



저온에서 *Rhodococcus erythropolis* 균주로부터 재조합 젖소 Lactoferrin과 Lactoferrin N-lobe의 발현

김완섭* · 김거유¹ · 권일경¹ · 고준수¹

일본산업기술종합연구소 유전자발현공학연구실, ¹강원대학교 축산식품과학과

Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin and Lactoferrin N-lobe in *Rhodococcus erythropolis* at Low Temperature

Woan-Sub Kim*, Gur-Yoo Kim¹, Ill-Kyung Kwon¹ and Juhn-Su Goh¹

Proteolysis and Protein Turnover Research Group, Research Institute of Genome-Based Biofactory,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

¹Department of Animal Food Science and Technology, Kangwon National University

Abstract

Lactoferrin is a member of the transferrin family of iron-binding glycoproteins. It is originally found in milk. In addition to its antibacterial and antiviral activities, lactoferrin has many other biological functions include anti-inflammatory properties, antitumor, cell growth-promoting activity as well as antioxidant effect. In the present study, we report the production of recombinant bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe in the *Rhodococcus erythropolis* (*R. erythropolis*) using pTip vector. The expression level was investigated in various range of temperature, and we could successfully expressed the bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe in *R. erythropolis* at low temperature. The recombinant proteins were purified by Nickel-Nitrotri-acetic acid (Ni-NTA). The purified proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blot, which indicating that the recombinant proteins have a molecular weight of 80 kDa and 43 kDa for bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe, respectively.

Key words : lactoferrin, milk protein, *Rhodococcus*

서 론

락토페린은 1939년 Sorensen에 의해 발견된 이후, 여러 분야에서 연구되고 있으며, 많은 연구결과가 발표되고 있다. 이 의미는 락토페린의 다양한 기능이 아직 전부 밝혀지지 않은 것을 말한다. 락토페린은 철 결합성 당단백질로, 눈물, 콧물, 침, 담즙 및 정액 등에서도 확인할 수 있다(Masson et al., 1966; Nuijens et al, 1996). 락토페린의 농도는 동물의 종에 따라 크게 다르다. 예를 들면, 모유의 경우는 보통 2~3 mg/mL

가 함유되어 있고, 특히 초유에 있어서는 5~7 mg/mL 정도로 그 함량이 많이 포함되어 있다(Nagasawa et al., 1972). 우유 속에는 0.02~0.2 mg/mL의 함량이 포함되어 있으며, 그밖에 마우스와 말에서 0.2~2 mg/mL, 그리고 랫트, 토끼 및 개의 유즙에서 0.05 mg/mL 이하로 함유되어 있다(Masson and Heremans, 1971). 지금까지 락토페린은 다양한 학문 분야에서 연구된 결과, 다기능을 가지고 있는 것이 밝혀졌다. 락토페린의 기능으로서는 항균활성, 항바이러스, 항진균, 항염증, 항산화, 항암 그리고 일부 유산균의 생장촉진효과 등이 알려져 있다(Arnold et al., 1980; Ellison 1994; Kim et al., 2004; Shimazaki 2000). 그동안 생리활성 기능이 뛰어난 락토페린의 재조합 생산 연구는 대장균을 비롯하여 여러 숙주로부터 실시되었다(Weickert et al., 1996). 그러나 대장균 내에서 발현시켜 얻은 락토페린은 쉽게 불용성이 되므로 활성이 있는 단백질을 얻기는 어려운 것으로 보고되어져 왔다. 그래서

* Corresponding author : Woan-Sub Kim, Proteolysis and Protein Turnover Research Group, Research Institute of Genome-Based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohiraku, Sapporo 062-8517, Japan. Tel: 81-11-857-8935, Fax: 81-11-857-8980, E-mail: wwsskim@hotmail.com

많은 연구자들은 숙주의 대상을 식물 또는 곤충세포로 대체 하였으나, 이들 숙주는 형질전환에서 재조합 단백질을 얻기 까지 많은 시간이 소요되며, 발현량도 미량의 수준을 벗어나 지 못하고 있다. 따라서 본 연구는 이러한 문제점들을 해결 하기 위해서 숙주의 대상을 토양균(*Rhodococcus* 속)으로 선택하였다. *Rhodococcus* 균은 *Streptomyces* 속 및 *Corynebacterium* 속과 상당히 높은 상동성을 가지고 있고, 그람 양성균 이며, G+C 함량이 높고, 성장가능 온도는 4~35°C로 있다 (Yagafarova and Skvortsova, 1996). 이 균주로부터 재조합 젓 소 락토페린과 락토페린 N-lobe의 생산을 시도 하였다. 또한 이 균의 낮은 성장온도에 착안하여 저온에서 재조합 젓소 락토페린과 락토페린의 N-lobe의 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

벡터

Tip vector는 젓소 유래의 락토페린과 그의 단편으로 있는 N-lobe의 발현을 위해서 사용하였다. C-terminal에는 정제를 쉽게 하기 위해서 6×His를 붙였다.

제한효소 및 균주

실험에 사용된 제한효소들은 New England BioLabs에서 구입하여 사용하였고, 항생물질들은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, 세균의 배양을 위한 배지 구성 성분들은 Difco Lab.(USA)에서 구입하여 사용하였다. *E. coli* XL1-blue (Stratagene, CA)는 서브클로닝과 벡터의 증식을 위하여 이용하였고, *Rhodococcus erythropolis*는 발현을 위한 숙주세포로서 이용하였다. *R. erythropolis*의 competent cell은 Shao등(1995)이 보고한 방법에 따라 제조하였다.

젓소의 락토페린 발현벡터의 구축

젓소의 락토페린의 cDNA는 Nakamura 등(2001)의 방법에 따라 획득하였다. 젓소의 락토페린과 N-lobe는 시그널 펩타이드를 포함시킨 것과 포함하지 않은 primer를 이용하여 증폭시켰다(Table 1). 즉, primer의 설계는 P1과 P3(시그널펩타

Table 1. Sequences of synthesized oligonucleotide primer used in PCR amplification of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe

Primer	Sequence
P1	5'-GGGTCATGAAGCTCTTCGTCCCCGCC-3'
P2	5'-GGGTCATGAGCGCCCCGAGGAAAAACG-3'
P3	5'-ACGTCGACCCCTCGTCAGGAAGGCGCAG-3'
P4	5'-ACGTCGACCCCTGGTGTACCGCGCCTTC-3'

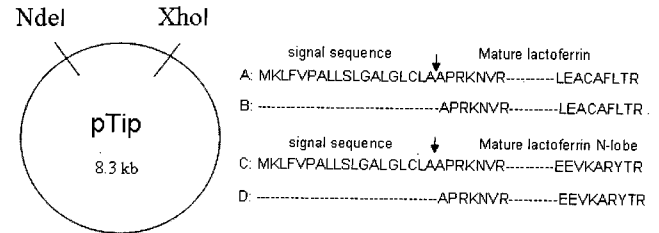


Fig. 1. Constructs designed to express bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe cDNA (with or without signal sequence) in *R. erythropolis*. A; Bovine lactoferrin (with signal sequence), B; Bovine lactoferrin (without signal sequence), C; Bovine lactoferrin N-lobe (with signal sequence), D; Bovine lactoferrin N-lobe (without signal sequence).

이드 함유), P2와 P3(시그널펩타이드 미함유), P1과 P4(시그널펩타이드 함유 N-lobe) 그리고 P2와 P4 (시그널펩타이드 미함유 N-lobe)로서 이용하였다. Forward primer는 BspHI site의 제한효소를 함유하였다. 그리고 reverse primer는 SalI site를 함유시켰다. 증폭된 PCR산물들은 위의 두 제한효소로 잘랐고, Tip vector는 Nde I 과 Xho I site를 잘랐다. 그리고 잘려진 Tip vector에 각각의 증폭된 PCR산물을 삽입하였다 (Fig. 1).

배지 및 성장조건

E. coli XL1-blue는 ampicillin(50 µg/mL)을 함유한 LB plate 또는 LB broth (1% Tryptone, 0.5% Yeast extracts, 1% NaCl, pH 7.0)에서 37°C로 배양하였다. *R. erythropolis*는 chloramphenicol(30 µg/mL)을 함유한 LB plate 또는 LB broth에서 다양한 온도(15~30°C) 범위에서 배양하였다.

*R. erythropolis*의 형질전환

재조합 발현벡터는 먼저 *E. coli* XL1-blue에 형질전환 후, 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 세포들을 원심 분리하여 모은 후, QIAGEN plasmid kit를 이용하여 plasmid DNA를 정제하였다. 정제된 plasmid들은 colony PCR 그리고 DNA sequence를 행한 후, 정확히 삽입된 plasmid를 선택하였고, 선택된 plasmid는 발현세포로 있는 *R. erythropolis*에 gene pulser 기계를 이용하여 형질 전환하였다. 형질 전환된 세포는 30°C에서 2시간 정도 회복시킨 후, LB plate(+Chl.)에 도말한 뒤, 30°C의 온도에서 colony가 형성될 때까지 배양하였다. 형성된 colony는 10 mL의 LB broth(+Chl.)내에서 배양 후, 흡광도 (OD)가 1에 도달하였을 때, thiostrepton(최종농도 1 µg/mL)을 첨가하여 재조합 젓소 락토페린과 락토페린 N-lobe의 생산을 유도하였다. 유도 20시간 후, 세포들은 원심분리에 의해서 얻었고, Phosphate buffered saline(PBS; pH 8.0)에 다시 현탁한 후, 비즈를 동량 넣고 Multi beads shocker(Yasui kikai

Co., Japan)를 이용하여 세포를 파괴한 후, 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질들은 Ni-NTA 정제 담체와 1시간 결합시킨 후, PBS(pH 6.3)로 3회 세정 후, 0.1M EDTA 용액 30 μ L를 넣고 단백질을 용출시켰다. 얻어진 재조합 락토페린은 SDS-PAGE와 Western blot을 이용하여 확인하였다.

전기영동 및 Western blot

전기영동은 Lamli(1970)의 방법에 따라 수행하였다. 각각의 재조합 단백질들은 분자량 marker와 더불어 10% SDS-polyacrylamide gel에 영동하였다. 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue (CBB) X에 염색하였다. Western blot은 위와 같이 전기영동한 단백질을 Bio-Rad사의 Semi-Dry Transfer 장치를 이용하여 cellulose membrane에 흡착시킨 후, 준비된 blocking buffer(7% skim milk)에 넣어 실온에서 1시간 교반하였다. 처리된 막은 TBST buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3 , 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 10분씩 3회 세정 후, 1차 항체인 anti-His 항체 (Covance, Co., USA)를 (1:1000)실온에서 1시간 반응시켰다. 그리고 다시 TBST buffer로 10분씩 3회 세정 후, alkaline phosphatase(AP)로 표지된 anti-mouse IgG 항체(Promega, Co., USA)(1:7500)를 실온에서 30분간 반응시켰다. TBST buffer로 10분씩 3회 세정 후, 막의 단백질은 AP buffer에 AP의 발색 기질로 있는 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)와 NBT(nitro blue tetrazolium)(Promega, Co., USA)의 첨가에 의해서 발색시켰다.

재조합 단백질의 정량

R. erythropolis 균으로부터 생산된 재조합 젖소 lactoferrin과 lactoferrin N-lobe의 정량은 standard로서 bovine serum albumin과 함께 Bio-Rad사의 시약을 이용한 Lowry 등의 방법(1951)에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

R. erythropolis 균에서 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe의 발현에 있어서 상류에 존재하는 시그널펩타이드가 영향을 끼치는지에 대해 알아보기 위해서 플라스미드를 Fig. 1과 같이 구축하였다. 즉, 시그널 펩타이드가 포함된 젖소 락토페린 cDNA(Fig. 1-A)와 포함시키지 않은 젖소 락토페린 cDNA(Fig. 1-B) 두 그룹과 시그널 펩타이드가 포함된 젖소 락토페린 N-lobe cDNA(Fig. 1-C)와 포함시키지 않은 N-lobe cDNA(Fig. 1-D) 두 그룹으로 나누어 준비하였다. Fig. 2는 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe가 thioestrepton에 의해서 발현이 유도되는지를 전기영동과 Western blot 분석을 통해 확인한 결과이다. Thioestrepton을 첨가하여 단백질을

유도한 세포에서는 재조합 단백질들이 발현되었고(Fig. 2. 1과 3), 첨가하지 않은 세포에서는 이들 재조합 단백질들의 발현이 유도되지 않았다(Fig. 2. 2와 4). 이들 결과로부터 단백질 발현에 이용하기 위하여 구축된 플라스미드들은 thioestrepton에 의해서 발현이 정확히 조절됨을 확인하였다. 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe의 발현은 LB 배지(+Chl.) 위에 형성된 재조합 락토페린 콜로니(colony)와 락토페린 N-lobe의 콜로니를 다섯 개씩 선발하여 재조합 단백질의 발현량을 조사하였다. 단백질의 유도는 thioestrepton(최종 농도 1 μ g/mL)으로 OD가 1에 도달하였을 때, 첨가시켜 유도를 하였다. 그리고 20시간 배양 뒤 단백질을 세포로부터 회수하여 정제하였다. 배양 온도는 숙주 세포의 최적 배양온도인 30°C에서 수행하였고(Fig. 3), 또한 단백질의 생산량이 온도에 따라 변화할 수 있기 때문에 가용성 단백질의 생산을 더욱 높이기 위해, 저온인 15°C(Fig. 4)에서도 단백질을 발현시켰다. 단백질의 정제는 비변성 조건과 변성 조건(8 M urea)으로 수행하였다. Fig. 3은 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe를 30°C에서 각각 시그널 펩타이드를 함유한 것과 함유하지 않은 플라스미드를 숙주세포에 형질전환하고 배양, 유도한 후, 비변성 조건과 변성조건으로 정제하여 전기영동과 Western blot 분석을 한 결과를 나타내었다. 30°C에서 재조합 락토페린의 발현은 시그널펩타이드를 함유한 플라스미드와 함유하지 않은 플라스미드 모두 비변성 조건에서는 정제되지 않았다. 그러나 변성조건에서는 조금 정제되었다(Fig. 3-A). 따라서 젖소 락토페린의 경우 30°C에서 단백질의 발현은 대부분 불용성이 되어 버리는 것이 관찰되었다. 한편, 락토페린 N-lobe의 경우, 30°C에서 재조합 단백질들은 비변성조건과 변성조건 모두에서 정제가 가능하였고, 시그

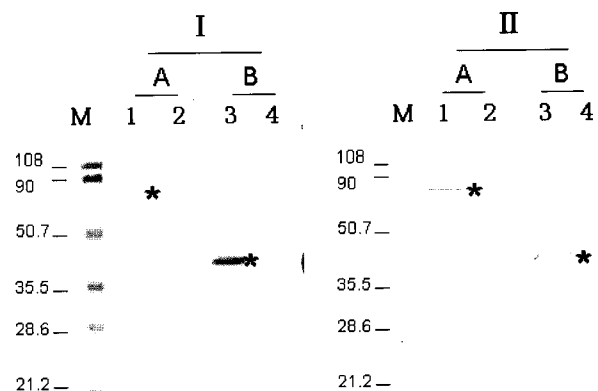


Fig. 2. Expression and purification of the recombinant bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe. Induction was performed with thioestrepton (lane 1 and 3) and without thioestrepton (lane 2 and 4) addition. I; SDS-PAGE, II; Western blot, M; Molecular weight.

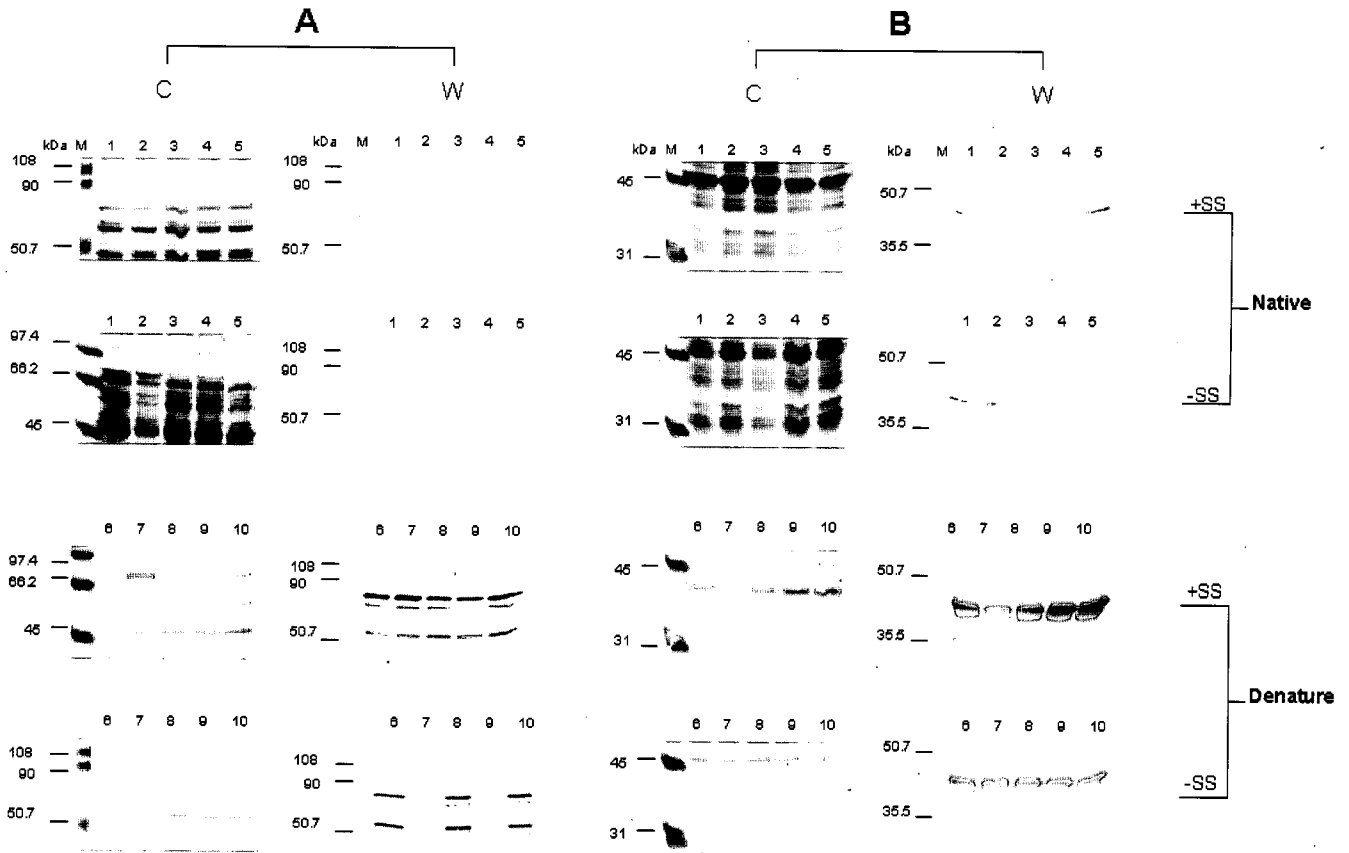


Fig. 3. SDS-PAGE and Western blot analysis of eluted native or denature recombinant bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe from the cell extracts (Growth temperature 30°C). A; recombinant bovine lactoferrin, B; recombinant bovine lactoferrin N-lobe, C; Coomassie brilliant blue, W; Western blot, M; Molecular weight, +SS; with signal sequence, -SS; without signal sequence, lanes 1~5; protein extracts from rBLF clone, lanes 6~10; protein extracts from rBLf N-lobe clone.

날 펩타이드의 유무에 따른 발현 량의 차이는 나타내지 않았다(Fig. 3-B). 그러나 비변성 조건보다 변성조건에서 정제된 양이 많으므로 역시, 이 온도에서는 젖소 락토페린과 마찬가지로 가용성 단백질보다는 불용성 단백질이 될 확률을 높게 나타내었다.

Rhodococcus 균의 장점은 저온에서도 생장이 가능하므로 이들 단백질의 생산에 있어 숙주세포로 있는 *R. erythropolis* 균이 저온에서도 단백질을 발현할 수 있는지를 확인하였다. Fig. 4는 15°C에서 균을 배양하면서 단백질을 유도한 후, 비변성 조건과 변성 조건하에서 정제한 결과들을 나타내고 있다. 이 온도에서 재조합 젖소 락토페린의 발현은 변성조건 뿐만 아니라 비변성 조건에서도 정제하였다. 더욱이 비변성 조건에서는 시그날 펩타이드의 함유한 것보다는 함유하지 않은 플라스미드에서 정제된 양이 많았다(Fig. 4-A). 그 이유에 대해서는 밝혀내지 못했다. 한편, 15°C에서 재조합 락토페린 N-lobe의 경우, 비변성조건과 변성조건 모두에서 단백질이 정제되었으며, 특히 비변성 조건에서 정제된 양을 30°C에서 정제된 재조합 젖소 락토페린 N-lobe의 양보다는 높게

관찰되었다(Fig. 4-B). 반대로 변성조건에서 정제된 양은 더욱 낮게 나타내었다. 따라서 우리들은 이들 결과로부터 저온에서 단백질의 발현은 불용성 단백질이 되기보다는 가용성 단백질로 유도될 가능성이 크다는 것을 관찰하였을 뿐만 아니라 저온에서 동일 배양시간과 동일 유도시간을 통해서 정제된 단백질의 양을 30°C에서 발현시킨 재조합 단백질과 비교하였을 때, 저온에서는 세포의 배양이 늦음에도 불구하고 정제된 재조합 단백질의 양은 동일하거나 조금 많이 정제된 것이 관찰되었다. 본 연구 결과에는 나타내지 않았지만, 우리들은 두 온도 범위 이외에도 20°C와 25°C에서도 단백질의 발현을 측정하였는데 이들 결과 역시 온도가 낮을수록 가용성 단백질의 양이 증가하였다.

저온에서의 단백질의 발현 목적은 재조합 단백질의 분해 및 변형을 방지하는 중요한 기능이 있다. 기존의 대장균 숙주를 이용한 단백질의 생산은 발현된 단백질의 접힘(folding) 현상이 제대로 이루어지지 않아 활성을 나타내지 않는 경우가 많고, 생산된 단백질이 독성을 나타내어 세포 자체의 성장을 저해하기 쉽다. 그리고 37°C에서 단백질을 발현할 때

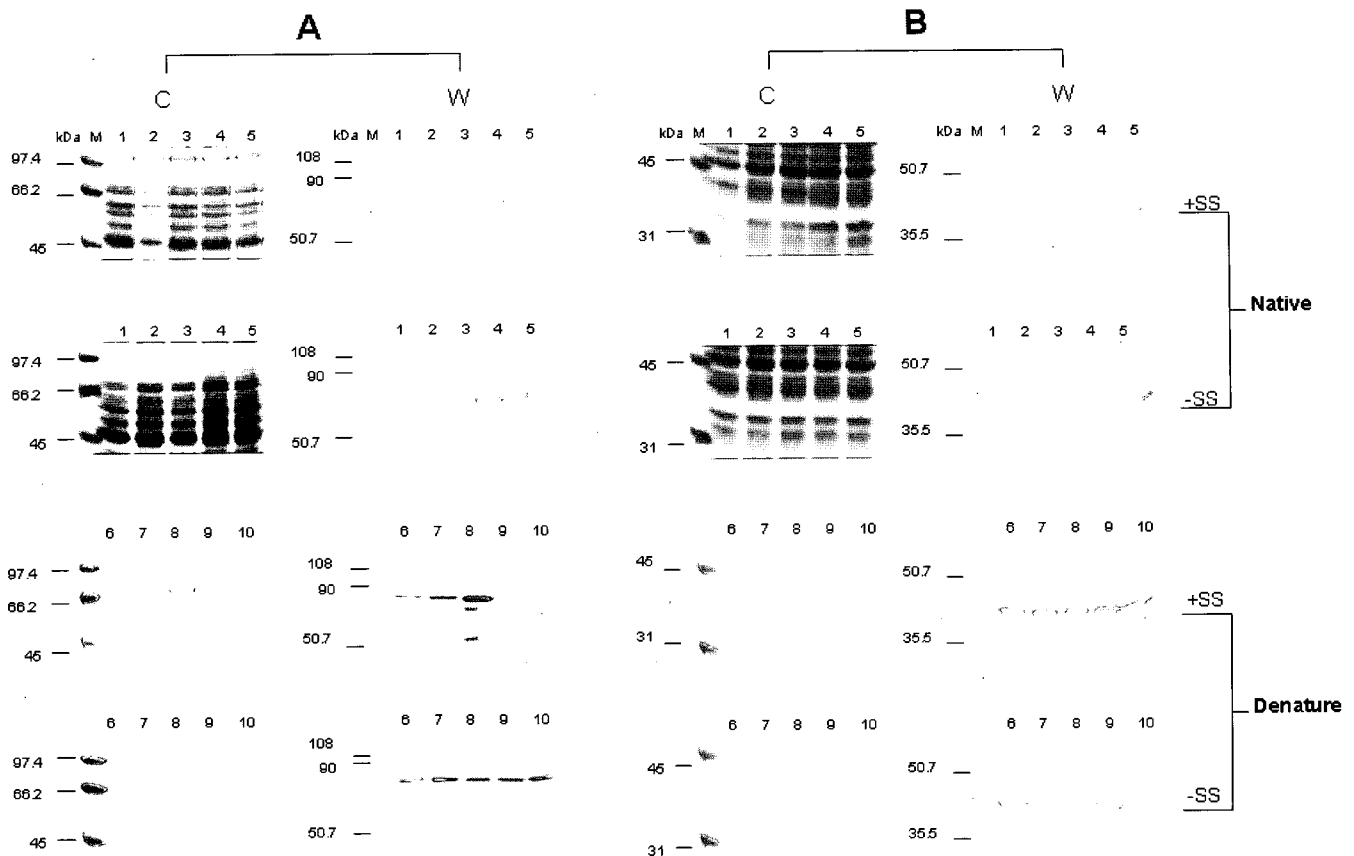


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blot analysis of eluted native or denature recombinant bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe from the cell extracts (Growth temperature 15°C). A; recombinant bovine lactoferrin, B; recombinant bovine lactoferrin N-lobe, C; Coomassie brilliant blue, W; Western blot, M; Molecular weight, +SS; with signal sequence, -SS; without signal sequence, lanes 1~5; protein extracts from same clone, lanes 6~10; protein extracts from rBLf N-lobe clone.

재조합 단백질의 과다 발현으로 불용성 단백질을 형성하는 경우가 많다. 따라서 재조합 기술의 향상은 한정된 유용단백질의 대량 생산을 할 수 있게 함과 동시에 단백질을 생산할 때 앞서 설명된 여러 가지 장애 요소로부터 안전성을 유지할 수 있고, 산업적으로는 고부가가치를 창출할 수 있을 뿐만 아니라, 재조합 단백질 생산 기술의 개발은 국가 경쟁력을 강화하는데 중요한 분야라고 생각한다. 재조합 단백질의 발현 양상은 숙주 세포나 목적으로 하는 생산물 종류에 따라 달라 목적으로 하는 생산물에 가장 적합한 발현 시스템을 선택해야 효율적인 생산시스템을 구축할 수 있다. 따라서 저온에서도 생산 가능한 토양균으로 있는 *Rhodococcus* 균은 단백질의 발현 시 저온이므로 생산된 단백질이 분해되기 어려우며 단백질의 합성이 천천히 이루어짐으로서 단백질의 변형을 줄일 수 있는 장점이 있다. 이러한 점에서 *Rhodococcus* 균은 재조합 단백질의 발현에 적합한 균주로 있다고 사료된다.

최근, 재조합 단백질의 및 펩타이드는 대부분 생물 의약품으로 이용되고 있으며 주로 치료용으로 이용되고 있다. 락토페린은 항균, 항암, 항염증, 항산화, 항진균, 항바이러스 효과

등 여러 가지 생리적 기능을 가지고 있는데 젖 속에 포함되어 있는 양은 극히 한정되어 있다. 특히, 우유속의 락토페린의 양은 0.02~0.2 mg/mL 정도 밖에 함유되어 있지 않기 때문에 재조합 락토페린의 생산 필요성은 절실하다. 본 실험에서 *R. erythropolis* 균주가 생산한 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe는 각각 300 µg/mL와 500 µg/mL의 수준을 나타내었다. Wang 등(2002)은 *Pichia pastoris*에서 돼지 유래의 락토페린을 12 µg/mL을 생산하였다고 보고하였으며, Paramasivam 등(2002)은 같은 숙주에서 생산한 재조합 말 유래의 락토페린은 40 µg/mL의 양으로 생산되었다고 보고하였다. 따라서 우리들이 본 실험에서 이용한 *R. erythropolis* 균의 숙주는 다른 숙주에 비하여 재조합 단백질의 생산량이 높게 나타내었다. 전장의 락토페린보다 400배 이상의 항균활성을 나타내는 젖소 락토페린은 N-lobe에 존재하고 단백질 분해효소를 이용한 N-lobe의 분리는 어려운 것으로 알려져 있다. 젖소의 락토페린은 분자량 약 3,100 Da으로 아미노산 25개의 잔기로 구성되어 있다. 락토페린의 특성은 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해서 항균 활성을 나타내고 있지

만 장내 최우세균으로 있는 비피도박테리아에 대해서는 항균작용을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 N-lobe 단독의 재조합 단백질의 생산은 여러 분야에 있어서 그 이용 가치가 크게 기대된다.

요 약

락토페린은 트랜스페린 패밀리에 속하며, 철 결합성 당단백질로 대부분 포유동물의 젖에서 발견되고 있다. 락토페린의 생리학적 기능으로는 항균활성, 항바이러스활성, 항염증반응, 항암효과, 세포의 성장과 항산화 효과 등이 알려져 있다. 본 연구는 pTip vector를 이용한 *Rhodococcus erythropolis* (*R. erythropolis*) 숙주로부터 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe의 생산을 시도하였다. 이들 단백질의 발현은 다양한 온도 범위에서 발현시켰다. 그리고 *R. erythropolis*의 숙주 내에서 이들 단백질의 발현은 낮은 온도 내에서도 가능함을 보여주었다. 생산된 재조합 단백질들은 Ni-NTA 정제 담체를 이용하여 정제하였다. 정제의 방법은 비변성 조건과 변성조건으로 수행하였다. 그리고 정제된 재조합 젖소 락토페린과 락토페린 N-lobe는 SDS-전기영동과 Western blot분석을 통하여 확인하였다. 생산된 재조합 젖소 락토페린은 분자량 80 kDa, 그리고 락토페린 N-lobe가 43 kDa의 분자량을 나타내었다.

참고문헌

1. Arnold, R. R., Brewer, M., and Gauthier, J. J. (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* **28**, 893-898.
2. Ellison, III R. T. (1994) The effects of lactoferrin on gram negative bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357**, 71-79.
3. Kim, W. S., Tanaka, T., and Shimazaki, K. (2004) Transferrin family proteins bind to *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft* **59**, 491-494.
4. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) **227**, 680-685.
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
6. Masson, P. L., Heremans, J. F., and Dive, C. (1966) Studies of the proteins of secretions from two villous tumours

- of the rectum. *Gastroenterologia* **105**, 270-282.
7. Masson, P. L. and Heremans, J. F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **39B**, 119-129.
8. Nagasawa, T., Kiyosawa, I., and Kuwahara, K. (1972) Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.* **55**, 1651-1659.
9. Nakamura, I., Watanabe, A., Tsunemitsu, H., Lee, N. Y., Kumura, H., Shimazaki, K., and Yagi, Y. (2001) Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insert cells and its antimicrobial activity. *Protein Express. Purif.* **21**, 424-431.
10. Nuijens, J. H., van Berkel, P. H. C., and Schanbacher, F. L. (1996) Structure and biological actions of lactoferrin. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* **1**, 285-295.
11. Paramasivam, M., Saravanan, K., Uma, K., Sharma, S., Singh, T. P., and Srinivasan, A. (2002) Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **26**, 28-34.
12. Shao, Z., Dick, W. A., and Behki, R. M. (1995) An improved *Escherichia coli* *Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* spp. using electroporation. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 261-266.
13. Shimazaki, K. (2000) Lactoferrin: A marvelous protein in milk. *Animal Science J.* **71**(4), 329-347.
14. Sorensen, M. and Sorensen, S. P. L. (1938) The proteins in whey. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Ser. Chimique.* **23**, 55-99.
15. Wang, S. H., Yang, T. S., Lin, S. M., Tsai, M. S., Wu, S. C., and Mao, S. J. T. (2002) Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **25**, 41-49.
16. Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A., and Olins, P. O. (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 494-499.
17. Yagafarova, G. G. and Skvortsova, I. N. (1996) A new oil-oxidizing strain of *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **32**, 207-209.