

한우 초유로부터 Lactoferrin의 분리 · 정제

양희진 · 하월규 · 양동훈 · 박기문 · 이수원

성균관대학교 식품 · 생명자원학과

Isolation and Purification of Lactoferrin from Korean Native Cow's Colostrum

H. J. Yang, W. K. Ha, D. H. Yang, K. M. Park and S. W. Lee

Department of Food & Life Science, Sungkyunkwan University

Abstract

Lactoferrin was isolated from the colostrum of Korean native cow by using several purification steps such as batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and affinity chromatography. Other whey protein components that having similar molecular weight and affinity to lactoferrin were gradually removed from crude Korean native cow's lactoferrin during the purification steps. The amount of lactoferrin collected from a liter of Korean native cow's colostrum was 65mg and the recovery rate was 29.4%. The molecular weight of the purified Korean native cow's lactoferrin was estimated approximately 81,000dalton.

Key word : lactoferrin, Korean native cow's colostrum, isolation and purification.

서 론

Lactoferrin은 lactotransferrin이라고도 불리워지며 transferrin family 단백질 중의 한 종류로 젖, 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucus에서 분비되고 neutrophil의 secondary granules에서도 분비된다^(1~3). Lactoferrin은 우유 내 여러 가지 생리적 기능을 가진 성분의 하나로 특히, 초유 중에 많이 함유되어 있고, 항균작용과 면역반응 등에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다. Lactoferrin은 여러 가지 생리적 기능을 가지고 있는데 유해한 미생물의 감염에 대한 방어작용⁽⁴⁾, 유아의 장내에서의 철분 흡수 촉진작용⁽⁵⁾, myelopoiesis의 조절작용⁽⁶⁾, 염증 반응의 조절작용⁽⁷⁾, neutrophil에 의한 hydroxyl기의 생성⁽⁸⁾, lymphocytes의 성장촉진 효과⁽⁹⁾, lysozyme regeneration의 감소⁽¹⁰⁾ 및 macrophage, granulocyte, neutrophil leukocytes

의 조절작용 등이 있다^(8,11,12). 또한 NK(natural killer) cell을 활성화시키고⁽¹³⁾ solid tumor 성장 및 전이를 억제시키는 항암효과를 나타내며⁽¹⁴⁾ TNF- α , interleukin-6, interleukin-8 같은 cytokine의 조절작용에 관한 연구가 많이 행하여지고 있다^(15,16).

Lactoferrin은 1960년 Groves⁽¹⁷⁾에 의해 우유에서 처음으로 분리되어졌고 같은 해에 Johansson⁽¹⁸⁾이 모유로부터 분리하는데 성공하였으며 이후 돼지, 쥐, 양, 말, 원숭이의 젖으로부터도 분리가 이루어졌다. Lactoferrin은 691개의 아미노산으로 구성되어 있으며 2개의 glycan chain이 결합된 glycoprotein이다⁽¹⁹⁾. Pierce 등⁽²⁰⁾에 의하여 bovine lactoferrin의 peptide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 알려졌고, 분자량은 약 76 kDa이며, glycan chain을 포함하면 약 83 kDa으로 알려지고 있다⁽²¹⁾. Lactoferrin은 2개의 globular lobe로 구성되어 있으며, 각각의 lobe에는 1분자씩 2개의 Fe³⁺ 결합 부위를 가지고 있다. 그러나 우유에서 유래한 lactoferrin의 구조와 기능에 대해서는 이전부터 많은 연구가 이루어졌으나 한우의 lactoferrin에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food & Life Science, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Suweon, 440-746, Korea

근래에 한우가 타 품종과의 유전적인 관계 분석을 통해 유전적으로 차이가 있음이 밝혀져⁽²²⁾ 한우의 lactoferrin 역시 다른 품종의 lactoferrin과 차이가 있을 것으로 여겨진다.

본 연구는 우리나라 재래종인 한우 초유로부터 lactoferrin을 분리, 정제하고 각 단계에서 얻은 한우 lactoferrin 분획의 특성을 비교하여 이를 한우 lactoferrin의 특성을 규명하기 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

한우 lactoferrin을 분리·정제하기 위한 시료는 강원도 대관령 소재 축산기술연구소 고령지 시험장에서 분만 후 2~3일 내의 초유를 채취하여 실험에 사용하였다. 젖소 lactoferrin과 human lactoferrin은 Sigma(U.S.A.)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

Lactoferrin의 분리 및 정제

초유를 4°C에서 5,000×g로 30분간 원심 분리하여 탈지유를 회수하였고, 회수한 탈지유를 20°C에서 1N HCl 용액으로 pH 4.6으로 조정하여 casein을 침전시킨 후, 5,000×g로 10분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 whey를 분리하였다. 분리된 whey는 1N NaOH 용액을 사용하여 pH 8.0으로 중화시킨 후 다시 5,000×g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 취해 정제용 시료로 사용하였다.

Batch extraction(정제 1단계)

Dionysius 등⁽²³⁾과 진 등⁽²⁴⁾의 방법을 변형하여, whey 1 liter를 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)로 미리 평형화시킨 CM-Sephadex C-50(Sigma, U.S.A.) 200 ml에 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 교반한 다음 1시간 동안 정치시켜 상등액을 제거하였다. 여기에서 회수된 slurry를 aspirator와 연결된 funnel로 옮기고 buffer를 제거한 다음, 0.2M NaCl을 함유한 동일 buffer 200 ml를 사용하여 slurry를 세척하였다. 세척한 slurry는 column(φ 3 cm × 30 cm)에 충전한 후 0.5M NaCl을 함유한 동일 buffer 400ml를 30 ml/hr의 유속으로 용출하고 10 ml씩 분획하여 UV monitor(Econo system:

Bio-rad, USA)로 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻어진 분획은 4°C에서 투석한 후 동결건조하였다.

Ion exchange chromatography(정제 2단계)

정제 1단계에서 얻은 crude lactoferrin을 50 mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)에 용해하여, 동일한 buffer로 평형화된 CM-sephadex C-50 column(φ 3 cm × 30 cm)에 흡착시켰다. 흡착된 crude lactoferrin은 4°C에서 stepwise gradient로서 1단계는 0.1M NaCl을 함유한 50 mM Na-phosphate buffer(pH 8.0) 250 ml, 2단계는 0.3M NaCl을 함유한 동일 buffer 250 ml, 3단계는 0.5M NaCl을 함유한 동일 buffer 250 ml를 30 ml/hr의 유속으로 용출시키면서 10 ml/tube의 양으로 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻어진 분획은 4°C에서 투석한 후 동결건조하였다.

Gel filtration chromatography(정제 3단계)

정제 2단계에서 얻은 crude lactoferrin을 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여 4°C에서 Sephadex G-150 column(Pharmacia, Sweden; φ 2.5 cm × 40 cm)에 loading하고, 50 mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)를 30 ml/hr의 유속으로 용출시키면서 10 ml/tube로 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 얻어진 분획은 4°C에서 투석한 후 동결건조하였다.

Heparin agarose affinity chromatography(정제 4단계)

Chen 등⁽²⁵⁾의 방법을 변형하여 affinity chromatography를 실시하였다. Heparin-agarose를 4°C에서 binding buffer(5 mM Tris-HCl containing 50 mM NaCl, pH 8.0)로 평형화시킨 후 column(φ 3 cm × 20 cm)에 충전하고, 정제 3단계에서 얻은 lactoferrin을 binding buffer에 용해하여 loading하였다. Washing buffer(5 mM Tris-HCl, containing 0.2 M NaCl, pH 8.0)로 평형화시킨 다음 0.2 M~0.7 M NaCl gradient로 30 ml/hr 속도로 용출시키면서 10 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 얻어진 분획은 4°C에서 투석한 후 동결건조하였다.

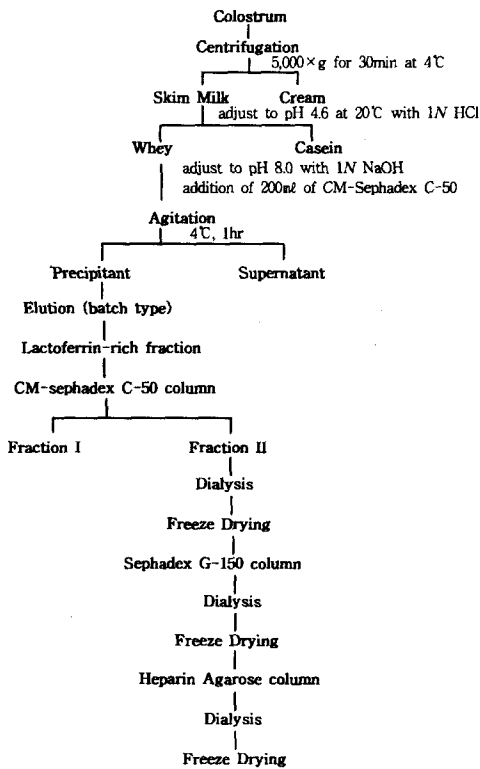


Fig. 1. Schematic diagram of lactoferrin purification.

단계별 정제도 확인

1) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

각 단계별 정제과정에서 용출된 각 분획과 lactoferrin의 정제도와 분자량을 확인하고자 Laemmli⁽²⁶⁾의 방법을 응용하여, running gel 10% 농도에서 Mini-Protein II (Bio-rad, USA)를 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다.

2) High performance liquid chromatography에 의한 순도 측정

정제된 lactoferrin의 순도를 측정하기 위하여 각각의 정제 단계별로 얻은 lactoferrin을 HPLC(SP8800, Spectra-Physics, USA)를 사용하여 reverse phase column chromatography 하였다. 기기의 분석조건은 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 함유한 acetonitrile을 이용하여 stepwise gradient(acetonitrile 농도: 0~35 min 20~45%, 35~40 min 45%)로 1.0 ml/min

의 유속으로 용출시키면서 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Chromatography에 의한 한우 lactoferrin의 분리·정제

Lactoferrin의 정제에는 Nagasawa 등⁽²⁷⁾의 DEAE-Cellulose, Spik 등⁽²⁸⁾의 SP-Sephadex, Dionysius 등⁽²³⁾의 CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography 방법과, Ena 등⁽²⁹⁾이 사용한 β -lactoglobulin을 이용한 affinity chromatography 방법 등이 사용되어 왔으나, 본 연구에서는 공정이 간편한 batch식 흡착법을 사용하여 한우의 colostrum whey로부터 lactoferrin을 분리하였다.

정제 1단계에서 batch식 추출로 회수한 한우 lactoferrin-rich fraction의 평균 흡광도는 280 nm에서 0.294 정도로 나타났으며, Dionysius 등⁽²³⁾이 얻은 lactoferrin 분획에는 lactoperoxidase가 혼재한다는 보고처럼 본 연구에서도 NaCl 농도가 0.2~0.5 부근일 때 수지로부터 용출되는 분획에는 lactoferrin 외에도 Fig. 5에서와 같이 lactoperoxidase 등을 포함한 다양한 분자량을 지닌 여러가지 물질들이 혼재되어 있었다. Whey 상태에서는 미량을 차지하던 lactoferrin 부분이 batch식 추출에 의해서 분리되어짐을 관찰할 수 있었다.

정제 2단계는 2개의 분획으로 분리되었고 (Fig. 2), fraction I은 0.3M NaCl 농도에서 갈

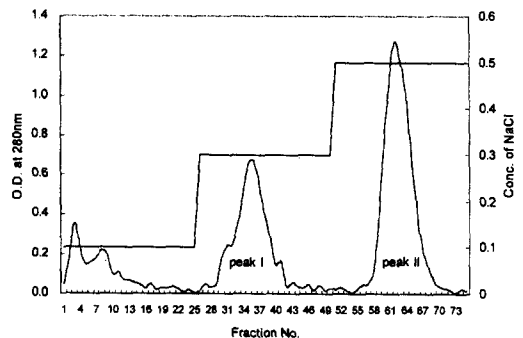


Fig. 2. CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following batch extraction with CM-sephadex C-50.

색을 띤 물질로 분획되었으며 fraction II는 0.5M NaCl 농도에서 분홍 빛깔을 띤 물질로 분획되어졌다. Fraction II는 Fig. 5에서와 같이 밴드가 거의 단일 밴드로 나타나 정제 2단계에서 이미 lactoferrin의 분리가 대부분 이루어짐을 알 수 있었고 여기에는 fraction II내에 존재하는 lactoferrin과 비슷한 이온 강도에서 용출되지만 lactoferrin보다 분자량이 조금 작은 물질들이 동시에 혼재하고 있는 것으로 나타났다.

정제 2단계의 분획을 Sephadex G-150 gel filtration chromatography한 정제 3단계는 Fig. 3과 같이 단일 peak를 나타냄을 확인하였고 SDS-PAGE로 확인한 결과 lactoferrin보다 분자량이 작은 물질들이 정제 2 단계에서 보다

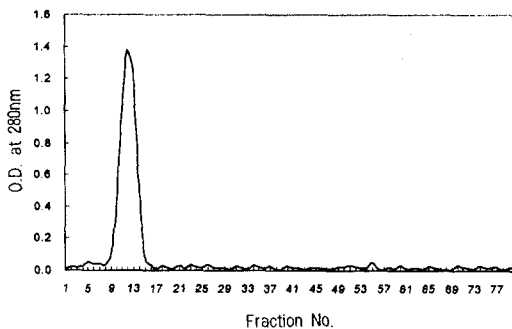


Fig. 3. Sephadex G-150 gel filtration chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography.

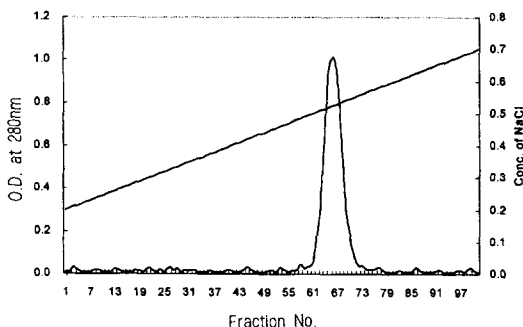


Fig. 4. Heparin agarose affinity chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following sephadex G-150 gel filtration chromatography.

감소한 것으로 나타났다.

정제 4단계에서는 Fig. 4에서와 같이 heparin agarose affinity chromatography한 결과 용출 초기에는 lactoferrin과 결합되어 있던 물질이 분리되고, 0.5M NaCl 농도에서 단일 peak를 얻을 수 있었다.

Heparin agarose affinity chromatography한 lactoferrin을 SDS-PAGE로 확인한 결과 단일 밴드를 얻었고, 밴드의 위치나 정제도가 대조구로 사용한 Sigma에서 구입한 젖소 lactoferrin과 같은 양상을 보여주었다. 정제한 한우 lactoferrin의 분자량은 SDS-PAGE로 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5에 나타났다.

상대적인 이동 거리에 대한 표준 단백질 분자량의 logarithm을 검량선으로 계산한 결과 한우 lactoferrin의 분자량은 약 81 kDa 이었으며, 젖소 lactoferrin의 분자량은 82 kDa, human

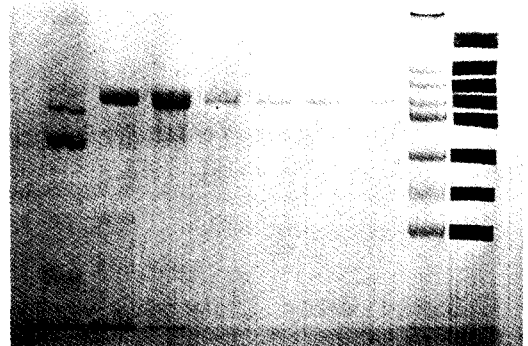


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum depending upon purification step.

Lane 1: Korean native cow's colostrum whey; lane 2: Lactoferrin rich fraction from Korean native cow's colostrum by batch extraction; lane 3: Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by CM-sephadex ion exchange chromatography; lane 4: Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by G-150 gel filtration chromatography; lane 5: Lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by heparin agarose affinity chromatography; lane 6: Commercial bovine lactoferrin; lane 7: Commercial human lactoferrin; M: Molecular weight standard marker.

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

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

lactoferrin의 분자량은 85 kDa으로 나타났다 (Fig. 5).

정제 단계별로 한우 lactoferrin의 회수율은 Table 1과 같고 whey 1리터에서 65 mg의 한우 lactoferrin을 얻었다. 최종 회수율은 1단계를 100으로 하였을 때 29.4%로 정제 단계를 거칠수록 회수율 간의 차이가 줄어드는 것으로 보아 이미 정제 초기 단계에서 lactoferrin과 공존하던 물질들이 대부분 제거되며 정제 후반부에서는 분리되기 어렵고 분자량과 affinity가 lactoferrin과 거의 비슷한 소량의 물질들이 제거되는 것으로 보여진다.

정제된 lactoferrin의 순도를 높이기 위해서 Sephadex G-150 gel filtration과 heparin agarose affinity chromatography와 같은 정제 단계가 필요하긴 하지만 이러한 단계에서는 순도의 증가에 비해 회수율의 감소가 더 크다고 할 수 있다. 유용종 초유의 경우 lactoferrin의 함량이 5 mg/ml 정도로 알려져 있으며, Tsuji 등⁽³⁰⁾의 보고에 의하면 우리나라 한우와 유사한 일본의 육용종 소들의 초유의 경우 lactoferrin의 함량은 약 0.5 mg/ml 정도라고 보고하였다. 하지만 이러한 보고 역시 본 실험에서 얻어진 한우 lactoferrin 함량과는 어느 정도 차이를 보여주었다. 그러나 Tsuji 등⁽³⁰⁾의 보고는 초유에서 정제 단계를 거쳐 직접 분리해낸 실험법이 아니라 전유(whole milk)에서 항체로 정량을 한 것이기 때문에 본 실험에서 분리해낸 lactoferrin의 양보다는 높게 검출되었을 것으로 생각된다. 또한 초유 중 lactoferrin의 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 나타났다고 생각된다.

HPLC를 이용한 lactoferrin의 순도 측정

각 단계별로 정제된 한우 lactoferrin의 순도를 HPLC를 사용하여 분석하였다. 정제 1단계에서는 여러 개의 peak가 존재하고 있음을 보여주었으나(Fig. 6-a) 정제 2단계에서는 몇 개의 peak가 붙어서 분획되긴 하지만 batch식 추출일 때보다 peak의 수가 줄어들었다(Fig. 6-b). 이러한 사실은 앞에서 설명한 ion exchange chromatography의 정제단계에서 lactoferrin과 동일한 이온 강도의 용출액에 의해 섞여 용출되는 물질들이 HPLC에서도 거의 동일한 retention time에 용출됨을 보여주었다. 정제 3단계의 HPLC에 의한 분리 pattern(Fig. 6-c)에서는 거의 단일 peak를 보이고 있지만 lactoferrin의 peak에 가깝게 작은 미지의 peak가 함께 나타났다. 정제 4단계를 거친 결과 매우 적은 양이지만 미지의 peak들이 제거되는 것으로 나타났다(Fig. 6-d) 정제 4단계에 의한 분리 pattern 역시 chromatography의 정제단계에서 보인 것과 같은 경향을 보여주었다. 최종 정제된 한우 lactoferrin과 젖소 lactoferrin의 HPLC 분리 pattern을 비교해 보면 SDS-PAGE에서는 크게 차이가 나타나지 않았지만 affinity chromatography를 거친 것이 더욱 더 단일한 peak를 보여주었고 retention time은 거의 동일하였다(Fig. 6-e). 그러나 human lactoferrin의 HPLC pattern(Fig. 6-f)과 비교해 보면 human lactoferrin의 retention time이 한우 lactoferrin과 젖소 lactoferrin보다 조금 빨랐으며 peak의 모양도 한우 lactoferrin과 젖소 lactoferrin과는 다른 양상을 보여주어 종에 따른 이질성을 나타내는 것으로 생각된다.

요 약

우리나라 재래종인 한우의 초유로부터 lactoferrin을 분리하기 위해서 batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, affinity chromatography 등의 정제과정을 실시하였다. 각 정제 단계에 의해 한우 lactoferrin과 결합되어 있던 여러 물질들이 제거되었으며 한우 초유 1 liter에서 정제과정을 통하여 회수한 lactoferrin 량은 65 mg으로서 회수율은 29.4%였으며 정제도를 SDS

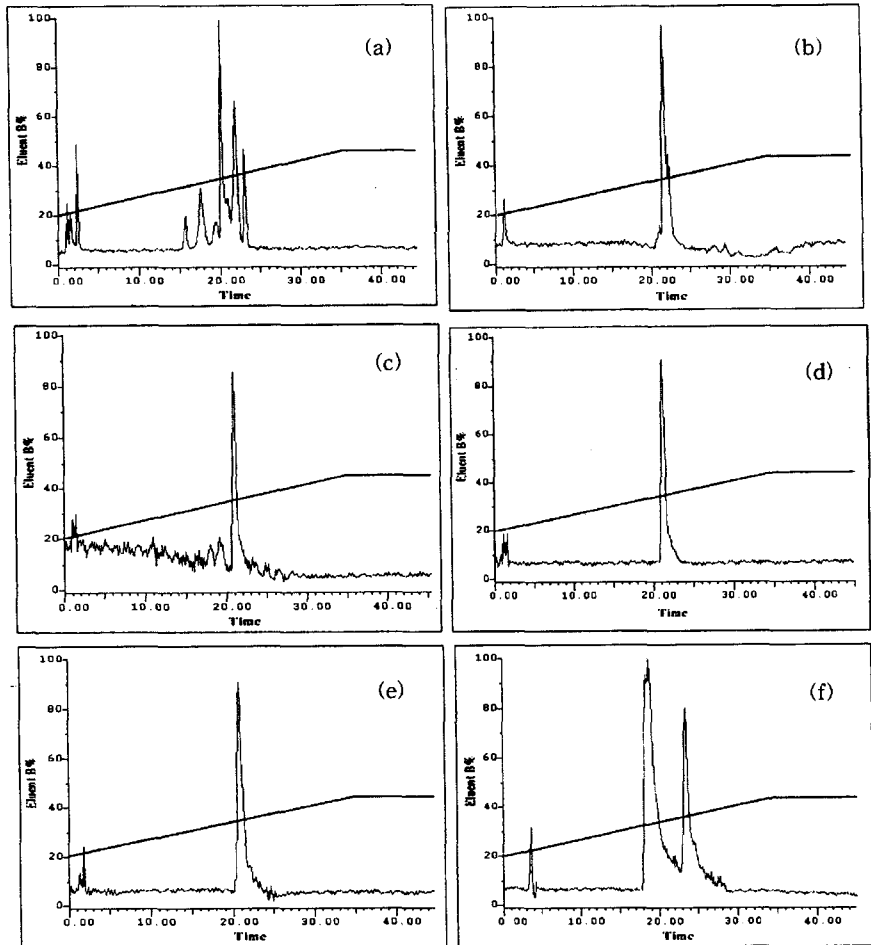


Fig. 6. HPLC analysis patterns of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum and other lactoferrins.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| (a) Batch extraction | (b) Ion exchange chromatography |
| (c) Gel filtration chromatography | (d) Affinity chromatography |
| (e) Commercial bovine lactoferrin | (f) Commercial human lactoferrin |

-PAGE와 HPLC에 의하여 확인한 결과 순도가 높게 정제되었음을 알 수 있었다. 정제된 한우 lactoferrin은 분자량이 81,000 Da으로 측정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림수산기술 개발사업의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Aisen, P. and Listowsky, I. : Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 357 (1980).
2. Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dryer, W. J., Hellstrom, K. E. and Brown, J. P. : Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97

- (milanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 1261 (1986).
3. Cohen, M. S., Britigan, B. E., French, M. and Bean, K. : Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 157(5), 1122 (1987).
 4. Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. : A bactericidal effect of human lactoferrin. *Science*, 197, 263 (1977).
 5. Nemet, K. and Simonovits, I. : The biological role of lactoferrin. *Haematol.*, 18, 3 (1985).
 6. Broxmeyer, H. E., De Sousa, M., Smithyman, A., Ralph, P., Amilton, J., Kurland, J. I. and Bognacki, J. : Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood*, 55, 324 (1980).
 7. Oseas, R., Yang, H. H., Baehner, R. L. M. and Boxer, L. A. : Lactoferrin: A promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 57, 939 (1981).
 8. Ambruso, D. R. and Johnston, R. B. : Lactoferrin enhances hydroxy radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fraction and an enzymic generating system. *J. Clin. Invest.*, 67, 352 (1981).
 9. Hashizume, S., Kuroda, K. and Murakami, M. : Identification of lactoferrin as an essential growth factor from human lymphatic cell lines in serum-free medium. *Biochem. Biophys. Acta.*, 763, 337 (1983).
 10. Anderson, W. L. and Tomasi, T. B. : Stimulation of reduced lysozyme regeneration by transferrin and lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 182, 705 (1977).
 11. Bullen, J. J. and Armstrong, J. A. : The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocyte. *J. Immunol.*, 36, 781 (1979).
 12. Hurlen, B., Olsen, I., Lingass, E. and Midtvedt, T. : Neutrophil phagocytosis *Treponema denticola* as indicated by extracellular release of lactoferrin. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.*, B92, 171 (1994).
 13. Shau, H., Kim, A. and Golub, S. H. : Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.*, 51(4), 343 (1992).
 14. Bezault, H. J., Bhimani, R., Wiprovnick, J. and Furmanski, P. : Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.*, 54(9), 2310 (1994).
 15. Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T. and Niwa, A. : Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF- α , IL-8 and NO. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 43(1), 79 (1997).
 16. Machnicki, M., Zimecki, M. and Zagulskit, T. : Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 *in vivo*. *Int. J. Pathol.*, 74, 433 (1993).
 17. Groves, M. L. : Isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3345 (1960).
 18. Johansson, B. G. : Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta. Chem. Scand.*, 14, 510 (1960).
 19. Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentigen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P. : Human lactoferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, 145, 659 (1984).
 20. Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. : Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, 196, 177 (1991).
 21. Shimazaki, K., Kawano, N. and Yoo, Y. C.

- : Comparison of bovine, sheep, and goat milk lactoferrin in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B, 417 (1991).
22. 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱 : 미토콘드리아 DNA D-loop Region의 PCR-RFLP를 이용한 한우, 제주 재래 한우와 타 품종과의 유전적 관계분석. *한국축산학회지*, 40(4), 335 (1998).
 23. Dionysius, D. A., Herse, J. B. and Grieve, P. A. : Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from whey using batch ion exchange techniques. *Aust. J. Dairy Technol.*, Nov., 72 (1991).
 24. 진현석, 금종수, 김종우 : Lactoferrin의 생물학적 특성. *한국낙농학회지*, 11(2), 31 (1994).
 25. Chen, J. P. and Wang, C. H. : Micro-filtration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. *J. Food Sci.* 56, 701 (1991).
 26. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 (1970).
 27. Nagasawa, T., Kiyosawa, I. and Kuwahara, K. : Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.*, 55, 1651 (1972).
 28. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouguellet, S. and Montreuil, J. : Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, 121, 413 (1982).
 29. Ena, J. M., Castillo, H., Sanchez, L. and Calvo, M. : Isolation of human lactoferrin by affinity chromatography using insolubilized bovine β -lactoglobulin. *J. Chromatogr.*, 525, 442 (1990).
 30. Tsuji, S., Hirata, U. and Matsroka, K. : Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *J. Dairy Sci.*, 72, 1130 (1990).

(2000년 5월 8일 접수)