

جداسازی و خالص سازی لاکتوفرین از شیر گاو

رمیسا شعربافی^۱ فاطمه مرادیان^۲ علیرضا رفیعی^۳ علی برزگر^۲

چکیده

سابقه و هدف: لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی با خواص مفید زیادی است که کاندید مناسبی جهت کاربردهای بالینی و تجاری است. اخیراً مشخص شده که تغذیه خوراکی لاکتوفرین اثرات مفیدی از جمله تعدیل عملکرد سیستم ایمنی، فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در سلامت نوزادان و بزرگسالان در انسان و حیوانات داشته است. به طوری که امروزه لاکتوفرین به عنوان مکمل غذایی انسان و حیوانات به کار می‌رود. این مطالعه با هدف جداسازی و خالص سازی بهینه لاکتوفرین از شیر گاو انجام گردید.

مواد و روش ها: کلستروم شیر گاو در فاصله حداکثر ۷۲ ساعت بعد از زایش اخذ گردید. ابتدا چربی شیر جدا شد برای جداسازی لاکتوفرین از سایر پروتئین های شیر، جداسازی در دو مرحله انجام گردید. ابتدا کازئین شیر با رسوب دهی با آمونیوم سولفات جدا گردید و در مرحله بعد لاکتوفرین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل کاتیونی CM-Sephadex-C50 با FPLC جداسازی شد. برای شناسایی پروتئین بدست آمده از روش SDS-PAGE استفاده شد.

یافته ها: پروتئین فعال لاکتوفرین خالص با وزن مولکولی ۸۰ KDa با غلظت ۲/۴ mg/ml بدست آمد. مرتبه خالص سازی توسط ستون کروماتوگرافی تبادل کاتیونی نسبت به مرحله اول خالص سازی، رسوب دهی با نمک آمونیوم سولفات ۴ مرتبه بوده است و بازده خالص سازی ۹۰ بود.

استنتاج: با توجه به اهمیت روز افزون کاربردهای درمانی، تغذیه‌ای و اثرات تنظیم کنندگی سیستم ایمنی مربوط به لاکتوفرین، یافتن روش خالص سازی مناسب با بازده بالا اهمیت فراوانی دارد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که روش فوق علاوه بر سادگی و سرعت می‌تواند باعث استحصال لاکتوفرین با خلوص بالا گردد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوفرین، جداسازی، خالص سازی، کروماتوگرافی تبادل کاتیونی

مقدمه

آهن را دارا می‌باشد. نام لاکتوفرین از طبقه بندی قدیمی آن به عنوان یک پروتئین مهم متصل شونده به آهن مشتق شده است (۱). لاکتوفرین بیشتر به عنوان لاکتوترانسفرین شناخته می‌شود (۲). ۶۰ درصد از توالی

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون است که تمایل زیادی به اتصال با آهن دارد. لاکتوفرین عضوی از خانواده ترانسفرین ها و وابسته به پروتئین هایی است که توانایی اتصال و انتقال

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۹-۸۷ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

Email: moradi_f@yahoo.com

مؤلف مسئول: فاطمه مرادیان - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه علوم پایه

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

۲. گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۳/۲۰ تاریخ تصویب: ۹۰/۵/۱۰

لاکتوفرین و ترانسفرین مشابه یکدیگر است و به همین دلیل لاکتوفرین به عنوان عضوی از این خانواده طبقه‌بندی می‌شود (۳). این پروتئین در اکثر ترشحات از جمله شیر، اشک، بزاق و همین‌طور به میزان زیاد در گرانول‌های اختصاصی نوتروفیل‌ها یافت می‌شود (۴). خواص بیولوژیکی آن شامل تنظیم جذب آهن در روده، محرک رشد سلول‌های حیوانی، خواص ضد التهابی، تعدیل‌کننده فعالیت سیستم ایمنی بدن و فعالیت ضد باکتریایی (۵)، ویروسی و نوموری می‌باشد (۶، ۷). لاکتوفرین به عنوان جزئی از سیستم ایمنی ذاتی معرفی شده است و در عین حال در واکنش‌های ایمنی اختصاصی نیز به طور غیر مستقیم دخالت می‌کند (۸). به علت موقعیت استراتژیک لاکتوفرین در سطح مخاط، یکی از اولین سیستم‌های دفاعی است که از ورود عوامل مهاجمی میکروبی از راه مخاط جلوگیری می‌کند (۹). لاکتوفرین بر روی رشد و تکثیر عوامل عفونی مختلف مانند باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت، تک یاخته، ویروس، انگل و قارچ‌ها تاثیر می‌گذارد (۱۰). لاکتوفرین با جذب آهن آزاد محیط را عاری از این عنصر می‌کند و در نتیجه باکتری‌ها و پاتوژن‌هایی که برای زندگی رشد و تکثیر خود به آهن نیاز دارند از آن محروم می‌مانند و قادر به ادامه زندگی نمی‌شوند و بدین ترتیب لاکتوفرین به طور غیرمستقیم عفونت را مهار می‌کند (۱۱).

لاکتوفرین از یک رشته پلی‌پپتیدی به طول ۶۸۹ اسید آمینه تشکیل شده است (۱۲). ساختمان پروتئینی آن شامل دو بخش (lobe)، آمینی (N-lobe) و کربوکسیلی (c-lobe) است (۱۳) که هر کدام قابلیت اتصال به آهن آزاد را دارا می‌باشند (۱۴-۱۶). در واقع لاکتوفرین یک آنتی‌اکسیدان است که آهن‌های آزاد را جستجو و اخذ می‌کند و مانع واکنش‌های رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳). در یک کارآزمایی بالینی در مورد مصرف خوراکی لاکتوفرین در هموستاز آهن زنان باردار نشان داده شد که لاکتوفرین کمبود آهن و کم‌خونی حاصل از کاهش آهن را جبران می‌کند (۱۷). تحقیقات پایه صورت گرفته

در مورد لاکتوفرین، اهمیت شیر مادر و سودمندی وجود لاکتوفرین در فرمول غذایی کودکان را نشان می‌دهد (۱۸). شواهد دیگری که تعیین‌کننده سودمندی لاکتوفرین در فرمول غذایی می‌باشد از جمله بهبود فلور طبیعی روده، افزایش فریتین سرم، افزایش سطح هماتوکریت و کاهش بیماری‌های تنفسی می‌باشد. علاوه بر این لاکتوفرین مانع اکسیداسیون لیپید در فرمول غذایی کودکان می‌شود (۱۹). این پروتئین با اثر ممانعت شیمیایی موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی در حلق، ریه، زبان، مثانه و کبد گشته است (۲۰). اثرات ممانعتی رشد سلول‌های سرطان کولون در تغذیه رت‌ها با لاکتوفرین مشخص شده است. به طوری که لاکتوفرین و لاکتوفریسین اثرات ضد متاستاز نیز دارند (۲۰). متابولیسم و مکانیسم عمل درمان با لاکتوفرین خوراکی تحقیق شده و نشان داد که لاکتوفرین خوراکی به طور کامل در مجرای گوارشی تجزیه نمی‌شود و به صورت پپتید لاکتوفریسین باقی می‌ماند که به طور معمول جذب خون نمی‌شود اما بر سیستم ایمنی روده و سیستم محافظتی سیستمیک اثر می‌گذارد (۲۱). با توجه به ارزش پروتئین خوراکی-دارویی لاکتوفرین، گسترگی اثرات تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی توسط آن، همچنین ارزش خالص‌سازی لاکتوفرین و استفاده جهانی آن سبب شده که مطالعات گسترده در مورد این پروتئین صورت گیرد. بنابراین خالص‌سازی پروتئین فوق در مطالعه حاضر، فرصتی برای بدست آوردن کاربردهای جدید لاکتوفرین علاوه بر انجام مطالعات ضد میکروبی و ضد سرطانی آن در حوزه پزشکی خواهد بود. نتیجه حاصل از این تحقیق این است که پروتئین خالص شده به لحاظ خلوص و غلظت، متناسب کاربرد در تست‌های ضد میکروبی و ضد سرطانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی لاکتوفرین از شیر گاو:

این مطالعه در فاصله زمانی ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ در مرکز

بیشتر از ۹ می باشد که این pH ایزوالکتریک در فرایند جداسازی آن از سایر پروتئین های آب پنیر کمک شایانی می نماید. PH ایزوالکتریک بالا در لاکتوفرین موجب ایجاد شارژ مثبت در PH خنثی در پروتئین می گردد حال آن که در این شرایط بیشتر پروتئین های شیر اسیدی هستند (۲۲). بنابراین ستون تبادل کاتیونی در pH خنثی روش معمولی برای جداسازی لاکتوفرین از آب پنیر حاصل از شیر است. برای خالص سازی لاکتوفرین از دستگاه FPLC (مدل LP، بیورد آمریکا) استفاده شد تا ستون های آن در مقایسه با HPLC امکان بارگزاری مقادیر بیشتر پروتئین و استفاده از دامنه گسترده تر از بافرها را فراهم سازد. برای این منظور نمونه های پودر شده پروتئین در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار حل شده و سپس روی ستون CM-sephadex-C50 برده شد. ابتدا ستون با بافر فسفات ۲۰ میلی مولار به تعادل رسید سپس بعد از ورود نمونه، پروتئین ها در شیب غلظت نمکی صفر تا ۰/۵ مولار توسط بافر خروج که شامل بافر فسفات و NaCl یک مولار می باشد از ستون با سرعت ۰/۷۵ میلی لیتر در دقیقه تحت فشار ۵ MPa خارج گردید. پروتئین لاکتوفرین در مولاریته ۰/۴ تا ۰/۵ نمک، خارج شد.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE):

جهت بررسی خلوص لاکتوفرین بدست آمده از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد (تانک الکتروفورز عمودی، ساخت شرکت بیورد BioRad). ژل SDS-PAGE به صورت دو قسمتی، در بالا ژل تراکم کننده ۵ درصد و در پایین ژل جدا کننده Running Gel د. درصد تهیه شد. نمونه های پروتئینی در حضور مارکر اندازه پروتئینی در طول ژل تحت جریان الکتریسیته با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲ ساعت حرکت نموده و پس از پایان الکتروفورز ژل با رنگ کماسی بلو R250 رنگ آمیزی شده و پس از رنگ بری

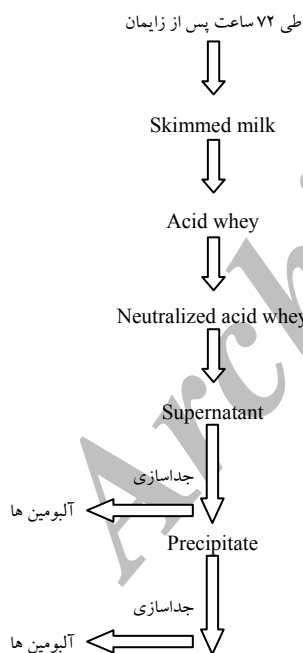
تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و پژوهشکده ژنتیک و تکنولوژی زیستی کشاورزی طبرستان انجام گردید. کلستروم شیر گاو در طی ۷۲ ساعت پس از زایمان از ۱۰ راس گاو در ظروف استریل جمع آوری گردید و در شرایط دمایی ۴ تا ۶ درجه سانتیگراد به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی منتقل شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۰۰۰۰ xg سانتریفیوژ گردید تا خامه آن جدا شود. بعد از جداسازی خامه، به منظور جداسازی پروتئین کازئین، شیر پس چرب (Skim milk) به دست آمده را با استفاده از HCl ۲ نرمال به pH = ۴/۶ رسانده و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. رسوب کازئین با سانتریفیوژ از نمونه ها جدا گردید. آب پنیر اسیدی (Acid whey) بدست آمده توسط NaOH دو نرمال خنثی شده و pH آن به ۶/۸ رسید. جهت جداسازی گلوبولین ها از آب پنیر، ۲۶۷ گرم آمونیوم سولفات به آرامی به یک لیتر از آب پنیر بدست آمده افزوده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ x g در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل از پروتئین گلوبولین دور ریخته شد و به مایع رویی باقی مانده به ازای هر لیتر ۲۵۰ گرم سولفات آمونیوم افزوده گردید تا لاکتوفرین ها رسوب نمایند. لاکتوفرین ها بوسیله سانتریفیوژ با شرایط قبلی جدا شدند. به منظور جداسازی نمک سولفات آمونیوم از پروتئین، عمل دیالیز با استفاده از کیسه های دیالیز با نقطه برش ۱۰ KDa در دمای ۴ درجه سانتیگراد و بر روی هیتراستیر با سرعت ۲۰۰ rpm/min به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار انجام گرفت. سپس نمونه ها جهت تغلیظ بیشتر به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفتند تا لاکتوفرین به صورت پودر در آید.

خالص سازی با استفاده از دستگاه FPLC و ستون کروماتوگرافی CM-Sephadex-C50:

لاکتوفرین یک پروتئین کاتیونی با pH ایزوالکتریک

این نوع ستون کروماتوگرافی در غلظت نمکی متفاوت به راحتی از هم قابل تمایز هستند. پروتئین‌های شیر به ترتیب با درصدهای متفاوت از غلظت نمک (۱ مولار NaCl) خارج گشته که در مولاریته ۰/۴ تا ۰/۵ نمک، پروتئین لاکتوفورین از ستون خارج گردید (تصویر شماره ۲). مراحل خالص سازی و میزان خالص سازی تعیین گردید (جدول شماره ۱). جهت تأیید پروتئین فوق از الکتروفورز SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۰ درصد استفاده شد وجود مارکر وزن مولکولی و لاکتوفورین استاندارد، باند لاکتوفورین مورد نظر را تأیید نمودند. نمونه‌های حاوی لاکتوفورین خالص شده در دستگاه لیوفلیزه تغلیظ شده و غلظت آن‌ها به روش براد فورد تعیین گردید (تصویر شماره ۳).

جمع آوری نمونه کلسیوم شیر گاوی



دیالیز در بافر فسفات به مدت ۲۴ ساعت سپس

تغلیظ پروتئین توسط دستگاه فریز درایر

تصویر شماره ۱: فلوجارت جداسازی لاکتوفورین از کلسیوم گاوی

سرعت خروج بافر برای شستشوی ستون و استخراج لاکتوفورین ۰/۷۵ ml/min بود و لاکتوفورین در غلظت

با محلول رنگ بر (اتانول + اسید استیک) باندهای پروتئین آشکار گردیدند.

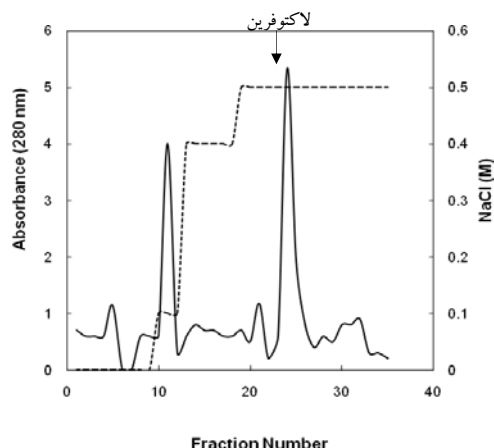
تعیین غلظت پروتئین با روش براد فورد:

پروتئین‌های خالص شده با استفاده از روش براد فورد تعیین غلظت شدند. بدین منظور ابتدا غلظت‌های متفاوتی از استاندارد (BSA) پروتئین آلبومین گاوی در ۶ لوله به صورت ذیل تهیه شد: ابتدا در هر لوله ۹۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد (Bradford) ریخته و سپس به آن‌ها مقادیر ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم از پروتئین استاندارد BSA اضافه شد. ۲ لوله از غلظت‌های پروتئین خالص شده با دو حجم به ترتیب ۵ و ۳۰ میکرولیتر تهیه شد سپس حجم تمام لوله‌ها توسط آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و لوله‌ها به طور یکسان مخلوط شدند. خواندن جذب نمونه‌ها از زمان ۱۰ دقیقه تا ۱ ساعت در ۵۹۵ نانومتر انجام گرفت و غلظت لاکتوفورین خالص شده با استفاده از منحنی استاندارد ۲/۵ µg/µl به دست آمد.

یافته‌ها

به منظور خالص سازی لاکتوفورین ابتدا چربی شیر با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی شد و سپس استخراج پروتئین‌های شیر طی دو مرحله صورت گرفت ابتدا با رسوب آمونیوم سولفات بخشی از پروتئین‌های شیر جداسازی شدند (تصویر شماره ۱). سپس پروتئین‌های باقی مانده تغلیظ شده حاوی لاکتوفورین را دیالیز نموده و جهت خالص سازی بیشتر بر روی ستون کروماتوگرافی تبادل کاتیونی CM-Sephadex-C50 برده شدند. فاز استخراج شامل دو پیک اصلی است که پیک اول خروج لاکتوپراکسیداز را نشان می‌دهد که در غلظت نمکی پائین صورت گرفته و پیک دوم مربوط به لاکتوفورین می‌باشد که در غلظت نمکی بالا (۵۰ درصد) خارج شده است. با توجه به این که این دو پروتئین هم وزن می‌باشند (۸۰ KDa) و خصوصیات تقریباً مشابهی دارند اما در

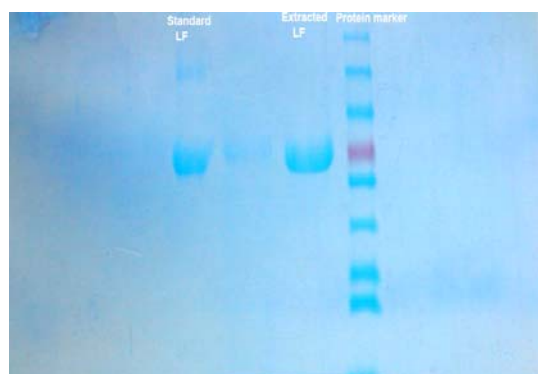
نمکی ۰/۵ مولار از ستون خارج گردید و به طور کلی مدت زمان خالص سازی ۳ ساعت بود.



تصویر شماره ۲: منحنی خالص سازی لاکتوفیرین کلاستروم شیر گاو با استفاده از ستون تبادل کاتیونی

جدول شماره ۱: مراحل خالص سازی پروتئین لاکتوفیرین از کلاستروم شیر گاو

مرحله خالص سازی	حجم اولیه ml	غلظت پروتئین Mg/ml	مرتبته خالص سازی
سولفات آمونیم	۱۰۰۰	۹/۵۳	۱
CM-Sephadex-C50	۳۵	۲/۴	۴



تصویر شماره ۳: تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به لاکتوفیرین خالص سازی شده از کلاستروم شیر گاو

بحث

مطالعه حاضر با هدف جداسازی و افزایش خلوص و غلظت لاکتوفیرین از کلاستروم شیر گاو جهت اهدافی

نظیر ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی و ضد توموری انجام گردید. امروزه غذای کودکان با فرمول حاوی لاکتوفیرین گاوی در کشورهای ژاپن، کره و اندونزی فروخته می شود. محصولات دیگری که شامل لاکتوفیرین گاوی می باشند از جمله: ماست، شیر پر چرب، قرص های مکمل، غذای حیوانات، کودکان و محصولات آرایشی هستند. تخمین زده شده که تولید لاکتوفیرین تنها توسط یک کمپانی در سال ۲۰۰۳ حدود ۷۹ تن بوده است که اهمیت تولید این پروتئین را نشان می دهد (۲۳). مراحل خالص سازی لاکتوفیرین با استفاده از ستون های کروماتوگرافی متنوع از جمله کروماتوگرافی تمایلی (Affinity) و تبادل یونی (Ion exchange) قابل انجام می باشد که تنها در نوع اول می تواند به صورت تک مرحله ای خالص سازی صورت گیرد و در سایر موارد خالص سازی به مراحل دوم یعنی استفاده از ستون ژل فیلتراسیون منجر خواهد شد. هر چند خالص سازی لاکتوفیرین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی به صورت تک مرحله ای قابل جداسازی می باشد اما عدم مزیت این روش در این است که معمولاً پروتئین خالص شده غیر فعال می باشد که باید توسط روش های فعال سازی مجدداً فعال گردد. از جمله کروماتوگرافی های تمایلی برای خالص سازی لاکتوفیرین، DNA و هیپارین و همچنین متال (مس) کروماتوگرافی تمایلی است که بعد از آن نیاز به کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای خالص سازی نهایی می باشد (۲۴). استفاده از هیپارین سفاروز کروماتوگرافی تمایلی برای خالص سازی لاکتوفیرین انسانی نیز گزارش شده است (۲۵-۲۷). لاکتوفیرین یک پروتئین کاتیونی (بار مثبت) است که می تواند توسط کروماتوگرافی تعویض یونی خالص سازی گردد با توجه به طبیعت کاتیونی لاکتوفیرین یکی از رایج ترین روش خالص سازی استفاده از ستون تبادل کاتیونی از جمله کربوکسی متیل سفادکس است که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته که نتایج حاصل از این روش با توجه به تک مرحله ای شدن خالص سازی قابل مقایسه با

حالی که در سایر مطالعات جداسازی از شیر معمولی گاو انجام شده است. از طرف دیگر یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده از FPLC جهت خالص‌سازی لاکتوفیرین در مواقعی که محتوای پروتئینی نمونه بسیار چشمگیر می‌باشد، می‌تواند بر سایر روش‌های جداسازی نظیر HPLC برتری داشته باشد (۳۲). این استنتاج از آنجا منشا می‌گیرد که ستون‌های تبادل کاتیونی مبتنی بر بارگذاری مقادیر زیاد پروتئین بکار رفته در FPLC، شرایط لازم برای خاص‌سازی را به نحو مطلوب فراهم خواهد آورد.

سپاسگزاری

محققین لازم می‌دانند از زحمات و همکاری‌های مفید خانم زهرا حسینی خواه کارشناس مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و همچنین دام‌دارهای عزیز که امکان انجام این مطالعه را فراهم آوردند تشکر نمایند. این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی طبرستان انجام گردید.

کروماتوگرافی‌های تمایلی انجام شده می‌باشد. در گزارش‌های موجود (از خالص‌سازی لاکتوفیرین با منشا انسانی، گاوی و شتر) مرتبه خالص‌سازی و بازده آن ناچیز بوده است (۲۸).

یافته‌های حاصل از الکتروفوز SDS-PAGE خلوص بالای این پروتئین بعد از تنها یک مرحله خالص‌سازی را تایید می‌نماید. این یافته با مطالعات سایر محققین همراستا می‌باشد (۲۹، ۱۹). نکته جالب در این مطالعه راندمان نسبتاً بالای فرایند تخلیص لاکتوفیرین می‌باشد به طوری که میزان لاکتوفیرین بدست آمده از یک لیتر شیر گاو حدود ۲/۴ mg/ml می‌باشد. این در حالی است که در مطالعات قبلی غلظت لاکتوفیرین اتحصال شده از کلستروم شیر گاو ۰/۱ تا ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۳۱، ۳۲). این اختلاف معنی‌دار می‌تواند مربوط به روش جداسازی و خالص‌سازی و بهینه‌سازی این روش و همچنین دقت در عمل باشد. در این مطالعه از کلستروم شیر گاو‌هایی استفاده شد که حداکثر ۷۲ ساعت از زایمان آن‌ها می‌گذشت که خود سرشار از انواع پروتئین‌های متراکم شده می‌باشد در

References

1. Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals* 2010; 23(3): 365-376.
2. Gifford JL, Hunter HN and Vogel HJ. lactoferrin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(22): 2588-2598.
3. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, furmanski DH. Lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* 1994; 54(9): 2310-2312.
4. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(22): 2588-2598.
5. Yen CC, Shen CJ, Hsu WH, Chang YH, Lin HT, Chen HL, et al. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. *Biometals* 2011; 24(4): 585-594.
6. Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y, Tamai Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *J Dairy Sci* 2002; 85 (9): 2065-2074.
7. Yamunchi K, Tomita M, Geili TJ, Ellison RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 1993; 61(2): 719-728.

8. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(22): 5449-2559.
9. Kirk Patrik CH, Green I, Rich RR, Schade AL. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron unsaturated lactoferrin. *J Infec Dis* 1971; 124(6): 539-544.
10. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganism. *Infect Immun* 1980; 28(3):893-898.
11. Crosa JH. Genetics and molecular biology of siderophore-mediate iron transport in bacteria. *Microbiolo Rev* 1989; 53(4): 517-530.
12. Baker EN, Baker HM, Kidd RD. Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol* 2002; 80(1): 27-34.
13. Kim WS, Shimazaki K, Tamura T. Expression of bovine lactoferrin C-lobe in *Rhodococcus erythropolis* and its purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(11): 2641-2645.
14. Artym J. The role of lactoferrin in the iron metabolism. Part II. Antimicrobial and antiinflammatory effect of lactoferrin by chelation of iron. *Postepy Hig Med Dosw*. 2010; 64(30): 604-16.
15. Feng X, Liu C, Guo J, Bi C, Cheng B, Li Z, et al. Expression and purification of an antimicrobial peptide, bovine lactoferricin derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 2010; 60(3): 179-184.
16. Barker EN, Barker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(22): 2531-2539.
17. Paesano R, Pietropaoli M, Gessani S, Valenti P. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. *Biochimie* 2009; 91(1): 44-51.
18. Manzoni P, Tarnow-Mordi W, Franco C, Gallo E, Spera AM, Rizzollo S, et al. Clinical use of lactoferrin in preterm neonates: an update. *Minerva Pediatr* 2010; 62(3 Suppl 1): 101-104.
19. AL-Mashikhi ShA, Nahai Sh. Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration technique. *J Dairy Sci* 1987; 70(12): 2486-2492.
20. Tsuda H, Fukamachi K, Xu J, Sekine K, Ohkubo S, Takasuka N, et al. Prevention of carcinogenesis and cancer metastasis by bovine lactoferrin. *Proc Jpn Acad Ser B* 2006; 82(7): 208-215.
21. Takase K, Hagiwara K, Onodera H, Nishizawa Y, Ugaki M, Omura T, et al. Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance. *Biochem Cell Biol* 2005; 83(2): 239-249.
22. Pedersen L, Mollerup J, Hansen E, Jungbauer A. Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 790(1-2): 161-173.
23. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J* 2006; 16(11): 1241-1251.
24. Lonnerdal B, Carlsson J, Porath J. Isolation of lactoferrin from human milk by metal chelate affinity chromatography. *FEBS Lett* 1977; 75(1): 89-92.
25. Blackberg L, Hernell O. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Letters* 1980; 109(2): 180-183.
26. Wang C, Chan W, Kloer HU. Comparative studies on the chemical and immunochemical

- properties of human milk, human pancreatic juice and bovine milk lactoferrin. *Comp Biochem Physiol B* 1984; 78(3): 575-580.
27. Hutchens TW, Magnuson JS, Yip T. Interaction of human lactoferrin with DNA: one-step purification by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. *Pediatr Res* 1989; 26(6): 618-622.
 28. Yoshida S, Xiuyun Y. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *J Dairy Sci* 1991; 74(5): 1439-1444.
 29. Plate K, Beutel S, Buchholz H, Demmer W, Fischer-Frühholz S, Reif O, et al. Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J Chromatogr A* 2006; 1117(1): 81-86.
 30. Heebøll-Nielsen A, Justesen SF, Thomas OR. Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers. *J Biotechnol* 2004; 113(1-3): 247-262.
 31. Copeland RA. *Method for protein analysis*. 2nd ed. Chapman and Hall, New York, 1994.
 32. Santos MJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879(7-8): 475-479.

Archive of SID