

한우 Lactoferrin의 생화학적 특성 및 항균 활성

양희진 · 이수원

성균관대학교

Biochemical Properties and Antibacterial Activity of Lactoferrin from Korean Native Cow

H. J. Yang and S. W. Lee

Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University

ABSTRACT

The purpose of this study was to demonstrate biochemical properties and antibacterial activity of lactoferrin (Lf) obtained from the colostrum of Korean native cow. Lactoferrin was isolated from the colostrum of Korean native cow by purification steps using batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, affinity chromatography. Other whey protein components that is similar molecular weight and affinity to lactoferrin were gradually removed from crude Korean Native cow's lactoferrin during the purification steps. The molecular weight of the purified Korean native cow's Lf(K-Lf) was 81 kDa, the isoelectric point was 9, and the content of iron was 0.56 mg/g, which is indicated that iron saturation of the K-Lf was 40.6%. Amino acid composition and α -helix content were different K-Lf from bovine Lf(B-Lf). Antibacterial activity of *E. coli* O111 by K-Lf was lower than that of B-Lf. A minimal inhibitory concentration(MIC) of K-Lf and B-Lf was 2.75 mg/ml and 1.5 mg/ml respectively.

(Key words : Lactoferrin, Colostrum, Korean native cow)

I. 서 론

Lactoferrin(Lf)은 lactotransferrin 이라고도 불리우며, transferrin family 단백질 중의 한 종류로(Aisen and Listowsky, 1980; Brock, 1985; Rose et al., 1986) 젖 및 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucous에서 분비되고 면역세포 중에서 neutrophil의 secondary granules 에서도 분비되어 비면역학적 생체방어 기구의 기능을 가지고 있다. 특히, 초유 중에 많이 함유되어 있는데 젖소의 초유에서는 5 mg/ml 이상이지만 비유가 진행됨에 따라 정상유에서는 0.02~0.035 mg/ml로 Lf의 함량이 급격히 감소된다.

Human lactoferrin(H-Lf)은 glycoprotein으로 2개의 glycan chain이 결합된 691개의 아미노산으로 구성되어 있고(Metz-Boutigue et al., 1984), Pierce 등(1991)

에 의하여 젖소 lactoferrin(B-Lf)의 peptide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 규명되었다. 이러한 아미노산 서열에 따라 젖소 Lf의 분자량을 계산하면 약 76 kDa이며, 당 사슬까지 포함하여 약 83 kDa이다. 이 당단백질은 2개의 lobe로 구성되어 있으며, 각각의 lobe에 1분자씩 2개의 Fe³⁺ 결합 부위를 가지고 있다.

생리적인 기능으로서는 미생물 감염에 대한 방어작용, 유아 장내에서의 철분 흡수 촉진작용, myelopoiesis의 조절작용, 염증반응의 조절작용, lymphocytes의 성장촉진 작용과 macrophage 및 granulocyte, neutrophil, leucocyte의 조절작용 등 다양한 생리활성 작용에 관여하고 있다(Arnold et al., 1977; Nemet and Simonovits, 1985; Broxmeyer et al., 1980; Mansson et al., 1990; Bullen and Armstrong, 1979).

또한, Tomita 등(1991)과 Bellamy 등(1992)은 젖소 Lf를 pepsin으로 가수분해하여 N-terminal의 17~41번의 25개의 amino acid 잔기로 이루어진 분자량

Corresponding author : Soo Won Lee, Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University, 300 chunchundong, Suwon, 440-746, Korea.

3,126 kDa의 항균성 domain인 lactoferricin을 발견하였다. Lactoferricin은 젖소 Lf의 대장균에 대한 최소 저해농도(MIC)가 2,000 µg/ml 인데 비하여 MIC가 6 µg/ml 으로서 약 300 배 강한 항균작용을 나타내었으며, H-Lf에서 분리한 Lf보다 16 배나 강한 항균력을 갖는다고 보고하였다. 이러한 lactoferricin에 관한 최근의 연구는 단백질 분자 내에서 실제로 항균작용을 나타내는 활성부위의 구조를 밝힐 수 있는 계기를 마련했다는 점에서 크게 주목되는 것이다.

현재 Lf은 이러한 생물학적 특성들을 바탕으로 하여 조제분유의 모유화를 위해 첨가되고 있으며 기타 철분 보강, 방부효과를 지닌 식품첨가제, 동물 사료 첨가제, 염증예방, 세포의 성장 촉진제 등으로 국내에서도 점차 실용화 하고 있는 단계이다. 그러나 국내에서는 높은 가격임에도 불구하고 Lf을 전량 수입에 의존하고 있는 실정이며 Lf과 Lf 가수분해물의 기능들에 관한 연구도 주로 외국에서 Holstein과 같은 외래의 유종종의 Lf을 대상으로 대부분 이루어졌다. 국내에서는 이에 관련된 연구도 부족할 뿐만 아니라 젖소 Lf의 대체 가능성을 가진 고유 재래종인 한우의 Lf에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 같은 종이라고 하더라도 한우가 유전적 관계에서 Holstein과 차이가 있다는 보고(Lee et al., 1998)로 볼 때 젖소와 한우 Lf 간에도 차이가 있을 것으로 생각되어진다.

본 연구는 한우 Lf을 분리·정제하여 생화학적 특성 및 병원성 미생물에 대한 생육억제 효과를 측정하고, 기준에 알려져 있는 젖소 Lf과의 비교를 통하여 유전적 관계에서 차이를 보이는 한우와 젖소 Lf 간에는 어떠한 차이점이 있는지를 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Lactoferrin의 분리 및 정제

Lf의 정제에 사용한 한우 시료는 축산연구소 고냉지 시험장에서 착유한 한우 초유를 사용하였고, 젖소 Lf은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다. 한우 탈지유를 등전 침전시켜, 유청을 얻은 후 batch extraction, CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography, heparin agarose affinity chromatography를 이용하여 Lf을 정

제한 후 분획하였다. 이렇게 정제된 Lf은 정제도 확인 및 분자량 측정을 위해 SDS-PAGE를 실시하여 확인한 후 실험에 사용하였다.

2. High performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 순도 측정

정제된 Lf의 순도를 측정하기 위하여 각각의 정제 단계별로 얻은 Lf을 reverse phase C₁₈ column을 사용하여 HPLC(SP8800, Spectra-Physics, USA)를 실시하였다. 기기의 분석조건은 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 acetonitrile을 이용하여 stepwise gradient(acetonitrile 농도; 0 - 35 min : 20~45%, 35 - 40 min : 45%)로 1.0 ml/min의 유속으로 용출시키면서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 한우 lactoferrin의 아미노산 조성 분석

아미노산 분석은 HPLC로 취한 Lf 시료를 건조하여 이를 HCl로 110 °C 24시간동안 가수분해한 후 Pico-Tag 방법을 이용하여 HPLC(Waters, USA)로 분석하였다. 분석된 측정치를 각 아미노산의 분자량을 참고로 하여 각각의 아미노산 잔기수를 산출하였다.

4. 등전점 측정(Isoelectric focusing : IEF)

Robertson 등(1987)의 방법으로 등전점 전기영동을 실시하였다. 5%의 acrylamide gel(3.3%, pH 3.5~10.0)을 제조한 후 Mini-Protein II(Bio-rad, USA)을 사용하여 IEF-PAGE를 하였다.

5. 철분 함량 측정

정제된 Lf에 함유되어 있는 철 함량을 serum iron analysis kit(Wako Pure Chemical Industries, Japan)를 사용하여 측정하였다.

6. Circular dichroism(CD) 측정

Shimazaki 등(1993)의 방법을 변형하여 PS 150J power supply를 장착한 JASCO J-715 automatic recording spectropolarimeter(日本分光工業, Japan)를 이용하였다. 측정하는 cell은 1 mm의 것을 사용하였으며, 시료 단

백질은 증류수에 150 µg/900 µl이 되도록 용해하여 200~250 nm에서 CD를 측정하였다.

7. 최소저해농도(Minimal inhibition concentration : MIC) 측정

시험균주로는 *E. coli* O111를 KIST, 생명공학 연구소에서 분양받아 사용하였다. 균주는 1% peptone 배지에서 계대 배양한 후 MRS 배지에 접종하여 37 °C에서 배양하였으며, 이를 1% peptone 배지에 1차 배양 후 균주의 생육억제 실험에 사용하였다.

1% peptone broth에 filter(0.45 µm)로 제균한 Lf을 각각의 농도로 첨가하고 균의 최종농도가 10⁴ cfu/ml 수준이 되도록 시험균주 배양액을 접종한 후 37 °C에서 배양했다. 12 시간 정도 배양 후 눈으로 균의 성장 여부를 관찰하고 이 배양액을 희석해 PYG 배지에 접종하여 균수를 측정하였다. 이때 측정된 균수가 배양 전의 균 농도보다 낮거나 같으면 이때 첨가한 Lf의 농도를 MIC로 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Chromatography에 의한 한우 lactoferrin의 분리·정제

본 연구에서는 Lf을 효과적으로 분리하기 위해 4 단계의 분리, 정제 방법을 사용하였다(Fig. 1). 먼저, 정제 1단계에서 지방을 제거한 한우의 colostrum whey를 공정이 간편한 batch식 흡착법을 사용하여 Lf-rich fraction을 회수하였다. 정제 2단계에서는 ion exchange chromatography, 정제 3단계에서는 gel filtration chromatography, 마지막으로 정제 4단계에서는 affinity chromatography를 이용하여 Lf-rich fraction으로부터 순도가 높은 Lf을 분리 할 수 있었다.

Fig. 2는 정제 4단계를 거쳐 분리한 Lf을 SDS-PAGE로 확인한 결과로서 혼재된 다른 성분들이 여러 정제단계를 거침에 따라 제거되어지는 것을 관찰할 수 있었다. 마지막 정제단계까지 거쳐 얻은 Lf을 SDS-PAGE 하였을 때 단일 밴드를 관찰 할 수 있었고(Fig. 2 - lane 5), 밴드의 위치와 정제된 정도가 대조구조로 사용한 Sigma Co.의 젖소 Lf과 거의 같은 양상을 보여주었다. 상대적인 이동 거리에 대한 표준 단백질 분자량의 logarithm을 검량선으로 계산한 결과,

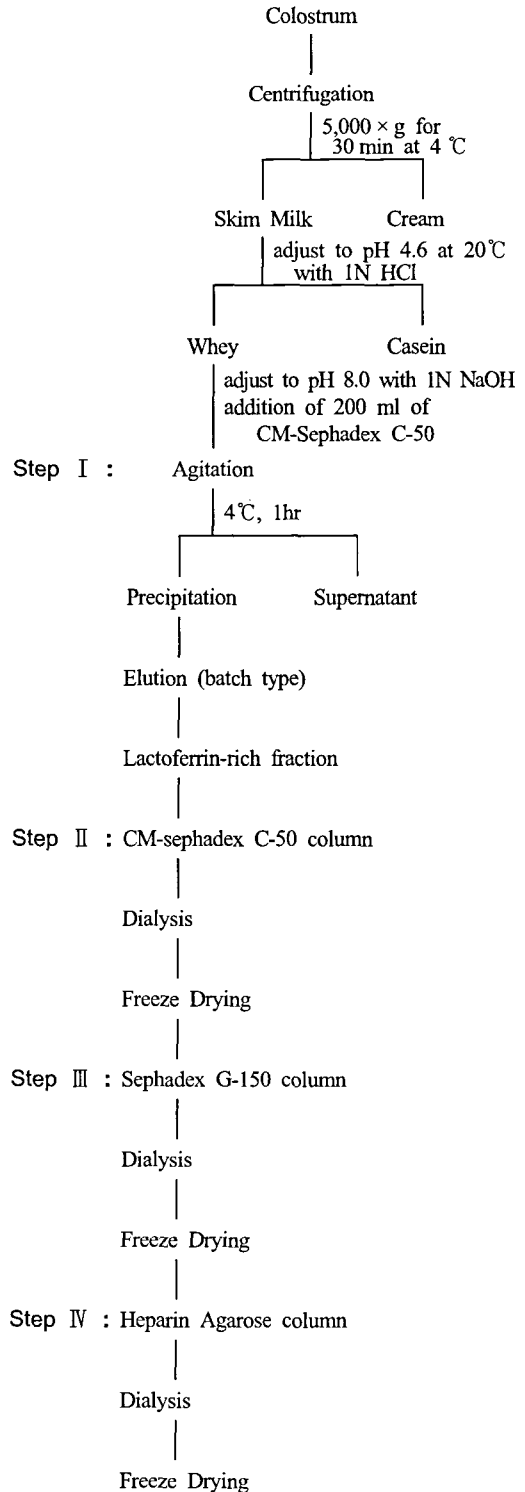


Fig. 1. Isolation steps of lactoferrin.

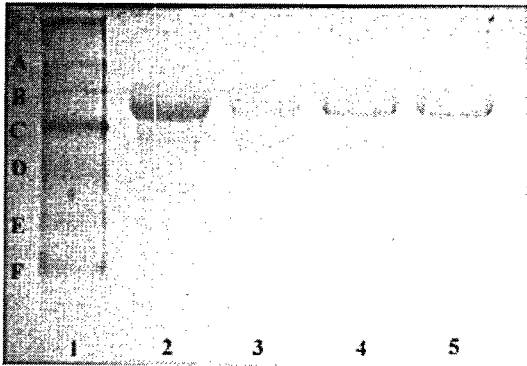


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by purification step.

- Lane 1 : Molecular weight marker(Sigma. Co.)
 - A : β -galactosidase (MW 116,000)
 - B : Fructose-6-phosphate kinase (MW 84,000)
 - C : Pyruvate kinase (MW 58,000)
 - D : Ovalbumin (MW 45,000)
 - E : Lactic dehydrogenase (MW 36,500)
 - F : Triosephosphate isomerase (MW 26,000)
- Lane 2 : Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography
- Lane 3 : Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by G-150 gel filtration chromatography
- Lane 4 : Commercial bovine lactoferrin
- Lane 5 : Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by heparin agarose affinity chromatography

한우 Lf의 분자량은 약 81 kDa이며, 젖소 Lf의 분자량은 82 kDa으로 나타났다.

정제 단계별로 한우 Lf의 회수율은 Table 1과 같고 whey 1리터에서 65 mg의 한우 Lf을 얻었다. 최종 회수율은 29.4%로 정제 단계를 거칠수록 회수율 간의 차이가 줄어드는 것으로 보아 이미 정제 초기 단계에서 Lf과 공존하던 물질들이 대부분 제거되며 정제 후반부에서는 분리되기 어렵고 분자량과 affinity가 Lf과 거의 비슷한 소량의 물질들이 제거되는 것으로 보여진다.

정제된 Lf의 순도를 높이기 위해서는 Sephadex G-150 gel filtration과 heparin agarose affinity chromatography와 같은 정제 단계가 필요한 하지만, 이러한 단계에서는 순도의 증가에 비해 회수율의 감소가 더 크다고 할 수 있다. 유용종 초유의 경우 Lf의 함량

이 5 mg/ml 정도로 알려져 있으며, Tsuji 등(1990)의 보고에 의하면 우리나라 한우와 유사한 일본의 육용종 소들의 초유의 경우 Lf의 함량은 약 0.5 mg/ml 정도라고 보고하였다. 하지만 이러한 보고 역시 본 실험에서 얻어진 한우 Lf 함량과는 어느 정도 차이를 보여주었다. 그러나 Tsuji 등(1990)의 보고는 초유에서 정제 단계를 거쳐 직접 분리해 낸 실험법이 아니라 전유(whole milk)에서 항체로 정량을 한 것이기 때문에 본 실험에서 분리해낸 Lf의 양보다는 높게 검출되었을 것으로 생각된다. 또한 초유 중 Lf의 함량은 분만 후 제일 높다가 비유기간이 진행됨에 따라 급격히 감소하는데 본 실험에 정제 재료로 사용한 초유가 분만 후 24시간 이전의 것이 아니기 때문에 회수율이 낮게 나타났다는 사실을 배제할 수 없다.

Table 1. Recovery rate of lactoferrin from 1 liter of Korean native cow's whey

Purification step	Lactoferrin (mg)	Recovery rate (%)
I : Batch extraction	221	100.0
II : Ion exchange chromatography	98	44.3
III : Gel filtration chromatography	77	34.8
IV : Affinity chromatography	65	29.4

2. HPLC를 이용한 lactoferrin의 순도 측정

각 단계별로 정제한 한우 Lf 분획의 순도를 HPLC를 사용하여 분석하였다. 정제 1단계에서의 Lf 분획은 여러 개의 peak가 나타나 Lf 이외의 여러 물질이 존재하고 있음을 보여주었다(Fig. 3(A)). 그러나 정제 2단계에서 얻은 Lf의 HPLC 분석 결과는 Lf이 다른 peak들과 붙어서 분획되긴 하지만 batch식 추출일 때보다 peak의 수가 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3(B)). 정제 3단계의 HPLC에 의한 분리 pattern(Fig. 3(C))에서는 거의 단일 peak를 보이고 있기는 하지만 Lf peak에 가깝게 미지의 작은 peak들이 함께 용출되었다. 마지막으로 정제 4단계를 거쳐 얻어진 Lf은 3단계 정제에서 매우 적은 양으로 존재해있던 미지의 peak들이 제거되는 것으로 나타났다(Fig. 3(D)). 최종 정제된 한우 Lf과 젖소 Lf의 HPLC에 의한 분리 pattern을 비교해 보면 SDS-PAGE에서는 크게 차이가

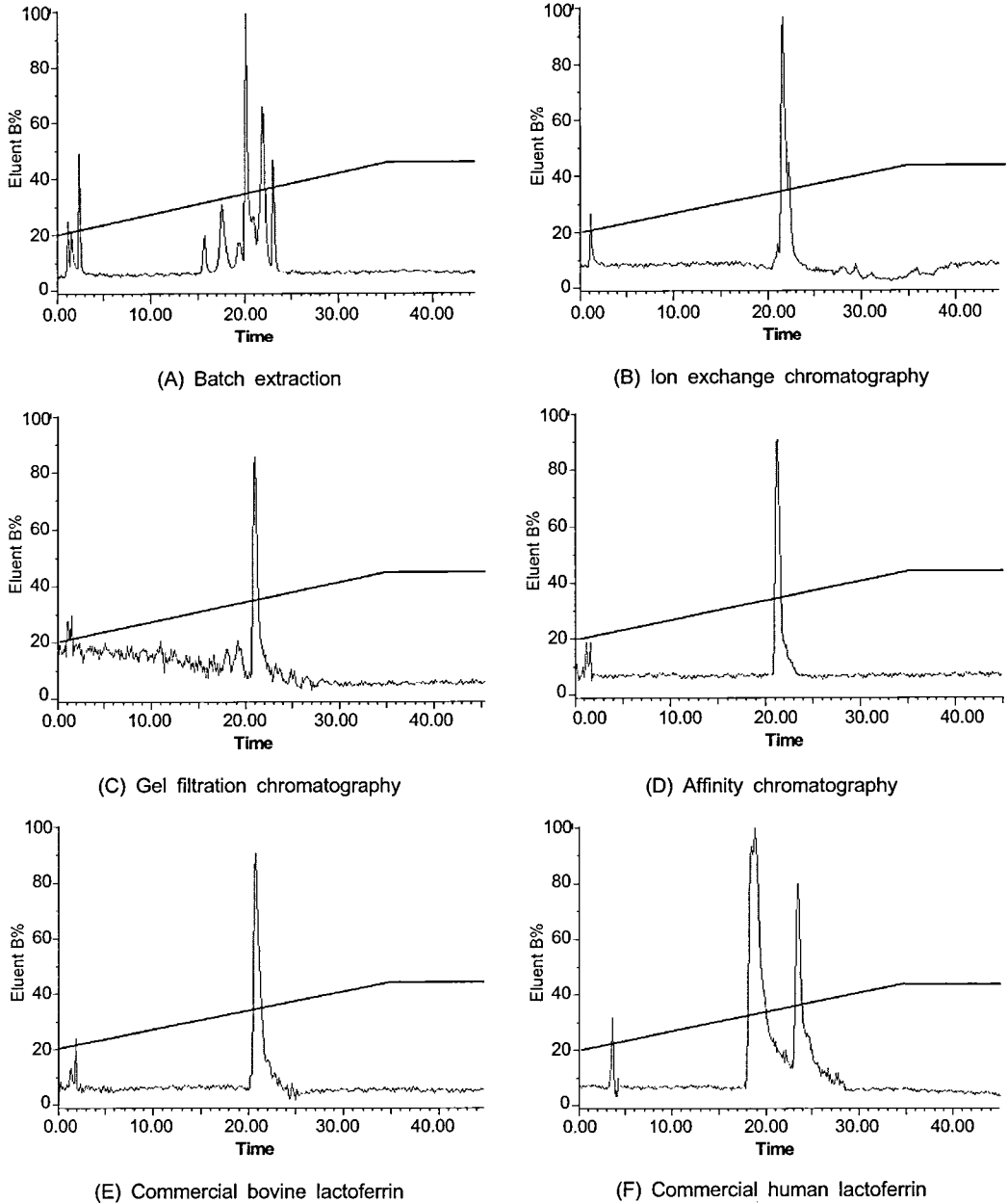


Fig. 3. HPLC analysis patterns of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum.

나타나지 않았지만 affinity chromatography를 거친 것이 더욱 더 단일한 peak를 보여주었고 retention time은 거의 동일하였다(Fig. 3(E)). 그러나 human Lf의 HPLC에 의한 분리 pattern(Fig. 3(F))과 비교해 보면 human Lf의 retention time이 한우 Lf과 젓소 Lf보다 조금 빨랐으며 peak의 모양도 한우 Lf과 젓

소 Lf과는 다른 양상을 보여주어 종에 따른 이질성을 나타내는 것으로 판단되었다.

3. 한우 lactoferrin의 생화학적 특성

한우 Lf의 amino acid 조성을 Pierce 등(1991)이

보고한 젖소 Lf의 amino acid 조성과 비교하면(data not shown) 총 아미노산 함량은 lysine을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았으나, 한우 Lf의 각 amino acid 함량들이 젖소 Lf의 amino acid 함량과 전반적으로 차이를 보여 한우 Lf과 젖소 Lf은 구조가 다소 다른 것으로 추정되었다.

정제된 한우 Lf의 pI 값을 측정하기 위하여 isoelectric focusing을 한 결과, 한우 초유에서 정제한 Lf의 pI 값은 9로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과는 Jin 등(1995)이 보고한 한우 Lf의 pI 값이 8.7 이라고 한 결과와는 차이가 있으나 같이 분석한 젖소 Lf의 pI 값도 8.9로 한우 Lf과 비슷한 값을 나타내었고 H-Lf 역시 pI 값이 8.8 정도로 Moguilevsky 등(1985)의 8.7, Foley 등(1987)과 O'connor 등(1987)이 보고한 H-Lf의 pI 값이 8~9 사이라는 것과 거의 일치하였다.

Lf에 결합되어 있는 철분의 함량을 측정하기 위해 serum iron analysis kit를 이용하여 Lf과 결합할 수 있는 철의 최대 함량을 각 Lf의 분자량에 맞추어 계산한 후 철분 포화도를 산출하였다(Table 2). 한우 Lf과 젖소 Lf의 철 포화도는 각각 40.6%와 34.2%였으며 이러한 결과는 정상유에서 분리해 낸 젖소 Lf과 H-Lf의 15.4%와 10.8%에 비해 훨씬 높은 포화도를 보여주었다. 이러한 결과는 한우 Lf과 젖소 Lf이 초유로부터 분리된 것이므로 다소 높게 함유하고 있는 것으로 생각되어지며 Frasson과 Lonnerdal(1980)은 인유 중의 철 포화도는 1~4% 정도로서 인유 중에 포함되어 있는 철들이 지질 분획이나 저분자 물질과 결합되어 있어 적은 양의 철만 Lf과 결합된 상태로 존재하고 있다고 하였다.

Circular dichroism(CD) 측정 결과로 2차 구조상 α -helix 함량은 한우 Lf이 약 18%의 α -helix를 함유하고 있고, 젖소 Lf이 15% 정도의 α -helix를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 Brown과 Parry(1974)의 젖소 Lf이 α -helix 15% 함유하고 있다는 보고와 동일하였으며, Shimazaki 등(1991)의 보고에서는 젖소

Lf은 12%, apo-type의 젖소 Lf은 14%, holo-type의 젖소 Lf은 12%의 α -helix를 함유하고 있다고 하였는데 이러한 보고들은 본 실험에서 측정된 젖소 Lf의 α -helix의 함량과 유사함을 나타내었다. 실험 결과에서 α -helix 함량의 수치적 차이로 볼 때, 한우 Lf은 젖소 Lf의 구조와는 다소 차이가 있는 것으로 생각되어진다.

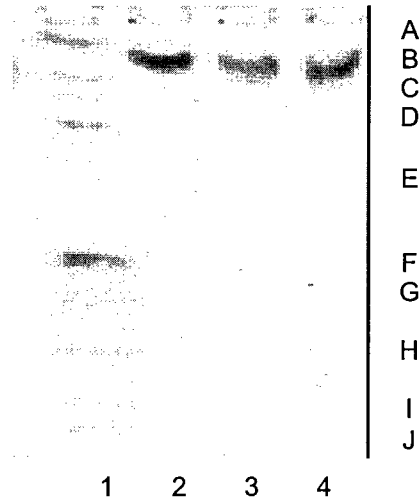


Fig. 4. Isoelectric focusing gel electrophotogram of Korean native cow's lactoferrin.

- 1. pI standard marker, 2. Korean native cow's Lf
- 3. Bovine lactoferrin, 4. Human lactoferrin
- A : Trypsinogen (pI 9.3), B : Lectin i (pI 8.8)
- C : Lectin ii (pI 8.6), D : Lectin iii (pI 8.2)
- E : Myoglobin(pI 7.2)
- F : Carbonic Anhydrase(pI 6.6)
- G : Carbonic Anhydrase(pI 5.9)
- H : β -lactoglobulin A(pI 5.1)
- I : Trypsin inhibitor(pI 4.6)
- J : Amyloglucosidase(pI 3.6)

Table 2. Iron content and iron saturation of lactoferrin

	Korean native cow's lactoferrin (colostrum)	Bovine lactoferrin (colostrum)	Bovine lactoferrin (normal milk)	Human lactoferrin (normal milk)
Fe content (mg / g)	0.56	0.49	0.22	0.15
Fe saturation (%)	40.5	34.2	15.4	10.5

Korean native cow's lactoferrin : Fe saturation 100% = 1.38 mg / g lactoferrin.

Bovine lactoferrin : Fe saturation 100% = 1.43 mg / g lactoferrin.

4. 한우 lactoferrin의 대장균에 대한 저해 농도 측정

한우 Lf와 젖소 Lf를 배지에 여러가지 농도로 첨가하여 균의 성장을 억제하는 최소 저해 농도(MIC)를 측정하였다(Table 3).

실험 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 MIC는 젖소 Lf이 1.50 mg/ml, 한우 Lf이 2.75 mg/ml로 젖소 Lf의 항균성이 더 높은 것으로 나타났다. Tomita (1991)와 Bellamy(1992)의 보고에서는 젖소 Lf의 MIC가 2 mg/ml 정도라는 이들의 연구결과와 비교하여 볼 때 유사한 결과를 보여 주었다.

Table 3. Antibacterial activity of lactoferrin against *Escherichia coli* O111

	MIC (mg/ml)
Bovine lactoferrin	1.50
Korean native cow's lactoferrin	2.75

MIC : Denotes minimal inhibition concentration.

IV. 요약

우리나라 재래종인 한우의 초유로부터 lactoferrin (Lf)을 분리하기 위해서 batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, affinity chromatography 등의 정제과정을 실시하였다. 각 정제 단계에 의해 한우 Lf과 결합되어 있던 여러 물질들이 제거되었으며 한우 초유 1 liter에서 정제과정을 통하여 회수한 Lf의 양은 65 mg로 회수율이 29.4%였다. SDS-PAGE와 HPLC를 이용해 확인한 결과, 정제 단계를 거침에 따라 순도가 높아지는 것 알 수 있었다. 정제된 한우 Lf은 분자량이 81 kDa 이고 등전점은 pI 9였으며, 철 함량이 0.56 mg/g으로 철 포화도는 약 40.6%로 측정되었다. 한우 Lf과 젖소 Lf은 아미노산 조성과 α-helix 함량에서 서로 다르게 나타났다. *E. coli* O111에 대한 항균성은 젖소 Lf이 한우 Lf 보다 높았으며, 최소저해농도(MIC)는 젖소 Lf이 1.5 mg/ml, 한우 Lf은 2.75 mg/ml로 젖소 Lf의 항균 활성이 더 높은 것으로 나타났다.

V. 인용 문헌

1. Aisen, P. and Listowsky, I. 1980. Iron transport and

storage proteins. *Annu Rev Biochem.* 49:357-393.
 2. Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science.* 197:263-265.
 3. Bellamy W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992. Antibacterial spectrum of Lactoferrin B, a Potent Bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Applied Bacteriologie.* 73:472-479.
 4. Brock, J. H. 1985. In metalloproteins, Part II: Metal proteins with non-redox roles. *Topics in molecular and structural biology.* Harrison, P.(eds), Macmillan Press, London, pp. 183-262.
 5. Brown, E. M. and Parry, R. M. Jr. 1974. A spectroscopic study of bovine lactoferrin. *Biochemistry.* 13: 4560-4565.
 6. Broxmeyer, H. E., DeSousa, M., Smithyman, A., Ralph, P., Hamilton, J., Kurland, J. I. and Bognacki, J. 1980. Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood.* 55:324-33.
 7. Bullen, J. J. and Armstrong, J. A. 1979. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 36:781-91.
 8. Foley, A. A. and Bates, G. W. 1987. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal. Biochem.* 162:296-300.
 9. Fransson, G. B. and Lonnerdal, B. 1980. Iron in human milk. *J. Pediatr.* 96:380-384.
 10. Jin, H. S., Keum, J. S., Kim, J. H. and Choi, W. Y. 1995. Purification and physicochemical characterization of lactoferrin from Korean native cattles. *Kor. J. Dairy Sci.* 17:146-160.
 11. Lee, S. S., Ko, S. B., Oh, W. Y., Yang, Y. H., Kim, K. I. and Cho, B. W. 1998. Determination of phylogenetic relationships of Korean native and Cheju native cattle to other breeds using PCR-RFLP of mtDNA D-loop region. *Kor. J. Anim. Sci.* 40: 335-344.
 12. Mansson, B., Geborek, P., Saxne, T. and Bjornsson, S. 1990. Cytidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: relation to lactoferrin, acidosis, and cartilage proteoglycan release. *Ann. Rheum. Dis.* 49:594-597.
 13. Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145:659-676.
 14. Moguilevsky, N., Retegui, L. A. and Masson, P. L.

1985. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.* 229:353-359.
15. Nemet, K. and Simonovits, I. 1985. The biological role of lactoferrin. *Haematologia.* 18:3-12.
16. O'Connor, C. J. and Sutton, B. M. 1987. Interfacial interactions between proteins and mammalian lipases. *Adv. Colloid Interface Sci.* 28:1-34.
17. Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196:177-84.
18. Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide mini gel system. *Anal. Biochem.* 167:290-294.
19. Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellstrom, K. E. and Brown, J. P. 1986. Primary structure of the human melanoma-associated antigen p. 97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 83: 1261-1265.
20. Shimazaki, K., Kawano, N. and Yoo Y. C. 1991. Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 98:417-22.
21. Shimazaki, K., Tanaka, T., Kon, H., Oota, K., Kawaguchi, A., Maki, Y. and Sato, T. 1993. Separation and characterization of the C-terminal half molecule of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 76:946-55.
22. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74:4137-42.
23. Tsuji, S., Hirata, Y., Mukai, F. and Ohtagaki, S. 1990. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *J. Dairy Sci.,* 73:125-128.