

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА ИЗ ЖЕНСКОГО, КОЗЬЕГО И КОРОВЬЕГО МОЛОКА РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**В.П. Курченко, М.А. Капустин, Н.В. Гавриленко, А.П. Дрожденюк****Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*** Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

Многие белки и пептиды животных широко применяются в медицине, пищевой промышленности и косметике. В молоке различных видов млекопитающих и человека содержится лактоферрин. Кроме молока лактотрансферрин присутствует в плазме крови, нейтрофилах, и является одним из основных белков практически всех экзокринных секретов млекопитающих, таких как слюна, желчь, слезы, секрет поджелудочной железы и некоторых других биологических жидкостей [1, 2, 3].

Лактоферрин обладает рядом уникальных биологических активностей, благодаря которым он может найти широкое применение в различных областях. Этот белок считается одним из основных компонентов первичной защиты организма от действия патогенных бактерий, грибов, вирусов и паразитов [4, 5]. Механизм бактериостатического действия лактотрансферрина заключается в хелатировании ионов железа, что лишает бактериальные клетки важного микроэлемента, необходимого для их роста. Кроме того, действие этого белка обусловлено взаимодействием с поверхностными структурами бактериальной клетки. При этом положительно заряженные участки лактоферрина препятствуют образованию стабилизирующих связей между компонентами наружной мембраны микроорганизмов и ионами магния и кальция. В результате происходит отщепление липополисахаридов от мембраны и ее разрушение. Сходным образом реализуется процесс подавления роста грамположительных бактерий [5, 6, 7].

Лактоферрин обладает противовирусной активностью в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Он эффективен против аденовирусов и энтеровирусов, а также вируса иммунодефицита человека [8, 9]. Лактоферрин препятствует развитию грибковых инфекций, вызываемых *Candida albicans* и *Candida krusei* [10, 11]. Механизм данного действия связан с непосредственным взаимодействием белка с поверхностью патогена, а также хелатированием ионов железа [12].

Лактотрансферрин выполняет функцию модулятора как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Люди с врожденным сниженным уровнем экспрессии этого белка более подвержены инфекционным заболеваниям с частыми рецидивами. Существуют сведения о том, что в тонком кишечнике у мышей лактоферрин регулирует экспрессию генов, связанных с иммунной защитой организма. Положительный заряд лактоферрина позволяет ему взаимодействовать с отрицательно заряженными участками на поверхности клеток иммунной системы, что приводит к их активации, дифференцировке и пролиферации. Белок способен переноситься в клеточное ядро, где он связывается с ДНК и активирует различные сигнальные пути. Помимо повышения системного иммунитета, лактоферрин положительно влияет на иммунитет кожных покровов и подавляет аллергические реакции [13, 14, 15].

При раковых заболеваниях лактотрансферрин способен изменять уровень цитокинов. Он индуцирует апоптоз и подавляет рост опухолей *in vitro*. Лечение рака у мышей рекомбинантным лактоферрином подавляет рост опухоли на 60% по сравнению с контрольной группой животных [15].

В некоторых случаях лактоферрин выступает в роли фермента [5]. Он способен проявлять амилазную, ДНК-, РНК- и АТФазную активности. Механизмы проявления лактоферрином различной ферментативной активности не известны. Однако считается, что они реализуются за счет существования различных форм данного белка. Так, одна из форм

лактоферрина, не способная связывать ионы железа, эффективно катализирует деградацию молекул РНК [16]. Открытие ферментативных активностей лактоферрина позволило объяснить некоторые его биологические функции: антибактериальную, противовирусную и противогрибковые эффекты [5].

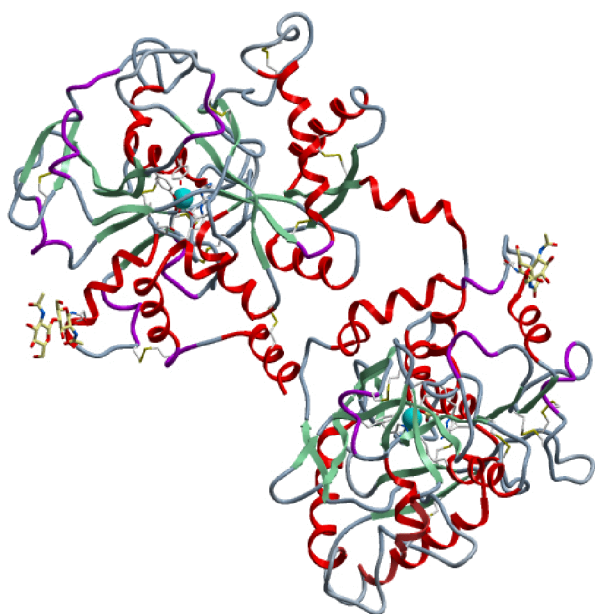
Известно, что лактотрансферрин принимает участие в регуляции гомеостаза ионов железа. Степень насыщения железом лактоферрина женского молока составляет по оценкам разных авторов от 10 до 30 %. Показано, что белок участвует не только в транспорте ионов железа, цинка и меди, но и в регуляции их всасывания [17]. Так, младенцы, питающиеся грудным молоком с высоким содержанием этого протеина, не испытывают дефицита железа, в отличие от детей, получающих искусственные питательные смеси [18, 19, 20].

Из краткого обзора биологических активностей лактоферрина следует, что этот белок может найти широкое применение в различных областях в качестве биологической добавки, лекарственного средства. Для его успешного использования необходимо разработка эффективных методов выделения, идентификации и контроля количественного содержания

данного соединения в молоке и в продуктах, содержащих лактоферрин. При их создании необходимо использовать особенности физико-химических свойств лактотрансферрина.

В связи с этим целью работы являлась разработка методов выделения лактоферрина из женского, козьего и коровьего молока с использованием различных аффинных сорбентов.

В основе этих методов лежали особенности строения и физико-химические свойства лактоферрина. Этот гликозилированный протеин (см. рисунок 1) с молекулярной массой 76–80 кДа состоит из двух глобулярных доменов: N-доли, образованной аминокислотами 1–333, и C-доли, включающей аминокислоты 345–692, соединенных α -спиралью. Каждый из доменов содержит один железосвязывающий сайт и один сайт гликозилирования [21, 22]. Белок способен взаимодействовать с различными лигандами: ДНК, РНК, полисахаридами, гепарином, а также различными металлами



Разрешение 2,5 Å

Рисунок 1 – Пространственная структура лактоферрина *Homo sapiens* (модель выполнена в программе Molsoft ICM 3.5)

переменной валентности. Обнаружено, что для лактоферринов молока различных видов животных характерен выраженный полиморфизм, обусловленный вариациями последовательности аминокислот в белке [23]. При этом процентная доля отдельных аминокислот в белках сильно варьирует (таблица 1). По сравнению с человеческим в молекулах лактоферрина коровьего и козьего молока имеется большое количество сайтов одиночных и множественных последовательных аминокислотных замен (рисунок 2).

Отличия в первичной структуре белка обуславливают формирование разной вторичной и третичной структуры, характерной для лактоферринов женского, коровьего и козьего молока. Это подтверждается результатами проведенного нами ВЭЖХ анализа сывороток молока этих животных и человека [24]. Бычий, козий и человеческий лактотрансферрины обладают разным временем удержания (рисунок 3А, Б, В).

Таблица 1 – Аминокислотный состав лактоферринов различных видов животных*

Аминокислота	Человеческий лактоферрин (H.sapiens)	Бычий лактоферрин (B.taurus)	Козий лактоферрин (C.hircus)
Ala	9,17	9,75	10,45
Cys	4,65	4,94	5,08
Asp	5,5	5,08	4,8
Glu	5,64	5,65	5,79
Phe	4,37	3,95	3,81
Gly	8,04	7,2	7,49
His	1,27	1,27	1,13
Ile	2,26	2,12	2,12
Lys	6,35	7,77	7,2
Leu	9,17	10,31	10,31
Met	0,85	0,71	0,85
Asn	4,51	4,1	4,38
Pro	4,94	4,38	4,24
Gln	4,09	4,1	4,1
Arg	6,35	5,37	4,66
Ser	7,19	6,36	7,2
Thr	4,37	5,23	4,94
Val	6,91	6,78	6,64
Trp	1,41	1,84	1,69
Tyr	2,96	3,11	3,11

Примечание.* указана доля аминокислоты по отношению к общему количеству аминокислот, %.

....V.WC.#S.PE#.KC..WQ..M..#.P.#.CV.R..#.CI.AIA...A #T.#.NLR...EEV.AR..RVVWCAVG..E..KC.QWS...S...VTC..ASIT.
 А 1 GRRRSVQWCTVSNPEATKCFQWQRNRRVRGPPVSCVKRDSPTQCIQAIENRA 325 FTAIQNLRLKSEEEVAARRARVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSASTTE
 Б 1 ---N.R...I.Q..WF..RR..WR.KKLGA.SIT..R.AFALE..R...KK. 321 L.TLK...ETA...K..YT.....PE.QK..Q...QQ.GQN...AT...D
 В 1 AP.KN.R..AI.L..WS..Y...R..KLGA.SIT..R.I.VLE..R...GKN. 325 L.LK...ETA...K..CT.....PE.QS..Q...EQ.GQN...AT...D

 DAVTLD.G###EAG..PYKLRPVAAE#YGT...P..THYYAVAVVKKG..F.L.. DCI#LVLKGEADA#.LDGGY#YTAGKCGLVFV#AEN.KS...S.#D..CV.RP.
 55 DAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEYGTQPRTHYYAVAVVKKGGSFQLMNE 379 DCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLVFVLAENYKSSQSDPDPCVDRPV
 51MV.F...RD.....I...KES.Q.....SN...DQ 375 ...V.....LN.....I.....R..SKH.SL---.L..T
 55D.MV.F...RD.....I...KS.Q.....SN.K.DQ 379L.....I.....M...R..SKH.SL---.L..T

 LQG.KSCH.GL.R.AGW.#P#G.LRP#L.WT...#EP#...AVA.FFSASCVP.#D EGYLAVAVV.....LTWNS#K.KKSCHTAVDRTAGWNIPMGL#NQTGSC.FD
 109 LQGLKSCHTGLRRRTAGWNVPIGTLRPFLNWIWGPPEPIEAAVARFFSASCVP.GAD 433 EGYLAVAVVRRSDTSLTWSVKGKKSCHTAVDRTAGWNIPMGLFNQTGSC.FD
 105 ...R.....G.S...II.M.I...Y.S..ESL..LQG...K.....CI. 427KKANEG.....L.D.....IV.....A..
 109 ...Q...M..G.S...I.V.I...P.S..ESA..LQG.....CV. 431KKANEG.....L.....IA.....A..

 ...#PNLC.LC.G.GEN.CA#SS.EPYF.YSGAFKCL.DGAGDVAF#.E.TVFE E#FSQSCAPG.DP.S.LCALC#GD.QG..KCVPSN.E.YGYTGAFRCIAE.#G
 163 KGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFE 487 EYFSQSCAPGRDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPSNERNERYGYTGAFRCIAENAG
 159 RQAY....Q..K.E...Q..C..R...G.....Q.....VK.I... 481 .F.....A..K.R...A..D..LD.....K.K.....DV.
 163 GKAY....Q..K.V.....C.....G.....Q.....VK.T... 485 .F.....A..K.S...A..D..LD.....K.K.....DV.

 .L...A.RD.YELLC#.N.R.PVD.FK.CHLA.VPSHAVVARSV.GKE.#IW.L DVAFVK..TV#.NT.G....WAK.L...DF.LLCLDG..KPVTEA.SC#LA#A
 217 DLSEAEERDEYELLCPDNTRKFPVKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNL 541 DVAFVKDVTVLQNTDGNNEAWAKDLCLADFALLCLDGKRPVTEARSCHLAMA
 213 N.PEK.D..Q....LN.S.A...A.E...Q.....D....L..K. 535ND..WE..N.ESTAD...N.NRE..R.....T.....Q....V.
 217 N.PEK.D..Q....LN...A..A.E...Q.....D....NL..E. 539ND..WE..N.ESSAD...N.NRE..R.....T.....Q....V.

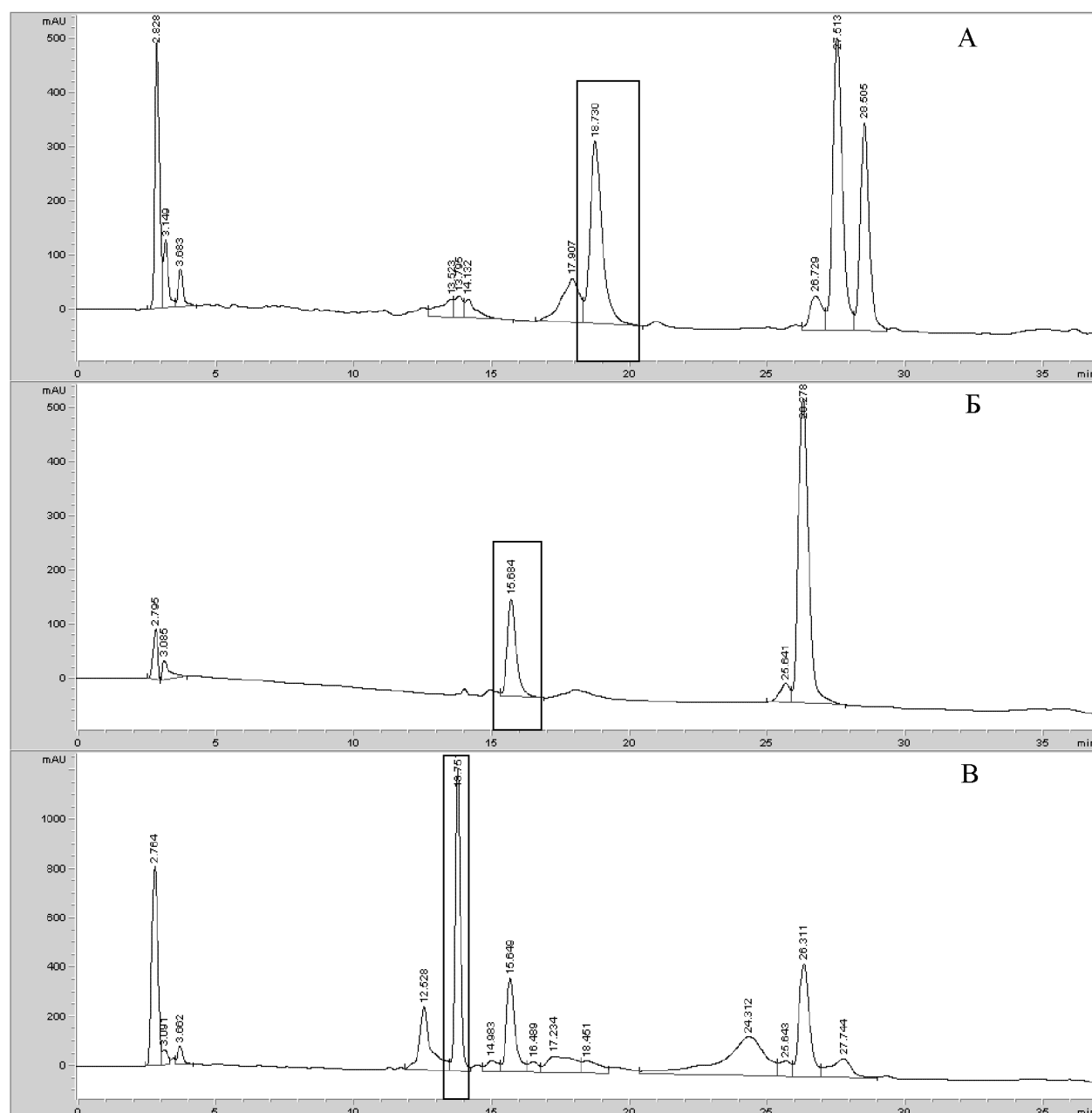
 L..AQEKFGK.KS..FQLFGSP.G..DLLFKDSA#GF.R#P...#DS.LYLG.S.Y PNHAVVSR.D.#..QVLLHQQA.FG.NG..CPDKFCLF.SETKNLLFNDNTE
 271 LRQAQEKFGKDKSPAFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIPDSGLYLGSGY 595 PNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAQKFRNGSDCPDKFCLFQSETKNLLFNDNTE
 267 .SK.....N..RS.....P..R.....L..L.I.SKV..A.....R. 589S..RAAHV.....L..K..KN.....K.....
 271 ..K.....N..QR.....E.RR.....L..L.I.SKV..A.....R. 593S..RAAHVE.....L..K..KN.....K.....

 CLA.L.G..TYE.YLG..YV..I.NLKKCSISPLLEAC.FL..
 649 CLARLHGKITYEYKLPQYVAGITNLKKCSISPLLEACEFLRK
 643 ...K.G.RP...E...TE..TA.A.....A..TR
 647 ...K.G.RP.....TE..TA.A.....A..TR

Рамкой обозначены сайты с тремя и более аминокислотными заменами

А – человеческий лактоферрин; Б – бычий лактоферрин; В – козий лактоферрин

Рисунок 2 – Первичная последовательность аминокислот в молекулах лактоферринов человека, коровы и козы



А – сыворотка коровьего молока; Б – сыворотка козьего молока; В – сыворотка человеческого молока. В рамке указан лактоферрин

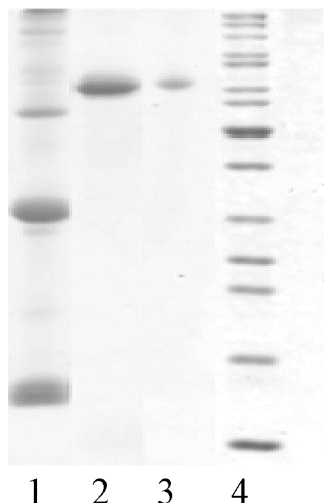
Рисунок 3 – ВЭЖХ профили сыворотки коровьего, козьего и женского молока

Предложенный метод ВЭЖХ анализа позволяет осуществлять идентификацию и количественную оценку лактоферрина в молоке различных животных и человека.

Ниже описаны использованные нами методы выделения лактоферрина и сыворотки молока различных животных и человека.

Ионообменная хроматография. В настоящее время основным методом выделения лактоферрина из молока является ионообменная хроматография на катионообменных сорбентах. Метод основан на значительном отличии изоэлектрической точки лактоферрина по сравнению с другими белками сыворотки молока при значениях pH=7–7,4 [25, 26, 27]. Нами был выделен лактоферрин из женского молока с использованием карбоксиметил

сефарозы 4В Fast flow (Healthcare, Швеция) при $pH=7,2$. Для чего сыворотку молока разводили в 2 раза 0,1М натрий-фосфатным буфером, $pH=7,2$, содержащим 0,4% Tween 20 (буфер 1) и помещали на шейкер на ночь при $+4^{\circ}C$. Затем сорбент промывали на стеклянном фильтре 0,05 М натрий-фосфатным буфером $pH=7,2$ содержащим 0,2 М NaCl и 0,2% Tween 20 (буфер 2). Сорбент помещали в колонку и отмывали от детергента буфером 2, не содержащим Tween 20. Элюцию лактоферрина проводили 1 М NaCl. Анализ выделенного лактотрансферрина методом ДСН-электрофореза свидетельствует о его гомогенности и соответствии молекулярной массы стандарту человеческого лактоферрина (Sigma, США) (рисунок 4).

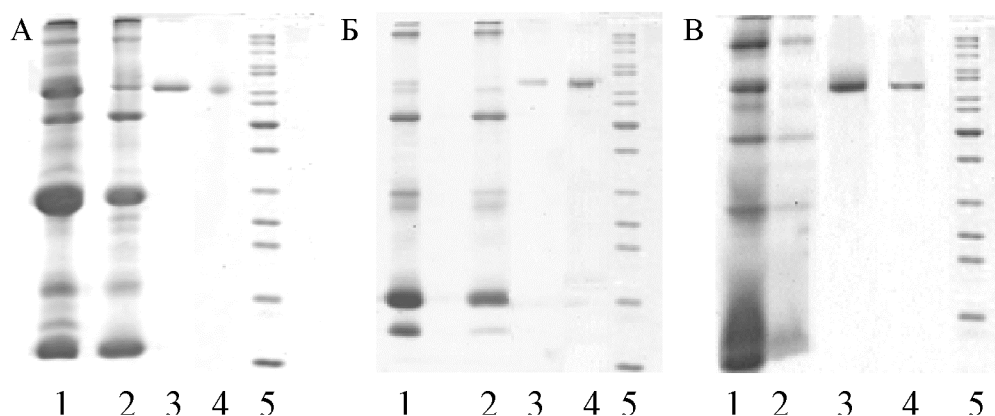


1 – сыворотка женского молока; 2 – лактоферрин из женского молока; 3 – стандарт человеческого лактоферрина (Sigma, США); 4 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

Рисунок 4 – Электрофореграмма белков сыворотки женского молока и лактоферрина, выделенного на ионообменном сорбенте

Металлоаффинная хроматография. Лактотрансферрин обладает способностью взаимодействовать не только с ионами железа, но и может связывать ионы Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . При этом взаимодействие белка с ними не влияет на железосвязывающую функцию лактоферрина [28, 29]. Свойство лактотрансферрина связывать ионы металлов переменной валентности лежит в основе его выделения методом металлоаффинной хроматографии [30, 31]. С использованием Ni-NTA -Сефарозы-6В (Healthcare, Швеция) нами в одну хроматографическую стадию выделен лактоферрин из сыворотки женского, козьего и коровьего молока. Для этого сорбент помещали в колонку и уравнивали 0,05 М Трис-HCl буфером, $pH=8,0$, содержащим 0,25% Tween 20. Сыворотку молока разводили в 2 раза тем же буфером, содержащим 0,5% Tween 20. Затем разведенную сыворотку наносили на колонку, промывали сорбент 0,05 М Трис-HCl буфером, $pH=8,0$, содержащим 0,25% Tween 20 и 0,25 М NaCl. После чего колонку промывали тем же буфером не содержащим Tween 20. Элюцию лактоферрина проводили 0,2 М имидазолом. На рисунке 5 представлены результаты выделения и очистки лактоферринов.

Данные, полученные методом ДСН-электрофореза свидетельствует о гомогенности выделенных лактотрансферринов. Их молекулярная масса составляет 78–80 кДа и соответствует стандартам человеческого и бычьего лактоферрина (Sigma, США) (рисунок 5).



А. 1 – сыворотка женского молока; 2 – не связавшаяся с сорбентом белковая фракция; 3 – лактоферрин из женского молока; 4 – стандарт человеческого лактоферрина (Sigma, США); 5 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

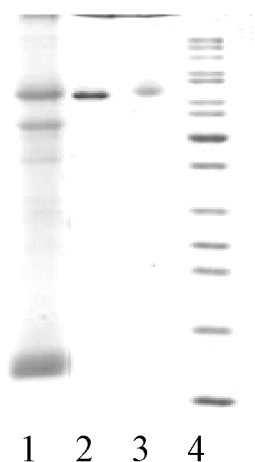
Б. 1 – сыворотка козьего молока; 2 – не связавшаяся с сорбентом белковая фракция; 3 – лактоферрин из козьего молока; 4 – стандарт бычьего лактоферрина (Sigma, США); 5 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

В. 1 – сыворотка коровьего молока; 2 – не связавшаяся с сорбентом белковая фракция; 3 – лактоферрин из коровьего молока; 4 – стандарт бычьего лактоферрина (Sigma, США); 5 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

Рисунок 5 – Электрофореграмма белков сывороток женского, козьего, коровьего молока и лактоферринов, выделенных на сорбенте Ni-нитрилтриацетокислота-Сефароза-6В

Выделение лактоферрина на ДНК-содержащих сорбентах. Способность лактоферрина взаимодействовать с ДНК [5, 29] была использована для создания сорбентов, пригодных для его выделения. Нами был разработан оригинальный сорбент на основе кальций-тарtratного геля [32] в состав которого была включена одонитевая ДНК. Для выделения лактоферрина сорбент промывали водой, уравнивали 0,05 Трис-НСl, рН=7,4, смешивали с молоком и помещали на 1,5 часа на шейкер. Затем центрифугировали при 2000 б/мин в течение 10 мин, промывали осадок сорбента уравнивающим буфером, содержащим 0,01% Tween 20. После чего сорбент помещали в колонку и промывали буфером до достижения в элюате оптической плотности менее 0,1 на длине волны 280 нм. Элюцию лактоферрина с колонки проводили 0,05 М Трис-НСl буфером, содержащим 0,5 М NaCl.

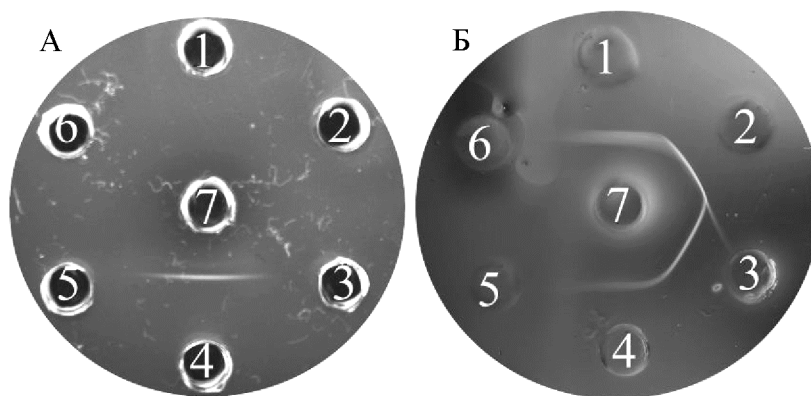
Лактотрансферрин, выделенный из женского молока на этом аффинном сорбенте анализировали с помощью ДСН-электрофореза. Чистота выделенного белка составляла 96–98% (рисунок 6).



1 – сыворотка женского молока; 2 – лактоферрин из женского молока; 3 – стандарт человеческого лактоферрина (Sigma, США); 4 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

Рисунок 6 – Электрофореграмма белков женского молока после разделения на сорбенте кальций-тартратный гель – хитозан – ДНК

Иммуноаффинный метод выделения лактоферрина. В основе метода лежит использование иммобилизованных иммуноглобулинов, моноспецифичных к антигенным эпитопам лактоферрина. Для создания такого сорбента нами были получены антисыворотки к бычьему лактоферрину путем иммунизации кроликов гомогенным препаратом бычьего лактоферрина (Sigma, США). Животных иммунизировали 1 раз в неделю 1 мл смеси физраствор/полный адъювант Фройнда (Calbiochem-Behring, США) (соотношение 1:1), содержащей 1 мг белка в 1 мл, в течение 8 недель. Антисыворотка против лактоферрина с титром 1/32 была использована в реакции двойной иммунодиффузии для определения перекрестных реакций с лактоферринами из коровьего, козьего, женского молока и другими молочными белками (рисунок 7).



А. 1 – казеин коровий; 2 – казеин козий; 3 – α -лактоальбумин; 4 – лактоферрин бычий (Sigma, США); 5 – β -лактоглобулин; 6 – раствор БСА; 7 – антисыворотка к бычьему лактоферрину

Б. 1 – лактоферрин бычий Sigma; 2 – лактоферрин выделенный из коровьего молока; 3 – сыворотка козьего молока; 4 – лактоферрин выделенный из козьего молока; 5 – лактоферрин выделенный из женского молока; 6 – лактоферрин человеческий (Sigma, США); 7 – антисыворотка к бычьему лактоферрину

Рисунок 7 – Иммуноспецифичность антисыворотки против бычьего лактоферрина в реакции двойной иммунодиффузии с различными белками молока

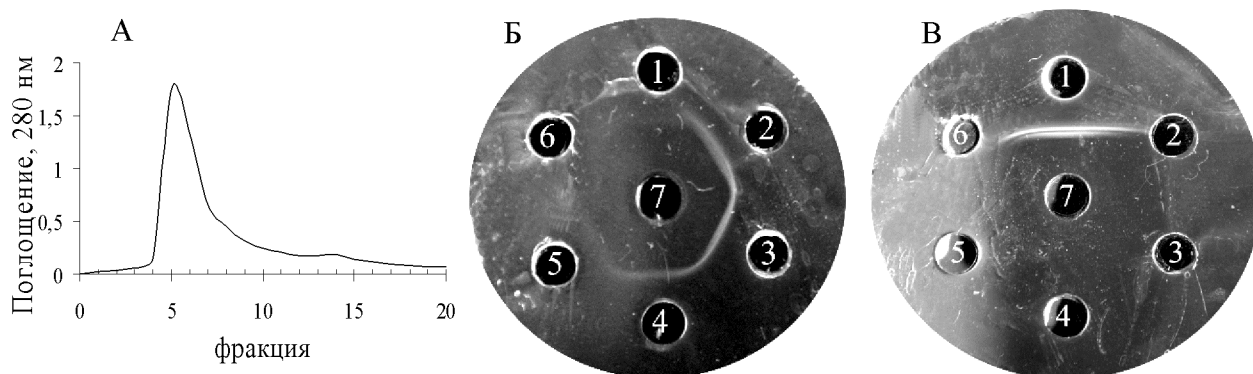
Данные иммунохимического анализа, представленные на рисунке 7 свидетельствуют о том, что лактоферрины из коровьего и козьего молока дают перекрестные иммунные реакции, что свидетельствует о наличии общих антигенных детерминант. Это согласуется с результатами анализа первичной последовательности аминокислот лактоферринов (рисунок 2).

Для выделения моноспецифических антител на сорбенте CNBr-активированной Сефарозе 4В (Healthcare, Швеция) был иммобилизован бычий лактоферрин [33]. На колонку с этим белковым антигеном наносили антисыворотку, отмывали сорбент от несвязавшихся белков и элюировали специфические антитела 0,2 М глицин-HCl буфером pH=2,8. Способность выделенных моноспецифичных иммуноглобулинов взаимодействовать с бычьим лактоферрином проверяли в реакции двойной иммунодиффузии (рисунок 8А, Б, В).

После проверки сохранения иммунореактивности полученных антител, они были иммобилизованы на Сефарозе 4В, активированной бромцианом. Этот иммуноаффинный сорбент был использован для хроматографического выделения лактоферрина из коровьего молока.

Данные анализа выделенного лактоферрина методом ДСН-электрофореза свидетельствуют о соответствии молекулярных масс полученного белка и стандарта бычьего лактоферрина (Sigma, США). Молекулярная масса протеина составляет около 78 кДа.

Отсутствие посторонних полос на электрофореграмме позволяет также судить о степени чистоты полученного белка, которая составляет 95–98% (рисунок 8).

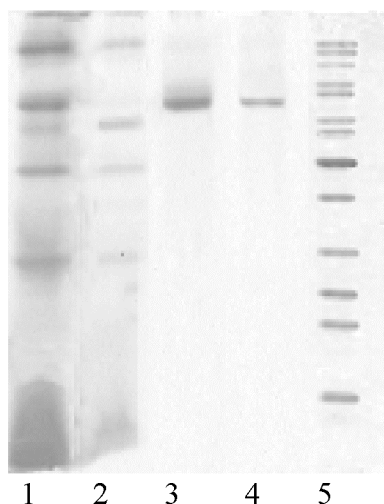


А – элюция антител к бычьему лактоферрину с аффинного сорбента 0,2 М Гли-НСI буфером рН=2,8, V=30 мл/час, объем фракции 1,5 мл

Б. 1 – антисыворотка к бычьему лактоферрину после инкубации с аффинным сорбентом; 2 – фракция элюции антител № 5; 3 – фракция элюции антител № 7; 4 – фракция элюции антител № 10; 5 – фракция элюции антител № 15; 6 – фракция элюции антител № 20; 7 – лактоферрин бычий (Sigma, США)

В. 1 – антисыворотка к бычьему лактоферрину; 2 – антисыворотка к бычьему лактоферрину после инкубации с аффинным сорбентом; 3 – фильтрат после концентрирования антител; 4, 5, 6 – пустая ячейка; 7 – лактоферрин бычий (Sigma, США)

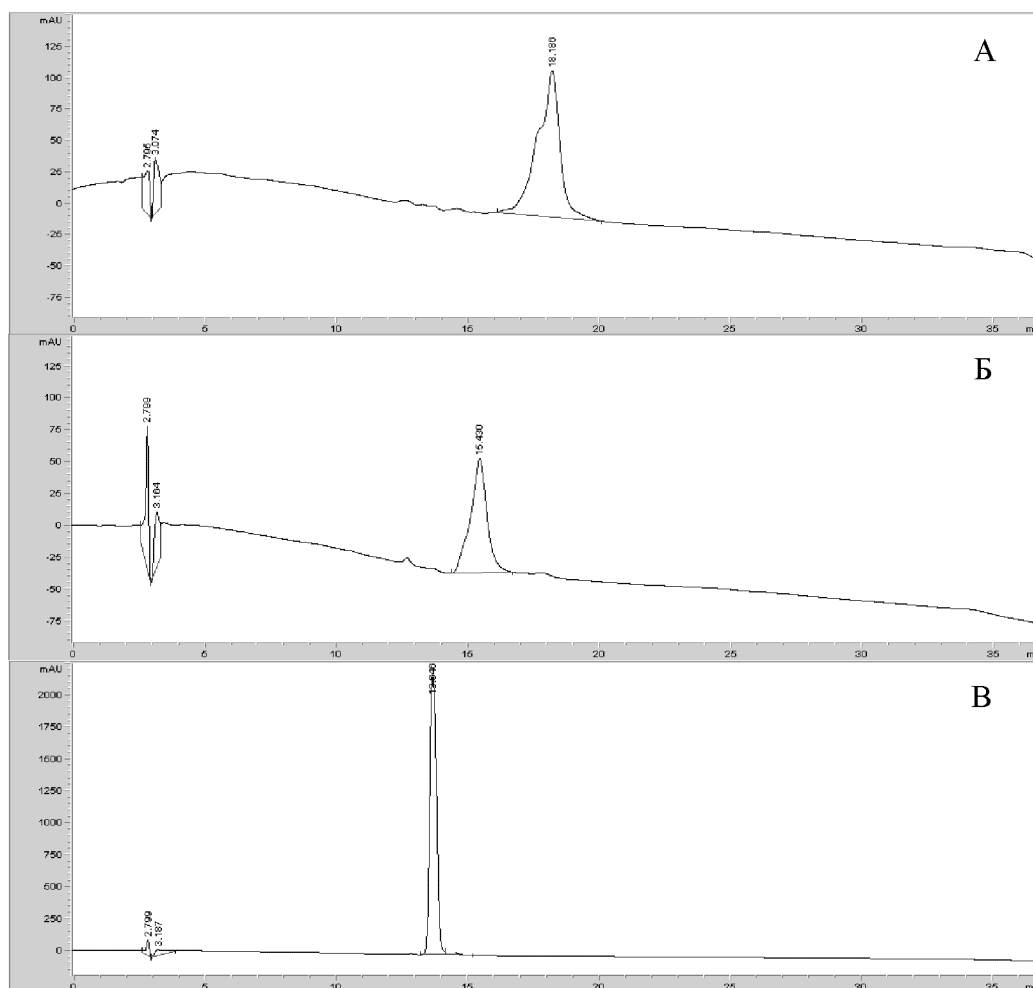
Рисунок 8 – Элюция антител, выделенных на аффинном сорбенте, и их способность образовывать преципитаты в реакции двойной иммунодиффузии с бычьим лактоферрином



1 – сыворотка коровьего молока;
2 – не связавшаяся с сорбентом белковая фракция;
3 – лактоферрин из коровьего молока;
4 – стандарт бычьего лактоферрина (Sigma, США);
5 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, Литва)

Рисунок 9 – Электрофореграмма белков коровьего молока после разделения на иммуноаффинном сорбенте

Чистота лактоферринов, полученных из молока коровы, козы и человека была подтверждена методом ВЭЖХ. Из рисунка 10 видно, что белки выделены с высокой степенью чистоты, которая составляет 98–99% (рисунок 11А, Б, В).



А – лактоферрин из коровьего молока; Б – лактоферрин из козьего молока; В – лактоферрин из женского молока

Рисунок 10 – ВЭЖХ-хроматография лактоферринов, выделенных из молока различных животных

Таким образом, с использованием различных сорбентов нами выделен лактоферрин из сывороток молока коровы, козы и человека. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофоретического и иммунологического анализа была оценена чистота и исследованы свойства полученных белков. В результате проведенных исследований предложена методика идентификации лактоферринов в коровьем, козьем и женском молоке методом ВЭЖХ. На основании полученных данных можно заключить, что все исследованные сорбенты пригодны для выделения лактоферрина в одну хроматографическую стадию из сыворотки женского, коровьего и козьего молока. Использование быстро текущих катион-содержащих сорбентов делает возможным проводить выделение лактоферрина из большого количества молока за короткое время. Применение аффинных и ионообменных сорбентов в сочетании с бэтч-хроматографией также позволяет с минимальными временными затратами выделить лактоферрин из различных источников с высокой чистотой, достигающей 98–99%. Такой лактоферрин из сывороток коровьего, козьего и женского молока может быть использован в качестве БАД и в различных продуктах функционального назначения, что позволит повысить их биологическую ценность, качество и конкурентоспособность.

Список литературы:

1. Берлов, М.Н. Лактоферрин из нейтрофилов собаки: выделение, физико-химические и антимикробные свойства / М.Н. Берлов, Е.С. Кораблева, Т.В. Овчинникова // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 4. – С. 551–559.

2. Johansson, B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk / B. Johansson // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1960. – Vol. 14. – P. 510–512.
3. Birgens, H. Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia / H. Birgens // *Scandinavian Journal of Haematology*. – 1985. – Vol. 34, № 4. – P. 326–331.
4. Ellison, R.T. Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin / R.T. Ellison, T.J. Giehl, F.M. Laforce // *Infection and immunity*. – 1988. – Vol. 56. – P. 2774–2781.
5. González-Chávez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – Vol. 33. – P. 301.e1–301.e8.
6. Ellison III, R.T. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme / R.T. Ellison III, T.J. Giehl // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1991. – Vol. 88. – P. 1080–1091.
7. Leitch, E.C. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme / E.C. Leitch, M.D. Willcox // *Journal of Medical Microbiology*. – 1999. – Vol. 48. – P. 867–871.
8. Seganti, L. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses / L. Seganti, A.M. Di Biase, M. Marchetti // *BioMetals journal*. – 2004. – Vol. – P. 1295–1299.
9. Viani, R.M. Lactoferrin inhibits HIV-1 replication in vitro and exhibits synergy when combined with zidovudine / R.M. Viani, T.J. Gutteberg, J.L. Lathey // *AIDS*. – 1999. – Vol. 13. – P. 1273–1274.
10. Kirkpatrick, C.H. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis / C.H. Kirkpatrick, A.L. Schade // *Journal of Infectious Diseases*. – 1971. – Vol. 124. – P. 539–544.
11. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice / N. Takakura [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47 – P. 2619–2623.
12. Zarembek, K.A. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion / K.A. Zarembek, J.A. Sugui // *Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 178. – P. 6367–6373.
13. Interaction of lactoferrin with cells involved in immune function / Legrand, D. [et al.] // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2006. – Vol. 84. – P. 282–290.
14. Oztas, Y.N. Lactoferrin: a multifunctional protein / Y.N. Oztas, E.R. Ozgunes // *Advanced Molecular Medicine*. – 2005. – Vol. 1. – P. 149–154.
15. Activation of mucosal intestinal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin / W.P. Wang [et al.] // *Japanese Journal of Cancer Research*. – 2000. – Vol. 91. – P. 1022–1027.
16. Kanyshkova, T.G. Multiple enzymatic activities of human milk lactoferrin / T.G. Kanyshkova, S.E. Babina, D.V. Semenov // *European Journal of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 270. – P. 3353–3361.
17. Shongwe, M.S. Anion binding by human lactoferrin: results from crystallographic and physicochemical studies / M.S. Shongwe, C.A. Smith // *Biochemical Journal*. – 1992. – Vol. 31. – P. 4451–4458.
18. Siimes, M.A. Exclusive breast-feeding for 9 months: risk of iron deficiency / M.A. Siimes, L. Salmenperä, J. Perheentupa // *Journal of Pediatrics*. – 1984. – Vol. 104. – P. 196–199.
19. Lactoferrin in Infant Formulas: Effect on Oxidation / M.T. Satué-Gracia [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48, № 10. – P. 4984–4990.
20. Availability of lactoferrin as a natural solubilizer of iron for food products / T. Uchida [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2006. – Vol. 16, № 2. – P. 95–101.
21. Baker, H.M. Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting function / H.M. Baker, B.F. Anderson, R.D. Kidd // *Elsevier Science*. – 2000. – P. 3–15.
22. Baker, E.N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E.N. Baker, H.M. Baker // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – Vol. 62. – P. 2531–2539.

23. Kang, Jing-Fen Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species / Jing-Fen Kang, Xiang-Long Li // *Biochemical Genetics*. – 2008. – Vol. 46. – P. 312–322.
24. Выделение лактоферрина из женского молока методами аффинной и ионообменной хроматографии / М.А. Капустин [и др.] // *Современные достижения биотехнологии: материалы международной научно-технической конференции и международного научно-практического семинара «Феномен молочной сыворотки: синтез науки, теории и практики»*. Ставрополь, 20–23 июня 2011 / СевКавГТУ; редколлег.: И.А. Евдокимов. – Ставрополь, 2011. – Т. 2. – С. 42–46.
25. Process of extraction of lactoferrin and immunoglobulins of milk: Pat. № 4,436,658 [Electronic resource] / A. Peyrouset, F. Spring; Dat.Pat. Mar. 13, 1984 // Free patents online. – 2004. – Mode of access: <http://www.freepatentsonline.com>. – Date of access: 29.06.2011.
26. Isolation of lactoferrin from milk: Pat. № 5,849,885 [Electronic resource] / J.H. Nuyens, H.H. Van Veen; Dat.Pat. Dec. 15, 1998 // Free patents online. – 2004. – Mode of access: <http://www.freepatentsonline.com>. – Date of access: 29.06.2011.
27. Process of isolating lactoferrin: 0220953 A1 [Electronic resource] / A.O.F. Lihme; Dat.Pat. Oct. 6, 2005 // Free patents online. – 2004. – Mode of access: <http://www.freepatentsonline.com>. – Date of access: 30.06.2011.
28. Levay, P.F. Lactoferrin: a general review / P.F. Levay, M. Viljoen // *Haematologica*. – 1995. – Vol. 80, № 3. – P. 252–267.
29. Adlerova, L. Lactoferrin: a review / L. Adlerova, A. Bartoskova, M. Faldyna // *Veterinarni Medicina*. – 2008. – Vol. 53, № 9. – P.457–468.
30. Al-Mashikhi, S. Separation of Immunoglobulins and lactoferrin directly from skim milk by MCIC / S. Al-Mashikhi, S. Nakai // *J. King Saud Univ*. – 1991. – Vol. 3. – P. 215–229.
31. Calvo, A. Isolation of Lactoferrin by IMAC / A. Calvo, F. Batista Viera // *Biochemical Education*. – 1994. – Vol. 122, № 1. – P. 50–52.
32. Способ получения сорбента для выделения ДНК: Патент № 14225 [Электронный ресурс] / А.П. Дрожженюк; Дата публикации 30.04.2011 // *belgospatent*. – 2007. – Mode of access: <http://www.belgospatent.org.by>. – Date of access: 06.07.2011
33. Иммунологические методы исследования / под редакцией И. Лефковитса и Б. Перниса, 1988. – Москва: Мир. – 528 с.

ISOLATION OF LACTOFERRIN FROM FEMALE, GOAT, COW MILK USING DIFFERENT METHODS OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY

V.P. Kurchenko, M.A. Kapustin, N.V. Gavrilenko, A.I. Drozhdenuk*

Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Institute of bioorganic chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

Certain scanty milk proteins possess pronounced biological activity. Lactoferrin, protein molecule derived from animal and human milk, is among them. This protein is very important in practical application. Unfortunately the amount of lactoferrin in milk of different species is low, that is why it's important to find out methods of lactoferrin isolation and obtainment in pure form to use in food and pharmaceutical industry.

In our study the structure and biological activities of lactoferrin have been reviewed. The mechanisms of its antibacterial, antiviral and other types of action have been described. In the course of experiment the possibility of lactoferrin isolation by different types of affinity chromatography methods was investigated. Purified protein was analysed with SDS-electrophoresis, HPLC analysis and immunochemical assay.