Spring (2023) 11(4): 55-63
DOI: 10.30473/EAB.2023.66471.1895
Received: 25 Dec 2022 Accepted: 8 Jun 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the properties of Lactoferrin and comparing its amount in cow, sheep and goat milk

Ali Ahmadi-Shapourabadi*, Mohammad Fazilati, Hbib-Allah Nazem

Department of Bioligy, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence
Ali Ahmadi-Shapourabadi
Email:ali.ahmadi@isfahan.pnu.ac.ir

How to cite
Ahmadi-Shapourabadi, A., Fazilati, M. & Allah Nazem, H. (2023). Investigating the properties of Lactoferrin and comparing its amount in cow, sheep and goat milk. Experimental Animal Biology, 12(4), 55-64.

ABSTRACT
Lactoferrin is one of the milk proteins that has shown a wide range of physiological activities such as antibacterial, anti-protozoal, anti-fungal, anti-viral, anti-cancer, antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory. In this study, lactoferrin was extracted and purified from cow, sheep and goat milk. HPLC analysis and determination of the concentration of these three extracted lactoferrins were performed. Antibacterial activity against Gram negative Escherichia coli and Salmonella typhi and gram positive Bacillus cereus and Staphylococcus aureus and antioxidant activity were investigated. The activity of lactoferrin against DPPH free radical was investigated. Also, lactoferrin activity was evaluated in neutral acidic and alkaline environments. The combination test with iron was also performed with FeNTA reagent. The findings showed that lactoferrin has the ability to inhibit two bacteria, Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Also, the evaluation of lactoferrin activity in neutral acidic and alkaline environments showed that lactoferrin is more stable in alkaline environment than other environments. In the combination test with iron, the results indicated the combination of lactoferrin with iron. The percentage of free radical inhibition was equal to %4.49. Also, the results showed that the concentration of lactoferrin in goat's milk is higher than that of sheep's and cow's milk and its amount was equal to 131.66 µg/ml.

KEYWORDS
antibacterial, antioxidant activity, lactoferrin, extraction.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال یازدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل‌وچهارم، بهار ۱۴۰۲ (۶۳-۵۵)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۸

DOI: 10.30473/EAB.2023.66471.1895

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی خواص لاکتوفرین و مقایسه میزان آن در شیر گاو، میش و بز

علی احمدی شاپورآبادی*، محمد فضیلتی، حبیب‌اله ناظم

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:
علی احمدی شاپورآبادی
رایانامه: ali.ahmadi@isfahan.pnu.ac.ir

چکیده

لاکتوفرین یکی از پروتئین‌های شیر است که طیف وسیعی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی مانند ضد باکتری، ضد تک‌یاخته، ضد قارچ، ضد ویروسی، ضد سرطان، آنتی اکسیدان، ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی را از خود نشان داده است در این مطالعه لاکتوفرین از شیر گاو، میش و بز استخراج و خالص‌سازی شد. آنالیز HPLC و تعیین میزان غلظت این سه لاکتوفرین استخراج‌شده انجام شد. بررسی فعالیت ضد باکتری بر علیه باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی و گرم مثبت باسیلوس سرئوس و استافیلوکوک آرئوس و فعالیت آنتی اکسیدانی انجام شد. فعالیت لاکتوفرین دربرابر رادیکال آزاد DPPH بررسی شد. همچنین فعالیت لاکتوفرین در محیط های اسیدی خنثی و قلیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ترکیب با آهن نیز با معرف FeNTA انجام شد. یافته‌ها نشان دادند که لاکتوفرین قدرت مهار دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوک آرئوس را دارد. همچنین ارزیابی فعالیت لاکتوفرین در محیط های اسیدی خنثی و قلیایی نشان داد که لاکتوفرین در محیط قلیایی پایداری بیشتری نسبت به سایر محیط‌ها را دارد. درآزمون ترکیب با آهن، نتایج حاکی از ترکیب لاکتوفرین با آهن بودند. درصد مهار رادیکال آزاد برابر با ۴/۴۹ درصد بود. همچنین نتایج نشان داد که میزان غلظت لاکتوفرین شیر بز بیشتر از شیر میش و گاو است و میزان آن برابر با ۱۳۱/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.

واژه‌های کلیدی

استخراج، ضد باکتری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، لاکتوفرین.

استناد به این مقاله:

احمدی شاپورآبادی، علی، فضیلتی، محمد و ناظم، حبیب‌اله (۱۴۰۲). بررسی خواص لاکتوفرین و مقایسه میزان آن در شیر گاو، میش و بز. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۱(۴)، ۵۵-۶۳.

مقدمه

در حال حاضر، پروتئین‌های لبنی با ارزش بالا به عنوان یک محصول جانبی درنظر گرفته می‌شوند و درآمد عمده این صنعت از محصولات لبنی مانند پودر شیر، پنیر و کره است (Fee & Chand, 2006). شیر، تنها غذای کامل یا فرآورده مغذی است که به دلیل داشتن مواد مغذی متنوع، تمام مواد مغذی لازم را برای همه پستانداران از جمله انسان از سنین نوزادی تا بزرگسالی فراهم می‌کند. تحقیقات برای استخراج این ترکیبات زیست فعال در مقیاس بزرگ با حداقل هزینه در سطح جهانی در حال انجام است. پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات نشان داده است که نوزادان به دلیل وجود چنین ترکیبات زیست فعال در آغوز و همچنین شیر، از عفونت‌های میکروبی مختلف و سرطان محافظت می‌شوند (Gobbetti et Montoya et al,2012 al,2007,). در میان این ترکیبات زیست فعال، لاکتوفرین و ایمونوگلوبولین دو ترکیب فعال زیستی مهم مورد علاقه تحقیقاتی هستند که به حفظ خود شیر کمک می‌کنند زیرا دارای خواص ضدعفونت‌های میکروبی مختلف و خواص ضد سرطانی هستند. لاکتوفرین[1]، یک گلیکوپروتئین متصل به آهن با وزن مولکولی ۷۸ تا ۸۰ کیلو دالتون که حاوی حدود ۶۹۰ تا ۷۰۲ اسید آمینه باقی‌مانده است. لاکتوفرین عضوی از خانواده ترانسفرین است که توانایی خاصی در اتصال آهن دارد (Legrand et al,2008). این پروتئین در ترشحات پستانداران مانند شیر، اشک، بزاق، مایعات منی، مایعات واژن، مخاط بینی، مخاط برونش و همچنین در برخی از گلبول‌های سفید و گرانول های ثانویه نوتروفیل‌ها وجود دارد (Rodrigues et al,2008). لاکتوفرین به عنوان یک مولکول دفاعی مهم میزبان درنظر گرفته می‌شود و دارای طیف متنوعی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی مانند ضد باکتری، ضد تک‌یاخته، ضد قارچ، ضد ویروسی، ضد سرطان، آنتی اکسیدان، ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی است (Iigo et. al., 2009). بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی به لاکتوفرین نسبت داده شده است. یکی از عملکردها انتقال فلزات است. لاکتوفرین نیز جزء مهمی از سیستم ایمنی غیر اختصاصی است، زیرا دارای خواص ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها و بعضی از ویروس‌ها است (Van der et al,2001).

پیشینه پژوهش

امروزه تغذیه کودکان با ترکیباتی شامل لاکتوفرین گاوی درکشورهای مختلف مثل ژاپن، کره و اندونزی انجام می‌گیرد. محصولات دیگری که حاوی لاکتوفرین گاوی می‌باشند عبارتند از ماست، شیر پرچرب، داروهای مکمل، غذای حیوانات، کودکان و محصولات آرایشی می‌باشند (Wakabayashi et al, 2006). در مطالعات بابایی و همکاران، روی جداسازی یک پروتئین خاص، از سه روش کروماتوگرافی، ژل فیلتراسیون، تعویض یونی و HPLC که در هر مرحله محصول خالص شده دیالیز و پروتئین آن محاسبه گردید، استفاده شد. نتایج نشان داده که به هر مرحله خالص‌سازی مقدار کل پروتئین کمتر شد ولی فعالیت آن پروتئین در هر مرحله زیادتر شد. (Babaie M et al,2013). آلا و همکاران در سال نشان دادند که لاکتوفرین شیر شتر بر باکتری‌های اشریشیا کولی و سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس واسترپتوکوکوس اگالاکتیه اثر مهاری داشت (Alaa et al., 2013). نتایج بررسی مصرف مقادیر مختلف لاکتوفرین در پنیر، نشان داد که با افزایش مقادیر لاکتوفرین رشد باکتری‌ها در این فراورده لبنی کاهش یافته، در نتیجه ماندگاری پنیر بیشتر شد (Shashikumar & Puranik, 2011).

روش‌شناسی پژوهش

استخراج آنزیم لاکتوفرین

شیرهای مورد استفاده در این مطالعه از منطقه دولت‌آباد استان اصفهان تهیه گردید. سه شیر گاو، میش و بز پس از جمع‌آوری برای حفظ ساختار پروتئینی آنزیم‌ها بلافاصله به یخچال منتقل گردید. برای عمل چربی‌زدایی، شیرها در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند و چربی‌ها از شیر جدا شدند.

جداسازی آب پنیر

شیرها در بن ماری ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و اسید استیک ۱ درصد به صورت قطره قطره به آن اضافه شد تا ایجاد لخته شود. سپس مایع به دست آمده (آب پنیر) برای استخراج لاکتوفرین جدا شد.

سنجش پروتئین کل با روش برادفورد[2]

جهت تعیین مقدار پروتئین نمونه مجهول با روش برادفورد، در یک لوله مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از شیر چربی‌زدایی شده و ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته و پس از مخلوط‌کردن محتویات لوله، ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد به آن اضافه و مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، جذب نوری نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه UV اسپکتروفوتومتر (SHIMADZU-2550) به دست آمد. سپس با استفاده از نمودار منحنی استاندارد پروتئین، مقدار پروتئین نمونه مجهول محاسبه شد (Bradford,1976).

1. lactoferrin

2. Bradford

خالص‌سازی توسط سولفات آمونیوم

برای خالص‌سازی بیشتر پروتئین، سولفات آمونیوم جامد به‌صورت تدریجی به لاکتوفرین استخراجی اضافه شد درحالی‌که روی دستگاه استیرر درحال هم‌زدن مستمر بود تا به ۵۰ درصد حد اشباع رسید. بعد از آن به مدت ۱ ساعت هم‌زدن ادامه پیدا کرد. محلول حاصل به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. سپس جهت رسوب‌گیری، با دور rpm ۱۰۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار و pH=۷ حل شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در شیشه قهوه‌ای درپوش‌دار نگهداری شد.

تصفیه ازطریق دیالیز

جهت تصفیه بیشتر پروتئین و جداسازی یون‌ها و مولکول‌های کوچک‌تر، نمونه به دست آمده از مرحله رسوب‌دهی با سولفات‌آمونیوم به کیسه دیالیز منتقل و در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵مولار و pH=۷ به صورت معلق قرار داده شد، سپس به مدت ۲۴ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

کروماتوگرافی تعویض یونی[1]

خالص‌سازی نهایی پروتئین لاکتوفرین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گرفت. مایع به دست آمده از مرحله دیالیز بر روی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی به ابعاد ۱۰×۳ سانتیمتر با استفاده از رزین سفادکس C50 لود گردید. عمل متعادل‌سازی رزین سفادکس با بافر فسفات سدیم۱۰ میلی مولا ، pH=۶/۸ ، انجام شد، سپس نمونه پروتئین به ستون تزریق گردید و ستون با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار pH= ۶/۸ محتوی NaCl با شیب غلظت شستشو داده شد.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[2]

نمونه لاکتوفرین استخراج‌شده جهت تعیین پروتئین خالص و محاسبه غلظت آن، به دستگاه HPLC (SY-8100)، تزریق شد. برای این‌کار از ستون C18 و فاز متحرک استونیتریل و ۱ درصد تری‌فلورواستیک اسید استفاده شد. سپس دستگاه در طول موج ۲۵۴ نانومتر تنظیم گردید. ۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین به دستگاه تزریق شد.

بررسی خاصیت ضد باکتری

خاصیت ضد باکتری لاکتوفرین بر روی سویه‌های استاندارد گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و گرم منفی اشرشیاکولی به روش انتشار دیسک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. دیسک سلولزی به قطر ۶ میلی‌متر با ۲۰ میکرولیتر از لاکتوفرین استخراج شده از شیر بز، گاو و میش آغشته شد و در زیر هود و نور UV خشک گردید. سپس بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار حاوی باکتری‌های ذکر شده قرار گرفتند. از دیسک آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل استفاده شد.

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی لاکتوفرین بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی لاکتوفرین با ۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، به عنوان رادیکال آزاد، اندازه‌گیری شد. ۰/۳ میلی‌لیتر DPPH در اتانول ۱۰۰ درصد حل شد، سپس ۳/۹ میلی‌لیتر از این محلول با ۰/۱ میلی‌لیتر لاکتوفرین مخلوط و ورتکس شد. محلول حاصل در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و جذب آن توسط طیف‌سنج UV در طول موج ۵۱۷ نانومتر، برای بررسی میزان مهار رادیکال آزاد، اندازه‌گیری شد (Blois 1958).

بررسی ترکیب آهن با لاکتوفرین

لاکتوفرین استخراج شده به عنوان ماده اولیه، برای تهیه ترکیب لاکتوفرین با محتوای آهن اصلاح شده استفاده شد. لاکتوفرین با محلول FeNTA (۹/۹ میلی‌مولار $Fe(NO_3)_3$ و ۸/۵ میلی‌مولار اسید نیتریلوتری استیک) مخلوط شد و آهن اضافی با اولترافیلتراسیون حذف شد. برای بررسی وضعیت اشباع آهن با لاکتوفرین، این محلول در دستگاه UV اسپکتروفوتومتر قرار گرفت. سپس وضعیت ترکیب آهن با پروتئین لاکتوفرین با نسبت جذب نور در ۴۶۵ نانومتر (طول موج ترکیب آهن) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج پروتئین) برآورد شد. (Brisson et al,2007).

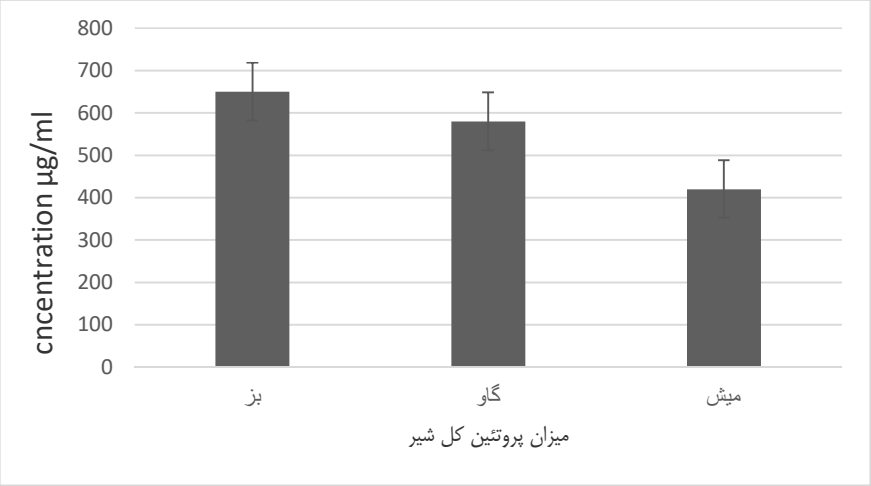
بررسی پایداری لاکتوفرین در محیط‌های اسیدی قلیایی و خنثی

به منظور تایید و تعیین فعالیت لاکتوفرین، در طول فرآیند جداسازی آن از شیر در سه محیط اسیدی خنثی و قلیایی، مورد بررسی قرار گرفت. برای تنظیم pH محلول لاکتوفرین از HCl (محیط اسیدی) و NaOH (محیط بازی) ۰/۱ مولار استفاده گردید. محلول لاکتوفرین در محدوده اسیدی (pH: ۴) خنثی (pH:۷) و قلیایی (pH: ۱۰)، در طول موج ۲۹۳ نانومتر برای بررسی بیشترین میزان لاکتوفرین و پایداری آن، مورد بررسی قرار گرفت.

1. Ion exchange chromatography
2. High-performance liquid chromatography

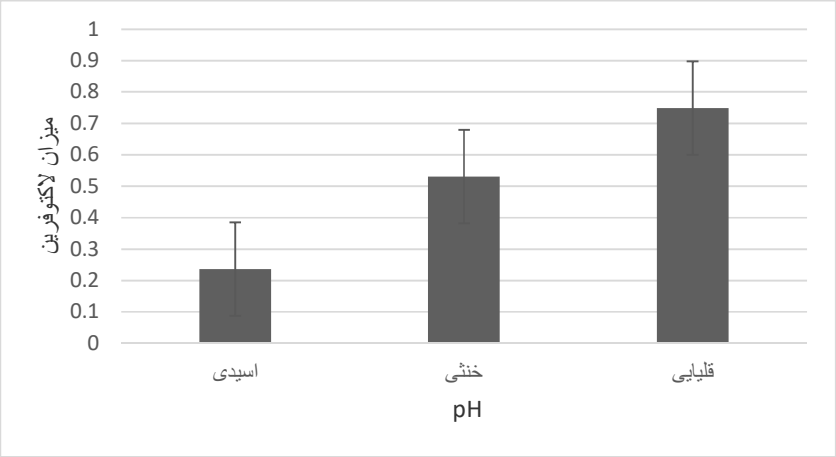
یافته‌ها

شکل ۱ نمودار غلظت پروتئین کل بر اساس روش برادفورد، در محلول آب پنیر استخراج شده از شیر بز، گاو و میش در طول موج ۵۹۵ نانومتر را نشان می‌دهد که از منحنی استاندارد پروتئین به دست آمده است. براساس این مقادیر شیر بز دارای محتوای پروتئینی بیشتری نسبت به شیر گاو و میش بوده است.



شکل ۱. نمودار غلظت پروتئین کل در آب پنیر حاصل از شیر بز، گاو و میش

در بررسی پایداری لاکتوفرین در محیط‌های اسیدی قلیایی و خنثی مشخص شد که بیشترین میزان لاکتوفرین در محیط قلیایی می‌باشد. بر این اساس پروتئین لاکتوفرین در محیط قلیایی نسبت به سایر محیط‌ها پایدارتر است (شکل ۲).



شکل ۲. میزان لاکتوفرین در محیط‌های اسیدی قلیایی و خنثی

بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین

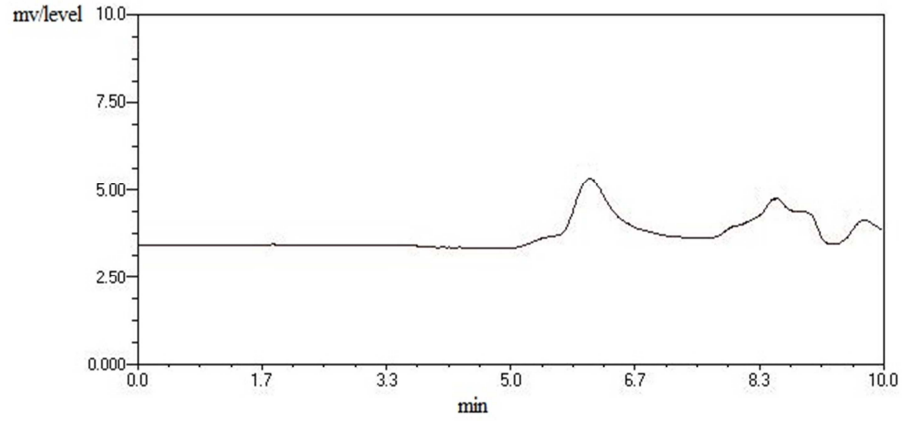
جدول ۱ فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین استخراج شده بر روی ۴ باکتری گرم مثبت و گرم منفی اشرشیا کولی[1]، استافیلوکوک آرئوس[2]، سالمونلا تیفی[3] و باسیلوس سرئوس[4] را نشان می‌دهد. بررسی محیط‌های کشت باکتری‌ها مشخص شد که لاکتوفرین شیر میش اثر مهارکنندگی بیشتری بر باکتری اشرشیاکلی و استاف آرئوس دارد.

1. Escherichia coli
2. Staphylococcus aureus
3. Salmonella typhi
4. Bacillus cereus

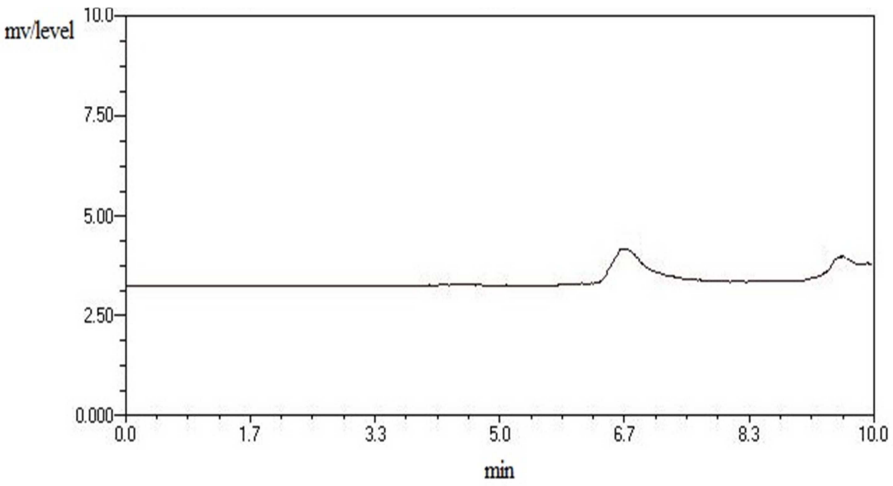
جدول ۱. فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین‌های استخراج‌شده

قطر ناحیه مهار(mm)				
شیر/ باکتری	**شیر میش**	**شیر بز**	**شیر گاو**	**تتراسایکلین**
اشرشیا کولی	۲/۵	۱	۱	۱۰
استافیلوکوک آرئوس	۳	۱	۱	۱۰
سالمونلا تیفی	۰	۰	۰	۱۰
باسیلوس سرئوس	۰	۰	۰	۶

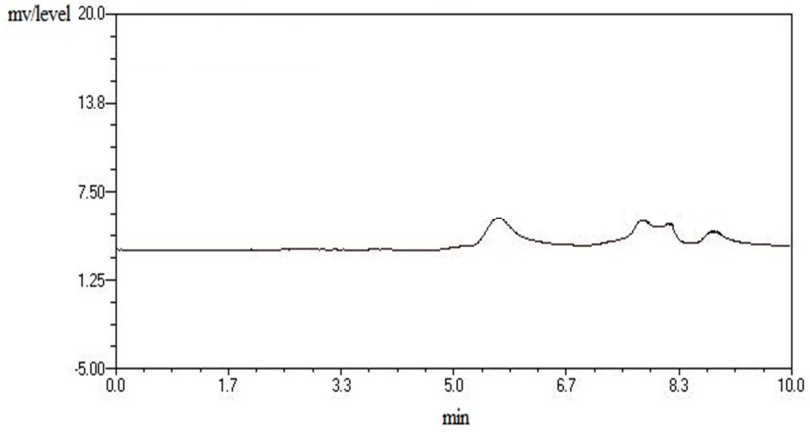
در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، پیک مشاهده شده از لاکتوفرین، براساس استاندارد آن در زمان بین ۵ تا ۶ دقیقه مشاهده شد. (شکل ۴،۳ و ۵) بیشترین سطح زیر پیک برای لاکتوفرین خالص شده از شیر بز مشاهده شد.



شکل ۳. نمودار HPLC از لاکتوفرین شیر گاو



شکل ٤. نمودار HPLC از لاکتوفرین شیر میش



شکل ۵. نمودار HPLC از لاکتوفرین شیر بز

براساس نتایج حاصل از HPLC و سطح زیر پیک لاکتوفرین استخراج شده از سه شیر، غلظت لاکتوفرین برای شیر بز برابر با ۱۳۱/۶۶، برای شیر گاو برابر با ۱۲۶ و برای شیر میش برابر با ۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط لاکتوفرین از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد مهار= جذب کنترل – جذب نمونه/ جذب کنترل × ۱۰۰

درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد با ۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط لاکتوفرین طبق فرمول برابر ۴/۴۹ درصد محاسبه شد.

وضعیت اشباع آهن توسط لاکتوفرین براساس جذب UV و با نسبت جذب در طول موج ۴۶۵ و ۲۸۰ نانومتر برآورد شد که برای لاکتوفرین استخراج شده برابر با ۰/۹۵۴ بود.

نتیجه‌گیری و بحث

پروتئین‌های آب پنیر دارای طیف وسیعی از نقاط ایزوالکتریک هستند و این ویژگی جداسازی آنها را با کروماتوگرافی تبادل یونی امکان‌پذیر کرده است. سه جزء اصلی در میان پروتئین‌های آب پنیر، β-لاکتوگلوبولین[9]، α-لاکتالبومین[10] و آلبومین سرم گاوی پروتئین‌های اسیدی هستند (Rollo et al., 2014). با این حال، لاکتوپراکسیداز[11] و لاکتوفرین از پروتئین‌های با بار مثبت هستند (Takahashi et al., 2007, , Kim et al., 2009). چندین مطالعه فعالیت بالقوه ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی لاکتوفرین را نسبت به طیف گسترده‌ای از گونه‌ها نشان داده‌اند (Wakabayashi et al,2006) که عمدتاً از توانایی آن در اتصال به آهن سرچشمه گرفته است (Burrow et al., 2011). در این مطالعه برای بررسی ترکیب آهن با لاکتوفرین با محلول FeNTA مخلوط شد. سپس وضعیت ترکیب آهن با پروتئین لاکتوفرین با نسبت جذب UV در ۴۶۵ و ۲۸۰ نانومتر برآورد شد. که برای لاکتوفرین استخراج شده برابر با ۰/۹۵۴ بود. مشخص شده است که لاکتوفرین انسان و گاو و مشتقات پپتیدی آنها نقش اساسی در پیشگیری و درمان سرطان دارند. برخی از عملکردهای اعمال‌شده توسط لاکتوفرین نیز می‌تواند تحت‌تأثیر وضعیت اتصال آهن آن قرار گیرد و می تواند آهن آزاد را در محل‌های ملتهب یا عفونی پاک کند. این‌کار را با سرکوب آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و کاهش دسترسی فلز به پاتوژن‌ها و سلول‌های سرطانی انجام می‌دهد. علاوه‌بر این، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بسته به میزان اشباع آهن، لاکتوفرین می‌تواند عملکردهای متفاوتی را با فعال‌کردن مسیرهای سیگنال‌دهی خاص اعمال کند (Mahala et al., 2022). لاکتوفرین به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان با توانایی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو شناخته شده است که مطالعات مختلفی در تایید هیدرولیزات‌های به دست آمده از آن در موش‌ها تایید شده است. گزارش شده است که لاکتوفرین در واکنش‌های اکسایش و کاهش در غشاء سلول‌ها مشارکت می‌کند. لاکتوفرین یک ترکیب مهارکننده آهن است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط با توانایی آن در باندکردن آهن ۲ و ۳ ظرفیتی است (Salami et al., 2009). در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط لاکتوفرین محاسبه شد. درصد

9. β-lactoglobulin
10. α-lactalbumin
11. Lactoperoxidase

مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل) توسط لاکتوفرین طبق فرمول برابر ۴/۴۹ درصد محاسبه شد. لاکتوفرین و پپتیدهای حاصل از آن خاصیت ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین ناشی از چند مکانیسم است، از دسترس خارج کردن آهن مورد نیاز باکتری و میان‌کنش مستقیم با میکروب (میان‌کنش با اسید لیپوتیکوئیک باکتری‌های گرم مثبت و لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی)، افزایش خاصیت آنتی‌بیوتیکی در مقابله با بعضی از باکتری‌ها و افزایش خاصیت ضد باکتریایی لیزوزیم از اثرات آن بوده است. همچنین لاکتوفرین قادر است با خاصیت دور کردن آهن از تشکیل بیوفیلم در باکتری جلوگیری کرده که این امر سبب حساس‌تر شدن باکتری‌های مقاوم نظیر سودوموناس آئروجینوزا شده است (Mahdi et al., 2017, Matijašić et al., 2020). در این مطالعه اثر لاکتوفرین بر روی باکتری‌های اشرشیا کولی، استافیلوکوک آرئوس، سالمونلا تیفی و باسیلوس سرئوس بررسی شد و مشخص شد که لاکتوفرین شیر میش اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های اشرشیاکلی و استاف آرئوس را دارد. و بر سالمونلا تیفی و باسیلوس سرئوس بی‌تاثیر است.

محتوای لاکتوفرین در شیر بین گونه‌های مختلف پستانداران و در یک گونه خاص، بین دوره‌های شیردهی متفاوت است (Palmano et al., 2009). در این مطالعه براساس نتایج حاصل از HPLC و سطح زیر پیک لاکتوفرین استخراج شده از سه شیر، غلظت لاکتوفرین برای شیر بز بیشتر از شیر گاو و شیر میش، برابر با ۱۳۱/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. استفاده از روش‌های جداسازی برای اندازه‌گیری دقیق مقدار مواد فعال بدون تداخل ناخالصی‌ها و مواد کمکی بسیار مهم است (Blessy et al., 2014). بنابراین روش HPLC یک روش پایدار و بهینه برای تعیین لاکتوفرین و همچنین برای کنترل کیفیت محصولات نهایی بوده است (Osel et al., 2021).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام‌نور مرکز اصفهان صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماید و هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند. این طرح با کد ۵۵۸۵۳۷۰ در دانشگاه پیام‌نور مرکز اصفهان تصویب شده است.

References

Alaa B. Ismael. Salama M. Abd El Hafez. Manal B. Mahmoud.AbdelKader A. Elaraby. Hany M. Hassan. (2013). Development of New Strategy for Non-Antibiotic Therapy: Dromedary Camel Lactoferrin Has a Potent Antimicrobial and Immunomodulatory Effects. *Advances in Infectious Diseases*. 3: 231-237

Babaie, M., Zolfagharian, H., Salmanizadeh, H., Mirakabadi, A. Z., & Alizadeh, H. (2013). Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake Echis carinatus. *Acta Biochimica Polonica*, *60*(1).

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199–1200.

Bradford, Marion M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2): 248–254.

Brisson, G., Britten, M., & Pouliot, Y. (2007). Effect of iron saturation on the recovery of lactoferrin in rennet whey coming from heat-treated skim milk. *Journal of dairy science*, 90(6), 2655-2664.

Blessy, M. R. D. P., Patel, R. D., Prajapati, P. N., et al., Y. K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of pharmaceutical analysis, 4(3), 159-165.*

Burrow, H., K Kanwar, R., & R Kanwar, J. (2011). Antioxidant enzyme activities of iron-saturated bovine lactoferrin (Fe-bLf) in human gut epithelial cells under oxidative stress. *Medicinal chemistry, 7(3), 224-230.*

Fee, C. J., & Chand, A. (2006). Capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. Separation and purification technology, 48(2), 143-149.

García-Montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1820(3), 226-236.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2007). Bioactive peptides in dairy products. *Handbook of food products manufacturing, 2, 489-517.*

Iigo, M., Alexander, D. B., Long, N., Xu, J., Fukamachi, K., Futakuchi, M., ... & Tsuda, H. (2009). Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. Biochimie, 91(1), 86-101.

Kim, H. J., & KIM, C. W. (2009). Stabilization of glycoprotein liquid formulation using arginine: A study with lactoferrin as a model protein. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 73(1), 61-66.

Legrand, D., Pierce, A., Elass, E., Carpentier, M., Mariller, C., & Mazurier, J. (2008). Lactoferrin structure and functions. Bioactive components of milk, 163-194.

Mahala, N., Mittal, A., Lal, M., & Dubey, U. S. (2022). Isolation and characterization of bioactive lactoferrin from camel milk by novel pH-dependent method for large scale production. Biotechnology Reports, 36, e00765.

Mahdi, L., Musafer, H., Zwain, L., Salman, I., Al-Joofy, I., Rasool, et al. (2017). Two novel roles of buffalo milk lactoperoxidase, antibiofilm agent and immunomodulator against multidrug resistant Salmonella enterica serovar Typhi and Listeria monocytogenes. Microbial Pathogenesis, 109, 221-227.

Matijašić, B. B., Oberčkal, J., Mohar Lorbeg, P., Paveljšek, D., Skale, N., Kolenc, B., et al. (2020). Characterisation of lactoferrin isolated from acid whey using pilot-scale monolithic ion-exchange chromatography. Processes, 8(7), 804.

Osel, N., Planinšek Parfant, T., Kristl, A., & Roškar, R. (2021). Stability-Indicating Analytical Approach for Stability Evaluation of Lactoferrin. Pharmaceutics, 13(7), 1065.

Palmano, K. P., & Elgar, D. F. (2002). Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene–divinylbenzene. *Journal of Chromatography A, 947(2), 307-311.*

Rodrigues, L., Teixeira, J., Schmitt, F., Paulsson, M., & Månsson, H. L. (2008). Lactoferrin and cancer disease prevention. *Critical reviews in food science and nutrition, 49(3), 203-217.*

Rollo, D. E., Radmacher, P. G., Turcu, R. M., Myers, S. R., & Adamkin, D. H. (2014). Stability of lactoferrin in stored human milk. *Journal of Perinatology, 34(4), 284-286.*

Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Chobert, J. M., Haertlé, T., ... & Moosavi-Movahedi, A. A. (2009). Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α-lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. International Dairy Journal, 19(9), 518-523.

Shashikumar, C. S. S., & Puranik, D. B. (2011). Study on use of lactoferrin for the biopreservation of paneer.

Takahashi, Y., Takeda, C., Seto, I., Kawano, G., & Machida, Y. (2007). Formulation and evaluation of lactoferrin bioadhesive tablets. International *journal of pharmaceutics, 343(1-2), 220-227.*

Tsakali, E., Petrotos, K., Chatzilazarou, A., Stamatopoulos, K., D'alessandro, A. G., Goulas, P., ... & Van Impe, J. F. M. (2014). Determination of lactoferrin in Feta cheese whey with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science, 97(8), 4832-4837.*

Van der Strate, B. W. A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C., & Meijer, D. K. F. (2001). Antiviral activities of lactoferrin. Antiviral research, 52(3), 225-239.

Wakabayashi, H., Yamauchi, K., & Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal, 16(11), 1241-1251.*