

BİYOAKTİF BİR GLİKOPROTEİN OLAN LAKTOFERRİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Gülcan AVCI

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Afyon

ÖZET

Laktoferrin 75.000 ile 80.000 Dalton molekül ağırlığına sahip tek zincirli bir polipeptid olup transferrin ailesinin biyoaktif bir glikoproteindir. Laktoferrin sütte ve memelilerin vücut sıvılarında bulunan çok fonksiyonlu proteinlerden biridir. Laktoferrinin biyolojik özelliklerinin bir çoğu demir bağlaması ile ilişkilidir. Bununla birlikte antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere de sahiptir. Sığır laktoferrini günümüzde uygun demir dağılımı, insan sütünün taklit edilmesi ve hastalıklara karşı doğal savunmaya yardımcı olması gibi amaçlarla ticari ürünlerde kullanılmaktadır. Ayrıca bebek maması, gıda, kozmetik ve tıbbi bakım alanlarında da yer almaktadır. Bu nedenle çalışmada laktoferrinin yapısı, biyokimyasal ve teknolojik özellikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Demir Bağlayan Glikoprotein, Laktoferrin, Kesilmiş Süt Proteinleri.

THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LACTOFERRIN, BIOACTIVE GLYCOPROTEIN

ABSTRACT

Lactoferrin, a bioactive glycoprotein of the transferrin family, consists of a single polypeptide chain with a molecular weight of 75,000 to 80,000 Daltons. Lactoferrin, one of the many multifunctional proteins in milk, is also found in other secretory fluids of mammals. Most of the proposed biological activities of lactoferrin are related to the binding of iron, but non-iron related functions have been described as well antibacterial, antiviral, antiinflamatuvar and antioxidant properties. Bovine lactoferrin is currently used in commercial products targeting at optimal iron delivery, mimicking human breast milk or boosting the natural defence against infections and its application in infant formulas, foods, nutritional supplements, cosmetic and medical care. Therefore, we have given information about structure, biochemical and technological properties of lactoferrin in this study.

KeyWords: Iron-Binding Glycoprotein, Lactoferrin, Whey Proteins.

1.GİRİŞ

Sorensen ve ark.[1] 1939 yılında, inek sütünde bulunan ve serum transferrinine benzerliği olan kırmızı bir protein fraksiyonu tanımlanmıştır. Bu protein 1961 yılında Blanc ve Isliker [2] tarafından “Laktoferrin” olarak adlandırılmıştır. İlk kez süttten elde edildiği için bu isimle anılan laktoferrin sadece süte özgü bir protein değildir [3]. Laktoferrin meme bezi epitel hücreleri, gözyaşı bezi, tükrük bezi, bronşiyal bezlerin epitel hücreleri, seminal veziküller, endometriyum mukoza hücreleri ve böbrek tubul hücreleri tarafından salgılanmaktadır [4,5]. Ayrıca eklem sıvısı, pankreas salgıları ve safra gibi birçok ekzokrin sıvılarda [3] ve heterofilik lökosit granüllerinde yoğun olarak bulunmaktadır [5]. Laktoferrinin plazmadaki miktarı süttekine oranla önemli ölçüde düşük seviyededir [3]. Plazma laktoferrini yangısal reaksiyonlar boyunca nötrofiller tarafından sentezlenip salınan laktoferrinden köken almaktadır [6].

2. TÜR FARKLILIKLARI VE MİKTARI

Süt laktoferrin miktarı türler arasında büyük oranda farklılık göstermektedir. İnsan ve diğer primatlar ile domuz ve fare sütünde laktoferrin seviyesi yüksek olmasına karşın, inek ve diğer gevişgetirenlerin sütünde çok düşüktür. Süt laktoferrin seviyesi düşük olan türlerde ise, süt transferrin seviyesi yüksektir. Böylece sütteki demir miktarına bağlı olarak birçok farklı türün sütünde hem transferrin hem de laktoferrinin birlikte bulunduğu görülmektedir [5]. Rat ve tavşan gibi bazı türlerin sütleri laktoferrinden yoksun olup bunun yerini transferrin almaktadır. Köpek sütü, demir bakımından çok zengin olmasına karşın transferrin miktarı oldukça düşüktür ve aynı zamanda laktoferrin bulunmaz [5].

Tablo 1. Biyolojik sıvılarda laktoferrin miktarları (6).

Biyolojik sıvılar	Miktar
İnsan kolostrumu	7 mg/ml
İnsan sütü	1-2 mg/ml
Gözyaşı	2.2 mg/ml
Seminal plazma	0.4-1.9 mg/ml
Eklem sıvısı	10-80 µg/ml
Tükrük	7-10 µg/ml
İnek kolostrumu	1.5 mg/ml
İnek sütü	20-200 µg/ml

Laktasyon süresince Ankara Keçileri’nde süt ve serum laktoferrin miktarının ELISA ile belirlendiği çalışmada, süt laktoferrin düzeyleri ortalama 39,43-63,97 µg/ml arasında değişim gösterirken, serum laktoferrin düzeyleri ortalama 2,17-3,08 µg/ml arasında bulunmuştur. Laktasyon periyodu

boyunca Ankara Keçileri'ndeki süt ve serum laktoferrin düzeyleri yüksek bireysel farklılıklar göstermiştir [7]. Masson ve Heremans [5]'in insan, domuz ve kobayda laktasyon periyodu boyunca süt ve kolostrum düzeylerinde tespit ettiği değişimler Ankara Keçileri'nde gözlenmemiştir. Çalışmadan elde edilen serum laktoferrin ile süt laktoferrin düzeyleri bugüne kadar yapılan çeşitli hayvanlardaki süt ve serum laktoferrin düzeylerine göre oldukça düşük değerlerde bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen düşük süt ve serum laktoferrin düzeylerinin sebebi Ankara Keçileri'nin esas olarak tiftik üretimine yönelik yetiştirilmesiyle ilgili olabilir. Ankara Keçileri'nde 2 aylık periyot boyunca yavruların annesini emmesi dışında süt sağımı yapılmamıştır [7]. Nitekim Tsuji ve ark. [8]'nin verim yönleri ve ırkları farklı sığırlarda kolostrum laktoferrin miktarını ölçtükleri çalışmada süt sığırlarında kolostrum laktoferrin miktarı ortalama 2 mg/ml iken et sığırlarında 0,5 mg/ml bulunmuştur. Kolostrumdaki laktoferrin miktarı süt sığırlarında laktasyon sayısından etkilenirken, et sığırlarında etkilenmediği gözlenmiştir. Çok doğum yapmış dolayısıyla laktasyon sayısı yüksek süt sığırlarındaki laktoferrin miktarı 1. laktasyondaki süt sığırlarına göre 2-3 kat yüksek bulunmuştur. Farklı ırk etçi sığırlar arasında laktoferrin miktarlarındaki değişim çok düşük gözlenmiştir. Hayvanların yarısında laktoferrin düzeyi hemen hemen sıfır değerine yakın bulunmuştur.

Tablo 2. Farklı türlerde süt laktoferrin, transferrin ve demir miktarları (13).

	>2 mg/ml	0.2-2 mg/ml	20-200 µg/ml	<50 µg/ml
Laktoferrin	İnsan	Kobay, fare, kısırak	İnek, keçi, domuz	Tavşan, rat, köpek
Transferrin	>2 mg/ml	0.2-2 mg/ml	20-200 µg/ml	<50 µg/ml
	Tavşan(11), rat	Kobay, fare	İnek, keçi, domuz, kısırak	İnsan, köpek
Demir	>5 µg/ml	1.5-5 µg/ml	<1.5 µg/ml	_____
	Rat(14), köpek (10)	Tavşan(11), domuz (12)	İnsan (2), inek (2), keçi (13)	_____

İnsan sütündeki laktoferrin miktarının maternal demir miktarına bağlı olmadığı görülmüştür [3,5]. Demir eksikliği olan annelerde laktoferrin miktarı normal bulunmuştur. Bununla birlikte laktoferrin seviyesinin düşüklüğü, demir seviyesi düşük olan annelerden ziyade, protein enerji malnutrasyonu tespit edilmiş olan annelerde daha düşük bulunmuştur [9].

3. YAPISI

Laktoferrin, transferrin gen ailesinin demir bağlayan bir üyesidir [15]. Türlerine bağlı olarak 1-4 adet glikan içeren yaklaşık 80.000 dalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptid olup bu tek zincirli polipeptid, proteazlara duyarlı bir alfa heliks ile birbirine bağlanmış olan N- ve C- lob adı verilen iki homolog lobdan oluşmaktadır. N- ve C- lobun her biri ise iki alt lob içermekte ve sırasıyla N1, N2 ve C1, C2 olarak adlandırılmaktadır [3,6]. N- ve C- loblarındaki her iki alt lobun birbirlerine bakan yüzlerinde ferrik iyonun (Fe^{+3}) bağlandığı bir iyon bağlanma bölgesi yer almaktadır. Transferrinde olduğu gibi laktoferrinin iyon bağlama bölgesindeki bir asparajin, bir histidin ve iki tirozin rezidüleri birer demir iyonu bağlamakta olup bunun yanında bir arginin rezidüsü de HCO_3^- iyonu bağlamaktadır [4, 6]. Demir iyonunun bağlanma yerleri N- lobunda Asp (aspartik asit) 60, Tyr (tirozin) 92, Tyr 192, His (histidin) 253 ve C- lobunda Asp 395, Tyr 433, Tyr 526, His 595. amino asitlerden olmaktadır. Her iki lobda yer alan HCO_3^- anyonu laktoferrine demirin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. İnek ve insan laktoferrininin tersiyer yapısı birbirine çok benzer olmasına karşın tamamen aynı değildir. İnekte 689, insanda ise 692 adet amino asit bulunmaktadır. Sığırlaktoferrininde N1 lob 1-90 / 233-251, N2 lob 91-250, C1 lob 345-431 / 593-676, C2 lob 432-592 arasındaki amino asit dizilerinden oluşmaktadır. 334-344 arasındaki bölge 3 dönüşlü bir sarmal yapısında olup zincirin açılıp kapanmasından sorumludur. Molekülün sekonder yapısı sistein rezidüleri arasında kurulan disülfid bağlarından kaynaklanmaktadır. N2 ve C2 loblarının her ikisi de N-asetil laktozamin tipindeki bir glikanı bağlamaktadır. Sığırlaktoferrininde karbonhidrat olarak N-asetillaktozamin, N-asetilglukozamin, galaktoz, fukoza, mannoz ve nörominik asit bulunmaktadır [4, 6].



Şekil 1. Laktoferrinin üç boyutlu yapısı (17).

Sığır laktoferrininde N- bağı glikan yapısını bağlayan 5 güçlü bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler Asn (asparajin) amino asidinin 233, 281, 368, 476 ve 545. pozisyonlarıdır. Kimyasal analizler sonucunda Asn 281'in kullanılmadığı sadece diğer 4'ünün kullanıldığı ve Asn 476'nın ise türler arasında korunduğu ortaya çıkmıştır [4,6]. Laktoferrinin reseptörlerle etkileşiminde karbonhidrat zincirinin rol oynadığı görülmektedir. Laktoferrinin, reseptörleri tanınması için fukozun gerekli olduğu ve fukoz uzaklaştırıldığında reseptörlere bağlanmada önemli derecede bozukluk olduğu tespit edilmiştir [16].

Tablo 3. Laktoferrinin genel özellikleri (16).

Molekül ağırlığı (Dalton)	80.000
Karbonhidrat içeriği (%)	11.2
En yüksek demir içeriği (mg/g)	1.4
pI	8.0
465 nm'deki absorbanı (demir ile doymuş)	0.58

4. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

4.1. Metal ve Anyon Bağlama Özelliği

Laktoferrin doğal koşullarda %15-20 oranında demir ile doymuş halde bulunmaktadır. Laktoferrinin demir ile doymuş haline "halolaktoferrin", % 5'ten daha az demir ile doymuş haline ise "apolaktoferrin" denir. Laktoferrin sütte apolaktoferrin şeklinde bulunmaktadır. Laktoferrinin demire olan ilgisi serum transferrininkinden yaklaşık 260 kez daha fazladır [6]. İlgideki bu fazlalık yangısal bölgeler, ince bağırsak ve genital yollar gibi düşük pH'a sahip vücut bölgelerinde laktoferrinin demire bağlanmasını ve emilimini sağlamaktadır [18]. Laktoferrinin demir bağlama kapasitesi az da olsa yapısındaki HCO₃ anyonu ile ilişkilidir ve bu anyon demir ile doyurulmayı büyük ölçüde kolaylaştırır [3]. Laktoferrinin bu bağlayıcı bölgesinin stereokimyası, yükü ve büyüklüğü göz önüne alındığında ferrik demir ve HCO₃'ın bağlanması için en uygun özellikleri taşıdığı çalışmalarda kanıtlanmıştır. Laktoferrine demirin bağlanmasıyla okzalat, HCO₃ ile yer değiştirebilir ancak sitrat yer değiştiremez. Bununla birlikte sitratin, *in vivo* koşullarda laktoferrinin izolasyonu boyunca bağlanabildiği görülmektedir. HCO₃ 'ın miktarına bağlı olarak, yüksek miktardaki sitrat laktoferrine demirin bağlanmasını etkisiz hale getirebilmektedir. Ferrik demirden başka

Cu^{+2} , Mn^{+3} , Co^{+3} ve Zn^{+2} , de bu bağlanma bölgesine bağlanabilmektedir. Ancak laktoferrinin maksimum absorbans verdiği dalga boyları bağlanan bu katyonlara göre değişmektedir. Halolaktoferrin 466 nm'de maksimum absorbans verirken, Cu^{+2} ile doyurulduğunda 434 nm'de maksimum absorbans vermektedir [6].

4.2. Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Laktoferrin yüksek bir izoelektrik pH noktasına sahiptir. Teorik olarak hesaplandığında sığır için 9.4 ve insan için 9.5'tir. Ancak bu değerler kullanılan metoda bağlı olarak sığırda 8.4 -9 ve insanda 5.5 -10 arasında değişim göstermektedir. Seperasyon koşullarına bağlı olarak molekülün argininden zengin N-terminal ucunda meydana gelen değişimler buna sebep olmaktadır. Sığır laktoferrini, pH 4'ün altına düştüğünde demirin salıverilmesini sağlarken, insan laktoferrini pH 3'ün altına demirin salınımına oldukça direnç göstermektedir [6].

4.3. Güçlü Katyonik N- Uç

İnsan ve sığır laktoferrininin N-ucu, pek çok önemli bağlama özelliğinden sorumlu olan güçlü bir katyonik peptid bölgesine sahiptir. Hem insan hem de sığır laktoferrini N1 zincirinde bakteriyel lipolisakkaritlerin bağlanması için güçlü bir bağlama bölgesi içermektedir. Laktoferrindeki C lobunun bağlama kapasitesi buna göre 100-130 kez daha düşüktür [6]. Laktoferrin lipopolisakkarit, seminal plazma komponentleri, spermatozoa, DNA, düşük dansiteli lipoprotein, albumin, IgA, lizozim, glikozamino glikanlar, β -laktoglobulin, agar, kolera toksin, kalmodulin, triptan blue gibi moleküllerle etkileşimde bulunabilir. Laktoferrinin bu moleküllerle etkileşimi N-ucta yer alan arginin rezidülerinden kaynaklanmaktadır. Bu etkileşimlerin biyolojik rolleri bilinmemektedir [18]. Van Berkel ve ark.[19], N-ucu çıkarılmış insan laktoferrinine DNA, heparin, lizozim ve lipopolisakkaritlerin bağlanmasını incelemiştir. Demir ile doyma derecesinin DNA, heparin, lizozim ve lipopolisakkaritlerin laktoferrine bağlanmasını etkilemediği belirlenmiştir. Bir ya da birden fazla arginin rezidüesinin (Arg^2 , Arg^3 , Arg^4 , Arg^5) uzaklaştırılması sonucunda laktoferrinin farklı derecelerde bu moleküllere bağlanmasının azaldığı görülmüştür. Bu da göstermektedir ki bu 4 arginin rezidüsü ile biyomoleküller arasındaki etkileşim savunma sisteminde rol almaktadır.

Wang ve Hurley [20], Holstein ineklerde jel filtrasyon kromatografide involusyonun 7. günü 41. ve 51. fraksiyonlarda ölçülen laktoferrinin %75'ini yaklaşık 250 kDa ağırlıktaki laktoferrin kompleksi, 36. ve 40. fraksiyonlar arasında ise total laktoferrinin %22'sini yaklaşık 800 kDa ağırlıktaki laktoferrin kompleksinin oluşturduğunu belirtmiştir. İnvolusyonun 21.

gününde 41. ve 51. fraksiyonlardaki laktoferrinin %94'ünü yaklaşık 250 kDa ağırlıktaki laktoferrin kompleksi oluşturmuştur. Fraksiyonların en yüksek seviyede olduğu 7. ve 21. günlerde yaklaşık 150, 250, 300 ve 800 kDa ağırlıklı laktoferrin kompleksleri total laktoferrinin %97'sini oluşturmuştur. İnvolyonda laktoferrinin monomerik formdan yüksek molekül ağırlıklı forma geçişi laktoferrinin kazein, immunglobulinler ya da kendi multimerleriyle kompleksler oluşturmasındandır ki bu kompleksler antibakteriyel aktivitesini artırıp azaltabilir. İnvolyonun 21. gününde laktoferrin-immunglobulin ve laktoferrin-laktoferrin multimerlerinin artışı meme içi infeksiyonlara direncin ve antibakteriyel aktivitenin oluşmasında önemlidir. Buna karşın kazein ile yaptığı kompleks laktoferrinin bakteri yüzeyindeki lipopolisakaritler ile etkileşimini engellediğinden antibakteriyel aktivitesinin azalmasına neden olur. Sığır laktoferrininin katyonik N-ucu antibakteriyel aktivitede özel bir yere sahiptir [6].

4.4. Proteolitik Direnci

Tripsin ve kimotripsin özellikle halolaktoferrine etkisizdir. Emzirme ile beslenen ve hazır besinle beslenen bebeklerde yapılan çalışmada bebeklerin gaitasında önemli derecede sindirime uğramamış laktoferrin tespit edilmiştir. Böylece gaitadaki laktoferrinin pepsin ve pankreatik enzimlerden etkilenmediği ve mide-bağırsak sisteminde biyolojik fonksiyonlarını yerine getirdiği ortaya konmuştur [3]. İnsan laktoferrini ve sığır laktoferrini ile desteklenmiş inek sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin gaitalarında halolaktoferrinin apolaktoferrine göre değişime uğramadan kaldığı ve sığır laktoferrininin insaninkine oranla daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. İnsan sütü verilen bebeklerin idrarlarında da değişime uğramamış laktoferrin ve fragmentleri tespit edilmiş olup bunlar bağırsaklardan emilen laktoferrinden kaynaklanmaktadır. Bu da göstermektedir ki laktoferrin bağırsaklarda kısmen parçalanmaktadır [6, 16].

4.5. Isıya Dayanıklılığı

Sığır apolaktoferrininin ısıya dayanıklılığı HCl ya da NaOH ile ayarlanmış farklı pH derecelerindeki laktoferrin üzerinde incelenmiştir. Nötr ya da nötre yakın pH'da laktoferrinin pastörizasyonu sonucu kısmi denaturasyon meydana gelirken, düşük pH'da laktoferrin ısıyla denaturasyona direnç göstermektedir. Laktoferrine, pH 6'da 80°C'de ve pH 4'te 90°C'de 5 dakika ısı uygulanması antibakteriyel aktivitede ve demir bağlama kapasitesinde önemli bir kayıba neden olmaz [6, 21]. Paulsson ve ark. [22], bakterilerle etkileşimi ve antibakteriyel aktivitesine bağlı olarak apolaktoferrin ve halolaktoferrinin ısıya dayanıklılığı üzerine yaptıkları çalışma sonucunda

laktoferrinin 72°C'de 15 saniyelik pastörizasyondan etkilenmediği tespit edilmiştir. 135°C'de 4 saniyelik ısı uygulanmasında ise apolaktoferrinin bakteriyostatik aktivitesinde olduğu gibi halolaktoferrinin bakteriye bağlanma yeteneğinin de ortadan kalktığı görülmüştür. Sanchez ve ark. [23], ise süt endüstrisinde kullanılan standart pastörizasyon uygulamalarının laktoferrinin yapısına hemen hemen hiç etki etmediği sonucuna varmıştır.

6. SONUÇ

Güntümüzde, sığır laktoferrini güçlü demir bağlayıcı özelliği nedeniyle beslenmede kullanılan doğal bir antioksidandır. Sığır laktoferrini uygun bir demir alıcısı ve vericisi olarak, insan sütünün taklit edilmesinde ve hastalıklara karşı doğal savunmaya yardımcı olarak bebek mamalarında kullanılmaktadır. Laktoferrin, özellikle yeni doğanların beslenmesinde minör süt proteinlerinin üretilmesine ve ticari ürünlerde kullanılmasına en güzel örnektir. Son yıllarda hamile kadınlarda, immun sistem destekleyicisi ve demir emilimine yardımcı olarak, fonksiyonel amaçlı gıda içeceklerinde, antioksidan özelliği nedeniyle kozmetikte, ağız bakım ürünleri ile diş çürüğü önlenmesi için sakızlarda kullanılmasının yanısıra kedilerde feline virusuna karşı mamalarda da kullanılmaktadır. Laktoferrinin antikanser gibi henüz tam olarak açıklanamayan diğer özelliklerinin gelecek yıllarda aydınlatılması hem ticari kullanım alanlarını yaygınlaştıracak hem de insan ve hayvan sağlığına yararlarını artıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Sørensen M., Sørensen S. P. L., The Proteins in Whey. C. R. Lab. Carlberg, 23: 55-99. (1939). In: Masson P. L., Heremans J. F. Lactoferrin in Milk from Different Species. Comp Biochem Physiol. 39B: 119-129. (1971).
2. Blanc B., Isliker H., Isolement et Caractérisation de la Protéine Rouge Sidérophile du lait Maternal: la Lactoferrine. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 19. C₁₃- C₁₄. (1961). In: Masson P. L., Heremans J. F., Lactoferrin in Milk from Different Species. Comp Biochem Physiol. 39B: 119-129. (1971).
3. Lønnerdal B., Iyer S., Lactoferrin: Molecular Structure and Biological Function. Annu. Rev. Nutr., 15: 93-110, (1995).
4. Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Spik G., Legrand D., Lactoferrin: a Multifunctional Glycoprotein Involved in the Modulation of the Inflammatory Process. Clin. Chem. Lab. Med., 37[7]: 281-286, (1999).
5. Mason P.L., Heremans J.F., Lactoferrin in Milk from Different Species. Comp Biochem Physiol, 39B: 119-129, (1971).

6. Steijns J.M., Van Hooijdonk A.C.M., Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84: Suppl.1, 11-17, (2000).
7. Avcı G., Laktasyon Periyodundaki Ankara Keçileri'nde Süt ve Serum Laktoferrin Düzeyleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120, (2003).
8. Tsuji S, Hirata Y, Mukai F, Ohtagaki S., Comparison of Lactoferrin Content in Colostrum Between Different Cattle Breeds. *J. Dairy Sci.* 73 [21]: 125-8, (1990).
9. Sanchez L., Calvo M., Brock J.M., Biological Role of Lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, 67: 657-661, (1992).
10. Blaxter K.L., Milk. The Mammary Gland and Its Secretions. Ed: Kon S., Cowie A.T., 2: 305-61. Academic Press, London, (1961). In: Mason P. L., Heremans J. F., Lactoferrin in Milk from Different Species. *Comp Biochem Physiol.* 39B: 119-129, (1971).
11. Jordan S.M., Kaldor I., Morgan E.H., Milk and Serum Iron and Iron Binding Capacity in the Rabbit. *Nature, Lond.* 215, 76-77, (1967). In: Masson P. L., Heremans J. F., Lactoferrin in Milk from Different Species. *Comp. Biochem Physiol.* 39B: 119-129, (1971).
12. Venn J.A.J., McCance R.A., Widdowson E.M. Iron Metabolism in Piglet Anaemia. *J. Comp. Path.* 57: 314-325, (1947). In: Masson P.L., Heremans J. F. Lactoferrin in Milk from Different Species. *Comp Biochem Physiol.* 39B: 119-129, (1971).
13. Schafer K. H., Breyer A. M., Karte H., Das Spurelement Eisen in Milch und Milchlösungen. *Z. Kinderheilk.* 76: 501-513, (1955). In: Masson P. L., Heremans J. F. Lactoferrin in Milk from Different Species. *Comp Biochem Physiol.* 39B: 119-129, (1971).
14. Ezeziel E., The Iron Binding Proteins in Milk and the Secretion of Iron by the Mammary Gland in the Rat. *Biochim. Biophys. Acta* 107: 511-518, (1965). In: Masson P.L., Heremans J.F. Lactoferrin in Milk from Different Species. *Comp Biochem Physiol.* 39B: 119-129, (1971).
15. Schanbacher F.L., Goodman R.E., Talhouk R.S., Bovine Mammary Lactoferrin: Implications from Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Sequence and Regulation Contrary to other Milk Proteins. *J. Dairy Sci.*, 76: 3812-3831, (1993).
16. Davidson L.A., Lönnerdal B.O., Fe-Saturation and Proteolysis of Human Lactoferrin: Effect on Brush-Border Reseptör-Mediated Uptake of Fe and Mn. *American Journal Physiology.* 257: (Gastrointest. Liver Physiol. 20); G930-34, (1989).
17. Anonim. I.s.b. Laboratory of Structural Biology School of Biological Sciences. The University of Auckland, New Zealand. xena.isb.sbc.auckland.ac.nz/projects.html, (2003).
18. Joannou C., Lactoferrin Structure. http://www.umds.ac.uk/mrg/acto_struct.html, (2001).

19. Berkel P.H.C., Geerts M., Van Veen H. A., Mericskay M., DeBoer H., Nuiens J.H., N-Terminal Stretch Arg² Arg³ Arg⁴ and Arg⁵ of Human Lactoferrin is Essential for Binding to Heparin, Bacterial Lipopolysaccharide, Human Lysozym and DNA. *Biochemical Journal*, 328: 141-151, (1997). In: Steijns J. M., Van Hooijdonk A. C. M. Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84: Suppl.1, 11-17, (2000).
20. Wang H., Hurley W.L., Identification of Lactoferrin Complexes in Bovine Mammary Secretions During Mammary Gland Involution. *J. Dairy Sci.*, 81: 1896-1903, (1998).
21. Anonim. DMV International Nutritionals. Lactoferrin's Antioxidant Effect. <http://www.ifpluscom/s2/2215.html>. (2001).
22. Paulsson M.A., Svensson U., Kishore A.R., Naidu A.S., Thermal Behaviour of Bovine Lactoferrin in Water and Its Relation to Bacterial Interaction and Antibacterial Activity. *Journal of Dairy Science* 76: 3711-3720, (1993). In: Steijns J. M., Van Hooijdonk A. C. M. Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84: Suppl.1, 11-17, (2000).
23. Sanchez L., Peiro J.M., Castillo H., Perez M.D., Ena J.M., Calvo M., Kinetic Parameters For Denaturation of Bovine Milk Lactoferrin. *Journal of Food Science*, 57: 873-879, (1992). In: Steijns J. M., Van Hooijdonk A.C.M., Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84: Suppl.1, 11-17, (2000).