دوفصلنامه ترویجی
علوم و فنون دامپروری
شماره ۴۷، بهار و تابستان ۱۴۰۴
ص‌ص: ۶۹~۷۶

مقایسه استخراج لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز، از شیر شتر با شیر گاو،گوسفند و بز

• **سعیدزیبائی** (نویسنده مسئول)
دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش کنترل کیفی فرآورده‌های بیولوژیک،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۴۰۴
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹
Email: s.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ aasrj.2025.134361

چکیده

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نموده و مانع واکنش‌های رادیکال آزاد می‌شود. لاکتو پراکسیداز یک آنزیم اکسیدوردوکتاز یک پروتئین دفاعی است فعال شدن این آنزیم وترشح آن در غدد برون ریزی رخ می دهد .خالص سازی لاکتوفرین از شیر شتر،گاو،گوسفند وبز بر اساس روش راعی و همکاران با کروماتوگرافی تعویض کاتیونی توسط رزین CM sephadex C-50 انجام گرفت.پس از تعیین غلظت پروتئین ها با آزمایش برادفورد و نانو دراپ، تأیید وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز در فراکسیون های جمع آوری شده با آزمایش های الکتروفورز SDS-PAGE و ترامتیل بنزیدین.نتایج حاصل از تأیید وجود لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز با آزمایش ترامتیل بنزیدینن نشان داد که درفراکسیون‌ها حاصل از شیرفراکسیون های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار NaCl، لاکتوفرین و فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۹مولار لاکتوپراکسیداز ،در فراکسیون-های حاصل از شیر گاو فراکسیون‌های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۵و۰/۹مولارلاکتوپراکسیداز، در فراکسیون‌های حاصل از شیر گوسفند، فراکسیون‌های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۸و۰/۹مولارلاکتوپراکسیداز در فراکسیون‌های حاصل از شیر بز، فراکسیون‌های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۹مولار لاکتوپراکسیداز می باشند.نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین در فراکسیون های شیرشتر نشان داد که فراکسیون۰/۷مولار NaCl در ۵۹۵ نانومتر با مقدار۵۸۶/۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر ، و فراکسیون ۰/۷ شیر گاوبا مقدار۵۰۶/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و فراکسیون ۰/۶شیر گوسفند با مقدار۵۹۶/۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر و فراکسیون ۰/۶شیر بز با مقدار ۵۸۹/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین بیشترین مقدار را در بین فراکسیون ها داشتند .

واژه‌های کلیدی: لاکتوفرین،لاکتوپراکسیداز،شیر شتر

بیان مسئله

شیر بعنوان کامل ترین غذای است. که جدای از نقش معمولی خود برای تغذیه انسان، می تواند بعنوان غذای فراسودمند باشدکه برای سلا مت انسان بسیار اهمیت دارد .شیر دارای ترکیبات فعال زیستی (بیو اکتیو ها) مهمی است.پروتئین‌های شیر شتر به دو بخش عمده‌ی کازئین (۸۰-۷۰ درصد) و پروتئین‌های آب‌پنیر (۳۰-۲۰ درصد) تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های آب‌پنیری یکی از منابع اصلی پپتیدهای فعال زیستی هستند. این پروتئین‌ها شامل آلفالاکتالبومین، آلبومین ، لاکتوفرین،لاکتوپراکسیداز، ایمونوگلوبولین ها می‌باشند. لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن و از اعضای خانواده ی ترانسفرین است که وزن مولکولی آن حدود ۸۰ کیلودالتون می باشد. مهم‌ترین ویژگی فیزیکوشیمیایی لاکتوفرین تمایل بسیار بالای آن نسبت به یون آهن است بطوریکه دو یون آهن به‌صورت محکم اما برگشت‌پذیر به همراه دو یون بیکربنات به لاکتوفرین متصل می‌شوند ازاین‌رو با اتصال به آهن آزاد به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نموده و مانع واکنش‌های رادیکال آزاد می‌شود(فرهنگ و زیبائی،۱۴۰۱). این گلیکوپروتئین در ترشحات موکوسی شامل اشک، بزاق، ترشحات برونشیال و بینی، صفرا، مایعات معدی- روده‌ای، مایعات واژینال، منی، ادرار و به میزان زیاد در شیر، کلستروم و گرانول های اختصاصی نوتروفیل ها یافت می‌شود. این پروتئین آهن‌دار به مقدار بسیار کمی در شیر گاو (۲۰ mg/۱۰۰ ml) وجود دارد اما غلظت آن در شیر شتر ۴۸ ساعت بعد از زایمان به حداکثر مقدار خود (۲/۳ g/l) می‌رسد(Zibaee و همکاران،۲۰۲۲).لاکتوپراکسیداز پلی پپتیدی با وزن ملکولی ۷۸ کیلو دالتون بوده که نقطه ایزوالکتریک آن برابر ۹/۶ است. لاکتو پراکسیداز یک آنزیم اکسیدوردوکتاز با ساختار گلیکوپروتئین ویک پروتئین دفاعی است فعال شدن این آنزیم وترشح آن در غدد برون ریزی مانند شیر، اشک ، بزاق ،بینی و برونشها وترشحات روده ای رخ می دهد .فاکتور های متعددی بر غلظت آنزیم لاکتو پراکسیداز اثر می گذارند .از جمله سن،مراحل شیر دهی وتغذیهدر مطالعه ی حاضراز روشی ساده، سریع و نسبتاً کم هزینه برای استخراج و تخلیص این لاکتوفرین از شی شتر،شیر گاو،گوسفند وبز استفاده شد(Zibaee و همکاران،۲۰۲۱).

مواد و روش ها

مواد:

کلرید سدیم ، ژل سفادکس(Gel Sephadex G50)، سولفات آمونیوم، آلبومین سرم گوساله (BSA)، پراکسید هیدروژن۳%، ترامتیل بنزیدین، اسید کلریدریک ۱ نرمال، هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، تریس، استات سدیم، گلایسین، آمونیوم پرسولفات، سدیم دودسیل سولفات، تیوسولفات سدیم، نیترات نقره، فرمالین ، کربنات سدیم، اسید استیک، متانول، آکریل آمید، بیس آکریل آمید ، بوتانول،کاغذ صافی واتمن شماره ۱و۷.

خالص سازی لاکتوفرین:

کروماتوگرافی تعویض کاتیونی:

جهت انجام این تحقیق، شیرشتر از شتر اطراف شهر مشهد،شیر گاو از گاوداری صنعتی شهر مشهد،شیر گوسفند وبز از گوسفند داری اطراف مشهد جمع آوری و در شرایط دمایی ۴ تا ۶ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد.خالص سازی لاکتوفرین بر اساس روش راعی و همکاران (روش تغییر یافته Yoshida) انجام گرفت (Raei و همکاران ، ۲۰۱۵ و Yoshida ،۱۹۹۱). پس از چربی زدایی توسط سانتریفوژ (۴۰۰۰g-۲۵ دقیقه) ، کازئین شیر با افزودن تدریجی اسید استیک ۱۰٪ و استات سدیم ۱ مولار به ۴/۶ رسید(۱۲) سپس سانتریفیوژ (۳۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه) گردید وپس ازعبور ازکاغذ واتمن(7 N) با نمک سولفات آمونیوم ۹۰٪ رسوب داده شد. برای کروماتوگرافی تعویض کاتیونی از رزینCM sephadex C-50 و ستونی به طول cm ۱۰ و قطر داخلی cm ۳ استفاده شد. نمونه ی پروتئینی حاصل از مراحل فوق با بافر فسفات سدیم mM ۱۰ با pH=۶/۸ متعادل و سپس روی ستون CM sephadex C-50 برده شد. بدین منظور ابتدا ستون با بافر فسفات سدیم mM ۱۰ با pH=۶/۸ به تعادل رسید. پس از ورود نمونه، برای تفکیک اجزای پروتئینی از

جریان بافر فسفات سدیم ۱۰ mM با pH=۶/۸ وفراکسیون‌های جمع آوری شده از شستشوی رزین توسط بافر فسفات حاوی غلظت های مختلف نمکی (۰/۱ تا یک مولار) و سپس اندازه گیری میزان پروتئین در این فراکسیون‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری با طول موج ۲۶۰ nm، انجام گرفت.

تعیین غلظت پروتئین ها با آزمایش برادفورد و نانو دراپ:

غلظت پروتئین‌های خالص شده با استفاده از روش برادفورد واستفاده از دستگاه نانودراپ تعیین گردید.

تأیید وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز در فراکسیون های جمع آوری شده:

تأیید وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز با آزمایش الکتروفورز SDS-PAGE:

جهت بررسی وجود لاکتوفرین در فراکسیون های جمع آوری شده از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید. در فراکسیون هایی که در SDS-PAGE دارای باند ۸۰ کیلودالتون می باشند لاکتوفرین و یا لاکتوپراکسیداز وجود داشت.

تأیید وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز با آزمایش تترامتیل بنزیدین(TMB) :

به منظور تأیید وجود لاکتوفرین در فراکسیون ها از آزمایش تترامتیل بنزیدین(TMB) استفاده شد. لاکتوپراکسیداز در حضور پراکسیدهیدروژن با TMB واکنش رنگی نشان می دهد. بطوریکه سبب اکسیداسیون TMB و ظهور رنگ آبی می گردد. مخلوط واکنش شامل H2O2 ۳۰٪، TMB 88 mM و بافر فسفات سدیم ۱۰ mM با pH = ۶ بود. جهت انجام آزمایش میزان ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه گردید(۲۰C). در ادامه فراکسیون هایی که هیچگونه واکنش رنگی نشان ندادند(لاکتوفرین) برای انجام مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. در این سنجش horseradish peroxidase (HRP) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز:

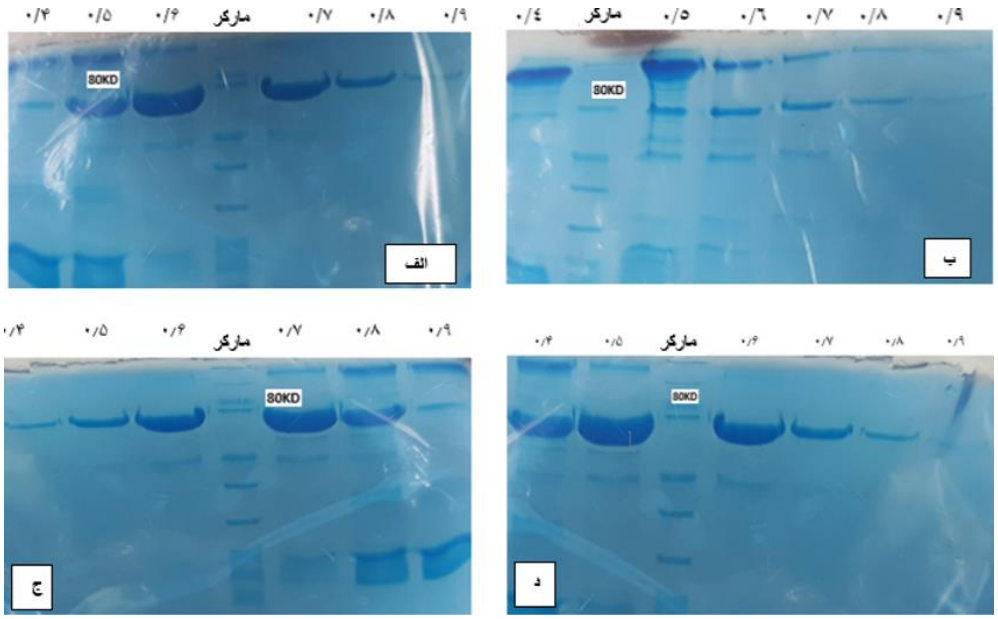
نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین در فراکسیون های شیر شتر،گاو،گوسفند و بز:

نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین در فراکسیون های شیرشتر نشان داد که فراکسیون‌های۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹مولار NaCl در ۵۹۵ نانومتر به ترتیب دارای مقادیر۱۶۵/۲۹- ۳۵۲/۷۱- ۲۸۳/۱۸–۵۸۶/۸۸ -۵۲۱/۷– ۱۵۲/۶۳ - ۱۰۲/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر ،فراکسیون‌های شیر گاو به ترتیب دارای مقادیر۴۵/۴- ۲۴۲/۹- ۱۷۳/۸۴–۵۰۶/۱۸ -۴۹۱/۷۱–۱۰۲/۱۳ - ۸۷/۹۴ میکروگرم بر میلی لیتر ، فراکسیون‌های شیر گوسفند به ترتیب دارای مقادیر ۳۵۲/۷۷- ۳۷۳/۱۴–۵۹۶/۴۸ -۵۴۱/۷۸–۱۹۲/۵۳ - ۱۱۹/۵۳ میکروگرم بر میلی لیتر و فراکسیون‌های شیر بزبه ترتیب دارای مقادیر ۳۶۵/۰۹- ۳۶۳/۲۴–۵۸۹/۷۸ -۵۵۱/۴۸–۱۸۷/۱۳ - ۱۲۲/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین می باشند.

نتایج حاصل از تأیید وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز در فراکسیون های جمع آوری شده:

نتایج حاصل ازتأیید وجود لاکتوفرین با آزمایش الکتروفورز SDS-PAGE:

در فراکسیون هایی که در SDS-PAGE دارای باند ۸۰ کیلودالتون می باشند .



تصویر۱- تصویر نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌های حاصل از ستون تعویض یونی با استفاده از الکتروفورز به روشSDS-PAGE الف-نتایج تایید وجود لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز در شیر شتر
ب- نتایج تایید وجود لاکتوفرین لاکتوپراکسیداز در شیرگاو ج-نتایج تایید وجود لاکتوفرین لاکتوپراکسیداز درشیر گوسفند د-نتایج تایید وجود لاکتوفرینلاکتوپراکسیداز درشیر بز

نتایج حاصل از تأیید وجود لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز با آزمایش تترامتیل بنزیدین(TMB) :

نتایج حاصل از تأیید وجود لاکتوفرین با آزمایش تترامتیل بنزیدین(TMB) در فراکسیون‌های حاصل از شیر شترنتایج نشان داد که فراکسیون‌ها ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار NaCl، لاکتوفرین و فراکسیون‌ها ۰/۴، ۰/۹مولار لاکتوپراکسیداز ،در فراکسیون‌های حاصل از شیر گاو فراکسیون‌ها ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌ها ۰/۴، ۰/۵و۰/۹مولارلاکتوپراکسیداز، در فراکسیون-های حاصل از شیر گوسفند، فراکسیون‌ها ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌ها ۰/۴، ۰/۸و۰/۹مولارلاکتوپراکسیداز در فراکسیون‌های حاصل از شیر بز، فراکسیون‌ها ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸مولار ، لاکتوفرین و فراکسیون‌ها ۰/۴، ۰/۹مولار لاکتوپراکسیداز می باشند.

تصویر۲- نتایج حاصل از وجود لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز با آزمایش تترامتیل بنزیدین(TMB) در فراکسیون‌های حاصل از شیرشتر

راه کارها:

شیر بعنوان کامل ترین غذای انسان شناخته شده است که جدای از نقش معمولی خود ، بعنوان غذای فراسودمند نیز مطرح می باشد.شیر شتر نسبت به شیر گاو دارای مقادیر بیش تری از ترکیبات ضد میکروبی مانند لیزوزیم، لاکتوفرین و ایمونوگلوبولین ها می باشد. علاوه بر آن بنظر می رسد بدلیل اختلاف در برخی از خواص فیزیکوشیمیایی این بیواکتیوها در شتر، نقش متفاوتی ایفا نمایند. در بین بیواکتیوهای شیر لاکتوفرین ولاکتوپراکسیدازاز جایگاه ,ویژه ای برخوردار می باشند.لاکتوفرین پروتئین زیست فعال مهمی است و خالص سازی لاکتوفرین از منابع مختلف ازجمله شیر گاو، شتر و انسان انجام می‌گیرد. جهت خالص سازی لاکتوفرین از روش‌های متنوعی از جمله کروماتوگرافی تبادل یونی ، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تمایلی و کروماتوگرافی جدیدبا استفاده از کیتوزان، استفاده شده است (Hirsch و همکاران،۲۰۲۰) .با توجه به طبیعت لاکتوفرین یکی از رایج‌ترین روش خالص سازی استفاده از ستون تبادل کاتیونی ازجمله کربوکسی متیل سفادکس است (Rascón و همکاران،۲۰۲۱) . بمنظورمقایسه استخراج لاکتوفرین از شیر شتر و استخراج آن از شیر گاو،گوسفند وبز لاکتوفرین با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی جدا سازی، تایید ،خالص و تعیین غلظت گردید.نتایج نشان داد که امکان استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی جهت استخراج و خالص سازی لاکتوفرین از شیر شتر،گاو،گوسفند و بز وجود دارد اما میزان بازدهی استخراج یکسان نمی باشد و بیشترین بازدهی به ترتیب مربوط به شتر،بز ،گوسفند و گاو بدست آمده است.برای جدا سازی و خالص کردن پروتئین ها از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از رزین CM Sephadex C-50 استفاده گردید.کروماتوگرافی تعویض یونی یکی از تکنیک هایی است که به میزان زیاد برای خالص سازی لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز مورد استفاده قرار می گیرد(Zibaee و همکاران،۲۰۲۱).

با توجه به ویژگی های لاکتوفرین ،انواع روش های جداسازی توسعه یافته است .محلول نمکی با می‌تواند با لاکتوفرین با مولکول‌های آب رقابت کرده، لایه آب روی سطح ذرات کلوئیدی پروتئین را از بین برده و باعث رسوب پروتئین گردد(Cui و همکاران ۲۰۲۰).

Ela gamy و همکاران (۱۹۹۶) از روش تبادل یونی با استفاده از کربوکسی متیل سلولز و گرادیان های ۱-۰/۱ مولار NaCl جهت خالص سازی لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز از شیر شتر استفاده کرده اند.سایر محققین نیز از این روش برای جداسازی مناسب این پروتئین ها استفاده نموده اند بااین وجود بدلیل وجود ایزو الکتریک و الگوی ایجاد باند در اکریل آمید مشکلاتی برای شناسایی این پروتئین ها بوجود می آید که بهینه سازی عملیاتی نظیر pH محیط و غلظت نمکی محلول مورد استفاده مهم می باشند (زیبائی و همکاران،۱۳۹۴).

Wong ، ۲۰۱۸ لاکتوفرین را با نمک از آغوز گاو استخراج کرد .نام برده۴۸ درصد خلوص لاکتوفرین را توسط نمک با ۸۰ درصد (NH4)2SO4 در pH 8.5 و رسوب با ۶۰ درصد اتانول به دست آورد .روش استخراج به تجهیزات آزمایشی گران قیمت نیاز نداشت و فرآیند عملیات ساده بود .با این حال، خلوص لاکتوفرین استخراج شده پایین بود .روش‌های کروماتوگرافی (کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، و کروماتوگرافی میل ترکیبی) معمولاً برای جداسازی و خالص‌سازی لاکتوفرین استفاده می‌شوند (Cui و همکاران ۲۰۲۰) . از محلول بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار در pH = 6.5 برای متعادل کردن دانه های بزرگ SP Sepharose برای استخراج لاکتوفرین از شیر خام استفاده کردند .میزان بازیابی با این روش بالاتر از ۹۰٪ بود، با خلوص پروتئین ۹۵٪ .جداسازی کروماتوگرافی لاکتوفرین اغلب دارای یک چرخه طولانی است و زمانی که قطرات از ستون کروماتوگرافی عبور می کنند به فشار بیش از حد نیاز دارد .همچنین جدا کردن پروتئین‌های ناخالص با بار یکسان و نقطه ایزوالکتریک مشابه، که خلوص لاکتوفرین به‌دست‌آمده را محدود می‌کند ،دشوار است. لاکتوفرین را می توان با استفاده از نانوذرات مغناطیسی، همراه با فناوری غشاء، به

سرعت از شیر جدا کرد(Cui و همکاران ۲۰۲۰).

برای جدا سازی لاکتوفرین از شیر گاو مستقیماً از آب پنیر اسیدی با استفاده از ذرات مغناطیسی-PGMA هپارین با روش یک مرحله‌ای و با استفاده از محلول NaCl به عنوان شوینده استفاده شد .حداکثر ظرفیت اتصال لاکتوفرین ۱۶۴ میلی گرم بر گرم بود که بالاتر از خلوص پروتئین استاندارد تجاری بود .نیاز به خلوص لاکتوفرین به دلیل کاربرد گسترده لاکتوفرین افزایش یافته است . توسعه روش های جدید می تواند خلوص لاکتوفرین را تا حد زیادی بهبود بخشد(Cui و همکاران ۲۰۲۰). Wu و Xu ،۲۰۰۹ از روش‌های کروماتوگرافی و اتصال غشایی برای جداسازی لاکتوفرین و ایمونوگلوبولین G به طور همزمان استفاده کردند و خلوص به ترتیب ۹۵ ٪ و ۹۶/۶٪ بود .Lu و همکاران د ر سال۲۰۰۷ لاکتوفرین را از آغوز گاو با اولترافیلتراسیون جدا و سپس از یک سیستم کروماتوگرافی تبادل کاتیونی با جریان سریع برای خالص سازی آن در مقیاس صنعتی استفاده کردند . پارامترهای عملیاتی بهینه اولترافیلتراسیون با سرعت جریان مماسی ۴ متر بر ثانیه، فشار ۱۵۰ کیلو پاسکال و دمای عملیاتی ۵۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد .خلوص لاکتوفرین غلیظ در محفظه به ۳۰.۸۸٪ (وزنی/وزنی) رسید و نرخ بازیابی ۹۴.۰۴٪ بود . لاکتوفرین خام به تدریج با کروماتوگرافی تبادل کاتیونی قوی آماده سازی خالص شد .خلوص و بازیابی محصول نهایی لاکتوفرین به ترتیب ۹۴.۲۰٪ و ۸۲.۴۶٪ بود.

لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گونه های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت می باشد. بعنوان مثال ، مکان گلیکوزیله شدن لاکتوفرین در شیر شتر با بقیه حیوانات تفاوت دارد .این پروتئین و پپتیدهای حاصل از آن خاصیت ضد باکتریای بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارندفعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین ناشی از چند مکانیسم است ، از خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی لاکتوفرین می توان جهت تولید لوسیون و کرم استفاده نمود(Zibaee و همکاران،۲۰۲۱).

منابع

زیبائی،س. بلوری مقدم،م. نوروزی مقدم،ح. (۱۳۹۴). خالص سازی آنزیم لاکتو پراکسیداز از شیر شتر و بررسی اثرات آن بر علیه باکتری های سودوموناس آئروجینوزا و کلستریدیوم سپتیکوم.نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/دوره یازدهم،شماره اول،۱۳۹۴، پیاپی ۳۰:۶۷-۵۹

فرهنگ،م.زیبائی،س.(۱۴۰۱). خالص سازی لاکتوفرین جداشده از شیرگاو بوسیله کرماتوگرافی تمایلی.فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی. شماره ۴۲۰ . ۵۵-۶۲ . /10.22092 : DOI aasrj.2022.126942

Cui, S., Lv, X., Sun, G., Wu, W., Xu, H., Li, Y., & Liu, L. (2022). Recent advances and prospects in purification and heterologous expression of lactoferrin. Food Bioengineering, 1(1), 58-67.

Hirsch, DB. Martínez Álvarez,LM. Urtasun, N. Baieli,MF. Lázaro- Martínez,JM. Glisoni,RJ. Miranda, MV. Cascone,O . Wolman,FJ.(2020). Lactoferrin purification and whey protein isolate recovery from cheese whey using chitosan mini-spheres. International Dairy Journal, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104764

Lu, R., Xu, S., Wang, Z., & Yang, R. (2007). Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale. Journal
of Membrane Science, 297, 152–161.

Raei M, Rajabzadeh G, Zibaei S, Jafari SM, Sani AM. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. International journal of biological macromolecules. 2015 Aug 1; 79:669-73.

Rascón-Cruz,Q.. Espinoza-Sánchez,EA. Siqueiros-Cendón ,TS . Nakamura-Bencomo,SI. Sigifredo Arévalo-Gallegos,S. Iglesias-Figueroa,BF.(2021). Lactoferrin: A Glycoprotein Involved in Immunomodulation Anticancer, and Antimicrobial Processes. Molecules, 26(1), 205 https://dx.doi.org/10.3390/molecules26010205,

Wu, M., & Xu, Y. (2009). Isolation and

Zibaee, S. Shamloo, M. Mohammadi Sani, A. The Study Synergy effect of lactoferrin and lactoperoxidas from camel milk on Staphylococcus aureus. Journal of Veterinary Microbiology, 2021.Volume 17, Issue 1. https://doi/10.30495/jvm.2021.1926601.1171

Zibaei, S., Bakhshani, A., & Bidmeshkipour, A. (2022). Extraction and Purification of Lactoferrin from Camel Milk and Investigation of Its Amylase Activity. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 32(209), 175-179.

purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14, 155–160.

Yoshida S. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. Journal of Dairy Science. 1991 May 1; 74(5):1439-44.