

## عزل وتنقية اللاكتوفيرين من اللبأ والشرش الحلو والحامضي المصنع من حليب الإبقار.

موج حميد قدوري<sup>1</sup> وإيثار زكي ناجي

قسم علوم الاغذية - كلية الزراعة - جامعة تكريت-العراق

### الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة فصل اللاكتوفيرين من لبأ الإبقار باستخدام طريقة التبادل الأيوني و المبادل DEAE-Cellulose إذ كان الرقم الهيدروجيني الأمثل للفصل هو 8.5 و قد أعطى اللاكتوفيرين القياسي ثلاث قمم في مرحلة الاسترداد و لم تظهر أي قمة في مرحلة الغسل ، حيث تميزت الأيام الثلاثة الأولى بعد الولادة باحتواء حليب الإبقار على اعلى نسبة من اللاكتوفيرين حيث كان التركيز (93.789 و 88.073 و 60.564%) لليوم الأول والثاني والثالث على التوالي مقارنةً مع اليوم الرابع والخامس والسادس والسابع الذي كانت النسبة فيها (37.019 و 30.392 و 30.436 و 31.100%) على التوالي. تم عزل وتنقية اللاكتوفيرين من الشرش الحلو والحامض باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose حيث كانت نسبة البروتين في الشرش الحلو 91.866% و الشرش الحامض 77.859% ، وعند استخدام هلام Sephadex G-100 أعطى اللاكتوفيرين القياسي وكل من الشرش الحلو و الحامض بقمتهما قمة واحدة وتم تحديد الوزن الجزيئي إذ بلغ 79.79 كيلودالتون في اللاكتوفيرين القياسي و واللاكتوفيرين المنقى من الشرش الحلو والشرش الحامض.

الكلمات المفتاحية:  
لاكتوفيرين، لبأ الإبقار،  
الشرش الحلو، الشرش  
الحامض.  
للمراسلة :  
موج حميد قدوري  
قسم علوم الاغذية ،  
كلية الزراعة ، جامعة  
بغداد ، العراق

## Isolation and Purification of Lactoferrin From Colostrum and From Sweet and Acidic Whey Produce From Cows

Mawj Hamid Qadoury and Ethar Zeki Najj

Food Science Dep. - College of Agriculture - University of Tikrit – Iraq

### ABSTRACT

**Key words:**  
Lactoferrin, Isolation,  
Purification, Bovine  
colostrum, sweet whey, acid  
whey.

**Correspondence:**  
Mawj H. Qadoury  
Food Science Dep. -  
College of Agriculture -  
University of Tikrit - IRAQ

This study involve separation of lactoferrin from bovine colostrum using DEAE-Cellulose ion exchanger. The optimum pH for the isolation is 8.5, standard lactoferrin has given three peaks in the recovery stage and did not show any peak in the washing stage, the first three days of lactation was characterized that contain highest proportion of lactoferrin, where 93.789% and 88.073% and 60.564% for the first day and the second and third, respectively, compared with the fourth day, fifth, sixth and seventh, which was the ratio 37.019% and 30.392% and 30.436% and 47.380%, respectively. Lactoferrin was isolated and purified from sweet and sour whey using ion exchanger DEAE-cellulose, the proportion of protein in whey sweet 91.866% and 77.859% in the whey acid, and when using Sephadex G-100 gel the standard lactoferrin and sweet and acid whey with its two peaks was given one peak. The molecular weight was determined where was 79.79 kDa for standard lactoferrin and lactoferrin purified from sweet and acid whey.

### المقدمة :

تتمثل أهميته الحليب على إحتوائه العديد من المركبات التي لها تأثيرات تغذوية وصحية بالنسبة للإنسان ونتيجة لهذا فقد تزايدت في الآونة الأخيرة تطبيقات الحليب في النواحي العلاجية والغذائية (El-Loly ، 2007) ، ومن بين أهم هذه المركبات هي

<sup>1</sup> البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

البروتينات التي يتركز بعضها في الشرش و التي تضم مجموعة من البروتينات أبرزها الكلوبولينات المناعية lactoperoxidase (LP) و lactoferrin (LF) و اللاكتوفيرين immunoglobulins (Igs) (Gonzalez-Chavez و آخرون ، 2009) حيث يعمل اللاكتوبيروكسيداز كمادة حافظة طبيعية (Sharma و آخرون ، 2009) في حين يمتلك اللاكتوفيرين فعالية بيولوجية كبيرة (Rodrigues و آخرون ، 2009) ، حيث أشارت الدراسات السابقة إلى أن الأطفال الذين يعتمدون على حليب الأم لم يظهر لديهم أي حالات من نقص الحديد بعكس أولئك الذين يعتمدون على خلائط الأطفال الذين يعانون من مخاطر الإصابة بنقص الحديد و الأمراض التي تترتب على ذلك فيما بعد (Saarinen و Siimes ، 1977) فضلاً عن أنه يعد عاملاً مضاداً قوياً للميكروبات ، إذ أن الطبيعة التركيبية له تجعل منه عاملاً مضاداً لمدى واسع من أنواع البكتريا و الفيروسات و الخمائر و الاعفان (Rodriguez و آخرون ، 2005 ؛ Yamauchi و آخرون ، 2006) فضلاً عن ذلك فإنه عامل مضاد للالتهابات و السرطانات (Connely ، 2001)، اما الكلوبولينات المناعية فتعد من أفضل المواد التي تدعم جهاز المناعة لدى الانسان (El-Loly ، 2007) . خلال صناعة الاجبان وغيرها من منتجات الالبان الأخرى يتم التخلص من كميات كبيرة من الشرش كمخلفات صناعية و تصريفه مع المياه الثقيلة مما يؤدي الى زيادة التلوث، فقد أشار عزيز (2001) الى ان كمية الشرش التي يتم التخلص منها في العراق إستناداً الى دراسة مسحية أجريت سنة 2000 تبلغ 84.06 طن يومياً و هذا ما يمثل خسارة كبيرة لمنتج يمكن الاستفادة منه و لهذا أتبعت تقنيات حديثة لتقليل الشرش الذي يتم التخلص منه وذلك بتركيز الشرش و زيادة نسبة المواد الصلبة فيه من خلال استعمال تقنية الترشيح الفائق او استعمال تقنية التبادل الأيوني لرفع نسبة بروتينات الشرش و الذي يمثل اللاكتوفيرين احد أنواعها المهمة (Kim و آخرون ، 2010). لذا هدفت الدراسة الى تقدير التغيرات في نسبة اللاكتوفيرين خلال مرحلة الحلب لمتابعة أفضل مرحلة في محتواها من هذا البروتين الهام، إضافة الى تحديد نسبة اللاكتوفيرين في الشرش باختلاف طريقة ترسيب الكازينات الحامضية والانزيمية.

## المواد وطرائق العمل:

### 1- جمع العينات

جمعت عينات اللبأ من ابقار عائدة لأحد مربى الأبقار في قرية عينات من اليوم الأول بعد الولادة ولغاية سبعة أيام ومن البقرة نفسها مع اعتماد الوقت نفسه في أخذ العينات حيث اخذت العينات من الطلبة الصباحية لمتابعة التغيرات الحاصلة خلال هذه الفترة، اما عينات الشرش الحلو والحليب فقد جمعت من معمل الالبان التابع لجامعة تكريت كلية الزراعة الذي يجهز الحليب من مصادر اخرى ثم حفظت العينات جميعاً في درجة حرارة التلاجة في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق لحين الاستخدام.

### 2- تحضير العينات

تم تحضير كل من الشرش الحامض و شرش اللبأ حسب الطريقة التي أوردته (Dračková و آخرون ، 2009) و ذلك باعتماد الترسيب على أساس نقطة التعادل الكهربائي حيث تم استخدام محلول 1 عياري من حامض الهيدروكلوريك بإضافته إلى عينة الحليب و اللبأ لحين وصول الرقم الهيدروجيني إلى 4.6 بعدها رشحت هذه العينات ثم نبذت العينات بعد تبريدها مركزياً على سرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة للتخلص من الدهون الموجودة فيها وما قد تبقى من الرواسب الكازينية الموجودة ثم ركزت جميع العينات قيد الدراسة عن طريق وضعها في أنابيب ديلزة واستخدام السكر للتخلص من الماء .

### 3: الفصل باستخدام تقنية كروماتوغرافية التبادل الأيوني باستخدام عمود التبادل الأيوني ثنائي ائيل امينو ائيل سليولوز

حددت التغيرات في تركيز اللاكتوفيرين في جميع عينات الشرش المحضر من اللبأ قيد الدراسة ولأيام الجمع التي تراوحت بين 1-7 أيام بالإضافة الى عينات الشرش الحلو و الحامض وذلك من خلال مقارنتها مع تراكيز معلومة من اللاكتوفيرين القياسي و باعتماد الفصل بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وتم تحضير المبادل وفق الطريقة التي وصفها (Whitaker، 1972) ، وذلك بغسل 20غرام من المبادل DEAE Cellulose في الماء المقطر في اسطوانة مدرجة وترك ليبرد ، ثم سكب السائل العلوي ، ورشح بعدها العالق باستخدام قمع بخنر تحت التفريغ على ورق ترشيح من نوع واتمان رقم (1) ، و باستخدام محلولين احدهما

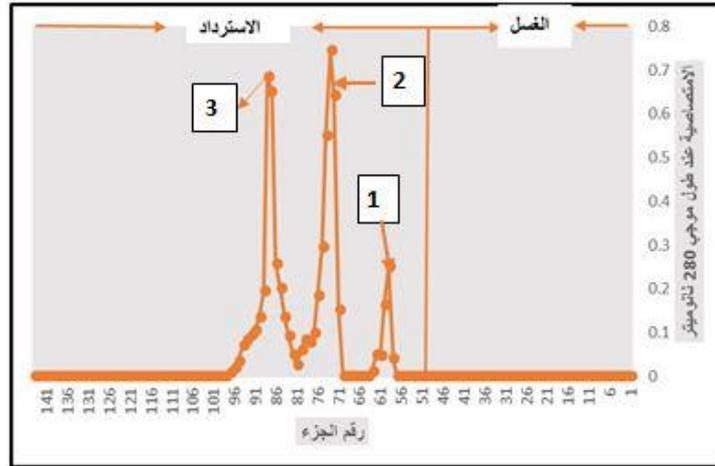
هيدروكسيد الصوديوم NaOH و NaCl ثم رشح وغسل المبادل بالماء المقطر ثم علق في محلول حامض الهيدروكلوريك وبعد الترشيح غسل مراراً عدة مرات بالماء المقطر ثم بمحلول Tris-HCl، عبي المبادل في عمود زجاجي ليعطي أبعاداً ( 2.5x 15.5) سم واستخدم محلول الترس الدائري في موازنة المبادل وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة بعد موازنة عمود التبادل الأيوني مرر كل من محلول اللاكتوفيرين القياسي المحضر من إذابة 0.5 غم في 10 مل من الماء على سطح العمود وغسل العمود بمحلول دارئ الترس ذي التركيز 0.005M لإزالة البروتينات غير المرتبطة وجمعت الأجزاء النافذة من العمود بمعدل 3 مليلتر / أنبوب و قيس الامتصاص للأجزاء النافذة عند 280 نانومتر، ثم استرداد الأجزاء المرتبطة من العمود بواسطة التدرج الخطي للملح باستعمال دارئ الترس الأول بتركيز 0.005M ورقم هيدروجيني 8.5 والثاني بتركيز 0.005M المحتوي على 1.0M من كلوريد الصوديوم NaCl برقم هيدروجيني 8.5 ، بعدها تم متابعة البروتين في الأجزاء المستردة ثم رسمت العلاقة بين الامتصاص الضوئي للأجزاء غير المرتبطة و المستردة و رقم الجزء لتحديد مواقع هذه الأجزاء . مررت بعدها جميع عينات الشرش المحضرة من اللبأ والشرش الحلو والحامض قيد الدراسة كلا على إنفراد وذلك بإتباع الطريقة نفسها، تم بعدها متابعة البروتين في الأجزاء المستردة ورسمت العلاقة بين رقم الجزء والامتصاصية الضوئية للأجزاء غير المرتبطة و المستردة ثم المقارنة مع ما تم الحصول عليه من إمرار اللاكتوفيرين القياسي.

#### 4: تعيين الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين المنقى جزئياً من الشرش الحلو و الحامض كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفادكس G-100

عين الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين المنقى جزئياً للقمطين الثانية والثالثة بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس G 100 حيث تم تحضير هلام السيفادكس المجهز من شركة sigma chemical بحسب تعليمات الشركة المجهزة في محلول 0.1M دارئ Tris HCl ذي الرقم الهيدروجيني 7 وبعد إزالة الهواء منه بواسطة مضخة تفريغ عبي في عمود زجاجي بأبعاد ( 2x45سم) بعد تعبئة العمود وموازنته تم حساب حجم الفراغ Vo و ذلك بإمرار 1 مليلتر من محلول الدكستران الأزرق وأجريت عملية الاسترداد لمحلول الدكستران الأزرق باستخدام محلول 0.1M Tris- HCl ورقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان ثابتة وواقع 3 مليلتر للجزء الواحد، وقرأت الامتصاصية في جهاز المطياف الضوئي للأجزاء المنفصلة على الطول الموجي 600 نانومتر، و قدر حجم الفراغ للعمود وتم تقدير حجم الاسترداد لكل من البروتينات القياسية (اللايسوزايم، الببسين، البومين المصل البقري واللاكتوفيرين) والبروتين المنقى جزئياً وبشكل منفرد لكل بروتين . وتم الاسترداد بأستخدام محلول 0.1M دارئ Tris HCl ورقم هيدروجيني 7 ثم قيست الامتصاصية الضوئية عند الطول الموجي 280 نانومتر للأجزاء المنفصلة لغرض تحديد حجم الاسترداد (Ve) لكل بروتين قياسي، بعدها تم تقدير الوزن الجزيئي للبروتين المنقى جزئياً بواسطة رسم المنحنى القياسي من العلاقة بين حجم الاسترداد / حجم الفراغ ( Ve / Vo ) و لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

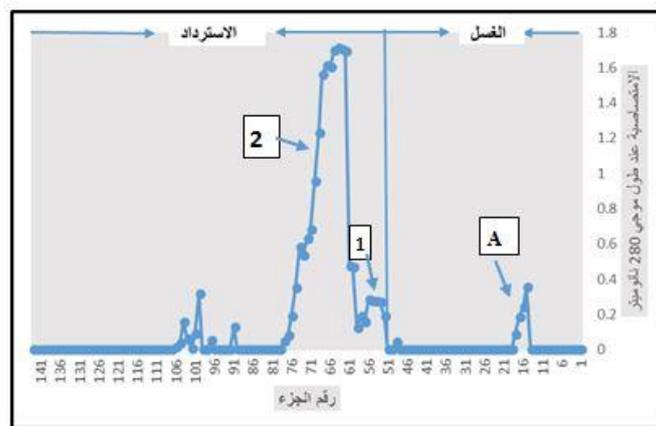
#### النتائج والمناقشة :

أظهرت قياسات الامتصاصية عند طول موجي 280 نانومتر لأجزاء الغسل لمحلول اللاكتوفيرين القياسي المار خلال عمود التبادل الأيوني DEAE-cellulose والذي سبق موازنته ، عدم ظهور أي قمة في هذه الأجزاء، اما أجزاء الاسترداد باستخدام التدرج الملحي الخطي للبروتينات المرتبطة فقد أعطى ثلاث قمم رئيسة وواضحة تركزت في الأجزاء (56-65) و (70-80) و (80-97) والتي رُمزت بالأرقام 1 و 2 و 3 على التوالي و هذا ما يظهره الشكل (1) و الذي يمثل الفصل الكروماتوغرافي لمحلول اللاكتوفيرين القياسي.



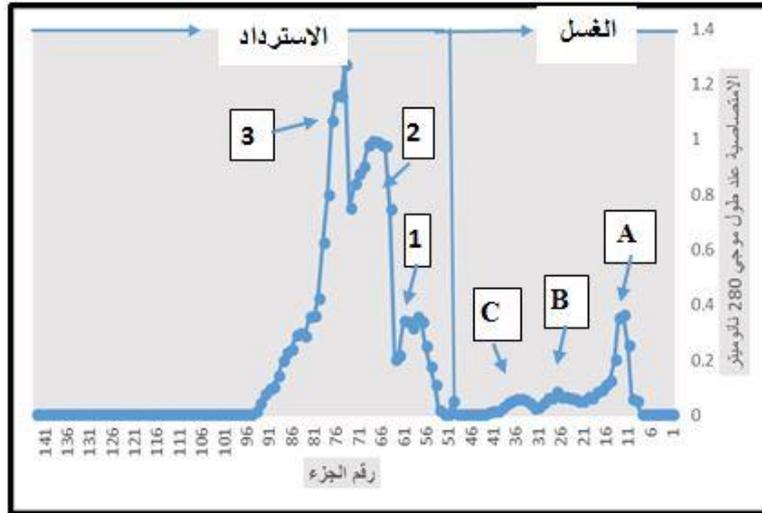
شكل (1) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لللاكتوفيرين القياسي باستعمال عمود المبادل الأيوني-DEAE Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس Tris-HCl برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي ( 1.0-0 ) MNaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

ويلاحظ من الشكل نفسه إن هنالك اختلافا في نسب هذه القمم حيث بلغت (11.111 و 37.037 و 51.852) % للقمم 1 و 2 و 3 وعلى التوالي (جدول 1). أما بالنسبة لمحتوى اللاكتوفيرين في اللبأ ولأيام الجمع 1-7 والذي تم عزله وتقديره باستخدام الطريقة نفسها في تقدير اللاكتوفيرين القياسي فقد أعطت اختلافات واضحة في نسب البروتينات التي تحويها كما أظهرت أيضاً اختلافات في نسب قمم اللاكتوفيرين من خلال مقارنتها مع اللاكتوفيرين القياسي. ففي اليوم الأول من الجمع وفي مرحلة الاسترداد والذي يظهره الشكل (2) أعطى الفصل الكروماتوغرافي في مرحلة الاسترداد قمتين تركزت في الأجزاء (50-60) و (61-77) والتي تمثل القمة الأولى والثانية عند مقارنتها مع القمم المفصولة لللاكتوفيرين القياسي. وكما يظهر في الشكل نفسه هنالك اختلاف واضحاً بين نسب هاتين القمتين حيث كانت القمة الأولى صغيرة وبلغت نسبتها 9.317% في حين كانت القمة الثانية كبيرة وبلغت نسبتها 84.472% كما أظهرت النتائج المبينة في جدول (1) لليوم الأول من الجمع وجود قمة واحدة صغيرة في مرحلة الغسل رُمزت بالحرف A تركزت في الأجزاء (15-20) وكانت نسبة البروتين في هذه القمة 6.211%.



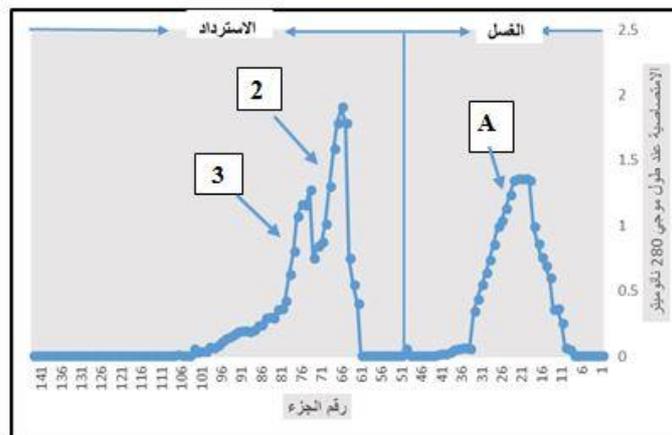
شكل (2) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبأ اليوم الأول باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس Tris-HCl برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي ( 1.0-0 ) MNaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

أما شرش اليوم الثاني من الجمع (شكل 3) فقد أعطت مرحلة الاسترداد ثلاث قمم تركزت في الأجزاء (65-52) و(75-65) و-95 (75) للقمم 1 و2 و3 على التوالي. وكما يلاحظ إن هناك فصل نوعي واضح بين القمتين الثانية والثالثة، كما اختلفت نسب هذه القمم حيث بلغ (11.116 و 21.377 و 55.580) % للقمم 1 و2 و3 على التوالي، أما في مرحلة الغسل ظهرت ثلاث قمم رُمزت بالأحرف A و B و C تركزت الأجزاء(20-8) و (32-21) و (40-33) على التوالي وكان مجموع نسبة البروتين في هذه القمم 11.928 % (جدول 1).



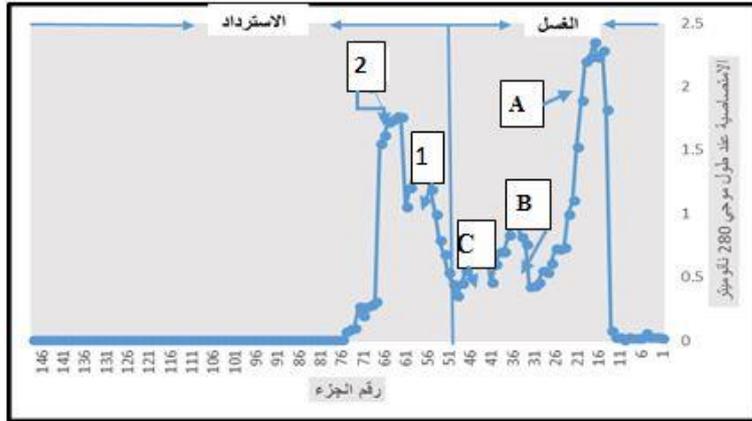
شكل(3) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم الثاني باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ التريس Tris-HCl برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ التريس Tris-HCl بتدرج ملحي (1.0-0) MNaCl وبسرعة جريان 30مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

واظهر شرش اليوم الثالث (شكل 4) قمتين في مرحلة الاسترداد تركزت في الأجزاء (75-65) و(96-73) وعند مقارنتها مع الأجزاء المفصولة لللاكتوفيرين القياسي فإنها تمثل القمة الثانية والثالثة مع اختفاء للقمة الأولى وقد بلغت نسبة هاتين القمتين (22.535 و 38.029) % للقمة الثانية والثالثة على التوالي مع ملاحظة أن مرحلة الغسل أعطت قمة واحدة كبيرة رمزت بالحرف A في الأجزاء (35-10) وقد بلغت نسبة البروتين في هذه القمة 39.436 % (جدول 1).



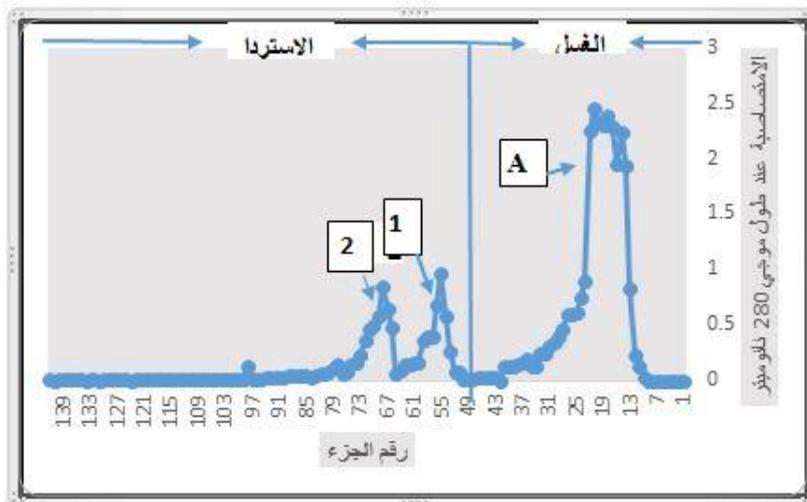
شكل(4) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم الثالث باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ التريس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ التريس Tris-HCl بتدرج ملحي (1.0-0) MNaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

أما شرش اليوم الرابع من الجمع والذي يتمثل في الشكل (5) في مرحلة الاسترداد أعطت قمثان تركزت في الأجزاء (50-65) و (75-65) و قد بلغت نسبة البروتين في هاتين القمتين (20.192 و 16.827%) على التوالي ،في حين أعطت مرحلة الغسل ثلاث قمم هي A و B و C تركزت في الأجزاء (30-10) و (40-30) و (50-40) على التوالي كما يظهر في الشكل (5) وكانت نسبة البروتين في هذه القمم 62.981% كما يوضحه الجدول (1).



شكل (5) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم الرابع باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي M (1.0-0) NaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

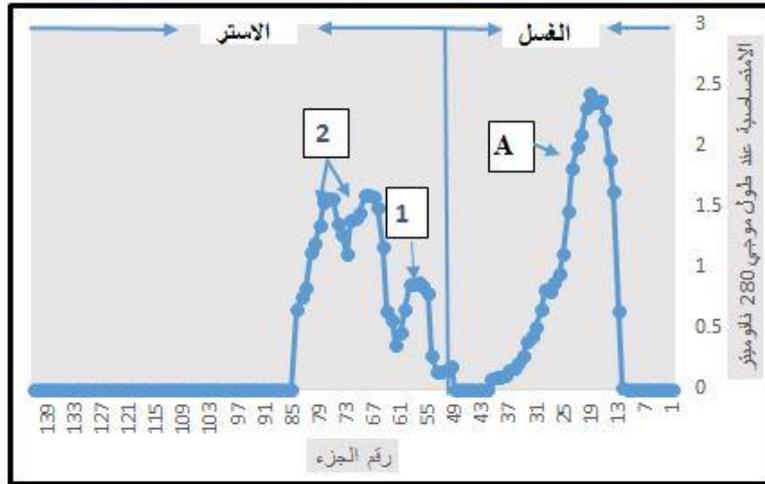
و ظهر في شرش اليوم الخامس قمتين في مرحلة الاسترداد ظهرت تركزت في الأجزاء (60-50) و (70-60) (شكل 6) وبنسبة بلغت (16.365 و 14.027%) على التوالي كما يظهر في الجدول (1) و هاتين القمتين تمثلان القمة الاولى و الثانية على التوالي عند مقارنتها مع اللاكتوفيرين القياسي ، أما في مرحلة الغسل فقد أعطت مرحلة الغسل قمة واحدة كبيرة رمزتها بالحرف A تركزت في الأجزاء (30-13) و بنسبة 69.608%.



شكل (6) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم الخامس باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي M (1.0-0) NaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

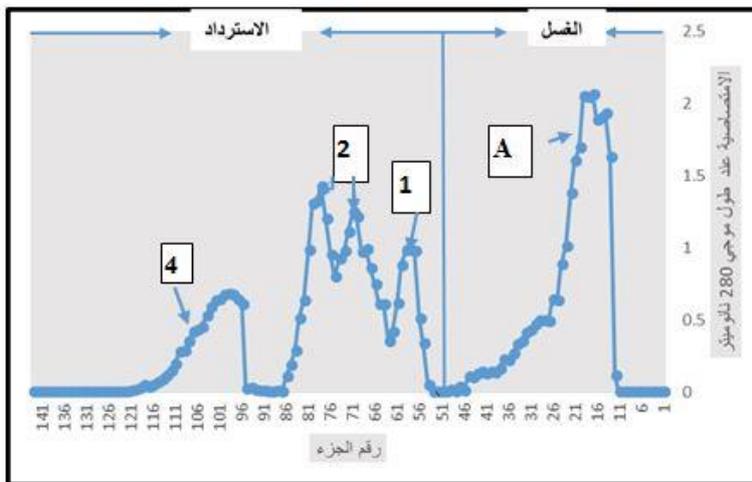
وأعطى الشرش لليوم السادس ثلاث قمم واضحة في مرحلة الاسترداد تركزت في الأجزاء (60-55) والتي تمثل القمة الأولى مقارنة مع اللاكتوفيرين القياسي والأجزاء (70-60) و (80-70) والتي تمثل القمة الثانية والتي تعتبر قمة واحدة منشطرة على التوالي

كم يظهر في الشكل (7) وقد تراوحت نسبة هذه القمم هذه القمم 4.348 % و 13.044 % و 13.044 % على التوالي ، و لكن أظهرت مرحلة الغسل قمة واحدة كبيرة (A) تركزت بالأجزاء (11-31) بنسبة بلغت 69.564 % و هذا ما يوضحه الجدول (1).



شكل (7) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم السادس باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي M (1.0-0) NaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

وأظهر الشرش لليوم السابع من الجمع أربع قمم في مرحلة الاسترداد تركزت في الأجزاء 53-65 التي تمثل القمة الأولى والقمة الثانية عبارة عن قمتين مندمجة ولم تتشطر بصورة كاملة تركزت في الأجزاء 65-75 و 75-85 على التوالي (شكل 8) والتي تراوحت نسبتها (9.569 و 9.968 و 11.563 %) على التوالي ، في حين أظهرت مرحلة الغسل قمة واحدة كبيرة (A) تركزت في الأجزاء (11-46) و بنسبة 56.934 % كما يظهر في الجدول (1) و يلاحظ من نفس الشكل أن هناك قمة ظهرت بعد اللاكتوفيرين تركزت في الأجزاء (96-116) و كانت نسبة البروتين فيها 11.963 % والتي تعود الى بروتينات ذات قاعدية اوطأ من اللاكتوفيرين و التي تشمل بروتينات الشرش كالألفاكتالبومين و البيتاكتوكلوبولين و التي تبلغ نقطة التعادل الكهربائي لها بحدود 5.1-4.3 و 5.4-5.2 على التوالي فضلاً عن البروتينات المناعية و التي تبلغ نقطة التعادل الكهربائي لها بحدود 7.3-5.8 (Hahn, 1998).



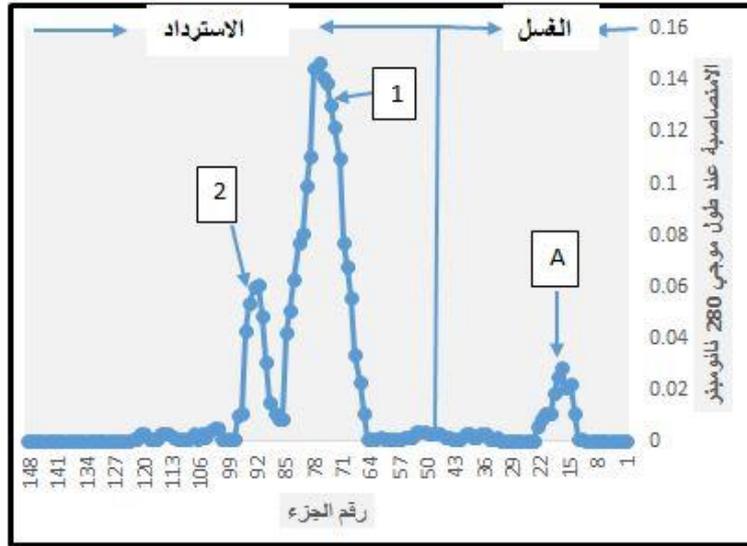
شكل (8) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للبا اليوم السابع باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.5x15) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي M (1.0-0) NaCl وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

من خلال متابعة الفصل و نسب القمم التي أعطاها الشرش لأيام الجمع 1-7 ، يلاحظ زيادة في نسب قمم اللاكتوفيرين المفصولة في مرحلة الاسترداد لأيام الجمع الأولى مع إنخفاضها التدريجي خلال أيام الجمع اللاحقة حيث بلغت في 93.789% و 88.073% و 60.564% خلال الأيام الثلاثة الأولى على التوالي وإستمرت بالانخفاض لتصل الى 37.019% و 30.392% و 30.436% للأيام الرابع و الخامس و السادس على التوالي مع ملاحظة ارتفاع بسيط لها في اليوم السابع بلغ 31.100% و إن هذه البروتينات تمثل البروتينات المخالفة لشحنة العمود ويلاحظ من جدول (1) حصول إرتفاع تدريجي في نسب القمم المفصولة في مرحلة الغسل و خلال أيام الجمع حيث بلغت في اليوم الأول 6.211% لترتفع الى (11.928 و 39.436 و 62.981 و 69.608 و 69.565%) في اليوم الثاني و الثالث و الرابع و الخامس و السادس ، مع ملاحظة حصول إنخفاض بسيط لها في اليوم السابع حيث بلغ 56.937% ، إن هذه البروتينات تمثل بروتينات ذات شحنة مشابهة لشحنة العمود و التي تتميز بأنها ذات قاعدية أعلى من اللاكتوفيرين لذا فهي تحمل في ظروف الرقم الهيدروجيني للدارئ المستعمل شحنة موجبة و مشابهة لشحنة العمود و هذه البروتينات قد يكون أحدها اللاكتوبيروكسيديز الذي تبلغ نقطة التعادل الكهربائي له بحدود 9-9.5 (Hahn, 1998) و هذا ما أكدته الحاتم (2012).

الجدول (1) التغير في تركيز اللاكتوفيرين خلال أيام الجمع السبعة

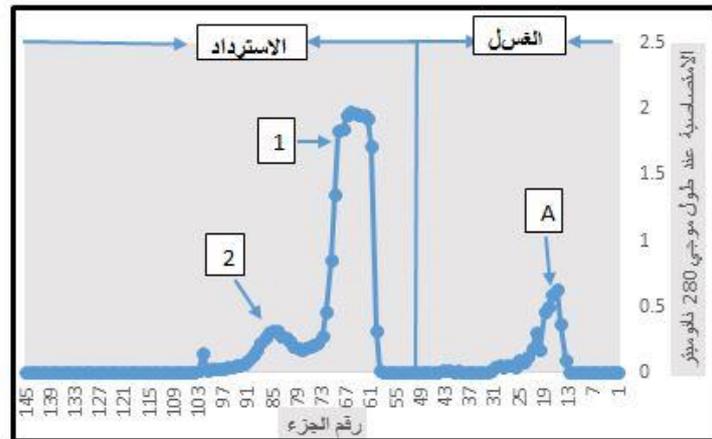
العينة	مرحلة الغسل التركيز الكلي %	مرحلة الاسترداد رقم القمة	التركيز في القمة %	مساحة القمة	التركيز الكلي %
اللاكتوفيرين القياسي	-	1	11.111	0.1125	100.000
		2	37.037	0.375	
		3	51.852	0.525	
لبأ اليوم الاول	6.211	1	9.317	0.150	93.789
		2	84.472	1.460	
لبأ اليوم الثاني	11.928	1	11.116	0.26	88.073
		2	21.377	0.500	
		3	55.580	1.300	
لبأ اليوم الثالث	39.436	2	22.535	10.000	93.380
		3	38.029	16.875	
لبأ اليوم الرابع	62.981	1	20.192	10.500	37.019
		2	16.827	8.750	
لبأ اليوم الخامس	69.608	1	16.365	5.250	30.392
		2	14.027	4.500	
لبأ اليوم السادس	69.565	1	11.340	2.5	30.435
		2	17.660	7.500	
			17.660	7.500	
لبأ اليوم السابع	56.937	1	9.569	6.000	31.100
		2	9.968	6.250	
			11.563	7.250	
		4	11.963	7.500	

وفي الشرش الحلو فقد تم الحصول على قمتين في مرحلة الاسترداد تركزت في الأجزاء (90-65) و(109-90) والتي تعتبر القمة الثانية والثالثة بالمقارنة مع محلول اللاكتوفيرين القياسي، وكما يظهر من الشكل نفسه تباين نسبة هاتين القمتين حيث بلغت نسبة القمة الأولى 76.27% أما القمة الثانية فقد كانت نسبة البروتين فيها 15.591% أما مرحلة الغسل فقد أعطت قمة صغيرة واحدة تركزت في الأجزاء (25-13) بنسبة بروتين بلغت 8.134%



شكل (9) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للشرش الحلو باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد (2.515 x ) سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي ( 1.0-0 ) M وبتسرع جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

أما الشرش الحامض فقد أظهر قمتين في مرحلة الغسل الأولى تركزت في الأجزاء (75-61) وكانت نسبة البروتين فيها 68.127% أما القمة الثانية فقد تركزت في الأجزاء (95-75) وبلغت نسبة البروتين فيها 9.732% والتي تعتبر القمة الثانية والثالثة عند مقارنتها مع الفصل الكروماتوغرافي محلول اللاكتوفيرين القياسي في حين أعطى قمة واحدة صغيرة في مرحلة الغسل تركزت في الأجزاء (26-13) وكانت نسبة البروتين فيها 22.141% والتي قد تمثل البروتينات التي تمتلك شحنة مماثلة لشحنة العمود لهذا فإنها لم ترتبط مع العمود (شكل 9).



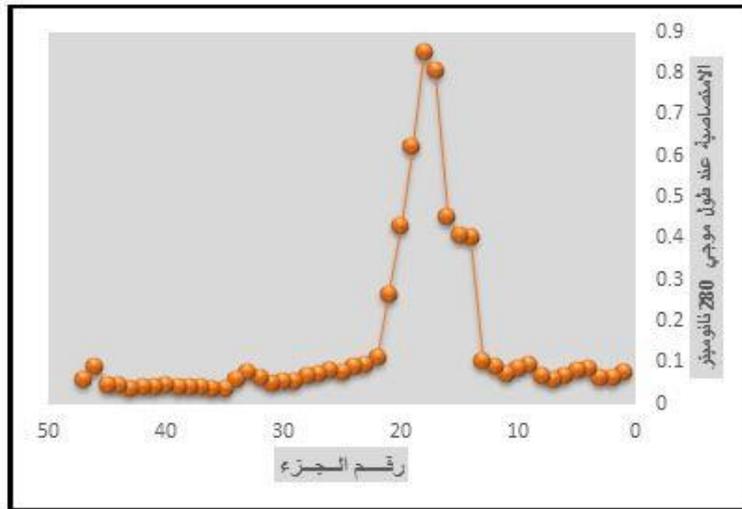
شكل(10)كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للشرش الحامض باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد 2.5 x 15 سم الموازن بمحلول 0.005M دارئ الترس برقم هيدروجيني 8.5 وتم الاسترداد بمحلول دارئ الترس Tris-HCl بتدرج ملحي ( 1.0-0 ) M وبتسرع جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3مليلتر/ جزء

ومن النتائج السابقة نلاحظ ارتفاع نسبة اللاكتوفيرين في الشرش الحلو عن الشرش الحامض حيث بلغت 91.866% في الشرش الحلو و77.859% في الشرش الحامض (جدول 2)

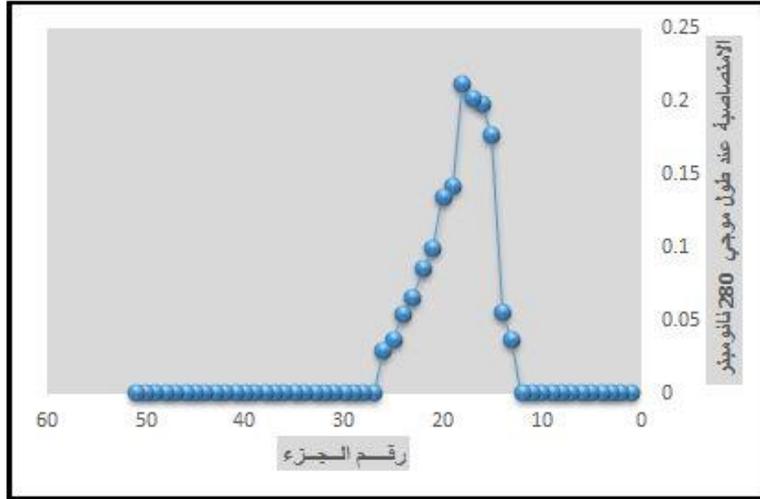
الجدول (2) تركيز اللاكتوفيرين في الشرش الحامض والشرش الحلو

النسبة الكلية للبروتين %	مساحة القمة سم	نسبة البروتين في القمة %	مرحلة الاسترداد رقم القمة	مرحلة الغسل نسبة البروتين في القمم %	نوع الشرش
91.866	2.813	76.275	2	8.134	الشرش الحلو
	0.575	15.591	3		
77.859	14.000	68.127	2	22.141	الشرش الحلو
	2.000	9.732	3		

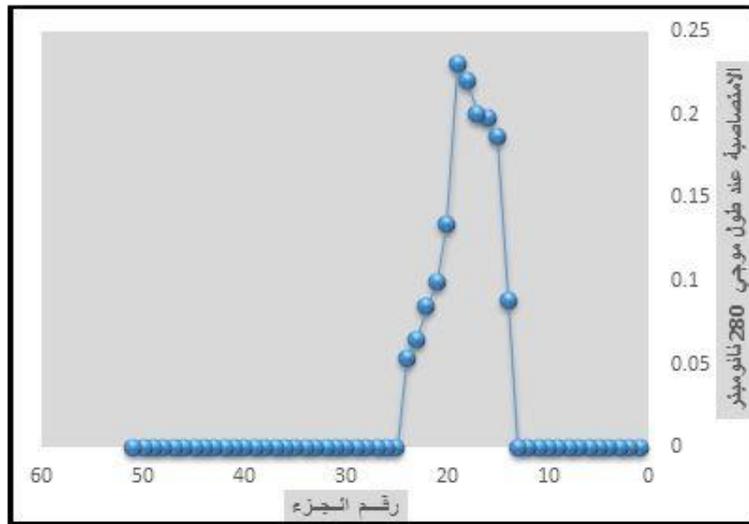
4: تعيين الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين المنقى جزئياً كروماتوغرافياً الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفاديكس G-100 يظهر من الفصل الكروماتوغرافي لللاكتوفيرين القياسي الحصول على قمة واحدة تركزت في الأجزاء 13-23 (شكل 11). وعند إمرار القمة الثانية من الشرش الحلو وباعتماد الظروف نفسها ظهرت قمة واحدة في الأجزاء 12-27 وقمة واحدة أيضاً عند إمرار القمة الثالثة من الشرش الحلو تركزت في الأجزاء 13-25 كما في الشكلين (12) و(13).



شكل (11) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لللاكتوفيرين القياسي باستخدام عمود السيفاديكس G-100 بأبعاد (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر / جزء.

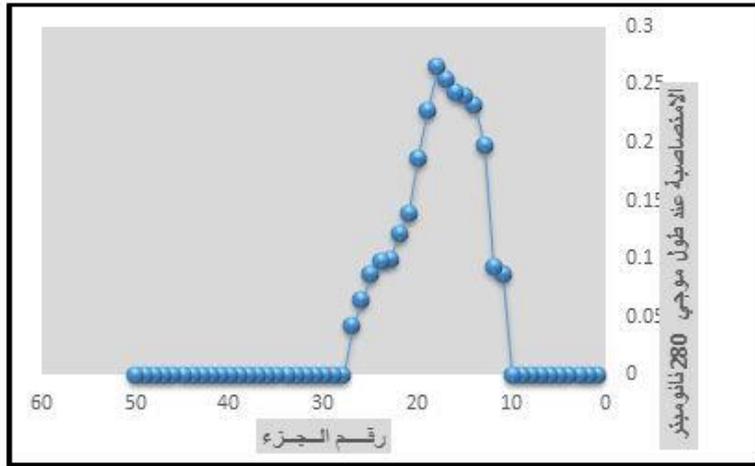


شكل (12) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للقمة الثانية من الشرش الحلو باستخدام عمود السيفادكس G-100 (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl بـرقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وواقع 3 مليلتر / جزء.

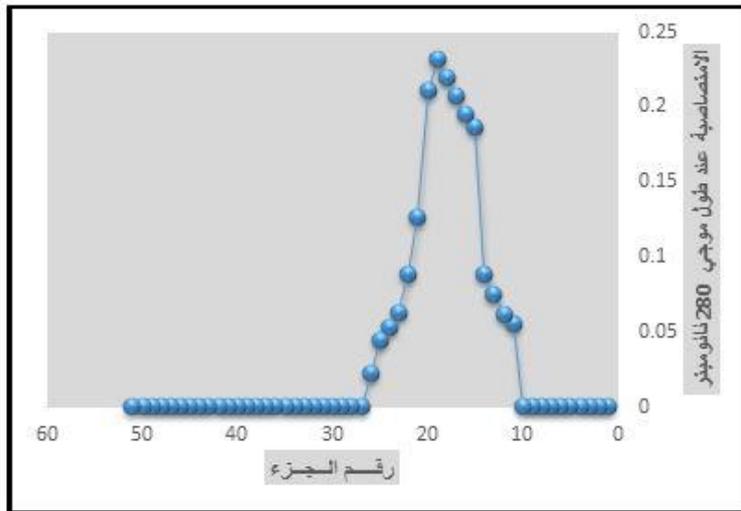


شكل (13) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للقمة الثالثة من الشرش الحلو باستخدام عمود السيفادكس G-100 (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl بـرقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وواقع 3 مليلتر / جزء.

أما عند إمرار القمة الثانية من الشرش الحامض فقد تم الحصول على قمة واحدة تركزت في الأجزاء 10-27 وعند إمرار القمة الثالثة فقد تم الحصول على قمة تركزت في الأجزاء 13-25 كما مبين في الشكلين (14) و (15) وهذا يتطابق مع ما تم الحصول عليه عند إمرار اللاكتوفيرين القياسي.

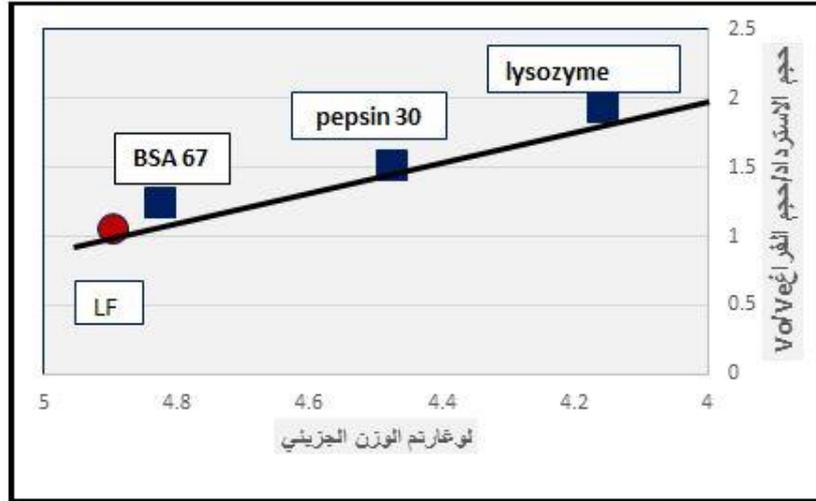


شكل (14) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للقيمة الثانية من الشرش الحامض باستخدام عمود السيفادكس-G- 100 بابعاد (45 x 2)سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر/ جزء.

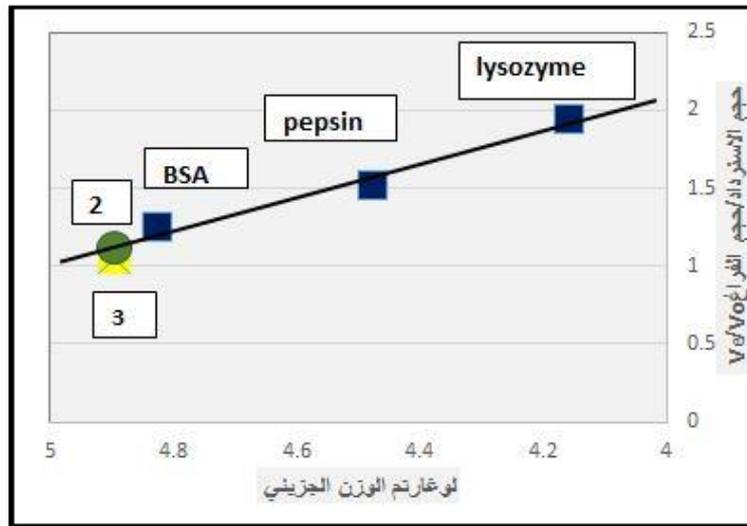


شكل (15) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للقيمة الثالثة من الشرش الحلو باستخدام عمود السيفادكس-G- 100 بابعاد (45 x 2)سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر/ جزء.

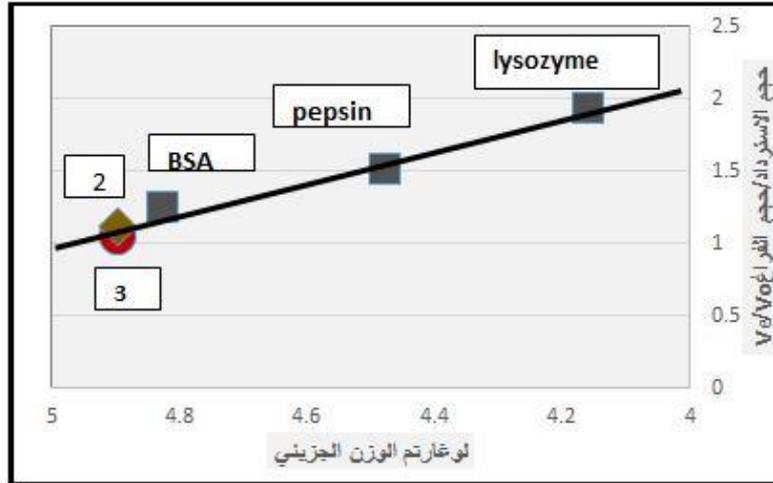
ان الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين بلغ 79.79 كيلو دالتون و هذا يتوافق مع الدراسات التي ذكرت ان الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين يقع في المدى 78-80 للمصادر المختلفة من الحليب (Hahn, 1998) وقد أظهرت النتائج أن أعلى امتصاصية كانت في الجزء 18 بالنسبة لللاكتوفيرين القياسي اما الشرش الحلو و الحامض فكانت أعلى امتصاصية في الأجزاء 18 و 19 للقيمة الثانية والثالثة على التوالي.



الشكل (16) الوزن الجزيئي لللاكتوفيرين القياسي بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس G-100 بأبعاد (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M دارى Tris HCl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر/ جزء



الشكل (17): الوزن الجزيئي للقمة الثانية والثالثة من الشرش الحلو بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس G-100 بأبعاد (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M دارى Tris HCl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر/ جزء



الشكل (18): الوزن الجزيئي للقمّة الثابته والثالثة من الشرش الحلو بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس G-100 بأبعاد (45 x 2) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 M Tris HCl بـرقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر / جزء

#### المصادر:

الحاتم، رعد علي رحيم (2012). فصل وتنقية بروتين اللاكتوفيرين من لباً الأبقار والماعز ودراسة بعض خصائصه وتطبيقاته. رسالة ماجستير، جامعة البصرة قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية.

عزيز، رعد أكرم (2001). دراسة فعالية بروتين اللاكتوفيرين المفصول من لباً الأبقار والجاموس. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

- Connely, OM.(2001). Antiinflammatory activities of lactoferrin. J Am Coll Nutr ;20(5 Suppl.) : 389S–95S.
- Dračková,M.; Borkovc ová, I.; Janštová, B.; Nais erová, M.; Přid alová, H.; avrátilová, P. N & Vorlová, L.(2009). Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method , Department of Milk Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology.
- El-Hatmi, H.; Girardet, J.M.; Gaillard, J.L.; Yahyaoui, M.H. & Attia, H. Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. Small Ruminant Res. 2007, 70, 267.
- El-Loly, MM. (2007). Bovine milk immunoglobulins in relation to human health. International Journal of Dairy Science 2(3):183-195.
- Gonzalez-Chavez, S. A.; Arevalo-Gallegos, S. and Rascon-Cruz,Q.(2009). Lactoferrin: Structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents,33:301-301.
- Hahn, R.; Schulz, P.M.; Schaupp, C. & Jungbauer, A.(1998). Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. J. Chromatogr. A, 795, 277-287.
- Kim, K.S.;Kim, J.S.; Shin, M.S.;Noh, H.W.;Lim, S.D.; Suvd, D. & Alimaa,J.(2010).Purification and characterization of Mongolianmare lactoferrin. Journal of Dairy Science, 29(2): 164-167.
- Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, Paulsson M, Mansson HL. (2009). Lactoferrin and cancer disease prevention. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 49(3):203-217.
- Saarinen, UM. & Siimes, MA.(1977). Iron absorption from infant milk formula and the optimal level of iron supplementation. Acta Paediatr Scand;66:719–22.
- Sharma R, Kaur S, Rajput YS, Kumar R. (2009). Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. Milchwissenschaft 64(2):173-175.
- Whitaker , J. R. ( 1972 ) . Principles of enzymology for the food science . Mercel Dekker. Inc. , New York , USA .
- Yamauchi, K .; Wakabayashi, H .; Shin, K . & Takase M . (2006) . Bovine lactoferrin: Benefi ts and mechanism of action against infections. Biochem Cell Biol 84 ( 3 ): 291 – 296 .