تنقية بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار والأغنام ودراسة بعض صفاته

علي خضير جابر الركابي | رغد أكرم عزيز | رغد رحيم الحاتم
قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة | قسم العلوم/ كلية التربية الأساسية | قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة
جامعة البصرة | الجامعة المستنصرية | جامعة البصرة

الخلاصة

تم تنقية بروتين اللاكتوفيرين من شرش لبأ الأبقار والأغنام باستعمال المبادل الأيوني CM-Sephadex A-50 والمرشح الهلامي Sephadex G-150، وتم التأكد من النقاوة باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد من خلال الحصول على حزمة مفردة، وبلغت النسبة المئوية للمحتوى الكربوهيدراتي في بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام 11.1 و 8.2% على التوالي، بينما كانت نسبة الحديد في بروتين اكتوفيرين الأبقار والأغنام 198.4 و 162.6 جزء بالمليون وبنسبة تشبع مقدارها 14.17 و 11.6% على التوالي، وقد بلغ الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام 81.23 و79.25 كيلو دالتون على التوالي باستعمال تقنية الترشيح الهلامي، بينما كان 80 و 76 كيلو دالتون على التوالي باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود العوامل الماسخة. درست الفعاليه تثبيطيه للاكتوفيرين حيال بعض البتكريا ومقدار تأثيره كمواد مضادة للأكسدة، اذ أظهر بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام الكامل وبروتين لاكتوفيرين الأبقار المتحلل فعالية تثبيطية حيال عزلات من البكتريا *مثل* *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus*، اذ ازدادت قوة الإختزال لبروتين اللاكتوفيرين بزيادة التركيز وأتضح بأن السعة الاختزالية للاكتوفيرين الأغنام كانت مقاربة لمضاد الأكسدة الطبيعي Ascorbic acid، وكانت أعلى من لاكتوفيرين الأبقار ، و تفوق لاكتوفيرين الأغنام في منع أكسدة الحامض الدهني اللينوليك وبفعالية مقاربة لمضاد الأكسدة الصناعي BHT وبالمقارنة مع لاكتوفيرين الأبقار، كما ازدادت قابلية الربط مع زيادة التركيز لكل من لاكتوفيرين الأبقار والأغنام، أذ أبدى لاكتوفيرين الأغنام قابلية ربط مقاربة لأنموذج المقارنة EDTA . وأظهرت نتائج إضافة لاكتوفيرين الأبقار والأغنام الى زيت الزيتون وزيت سمك الصبور المخزن عند درجة حرارة 45م لمدة 120 يوم بتركيز 08 .0% أعلى فعالية مضادة للأكسدة كما وانخفضت قيمة البيروكسيد مع زيادة التركيز.

المقدمة

يعد بروتين اللاكتوفيرين Lactoferrin (Lf) هو احد البروتينات المناعية غير المتخصصة المهمة في لبأ وحليب اغلب الثديات، اذ يتواجد في لبأ وحليب الإنسان والأبقار والجاموس والماعز والأغنام والخنازير والإبل والفئران والأرانب والكلاب (24;5)، وان اللاكتوفيرين من البروتينات السكرية القاعدية Basic glycoprotein اذ يتكون من سلسلة ببتيدية منفردة Single Polypeptide chain تتكون من ارتباط عدد من الأحماض الامينية كما ويمتلك وزناً جزيئياً يتراوح بين 76 – 87 كيلو دالتون (27;20)، ويمتلك اللاكتوفيرين بحالته الطبيعية تأثيراً مضاداً حيال أنواع عدة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة الكرام كما وانه يتميز بخصائص مميزة جعلته يمتلك فعالية ضد كل من الفطريات والطفيليات وحتى الفايروسات، كما وله دوراً هاماً في تقليل أكسدة الزيوت والدهون (12)، وقد استقطب هذا البروتين العديد من الباحثين لدراسته ومحاولة زيادة فعاليته الحيوية من خلال هضمه Digestion، اذ تبين حصول زيادة في فعالية اللاكتوفيرين المتحلل سواء كان تحت فعل إنزيمي ام فيزياوي بمقدار 8–10 مرات أكثر بالمقارنة مع اللاكتوفيرين الطبيعي، اذ يعد اللاكتوفيرسين احد تلك الانواع المهمة من الببتيدات التي تم الحصول عليها من بروتين اللاكتوفيرين المتحلل عن طريق استعمال البروتيزات التي تعمل على إعطاء هذا الببتيد تحت ظروف خاصة (25;10;9). وعليه فقد هدف هذا البحث الى تنقية بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار والأغنام باستعمال تقنية التبادل ألايوني والترشيح الهلامي، ودراسة بعض صفاته و اختبار فعاليته تجاه أنواع عدة من البكتريا وكذلك دراسة آلية عمله كمضاد أكسدة ومعرفة كفاءته في تقليل الأكسدة الذاتية في بعض أنواع الزيوت النباتية والحيوانية.

المواد وطرائق العمل

مصدر اللبأ: تم الحصول على اللبأ البقري من أبقار نوع (فريزين) في الأسبوع الأول بعد الولادة من حقل كلية الزراعة/جامعة البصرة، على لبأ الأغنام من الأغنام ألمحلية في الأسبوع ألأول بعد ألولادة من حقل كلية الزراعة/جامعة البصرة.

تحضير الشرش: اتبعت الطريقة التي ذكرها (3) في تحضير الشرش من نماذج اللبأ.

الديلزة (التنافذ الغشائي):اجراء عملية التنافذ الغشائي

تنقية بروتين اللاكتوفيرين: اشتملت تنقية بروتين اللاكتوفيرين من شرش لبأ الأبقار والأغنام على فصل البروتين بكروماتوكرافيا التبادل ألايوني وعلى عمود المبادل ألايوني الموجب CM–Sephadex A–50 أولا وذلك بالاعتماد على ما جاء به (15)، ثم كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي وعلى عمود هلام السيفادكس Sephadex G–150 وكما ذكره (4).

تقدير تركيز البروتين: استعملت الطريقة التي وصفها (16) في تقدير البروتين في محاليل النماذج المختلفة.

تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي: اتبعت طريقة الفينول – حامض الكبريتيك التي وصفها (6) لتعين المحتوى الكاربوهيدراتي في بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام.

تقدير الحديد الكلي: قدر الحديد الكلي في بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام بطريقة الامتصاص الذري والتي ذكرها (1).

اختبار نقاوة: اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد وبغياب العوامل الماسخة تبعا لطريقة (13) في اختبار نقاوة بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام.

تعيين الوزن الجزيئي: عين الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين الأبقار والأغنام بطريقة الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة Sodium Dodycylsulphate وبإتباع الطريقة الموصوفة من قبل (28).

العزلات البكتريه الاختبار: تم الحصول على عزلات البكتريا المستعملة في قياس الفعالية المضادة لبروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل من مختبرات كلية العلوم/ جامعة بغداد، وشملت كل من بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* و *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis*و *Bacillus cereus* .

اختبار فعالية بروتين اللاكتوفيرين ضد البكتريا: استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion التي ذكرها (14) لاختبار فعالية بروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل ضد بعض من أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گرام.

اختبار الفعل المضاد للأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين: قياس قوة الاختزال: تم اختبار القوة الاختزالية لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام استنادا لما ذكره (15) و للمقارنة قدرت القوه الأختزالية لمضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol و Ascorbic acid، وحسبت اعتماداً على المعادلة الآتية:

$$\text{القوة الاختزالية (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\text{امتصاص الأنموذج الكفأ}} \times 100 \right]$$

قياس الفعالية المضادة للأكسدة: اتبعت الطريقة التي اشار اليها (16) لقياس الفعالية المضادة للأكسدة لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام باستعمال نظام الحامض الدهني اللينوليك Linoleic acid System ، اذ حضرت تراكيز من لاكتوفيرين الأبقار والأغنام و مضاد الأكسدة الصناعيBHT و α–Tocopherol تراوحت بين-3.5 0.5ملغم/مل، وقد حسبت النسبة المئوية لتثبيط بيروكسيدات الحامض الدهني اللينوليك تبعاً للمعادلة الآتية:

$$\textbf{الفعالية المضادة للأكسدة (\%)} = \left[1 - \frac{\textbf{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\textbf{امتصاص النموذج الكفأ}} \right] \times \mathbf{100}$$

ج- قابلية ربط أيون الحديد: أتبعت الطريقة التي ذكرها (17) لقياس قابلية بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام لربط ايون الحديدوز، وللمقارنة قدرت قابلية ربط أيون الحديدوز لمركب الأثلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك ثنائي الصوديوم (Ethylene diamine tetra aceticacid disodium (EDTA-2Na بالطريقة نفسها، وحسبت قابلية البروتين على ربط أيون الحديدوز وفقاً للمعادلة الآتية:

$$\text{قابلية الربط(\%)} = \left[1 - \frac{\text{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\text{امتصاص الأنموذج الكفأ}} \right] \times 100$$

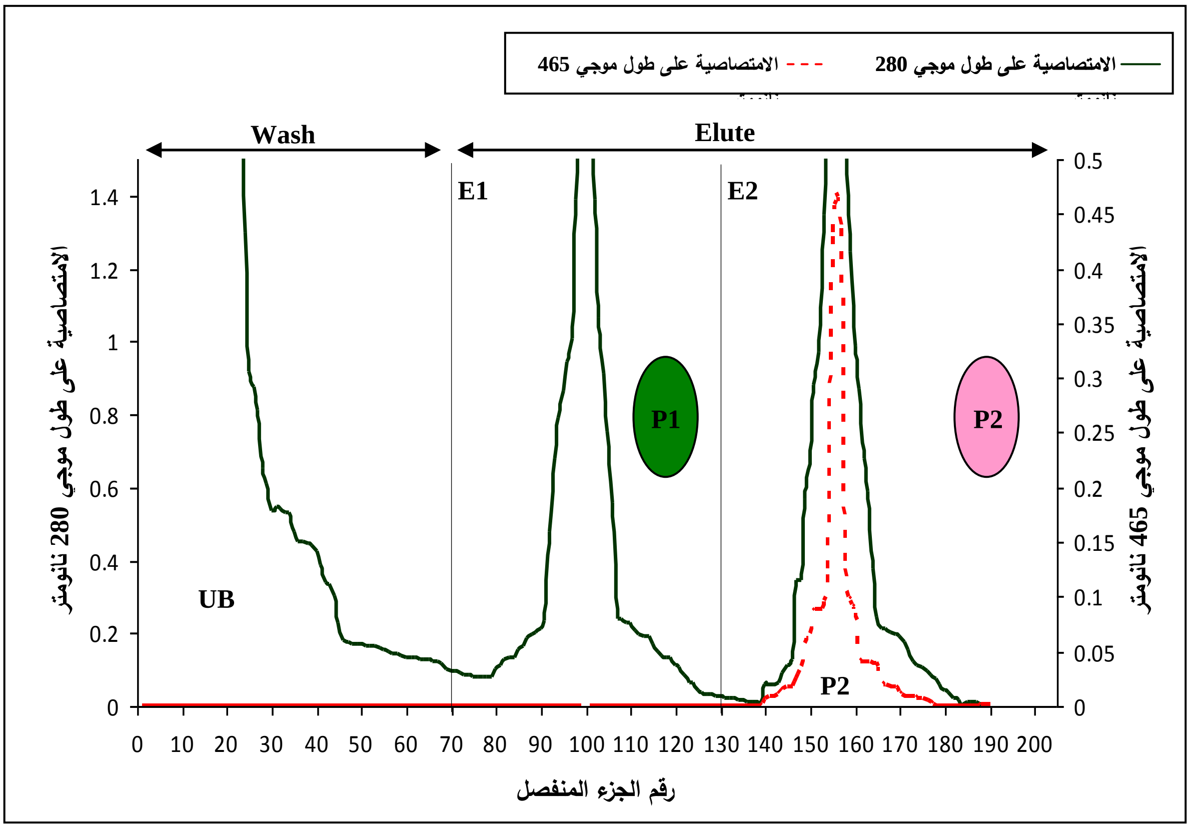
استخلاص زيت الصبور: استخلص الزيت من عينات سمك الصبور *Tenualosa ilisha* باستعمال طريقة الاستخلاص بالمذيبات العضوية وفقا الى ما ذكره (18).

تقيم أداء بروتين اللاكتوفيرين في الأنظمة الغذائية كمضادات أكسدة في الزيوت النباتية والحيوانية: اتبعت الطريقة التي ذكرها (19) اذ أذيب مضاد الأكسدة الصناعيBHT بالكحول الاثيلي وα-Tocopherol بالهكسان اما الأنموذج لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام فقد أذيب في الماء المقطر، كما وأضيفت المحاليل أعلاه الى زيت الزيتون وزيت سمك الصبور كل على انفراد وعلى درجة حرارة 45م وبتركيز نهائي لمضاد الأكسدة الصناعيBHT 0.02% في الزيت، اما المستخلص البروتيني فكان بتراكيز 0.02% و0.04% و0.08% وكذلك كانت تراكيز α – Tocopherolهي 0.02% و0.04% و0.08% وتمت متابعة كفاءة مضادات الأكسدة من خلال تقدير قيمة البيروكسيد Peroxide value في الزيت ولمدة 120 يوم وبواقع قرأه كل 15 يوم، وحسبت قيمة رقم البيروكسيد وفقا للطريقة المذكورة في (20).

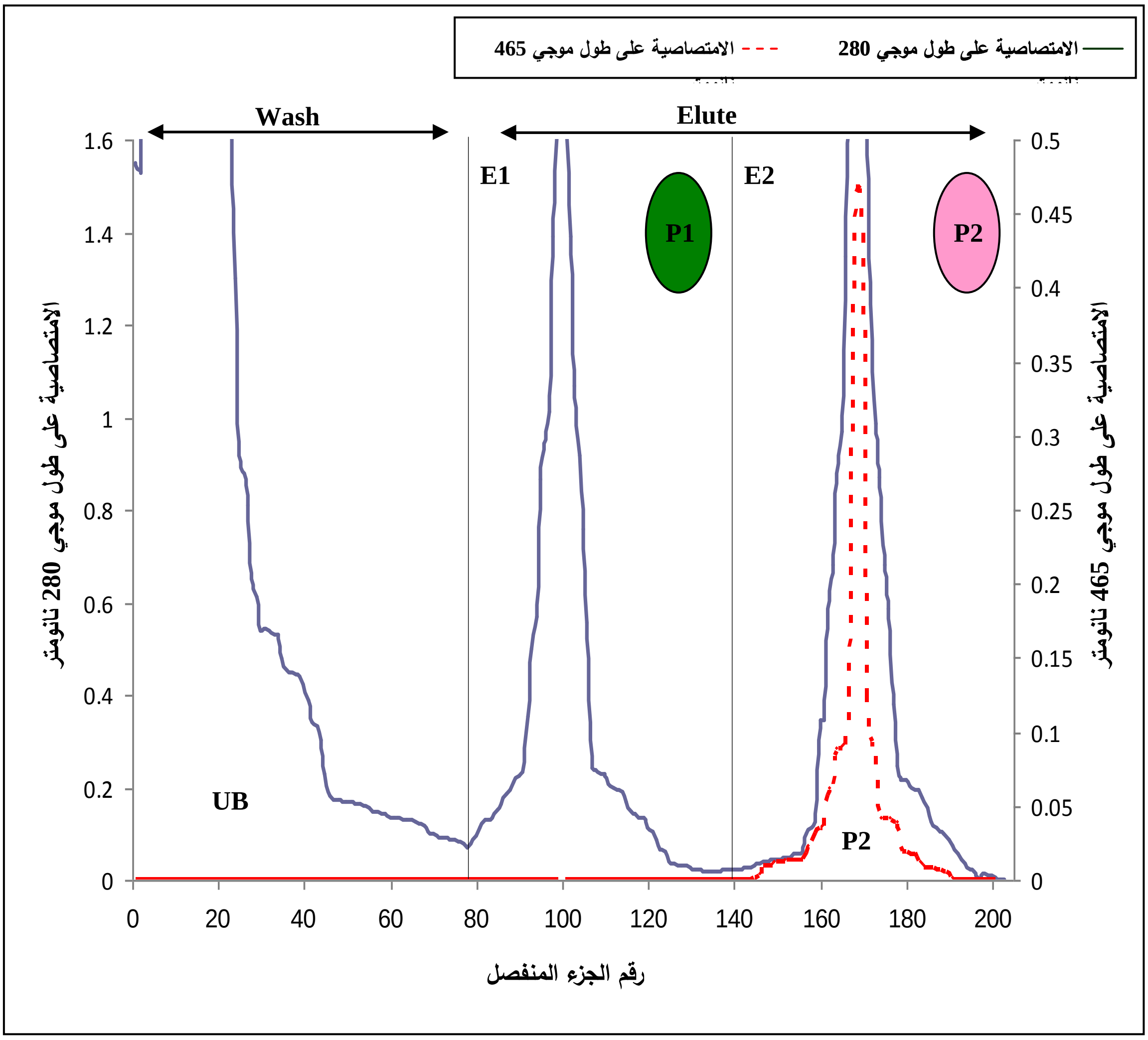
النتائج والمناقشة

تنقية بروتين اللاكتوفيرين: يبين الشكلين (1) و(2) ظهور قمة واحدة في مرحلة الغسل تمثل البروتينات غير المرتبطة من بروتينات الشرش مثل الفالاكتوالبومين α -Lactoalbumin والبيتالاكتوكلوبيولينβ-Lactoglobulin وعند إجراء عملية الاسترداد لوحظ ظهور قمتين (P_1 وP_2) اذ لوحظ ان الأولى أظهرت لوناً مخضراً وهذا يشير الى إنزيم اللاكتوبيروكسيديز، بينما أعطت القمة الثانية لونا وردياً وقد أظهرت أرتفاعاً واضحاً عند قراءتها على طول موجي مقداره 465 نانومتر الخاص بالكشف عن بروتين اللاكتوفيرين (22)، تطابقت النتائج التي تم التوصل إليها مع العديد من الدراسات الخاصة بتنقية بروتين اللاكتوفيرين، اذ قام (19) بتنقية بروتين اللاكتوفيرين من حليب الماعز بتقنية التبادل الأيوني باستعمال CM-Toyopearl650M، كما تمكن (8) من تنقية بروتين اللاكتوفيرين واللاكتوبيروكسيديز من حليب الأبقار بتقنية التبادل الايوني باستعمال SP Sepharose Big، وأعقبت خطوة التبادل الأيوني إجراء كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي بعد أجراء عملية التنافذ الغشائي وتركيز المحلول البروتيني، أذ توضح الأشكال (3) و(4) تنقية بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام بطريقة الترشيح الهلامي على عمود هلام السيفادكس 150 - Sephadex G اذ يلاحظ ظهور قمتين للبروتين في الأجزاء المستردة من الهلام، كانت القمة الأولى (P_1) صغيرة وهي تمثل مركبات بروتينية ذات أوزان جزيئية عالية مثل الكلوبيولينات المناعية التي قد يصل وزنها الجزيئي الى 150 كيلو دالتوان، أما القمة الثانية (P_2) فقد ظهرت بلون وردي فاتح ولوحظ أرتفاعاً واضحاً على طول موجي مقداره 465 نانومتر الخاص بالكشف عن بروتين اللاكتوفيرين، وتبين الاشكال (5) و(6) عملية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد

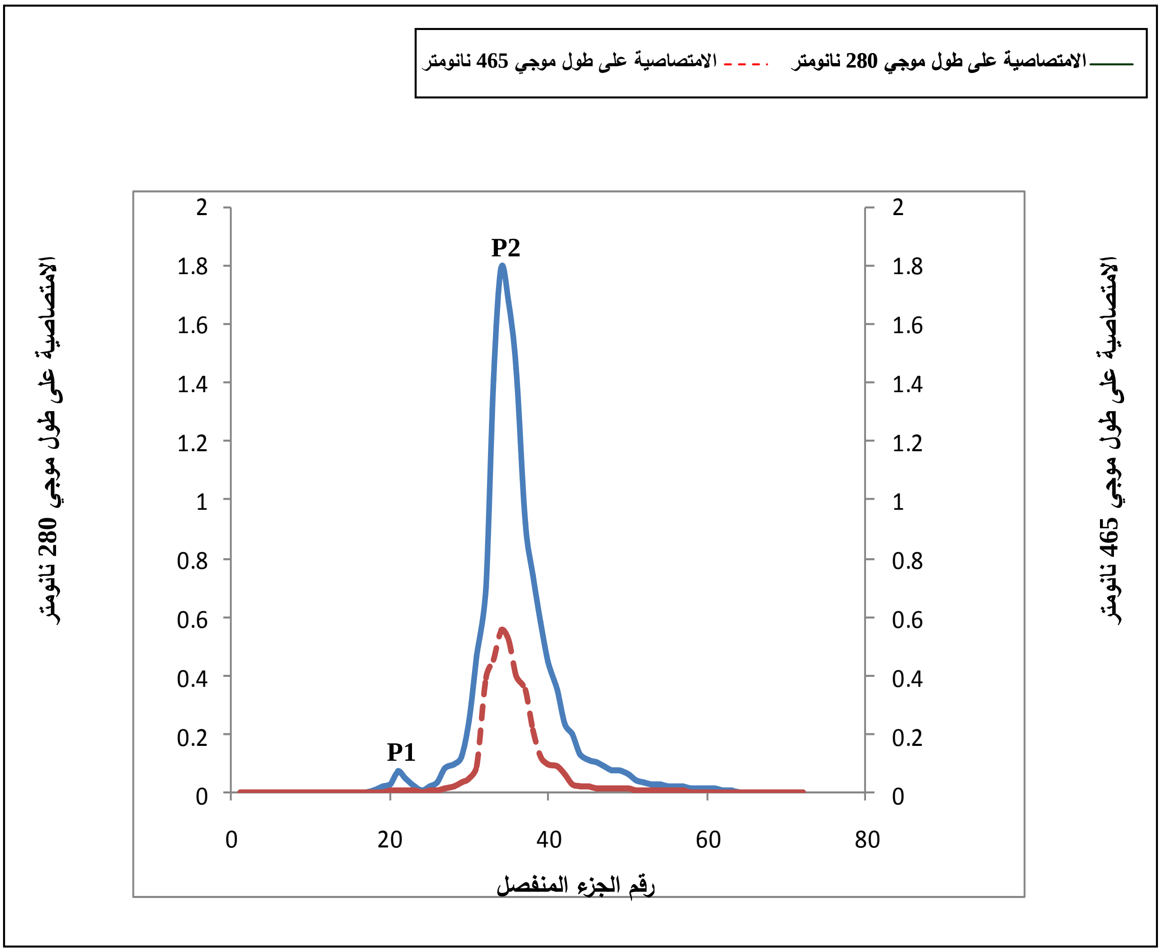
الاكريلامايد اذ لوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام على التوالي، وهذا قد يشير الى ان بروتين اللاكتوفيرين يتألف من سلسلة ببتيدية واحدة وهذا ما ذكره (18)، اذ تستعمل طريقة الترشيح الهلامي بشكل واسع كخطوة تنقية إضافية بعد التبادل ألايوني وذلك للحصول على البروتين بأعلى درجات النقاوة ويتم التأكد من ذلك بشكل قاطع بإجراء الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد، اذ قام (2) بتنقية بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الأبقار والجاموس استعمال المبادل الايوني CM–Sepharose ومن ثم استعمال تقنية الترشيح الهلامي بوساطة Sephacryl S–200، وقد أظهر فحص الترحيل الكهربائي حزمة واحدة للبروتين المستحصل عليه والذي يعد دليلاً على وصوله الى نقاوة تامة.



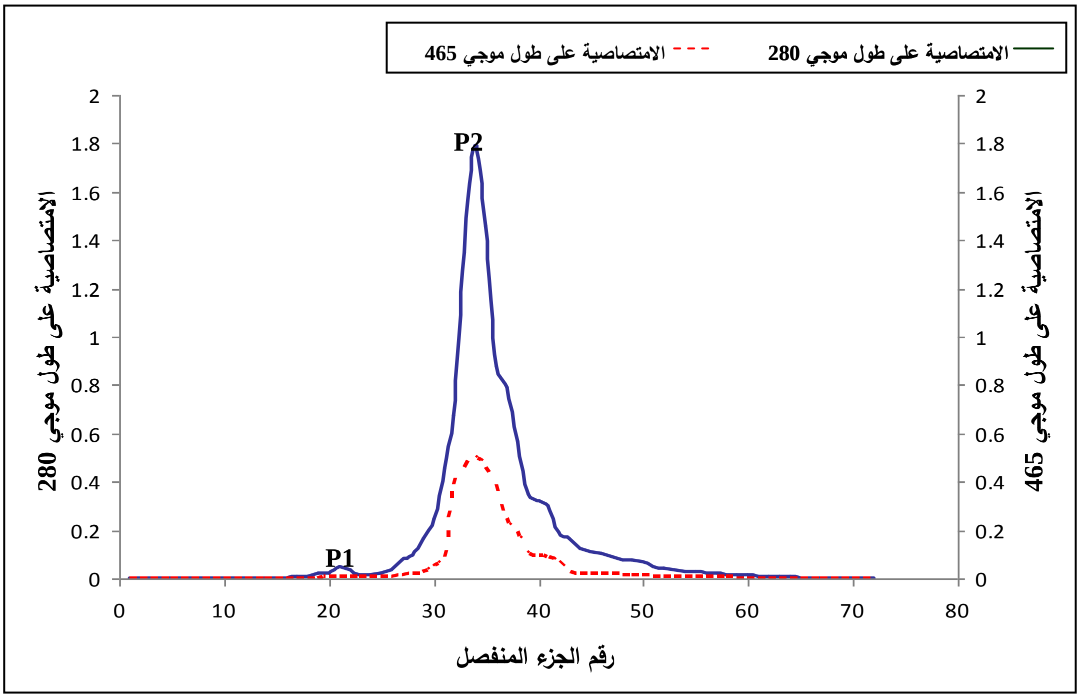
الشكل (1): كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية بروتين اللاكتوفيرين باستعمال المبادل الأيوني CM-Sephadex A-50 بأبعاد 2.5×30 سم من شرش لبأ الأبقار، الموازن بمحلول Tris – HCl الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5، وجرى الاسترداد على مرحلتين تمثلت الاولى (E_1) باستعمال محلول Tris – HCl الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار، بينما كانت الثانية (E_2) باستعمال محلول Tris – HCl الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار. اذ يمثل: UB = Unbound Protein ، P



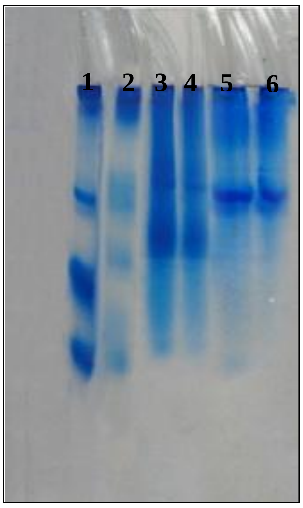
الشكل (2): كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية بروتين اللاكتوفيرين باستعمال المبادل الأيوني CM-Sephadex A-50 بأبعاد 2.5×30 سم من شرش لبأ الاغنام، الموازن بمحلول HCl – Tris الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5، وجرى الاسترداد على مرحلتين تمثلت الاولى (E1) باستعمال محلول HCl – Tris الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار، بينما كانت الثانية (E2) باستعمال محلول HCl – Tris الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار. اذ يمثل: UB = Unbound Protein ، P = Peaks



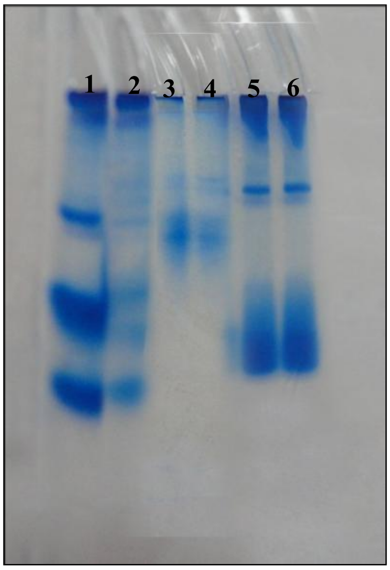
الشكل (3): الترشيح الهلامي للاكتوفيرين الأبقار بأستعمال عمود هلام السيفادكس Sephadex G – 150، ذي ابعاد 2.5×80 سم الموازن بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.5 مولار والحاوي على كلوريدالصوديوم بتركيز 0.01 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.4.



الشكل (4): الترشيح الهلامي للاكتوفيرين الاغنام بأستعمال عمود هلام السيفادكس Sephadex G – 150، ذي ابعاد 2.5×80 سم الموازن بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.5 مولار والحاوي على كلوريدالصوديوم بتركيز 0.01 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7.4.



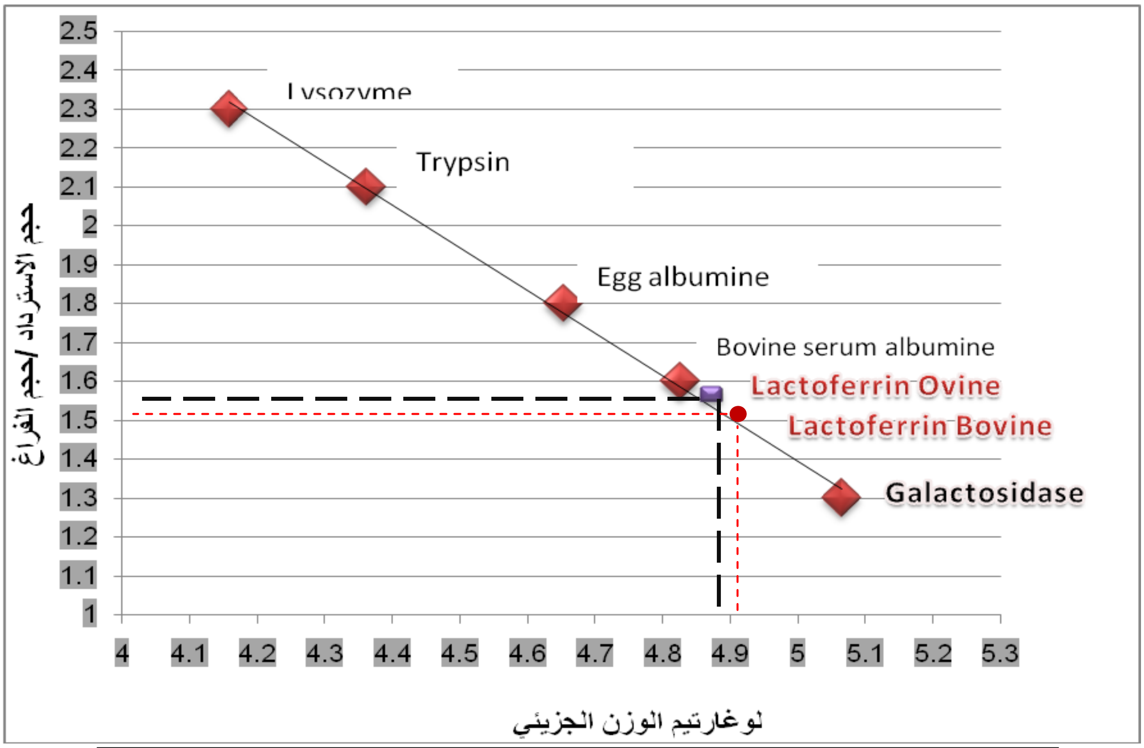
الشكل (5): الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الابقار، اذ يمثل: (1): شرش لبأ الابقار. (2): بروتينات غير مرتبطة من شرش لبأ الابقار.(3)و(4): لاكتوفيرين الابقار المفصول بوساطة التبادل الايوني.(5)و(6): لاكتوفيرين الابقار المنقى بوساطة الترشيح الهلامي.



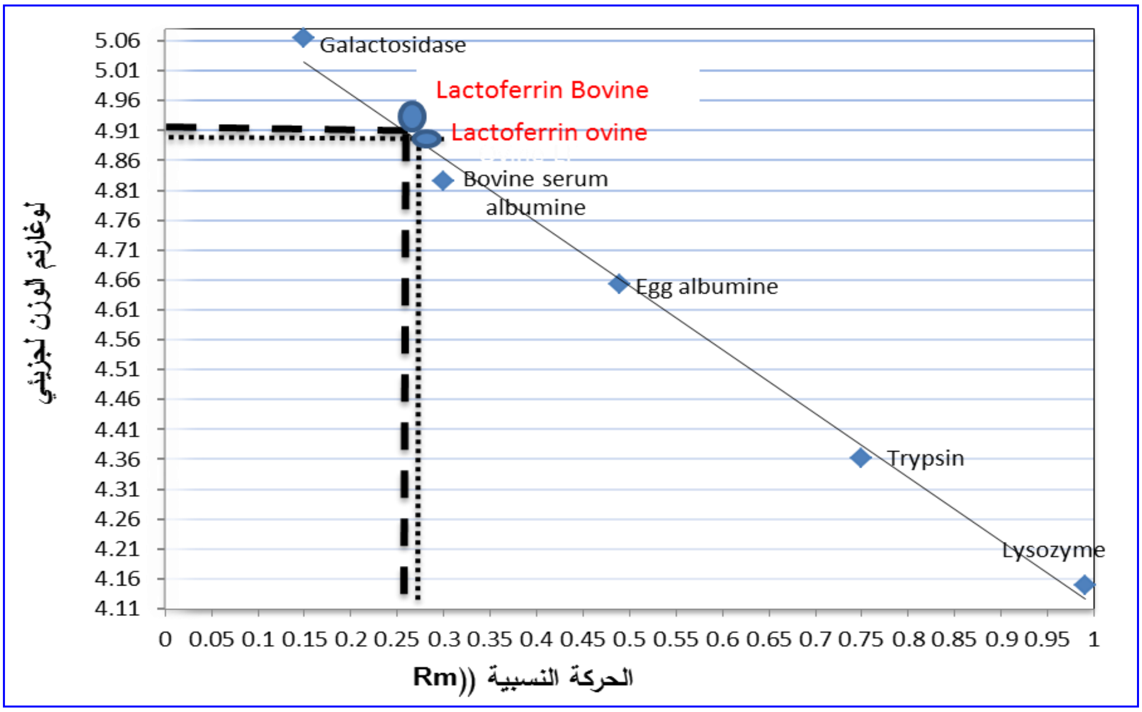
الشكل (6): الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الاغنام، اذ يمثل: (1): شرش لبأ الاغنام. (2): بروتينات غير مرتبطة من شرش لبأ الاغنام.(3)و(4): لاكتوفيرين الاغنام المفصول بوساطة التبادل الايوني.(5)(6): لاكتوفيرين الاغنام المنقى بوساطة الترشيح الهلامي.

المحتوى الكربوهيدراتي لبروتين اللاكتوفيرين: بينت نتائج تقدير الكربوهيدرات ان بروتين لاكتوفيرين الأبقار يحوي على 11.1% كاربوهيدرات في حين احتوى لاكتوفيرين الاغنام على 8.2% من الكربوهيدرات، وقد اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (23) من ان محتوى جزيئة لاكتوفيرين الأبقار من الكربوهيدرات كان 11.2% كما كانت ضمن المدى الذي أشار إليه (21) من ان نسبة الكربوهيدرات في بروتين اللاكتوفيرين تتراوح 7% – 11.5%، إذ الاختلاف في أنواع الثديات يمكن أن يؤدي إلى اختلاف في محتوى الجزيئة من Sialic acid أو اختلاف في عدد السلاسل السكرية للجزيئة البروتينية (26). تعين الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام: ويبين الشكل (7) أن الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار المقدر بطريقة الترشيح الهلامي كان 81.23 كيلو دالتون، بينما كان الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأغنام79.25 كيلو دالتون، في حين تشير الاشكال (8) و (9) الى ان الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والاغنام بلغ 80 و 76 كيلو دالتون على التوالي عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي، اذ يتراوح الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين المفصول من مصادر مختلفة بين 76 – 87 كيلو دالتون (27)، ويعزى تباين النتائج في قيمة الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام إلى محتوى هذا البروتين من الكربوهيدرات (26;14) والتي تتباين تبعاً لمصدر الحصول على البروتين والتي بدورها تعمل على إكساب البروتين وزناً جزيئياً اكبر من الواقع في طريقة الترشيح الهلامي، وذلك لأحاطته بعدد كبير من جزيئات الماء مقارنة مع البروتينات الأخرى التي لا تحتوي على جزء كاربوهيدراتي، كما ويلاحظ الأمر ذاته عند تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة التي تعمل على اضفاء شحنة سالبة على البروتين، لذا فأن نسبة ارتباطها مع اللاكتوفيرين تنخفض فتقل حركته ومن ثم يظهر البروتين بوزن جزيئي أقل من الحقيقي، إذ تتناسب حركة البروتينات في الهلام عكسياً مع لوغاريتم الوزن الجزيئي (2) لذلك فأن النتائج التي تم الحصول عليها تبين ارتفاع الوزن الجزيئي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار على

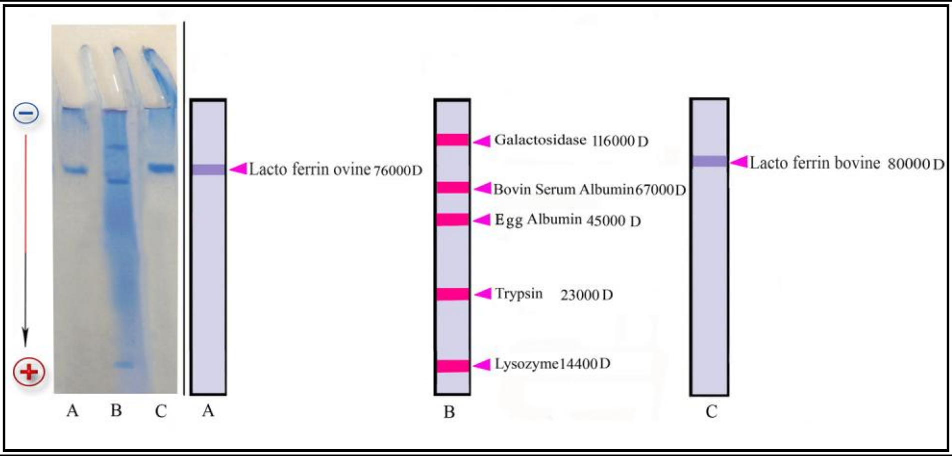
بروتين لاكتوفيرين الأغنام في كلا الطريقتين والسبب في ذلك قد يعود إلى ارتفاع نسبة الكربوهيدرات في البروتين الأول مقارنة مع الثاني، ومن الناحية الأخرى فأن الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي للبروتين يعود الى اختلاف في تعاقب الأحماض الأمينية (23).



الشكل (7): المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الأبقار والأغنام بتقنية الترشيح الهلامي Sephadex G −150 باستعمال بروتينات قياسية



الشكل (8): المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الأبقار والأغنام بطريقة الترحيل الكهربائي باهلام متعدد الاكريلامايد وبوجود العوامل الماسخة SDS.



الشكل (9): الترحيل الكهربائي باهلام متعدد الاكريلامايد وبوجود العوامل الماسخة SDS لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الأبقار والأغنام مقارنة مع البروتينات القياسية، اذ يمثل: A: لاكتوفيرين الاغنام المنقى، B: البروتينات القياسية، C: لاكتوفيرين الابقار المنقى.

محتوى بروتين اللاكتوفيرين من الحديد: تشير نتائج تقدير الحديد باستعمال مطياف الامتصاص الذري أن بروتين لاكتوفيرين الأبقار يحتوي على 14.17% تشبع من الحديد بينما أظهر لاكتوفيرين الأغنام تشبعاً مقداره 11.6%، وان كمية الحديد لكل منها 198.4 و 162.6 جزء بالمليون على التوالي، هذا يتفق مع ما ذكره (19) بأن لاكتوفيرين الابقار يحتوي على 36% تشبع من الحديد بينما لاكتوفيرين الماعز يحتوي على 30% تشبع من الحديد، وكذلك بلغ محتوى تشبع لاكتوفيرين الانسان من الحديد 39%، وهذا يشير الى اختلاف نسبة تشبع اللاكتوفيرين من الحديد تبعاً لمصادره، وقد وجد (7) ان محتوى تشبع الحديد للاكتوفيرين الانسان بين 5% - 15%، وقد تمكن (11) من تقدير محتوى تشبع لاكتوفيرين الابقار والاغنام والماعز والانسان اذ كان يتراوح بين 30% - 40%، اذ يعد بروتين اللاكتوفيرين أحد أفراد عائلة الترانسفيرين والتي تتميز بأن بروتيناتها تكون من النوع الرابط للحديد، وان كل جزيئة من اللاكتوفيرين ترتبط بذرتين من الحديد (17).

المصادر:

1- **جاسم، عبد علي جبر.(1988)**.بعض العوامل المؤثرة على جاهزية الحديد في الحنطة ومنتجاتها.رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد-العراق.

2- **عزيز، رغد أكرم.(2001)**. دراسة فعالية بروتين اللاكتوفيرين المفصول من لبأ الأبقار والجاموس.رسالة ماجستير، كلية الزراعة ، جامعة بغداد-العراق.

3-**Al-Mashikhi, S. A. and Nakai, S.(1987).** Isolation of bovine immune globulinsand lactoferrin from whey protein by gel filtrations techniques. *Journal of Dairy Science*, 70:2486-2492.

4-**Al-Mashikhi, S. A.; Li-Chan, E. and Nakai, S. (1988).**Separation of immune globulins and lactoferrin from cheese whey by chelatingchromatography. ***Journal** of Dairy Science*,71(7):1747-1755.

5-**Baker, E. N. (2005).** Lactoferrin: a multi-tasking protein par excellence. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 62(22): 2592-30.

6-**Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamiton, J. K.; Robers, P. A. and Smith, F.(1959).** Colorimetric method for determination of sugars and substances.*Analytical and chemistry*,28(3):350-356.

7-**Ella, E. E. ;. Ahmad ,A. A;Umoh, V. J. ; Ogala,W. N. and. Balogun T. B,(2009).**Lactoferrin levels in human breast milk among lactating mothers with sick and healthy babies in Kaduna State,Nigeria.*International Journal of Medicine and Medical Sciences* ,1(11) :495-500

8-**Fee, J. C. and Chand A.(2007).** Direct capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange.*Separation and Purification Technology,* 48: 143–149.

9-**Flores-Villasenor, He.; Canizalez-Roman, A. and Reyes-Lopez, M. (2010).** Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals,* 23:569–578.

10-**Gifford, J. L.; Hunter, H. N. and H. J. Vogel. (2005).**Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitum or and immunological properties.*Cellular and Molecular Life Sciences,*62(22):2588-2589.

11-**Hyvönen, P. (2010).**Lactoferrin in bovine intramammary infection. department of production Animal.Dissertation.Animal MedicineFaculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki:78p

12-**Kim, J.; Ko, Y.; Park, Y.; Kim, N.; Ha, W. and Cho, Y. (2010).** Dietary effect of lactoferrin-enriched fermented milk on skin surface lipid and clinical improvement of acne vulgarism. *Nutrition,* 26: 902-909.

13-**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head ofbacteriophageT4Nature.,227(5259):680–285.

14-**Lambert, L.A.; Perri, H.; Halbrooks, P. J. and Mason, A. B. (2005).** Evolution of the transferring family: Conservation of residues associatedwith iron and anion binding. *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part B 142:129 – 141.

15-**Law, B. A. and Reiter, B. (1977).** The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey*. J. Dairy Res*, 44:595-599.

16-**Lowry, O. H.;Rosobrough, N.; Far, A. L. and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with foilin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry,* 193(1): 265-275.

17-**Madureira, A. R.;Claudia, I.; Pereira, A.; Gomes, M.P.; Manuela E.; Pintado, F. and Malcata, X. (2007).**Bovine whey proteins -overview on their main biological properties.Food Research International,40:1197–1211.

18-**Nagasako, Y., Saito, H., Tamura, Y., Shimamura, S. and Tomita, M.(1993).** Iron –binding properties of bovine lactoferrin in iron – rich solution. J. Dairy Sci. 76(7): 1876 – 1881.

19-**Nam, M. S.; Shimazaki, K.; Kumura, H.; Kyung Lee, K. K. and Yu, D. Y. (1999).** Characterization of Korean native goat lactoferrin*.Comparative Biochemistry and Physiology Part B,*123:201–208.

20-**Pierce, A.; Colavizza, D.;Benaissa, M.; Maes, P.; Tartar,A.; Montreuil, J. and Spik, G. (1991).** Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin.*European Journal of Biochem,* 196:177-184.

21-**Shimazaki, K. (2000).**Lactoferrin: a marvelous protein in milk. *Animal Science Journal,* 71: 329-347.

22-**Shimazaki, K. I.; Nitta, K.; Sato, T.; Tomimura, T. and Tomita, M. (1992).** Different profiles of induced cotton effects of human and bovine lactoferrin by

cibacronbblue F3GA binding. *Comparative Biochemistry and Physiology,*101B, (4):541-545.

23-**Spik, G.; Coddeville, B.; Mazurier, J.; Bourne, Y.; Cambillaut, C.and Montreuil, J. (1994)**. Primary and three-dimensional structureof lactotransferrin (lactoferrin) glycans. *Advances in ExperimentalMedicineand Biology,* 357:21-32.

24-**Stumpf and Welch. (2004)**. Secretary and defensive functions of the duct system of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodontoafricana, proboscidea*). *Zoomorphology,* 123:155-167.

25-**Tomita, M.; Bellamy, W.; Takasem,M.; Yamauchi, Wakabayashi, H. and Kawase,K. (1991)**. Potentantibacterialpeptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science,*74:4137- 4142.

26-**Van der Kraan, M. I.;Groenink, J.;Nazmi, K. ;Veerman, E. C.;Bolscher, J. G. and Nieuw, A. V. (2004)**. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides.* 25:177-183.

27-**Wang, H. and Hurley, W. L. (1998)**. Identification of lactoferrin complexes in bovine mammary secretions during mammarygland involution. *Journalof Dairy Science,*81: 1896-1903.

28-**Weber, K. and Osborn, M.(1969)**.The Reliabity of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polydactylamide gelelectro phoresis. *Journal of Biology Chem.,*244(16):4406-4412.

Purification of protein lactoferrin from bovine and ovine colostrum and study some properties

A. K. AL-Rikabi — Coll. Of Agricul., Univ. of Basrah

R. A. Aziz — Dep. of Sciences, Univ, of Al-Mustansiriya

R. R. Al-Hatim — Coll. Of Agricul., Univ. of Basrah

Abstract

Lactoferrin was purified from bovine and ovine whey colostrums by ion exchange throw CM-Sephadex A-50 and gel filtration throw Sephadex G-150. The purity of Lactoferrin to homogeneity was examined by polyacrylamide gel electrophoresis with single bond. The percentage of carbohydrate content in bovine and ovine Lactoferrin were 11.1 and 8.2% respectively. The percent of Fe in bovine and ovine Lactoferrin were 198.4 and 162.6 ppm as a saturated percent 14.17 and 11.6 respectively. The molecular weight for bovine and ovine Lactoferrin were 81.23 and 79.25 kDa respectively as determined by gel filtration, while its 80 and 76 kDa respectively. lactoferrin from bovine and ovine colostrums was known its ability as antimicrobial agent against some microorganisms and how its effect as antioxidant agents. The results were referred to the complete lactoferrin form bovine and ovine, also hydrolysis lactoferrin form bovinesha were showed ability as antibacterial agent against some bacteria like: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. The specific study of lactoferrin effect as antioxidant agents were referred to the reducing force for lactoferrin was increase by upper concentration; the antioxidant activity was different according to its sources and protein structure. So, ovine lactoferrin was given a good results to prevent linoleic acid oxidation that it near to industrial antioxidant (BHT), but the percent of bovine lactoferrin as the antioxidant activity was 73.64%, the binding ability to ferrous ion for both of bovine and ovine lactoferrin were increased with the upper concentrate, ovine lactoferrin was given a good results 88.89% that it near to control EDTA, while the binding ability to bovine lactoferrin to olive and fish (*Tenualosa ilisha*) oil that storage at 45^{o}C for 120 days refer to the concentration 0. 08% showed highest antioxidant activity than the other concentrations, the peroxide value was decreased with increase concentrations.