مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۳، ۳۲۱-۳۲۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 71,3:321-327, 2016

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

سعیدزیبائی[1*] رضا برازنده[2] زرریناسحاقی[3] سید مهدی جعفری[4]
۱) بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن وسرم 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: لاکتو پراکسیداز آنزیمی از خانواده اکسیدوردوکتاز می‌باشد؛ که عامل مهم ضد باکتری محسوب می‌گردد. بدین علت بعنوان نگهدارنده مواد غذایی و آرایشی بهداشتی کاربرد دارد. تثبیت لاکتو پراکسیداز مزیت‌های 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 شترتوسط پلیمر آلژینات سدیم. **روش کار:** در این پژوهش آنزیم لاکتوپراکسیدازی با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس G- ۱۰۰ و کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون کربوکسی متیل سفادکس C-۵۰ از شیر شتراستخراج وخالص سازی شد. سپس با استفاده از آلژینات سدیم، گلیسرول وتوئین ۸۰ انکپسوله گردید. کارائی ریز پوشانی محاسبه گردید و اندازه ذرات ونحوه پراکنش آن‌ها توسط دستگاه پارتیکل سنج اندازه‌گیری شد. مرفولوژی ذرات و مشاهده میکروکپسول‌ها تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. پایداری آنزیم محلول و انکپسوله شده در دمای ۴°C طی ۷۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** پس از خالص سازی و تعیین خلوص توسط SD-SPAGE غلظتی معادل ۰/۲۸µg/ml برای هر یک از فراکسیون‌ها بدست آمد.همچنین کارائی ریزپوشانی ۸۴٪ تعیین و کپسول‌هایی کمتر از ۲۰۰nm تشکیل شد. در بررسی بامیکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داده شد که میکروکپسول‌ها دارای سطحی نسبتاً صاف، کروی دارای بهم چسبیدگی کم می‌باشند. پایداری لاکتوپراکسیداز انکپسوله درعرض ۷۰ روز ۸۱٪ بدست آمد. **نتیجه‌گیری نهایی:** روش انکپسوله کردن آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر توسط آلژینات سدیم روشی مناسب برای افزایش کارائی آنزیم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلژینات، تثبیت آنزیم، انکپسوله کردن، لاکتوپراکسیداز

مقدمه

شیر شتر با دارا بودن بیواکتیوها نظیر لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز و برخی ترکیبات خاص نظیر پروتئین اسیدی آب پنیر Whey Acidic Protein (WAP) و پپتیدهای شبه انسولینی همچنین بدلیل فقدان بتا دو لاکتوگلوبولین می‌تواند بعنوان غذای فراسودمند محسوب گردد. این محصول مهم دارای بیو اکتیوهایی است که هر کدام بنوبه خود بسیار با ارزش بوده و عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند (۸). لاکتو پراکسیداز بیو اکتیوی 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 می‌باشد. لاکتوپراکسیداز از آنزیم‌های مقاوم به حرارت است که به عنوان شاخص پاستوریزاسیون محسوب می‌گردد دارای یک گروه هم (آهن) و حدود ۱۰٪ کربوهیدرات می‌باشد (۱۰). سیستم ضد میکروبی لاکتوپراکسیداز، با افزایش دو ترکیب فعال کننده تیوسیانات و پراکسید هیدروژن اعمال می‌گردد. لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید می‌کند و به این ترتیب هیپوتیوسیانات باخاصیت ضدمیکروبی قوی تولید می‌گردد، این ترکیب با SH پروتئین‌های باکتریایی پیوند برقرار کرده و اثر بازدارندگی خود را بر ویروس‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها اعمال می‌نماید (۱۰). مقایسه توالی اسیدهای آمینه آنزیم لاکتوپراکسیداز انسان با لاکتوپراکسیداز گاو، گاومیش، گوسفند، بز و شتر نشان داد که تشابه‌ای حدوداً ۸۵٪ وجود دارد واین در حالی است که این مقایسه در بین حیوانات به استثنای شتر نشان می‌دهد که بین ۹۵ تا ۹۸٪ تشابه وجود دارد بنا براین لاکتوپراکسیداز شتر با سایر حیوانات تفاوت دارد (۱۹).

جهت افزایش کارائی آنزیم‌ها از تکنیک تثبیت آن‌ها استفاده می‌کنند. دو مزیت اصلی تثبیت آنزیم جداسازی آسان از محصولات و استفاده مجدد از آنزیم می‌باشد. بطور کلی از سه روش اتصال با حامل (Cross-linking method)، تثبیت با اتصال پل‌های عرضی (Cross-linking method) و بدام انداختن (Entrapping method) می‌توان برای تثبیت آنزیم‌ها استفاده نمود. انکپسوله کردن لاکتوپراکسیداز توسط آلژینات، روش سوم تثبیت آنزیم‌ها می‌باشد (۲). آلژینات یک صمغ هترو پلی ساکارید خطی است که در دیواره سلولی و فضای بین سلولی جلبک قهوه‌ای یافت می‌شود و قابلیت انعطاف و استحکام ساختمانی را برای گیاه فراهم می‌کند. از نقطه نظر ساختمانی آلژینات‌ها از واحدهای اسید - مانورونیک (M) و اسیدL - گلوکونیک (G) تشکیل شده‌اند که از طریق پیوندهای گلیکوزیدی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۳۱۷۸۰ نمابر: ۰۵۱-۳۸۴۲۰۴۳۰ Email: s.zibaee@mrazi.ac.ir

به یکدیگر متصل شـده‌اند 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 می‌باشـد. لذا جهت نگهـداری و فعالیت بهینه آنزیم انکپسـوله کردن آن می‌تواند حائز اهمیت باشد.

مواد و روش کار

مواد مورد اسـتفاده: شیر شـتراز شتر تک کوهانه بوم شناخت ترکمن (اسـتان گلستان)، مواد تترا متیل بنزیدین (از شـرکت AppliChem)، آلژینات کلسیم (از شرکت Fluka)، کلرید سدیم ، کلرید کلسیم ، سولفات آمونیوم، پراکسـید هیدروژن ۳٪، گلیسرین، دی متیل سولفوکساید، اسید کلریدریک، توئین ۸۰، تریس، گلیسین، آمونیوم پرسولفات، سدیم دودسیل سولفات، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول و از شرکت مرک آلمان تهیه شـدند. آلبومین سرم گاو، سـفادکس C–۵۰ ، سفادکس G–۱۰۰، آکریل آمید، بیس آکریل آمید ازشرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند.

اسـتخراج و خالص سـازی آنزیـم لاکتو پراکسـیداز: 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 وجدا سازی کازئین از آب پنیر و صاف کردن بمنظور کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین سـفادکس سـی۵۰ (CM sephadex C–۵۰) و ستونی به ابعاد (۳ cm ×۱۰) و برای ژل فیلتراسـیون از سـفادکس G– ۱۰۰ استفاده گردید. عمل متعادل سـازی با بافر فسفات سـدیم ۱۰mM با (pH=۶/۸) انجام گرفت. در کروماتو گرافی تعویض یونی جمع‌آوری فراکسـیون‌های حاوی پروتئین‌های با شستشـو توسط بافرفسـفات سدیم محتوی مقادیر مختلف کلرید سـدیم (۰/۲ M تا ۱) انجام شـد. میزان خلوص پروتئین در فراکسـیون‌های جمع‌آوری شـده به روش SDS– PAGE بررسی گردید. از رنـگ آمیزی نیترات نقره برای دیـدن باند حاوی پروتئین در ژل آکریل آمیـد ۱۲/۵٪ اسـتفاده گردید. به منظور تأیید وجود لاکتوپراکسـیداز از در فراکسیون‌ها، از آزمایش واکنش رنگی لاکتوپراکسیداز با تترا متیل بنزیدین (TMB) استفاده شد.

سـنجش فعالیت و بررسی سـنتیک آنزیم لاکتو پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم براساس روش تغییر یافته (۴) انجام گرفت. لاکتوپراکسیداز در حضورپراکسـید هیدروژن با (۳,۳ _ ۵,۵ _tetramethylbenzidine–) TMB واکنش رنگی نشـان ایجاد می‌نماید. برای انجام آزمایش مقدار ۱ml، ۲ TMBmmol به مقدار ۳۰۰µl نمونه اضافه شـد. با اضافه کردن مقـدار ۵۰۰µl پراکسـید هیـدروژن (H۲O۲– ۰/۳mM) شـرایط انجام واکنـش فراهم می‌گـردد. پس از ۵ دقیقه انکوباسـیون در ۳۷°C با اضافه کردن مقدار ۵۰۰µl اسیدسـولفوریک ۲N واکنش متوقف شده، پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در این شرایط جذب در طول موج ۴۵۰nm اندازه‌گیری شد. در این سـنجش از HRP (Horseradish Peroxidase) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. یک واحد (۱ U) فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز، مقـدار آنزیمی اسـت کـه اکسیداسـیون ۱µmol/min از سوبسـترای تترامتیـل بنزیدین را در دمـای ۲۵°C و pH ۶ در محصول رنگی (cm–۱ M–۱ ε= ۵۹۰۰۰) کاتالیز می‌کند. جهت بررسـی سنتیک فعالیت آنزیم از غلظت‌های مختلـف (۰/۱mM تا ۲/۵) TMB، در برابر مقدار مشـخص آنزیم (۵۰µg آنزیم) استفاده گردید. سنتیکی آنزیم–(Km, Vmax) فعالیت آنزیم در برابر غلظت‌های مختلف TMB سنجش شد. بر پایه ۱/[S](عکس غلظت سوبسـترا) و ۱/[V] منحنی لینوبور– بـرک (Linewear–Burk) رسم گردید.

تهیه محلول لاکتوپراکسیداز –آلژینات: لاکتوپراکسیداز درحجم نهایی ۰/۲٪ و نیز آلژینات سدیم در حجم نهایی۰/۲٪ استفاده گردید. بدین منظور لاکتوپراکسـیداز محلول در بافر فسـفات ۲۰۰mM با ۶/۵PH بتدریج در دمای محیط به محلول آلژینات افزوده و با همزدن در شـرایط (۸۵۰rpm – بمدت ۳۰ دقیقه و درجه حرارت ۲۵°C) محلول لاکتوپراکسیداز –آلژینات تهیه گردید.

تهیه محلول گلیسـرول–توئین ۸۰ : برای تهیه میزان ۲۵٪ حجمی/ حجمی گلیسـرول و ۴٪ W/W توئین۸۰ (بعنوان سورفاکتانت) مخلوط و بمدت ۱۵ دقیقه با اسـتفاده از حرارت مرطوب تا ۷۰ °C حرارت داده شـد و جهت استفاده، دمای محلول به دمای اتاق رسانیده شد.

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

تثبیـت توسـط یـون کلسـیم یـک درصد: محلـول کلرید کلسـیم (CaCl۲/۶H۲O) بـا غلظـت یـک درصد W/V تهیه وبـه آرامی (قطره قطره) داخل ۱۰۰ml امولسـیون چکانده شد. بعداز مدت ۴۵ دقیقه (۹۵۰– rpm – درجـه حرارت ۲۵ °C) که محلول حاصل هم زده شـد، 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 توسـط سانتریفوژ (۱۵۰۰ rpm) بمدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. در آخر کپسول‌ها تهیه شده سه بار با سرم فیزیولوژی شستو وتا قبل از استفاده در دمای ۴ °C نگهداری شدند.

بررسـی کارآئی ریز پوشـانی: مقدارلاکتوپراکسـیداز قبـل و پس از انکپسوله شـدن بااسـتفاده از روش برادفورد، اندازه‌گیری شد. جذب تمام نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵nm با اسـتفاده از دسـتگاه اسـپکتروفتومتری

(Japan-۲۸D۹۶۷۴۱-۱۶۰A-SHIMADZU-uv) اندازه‌گیری شد. ازآنجایی که دراین روش جهت تعیین مقدار پروتئین، آلژینات کلسیم تداخل نموده ودارای جذب می‌باشد، درتعیین مقدار،جذب یک محلول از کپسول آلژینات بدون لاکتوفرین باغلظت مشابه (شاهد) نیزخواند 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 شستشوی نهایی در نمونه وشاهد اندازه‌گیری گردید. جهت افزایش صحت و دقت آزمایش سه تکرا شد. جهت محاسبه کارآئی ریز پوشانی از معادله ۱ استفاده گردید.

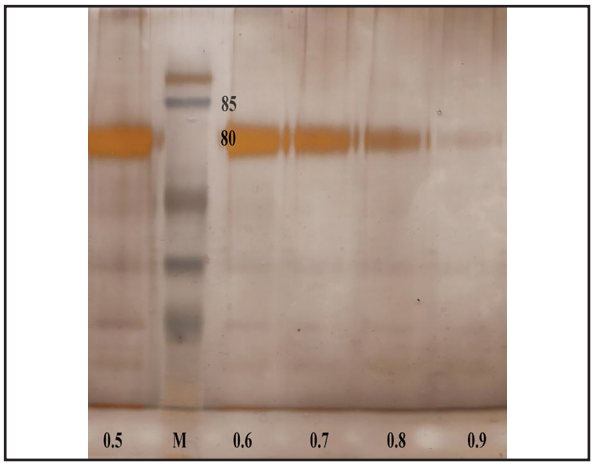
معادله ۱ $E\% = C-1\ C0/C100 \times 1$

در این معادله E کارآئی ریز پوشانی لاکتوفرین، C۱ و C۰ مقدار پروتئین موجود در محلول قبل و بعد از فرآیندانکپسوله کردن بر حسب میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد.

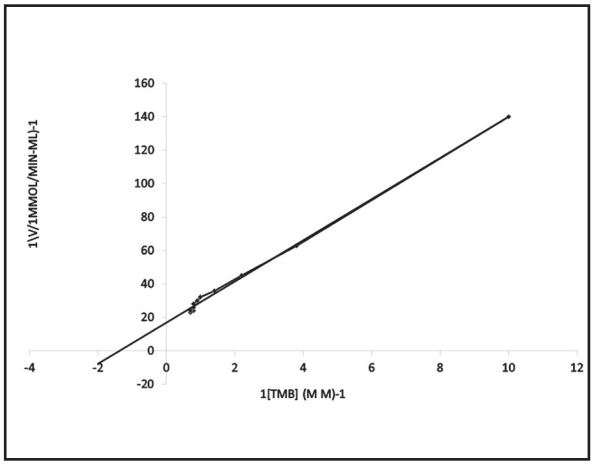
تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آن‌ها: اندازه کپسول‌ها و فراوانی هریک ازآن‌ها بااستفاده ازدستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات (Particle Size Analyser) مدل (SHIMADZU Japan ۲۱۰۱-SALD-) تعیین گردید. بدین منظور کپسول‌ها در آب یونزدایی شده (Milli Q Millipore USA) باضریب هدایت ۰/۰۵۴ µs پراکنده و نتایج براساس قطرحجم میانگین گزارش گردید.

تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده ریز ساختار تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (VP Germany ۱۴۵۰ LEO): جهت تعیین مرفولوژی ذرات ومشاهده شکل ظاهری نانوکپسوله‌ای ایجاد شده از میکروسکوپ SEM استفاده گردید. استاب نمونه‌ها پس از آماده سازی و پوشش به اتاقک نمونه تحت خلاء منتقل شدند. مشاهده کپسول‌ها بوسیله تابش الکترونی با ولتاژ ۲۰Kv 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 (سانتریفوژ ۱۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه) و در مرحله آخر شتشو با آب مقطر فاقد یون استریل دو بار انجام گرفت سپس تثبیت ذرات با گلوتارالدئید ۲٪ انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی یک استاب آلومنیومی (SC ۷۶۲۰ England) پوشیده شده با لایه‌ای از کربن به قطر ۱۲mm پخش و بوسیله یک لایه نازک رسانا 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.



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



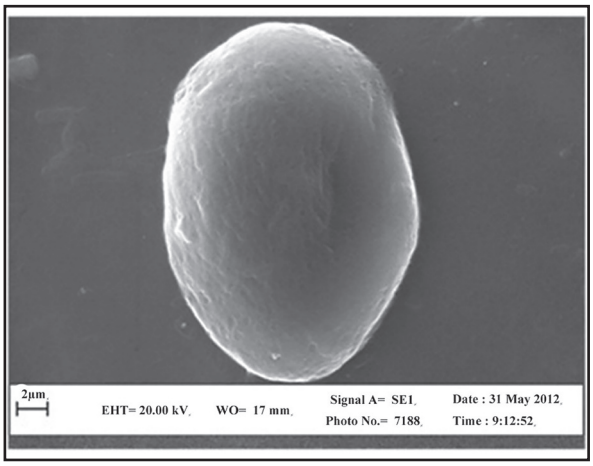
تصویر ۲. نمودار لینویور- برک آنزیم لاکتوپراکسیداز در حضورغلظت‌های مختلف TMB.

نتایج

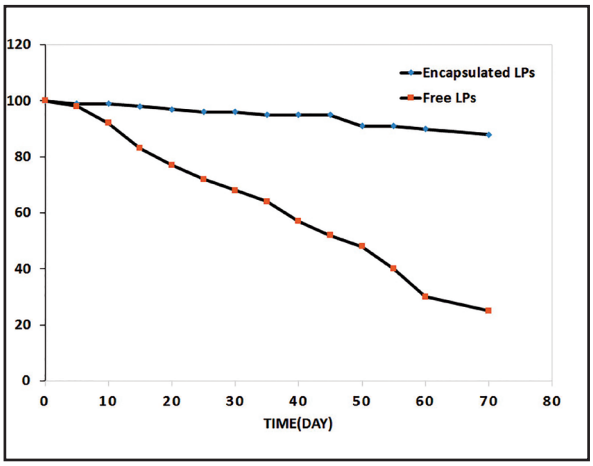
نتایج حاصل از خالص سازی لاکتو پراکسیداز: نتایج حاصل از سنجش پروتئین در فراکشن‌ها استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برروی سفادکس G-۱۰۰ (تصویر ۱) نشان داد که در می‌توان از فراکسیون‌های ۱۸ تا ۳۸ برای انجام مراحل بعد استفاده نمود. نتایج حاصل از SDS_PAGE و نیز واکنش رنگی با TMBخالص بودن لاکتو پراکسیداز 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 لاکتوپراکسیدازنشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم با pH ۶ می‌باشد.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت و بررسی سنتیک آنزیم لاکتو پراکسیداز: مقدار Vmax و Km برای آنزیم محلول به ترتیبml-۱min-۱µmol۰۴۵-و۰/۱mM۵۷-و۰/۱ و برای آنزیم بدست آمد (تصویر۲).



تصویر۳. تصویر SEM ازیک میکروکپسول آلژینات حاوی آنزیم لاکتوپراکسیداز.



تصویر۴. نمودار پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز محلول و انکپسوله در دمای ۴°C در زمان‌های مختلف.

نتایج حاصل از تعیین pH اپتیمم فعالیت لاکتوپراکسیدازنشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم ۱۰۰ mM و pH ۶ می‌باشد.

نتایج حاصل از انکپسوله کردن لاکتو پراکسیداز: بررسی نتایج حاصل از تشکیل میکروکپسول‌هاو نتایج حاصل از کارآئی 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 ۲۰۰ mic ایجاد نماید.

نتایج حاصل ازکارآئی ریز پوشانی نشان داد که بازده ۸۴٪ 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 ۲۰۰µm، سطح کپسول‌ها نسبتاً صاف، با بهم چسبیدگی کم و دارای شکلی نسبتاً کروی می‌باشند (تصویر ۳). باتوجه به نتایج به دست آمده ازآزمایشات می‌توان نتیجه گرفت که پلیمر آلژینات حاملی مناسب برای تثبیت آنزیم لاکتو پراکسیداز می‌باشد. زیرا آلژینات یک پلیمرطبیعی است که فاقد هرگونه مواد سمی می‌باشد و تأثیری بر روی ساختار آنزیم ندارد. تثبیت آنزیم اجازه استفاده مکرر ازآنزیم 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 آلژینات سدیم تا ۷۰ روز پس از نگهداری در ۴ °C توانسته است ۸۱٪ فعالیت خود را حفظ نماید در این در حالی است که با این شرایط تنها ۲۰٪ فعالیت آنزیم بدون تثبت شدن، حفظ شده است (تصویر ۴).

بحث

شیر شتر در نقاطی از دنیا دارای اهمیت اقتصادی زیادی است. بیواکتیوهای شیر نظیرلاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز و ایمونوگلوبولین‌ها به میزان قابل توجه‌ای درقسمت آب پنیری شیر یافت می‌شوند. فدراسیون جهانی محصولات لبنی توصیه می کند 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 فیزیکو شیمیایی مواد غذایی ایجاد نمی نماید. انکپسوله کردن آنزیم روشی برای افزایش کارآئی 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 Carboxy Methyl (CM) دارای بار منفی می‌باشند که به پروتئین با بار مثبت متصل می‌شوند. از آنجا ئیکه لاکتوپراکسیداز دارای بار مثبت است به این رزین متصل شده و در غلظت‌های مختلف نمکی می‌توان این اتصال را جدا نمود. از سایر روش‌ها کروماتو گرافی تمایل یونی توسط آگارز هپارین heparin-(agarose affinity chromatography) و نیز روش‌های ژل فیلتراسیون (gel filtration)، کروماتوکرافی تبادل یونی و سپس استفاده از ژل فیلتراسیون نیز برای خالص سازی لاکتوپراکسیداز می‌توان استفاده نمود. Elagamyand و Ruppanne در سال ۱۹۹۹ از روش تبادل یونی توسط کربوکسی متیل سلولز جهت خالص سازی لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز از شیر شتر استفاده کرده‌اند .آن‌ها از گرایان‌های M ۱-۰ کلرید سدیم برای جداسازی لاکتوفرین استفاده کردند(۵). Kinkadeand و kendarmiller در سال ۱۹۷۶از 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

لاکتوپراکسیداز شیر شتر را خالص نمودند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. ایـن محققیـن پس از خالص سـازی اثر لاکتوپراکسـیداز را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند (۳).

نتایـج تحقیق حاضر با نتایـج این محققین هم خوانـی دارد. پس از خالص سـازی سـنتیک فعالیت آنزیم (Km,Vmax) در برابر غلظت‌های مختلف TMB سنجش شد. کیلومتر یک آنزیم، نشان دهنده تمایل آنزیم به سوبستراست. بدیهی است هرچه کیلومتر یک آنزیم کوچکتر باشد، این آنزیم به غلظت کمتر سوبسـترا در محلول حساس‌تر است. و همینطو ر از این طریق می‌توان به وجود سوبسترای مناسب برای هر آنزیم پی برد (۲۱). آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده با استفاده از آلژینات سدیم، گلیسرول وتوئین ۸۰ انکپسـوله گردید. امکان تثبیت آنزیم‌ها با حامل‌های مختلف توسط روش‌های، مختلفی صورت می‌گیرد. معمولاً ارجحیت با روشی است کـه کمترین صدمه را به آنزیم وارد می‌نماید و در این میان سیسـتم‌هایی با سـهولت 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 دستیا بی به آن‌ها را راحت‌تر می کند (۷). یکی از پلیمرهای طبیعی که برای عمل تثبیت آنزیم مناسب می‌باشد آلژینات است. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که از آلژینات که کربوهیدراتی مناسب برای استفاده در سیستم‌های بیولووژیک است می‌توان بخوبی برای تثبیت آنزیم لاکتو پراکسیداز استفاده نمود. از آلژینات برای تثبیت آنزیم‌های دیگر نیز استفاده شـده اسـت (۲۴). آلژینات خواصی مانند قوام دهندگی، تعلیق، تشـکیل فیلـم، تثبیت، تولید ژل و پایدارسـازی امولسـیون را دارد (در این تحقیق همچنین جهت ایجاد استحکام بهتر کپسـول‌های تشکیل شده از کلرید کلسیم استفاده شد تا پیوند متقاطع القا شود (۱۸). Olivas و همکاران در سال ۲۰۰۸ اعتقاد دارند که فیلم‌های‌های آبدوست آلژینات، عایق ضعیف رطوبت هستند اما استفاده از کلسیم در فرمول، نفوذپذیری به بخار آب این فیلم‌هـا را کاهش داده و آن‌ها را در آب نامحلول می‌سـازد (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 فضاهای بین ملکولی آن‌ها می‌شـوند (۲۰). نتایج حاصل از بازده تشـکیل کپسول‌هایی با سطح نسبتاً صاف، شکلی کروی و بهم چسبیدگی کم و نگهداری آنزیم در طول زمان نشـان داد که از این روش بخوبی می‌توان برای انکپسـوله نمودن و تثبیت آنزیم لاکتوپراکسـیداز 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 لاکتو پراکسیدا تثبیت شده بر روی فیلم آلژینات استفاده نمودند (۲۳). Jafary و همکاران در سال ۲۰۱۳ از پلمر پلی آلانین که توسط گلوتارآلدئید فعال شـده بود برای تثبیت آنزیم لاکتو پراکسیداز اسـتفاده نمودند. در این روش میزان بـازده را ۹۱٪ برآورد نموده همچنین آنزیم پس از ۶۰ روز بعد از تثبیت توانسـته است ۸۰٪ کارآئی خود را حفظ نماید (۱۱). در مقایسه این تحقیق با مطالعه انجام گرفته، بازده ۸۴٪ وآنزیم تا۷۰ 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 4B) برای تثبیت آنزیم لاکتو پراکسیداز استفاده نموده‌اند این محققین نشان دادند که با استفاده از روش یاد شده پس از ۱۴ روز در دمای ۴ °C، ۶۰٪ از کارآئی آنزیم حفظ شده است (۱۵). همچنین Al–Baarri و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ترکیبات مختلف سـفارز ,SP Sepharose Big Beads (BB–SP) and SP Sepharose CNBr active (SP–CNBR) (SPFF) SP Sepharose Fast Flow برای تثبیت لاکتو پراکسیداز استفاده نموده‌اند. تحقیق یاد شده نشان داد که از ترکیبات متفاوت می‌توان برای تثبیت لاکتوپراکسیداز استفاده نمود (۱). بطورکلی با انجام این مطالعه نتیجه گرفته می‌شود که روش انکپسوله کردن آنزیم لاکتوپراکسـیداز توسط آلژینات سدیم را می‌توان یک روش سریع و ارزان و کاربردی دانسـت 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

بدینوسـیله از همکاری اعضاء محترم بخش تحقیقات دامپزشـکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق بخصوص سرکار خانم مجیدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Al-Baarri, A.N., Ogawa, M., Visalsok, T., Hayakawa, S. (2012) Lactopexoidase immobilized onto various beads for producing natural preservatives solution. J Applied Technol. 1: 4-6
2. Bickerstaff, G.F. (1997) Immobilization of enzyme and cells. In: Methods in Biotechnology Bickerstaff, G. F. Humana Press, Totowa New Jersey. p. 1-20.
3. Bolori Moghaddam, M., Bahmanpoor, S., Zibaee, 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.
4. Chávarri, F., Santisbean, A., Virto, M., Renobales, M. (1998) Alkaline Phosphatase. Acid

Phosphates, Lactoperoxidase, and Lipoprotein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. J Agric Food Chem. 46: 2926-2932.
5. Elagamy, E.I., Ruppanne, 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. Gobbetti, 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 lactoproxidase 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 studiesof 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) Biospecifc Immobilization of Lactoperoxidase on Con A-Sepharose 4B. Scientia Iranica. 14: 303-307.
16. Olivas, GI., Barbosa-Cánovas, GV. (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 _-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, a-lactalbumin, b-lactoglobulin B and b-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]

[1]*Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad- Iran*

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

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

[4]*Department 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 stablized 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 uncapsulated 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.

***Corresponding author's email: s.zibaee@mrazi.ac.ir, Tel: 051-38431780, Fax: 051-38420430**