

## Laktoferrinin Biyolojik Aktivitesi

Zeliha Yıldırım, Mehmet Tokatlı, Nilgün Öncül, Metin Yıldırım

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat

Geliş Tarihi (Received): 02.11.2011, Kabul Tarihi (Accepted): 26.12.2011

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): zeliha.yildirim@gop.edu.tr (Z. Yıldırım)

☎ 0 356 252 18 00-2899 📠 0 356 252 17 29

### ÖZET

Transferrin protein ailesi içinde yer alan laktoferrin, başta süt olmak üzere birçok sıvıda bulunan demir bağlayan bir glikoproteindir. Laktoferrin antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioksidant, antikanserojen, kemik sağlığını iyileştirici, bağırsakta demir absorpsiyonunu düzenleyici, anti-inflamatuar, immünomodulator gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğundan çok fonksiyonlu protein olarak değerlendirilmektedir. Bu derlemede inek sütü laktoferrinin kimyasal ve yapısal özellikleri ile biyolojik aktiviteleri hakkında bilgiler verilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Süt, Serum proteini, Laktoferrin, Biyolojik aktivite

### Biological Activity of Lactoferrin

#### ABSTRACT

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein of the transferrin family and it is mainly found in milk and in most biological fluids. Lactoferrin is a multifunctional protein since it has many biological activities including antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioxidant and anticarcinogenic activity, improvement of bone health, regulator of iron absorption in intestine, anti-inflammatory activity, and immunomodulatory. In this review article, we focus on the chemical and structural properties, and biological activities of bovine milk lactoferrin.

**Key Words:** Milk, Whey protein, Lactoferrin, Biological activities

#### GİRİŞ

Süt birçok fonksiyona sahip proteinleri içeren önemli bir gıda maddesidir. Sütte bulunan proteinlerin yaklaşık %80'ini kazeinler, %20'sini ise serum proteinleri oluşturmaktadır. Serum proteinleri içerisinde yer alan başlıca proteinler  $\beta$ -laktoglobulin (%50),  $\alpha$ -laktalbumin (%20), serum albümini (%10), immünoglobulinler (%10) ve proteoz-peptonlar (%10); minor proteinlerden bazıları ise laktoferrin, transferrin, laktoperoksidaz ve lizozimdir [1, 2]. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan çalışmalarda serum proteinleri içinde hem antimikrobiyal hem de biyolojik aktiviteye sahip protein ve peptidlerin olduğu belirlenmiştir. Bunlara örnek olarak transferrin, lizozim, laktoperoksidaz ve laktoferrin verilebilir [3, 4]. Bu

makalede önemli bir biyoaktif protein olan laktoferrinin kimyasal özellikleri, biyolojik aktivitesi ve kullanım alanları hakkında bilgiler verilmektedir.

#### LAKTOFERRİN ve ÖZELLİKLERİ

Laktoferrin serum transferrin, ovotransferrin ve melanotransferrinin de yer aldığı transferin ailesinin bir üyesidir. Transferin ailesi içinde yer alan tüm proteinler karbonik anhidraz inhibitörleri olup demir taşınımında rol oynamaktadırlar. Laktoferrin inek, insan, kısırak, keçi, fare gibi birçok süt türünde bulunan demir bağlayan bir glikoproteindir. İlk olarak inek sütünden izole edildiği için bu isimle anılan laktoferrin, sadece süte özgü bir protein değildir. Aynı zamanda gözyaşı, salya, tükürük, burun

salgısı, polimorfonükleer lökositler, bronşiyal bezlerin epitelyum hücreleri, seminal vasiküller, nötrofil granülleri ve eklem sıvısında da bulunmaktadır [5-9]. Diğer sıvılarla karşılaştırıldığında sütte daha yüksek oranda laktoferrin bulunmaktadır (Tablo 1). Ancak laktoferrin düzeyi süt türleri arasında da büyük farklılıklar göstermektedir. İnsan, domuz ve fare gibi canlıların sütlerinde laktoferrin seviyesi yüksek olmasına karşın, inek ve diğer geniş getiren hayvanların sütlerinde çok düşüktür [5, 10, 11].

Laktoferrin yapısında demir bulundurduğundan ve demirin bağlanması durumunda kırmızı bir renk oluşturduğundan kırmızı protein ismiyle de anılmaktadır [12]. Laktoferrinin demire ( $Fe^{3+}$ ) karşı affinitesi o kadar yüksektir ki, asidik koşullarda bile demiri bağlama yeteneğine sahiptir. Laktoferrin endüstriyel ölçekte yağsız süttten veya peyniraltı suyu tozundan üretilmektedir [7, 13-16].

### Kimyasal Yapısı

Laktoferrin, iki demir bağlama bölgesi bulunduran, molekül ağırlığı yaklaşık 80 kDa olan, 692 aminoasitten oluşan tek zincirli bazik ve pozitif yüklü (pI 8,4–9,0) bir glikoproteindir. Laktoferrin  $\alpha$ -heliks yapı ile birbirine bağlanan N (1–333 aminoasitler arası) ve C-terminal (346–692 aminoasitler arası) olarak adlandırılan iki globüler lobtan oluşmaktadır. Loblar bir heliks yapı (334–344 aminoasitler arası) ile birbirine bağlanmakta ve her lobun bir demir bağlama bölgesi bulunmaktadır. Her bir lob  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -plaka yapı formunda iki alt domain içermektedir. Bundan dolayı laktoferrin molekülü 4 domainle (N1, N2, C1 ve C2) gösterilmektedir [10, 14, 17, 18].

Tablo 1. Çeşitli biyolojik sıvılardaki laktoferrin miktarı [8, 10, 16].

Biyolojik Sıvı	Miktar
Kolostrum (insan)	5-7 mg/mL
İnsan sütü	1-2 mg/mL
Gözyaşı	2.2 mg/mL
Eklem sıvısı	10-80 $\mu$ g/L
Tükürük	7-10 $\mu$ g/mL
İnek sütü	20-200 $\mu$ g/mL
Kolostrum (inek)	0.5-1.0 mg/mL
Kolostrum serumu (inek)	1.5 mg/mL

Laktoferrin molekülünün iç kısmı türler arasında oldukça sabit olup demir bağlama kapasitesine, dış yüzeyi ise kuvvetli katyonik olup birçok negatif yüklü makromoleküllerle interaksiyona girme potansiyeline sahiptir. Laktoferrin N-terminaline yakın bazik aminoasit olan arjinince zengin bölge içermektedir. Arjinince zengin kısım birçok aniyonik biyolojik moleküllerin (heparin, lipid A, DNA, lizosim) bağlandığı kısımdır [19].

Laktoferrin geri dönüşümlü olarak  $Fe^{3+}$ 'i bağlayabildiğinden  $Fe^{3+}$  içermeyen laktoferrine apo-laktoferrin (inek sütü laktoferrininin demir bağlama kapasitesinin en fazla %5'i düzeyinde demir bağlanmış hali),  $Fe^{3+}$ 'le doymun halde bulunana ise holo-laktoferrin denilmektedir. İnek sütü laktoferrini doğal formunda

demir atomu ile kısmen (toplam bağlama kapasitesinin %15-20'si düzeyinde) doymun halde bulunmaktadır. Apo ve holo formlarının üç boyutlu yapıları farklılık göstermektedir. Apo-laktoferrin açık ve esnek bir yapıya sahip olup ısı denatürasyon ve proteolize karşı hassastır. Holo-laktoferrin kapalı formda ve stabil bir molekül olup proteolize ve ısı işleme oldukça dayanıklıdır. Laktoferrinin holo ve apo formlarının yapısal değişimleri molekül yüzeyini etkilemediğinden bakteri ve viral reseptörler için yüzeydeki bağlanma bölgeleri demir iyonunun bulunup bulunmamasından etkilenmemektedir. Her bir lobta direk demir bağlamada rol oynayan aminoasitler Asp, Tyr ve His (N-lob'ta His253, Tyr92, Tyr192, Asp60; C-lopta His253, Tyr435, Tyr528, Asp395)'dir. Laktoferrinin demir bağlama kapasitesi (bi)karbonat iyonu ( $CO_3^{2-}$ ) varlığına bağlıdır. Her bir demir iyonu ile birlikte bir karbonat iyonu bağlanarak demir iyonunun pozitif yükü dengelenmektedir.  $CO_3^{2-}$  iyonunu bağlayan aminoasit ise arjinindir [10, 14, 17, 18].

Laktoferrinin demiri bağlama stabilitesi geniş bir pH aralığına sahip olup mide asitliğinden bile olumsuz etkilenmemektedir. pH 3 gibi çok asidik durumlarda bile demiri tutabilmektedir [20-24]. Laktoferrine bağlı olan demir, sadece düşük pH değerlerinde veya çok kuvvetli şelatlayıcı maddeler kullanıldığında ayrılabilir [10, 14]. Demir iyonlarından başka kalsiyum, magnezyum, çinko, sodyum, potasyum, bakır, mangan, kobalt iyonları ile DNA ve RNA'yı da bağlama özelliği bulunmaktadır. Bunlara ilave olarak proteolitik bozunmalara (özellikle tripsin ve tripsin benzeri enzimlere) da oldukça dayanıklıdır. Proteaz ve ribonükleaz enzim aktivitelere de sahiptir [20-24].

Şeker bağlanma bölgesi ve sayısı açısından değişik kaynaklı laktoferrinler farklılık sergilemektedirler. İnsan sütü laktoferrini 3 (Asn137, Asn478 ve Asn623), inek, keçi ve koyun sütü laktoferrini 5 (Asn233, Asn281, Asn368, Asn476 ve Asn545) şeker bağlanma bölgesine sahiptirler. Ancak bu bölgelerin kullanımına yönelik yapılan çalışmalarda insan sütü laktoferrininde 2 (Asn137 ve Asn478) ve inek sütü laktoferrininde ise 4 (Asn233, Asn368, Asn476 ve Asn545) bölgenin sıklıkla şeker bağladığı belirlenmiştir ([18]. Laktoferrinin şeker olarak heksozları (özellikle de mannoz) ve heksozaminleri içerdiği tespit edilmiştir. İnek laktoferrininde bulunan karbonhidratlar N-asetil glukozamin, N-asetillaktozamin, galaktoz, fukoz, mannoz ve nöraminik asittir. Araştırmacılar, laktoferrinin proteolitik enzimlere ve düşük pH'lara karşı dirençli olmasının temel nedeninin yüksek glikolizasyon derecesi ile ilişkili olduğunu vurgulamaktadırlar [10, 20].

İnek ve insan sütü laktoferrinleri birbirlerine çok benzemektedir. Her iki sütteki laktoferrinler, demiri bağlama kapasiteleri ve aminoasit bileşimi açısından büyük bir farklılık göstermezler. İnek ve insan sütündeki laktoferrinin yapısal (3 boyutlu yapısı) ve biyokimyasal özelliklerinde farklılıklar bulunduğu halde, hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda biyoaktivitelerinin oldukça benzerlikler gösterdiği saptanmıştır [10, 25].

## LAKTOFERRİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ

Laktoferrinin demir bağlama yeteneğinin yüksek olması ve bu yeteneğini transferin ailesi içinde geniş bir pH aralığında özellikle de çok düşük pH değerlerinde gösterebilen tek protein olması, proteolize karşı oldukça dayanıklı olması, net pozitif yüklü olması ve birçok dokuda bulunması ona çok sayıda fonksiyonel özellik kazandırmaktadır [17, 25-27]. Laktoferrin doğal bağışıklıkta rol oynadığı gibi antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioksidant, antikanserijen, kemik sağlığını iyileştirici, bağırsakta demir absorpsiyonunu düzenleyici, antienflamatuar, immünomodulasyon ve hücre gelişiminin kontrolü özelliklerine sahiptir. Ayrıca lipopolisakkarit ve glikozaminoglukan gibi bazı biyoaktif bileşikleri bağlama ve inhibe etme de dahil olmak üzere oldukça fazla biyolojik aktivite göstermektedir (Şekil 1) [28-32].

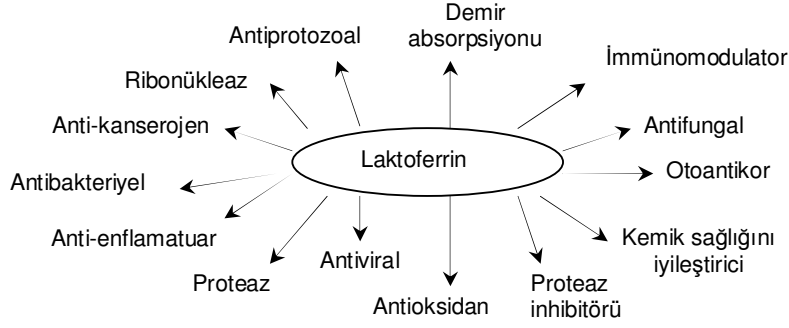
### Laktoferrinin Antibakteriyel Aktivitesi

Laktoferrinin bakteriler üzerindeki inhibitör etkisi bakteriyostatik ve/ya bakteriyosidal olabilir. Gram-negatif (*Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhimurium*) ve pozitif bakterilere (*Streptococcus mutans*) karşı bakteriyostatik aktivitesini demir atomunu bağlayarak göstermektedir. Patojenler de dahil olmak üzere birçok bakteri gelişebilmeleri için demire ihtiyaç duymaktadır. Apo-laktoferrin bakteriyel gelişme için gerekli olan demiri şelatlayıp bakteriler tarafından kullanılamaz duruma getirerek bakterilerin gelişimini durdurmaktadır. Laktoferrin Gram-negatif bakterilere (*E. coli*, *S. Typhimurium*) karşı bakteriyel etkisini ise Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit tabakasının lipit A kısmıyla interaksyona girerek göstermektedir (Şekil 2). Laktoferrinin N-terminali lipit A kısmı ile interaksyona girmektedir. Böylece lipopolisakkaritin ayrılmasına, dış membran stabilitesinin bozulmasına ve geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Bu inhibitör etkinin ortama  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonları ilave edildiği zaman yok olduğu belirlenmiştir. Laktoferrin Gram-pozitif bakterilere karşı bakteriyel aktivitesini ise bazı bakterilerin (örneğin *Micrococcus luteus*) yüzeyinde bulunan lipomannan veya yüzey proteinlerine (örneğin *Clostridium perfringens*) tutunarak göstermektedir [34-39]. Ayrıca Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini hücre duvarında bulunan taykoik asitlerle reaksiyona girmek suretiyle de gösterebilmektedir (Şekil 2) [40]. Demir şelatlayıcı özelliği ile laktoferrinin bakterilerin biyofilm oluşturmasını önlediği de belirlenmiştir [41, 42]. Laktoferrinin antibakteriyel aktivitesi konsantrasyonuna, ortamdaki diğer minerallerle interaksyonuna ve demirle doymuşluk

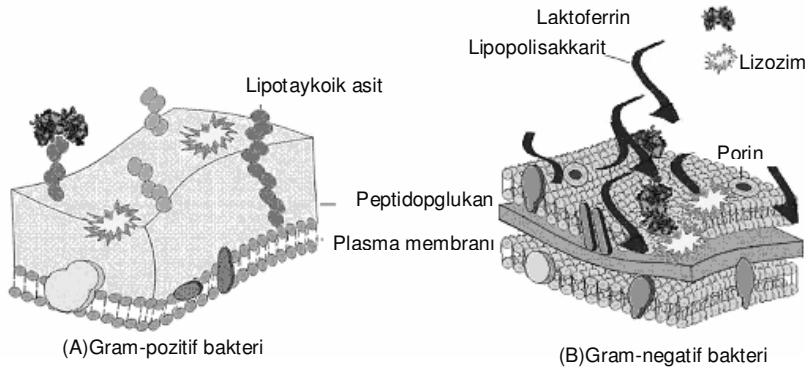
dercesine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle laktoferrinin antimikrobiyal etkinliği diğer makromoleküllerin bağlanması ve demirle doygun olduğu durumlarda azalmakta, diğer antimikrobiyal proteinlerle (lizozim) birlikte bulunması durumunda ise artmaktadır (sinerjistik etki) [16].

Laktoferrin serin proteaz aktivitesine sahip olup proteinlerin arjinince zengin kısmını parçalayabilmektedir. Laktoferrin birçok bakterinin virülans faktörlerini serin proteaz aktivitesi ile parçalayarak antibakteriyel aktivite gösterebilmektedir. Laktoferrin *Haemophilus influenzae*'nin patojenesini kolonizasyon faktörlerini (IgA1, proteaz protein ve Hap adhesin) parçalayıp apoptose neden olarak göstermektedir [43, 44]. Ayrıca laktoferrin *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ve *Shigella flexneri* gibi intraselüler invaziv patojenlerin invaziv plasmid antijenlerinin parçalanmasını tetikleyerek de (böylece bakteriyel virülansların salgılanmasında rol oynayan bakteriyel tip III salgılama sisteminin inaktivasyonuna neden olmaktadır) inhibisyona yol açmaktadır [45-48]. Laktoferrinin bakterilerin konakçı hücreye tutunmasını, kolonize olmasını ve hücre içine girmesini de önlediği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Laktoferrinin bu etkisi, tam olarak bilinmese de laktoferrin oligomannosid glikanlarının konakçı hücrenin reseptörleri ile interaksyona giren bakteri adhesinlerine bağlanarak gerçekleştirildiği belirtilmektedir [49-52].

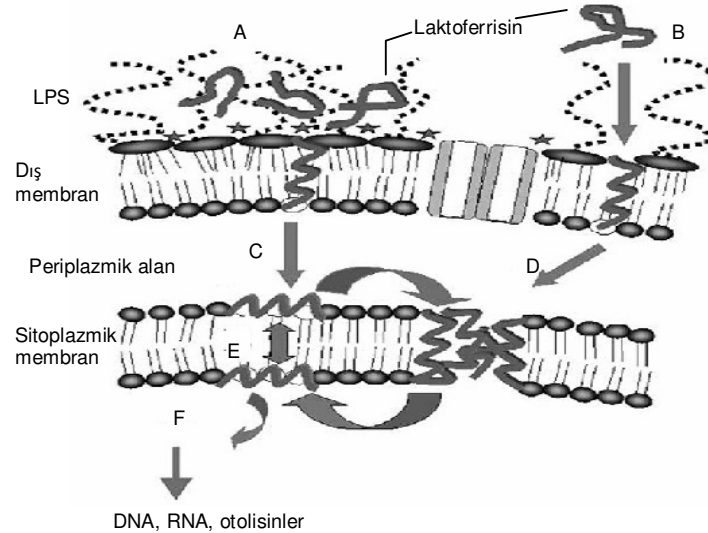
Laktoferrinin antimikrobiyal aktivitesinin pepsin ile hidrolizinden sonra arttığı belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivitedeki artışın temel nedeni enzimatik parçalanma esnasında açığa çıkan biyoaktif peptid olan laktoferrisinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Laktoferrisin inek sütü laktoferrininin N-terminalinde 18-42. aminoasitleri içeren 25 aminoasitlik kısımdır. Laktoferrisin molekülü iki globüler üniteye katlanmakta ve her biri bir tane demir iyonu ( $Fe^{3+}$ ) bağlayabilmektedir [53]. Laktoferrisinin önemli özelliklerinden birisi yüksek oranda ve asimetrik olarak kümelenmiş bazik aminoasit içermesidir. 25 aminoasidin 8'i bazik karakterli olup bunların 6'sı  $\alpha$ -heliks yapıdaki N-terminalinde bulunmaktadır. Laktoferrisinin bakteri, maya ve virüslere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, hatta bu etkisinin laktoferrine göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Laktoferrisinin antimikrobiyal aktivitesi sahip olduğu net pozitif yükten kaynaklanmaktadır. Katyonik, amfiyotik ve  $\alpha$ -heliks yapılar vasıtasıyla laktoferrisin hücre membranında iyon kanalları oluşturup membran geçirgenliğini artırarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Şekil 3) [16].



Şekil 1. Laktoferrinin biyoaktif veya fonksiyonel özellikleri [16, 33].



Şekil 2. Laktoferrinin antibakteriyel aktivitesinin mekanizması. (A) Gram-pozitif bakteri: Laktoferrin hücre duvarında negatif yüklü moleküllerle örneğin lipotaykoik asitle reaksiyona girerek hücre duvarının yükünü nötralize eder ve lizosim gibi diğer antimikrobiyal bileşiklerin etkisini artırır. (B) Gram-negatif bakteri: Laktoferrin lipopolisakartın lipit A kısmı ile reaksiyona girerek membran stabitesini ve geçirgenliğini zarar verir [17].



Şekil 3. Laktoferrinin antimikrobiyal etki mekanizması. Laktoferrisin dış membranın negatif yüklerine bağlanır (A) veya dış membrandaki lipopolisakkarit ile membranın hidrofobik kısmına bağlanarak (B) dış membran stabilitesini bozar. Dış membranı geçtikten sonra negatif yüklü sitoplazmik membranın yüzeyine bağlanır ve yerleşir (C). Membran içine girerek gözenek oluşturabilir (D) veya membranın diğer yüzeyine geçer (E) ve sitoplazmada DNA ve RNA gibi negatif yüklü moleküllerle (F) interaksiyona girebilir [16].

İnek sütü laktoferrininin N1 domaininden açığa çıkan laktoferrampinin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Hatta laktoferrampinin kandidasidal aktivitesinin laktoferrine göre daha yüksek olduğu ve *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ile *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok bakteriye karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Laktoferrampinin laktoferrisine yakın bir bölgede yer aldığı ve laktoferrinin hücre membranına yerleşmesinde esas rolü oynadığı belirtilmektedir [54].

Laktoferrin ve laktoferrisin; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteria*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio anguillarum*, *Salmonella Typhimurium*, *Neisseria* ve *Moraxella* spp. de dahil olmak üzere 30'dan fazla patojen bakteriyi ve hatta bazı virüsleri inhibe etmektedirler [39, 47, 55, 56]. Ancak laktoferrinin probiyotik aktiviteye sahip *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus*'un membran yüzeyinde bulunan spesifik protein reseptörlerine bağlanarak demir iyonların alımını sağladığından gelişimlerini teşvik ettiği [57, 58] ve böylece kolon kanseri oluşumunu engelledikleri belirtilmektedir [59]. Ayrıca düşük miktarlarda demir iyonuna ihtiyaç duyan, mide ve bağırsaklarda doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerine de etki etmemektedirler [60].

### Laktoferrinin Antifungal Aktivitesi

Laktoferrinin ortamda bulunan demiri bağlama ve şelatlama yeteneğine bağlı olarak *Candida* türlerine karşı antifungal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir [61]. Laktoferrin ve onun biyoaktif peptidi laktoferrisinin insan patojeni *Candida albicans* ve diğer *Candida* türlerine karşı antikandisidal aktivitesi birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Laktoferrin ve laktoferrisinin antikandisidal aktivitesini *Candida* hücrelerine direkt olarak bağlanıp hücre duvarına zarar vererek ve sitoplazmik membran geçirgenliğinde değişime neden olarak gösterdiği belirlenmiştir [61-64]. Laktoferrinin *Candida* türlerine karşı antifungal aktivitesi suş spesifik olup en yüksek aktiviteyi *C. tropicalis*'e karşı gösterdiği ve bunu *C. krusei*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın takip ettiği belirlenmiştir [38].

In vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda laktoferrinin parazit funguslardan *Trichophyton* ve *Pneumocystis carinii* türlerine [65-67] ve *Aspergillus fumigatus*'a karşı da etkili olduğu saptanmıştır [68].

### Antiviral Aktivitesi

Laktoferrin, insan ve hayvanları enfekte eden birçok RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral etkiye sahiptir. Zarflı virüslerden herpes simplex 1 ve 2, insan sitomegalovirüs [69], HIV [70], hepatit B [71], hepatit C

[72], hantavirüs [73] ile HIV [74]; zarfsız virüslerden ise adenovirüs [75], rotavirüs [76], poliovirüs [77] ve enterovirüs 71'e [78, 79] karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Laktoferrin ve laktoferrisin antiviral aktivitelerini genellikle viral enfeksiyonun başlangıç aşamasında göstermektedir. Antiviral aktivitesini virüslere direkt bağlanarak veya virüsün konakçı hücreye bağlandığı spesifik ve spesifik olmayan reseptörlere bağlanarak gösterdiği belirtilmektedir (Şekil 4) [27, 80-82]. Antiviral etkisini ayrıca immün hücreler üzerindeki etkisiyle de ortaya koymaktadır [83]. Laktoferrin ve laktoferrisinin virüs partiküllerine veya viral reseptörlerine bağlanabilmesi bu proteine antiviral ilaçlar için selektif dağıtıcı olarak kullanılabilme olanağı sağlamaktadır [17, 84].

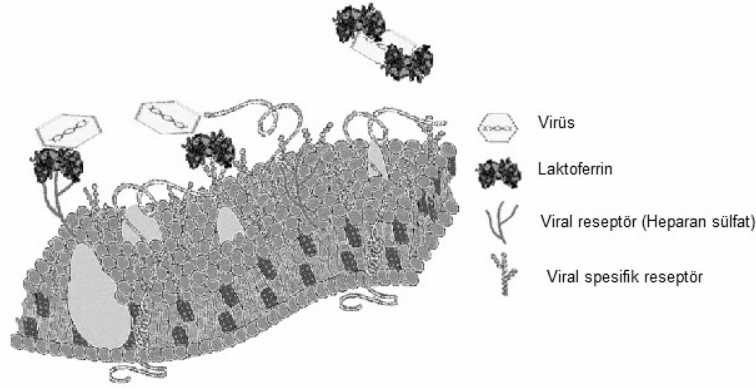
Yapılan çalışmalarda apo-laktoferrinin metal ile doygun olan holo-laktoferrine göre daha yüksek antiviral aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Nedeni tam olarak ortaya konulmasa da bu etkinin viral enzimlerin çoğunun kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duymalarından ileri geldiği belirtilmektedir. Diğer bir neden olarak da virüslerin hedef hücreye tutunma işlemi sırasında fazla miktarda  $Zn^{2+}$  gibi metallere ihtiyaç duymalarından kaynaklandığı ifade edilmektedir [16]. Ancak holo-laktoferrinin kompakt yapısından dolayı apo-laktoferrine göre ökaryotik hücrelerdeki viral reseptörlere karşı daha yüksek affiniteye sahip olduğu bildirilmektedir. İnek sütü laktoferrini insan sütü laktoferrine göre daha yüksek antiviral etkiye sahiptir. Laktoferrin türevli laktoferrisin ve diğer peptitlerin antiviral aktivitelerinin laktoferrine göre daha düşük olduğu belirtilmektedir [18, 55].

### Antiprotozoal Aktivitesi

Laktoferrinin *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* ve *Eimeria stiedai* gibi parazitik protozoolar üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Antiparazitik etkiyi protozooların hücre membranındaki lipitlere bağlanıp membranın stabilitesini bozarak, demiri şelatlayarak veya konakçı hücre ile interaksyonunu önleyerek gösterdiği bildirilmektedir [16, 80, 85-87]. Apo-laktoferrinin hololaktoferrine göre antiprotozoal aktivitesinin daha yüksek olduğu ifade edilmektedir [88].

### İmmün Sistem Üzerine Etkisi

Laktoferrin konakçı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların konakçı hücreye tutunmasını ve kolonize olup çoğalmasını önleyerek veya onları öldürerek etki göstermektedir [89, 90]. Laktoferrinin doğal (spesifik olmayan) ve sonradan kazanılan (spesifik immünite) immünite üzerinde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Pozitif yüklü laktoferrin immün sistemde bulunan birçok hücrenin yüzeyindeki negatif yüklü moleküllere bağlanarak aktivasyon, farklılaşma ve çoğalma gibi selüler yanıtlara neden olabilmektedir. Laktoferrin hücre çekirdeğine taşınabildiğinden burada DNA'ya bağlanarak farklı sistemleri de aktifleştirebilmektedir [18, 27].



Şekil 4. Laktoferrinin antiviral etki mekanizması. Laktoferrin viral partikülüne ve glikozaminoglikanlara, spesifik viral reseptörlere ve heparan sülfata bağlanarak virüsün konakçı hücreye girişini önler [17].

Demir bağlama yeteneğinden, hedef hücreler ve moleküllerle olan interaksyonundan dolayı laktoferrin immün sistemdeki hücreler ve antienflamatuvar reaksiyonda rol oynayan hücreler üzerine hem pozitif hem de negatif etkiye sahip olabilmektedir. Laktoferrin immün sistemdeki hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve aktifleşmesini sağlayarak immün yanıtı güçlendirebildiği gibi antienflamatuvar faktör olarak da rol oynayabilmektedir. Laktoferrin, bakteri hücre duvarındaki lipopolisakkaritlere veya reseptörlere bağlandığından inflamasyonun (iltihap, yangı) ilerlemesini ve buna paralel olarak pro-inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türlerinden dokunun zarar görmesini önleyebilmektedirler [22, 89]. Demir, reaktif oksijen türlerinin oluşumunda başlıca katalist olarak rol oynamaktadır. Laktoferrin inflamasyonun olduğu yerde lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkisini azaltabilmektedir [91].

Laktoferrin tumor nekrosis faktör (TNF $\alpha$ ) veya interlökinler IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi bazı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak koruyucu etkisini göstermektedir. Antienflamatuvar interlökin IL-10 miktarında bir artışa neden olduğu da tespit edilmiştir [92, 93]. Bakteriler fagositoz olurken laktoferrin polimnonükleoların bakterisidal aktivitelerini teşvik edebilmektedirler. Bu etkiyi hidroksil radikal üretimi için gerekli olan demiri bağlayarak göstermektedir [91].

Özetle, laktoferrin immün yanıtı iyileştirme ve aktive etme yeteneğine (i) makrofajları aktive ederek ve üretimini artırarak, (iii) doğal immün yanıtı aktive edip artırarak, (iii) bağırsak ve periferik spesifik immün yanıtı artırarak, (iv) bakterileri fagositoza karşı koruyan lipopolisakkarit tabakasını uzaklaştırarak, (v) sitokin üretimini kontrol ederek, (vi) doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini artırarak, (vii) sitotoksik etki gösteren hücreleri engelleyerek ve inflamasyonu azaltarak göstermektedir [14, 90, 94, 95].

#### Antioksidan Aktivitesi

Laktoferrin serbest demiri bağlayarak antioksidan aktivite göstermektedir. Demir hücre membranında

özellikle lipit peroksidasyonunda serbest radikallerin oluşumunu katalize etmektedir. Laktoferrin demiri bağlayarak aşağıda gösterilen Fenton reaksiyonunu önlemekte ve böylece serbest radikallerin oluşmasını engellemektedir [96].



Laktoferrinin antioksidan aktivitesi demir ile doygunluk derecesine bağlı olduğundan apo-laktoferrinin antioksidan aktivitesi çok yüksektir [97]. Antioksidan aktivitesinden dolayı laktoferrin, kanser ve damar sertliği gibi birçok hastalık riskinin azalmasına yardımcı olmaktadır [96, 98].

#### Antikanserojenik Aktivitesi

Laktoferrinin kolon, meme ve prostat gibi bazı kanserlere karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Antikarsinojenik etkisini (i) patojen mikroorganizmaların kolonizasyonu ve çoğalmasını, dolayısıyla kanserojenik madde ve enzim üretmelerini engelleyerek, (ii) hücrelerin aşırı bir şekilde çoğalmasını ve farklılaşmasını önleyerek, (iii) bağırsıklık sistemini aktive ederek, (iv) antikanserojenik sitokinlerin örneğin IL-18'in düzeyini artırarak, (v) doğal öldürücü hücreler (NK) ve CD8+ T-limfositleri aktive ederek ve (iv) lipit peroksidasyonunu önleyerek göstermektedir [99, 100, 101].

Laktoferrin alımına bağlı olarak kan ve limfatik dokuda doğal öldürücü hücrelerin (NK) ve limfosit CD4+ ve CD8+'ın sayılarının arttığı ve bu nedenle laktoferrinin tümör hücrelerinin gelişimine karşı önemli bir koruyucu faktör olarak rol oynadığı tespit edilmiştir [22].

#### Kemik Sağlığı ve Gelişimi Üzerine Etkisi

Laktoferrinin kemik gelişimini teşvik etme özelliğine sahip olduğu da ortaya konulmuştur. Bu etkisini kemik oluşturan hücrelerin (osteoblastlar) gelişimini teşvik ve kemiği bağlayan hücrelerin (osteoklastlar) gelişimini inhibe ederek gösterdiği belirlenmiştir. Bundan dolayı kemik erimesi hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde

laktoferrinin kullanılabilmesi belirlenmektedir [102, 103]. Direk etkisinin yanı sıra laktoferrin inflamasyon esnasında miktarı artan osteolitik sitokinlerin örneğin TNF $\alpha$  veya IL-1 $\beta$ 'nin inhibisyonuna neden olarak kemik hücrelerini etkileyebilmektedir. Böylece laktoferrin osseous dokunun stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır [22].

### Enzimatik Aktivitesi

Laktoferrinin serin proteaz, amilaz, DNAz, RNAz (ribonükleaz A) ve ATPaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Laktoferrinin farklı enzimatik aktivite göstermesinin nedeni tam olarak bilinmemesine karşın bunun proteinin doğasından yani farklı izoformlarının bulunmasından, glikolizasyonun derecesi, tersiyer yapısı (holo veya apo-laktoferrin) ve oligomerizasyon derecesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir. Örneğin apo-laktoferrin izoformu ribonükleaz aktivitesine sahiptir [17, 22].

### Laktoferrinin Güvenliği

Laktoferrinin gıda katkı maddesi olarak güvenli olduğu kabul edilmektedir. İnsanlar yüzyıllardır süt ve peynir (yaklaşık laktoferrin düzeyi 3 mg/g) gibi ürünleri tüketerek zaten doğal olarak laktoferrini almaktadırlar. Ayrıca Ame's, kromozom anormalite ve mikronükleus testleri sonucunda peyniraltı suyundan elde edilen saf laktoferrinin herhangi bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir [104]. Dört-onüç hafta süresince tek toz şeklinde ve maksimum 2 mg/kg/gün olacak şekilde farelere uygulanan oral doz toksite testi sonucunda da herhangi bir olumsuzluğa rastlanmamıştır [105]. İnek sütü laktoferrininin gıda katkısı olarak kullanımının güvenli (GRAS) olduğu Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından da kabul edilmektedir [31].

### LAKTOFERRİNİN GIDA VE DİĞER ENDÜSTRİLERDE KULLANIM ALANLARI

Laktoferrinin gösterdiği biyolojik aktivitelerden dolayı yüksek bir uygulama potansiyeline sahiptir. Günümüzde laktoferrin gıda, kozmetik, mama ve hayvan yemleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Tablo 2). Laktoferrinin özellikle farmasötik ve gıda ile ilgili uygulamaları son yıllarda oldukça ilgi görmeye başlamıştır. Fakat laktoferrinin insanlardaki metabolik olaylar üzerine etkisi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Laktoferrin, antimikrobiyal ve prebiyotik özelliklerinden dolayı çok fonksiyonlu gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir. Laktoferrinin

gıdalarda, bebek mamalarında, sporcu beslenmesinde kullanılan gıdalarda, sakızlarda ve ağız bakım ürünlerinde (diş macunu, ağız yıkama gargaralarında ve kozmetikte) katkı maddesi olarak kullanılması önerilmektedir [10, 31, 106, 107].

Laktoferrinin et ürünlerinde kullanılmasına Amerika Birleşik Devletlerinde izin verilmiştir [108]. Laktoferrin ve aktive edilmiş laktoferrinin (inek sütü laktoferrininin gıda kaynaklı bir glikozaminglikana örneğin galaktozca zengin polisakkarit veya karragenana immobilize edilmiş haline aktive edilmiş laktoferrin denilmektedir) et endüstrisi için uygun bir doğal koruyucu olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Laktoferrin katıldığı et ürününün rengini, kokusunu ve görünüşünü değiştirmemektedir [109]. Üretim anında ete kolayca uygulanan laktoferrin etin yüzeyinde kalarak üretim sonrası patojen ve bozulma etmeni bakterilerin gelişmesine de engel olmaktadır [110, 111]. Laktoferrinin Tekirdağ köftesinin mikrobiyal kalitesini iyileştirdiği [112], fermente et ürünlerinde laktoferrinin tek başına veya şelatlayıcı maddelerle birlikte kullanıldığında *E. coli* O157:H7 [113], Bologna sosiste *Carnobacterium viridans* [114], taze ette *Pseudomonas fluorescens*'in [115], *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium ve *Campylobacter jejuni*'nin gelişimini durdurduğu ve/veya inhibe ettiği belirlenmiştir [111]. İnek karkaslarına ağırlıkça %2 ve altında uygulandığında GRAS statüsünde olduğu ve karkas yüzeyine tutunan mikroorganizmaları etkili bir şekilde uzaklaştırdığı belirtilmektedir [116].

UHT sütte laktoferrinin tek başına, EDTA veya lizozim enzimi ile birlikte kullanıldığında *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas fluorescens* ve *Salmonella* Typhimurium gelişimini sınırlı düzeyde önlediği belirlenmiştir [117, 118]. UHT sütte laktoferrininin (2 -8 mg/ml) aynı konsantrasyondaki laktoferrine göre patojen bakteriler üzerinde daha etkili olduğu, laktoferrininin asitlendirilmiş (pH 4,0) ve buzdolabı koşullarında tutulan UHT sütte *L. monocytogenes*, *Salmonella* Stanley, *E. coli* O157:H7 ile *Staphylococcus aureus*'un gelişimini önlediği belirlenmiştir [119].

Laktoferrinin soya yağı tozunda doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlediği ve ürünün depolama ömrünü artırdığı belirlenmiştir [10]. Laktoferrin türevli biyoaktif peptidin şarapta bozulma etmeni *Dekkera bruxellensis* mayasının gelişimini önlediği ve dolayısıyla şarabın raf ömrünü artırdığı saptanmıştır [120].

Tablo 2. Laktoferrinin endüstride kullanıldığı alanlar [10, 31].

Ürün adı	Fonksiyonel özelliği
Süt esaslı bebek mamaları	Taklit anne sütlerinde patojenlere karşı direnci sağlamak
Süt ve yoğurt	Prebiyotik
Sağlık ürünleri	Hamile bayanlarda demir emilimini artırmak ve bağışıklık sistemine yardımcı olmak
Fonksiyonel gıda ve içecekler	Demir çözünürlüğü ve emilimini artırmak
Kozmetik (çilt bakım ürünleri)	Hijyen, antioksidant, nemlendirme
Ağız bakım ürünleri ve sakızlar	Ağız hijyenini iyileştirmek
Yem katkıları	Kedilerde virüs hassasiyetini yok etmek

## SONUÇ

Sütte doğal olarak bulunan laktoferrin hem içerdiği esansiyel aminoasitlerden dolayı beslenme açısından hem de sahip olduğu biyolojik aktivitelerden dolayı insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ayrıca gıdaların demirle zenginleştirilmesinde de önemli bir araç olarak kullanılabilme olanağını bulunmaktadır. Bundan dolayı gıda endüstrisinde doğal biyokoruyucu ve fonksiyonel gıda katkıları olarak kullanılabilme potansiyeli oldukça yüksektir.

## KAYNAKLAR

- [1] Etzel, M.R., 2004. Manufacture and use of dairy protein fractions. *The Journal of Nutrition* 134: 996S-1002S.
- [2] Smilowitz, J.T., Dillard, C.J., German, J.B., 2005. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. *Australian Journal of Dairy Technology* 60: 77-83.
- [3] Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18: 695-704.
- [4] Korhonen H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1: 177-187.
- [5] Masson, P.L., Heremans, J.F., 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 39B: 119-129.
- [6] Bennett, R.M., Kokocinski, T. 1987. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *British Journal of Haematology* 39: 509-21.
- [7] Lonnerdal B, Iyer S. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition* 15: 93-110.
- [8] Levay, P.F., Viljoen, M. 1995. Lactoferrin: A general review. *Haematologica* 80: 252-267.
- [9] Ward, P.P., Paz, E., Conneely, O.M., 2005. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2540-2548.
- [10] Steijns, J.M., van Hooijdonk, A.C., 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 84: S11-S17.
- [11] Connely, O.M., 2001. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition* 20(5 Suppl.): 389S-95S.
- [12] Sánchez, L, Calvo, M, Brock, J.H. 1992. Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood* 67 (5): 657-661.
- [13] Iyer, S., Lonnerdal, B., 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 47: 232-241.
- [14] Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinsky G.A., 2001. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)* 66: 1-7.
- [15] Troost, F.J., Steijns, J., Saris, W.H.M., Brummer, R.J.M., 2001. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *Journal of Nutrition*, 131: 2101-2104.
- [16] Farnaud, S., Evans, R.W., 2003. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology* 40: 395-405.
- [17] Gonzalez-Chavez, S.A., Arevalo-Gallegos, S., Rascon-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 301.e1-308.e8
- [18] Baker, E.D., Baker, H.M. 2009. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie* 91: 3-10.
- [19] van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Mericskay, M., DeBoer, H., Nuijens, J.H., 1997. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochemical Journal* 328: 141-151.
- [20] van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., de Boer, H. A., Nuijens, J.H., 1995. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins can both bind iron and have identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibility towards tryptic proteolysis. *Biochemical Journal* 312: 107-114.
- [21] Kanyshkova, T.G., Semenov, D.V., Boneva, V.N., Nevinsky, G.A. 1999. Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Letters* 451: 235-237.
- [22] Fleet, J.C., 1995. New role for lactoferrin: DNA-binding and transcription activation. *Nutrition Reviews* 53: 226-227.
- [23] Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M., 2008. Lactoferrin: a review. *Veterinari Medicina* 53: 457-468.
- [24] Vegarud, G.E., Langsrud, T., Svenning, C., 2000. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition* 84: 1896-1903.
- [25] Wally, J., Buchanan, S.K., 2007. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *BioMetals* 20: 249-262.
- [26] Aisen P, Leibman A. 1972. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta* 257: 314-23.
- [27] García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2011. Lactoferrin a multiple bioactive protein. *Biochimica et Biophysica Acta* (in press).
- [28] Baveye, S., Ellass, E., Mazurier, J., Spik, G., Legrand, D., 1999. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37: 281-286.
- [29] Chierici, R., 2001. Antimicrobial actions of lactoferrin. *Advances in Nutritional Research*, 10: 247-269.
- [30] Aguila, A.O., Brock, J.H., 2001. Lactoferrin: Antimicrobial and diagnostic properties. *Biotechnologia Aplicada* 18: 76-83.
- [31] Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M., 2006. Lactoferrin research, technology and



- applications. *International Dairy Journal* 16: 1241–1251.
- [32] Naot, D., Chhana, A., Matthews, B.G., Callon, K.E., Tong, P.C., Lin, J.M., Costa, J.L., Watson, M., Grey, A.B., Cornish, J., 2011. Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in osteoblasts. *Bone* 49: 217–224.
- [33] Brock, J.H., 2002. The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology* 80: 1–6.
- [34] Ellison, R.T., Giehl, T.J., LaForce, F.M., 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity* 56, 2774–2781.
- [35] Shi Y, Kong W, Nakayama K., 2000. Human lactoferrin binds and removes the hemoglobin receptor protein of the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 30002-30008.
- [36] Brandenburg, K., Jurgens, G., Muller, M., Fukuoka S, Koch MH., 2001. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biological Chemistry* 382 (8): 1215-1225.
- [37] Al-Nabulsi, A.A., Holley, R.A., 2005. Effect of bovine lactoferrin against *Carnobacterium viridans*. *Food Microbiology* 22: 179–187.
- [38] Jenssen, H., Hancock, R.E.W., 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91: 19-29.
- [39] Ochoa, T.J., Cleary, T.G. 2009. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 91: 30-34.
- [40] Wang, H., Hurley, W.L., 1998. Identification of Lactoferrin Complexes in Bovine Mammary Secretions During Mammary Gland Involution. *Journal of Dairy Science* 81: 1896-1903.
- [41] Weinberg, E.D., 2004. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Medical Hypotheses* 63: 863–865.
- [42] Berlutti, F., Morea, C., Battistoni, A., Sarli, S., Cipriani, P., Superti, F., Ammendolia, M.G., Valenti, P., 2005. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18: 661-670.
- [43] Plaut, A.G., Qiu, J., St Geme, J.W., 2000 Human lactoferrin proteolytic activity: analysis of the cleaved region in the IgA protease of *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* 8: S148–152.
- [44] Hendrixson, D.H., Qiu, J., Shewry, S.C., Fink, D.L., Petty, S., Baker, E.N., Plaut, A.G., St. Geme III J.W., 2003. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. *Molecular Microbiology* 47: 607–617.
- [45] Longhi C, Conte MP, Seganti L *et al.* 1993 Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells. *Medical Microbiology and Immunology (Berl)* 182: 25–35.
- [46] Conte, M.P., Longhi, C., Petrone, G., Buonfiglio, V., Di Santo, S., Seganti, L., Valenti, P., 1999. The anti-invasive effect of bovine lactoferrin requires an interaction with surface proteins of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 12: 149–155.
- [47] Gomez, H.F., Ochoa, T.J., Carlin, L.G., Cleary, T.G., 2003. Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *The Journal of Infectious Diseases* 187: 87-95.
- [48] Ochoa, T.J., Cleary, T.G., 2004. Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *BioMetals* 17: 257–260.
- [49] Ochoa, T.J., Noguera-Obenza, M., Cleary, T.G. 2004. Lactoferrin blocks the initial host cell attachment mechanism of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 554: 463-466.
- [50] Bessler, H.C., de Oliveira, I.R., Giugliano, L.G. 2006. Human milk glycoproteins inhibit the adherence of *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. *Microbiology and Immunology* 50: 877-882.
- [51] Roseanu, A., Florian, P., Condei, M., Cristea, D., Damian, M. 2010. Antibacterial activity of lactoferrin and lactoferricin against oral Streptococci. *Romanian Biotechnological Letters* 15: 5788–5792.
- [52] Wakabayashi, H., Kondo, I. 2010. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. *BioMetals* 23, 419–424.
- [53] Jones, E.M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L., Millar, M.R., 1994. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *Journal of Applied Microbiology* 77: 208-214.
- [54] van der Kraan, M.I.A., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E.C.I., Bolscher, J.G.M., Nieuw Amerongen, A.V., 2004. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 25: 177–183.
- [55] Pan, Y., Lee, A., Wan, J., Coventry, M.J., Michalski, W.P., Shiell, B., Roginskia, H., 2006. Antiviral properties of milk proteins and peptides. *International Dairy Journal* 16: 1252–1261.
- [56] Lygren, B., Sveier, H., Hjeltnes, B., Waagbø, R., 1999. Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. *Fish Shellfish Immunology* 9: 95–107.
- [57] Petschow, B.W., Talbott, R.D., Batema, R.P., 1999. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology* 48: 541-549.
- [58] Kim, W.S., Ohashi, M., Tanaka, T., Kumura, H., Kim, G.Y., Kwon, I.K., Goh, J.S., Shimazaki, K., 2004. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *BioMetals* 17: 279–283.
- [59] Tsuda, H., Sekine, K., Takasuka, N., Toriyama-Baba, H., 2000. Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovine lactoferrin in animals. *Biofactors*, 12, 83-88.

- [60] Losnedahl, K.J., Wang, H., Alsam, M. 1996. Antimicrobial proteins in milk. *Journal of Dairy Science* 84: 1123-1127.
- [61] Valenti, P., Visca, P., Antonini, G., Orsi, N., 1986. Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. *FEMS Microbiology Letters* 33: 271–275.
- [62] Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M., 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin b, a potent bactericidal peptide derived from the n-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 472-479.
- [63] Wakabayashi, H., Abe, S., Okutomi, T., Tansho, S., Kawase, K., Yamaguchi, H., 1996. Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiology and Immunology* 40: 821–825.
- [64] Xu, Y.Y., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., Nikawa, H., 1999. In vitro susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. *Medical Mycology* 37: 35–41.
- [65] Wakabayashi, H., Uchida, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Yamaguchi, H., 2000. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 595–601.
- [66] Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K *et al.* 2002. Effect of lactoferrin feeding on the host antifungal response in guinea-pigs infected or immunised with *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Medical Microbiology* 51: 844–850.
- [67] Cirioni, O., Giacometti, A., Barchiesi, F., Scalise, G., 2000. Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 46, 577–582.
- [68] Zarembek, K.A., Sugui, J.A., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Gallin, J.I., 2007. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *Journal of Immunology* 178: 6367-6373.
- [69] Hasegawa, K., Mutsuchi, W., Tanaka, S., Dosako, S., 1994. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 47: 73–85.
- [70] Harmsen, M. C., P. J. Swart, M. P. de Béthune, R. Pauwels, E. de Clercq, T. H. The, and D. K. F. Meijer. 1995. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 380-388.
- [71] Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K., Sekihara, H., 2002. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Research* 24: 228.
- [72] Ikeda, M., Nozakia, A., Sugiyama, K., Tanaka, T., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K., Saito, M., Kato, N., 2000. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Research* 66: 51–63.
- [73] Murphy M. E., Kariwa H., Mizutani T., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I., 2000. In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Archives of Virology* 145: 1571–1582.
- [74] Legrand, D., Vigie, K., Said, E.A., Ellass, E., Masson, M., Slomianny, M.C., Carpentier, M., Briand, J.P., Mazurier, J., Hovanessian, A.G., 2004. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *European Journal of Biochemistry* 271: 303–317.
- [75] Arnold D., Di Biase A. M., Marchetti M., Pietrantonio A., Valenti P., Seganti L. et al., 2002. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Research* 53: 153-158.
- [76] Superti, F., Ammendolia, M.G., Valenti, P., Seganti, L., 1997. Antiviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology (Berl)* 186: 83-91.
- [77] Marchetti, M., Superti, F., Ammendolia, M.G., Rossi, P., Valenti, P., Seganti, L., 1999. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese-, and zinc-saturated lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology (Berl)* 187: 199–204.
- [78] Lin, T.Y., Chu, C., Chiu, C.H., 2002. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells in vitro. *Journal of Infection Disease* 186 (8): 1161-1164.
- [79] Seganti, L., Di Biase, A.M., Marchetti, M., Pietrantonio, A., Tinari, A., Superti, F., 2004. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals* 17: 295–299.
- [80] Orsi N., 2004. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 17, 189–196.
- [81] Andersen H.J., Jenssen H., Sandvik K., Gutteberg T.J., 2004. The anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulfate at the cell surface. *Journal of Medical Virology* 74: 262–271.
- [82] Jenssen, H. 2005. Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin e an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (24): 3002-3013.
- [83] van Hooijdonk, A.C.M., Kussendrager, K.D., Steijns, J.M., 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition* 84: S127–S134.
- [84] van der Strate, B.W.A., Belijaars, L., Molema, G., Harmsen, M.C., Meijer, D.K., 2001. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research* 52: 225–239.
- [85] Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Yamauchi, K., Uzaka, Y., Tanabe, S., Sarashina, T., Mikami, T., 2001. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria*

- stedei* sporozites by treatment with bovine lactoferrin. *Journal of Veterinary Medicine Science* 63: 187–190.
- [86] Katarzyna, D., Bożena, D., Jarosław, D., Henryka, D., 2007. *Toxoplasma gondii*: inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. *Polish Journal of Microbiology* 56: 25–32.
- [87] López-Soto, F., León-Sicaños, N., Nazmi, K., Bolscher, J.G., de la Garza, M. 2010. Microbicidal effect of the lactoferrin peptides lactoferricin 17–30, lactoferrampin 265–284, and lactoferrin chimera on the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biometals* 23: 563–568.
- [88] Ikada, H., Tanaka, T., Shibahara, N., 2005. Short report: inhibitory effect of lactoferrin on in vitro growth of *Babesia caballi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 710–712.
- [89] Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. 2005. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2549–2559.
- [90] Valenti, P., Antonini, G., 2005. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2576–2587.
- [91] Ward, P.P., Uribe-Luna, S., Conneely, O.M., 2002. Lactoferrin and host defense. *The Biochemistry and Cell Biology* 80: 95–102.
- [92] Machnicki M., Zimecki M., Zagulski T., 1993. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *International Journal of Experimental Pathology* 74: 433–439.
- [93] Haversen L., Ohlsson B.G., Hahn-Zoric M., Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I., 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular Immunology*, 220: 83–95.
- [94] Puddu, P., Valenti, P., Gessani, S., 2009. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie* 91, 11-18.
- [95] Puddu, P., Latorre, D., Valenti, P., Gessani, S. 2010. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals* 23(3): 387-97.
- [96] Belizi, S., Nazarova, I.A., Klimova, I.A., Prokof'ev, V.N., Pushkina, N.V., 1999. Antioxidant Properties of lactoferrin from human milk. *Biophysics and Biochemistry* 5: 471-473.
- [97] Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M., Hayasawa, H., 1999. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 955-957.
- [98] Ye, X.Y., Wangb, H.X., Liuc, F., Nga, T.B. 2000. Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 32: 235-241.
- [99] Farley, J., Loup, D., Nelson, M., Mitchell, Esplund, G., Macri, C., Harrison, C., Gray, K., 1997. Neoplastic transformation of the endocervix associated with down regulation of lactoferrin expression. *Molecular Carcinogenesis* 20: 240–250.
- [100] Sekine, K., Watanabe, E., Nakamura, J., Takasuka, N., Kim, D.J., Asamoto, M., Krutovskikh, V., Baba, T.H., Ota, T., Moore, M.A., Masuda, M., Sugimoto, H., Nishino, H., Kakizoe, T., Tusda, H., 1997. Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 88, 523–526.
- [101] Wang, W.P., Iigo, M., Sato, J., Sekine, K., Adachi, I., Tsuda, H. 2000. Activation of mucosal intestinal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:1022–7.
- [102] Cornish, J., 2004. Lactoferrin promotes bone growth. *Biometals* 17: 331–335.
- [103] Cornish, J., Palmano, K., Callon, K.E., Watson, M., Lin, J.M., Valenti, P., Naot, D., Grey, A.B., Reid, I.R. 2006. Lactoferrin and bone; structure–activity relationships. *Biochemistry of Cell Biology*, 84: 297–302.
- [104] Yamauchi, K., Toida, T., Kawai, A., Nishimura, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H. 2000a. Mutagenicity of bovine lactoferrin in reverse mutation test. *Journal of Toxicological Science* 24: 63–66.
- [105] Yamauchi, K., Toida, T., Nishimura, S., Nagano, E., Kusuoka, O., Teraguchi, S., et al. 2000b. 13-week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food and Chemical Toxicology* 38: 503–512.
- [106] Morinaga Milk Industry CO., Ltd. 2003. Biological Functions of Lactoferrin: Basic Research and Applications. Fourth edition.
- [107] Marnila, P., Korhonen, H. 2009. Lactoferrin for human health. In: Dairy-derived ingredients: Food and Nutraceutical Uses. Edited by M. Gorredig, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 290-307p.
- [108] USDA-FSIS 2008. Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products. FSIS Directive 7120.1 Amendment 15. United States Department Of Agriculture Food Safety And Inspection Service Washington, DC.
- [109] Naidu, A.S., 2000. Lactoferrin. In: Natural Food Antimicrobial Systems. Edited by A.S. Naidu, CRC press, Boca Raton FL, 19–102 p.
- [110] Naidu, A.S., 2002. Activated lactoferrin - A new approach to meat safety. *Food Technology* 56 (3): 40–45.
- [111] Naidu, A.S., Tulpinski, J., Gustilo, K., Nimmagudda, R., Morgan J.B., 2003. Activated lactoferrin. *AGROFood Industry Hi-Tech*, 1-10.
- [112] Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B., Aksu, H., 2008. The effect of nisin and bovine lactoferrin on the microbiological quality of Turkish-style meatball (Tekirdağ Köfte). *Journal of Food Safety* 28, 355–375.
- [113] Al-Nabulsi, A.A., Holley, R.A., 2007. Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *International Journal of Food Microbiology* 113: 84–91.

- [114] Al-Nabulsi, A.A., Ran, J.H., Liu, Z.Q., Rodrigues-Vleira, E.T., Holley, R.A., 2006. Temperature-sensitive microcapsules containing lactoferrin and their action against *Carnobacterium viridans* on Bologna. *Journal of Food Science* 71 (6): M208–M214.
- [115] Del Olmo, A., Morales, P., Nunez, M., 2009. Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *Journal of Food Protection* 72 (4): 760–765.
- [116] Taylor, S., Brock, J., Kruger, C., Berner, T., Murphy, M., 2004. Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: 12–24.
- [117] Payne, K.D., Davidson, P.M., Oliver, S.P., Christen, G.L., 1990. Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53: 468–472.
- [118] Payne, K.D., Oliver, S.P., Davidson, P.M. 1994. Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* 57: 62–65.
- [119] Murdock, C.A., Matthews, K.R., 2002. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. *Journal of Applied Microbiology* 93: 850–856.
- [120] Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology* 127: 229–234.
-