

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

利用酵素水解豬血生產含生物活性胜肽且具生理機能性之 產品(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2214-E-002-025-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：蔣丙煌

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 10 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

☐ 成果報告
☒

期中進
度報告

利用酵素水解豬血生產含生物活性胜^o

且具生理機能性之產品

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 91－2214－E－002－025－

執行期間： 91 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔣丙煌

共同主持人：

計畫參與人員：魏任廷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

☐ 赴國外出差或研習心得報告一份

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐涉及專利或其他智慧財產權，☐一年☒二年後可公開
查詢

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中 華 民 國 九 十 二 年 五 月 三 十 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中精簡 報告

利用酵素水解豬血生產含生物活性胜^o

且具生理機能性之產品 (第一年)

Enzymatic hydrolysis of porcine blood to yield products containing
bioactive peptides and possessing healthy promoting functionalities (the
first year)

計畫編號：NSC 91-2214-E-002-025-

執行期限：91 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

主持人：蔣丙煌 教授 國立臺灣大學食品科技研究所

計畫參與人員：魏任廷 國立臺灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

豬隻全血液中約有 17 ~ 18 %之粗蛋白質，為一良好的動物性蛋白質來源。本研究室曾分別以豬血球、血漿、去纖維蛋白原血漿為受質，於幾種酵素組合下進行水解。其中以血球為受質，使用單一酵素 trypsin 水解 24 小時，可得到較佳之還原

力之水解物；使用 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 所組成的混合酵素水解，水解 6 小時，可得到較佳抑制 ACE 能力之水解物，IC₅₀ 為 0.58 mg/ml；水解 10 小時可得到較佳的清除 DPPH 自由基效果之水解物，其清除能力為 64.9%。本年度分別將上述具較佳還原力、清除 DPPH 自由基及抑制 ACE 能力之三水解液利用濾析

(Diafiltration)更進一步分成大於 10000、10000~3000、3000~1000、1000 Da 以下四個分子量區分，以探討水解液中主要貢獻生理活性之分子量範圍，除此之外，更進一步地測試水解液是否還有其他生理機能(如抑制腫瘤細胞增生)。初步結果顯示，水解液中較具還原力及清除 DPPH 自由基之 H° 分子量為 10000 Da 以上，而抑制 ACE 活性之分子量為 3000-10000 Da；於抑制腫瘤細胞增生上，對 B16F10、Hep G2 二種癌細胞並無顯著的抑制效果。

關鍵詞：豬血、酵素水解、生物活性 H° 、機能性

Abstract

Porcine blood contains 17~18% protein, is a good source of protein for food. In our previous study, hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma were prepared and hydrolyzed by proteases. Results showed that trypsin hydrolysate of red blood corpuscle had the highest reducing power after 24 hours hydrolysis. The hydrolysate produced by hydrolyzing red blood corpuscle with trypsin, chymotrypsin and thermolysin showed the highest ACE

台灣地區每年家畜屠宰量相當可觀。每頭豬隻採血量約三公升，全血液中約有 17-18% 為粗蛋白質[1]，為一良好的動物性蛋白質資源。目前除少部分豬血製成豬血糕、豬血塊供食用或做為肥料、飼料外，其餘大部分均以廢棄物方式處理。此不僅易造成環境污染，且為蛋白質資源之一大浪費。

近年來國人在藥補不如食補的觀念影響之下，保健食品的市場佔有率逐年提高，而動物性保健食品中以雞精類之產品最受國人的喜好。若以此產品的模式應用於其他動物蛋白質酵素水解物上，確立其生理功能後，應可開發更具價值之機能性食品。

利用各種動植物蛋白質生產生物活性 H° (bioactive peptides)已有相當多的研究，如：抗菌性 H° [2. 3. 4]、類鴉片 H° [5]、血管收縮素(ACEI) [6. 7.

inhibitory activity ($\text{IC}_{50} = 0.58 \text{ mg/ml}$) and the highest scavenging effect on DPPH (scavenging effect = 64.9%) after 6 hours and 10 hours hydrolysis, respectively. In this study, the hydrolysates were fractionated into four fractions (>10000, 10000-3000, 3000-1000, <1000 Da) by diafiltration, and the reducing power, DPPH radical scavenging and ACE inhibitory capabilities of each fraction were evaluated. Besides, we also examined if the bioactive peptides in hydrolysates may also possess other biological activities, such as anti-tumor activity. The preliminary result showed that the peptides with molecular weights higher than 10000 Da possessed stronger reducing power and DPPH scavenging activity. Moreover, the peptides with molecular weights between 3000 and 10000 Da had better ACE inhibitory capability. The hydrolysates did not show apparent anti-proliferative activity on the B16F10 and HepG2 tumor cell line.

Keywords: bioactive peptides, porcine blood, enzymatic hydrolysis, functionality

二、前言

8. 9]、免疫活性 H° [10]、抗氧化 H° [11. 12. 13. 14]、抗腫瘤等活性[15. 16. 17. 18]，由於豬血的蛋白質含量豐富具有生產生物活性 H° 的潛力，因此，本研究利用豬血為原料，以酵素水解方式生產生物活性 H° 。

豬血可離心分離成血球及血漿。由於血漿中的纖維蛋白原(fibrinogen)和凝血因子 VIII (Clotting Factor VIII) 對血友病患者治療有很高的利用價值，因此以冷凍沈澱法將其沈澱分離出來，而上清液仍含有大量的蛋白質，亦為本研究的酵素水解基質之一，再加上血球及血漿，分別以這三部分為酵素水解的基質，探討生產生物活性 H° 的可行性。於先前的研究[19]，以血球為受質，使用單一酵素 trypsin 水解 24 小時，可得到具有較佳還原力之水解液；使用 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 所組成的混合酵素水解，水解 6 小時，可

得到較佳抑制 ACE 能力之水解液， IC_{50} 為 0.58 mg/ml；水解 10 小時可得到較佳的清除 DPPH 自由基效果之水解液，其清除能力為 64.9%。

根據上述初步研究結果可知，豬血之水解產物具有抑制 ACE 活性(降低血壓)以及些微抗氧化功能。本計劃擬進一步提昇豬血水解產物之活性胜^o含量及生理機能性，另外，雖然先前之研究僅著重於豬血水解物之抗氧化及抑制 ACE 活性之功能，但是生物活性胜^o仍有其他重要的功能性，尤其是抗腫瘤及增強免疫能力之功能性，特別值得研究。因此，本研究計畫也將進一步探討如何利用酵素水解豬血，獲得具抗腫瘤及增強免疫能力之生物活性胜^o。本報告為三年期計畫之第一年，為了後續二年利用膜反應器提升產品之機能性胜^o含量，故本年進一步先利用濾析，將水解液區分成不同分子量，以了解主要功能性胜^o之分子量範圍，以作為後續膜反應器條件的選擇；此外，也初步以高轉移性及高侵犯力之老鼠黑色素瘤細胞 B16F10 及人類肝癌細胞 HepG2 抗腫瘤活性測試水解液之抗腫瘤活性。

三、研究方法

℃ 加熱 5 分鐘，使水解酵素失活，並離心(23400× g) 15 分鐘，上清液於 4℃ 儲存備用。

(3)游離胺基酸及複合胺基酸分析[21]

0.3 ml 10% 5-sulfosalicylic acid (SSA) 加入 1.2 ml 水解液，於 4℃ 下靜置 30 min 後，4℃ 下離心(6000×g)10 分鐘。上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，並以高效胺基酸分析儀分析(Beckman 6300, Fullerton, CA, USA)。

(4)清除 DPPH 自由基測試[22]

首先取 1 ml 樣品，加入 4 ml 75 μM 的 DPPH(甲醇溶液)，充分混合下靜置 60 min，然後在波長 517 nm 處檢測其吸光值，並以 α-tocopherol 及 BHT 作正控制組。

$$\% \text{ Inhibition} = (A_0 - A - A_S) / A_0 \times 100\%$$

A_0 反應前吸光值

A 反應後(添加萃出物)吸光值

A_S 萃出物本身的吸光值

(5)還原力測試[23]

取 0.5 ml 不同水解時間之水解物，加入 0.5 ml 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.6) 及 0.5ml 0.1% Potassium ferricyanide，於 50℃ 水浴 20 分鐘後，冰浴快速冷卻，加入 0.5 ml 10% trichloroacetic acid (trichloroacetic acid in 95% ethanol)溶液，再用

(1)樣品製備

全豬血液於桃園縣中美肉品之屠宰場採集，採集後迅速添加檸檬酸鈉(抗凝血劑)使最終濃度達 0.5% w/v；全血經由離心(6000×g)15 分鐘，分離血球及血漿，兩分離液儲存於-20℃ 備用；一部份血漿利用冷凍沈澱法[20]製備成去纖維蛋白原血漿。血球、血漿、去纖維蛋白原血漿分別凍乾儲存，待作為後續酵素水解基質。

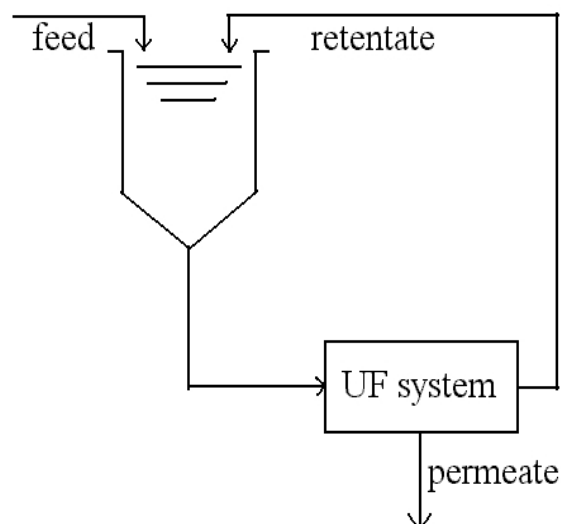
(2)酵素水解

分別以磷酸緩衝溶液將血球、血漿、去纖維蛋白原血漿配製成濃度為 1%之受質溶液。酵素則使用兩工業上常用酵素 Alcalase 及 Flavozyme (購自 Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)及三種粗酵素 trypsin (購自 Biocon, Nagoya, Japan), chymotrypsin 及 thermolysin (購自 Sigma, St. Louis, USA)，水解條件之溫度、pH、酵素分別為 I: 38℃, 7.0, trypsin、II: 35℃, 7.5, trypsin、chymotrypsin 及 thermolysin 之 1:1:1 混合物，III: 55℃, 7.5, Alcalase，IV: 55℃, 7.0, Alcalase 及 Flavozyme 之 1:1 混合物。將 2 ml 0.5% 酵素溶液加至 50 ml 受質溶液中 (E/S=1/50)，並於 0，2，6，10，24 小時取樣。取樣之水解液於 100

0.45 μ m 膜過濾處理去除不溶物，其濾液再加入 4ml 蒸餾水及 0.8ml 0.1 ferric chloride (氯化鐵溶在 3.5% HCl) 溶液，混合均勻於 10 分鐘後測定 700 nm 之吸光值並以 100, 200 ppm Vit C 作還原力比較。

(6) 抑制血管收縮素轉化酵素(ACE)活性[24, 25]

取 300 μ l 0.33mM hippuryl-his-leu 及 30 μ l 水解液，再加入 50 μ l 0.16U/ml



ACE(以 300mM NaCl 之 100mM 硼酸緩衝液 pH 8.3 配製)，於 37°C 水浴槽內振盪反應 30 分鐘後，加入 380 μ l 之 1N HCl 終止反應。在空白組(blank)是以蒸餾水替代酵素水解液。控制組中，同樣以蒸餾水替代酵素水解液，但在未加入酵素之前先加入 380 μ l 之 1N HCl，其餘步驟與樣品液相同。反應終止後各加入 1.5ml 乙酸乙酯，激烈振盪 15 秒，萃取反應中的 hippuric acid。再離心(1800 $\times$ g) 5 分鐘，取上層液 1ml，置入另一試管內。將此試管水浴加熱至乾燥為止，再加入 1ml 蒸餾水，測水溶液在波長 228nm 之吸光值。

(7) 勝^o濃度測定[26]

25ml 100mM sodium tetraborate、2.5ml 20% SDS、1 ml OPA (40 mg β -Phthaldialdehyde 溶於甲醇中)、100 μ l β -mercaptoethanol，上述藥品用棕色瓶定量至 50 ml，取 2 ml 混合液加 50 μ l sample 反應兩分鐘後立即測 340nm 吸光值，標準曲線以 1、0.8、0.6、0.4、0.2 mg/ml Leu-Gly 製作。

(8) 機能性水解液區分[27]

採用中空纖維狀之超過濾膜(Hollow fiber ultrafiltration membrane)進行分離(圖一)，使用之超過濾膜之分子量區分(Molecular weight cut-off)分別為 1000、3000 及 10,000 Da。使用之操作溫度為 25°C，壓力為 20 psi。首先將 400ml 水解液以 10k Da 的膜進行分離，分離過程繼續補充去離子水，使透流液(permeate)體積為原體積之 6 倍，最後使滯留液(retentate)體積為 100ml，透流液濃縮成 300ml，如此可區分得到分子量小於 10 kD 的透流液及分子量大於 10 kD 的滯留液，再將此部分所得之滯留液以 3000、1000Da 的膜進行分離，依上述方法可得四個區分(>10000, 10000~3000, 3000~1000, <1000 Da)。

(9) 抑制癌細胞增生測試[28]

將濃度 1×10^4 /ml 細胞分散於 96 well 培養盤中(100 μ l/well)隔夜培養後，於每 well 內加入 10 μ l 水解液，培養 24 小時後，將培養液換成不含 FBS 血清之培養液，並加入 50 μ l 2mg/ml MTT，培養 2 小時後，將 well 內溶液移除，並加入 150 μ l DMSO 混合均勻後，於 570nm 測定吸光值。

圖一、固定體積批式濾析

表一、以 Trypsin、Chymotrypsin、Thermolysin 酵素水解豬血球 6 小時之水解液其四個分子量區之 ACE IC₅₀ (mg/ml)

Molecular weight	ACE IC ₅₀ (mg/ml)
<1000	2.23
1000~3000	1.08
3000~10000	0.38

表二、以 Trypsin、Chymotrypsin、Thermolysin 酵素水解豬血球 10 小時之水解液其四個分子量區之 DPPH 自由基清除率

Molecular weight	DPPH scavenging effect (%)
<1000	21%
1000~3000	13%
3000~10000	4%
>10000	65%
á-tocopherol	95%
BHT	95%

表三、以 Trypsin 酵素水解豬血球 24 小時之水解液其四個分子量區之還原力

Molecular weight	OD ₇₀₀
<1000	0.062
1000~3000	0.054
3000~10000	0.050
>10000	0.087
100 ppm Vit C	0.813
200 ppm Vit C	1.427

四、結果與討論

(A)機能性水解液區分

利用濾析將水解液依分子量區分，於抑制 ACE 活性上(表一)，以 3~10 kDa 間之 IC₅₀ 值最低，顯示此區分為水解液主要提供抑制 ACE 酵素活性者。於清除 DPPH 自由基方面(表二)，分子量大於 10 kDa 之區分對於水解液清除自由基的貢獻較大，而分子量小於 1 kDa 者次之。前期的研究發現，於不同酵素與受質的水解條件下所製備之水解液之中，有二水解液具較好的清除自由基效果，且經分析各個水解液中 anserine 及 carnosine (已知之具有抗氧化性之雙胍^o)含量，也發現僅此兩水解液含有 carnosine 雙胍^o，且其含量隨著水解時間增加而上升，且以水解 24 小時含量最高。但是，本研究發現此二水解液最具清除 DPPH 能力之

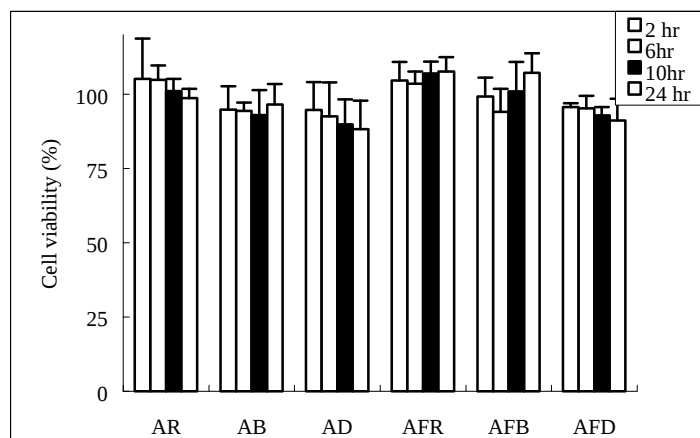
水解時間為 10 小時，且於水解 24 小時反而降低其抗氧化能力，而藉由濾析區分之實驗結果可以推論水解液中除了 carnosine 具清除 DPPH 自由基外，分子量大於 10000 Da 之胜[○]也同樣具有重要的地位，也因此水解 24 小時，使大分子量之胜[○]水解成較小分子之胜[○]，故水解液之清除 DPPH 自由基能力下降。有關水解液之還原力之測試結果如表三所示，同樣於分子量大於 10000 Da 者較具還原力，而小於 1000 Da 次之，與清除 DPPH 自由基之能力之結果相似，可能該胜[○]同時具有清除自由基及還原力。

(B)抑制腫瘤細胞生長

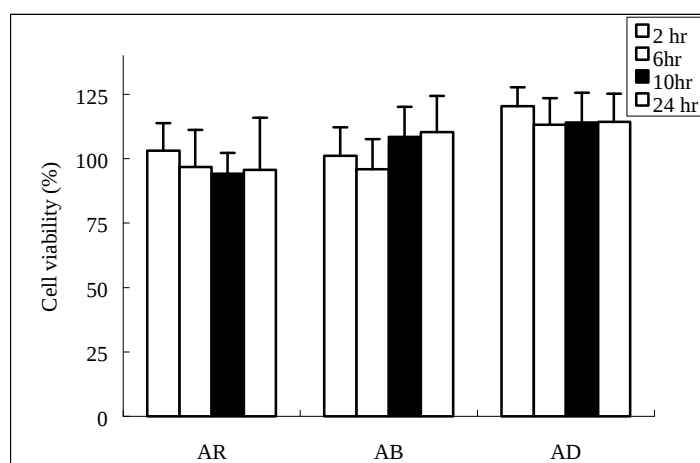
本研究初步先以單獨 Alcalase 酵素及 Alcalase、Flavozyme 兩混合酵素水解豬血球、血漿、去纖蛋白原血漿並於不同水解時間取樣，測試水解液抑制 B16F10 及 Hep G2 腫瘤細胞增生效果，結果顯示水解液並沒有顯著的抑制效果(圖二)。前人的研究顯示[30]，牛乳之乳鐵蛋白對腫瘤細胞有顯著的抑制效果，另外，也有學者研究[29]，經過酵素水解後，可大大的提升乳鐵蛋白之抑制腫瘤細胞增生效果；而乳鐵蛋白與本研究之血漿中運鐵蛋白結構十分相似，故以 transferrin 對兩腫瘤(B16F10. Hep G2)進行測試，結果顯

圖二、豬血球、血漿、去纖維蛋白原酵素水解液抑制(A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞增生效果

(A)



(B)

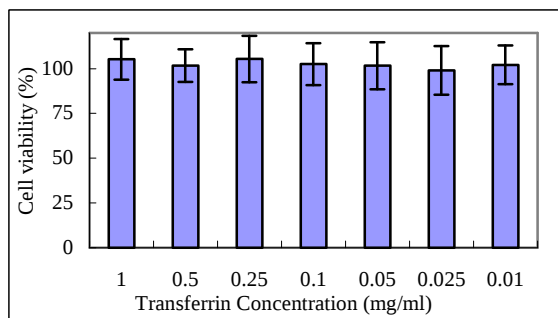


*Enzyme - A: Alcalase, F: Flavozyme,

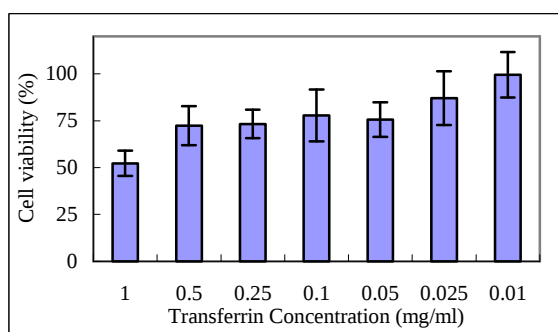
Substrate - R: Red blood corpuscle, B: blood plasma, D: Defibrinated plasma

圖三、Transferrin 抑制(A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞增生效果

(A)



(B)



示(圖三)，當 tranferrin 濃度達 1mg/ml 時 B16F10 仍無顯著的效果，但對 Hep G2 時即有顯著的抑制增生效果。故推論水解液中仍具有抑制腫瘤細胞增生之活性胜^o，但是其於水解液中含量少，故無法顯現，所以本研究後續擬再選擇幾種酵素水解液並利用濾析進一步提升特定分子量範圍的胜^o濃度，以評估利用豬血酵素水解液生產具抑制腫瘤細胞增生之可行性。

五、計畫成果自評

本年度依原計畫執行，初步研究結果，除了原已證實豬血酵素水解液於體外試驗具有降高血壓及抗氧化活性，且其與酪蛋白水解液具相近抑制 ACE 活性外，更進一步利用濾析方式，了解生物活性胜^o於水解液中之分子量範圍，以作為後續鑑定該活性胜^o序列及選擇適當膜反應系統之開端。此外，也對豬血酵素水解液其他活性開始進行測試(如：抗腫瘤活性)，後續擬再以 RAW 264.7 免疫細胞進行免疫活性測試，以了解豬血酵素水解液是否還有生產其他活性胜^o之可行性，增廣豬血酵素水解液之用途。

六、參考文獻

[1] Ockerman HW, Hansen CL. 1988. Animal by-product processing p. 232. Ellis Horwood Ltd,

Chichester, England.

- [2] Kang JH, Shin SY, Jang S, Kim KL, Hahm KS. 1999. Effects of tryptophan residues of porcine myeloid antibacterial peptide PMAP-23 on antibiotic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 264:281-286.
- [3] Lee DG, Kim DH, Park Y, Kim HK, Kim HN, Shin YK, Choi CH, Hahm KS. 2001. Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 282:570-574.
- [4] Yu PL, Choudhury SD, Katja A. 2001. Purification and characterization of the antimicrobial peptide, ostricacin. *Biotechnology Letters* 23:207-210.
- [5] Fiat AM, Daniele MS, Pierre J. 1993. Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J dairy Sci* 76: 301-310.
- [6] Arihara K, Nakashima Y, Muka, T, Ishikawa S, Itoh M. 2001. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci* 57:319-324.
- [7] Suetsuna K, Chen JR. 2001. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *J Mar Biotechnol* 3:305-309.
- [8] Wu J, Ding X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49:501-506.
- [9] Hyun CK, Shin HK. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry* 36:65-71.
- [10] Kayser H, Meisel H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383:18-20.
- [11] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine- containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 46(1):49-53.
- [12] Jao CL, Ko WC. 2002. 1,1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Sci* 68:430–435.
- [13] Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *J Agric Food Chem* 49:1984-1989.
- [14] Suetsuna K. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *J Mar Biotechnol* 2:5-10.
- [15] Ambs S, Dennis S, Fairman J, Wright M, Papkoff J. 1999. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgenic B16F10 melanoma cells. *Cancer Res* 59:5773-5777.
- [16] Qureshi A, Colin PL, Faulkner J. 2000. Microsclerodermins F-I, antitumor and antifungal cyclic

peptides from the lithistid sponge *Microscleroderma* sp. Tetrahedron 56:3679-3685.

- [17] 林哲雄。2002。Melittin 抑制鰐鼠黑色素瘤細胞 B16F10 的侵犯和轉移作用之研究。國立臺灣大學毒理學研究所碩士論文。
- [18] 葉嘉新。2000。蛇毒蛋白抑制血管新生作用之機轉研究。國立臺灣大學藥理學研究所碩士論文。
- [19] 蔣丙煌、魏任廷。2002。於膜反應器中利用酵素水解豬血生產生物活性胜^o。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告 NSC 90-2214- E-002-037。
- [20] Slichter SJ, Henderson CR, Harker LA. 1976. Preparation of cryoprecipitated factor VIII concentrates. Transfusion 16(6):616.
- [21] Spackman DH, Stein WH, Moore S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analytical Chemistry 30(7):1190-1206.
- [22] Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable, free radical. Nature 181:1199-1200.
- [23] Oyaizu M. 1988. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent on thin-layer chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 35:771-775.
- [24] Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 30:1637.
- [25] Maruyama S, Suzuki H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. Agric Biol Chem 46(5):1393-1394.
- [26] Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J Dairy Sci 66:1219-1227.
- [27] Beaton NC, Klinkowski PK. 1983. Industrial ultrafiltration design and application of diafiltration process. J Separ Proc Technol 4(2):1.
- [28] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 119:203-210.
- [29] Eliassen LT, Berge G, Sveinbjørnsson B, Svendsen JS, Vorland LH, Rekdal Ø. 2002. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. Anticancer Res 22(5):2703-2710.
- [30] Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shimazaki K, Azuma I. 1998. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. Adv Exp Med Biol 443:285-291.