



Préparation de lactoferrine et d' α -lactalbumine humaines par utilisation de techniques à membranes

F. Maynard, A. Pierre, J.L. Maubois

► To cite this version:

F. Maynard, A. Pierre, J.L. Maubois. Préparation de lactoferrine et d' α -lactalbumine humaines par utilisation de techniques à membranes. *Le Lait*, 1989, 69 (1), pp.59-69. hal-00929149

HAL Id: hal-00929149

<https://hal.science/hal-00929149>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Article de recherche

Préparation de lactoferrine et d' α -lactalbumine humaines par utilisation de techniques à membranes*

F. Maynard, A. Pierre et J.L. Maubois

INRA Laboratoire de recherches de technologie laitière, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France

(reçu le 26-2-1988, accepté le 15-9-1988)

Résumé — Un procédé technologique de fractionnement des protéines du lait humain est décrit. La séparation d' α -lactalbumine et de lactoferrine à partir de 60 l de lait est réalisée par filtrations successives en utilisant des membranes de microfiltration et d'ultrafiltration. L' α -lactalbumine est isolée par simple procédé physique, en 2 étapes de filtration. La lactoferrine (Lf) est obtenue dans une fraction contenant, pour 100 g de substance sèche, 25 g de Lf et 7,5 g de sérum albumine. La purification finale de la Lf est réalisée par chromatographie d'échange d'ions. Sa capacité de fixation du fer est de 1,71 μ mol de fer/ μ mol de protéine, soit 85% de la capacité maximale théorique.

microfiltration – ultrafiltration – α -lactalbumine humaine – lactoferrine humaine – capacité de fixation du fer

Summary — **Fractionation of human lactoferrin and α -lactalbumin using microfiltration and ultrafiltration membranes.** A technological process for fractionation of human milk proteins is described. Separation was achieved by successive filtrations using microfiltration and ultrafiltration membranes. In the same multistep experimentation, α -lactalbumin and lactoferrin were isolated from 60 l of milk. α -lactalbumin is purified by using 2 filtrations steps. Lactoferrin (Lf) is obtained in a fraction containing in 100 g of total solids, 25 g of Lf and 7.5 g of serum albumin. An additional purification step using ion-exchange chromatography was performed to purify lactoferrin. Its iron binding capacity was 1.71 μ mol of iron/ μ mol of protein, i.e. 85% of the maximum theoretical capacity.

microfiltration – ultrafiltration – human α -lactalbumin – human lactoferrin – iron binding capacity

*Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un contrat MRES (ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur) n° 86 S 0831 et grâce à l'aide financière de la Collectivité Régionale Bretagne et de l'INRA (bourse de thèse cofinancée).

Introduction

La lactoferrine et l' α -lactalbumine sont les 2 protéines majeures du lactosérum humain. Leurs concentrations varient respectivement entre 1 et 2 g/l (Lonnerdal *et al.*, 1977) et entre 3 et 4,8 g/l (Forsum, 1975) dans le lait humain mature.

La lactoferrine est une glycoprotéine, simple chaîne (Montreuil *et al.*, 1960) riche en acides aminés basiques (pH = 8,7 selon Moguilevsky *et al.*, 1985). Sa masse moléculaire est de 76 400 D (Querineau *et al.*, 1971). Elle a la propriété de fixer 2 atomes de fer (Blanc *et al.*, 1961) par l'intermédiaire d'un complexe mettant en œuvre 2 ions bicarbonate (Masson et Heremans, 1968). Partiellement saturée (8 à 25%) dans le lait (Reiter, 1984), cette protéine est capable d'inhiber *in vitro* par ferriprivation la croissance de micro-organismes tels que *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis* ou *Escherichia coli* (Oram et Reiter, 1968). L'inhibition observée est de type bactériostatique, la croissance des bactéries étant rétablie par addition de fer en excès dans le milieu (Bullen *et al.*, 1972). Toutefois, un effet bactéricide direct a été observé par Arnold *et al.* (1980, 1981). Cet effet découlerait d'une fixation de la lactoferrine à la surface des cellules, qui entraînerait un blocage soit des sites de transport de certains nutriments, soit des mécanismes de biosynthèse de la paroi (Arnold *et al.*, 1982).

L' α -lactalbumine humaine est une protéine simple chaîne, de masse moléculaire 14 100 D (Findley et Brew, 1972). Représentant 25% des protéines du lait humain, elle contribue considérablement à la haute valeur biologique de ce lait de par sa composition en acides aminés essentiels, notamment en tryptophane.

De nombreuses méthodes ont été mises en œuvre pour isoler et purifier (à

des fins analytiques) ces 2 protéines. Différentes techniques chromatographiques ont été utilisées : séparation basée sur l'échange d'ions (Querineau *et al.*, 1971; Blackberg et Hernell, 1980 pour la lactoferrine; Groves, 1965; Philipps et Jenness, 1971; Findley et Brew, 1972; Lonnerdal et Glazier, 1985 pour l' α -lactalbumine), sur l'affinité par chélation avec des métaux (Lonnerdal *et al.*, 1977) et sur l'immuno-affinité (Kawakami *et al.*, 1987). Si ces méthodes permettent d'obtenir les protéines avec un degré de pureté élevé, elles ne sont pas adaptées à l'obtention de quantités d' α -lactalbumine et de lactoferrine humaines requises pour une utilisation thérapeutique. Les quantités obtenues sont, en effet, inférieures au gramme et les autres composants protéiques ne sont pas ou sont mal récupérés.

En France, les lactariums recueillent actuellement près de 100 000 l/an de lait humain (Barrois *et al.*, 1982). Outre la redistribution du lait, la séparation des constituants protéiques, lipidiques et glucidiques permettrait de répondre à des besoins thérapeutiques de prématurés ou de nourrissons souffrant de pathologies graves de la digestion.

Les techniques à membrane (ultrafiltration et microfiltration) ont trouvé un large champ d'application dans la séparation des constituants protéiques du lait de vache (Maubois et Brulé, 1982; Maubois, 1984; Maubois *et al.*, 1987). Mises en œuvre à l'aide d'équipements modulaires, elles permettent le traitement de quantités très variables de lait. De plus, réalisant des opérations de concentration sélective des composants d'un liquide, en fonction de leur taille moléculaire, à des températures inférieures ou égales à 50°C, elles ne modifient pas les propriétés spécifiques des constituants biologiques. Aussi avons-nous pensé pouvoir appliquer ces techniques à la séparation des protéines

du lait humain.

L'objectif de cette première étude était d'utiliser une combinaison des technologies de microfiltration tangentielle et d'ultrafiltration pour obtenir à partir de mélanges de 60 l de lait humain des fractions purifiées en lactoferrine et en α -lactalbumine.

Matériels et Méthodes

Le lait

Le lait humain était un lait de mélange provenant du lactarium de Paris. Après décongélation par immersion dans un bain d'eau à 40°C, le lait était amené à une température de 37°C et écrémé sur une écrémeuse Westfalia (type DD 100 Z). Le volume de lait écrémé était de 60 l.

Fractionnement des protéines du lait

Le fractionnement des protéines du lait était effectué par filtrations successives sur membranes ayant différents pouvoirs de coupure (Maynard *et al.*, 1988) (Fig. 1).

Microfiltration. Une unité pilote SFEC comportant 2 pompes volumétriques (une pompe d'alimentation et une pompe de recirculation de 15 m³.h⁻¹) et 2 modules équipés de membranes minérales (Carbosep M14) était utilisée. La surface membranaire était de 1,6 m². L'essai était réalisé à une température de 48-50°C, avec une pression transmembranaire moyenne de 1,45 bars. La vitesse de recirculation du produit dans la membrane était de 4,5 m.séc⁻¹. Le rétentat obtenu (20 l) était diafiltré en continu avec de l'eau désionisée (60 l). Après diafiltration, le rétentat était concentré 2 fois.

Ultrafiltration. Les étapes d'ultrafiltration étaient réalisées sur une autre unité équipée d'une pompe volumétrique (avec une circulation de 4 m³.h⁻¹) et d'une membrane à fibres creuses (Romicon PM 100 ou Romicon PM 10) ayant une surface membranaire de 1,5 m². La température était de 48-50°C, la pression transmembranaire moyenne de 0,6 bar. Le rétentat 2 (10 l) était diafiltré en continu avec de l'eau désionisée jusqu'à élimination complète de l' α -lactalbumine.

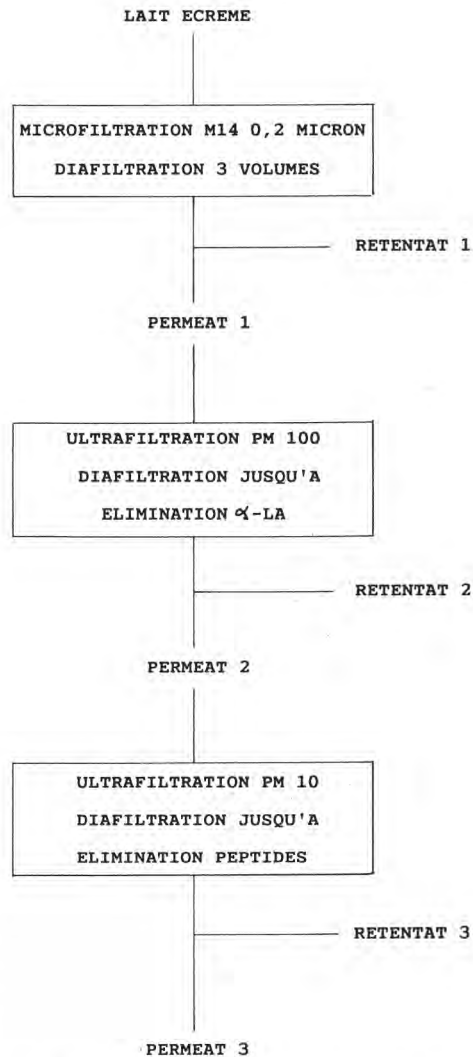


Fig. 1. Etapes technologiques de fractionnement des protéines du lait humain.

Une partie du perméat 2 était concentrée sur la membrane Romicon PM 10. Le rétentat 3 ainsi obtenu était diafiltré en continu jusqu'à élimination complète des peptides, appréciée par HPLC en gel filtration à pH 2,2 (détection à 210 nm).

Analyses des fractions

Chromatographie. L'analyse des fractions protéiques était effectuée par chromatographie HPLC sur Varian 5000, muni d'un détecteur à longueur d'onde variable (Varian, modèle 2050).

Les protéines étaient identifiées par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des protéines de référence (lactoferrine, sérum albumine et α -lactalbumine humaines) provenant de la Société Sigma (Chemical Co., St. Louis, USA).

La chromatographie HPLC en gel filtration était réalisée par utilisation d'une colonne TSK 2000 SW d'une longueur de 60 cm. La phase mobile était constituée de phosphate monopotassique 0,01 M amené à pH 2,2 avec de l'acide orthophosphorique. Le débit était de 1 ml.min⁻¹ et la détection était effectuée à 210 nm.

Dans le cas de la chromatographie HPLC en phase inverse, une colonne C18 Vydac 218 TP 54 était utilisée. L'élution était réalisée par un gradient établi à l'aide de 2 tampons : tampon A (eau, TFA 0,1%) et tampon B (eau, acétonitrile 20/80, TFA 0,1%). Le gradient, de 30 à 90% de tampon B, était effectué en 30 min. Le débit était de 1 ml.min⁻¹, et la longueur d'onde était fixée à 280 nm.

Détermination de la teneur en protéines. La matière azotée totale (MAT) était dosée par la méthode Kjeldhal. L'azote non protéique (NPN) était déterminé également par la méthode Kjeldhal sur le filtrat obtenu après précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique à 12%. Les extraits secs étaient réalisés par dessiccation à 102°C pendant 7 h. La concentration de chaque protéine était déterminée par le rapport des surfaces de pic protéine/étalon obtenu en chromatographie HPLC en phase inverse. Cette concentration, rapportée à la quantité de protéines vraies (MAT-NPN), était exprimée pour 100 g d'extraits secs.

Electrophorèse. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (15%)-SDS était réalisée sur un équipement Biorad, selon la méthode de Laemmli (1970).

Dosage des acides aminés. Les acides aminés des protéines isolées (lactoferrine et α -lactalbumine) étaient déterminés avec un analyseur d'acides aminés Beckman, après 24 h d'hydrolyse acide par HCl 6N, selon la méthode de Spackman et al. (1958).

Purification de la lactoferrine. La lactoferrine était purifiée à partir du rétentat 2 par chroma-

tographie d'échanges d'ions selon la méthode décrite par Foley et Bates (1987).

La teneur en fer de la protéine ainsi obtenue et sa capacité de fixation du fer étaient déterminées selon la méthode de Graham et Bates (1976).

Résultats

La microfiltration du lait écrémé permet d'obtenir un perméat 1 contenant des peptides, de l' α -lactalbumine et des protéines de poids moléculaire plus élevé que les précédents non identifiés lors de l'analyse HPLC en gel filtration (Fig. 3, P1).

La chromatographie en phase inverse selon un gradient B d'hydrophobicité met en évidence que le perméat 1 contient, outre l' α -lactalbumine (3%), de la lactoferrine (0,7%) et de la sérum albumine (0,1%) (Fig. 4, P1 et Tableau II).

En cours de microfiltration, le flux de perméation et le taux de rétention protéique varient respectivement de 54,5 à 45,5 l.h⁻¹.m⁻² et de 33 à 42% au bout de 35 min (Tableau I). Les résultats démontrent que dans les conditions expérimentales utilisées, il n'y a pas de colmatage rapide de la membrane.

La diafiltration du rétentat permet d'éliminer la majeure partie de l' α -lactalbumine et des peptides. Cependant, il s'avère que le rétentat 1 final ainsi obtenu contient encore 16-18% de lactoferrine (Fig. 4, R1 et Tableau II).

L'ultrafiltration sur membrane Romicon PM 100 du perméat 1 conduit à la séparation de l' α -lactalbumine (perméat 2). Les protéines de poids moléculaires plus élevés (lactoferrine et sérum albumine) sont retenues dans le rétentat 2 (Fig. 5). La diafiltration élimine la quasi-totalité de l' α -lactalbumine, et le rétentat 2 final ainsi obtenu (Fig. 5, R2) contient de la lactoferrine (24-27%), de la sérum albumine (6,

Tableau I. Rendement de l'extraction de l' α -lactalbumine lors de la microfiltration du lait humain. Membrane Carbosep M14, surface 1,6 m². Pression transmembranaire moyenne : 1,45 bar.

Temps (min)	α -lacta. rétentat (g/l)	α -lacta. perméat (g/l)	Débit (l.h ⁻¹ .m ⁻²)	Performance membrane (g.h ⁻¹ .m ⁻²)	Taux de rétention (%)
10	3,20	2,12	54,5	115	33
15	4,02	2,25	52,5	118	44
25	4,68	2,68	48,75	130	42
35	5,08	2,93	45,5	133	42

9-8, 5%) (Tableau II) et d'autres protéines non identifiées.

L'ultrafiltration du perméat 2 sur membrane Romicon PM 10 concentre l' α -lactalbumine en éliminant les fractions de plus faibles poids moléculaires.

L'analyse en gel filtration du rétentat 3 (Fig. 3, R3) nous montre la présence d'un

seul pic, alors que la chromatographie HPLC en phase inverse (Fig. 6, R3) met en évidence, outre le pic principal, un petit pic surnuméraire également présent dans la protéine purifiée de référence (Fig. 6, La).

La composition en acides aminés de l' α -lactalbumine isolée est en accord avec celle publiée par Findlay et Brew (1972) avec un coefficient de corrélation de 0,986.

La lactoferrine était purifiée à partir du rétentat 2 en utilisant ses propriétés basiques. La technique utilisée permet d'obtenir cette protéine avec un degré de pureté élevé (Fig. 6). La comparaison de sa composition en acides aminés avec celle publiée par Querinjean *et al.* (1971) donne un coefficient de corrélation de 0,974.

La courbe de saturation de la lactoferrine par une solution de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 0,2 mM est représentée Figure 7.

La saturation est atteinte lorsque 0,71 μ g de fer/mg de protéine sont ajoutés. Cela correspond à la fixation de 0,96 μ mole de fer/ μ mole de lactoferrine.

L'adsorption à 470 nm nous montre que la lactoferrine initiale contient 0,54 μ g de fer/mg de protéine. La saturation initiale est donc de 37,5%, résultat supérieur à celui énoncé par Reiter (1984).

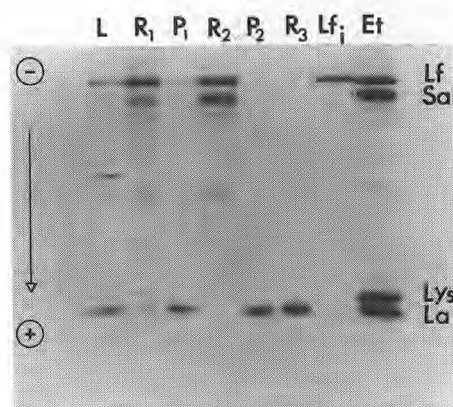


Fig. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (15%)-SDS. L : lait humain; R1 : rétentat 1; P1 : perméat 1; R2 : rétentat 2; P2 : perméat 2; R3 : rétentat 3; Lf : lactoferrine isolée; Et : protéines étalons; Lf : lactoferrine; Sa : sérum albumine; Lys : lysozyme; La : α -lactalbumine.

Tableau II. Composition protéique des différentes fractions.

	Extraits secs (g/kg)	g de protéines /100g de protéines vraies		g de protéines/ 100g d'extrait sec
Rétentat 1	72,3	Lf	29-33	16-18
		Sa	11-17	6,2-9,6
		α La	3,5-4,2	1,9-2,3
Perméat 1	76,9	Lf	16-20	0,6-0,8
		Sa	2-3	0,08-0,1
		α La	76-79	3-3,1
Rétentat 2	113,1	Lf	32-35	24-27
		Sa	9-11	6,9-8,5
Rétentat 3	974,9	α La	81	83

Lf : lactoferrine; Sa : sérum albumine; α La : α -lactalbumine.

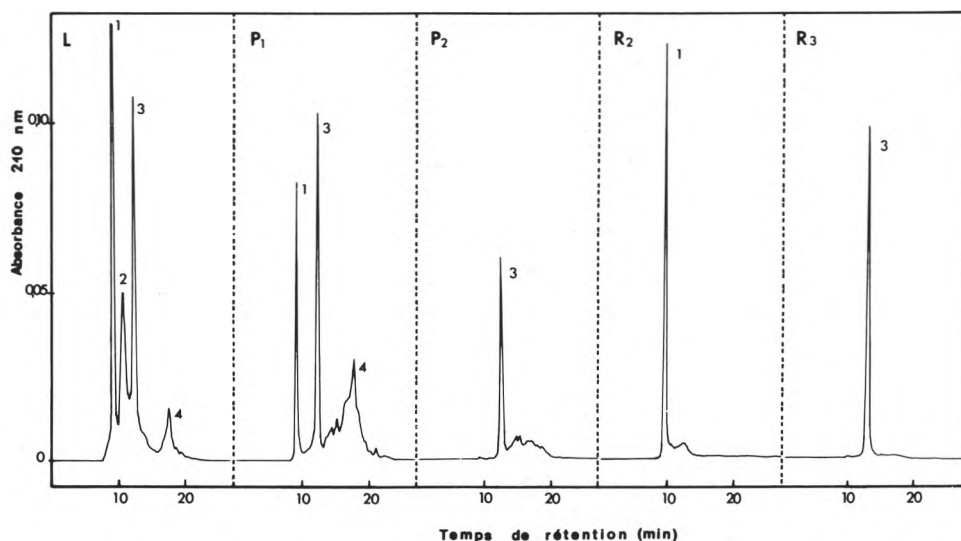


Fig. 3. Analyse HPLC en gel filtration des produits séparés. Elution par KH_2PO_4 0,01 M pH 2,2. Débit $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Détection à 210 nm. L : lait humain écrémé; P1 : perméat 1; P2 : perméat 2; R2 : rétentat 2; R3 : rétentat 3; 1 : exclusion; 2 : caséines; 3 : α -lactalbumine; 4 : fractions peptidiques.

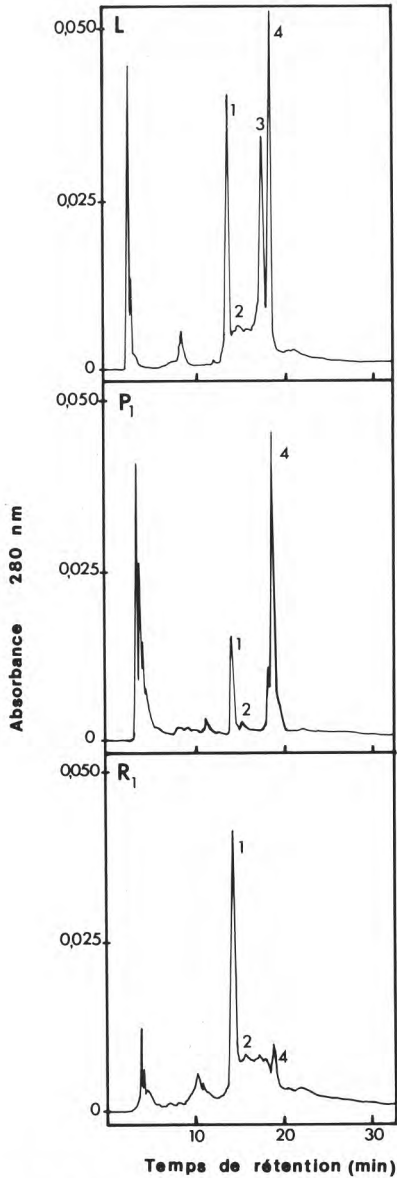


Fig. 4. Analyse HPLC en phase inverse des produits séparés par microfiltration. Elution par un gradient de 30 à 90% de tampon B en 30 min (tampon A : eau TFA 0,1%; tampon B : eau-acétonitrile (20/80)-TFA 0,1%). Débit 1 ml.min⁻¹. Détection à 280 nm. L : lait humain écrémé; P1 : perméat 1; R1 : rétentat 1; 1 : lactoferrine; 2 : sérum albumine; 3 : caséines; 4 : α -lactalbumine.

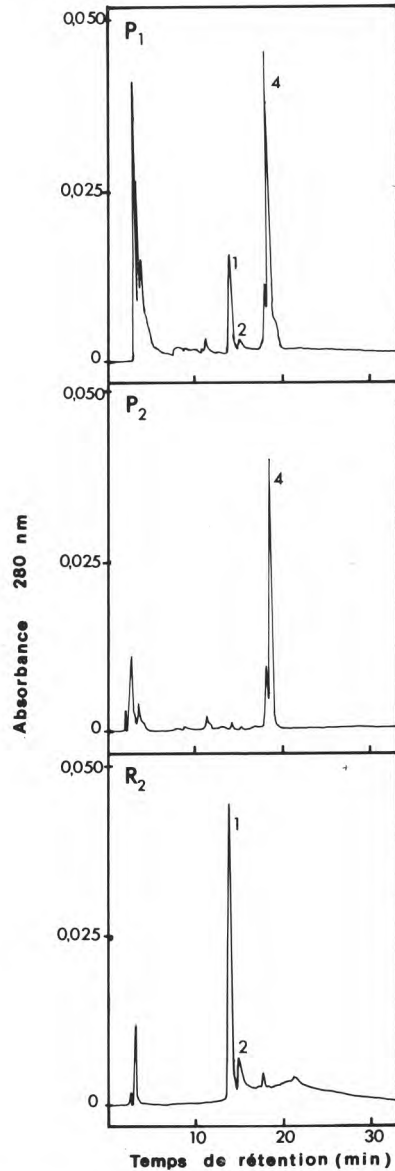


Fig. 5. Analyse HPLC en phase inverse des produits séparés par ultrafiltration sur membrane Romicon PM 100. Elution par un gradient de 30 à 90% de tampon B en 30 min (tampon A : eau-TFA 0,1%; tampon B : eau-acétonitrile (20/80)-TFA 0,1%). Débit 1 ml.min⁻¹. Détection 280 nm. P1 : perméat 1; P2 : perméat 2; R2 : rétentat 2; 1 : lactoferrine; 2 : sérum albumine; 4 : α -lactalbumine.

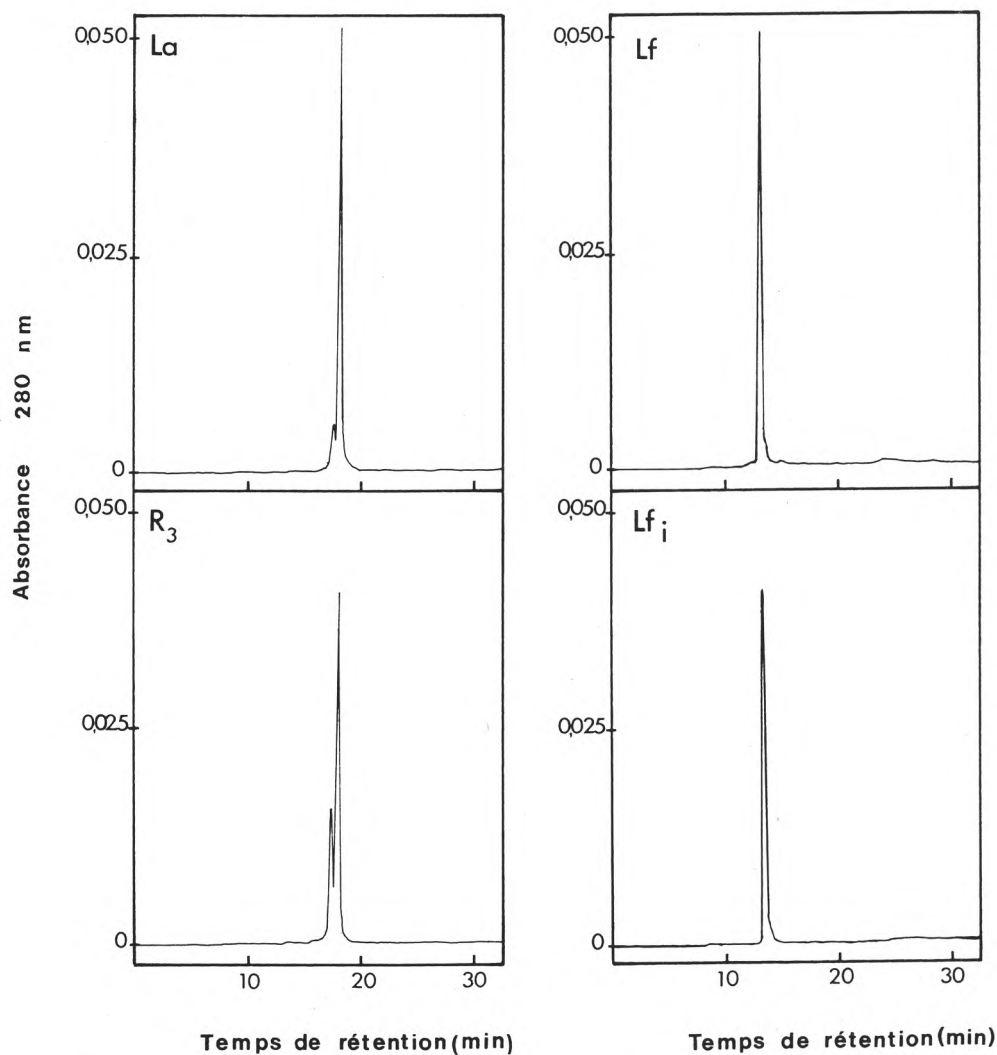


Fig. 6. Analyse HPLC en phase inverse du rétentat 3 et de la lactoferrine isolée par chromatographie d'échanges d'ions. Elution par un gradient de 30 à 90% de tampon B en 30 min (tampon A : eau-TFA 0,1%; tampon B : eau-acétonitrile (20/80)-TFA 0,1%). Débit 1 ml.min⁻¹. Détection à 280 nm. La : α -lactalbumine étalon; R₃ : rétentat 3; Lf : lactoferrine étalon; Lf_i : lactoferrine purifiée.

Discussion

Grâce à l'emploi combiné de membranes de microfiltration et d'ultrafiltration présentant différents seuils de coupures, les 2 protéines majeures du lactosérum humain peuvent être séparées et purifiées sans que la capacité de séquestration du fer de la lactoferrine en soit apparemment affectée. Il est à noter que le procédé proposé permet également de récupérer, sous une forme plus ou moins purifiée, d'autres

composants du lait tels que caséines et protéines de poids moléculaires élevés dans le rétentat 1, et peptides glycosylés ou non dans le perméat 3. Ce dernier pourrait être soumis à une nouvelle ultrafiltration sur membranes ayant un seuil de coupure faible.

Si la membrane Carbosep M14 est à peu près satisfaisante pour la séparation de l' α -lactalbumine (taux de rétention variant entre 30 et 40%), elle est loin de l'être pour la séparation de la lactoferrine

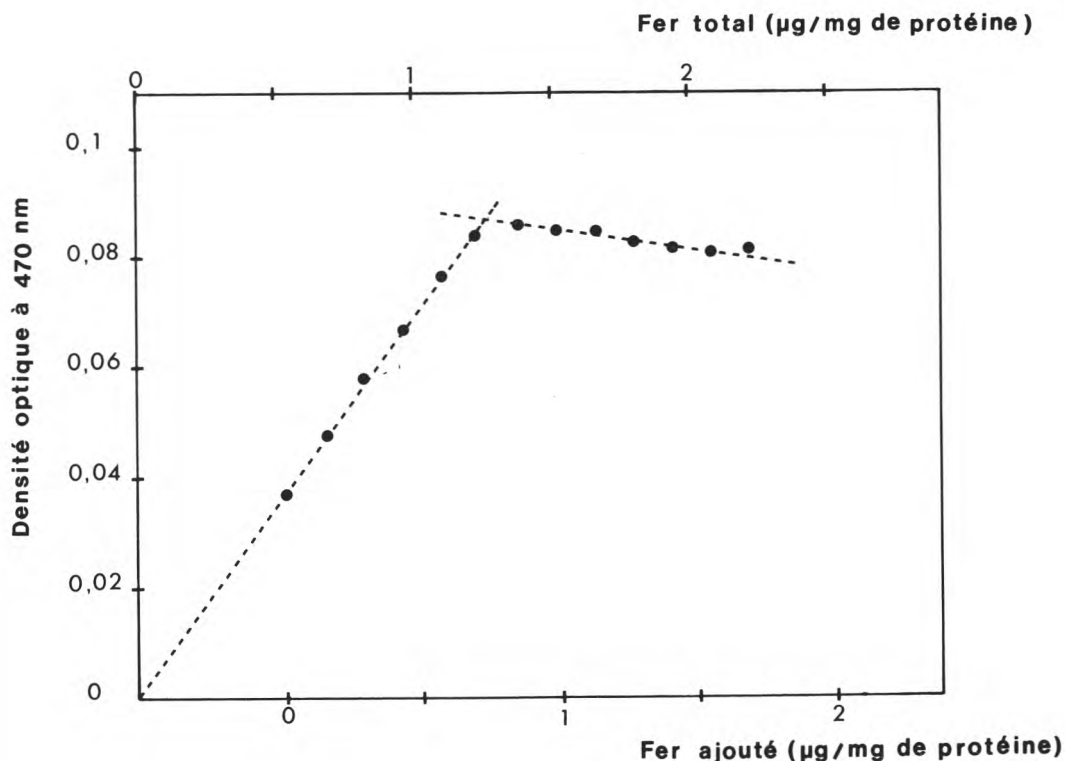


Fig. 7. Saturation de la lactoferrine humaine par addition progressive d'une solution de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 0,2 mM dans HCl 0,01 M. Détection à 470 nm.

(taux de rétention égal ou supérieur à 60%). L'emploi de membranes ayant un diamètre de pores supérieur à celui de la membrane M14, combiné avec une mise en circulation du microfiltrat dans son compartiment comme proposé par Alfa-Laval (brevet 75 04479-75 38098) devrait améliorer le taux de perméation de la lactoferrine.

Le rétentat 2, résultant de l'ultrafiltration sur membrane Romicon PM 100, contient principalement de la lactoferrine (24-27%) mais également de la sérum albumine.

En raison des masses moléculaires très proches de ces 2 protéines (76 400 et 68 000 D respectivement), il s'avère difficile de les séparer par des méthodes de filtration différentielle.

La mise en œuvre d'un procédé chromatographique, utilisant la propriété basique de la lactoferrine, nous a permis de purifier cette protéine. Le profil chromatographique obtenu en phase inverse et l'électrophorèse en SDS nous montrent une homogénéité de la lactoferrine obtenue (Fig. 2, Lfi). Elle contient 0,75 μ mole de fer/ μ mole de protéine, ce qui représente une saturation de 37%, valeur supérieure à celle indiquée par Reiter (1984). Bien qu'un maximum de précautions ait été pris lors du processus d'obtention, il est possible que des ions ferriques aient été fixés lors des différentes manipulations à partir du matériel utilisé (écrémeuse, microfiltre, ultrafiltre).

La lactoferrine obtenue fixe 0,96 μ mole de fer/ μ mole de protéine (Fig. 7), ce qui, ajouté aux 0,75 μ mole fixées initialement, représente une capacité de fixation globale de 1,71 μ mole/ μ mole de protéine, soit 85% de la capacité théorique. La différence peut être due soit à des incertitudes sur les déterminations effectuées, soit plus vraisemblablement aux traitements subis par le lait avant utili-

sation : congélation à -20°C pendant plusieurs mois et décongélation, matériaux de stockage (Goldblum *et al.*, 1981).

L' α -lactalbumine obtenue dans le rétentat 3 est homogène en électrophorèse SDS (Fig. 2, R3). En revanche, la chromatographie en phase inverse révèle la présence de 2 pics. Cette hétérogénéité de l' α -lactalbumine humaine a déjà été mise en évidence par Prieels et Schlusberg (1977). Différentes hypothèses ont été proposées : présence de formes glycosylées, variations génétiques, interactions avec le support chromatographique et les ions du tampon, conduisant à une ou plusieurs modifications conformationnelles. Si tel était le cas, des méthodes fines de séparation chromatographique devraient être mises en œuvre pour préciser les propriétés de chacune des fractions. Cependant, comme pour la lactoferrine, il n'est pas certain que cette étape de séparation supplémentaire se justifie sur le plan de l'éventuelle utilisation thérapeutique de l' α -lactalbumine.

Références

- Arnold R.R., Brewer M. & Gauthier J.J. (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin : sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28, 893-898
- Arnold R.R., Russel J.E., Champion W.J., Brewer M. & Gauthier J.J. (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin : differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.* 35, 792-799
- Arnold R.R., Russel J.E., Champion W.J. & Gauthier J.J. (1981) Bactericidal activity of human lactoferrin : influence of physical conditions and metabolic state of target microorganism. *Infect. Immun.* 32, 655-660
- Barrois V., Junod M. & Larouze B. (1982) Organisation d'un lactarium en 1982. *Ann. Pédiatr.* 29, 489-493
- Blackberg L. & Hernell O. (1980) Isolation of lactoferrin from human milk whey by a single

- chromatographic step. *FEBS Lett.* 109, 180-184
- Blanc B. & Isliker H. (1961) Isolement et caractérisation de la protéine rouge sidérophile du lait maternel : la lactotransferrine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 43, 929-943
- Bullen J.J., Rogers H. J. & Leigh L. (1972) Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br. Med. J.* 1, 69-74
- Findlay J.B.C. & Brew K. (1972) The complete amino-acid sequence of human alpha-lactalbumin. *Eur. J. Biochem.* 27, 65-86
- Foley A.A. & Bates G.W. (1987) The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal. Biochem.* 162, 296-300
- Forsum E. (1975) Determination of alpha-lactalbumin in human milk. *J. Dairy Sci.* 59, 14-18
- Goldblum R.M., Garza C., Johnson C.A., Harrist R., Nichols B.L. & Goldman S. (1981) Human milk banking. I. Effects of container upon immunologic factors in mature milk. *Nutr. Res.* 1, 449-459
- Graham G. & Bates G.W. (1976) Approaches to the standardization of serum unsaturated iron-binding capacity. *J. Lab. Clin. Med.* 88, 477-486
- Groves M.L. (1965) Preparation of some iron-binding proteins and alpha-lactalbumin from bovine milk. *Biochim. Biophys. Acta* 100, 154-162
- Kawakami H., Shinmoto H., Dosako S. & Sogo Y. (1987) One step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *J. Dairy Sci.* 70, 752-759
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lonnerdal B., Carlsson J. & Porath J. (1977) Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography. *FEBS Lett.* 75, 89-92
- Lonnerdal B. & Glazier C. (1985) Calcium binding by alpha-lactalbumin in human milk and bovine milk. *J. Nutr.* 115, 1209-1216
- Masson P.L. & Heremans J.F. (1968) Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein). The involvement of bicarbonate in the reaction. *Eur. J. Biochem.* 6, 579-584
- Maubois J.L. (1987) Industrial fractionation of main whey proteins. *Bull. Fed. Int. Lait.* 212, 154-159
- Maubois J.L. (1984) Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Lait* 64, 485-495
- Maubois J.L. & Brulé G. (1982) Utilisation des techniques à membrane pour la séparation, la purification et la fragmentation des protéines laitières. *Lait* 62, 484-510
- Maynard F., Pierre A. & Maubois J.L. (1988) Procédé de fractionnement des protéines du lait humain, conduisant à la production notamment de lactoferrine et d' α -lactalbumine et produits obtenus. Demande de brevet français n° 88.07122 du 27.5.88
- Mogilevsky N., Retegui L.A. & 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
- Montreuil J., Tonnelat J. & Mullet S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim. Biophys. Acta.* 45, 413-421
- Oram J.D. & Reiter B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and iron-chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 170, 351-365
- Phillips N.I. & Jenness R. (1971) Isolation and properties of human alpha-lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 229, 407-410
- Prieels J.P. & Schlusberg J. (1977) Heterogeneity in alpha-lactalbumins. 1. Human alpha-lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 491, 76-81
- Querineau P., Masson P.L. & Heremans J.F. (1971) Molecular weight, single-chain structure and amino acid composition of human lactoferrin. *Eur. J. Biochem.* 20, 420-425
- Reiter B. (1984) Role of nonantibody proteins in milk in the protection of the newborn. In : *Human Milk Banking* (A.F. Williams & J.D. Baum, eds.), Nestlé nutrition workshop series, vol. 5, Raven Press, New York, pp. 29-53
- Spackman D.H., Stein W.H. & Moore S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190-1206