

## عزل وتنقية وتوصيف بروتين اللاكتوفيرين من شرش الجبن ودراسة بعض خصائصه الجزيئية

محمد صبحي خطاب وكفاح سعيد دوش

قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة/ جامعة بغداد

### الخلاصة

عزل بروتين اللاكتوفيرين من شرش الجبن باستخدام تقنية كروماتوكرافي التبادل الأيوني باستخدام عمود التبادل الأيوني الموجب الشحنة CM-Sephadex C-50 وذلك بعد تهيئة الشرش بفرز الدهن بالطرد المركزي المبرد والتخلص من الأملاح والسكر باستخدام الديليزة؛ تبع ذلك استخدام كروماتوكرافي الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-100 للحصول على درجة عالية من النقاوة وقد كانت الحصيعة البروتينية وعدد مرات التنقية لخطوة التبادل الأيوني والترشيح الهلامي هي (66.89% و 55.86%) و (46.13 و 57.58) على التوالي كما تم التأكد من نقاوة البروتين بأجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكريلاميد بوجود العوامل الماسخة SDS حيث ظهرت حزمة بروتينية واحدة للبروتين؛ ثم درست بعض من صفاته حيث بلغ وزنه الجزيئي 79 كيلو دالتون بخطوة الترشيح الهلامي و 79.5 كيلو دالتون بخطوة الترحيل الكهربائي. كان المحتوى الكاربوهيدراتي للبروتين 11.08% بينما بلغت نسبة الحديد 169.3 جزء بالمليون وبتشبع 12.09%.

كلمات مفتاحية: لاکتوفیرین، شرش الجبن، عزل، تنقية، توصيف، خصائص

e-Mail: msubhi467@gmail.com

## Isolation, Purification and Characterization lactoferrin from Whey protein and study some of its molecule characteristics

M. S. Katab and K. S. Doosh

Department of Food Science- College of Agriculture/ University of Baghdad

### Abstract

Lactoferrin isolated from whey cheese by using Ion exchange chromatography through CM-Sephadex C-50 before this stage the whey was skimmed by Cooling centrifugation and demineralized against distilled water using dialysis bag, after this stage gel filtration chromatography was used to purified lactoferrin in a high degree of purification. The purity of lactoferrin to homogeneity was examined by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) with single band. The purification fold and yield were (55.86% time and 66.89%) and (57.58 and 46.13) respectively. Some biochemical characteristics of the purified Lactoferrin were determined. The molecular weight of LF were 79 and 79.5 KD as determined by gel filtration and SDS-PAGE respectively. The percentage of carbohydrate content in bovine Lactoferrin was 11.08% mean while the Iron percentage was 169.3 ppm and as a saturated percent 12.09%.

Key word: Lactoferrin, cheese whey, Isolation, Purification, Characterization

### المقدمة

أحتل الحليب ومنتجات الألبان مواقع متصدرة في العالم كأحد أهم الأغذية التي تشكل العصب الحيوي في نظام الإنسان الغذائي بجميع المراحل العمرية لاحتوائه على العديد من العناصر الغذائية والبيبتيدات الفعالة حيويًا والتي تلعب دور مهم في الحفاظ على المستوى الصحي بشكل متوازن؛ إذ استمرت البحوث لعدة أعوام في كيفية استخلاص هذه البيبتيدات الفعالة حيويًا والموجودة في الحليب وبكميات ترضي طموح الواقع التجاري والصحي وبأقل كلفة اقتصادية تعود

إلى شركات التصنيع؛ حيث تمتلك هذه الببتيدات فعل بيولوجي واسع التأثير على العديد من الأحياء المجهرية المرضية ومنع حدوث العديد من الأمراض الشائعة وقد أحتل بروتين اللاكتوفيرين موقع متصدر بين هذه الببتيدات الفعالة (1)، (2). يعد بروتين اللاكتوفيرين أحد بروتينات الحليب الثانوية والتي تشمل Lactoferrin و Immunoglobulin و Lysozyme و Lactoperoxidase والذي يعد الشرش مصدر غني بها(3)؛ وعلى الرغم من وجود اللاكتوفيرين بتركيز منخفضة في الحليب إلا أنه يلعب دور مهم في الحفاظ على نظام متوازن لمركبات الحليب ومن أهمها دهن الحليب والبروتين؛ وقد ظل بروتين اللاكتوفيرين محط أنظار العلماء لسنين عديدة لما يمتلكه من فعل مضاد للعديد من الأحياء المجهرية المسببة للالتهابات ومضاد للأكسدة ومثبط لنمو العديد من خطوط الخلايا السرطانية ومعزز لعمل الجهاز المناعي (4)؛ يصنف بروتين اللاكتوفيرين كأحد البروتينات السكرية glycoprotein ذو وزن جزيئي 80 كيلو دالتون ينتمي اللاكتوفيرين إلى عائلة بروتينات الترانسفيرين لاحتوائه على الحديد في تركيبه إذ يمتلك قابلية استثنائية على ربط الحديد؛ يتألف بروتين لاکتوفيرين الأبقار من سلسلة مفردة من 708 من الأحماض الأمينية(5)؛ يساهم اللاكتوفيرين في إطالة العمر الخزن للليب الخام من خلال الخصائص التي يمتلكها فهو يمتلك فعل مضاد للأكسدة عن طريق إيقاف الجذور الحرة ومنع أكسدة الدهون والتحلل البروتيني عن طريق إيقاف نمو الأحياء المجهرية المفرزة للأنزيمات المحللة للدهون والبروتين؛ كذلك له دور في المساعدة في تطور نمو الأطفال حديثي الولادة(6). نظراً لأهمية اللاكتوفيرين الصحية والتصنيعية وكون شرش الجبن مصدراً غنياً باللاكتوفيرين وبغية الاستفادة منه لكونه مادة عرضية تنتج من صناعة الجبن في العديد من مصانع ألبن العراق ولعدم وجود دراسة مسبقة حول إمكانية عزل وتنقية بروتين اللاكتوفيرين من شرش الجبن؛ أجريت الدراسة الحالية وباستخدام تقنية كروماتوغرافي التبادل الأيوني والترشيح الهلامي لعزل وتنقية اللاكتوفيرين ودراسة بعض خصائصه الجزيئية.

### المواد وطرائق العمل

تم الحصول على الشرش من معمل ألبن كلية الزراعة/ جامعة بغداد/ أبي غريب والتابع لقسم علوم الأغذية كنتاج عرضي بعد صناعة الجبن الطري؛ تم فرز الدهن بالطرد المركزي المبرد بسرعة 4000 دورة/ دقيقة لمدة نصف ساعة ودرجة حرارة 4 م°؛ أزيل الكازين المتبقي بالطرد المركزي المبرد على درجة حرارة 4م° بسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة؛ أجري للشرش المحضر خطوة ديلزة باستخدام أكياس ديلزة خاصة لطرد الأملاح واللاكتوز تجاه الماء المقطر لمدة 24 ساعة ومن ثم حفظ الشرش بالتجميد إلى حين الاستخدام(7).

عزل وتنقية اللاكتوفيرين: تم عزل وتنقية بروتين اللاكتوفيرين حسب ما ذكره (8) تضمنت الطريقة استخدام تقنية كروماتوغرافي التبادل الأيوني باستخدام عمود التبادل الأيوني Carboxymethyl Sephadex ( CM- Sephadex و كروماتوغرافي الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-100).

تقدير البروتين: تم تقدير البروتين حسب طريقة برادفورد (9).

فحص النقاوة: تم التأكد من نقاوة البروتين باستخدام Polyacrylamide gel electrophoresis وبوجود العوامل الماسخة SDS-PAGE وبحسب ما ذكره (10).

تقدير الوزن الجزيئي للبروتين بالترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلاميد بوجود العوامل الماسخة SDS-PAGE: أتبعنا الطريقة الموصوفة من قبل(11) وذلك باستخدام مجموعة من البروتينات القياسية ذات أوزان جزيئية

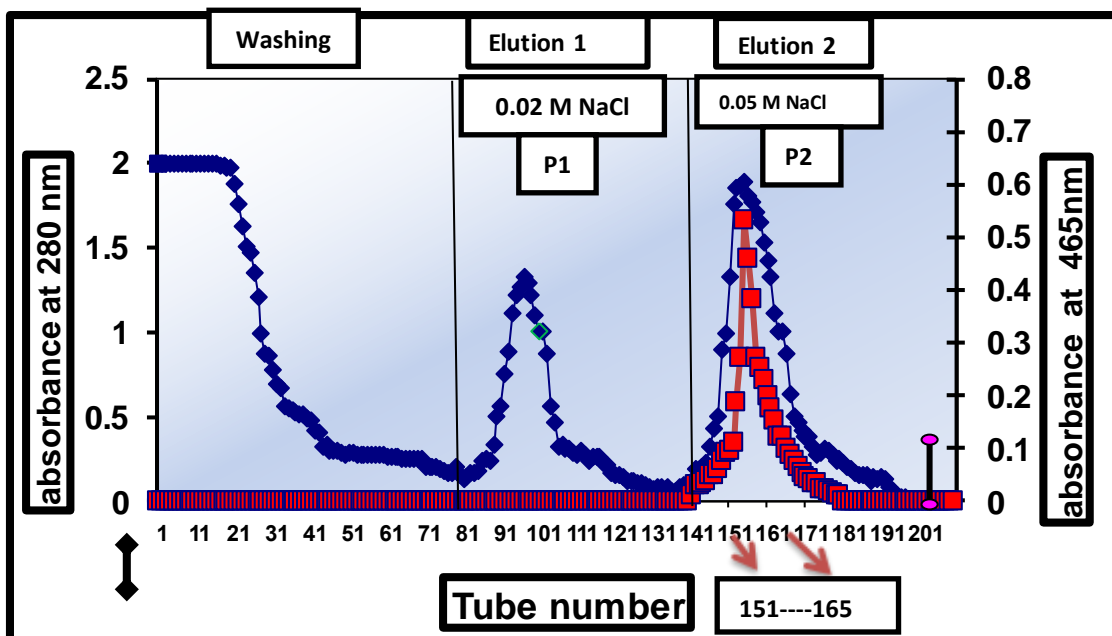
تراوحت من 15000 دالتون إلى 170000 دالتون. ومن ثم قدر الوزن الجزيئي لبروتيني اللاكتوفيرين عن طريق رسم العلاقة بين لوغاريتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية مع الحركة النسبية (Relative mobility (Rm). تقدير المحتوى الكربوهيدراتي لبروتيني اللاكتوفيرين: استخدمت طريقة الفينول- حامض الكبريتيك في تقدير المحتوى الكربوهيدراتي لبروتيني اللاكتوفيرين وبحسب ما ذكره (12). تقدير محتوى اللاكتوفيرين من الحديد: تم تقدير محتوى بروتيني اللاكتوفيرين من الحديد بموجب ما ذكره (13) وقد استخدم مطياف الامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometer في قياس نسبة الحديد الكلي في نموذج البروتين وحسب المعادلة التالية:

تركيز الحديد الكلي (ppm) = (الامتصاص الذري للعينة - الامتصاص الذري للبلانك) × الحجم النهائي للنموذج / وزن النموذج (غم) × معامل التخفيف

### النتائج والمناقشة

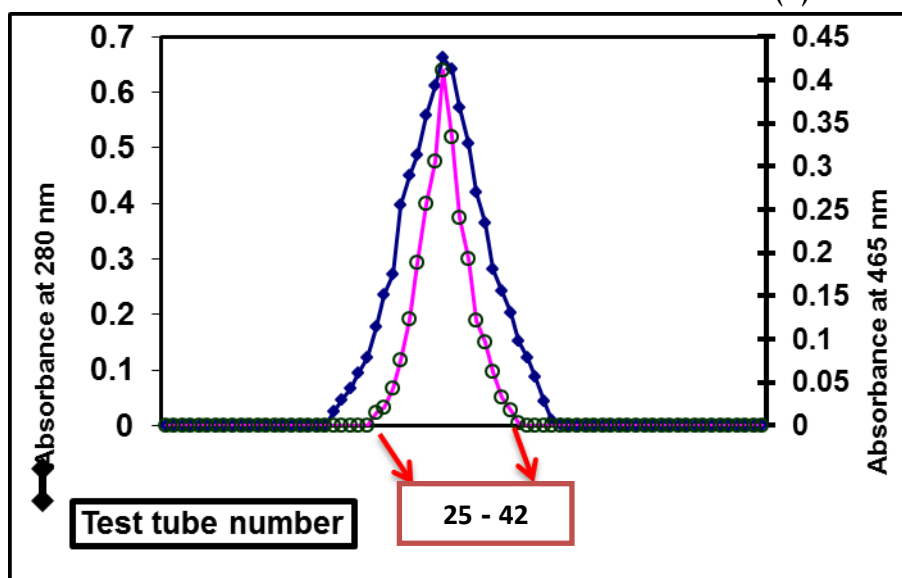
تم عزل وتنقية بروتيني اللاكتوفيرين باستخدام خطوتين الأولى باستخدام تقنية كروماتوغرافي التبادل الأيوني الموضحة في الشكل (1) والثانية بكروماتوغرافي الترشيح الهلامي الموضحة في شكل (2) تم التأكد من نقاوة البروتين باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة SDS-PAGE شكل (3) إذ استخدم المبادل الأيوني الموجب الشحنة CM-SephadexC-50 في عزل وتنقية بروتيني اللاكتوفيرين لما يمتاز به من خصائص مهمة منها سهولة تحضيره مع إمكانية استعماله لمرات عديدة بعد إعادة تنشيطه مرة أخرى (14)، مزج الشرش المحضر مع المبادل الأيوني المنشط CM-Sephadex C-50 لمدة ساعة مع التحريك بهدوء؛ مرر المزيج عبر عمود التبادل الأيوني؛ تم استرداد بروتيني اللاكتوفيرين بمحلول بفر (Tris HCl ذو pH=7.5 وتركيز ملحي 0.05 مولاري) ومن الشكل (1) تبين ظهور قمة واحدة للبروتين في مرحلة الغسل Washing مثلت هذه القمة مجموعة البروتينات الغير مرتبطة Unbounded proteins مثل الفالكتوبومين وبيتالكتوكلوبولين؛ أما في مرحلة الاسترداد فقد ظهرت قمتين للبروتين تمثلت الأولى p1 ظهرت في الأنابيب من (109-90) تمثلت بأنزيم اللاكتوبيروكسيديز حيث ظهر البروتين بلون أخضر أما الثانية p2 ظهرت في الأنابيب من (165-151) وكانت لبروتيني اللاكتوفيرين ظهرت بلون وردي فاتح سجلت فيها قيمة الامتصاصية للبروتين ارتفاع ملحوظ على طول موجي 465 نانومتر الخاص ببروتيني اللاكتوفيرين. جمعت الأنابيب الخاصة ببروتيني اللاكتوفيرين في كيس الديلزة ووضعت في الماء المقطر لمدة 24 ساعة للتخلص من المحلول الملحي ثم ركز البروتين بواسطة السكروز. يبين الشكل (3) باستخدام الترحيل الكهربائي وبوجود العوامل الماسخة SDS-PAGE ظهر بروتيني اللاكتوفيرين بحزمة واحدة إذ تحركت هذه الحزمة إلى موقع مماثل إلى حزمة بروتيني اللاكتوفيرين القياسي المجهز من شركة Sigma Aldrich رقم-2- قدرت نسبة البروتين بطريقة (9) وفي كل خطوة من خطوات التنقية وقد كانت 97 مايكروغرام/ لتر في خطوة التبادل الأيوني و 81 مايكروغرام/ لتر في خطوة الترشيح الهلامي؛ كانت النتائج مقارنة إلى ما وجدته (15). اتفقت هذه النتائج مع قام به العديد من الباحثين فقد تمكن (16) من فصل اللاكتوفيرين باستخدام عمود الفصل CM- Toyopearl 650M تبعها خطوة أخرى باستخدام عمود الفصل AF-Heparin Toyopearl إذ ظهرت في خطوة الاسترداد قمتين للبروتين تمثلت الأولى بإنزيم اللاكتوبيروكسيديز والثانية لبروتيني اللاكتوفيرين؛ استطاعت (17) من فصل بروتيني اللاكتوفيرين من شرش حليب الأبقار والجاموس باستخدام عمود الفصل CM-Sepharose حيث ظهرت قمتين للبروتين في مرحلة الاسترداد تمثلت

الأولى بإنزيم Lactoperoxidase والثانية لبروتين Lactoferrin، تمكن (18) من استخدام كروماتوگرافي التبادل الأيوني لعمود (SP-Sephadex) في تنقية كل من اللاكتوبيروكسيديز واللاكتوفيرين من حليب الأبقار؛ تمكن (19) من فصل أنزيم اللاكتوبيروكسيديز وبروتين اللاكتوفيرين بعمود الفصل SP-Sephadex من حليب الأبقار؛ تمكن (20) من تنقية اللاكتوفيرين من شرش لبأ الماعز باستخدام المبادل الأيوني CM-Sephadex C-50 وتقنية كروماتوگرافي الألفة العالية باستخدام *Hi-Trap Heparine HP*. تمكنت (21) من فصل اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار والأغنام باستخدام المبادل الأيوني CM-Sephadex C-50 حيث ظهر أنزيم اللاكتوبيروكسيديز بلون مخضر وبروتين اللاكتوفيرين بلون وردي واضح تمت قراءة الامتصاصية على طول موجي 465nm؛ بينما تمكنت (22) من تنقية اللاكتوفيرين من شرش لبأ الأبقار وبخطوة واحدة باستخدام CM-SephadexC-50 قدرت نسبة بروتين اللاكتوفيرين بطريقة (9) وكانت نسبة البروتين 2.4mg/ml وبنقاوة عالية بلغت 90%.



شكل (1) كروماتوگرافي التبادل الأيوني يوضح الشكل تنقية اللاكتوفيرين من شرش الجبن باستخدام عمود الفصل CM-Sephadex C50 بأبعاد (24 × 2) سم تمت موازنة المبادل الأيوني بمحلول بفر Tris-HCl بتركيز 0.05 مولاري وأس هيدروجيني 7.5، تم الاسترداد على مرحلتين الأولى تمثلت (E1) استخدم في هذه الخطوة محلول Tris-HCl تركيز 0.05 مولاري والحاوي على كلوريد الصوديوم 0.2 مولاري وأس هيدروجيني 7.5 بينما تمثلت الخطوة الثانية من الاسترداد استخدام محلول Tris-HCl بتركيز 0.05 مولاري والحاوي على كلوريد الصوديوم 0.5 مولاري وأس هيدروجيني 7.5 تم ضبط سرعة الجريان 18 مل/ ساعة و3 مل لكل أنبوبة يمثل UB بروتينات الشرش غير المرتبطة Unbound proteins.

تم تنقية بروتين اللاكتوفيرين في خطوة ثانية باستخدام كروماتوكرافي الترشيح الهلامي إذ مرر بروتين اللاكتوفيرين المركز من خطوة التبادل الأيوني عبر عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 وبيين الشكل (2) ظهور قمة واحدة للبروتين وبلون وردي واضح جداً إذ بينت قراءة الامتصاصية على طول موجي 465 نانومتر ارتفاع ملحوظ في القراءة وقد ظهر البروتين في الأنابيب من (25-42)، استخدمت تقنية الترشيح الهلامي بشكل واسع بعد خطوة التبادل الأيوني وذلك للحصول على البروتين بأعلى درجات النقاوة، تم التأكد من نقاوة البروتين باستخدام هلام البولي أكريلاميد بوجود العوامل الماسخة SDS (5).



شكل (2) كروماتوكرافي الترشيح الهلامي لتنقية بروتين اللاكتوفيرين من شرش الجبن باستخدام عمود Sephadex G-100 بأبعاد  $80 \times 1.5$  سم جرت موازنة الهلام بمحلول بفرالفوسفات بتركيز 0.5 مولاري وتركيز ملحي 0.01NaCl مولاري وأس هيدروجيني 7.4 وبمعدل جريان 18 مل/ ساعة و3 مل لكل أنبوبة

تمكن (5) من تنقية بروتين اللاكتوفيرين من حليب الإنسان باستخدام هلام Sephadex؛ بينما تمكن (23) من تنقية البروتين باستخدام عمود Sephadex G100، استخدمت (21) عمود Sephadex G150 في تنقية بروتين اللاكتوفيرين من حليب الأبقار والأغنام حيث ظهرت حزم البروتين بشكل منفرد عند استخدام SDS-PAGE؛ تمكنت (22) من فصل وتنقية اللاكتوفيرين من لباً الأبقار باستخدام CM- Sephadex C50. يوضح الجدول (1) أدناه نسبة اللاكتوفيرين في كل خطوة من خطوات التنقية مع الحصيلة الكلية للبروتين وعدد مرات التنقية.

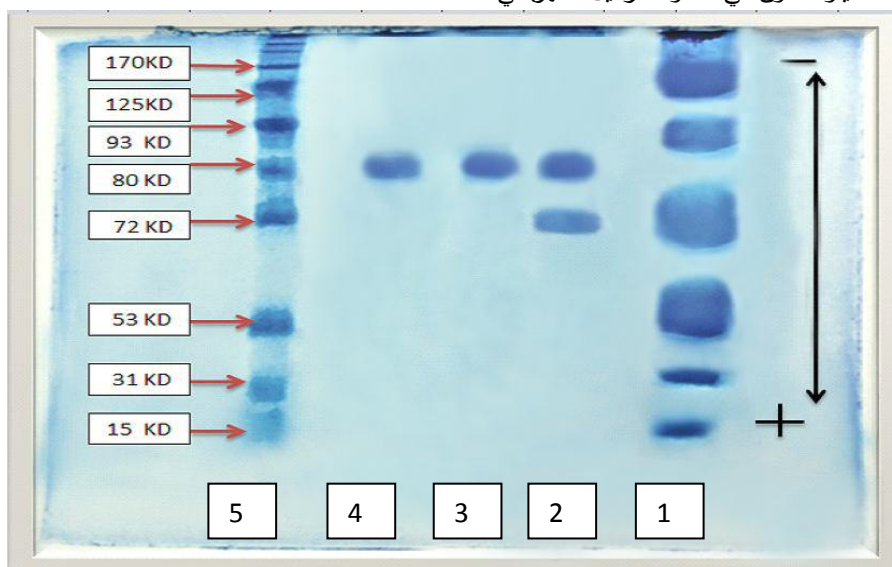
جدول (1) تركيز اللاكتوفيرين والحصيلة الكلية لبروتين اللاكتوفيرين وعدد مرات التنقية في كل خطوة من خطوات التنقية

	الترشيح الهلامي	التبادل الأيوني	شرش الجبن
تركيز الـ $L \setminus \mu g \setminus Lf$	81	97	145
الحصيلة البروتينية من شرش الجبن (%)	55.86	66.89	100
عدد مرات التنقية	57.58	46.13	—

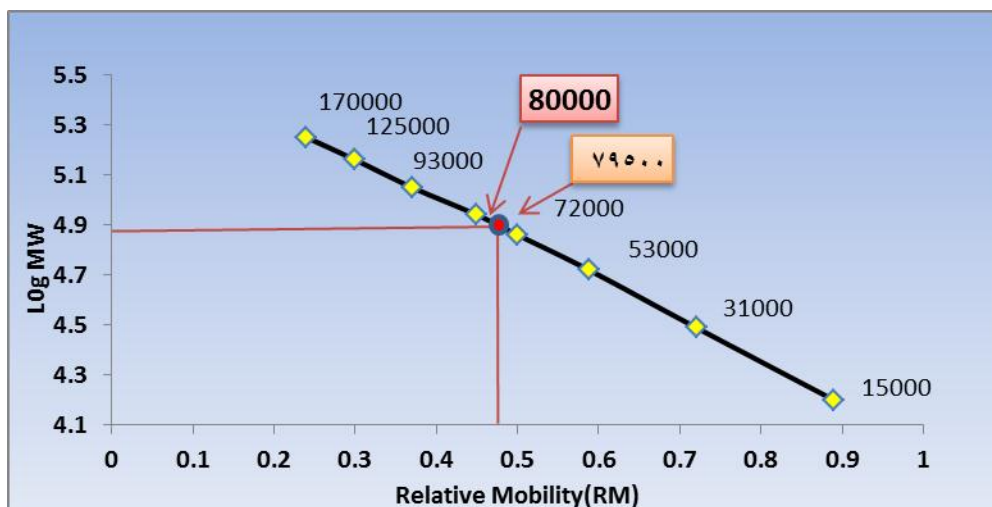
ويلاحظ من الجدول أعلاه أن تركيز البروتين يبدأ بالتناقص بعد كل خطوة من خطوات التنقية، كان تركيز اللاكتوفيرين في جميع مراحل التنقية 145؛ 97؛ 81 مايكرو غرام/ لتر من خطوة الديلزة؛ التبادل الأيوني والترشيح الهلامي على التوالي؛ بينما كانت الحصيصة البروتينية وعدد مرات التنقية لبروتين اللاكتوفيرين من خطوة التبادل الأيوني (66.89 و 55.86)% ومن خطوة الترشيح الهلامي (46.13 و 57.58) على التوالي؛ مما يشير إلى وصول البروتين إلى درجة عالية من النقاوة؛ كانت نقاوة بروتين اللاكتوفيرين في هذه الدراسة 90% والمشار لها في الشكل (3-7)؛ توافقت هذه الدراسة مع ما وجدته (22) حيث تمكنت من فصل اللاكتوفيرين بخطوة واحدة ونقاوة 90%.

- **تقدير نقاوة بروتين اللاكتوفيرين باستخدام البولي أكريلاميد بوجود العوامل الماسخة SDS-PAGE:** استخدمت تقنية الترحيل الكهربائي لمعرفة نقاوة بروتين اللاكتوفيرين تحت ظروف مختزلة وباستخدام العوامل الماسخة؛ وتعد هذه الخطوة أحد خطوات التنقية إذ يظهر فيها البروتين بنقاوة عالية؛ وكذلك تساعد هذه التقنية في معرفة نقاوة البروتين المنقى من خطوات أخرى. ظهر بروتين اللاكتوفيرين بشكل حزمة متجانسة أعلى هلام الفصل ذو تركيز 12.5% حيث لوحظ ارتفاع ملحوظ في قيمة الوزن الجزيئي ويشير الشكل (3) إلى وجود حزمة بروتينية واحدة لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش الجبن. استخدم (20) العوامل الماسخة للبروتينات SDS-PAGE للإشارة إلى نقاوة بروتين اللاكتوفيرين من أبقار الـ Caprine؛ تمت تنقية هذا البروتين باستخدام المبادل الأيوني CM Sephadex C-50. وجد (24) حزمة بروتينية مفردة لبروتين اللاكتوفيرين المفصول من لبأ الأبقار المنزوع الدهن في هلام البولي أكريلاميد بوجود SDS؛ استخدمت (22) تقنية SDS-PAGE لتنقية بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار وباستخدام المبادل الأيوني CM Sephadex C-50.

- **تقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين بالترحيل الكهربائي:** قدر الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلاميد وبوجود العوامل الماسخة إذ ظهرت حزمة بروتينية مفردة أعلى هلام الفصل تشير إلى ارتفاع في قيمة الوزن الجزيئي وبعد حساب قيمة الحركة النسبية Rm للبروتينات القياسية ولبروتين اللاكتوفيرين كما هو موصوف في الشكل (3 و 4) استخرجت قيمة الوزن الجزيئي للبروتين من العلاقة بين الحركة النسبية ولوغاريتم الوزن الجزيئي MW تبين النتائج أن قيمة الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين كانت 79 كيلو دالتون في خطوة الترشيح الهلامي و 79.5 كيلو دالتون في خطوة الترحيل الكهربائي.

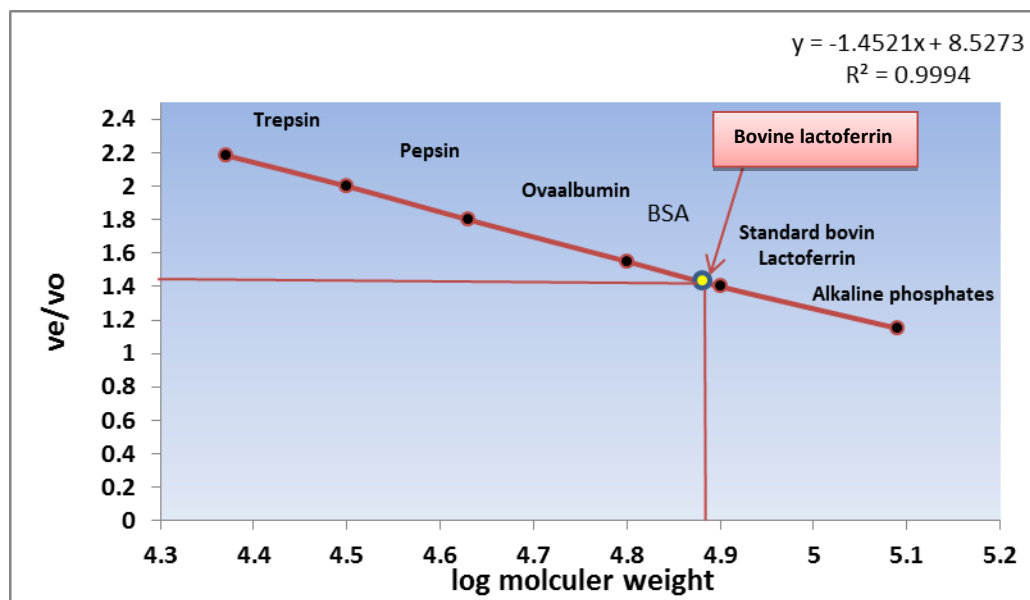


شكل (3) الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلاميد لبروتين اللاكتوفيرين (5) يمثل الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية (170)KDa - (15) (4) لكتوفيرين قياسي (3) لكتوفيرين من خطوة الترشيح الهلامي (2) لكتوفيرين من خطوة التبادل الأيوني (1) بروتينات شرش الجبن



شكل (4) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين باستخدام العوامل الماسخة SDS – PAGE تتباين قيمة الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين تبعاً لنوع الحيوان ومقدار المحتوى الكربوهيدراتي في جزيئة البروتين وعلى عمر الحيوان وفترة الحلب وعدد مرات الحلب مما يعطي تباين ملحوظ في قيمة الوزن الجزيئي للبروتين (25)، كانت النتائج في هذه الدراسة مقارنة إلى ما وجدته (21) حيث كان الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين لبأ الأبقار 80 كيلو دالتون؛ فيما وجد (20) أن الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين حليب Caprine 82 كيلو دالتون؛ أما (15) فقد كان الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين حليب الأبقار 77 كيلو دالتون؛ قدرت (26) الوزن الجزيئي لحليب الماعز 78 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE. أكد (27) أن الوزن الجزيئي للاكتوفيرين Carabo's كان 77.829 كيلو دالتون مستعيناً بـ SDS-PAGE؛ وقد وجد (28) أن اللاكتوفيرين المفصول من حليب الأبقار كان 76 كيلو دالتون مقدراً بـ PAGE-SDS؛ بينما وجدت (29) أن الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين من شرش لبأ الماعز كان 79 كيلو دالتون باستخدام SDS – PAGE.

- **تقدير الوزن الجزيئي بتقنية كروماتوغرافي الترشيح الهلامي:** قدر الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين بموجب العلاقة بين لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية مع  $V_e/V_o$  وكما هو موضح بالشكل (5) وقد بينت هذه الدراسة أن الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش الجبن كان 79 كيلو دالتون يتباين الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين حسب مصادره المختلفة ويتراوح بحدود من (76-87) كيلو دالتون (30). وجد (31) أن الوزن الجزيئي لحليب الأغنام كان 78 كيلو دالتون؛ بينما أوضح (32) أن الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار كان 82 كيلو دالتون وذلك باستخدام عمود Sepharose-4B؛ أشارت (21) في دراسة أن الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام كان 81.23 و 79.25 كيلو دالتون على التوالي؛ أن الاختلاف في الوزن الجزيئي له علاقة بالمحتوى الكربوهيدراتي لبروتين اللاكتوفيرين وعدد المجاميع الكربوهيدراتية المرتبطة بالجزيئة وكذلك مرحلة حلب الحيوان وعدد مرات الحلب (33).



شكل (5) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين بكميات توكرافي الترشيح الهلامي

- المحتوى الكربوهيدراتي لبروتين اللاكتوفيرين من شرش الجبن كان 11.08% وقد جاءت النتائج مقارنة مع ما أشار إليه (34) حيث كان المحتوى الكربوهيدراتي بحدود 7-11.5%، أوضح (35، 36) أن المحتوى الكربوهيدراتي bovine LF كان 11.2% و human LF 6.4% وللخيول 3.5% horse LF و 11% Camel LF؛ وجدت (21) أن المحتوى الكربوهيدراتي للاكتوفيرين الأبقار والأغنام كان 11.1% و 8.2% على التوالي؛ أن الاختلاف في نوع الحيوان اللبون يؤدي بالتالي إلى الاختلاف في عدد مجاميع Sialic acid أو الاختلاف في عدد جزيئات السكر التي ترتبط بالبروتين (35).

- محتوى اللاكتوفيرين من الحديد: أشارت نتائج تقدير الحديد باستعمال مطياف الامتصاص الذري Atomic absorption spectrophotometer أن بروتين اللاكتوفيرين المفصول من شرش حليب خليط من الأبقار كان يحتوي على 12.09% تشبع من الحديد وأن كمية الحديد 169.3 جزء بالمليون؛ كانت النتائج مقارنة إلى ما وجدته (17) بينت فيها إلى أن نسبة تشبع الحديد في حليب الأبقار بلغت 13.85% بينما كانت نسبة تشبع الحديد لحليب الجاموس 18.98%؛ أشار (37) إلى أن نسبة تشبع الحديد في لاكتوفيرين حليب الأبقار يتراوح بين 15-20%، تمكن (38) من تقدير محتوى لاكتوفيرين الأبقار والأغنام والماعز والإنسان إذ كان يتراوح بين 30-40%، أشارت (21) إلى أن نسبة تشبع الحديد في لاكتوفيرين كل من الأبقار والأغنام كان 14.7% و 11.6% على التوالي وكانت كمية الحديد لكل منهما 198.4 و 162.6 جزء بالمليون على التوالي، وجدت (29) نسبة تشبع لاكتوفيرين لبأ الماعز هو 8.7% وأن كمية الحديد 123 جزء بالمليون.

#### المصادر

1. García-Montoya, I. A.; Cendón, T. S.; Arévalo-Gallegos, S. & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1820(3):226-236.
2. Gobbetti, M.; Minervini, F. & Rizzello, C. G. (2002). Bioactive peptides in Dairy products. *Handbook of Food products Manufacturing*. Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sones Inc., Hoboken, NJ., PP. 489- 517.

3. Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2013). *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins, Basic Aspects*, 4<sup>th</sup> Ed.
4. Rachman, A. B.; Maheshwari, R. R. A. & Bachroem, M. S. (2015). Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat breeds. *Procedia Food Sci.*, 3: 200-210.
5. Legrand, D.; Pierce, A.; Ellass, E.; Carpentier, M.; Mariller, C. & Mazurier, J. (2008). Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606: 163-194.
6. Campanella, L.; Martini, E.; Pintore, M. & Tomassetti, M. (2009). Determination of lactoferrin and immunoglobulin g in animal milks by new Immunosensors. *Sensors(Basel)*, 9(3): 2202-2221.
7. Al-Mashikhi, S. A. & Nakai, S. (1987). Isolation of bovine Immunoglobulins and lactoferrin from whey protein by gel filtration techniques. *J. Dairy Sci.*, 70(12): 2486-2492.
8. Yoshida, S.; Wei, Z.; Shinmura, Y. & Fukunaga, N. (2000). Separation of Lactoferrin- a and -b from bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, 83(10): 2211-2215.
9. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
10. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
11. Weber, K. & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(16): 4406-4412.
12. DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and substances. *Anal. Chem.*, 28(3): 350-356.
13. Lee, K. & Clydesdale, F. M. (1979). Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complexed iron in food. *J. Food Sci.*, 44: 549-554.
14. Bonner, P. L. R. (2007). *Protein purification (the basics)*. Nottingham Trent University. First edition by Taylor and Francis group.
15. Adam, V.; Zitka, O.; Dolezal, P.; Zeman, L.; Horna, A.; Hubalek, J.; Sileny, J.; Krizkova, S.; Trnkova, L. & Kizek, R. (2008). Lactoferrin isolation using monolithic column coupled with spectrometric or Micro-Amperometric detector. *Sensors (Basel)*, 8(1): 464-487.
16. Nam, M. S.; Shimazaki, K.; Kumura, H.; Lee, K. K. & Yu, D. Y. (1999). Characterization of Korean native goat Lactoferrin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 123(2):201-208.
17. Aziz, R. A. (2001). Study the Lactoferrin isolation from cow and buffalo Colostrum. M.Sc. Thesis, Baghdad university. Iraq.
18. Fee, J. C. & Chand, A. (2006). Capture of lactoferrin and Lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Separation and Purification Technology*, 48(2): 143-149.
19. Lu, R. R.; Xu, S. Y.; Wang, Z. & Yang, R. J. (2007). Isolation of Lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong action exchange chromatography on a production scale. *J. Membr. Sci.*, 297:152-161.
20. Kim, Y.; Kim, M. J.; Han, K. S.; Imm, J. Y.; Oh, S. & Kim, S. H. (2009). Anticancer activity of lactoferrin isolated from caprine colostrum on human cancer cell lines. *Int. J. Dairy Technol.*, 62(2): 277-281.
21. Al-Hatim, R. R. (2012). Separation and purification Lactoferrin from bovine and ovine colostrum and studying of some its properties and Application. M.Sc. Thesis, College of Agric, University of Basra.
22. Moradian, F.; Sharbafi, R. & Rafiei, A. (2014). Lactoferrin, Isolation, Purification and Antimicrobial Effects. *J. Med. Bio-Eng.*, 3(3): 203-206.

23. Kim, K. S.; Kim, J. S.; Shin, M. S.; Noh, H. W.; Lim, S. D.; Suvd, D. & Alimaa, J. (2009). Purification and characterization of Mongolian Mare Lactoferrin. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 29(2): 164-167.
24. Liang, Y.; Wang, X.; Wu, M. & Zhu, W. (2011). Simultaneous isolation of Lactoferrin and Lactoperoxidase from bovine colostrum by SPEC 70 SLS cation exchange resin. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8(9): 3764-3776.
25. Lambert, L. A.; Perri, H.; Halbrooks, P. J. & Masson, A. B. (2005). Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 142(2): 129-141.
26. Le Parc, A.; Dallas, D. C.; Duaut, S.; Leonil, J.; Martin, P. & Barile, D. (2014). Characterization of goat milk Lactoferrin N-glycans and comparison with the N-glycomes of human and bovine milk. *Electrophoresis*. 35(11): 1560-1570.
27. Angeles, A. A.; Merca, F. E. & Roxas, N. P. (2008). Isolation and characterization of lactoferrin from CARABOS (*Bubalus bubalis* L) milk whey. *Philippine J. Vet. Anim. Sci.*, 34(1): 43-54.
28. Lorenzis, E. D.; Semeraro, C.; Blasi, M. D. D.; Mita, G. & Poltronieri, P. (2008). Emulsions based on the interaction between lactoferrin and chitosans. *Food Biophysics*, 3: 169-173.
29. Abbas, Z. H.; Doosh, K. S. & Yaseen, N. Y. (2015). Isolation, purification and Characterization of Lactoferrin from Goat colostrum whey. *Pak. J. Nutr.*, 14(8): 517-523.
30. Welty, F. K.; Smith, K. L. & Schanbacher, F. L. (1998). Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 59(2): 224-231.
31. Park, Y. W.; Juarez, M.; Ramos, M. & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-Chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68(1-2): 88-113.
32. Franco, I.; Castillo, E.; Perez, M. D.; Calvo, M. & Sanchez, L. (2010). Effect of Bovine Lactoferrin addition to milk in yogurt manufacturing. *J. Dairy Sci.*, 93(10): 4430-4489.
33. Farrell, H. M. Jr.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G. T.; Brown, E. M.; Butler, J. E.; Creamer, L. K.; Hicks, C. L.; Hollar, C. M.; Ng-Kwai-Hang, K. F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' Milk-Sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87(6): 1641-1674.
34. Shimazaki, K. (2000). Lactoferrin: a marvelous protein in milk?. *Anim. Sci. J.*, 71(4): 329-347.
35. van-Veen, H. A.; Geerts, M. E.; van Berkel, P. H. & Nuijens, J. H. (2004). The role of N-linked glycosylation in the protection of Human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, 271(4): 678-784.
36. Brisson, G.; Britten, M. & Pouliot, Y. (2007). Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: Effect of iron saturation. *Int. Dairy J.*, 17(6):617-624.
37. Rebelein, T. W. (2010). The Effect of heat treatment on microbiological qualities of bovine colostrums, Passive immune transfer of Neonatal calves, and future animal performance. Ph. D. Dissertation. Der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, P. 109.
38. Hyvönen, P. (2010). Lactoferrin in bovine intramammary infection. Department of production Animal. Ph.D. Dissertation. Animal Medicine Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki, P. 78.