BRIEF REPORT

Extraction and Purification of Lactoferrin from Camel Milk and Investigation of Its Amylase Activity

Saeed Zibaei[1],
Anis Bakhshani[2],
Ali Bidmeshkipour[3]

[1] Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Northeast Branch, Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
[2] MSc in Cellular and Molecular Biology, *Razi University* of Kermanshah, Kermanshah, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, *Razi University* of Kermanshah, Kermanshah, Iran

(Received December 15, 2021 ; Accepted May 1, 2022)

Abstract

Background and purpose: Lactoferrin is found in mucus, milk, and colostrum secretions and has antimicrobial activities, improves iron absorption, and enhances immune responses. Lactoferrin has the ability to degrade starch. The aim of this study was to investigate the preservation of milk lactoferrin enzymatic activity after purification by ion exchange chromatography.

Materials and methods: In this experimental research, fat and casein were removed from camel milk and lactoferrin was purified by ion exchange chromatography using CM-Sephadex-C-50. K_m and V_{max} values of lactoferrin amylase activity, pH, and optimum reaction temperature were determined. For this purpose, 0.5% solution of cornstarch was used as a substrate and iodine activity test was used to determine the unused amounts. The optimum temperature for amylase activity was determined by paper chromatography.

Results: The presence of lactoferrin was seen at about 73 KD and its average concentration was 60 µg/ml. K_m and V_{max} values were 2mg.ml^{-1} and 0.2 mg.ml^{-1}.min-1, respectively. Lactoferrin also showed extensive amylase activity in pH 4-7 and had the highest activity at pH 5. The amylase activity of lactoferrin reached its maximum at 40°C. Enzymatic digestion caused hydrolysis of starch and its conversion to maltose and glucose.

Conclusion: According to the present study, ion exchange chromatography could isolate high purity lactoferrin. High amylase activity of lactoferrin showed that its protein structure was preserved after passing through the chromatographic column.

Keywords: lactoferrin, camel milk, ion exchange chromatography

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (209): 175-179 (Persian).

Corresponding Author: Saeed Zibaei - Razi Vaccine and Serum Research Institute, Northeast Branch, Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. (E-mail: s.zibaee@mrazi.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-01-22]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 209 خرداد سال 1401 (179-175)

استخراج و تخلیص لاکتوفرین از شیر شتر و بررسی فعالیت آمیلازی آن

سعید زیبائی[1]
انیس بخشانی[2]
علی بید مشکی پور[3]

چکیده

سابقه و هدف: لاکتوفرین در ترشحات موکوسی، شیر و کلستروم یافت می‌شود و دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی، جذب آهن و افزایش پاسخ‌های ایمنی می‌باشد. لاکتوفرین قابلیت تجزیه نشاسته و ATP را داراست. هدف از این مطالعه، بررسی حفظ فعالیت آنزیمی لاکتوفرین شیرشتر پس از خالص سازی توسط کروماتوگرافی تبادل یونی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آزمایشگاهی پس از گرفتن شیر شتر، چربی و کازئین حذف و لاکتوفرین توسط کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از CM-Sephadex-C-50 خالص گردید. مقادیر K_m و V_{max} فعالیت آمیلازی لاکتوفرین، pH و دمای بهینه واکنش مشخص شد. بدین منظور از محلول 0/5 درصد نشاسته ذرت به‌عنوان سوبسترا و از آزمایش فعالیت یدی برای تعیین مقادیر مصرف نشده استفاده شد. دمای بهینه فعالیت آمیلازی توسط کروماتوگرافی کاغذی تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی، حضور لاکتوفرین را در محدوده 73کیلودالتون و غلظت آن را به‌طور متوسط 60 µg/ml نشان داد. مقادیر K_m و V_{max} به ترتیب $2mg.ml^{-1}$ و $0/2\ mg.ml^{-1}.min^{-1}$ تعیین شد. همچنین لاکتوفرین فعالیت آمیلازی گسترده ای در محدوده pH های 4 تا 7 داشت و بیش ترین فعالیت را در pH برابر 5 دارا بود. فعالیت آمیلازی لاکتوفرین در دمای $40^{\circ}C$ به حداکثر مقدار خود رسید. هضم آنزیمی سبب هیدرولیز نشاسته و تبدیل آن به قندهای مالتوز و گلوکز شد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر روش کروماتوگرافی تبادل یونی می‌تواند سبب جداسازی لاکتوفرین با خلوص بالا گردد. فعالیت آمیلازی بالای لاکتوفرین نشان داد که ساختار پروتئینی آن پس از عبور از ستون کروماتوگرافی حفظ شده است.

واژه های کلیدی: لاکتوفرین، شیر شتر، کروماتوگرافی تبادل یونی

مقدمه

پروتئین‌های شیر شتر به دو بخش عمده کازئین و پروتئین‌های آب‌پنیر تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های آب‌پنیری یکی از منابع اصلی پپتیدهای فعال زیستی هستند که شامل آلفالاکتالبومین، آلبومین، لاکتوفرین و ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشند(1). لاکتوفرین گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی حدود 80 کیلودالتون است(2). لاکتوفرین در شیر شتر 48 ساعت بعد از زایمان به حداکثر مقدار خود می‌رسد(3). این گلیکوپروتئین دارای خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدالتهابی و تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی است(2).

مولف مسئول: سعید زیبایی - مشهد: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک E-mail: s.zibaee@mrazi.ac.ir

1. دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
2. کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
3. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت : 1400/9/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1400/11/20 تاریخ تصویب : 1401/2/11

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-01-22]

بـه علـت افـزایش غلظـت لاکتـوفرین در هنگـام واکنش‌های التهابی و عفونت‌های ویروسی، محققین آن را پروتئین مرحله حاد می‌نامند(3). لاکتوفرین قادر است به‌عنوان آنزیم عمل نماید. لاکتوفرین شیر دارای بیش‌ترین فعالیت آمیلازی است. اساس فعالیت‌های آنزیمی لاکتوفرین ناشناخته است اما تنوع این فعالیت‌ها به تفاوت در ساختمان طبیعی پـروتئین از جملـه ایزوفـرم‌هـای مختلـف، درجـه گلیکوزیله شدن ساختمان سـوم و درجـه اولیگومریزاسـیون آن بستگی دارد(4). در برخـی از روش‌هـا ممکـن اسـت پس از خالص سازی خاصیت آنزیمی لاکتوفرین ازبـین برود، لذا هـدف از ایـن مطالعـه، بررسـی حفـظ فعالیـت آنزیمی لاکتوفرین شیر شتر پس از خالص‌سازی توسـط کروماتوگرافی تبادل یونی می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی (آزمایشگاهی) می‌باشد.

2-1-خالص‌سازی لاکتوفرین و تایید وجود لاکتوفرین

لاکتوفرین بر اساس روش راعی و همکاران (روش تغییر یافته یوشـیدا)(Yoshida) خـالص گردیـد. پـس از چربی زدایی شـیر و رسـوب دهـی کـازئین، از سـولفات آمونیوم 90 درصد و دیالیز در بافر فسفات سدیم استفاده شد. سپس به کمک کروماتوگرافی تعویض یونی بـا رزیـن CM sephadex C-50 و شستشـو توسـط بـافر فسـفات حاوی غلظت‌های نمکی (0/1 تا 1 مولار)، فراکسـیون‌ها جمع‌آوری گردید. برای تایید از الکتروفـورز SDS-PAGE و سپس آزمـایش بـا تترامتیـل بنزیـدین(TMB) اسـتفاده شد(۶،۵). فراکسیون‌هایی که واکنش رنگی نداشتند برای انجام مراحل بعـدی اسـتفاده شـدند. غلظـت لاکتـوفرین خالص شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید(7).

2-2- تعیین pH بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین

محلـول سوبسـترا- بافرفسـفات سـدیم بـا pH هـای مختلف(7-4)، با نمونه آنزیمی مخلوط و به مـدت 40 دقیقـه در دمای 40°C انکوبه شد. واکنش بـا اسـیدکلریدریک 0/1 نرمال متوقف و پس از افزودن محلول یدین جـذب نوری در 600 nm قرائت گردید.

2-3- تعیین دمای بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین

نشاسته (0/5 درصد) حل شده در بافر استات سـدیم 10mM (pH= 5) در طیف دماهای مختلـف (30 تـا 60°C) به مدت 40 دقیقه انکوبه و سپس واکنش متوقـف شـد و محلول یدین اضافه و جذب آن در 600 nm قرائت گردید.

2-4- تعیین کینتیک لاکتوفرین در برابر غلظت‌های نشاسته

برای تعیین مقادیر K_m و V_{max}، غلظت‌های مختلف از نشاسته 1 درصد (2 و 1/5، 1، 0/5، 0/3، 0/1) mg/ml در بـافر اسـتات سـدیم تهیـه و سـپس 25 µg از نمونـه آنزیمی با 90µl از غلظت‌های مختلف سوبسترا به مـدت 40 دقیقه در دمای 40°C انکوبه و واکنش متوقف و پس از افزودن 10µl محلول یدین جـذب نـوری در 600 nm قرائت گردید.

2-5- تعیین محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته

مخلوط واکنش(نشاسته ذرت 0/5 درصد حل شـده در بافر استات سدیم) و نمونه آنزیمی به مدت 40 دقیقـه در دمای 40°C انکوبه، کروماتوگرافی کاغـذی توسـط مخلـوطی از حـلال‌هـای آلـی بوتـانول، پیریـدین و آب (6 :3 : 4) انجـام و توسـط محلـول رنگـی محتـوی (24 ml اتانول، 0/4 gr فتالیک اسید و 0/3gr آنیسـیدین) رنگ‌آمیزی گردید(7).

یافته ها و بحث

یافتـه‌هـای مطالعـه حاضـر نشـان داد کـه تـک بانـد 75 کیلودالتـونی در غلظـت‌هـای نمکـی 0/8، 0/9 و 1 مولار (تصویر شـماره 1) و براسـاس *آزمـایش* TMB در فراکسیون‌هـای 0/9 و 1 مـولار لاکتـوفرین وجـود دارد. براسـاس معادلـه خـط، وزن مولکـولی لاکتـوفرین 72/5 کیلودالتون اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان داد که در فراکسیون‌های 0/9 و 1 مـولار به ترتیب 61 و59 µg/ml پروتئین وجـود دارد. همچنـین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-01-22]

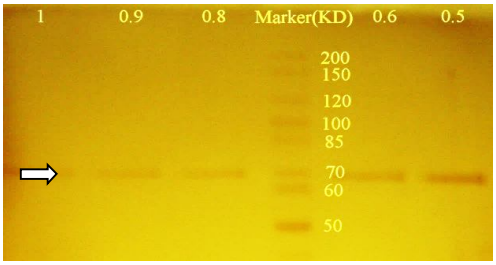
فعالیت آمیلازی لاکتوفرین در محدوده pH های 4 تا 7 بوده و بیش‌ترین فعالیت را در pH = 5 دارد (نمودار شماره 1).

و نیز در 40°C به حداکثر مقدار رسیده و در دو طرف این دما فعالیت کاهش می‌یابد (نمودار شماره 2).

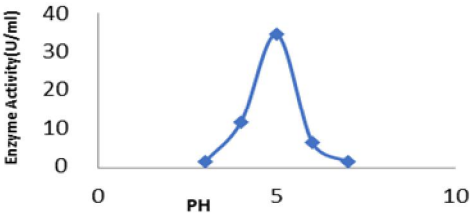
نتایج نشان داد که در غلظت‌های 1/5 mg/ml - 0/1 نشاسته، با افزایش میزان فعالیت آمیلازی لاکتوفرین افزایش و در غلظت‌های بالاتر از 1/5 mg/ml فعالیت کاهش یافت،که نشان می‌دهد در غلظت 1/5 mg/ml، جایگاه‌های فعال آنزیم از سوبسترا اشباع شده وآنزیم حداکثر سرعت را داراست. یافته‌ها براساس رسم منحنی لینور- برک بیان کرد که در حضور غلظت‌های مختلف نشاسته مقادیر K_m و V_{max} به ترتیب برابر با $2mg.ml^{-1}$ و $0/2\ mg.ml^{-1}.min^{-1}$ می باشد (نمودار شماره 3).

3-3- *نتایج حاصل از بررسی محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته*

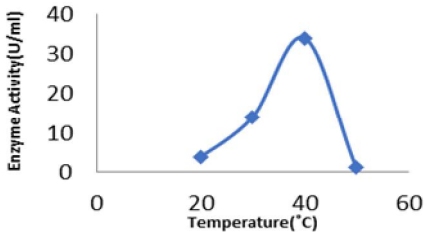
هضم آنزیمی نشاسته توسط لاکتوفرین منجر به تولید اولیگوساکاریدهایی با وزن مولکولی پایین تر گردید. این امر نشان داد که فعالیت آمیلازی لاکتوفرین از نوع داخلی بوده و سبب هیدرولیز نشاسته و تبدیل آن به قندهای احیا کننده مالتوز و گلوکز می گردد. تصویر شماره 2 کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی کاغذی محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته را نشان می‌دهد. قندهای مالتوز و گلوکز به‌عنوان کنترل مثبت و نشاسته به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.



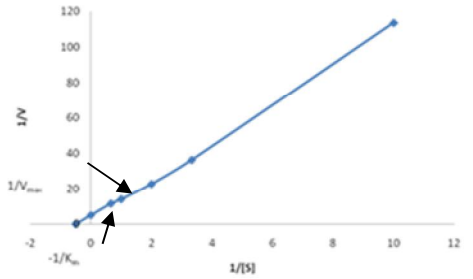
تصویر شماره 1: نتایج حاصل از *تأیید* وجود لاکتوفرین با استفاده از SDS-PAGE. به‌ترتیب از چپ به راست: فراکسیون‌های 1، 0/9، 0/8، مولار، مارکر، فراکسیون 0/6 و 0/5 مولار



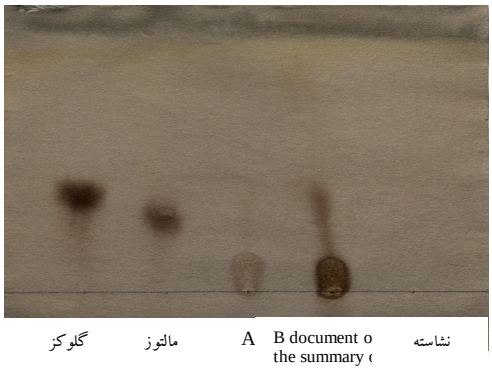
نمودار شماره 1: منحنی تعیین PH بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین



نمودارشماره 2: منحنی تعیین دمای بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین



نمودار شماره 3: فعالیت آمیلازی لاکتوفرین در حضور غلظت‌های مختلف نشاسته ذرت (نمودار لینور- برک). در غلظت‌های mg/ml 1/5 - 0/1 نشاسته، فعالیت آمیلازی لاکتوفرین افزایش و در غلظت 1/5 mg/ml بیش‌ترین فعالیت مشاهده شد، در غلظت‌های بالاتر از این مقدار فعالیت آنزیم کاهش یافت.



تصویر شماره 2: کروماتوگرام کاغذی محصولات نهایی نشاسته - محلول (0/5درصد) گلوکز و مالتوز به‌عنوان کنترل مثبت و نشاسته

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-01-22]

به‌عنوان کنترل منفی می‌باشند. آزمایش(A) و آزمایش(B) به ترتیب انکوباسیون به مدت 20 و 40 دقیقه در دمای 40°C می‌باشند.

یکی ازمرسوم‌ترین روش‌های خالص‌سازی لاکتوفرین استفاده از ستون تبادل کاتیونی است. از آن‌جائی‌که مولکول لاکتوفرین دارای بار الکتریکی مثبت می‌باشد به گروه‌های کربوکسیلات دارای بار منفی متصل شده و در غلظت‌های مختلف نمکی می‌توان آن را جدا نمود(7).

Raei و همکاران به کمک روش‌های اولترافیلتراسیون و تبادل یونی و با استفاده از رزین سفاروز، لاکتوفرین شیر را خالص و وزن مولکولی آن را حدود 80 کیلودالتون تعیین نمودند(5). در این مطالعه وزن مولکولی لاکتوفرین 72/5 کیلودالتون تخمین زده شد. یافته مطالعه حاضر با نتایج این محققین هم راستا می‌باشد. در سال Samar 2017 و همکاران لاکتوفرین با وزن مولکولی 78 کیلودالتون را طی دو مرحله با روش‌های کروماتوگرافی تبادل یونی و ژل فیلتراسیون از شیر شتر تخلیص نمودند(8). در حالی که در مطالعه حاضر لاکتوفرین تنها با یک مرحله خالص گردید که نتایج، خلوص بالای این پروتئین را *تأیید* می‌نماید. در سال Soboleva 2019 و همکاران لاکتوفرین را از شیر گاو خالص و فعالیت آمیلازی آن را بررسی نمودند، مشابه بررسی حاضر، پروتئین خالص شده توانست اولیگوساکاریدها را هیدرولیز نماید(7). نتایج این مطالعه بیان کردکه لاکتوفرین تنها با یک مرحله کروماتوگرافی تبادل یونی خالص گردید. همچنین یافته‌های حاصل از الکتروفورز خلوص بالای این پروتئین را *تأیید* می‌نماید. به علاوه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین نشان داد که ساختار پروتئینی آن پس از کروماتوگرافی حفظ شده است.

References

1. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe . Lactoferrin for prevention of common viral infections. J Infect Chemother 2014; 20(11): 666-671.
2. Aly E, Ros G, Frontela C. Structure and functions of lactoferrin as ingredient in infant formulas. Journal of Food Research 2013; 2(4): 25-36.
3. EL-HATMI H, GIRARDET JM, AILLARD JL, KHORCHANI T, ATTIA H. Therapeutic potential of whey proteins of camel colostrums. MHA 2006; 18(53): 70-76.
4. Najafi MF, Kembhavi A. One step purification and characterization of an extracellular α-amylase from marine Vibrio sp. Enzyme and Microbial Technology 2005; 36(4): 535-539.
5. Raei M, Rajabzadeha G, Zibaei S, Mahdi Jafari S, Sani AM. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. International Journal of Biological Macromolecules 2015; 79(2015): 669-673.
6. Yoshida SX, uyun Y .Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. Journal of Dairy Science 1991; 74(5): 1439-1444.
7. Soboleva SE, Sedykh SE, Alinovskaya LI, Buneva VN, Nevinsky GA. Cow milk lactoferrin possesses several catalytic activities. Biomolecules 2019; 9(6): 208.
8. Mohamed SS, Emam MA. Antifungal and Hepatoprotective effects of Lactoferrin purified from camel milk against Candida albicans: in vitro and in vivo studies. Int J Biosci 2017; 11(2): 144-156.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-01-22]