

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

Saeed Zibaei¹,
Anis Bakhshani²,
Ali Bidmeshkipour³

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.zibaei@nrzi.ac.ir)

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

سعید زیبائی¹انیس بخشانی²علی بید مشکی پور³

چکیده

سابقه و هدف: لاکتوفرین در ترشحات موکوسی، شیر و کلستروم یافت می‌شود و دارای فعالیت‌های ضد میکروبی، جذب آهن و افزایش پاسخ‌های ایمنی می‌باشد. لاکتوفرین قابلیت تجزیه نشاسته و ATP را داراست. هدف از این مطالعه، بررسی حفظ فعالیت آنزیمی لاکتوفرین شیر شتر 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 V_{max} و K_m فعالیت آمیلازی لاکتوفرین، pH و دمای بهینه واکنش مشخص شد. بدین منظور از محلول 0/5 درصد نشاسته ذرت به عنوان 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 73 کیلو دالتون و غلظت آن را به طور متوسط $60 \mu\text{g/ml}$ نشان داد. مقادیر K_m و V_{max} به ترتیب 2mg.ml^{-1} و $0/2 \text{mg.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ 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°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

با وزن مولکولی حدود 80 کیلو دالتون است (2). لاکتوفرین در شیر شتر 48 ساعت بعد از زایمان به حداکثر مقدار خود می‌رسد (3). این گلیکوپروتئین دارای خاصیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی و تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی است (2).

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 آلفا لاکتالبومین، آلبومین، لاکتوفرین و ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشند (1). لاکتوفرین گلیکوپروتئینی

مؤلف مسئول: سعید زیبائی - مشهد: موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک E-mail: s.zibae@mrzi.ac.ir

1. دانشیار، موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های 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

0/1 نرمال متوقف و پس از افزودن محلول یدین جذب نوری در 600 nm قرائت گردید.

2-3- تعیین دمای بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین
نشاسته (0/5 درصد) حل شده در بافر استات سدیم 10mM (pH=5) در طیف دماهای مختلف (30 تا 60°C) به مدت 40 دقیقه انکوبه و سپس واکنش متوقف شد و محلول یدین اضافه و جذب آن در 600 nm قرائت گردید.

2-4- تعیین کینتیک لاکتوفرین در برابر غلظت های نشاسته
برای تعیین مقادیر K_m و V_{max} ، غلظت های مختلف از نشاسته 1 درصد (2 و 1/5، 1، 0/5، 0/3، 0/1 mg/ml) در بافر استات سدیم تهیه و سپس 25 µg از نمونه آنزیمی با 90 µl از غلظت های مختلف سوبسترا به مدت 40 دقیقه در دمای 40°C انکوبه و واکنش متوقف و پس از افزودن 10 µl محلول یدین جذب نوری در 600 nm قرائت گردید.

2-5- تعیین محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته
مخلوط واکنش (نشاسته ذرت 0/5 درصد حل شده در بافر استات سدیم) و نمونه آنزیمی به مدت 40 دقیقه در دمای 40°C انکوبه، کروماتوگرافی کاغذی توسط مخلوطی از حلال های آلی بوتانول، پیریدین و آب (6:3:4) انجام و توسط محلول رنگی محتوی (24 ml اتانول، 0/4 gr فتالیک اسید و 0/3gr آتیسیدین) رنگ آمیزی گردید (7).

یافته ها و بحث

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تک باند 75 کیلودالتونی در غلظت های نمکی 0/8، 0/9 و 1 مولار (تصویر شماره 1) و براساس آزمایش TMB در فراکسیون های 0/9 و 1 مولار لاکتوفرین وجود دارد. براساس معادله خط، وزن مولکولی لاکتوفرین 72/5 کیلودالتون اندازه گیری شد.

نتایج نشان داد که در فراکسیون های 0/9 و 1 مولار به ترتیب 61 و 59 µg/ml پروتئین وجود دارد. همچنین

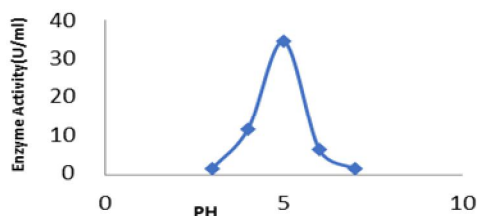
به علت افزایش غلظت لاکتوفرین در هنگام واکنش های التهابی و عفونت های ویروسی، محققین آن را پروتئین مرحله حاد می نامند (3). لاکتوفرین قادر است به عنوان آنزیم عمل نماید. لاکتوفرین شیر دارای بیش ترین فعالیت آمیلازی است. اساس فعالیت های آنزیمی لاکتوفرین ناشناخته است اما تنوع این فعالیت ها به تفاوت در ساختمان طبیعی پروتئین از جمله ایزوفرم های مختلف، درجه گلیکوزیله شدن ساختمان سوم و درجه اولیگومریزاسیون آن بستگی دارد (4). در برخی از روش ها ممکن است پس از خالص سازی خاصیت آنزیمی لاکتوفرین از بین برود، لذا هدف از این مطالعه، بررسی حفظ فعالیت آنزیمی لاکتوفرین شیر شتر پس از خالص سازی توسط کروماتوگرافی تبادل یونی می باشد.

مواد و روش ها

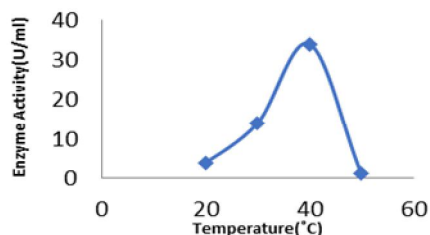
این مطالعه تجربی (آزمایشگاهی) می باشد.

2-1- خالص سازی لاکتوفرین و تایید وجود لاکتوفرین
لاکتوفرین بر اساس روش راعی و همکاران (روش تغییر یافته یوشیدا) (Yoshida) خالص گردید. پس از چربی زدایی شیر و رسوب دهی کازئین، از سولفات آمونیوم 90 درصد و دیالیز در بافر فسفات سدیم استفاده شد. سپس به کمک کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین CM sephadex C-50 و شستشو توسط بافر فسفات حاوی غلظت های نمکی (0/1 تا 1 مولار)، فراکسیون ها جمع آوری گردید. برای تایید از الکتروفورز SDS-PAGE و سپس آزمایش با تترامتیل بنزیدین (TMB) استفاده شد (۶،۵). فراکسیون هایی که واکنش رنگی نداشتند برای انجام مراحل بعدی استفاده شدند. غلظت لاکتوفرین خالص شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید (7).

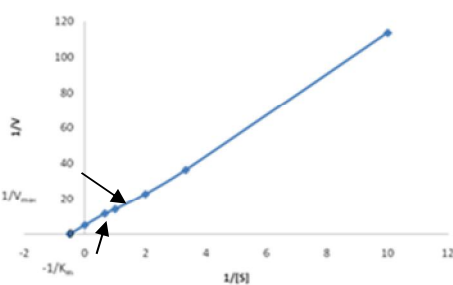
2-2- تعیین pH بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین
محلول سوبسترا - بافر فسفات سدیم با pH های مختلف (4-7)، با نمونه آنزیمی مخلوط و به مدت 40 دقیقه در دمای 40°C انکوبه شد. واکنش با اسید کلریدریک



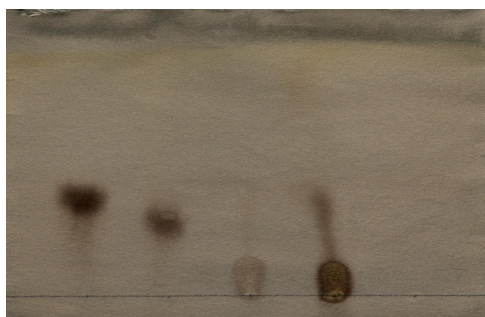
نمودار شماره 1: منحنی تعیین PH بهینه فعالیت آمیلازی لاکتوفرین



نمودار شماره 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 0/1-1/5 mg/ml 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.

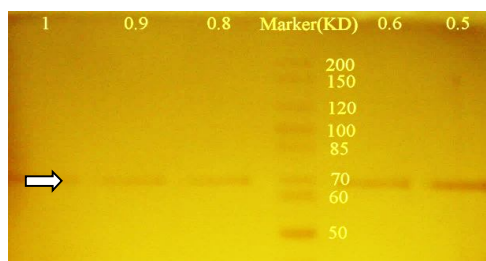


تصویر شماره 2: کروماتوگرام کاغذی محصولات نهایی نشاسته - محلول (0/5 درصد) گلوکز و مالتوز به عنوان کنترل مثبت و نشاسته

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 0/1-1/5 mg/ml 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 و آنزیم حداکثر سرعت را داراست. یافته‌ها براساس رسم منحنی لینور - برک بیان کرد که در حضور غلظت‌های مختلف نشاسته مقادیر V_{max} و K_m به ترتیب برابر با $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ و $0/2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ می‌باشد (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 پایین‌تر 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 می‌گردد. تصویر شماره 2 کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی کاغذی محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته را نشان می‌دهد. قندهای مالتوز و گلوکز به عنوان کنترل مثبت و نشاسته به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.



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

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 2019 Soboleva 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 کرد که 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.

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

یکی از مرسوم‌ترین روش‌های خالص‌سازی لاکتوفرین استفاده از ستون تبادل کاتیونی است. از آنجائی که 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 2017 Samar و همکاران لاکتوفرین

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, Kumbhavi 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.