الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690

website :http:// jsci.utq.edu.iq Email:utjsci@utq.edu.iq

استخلاص بروتين كلايكوماكروبيتايد من شرش الجبن واستخدامه كمضاد بكتري ضد*Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus* عند الأطفال

علي خضير جابر الركابي* حيدر إبراهيم علي* إيمان جابر حسن الجليلي

*قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة– جامعة ذي قار

الخلاصة

تركزت هذه الدراسة على استخلاص بروتين الكلايكوماكروبيتايدGMP من شرش الجبن الأبيض الطري والمصنع باستخدام المنفحة (أنزيم الكيموسين) ودراسة تأثيره على بكتريا*E. Coli ,Staph aureus* خارج جسم الحيوان *in vitro* وداخل جسم الحيوان *in vivo*.وكانت النتائج كما يلي:

استخدمت مستضدات البكتريا المرضية مع بروتين الكلايكوماكروبيتايدGMP باختبار التلازن الدموي المنفعل وتم الحصول على معيار تلازن مقداره ١:٢٥٦ مع مستضد السكريات المتعددة الشحمية LPS المعزولة من بكتريا *E. coli*. أما التلازن الدموي المنفعل لبروتين الكلايكوماكروبيتايدGMP مع مستضد السكريات الشحمية LPS المعزولة من بكتريا *Staph. aureus* فكانت ١:٦٤ .اثبت بروتين الكلايكوماكروبيتايدGMP فعالية تثبيطية خارج جسم الحيوان (*in vitro*) ضد عزلات بكتريا *E. coli* التي تسبب الإسهال والتهاب الأمعاء لدى الأطفال وبكتريا *Staph.aureus* . وذلك بأستخدام الأوساط الغذائية السائلة Nutrient broth وباستخدام جهاز Spectrophotometer وبتراكيز مختلفة (٠.١ ، ٠.٦، ١.١ ، ٦.٣) ملغم/ مل وكان أعلى تثبيط لتركيز ٦.٣ يليه ١.١. واثبت بروتين كلايكوماكروبيتايدGMP فعاليه تثبيطية داخل جسم الفئران (*In vivo*) ضد بكتريا *E. coli* و *Staph. aureus* عبر دراسة تأثيره على كريات الدم الحمراء والبيضاء والخلايا اللمفاوية إذ عملت على زيادتها.

Summary

This study focused on the extracted of protein Glycomacropeptide of soft white cheese whey and factory using rennet (chymosin) and studying of its effect outside the body's animals *in vetro* and within the body of the animal *in vivo*, the results were as follows: pathological bacteria antigens used with Glycomacropeptide in passive haemagglutination assay and showed that agglutination was 1:256 with LPS isolated from bacteria *E. coli*. The passive haemagglutination assay also showed that agglutination was 1:64 with LPS isolated from bacteria *Staph. aureus* Glycomacropeptide protein proved the inhibition activity the outside of the animal's body *(in vitro*) against bacterial isolates of *E. coli* and , which causes diarrhea and inflammatory intestine disease and *Staph. aureus* bacteria in children by using Nutreint Broth media and using a Spectrophotometer and different concentrations (0.1, 0.6, 1.1, 6.3) mg / ml had a higher inhibition concentration of 6.3 followed by 1.1.

Glycomacropeptide protein proved effectiveness inhibitory, within the body of mice (*In vivo*) against bacteria *E. coli* and *Staph. aureus* by studying their effect on red blood cells and white blood cell as it worked to increase.

المقدمة

يحوي حليب الأبقار حوالي ٣.٥%بروتين ويتكون من مجموعتين من البروتينات الرئيسة هما الكازينات وبروتينات الشرش ، تمتاز الكازينات بوجودها بحاله غروية (Fox & Mcsweeney,1998).وهي تتمثل في ثلاثة أنواع أساسية هي α_s-casein،B-casein ،K-casein وبنسب ٥٠-٥٥%،٢٥-٣٠% ،٨-١٥% على الترتيب الشبيبي (١٩٨٤). يتميز الكابا-كازين بأنه أكثر تعقيداً من الكازينات الباقية ، اذ تعزى له الصفة الوقائية لباقي الكازينات، ويحتوي على المواد الكربوهيدراتية ، وهي من نوع السكريات الثلاثية ويعد الكابا-كازين الهدف الرئيسي لأنزيم الرنين . إذ يعمل الأنزيم على كسر الآصرة الموجودة بين الحامض الاميني ١٠٥ فنيل الانين والحامض الاميني ١٠٦ ميثايونين ،منتجا" بارا-كابا-كازين وسلسلة ببتيدية كبيرةMacropeptide ويتحلل بروتينK-casein الببتيدين ، الببتيد الأكبر يحوي أحماض امينية من ١-١٠٥ ويسمى- para k-casein حيث يكون غير ذائب ويصبح جزء من خثرة الكازين أما الببتيد الأصغر فيتكون من الأحماض الامينية المتبقية من ١٠٦-١٦٩ من الـ k-caseinالذي يكون ذائب ويصبح جزء من بروتينات الشرش (Brody,2000). وبسبب الخصائص الفريدة لـGMP فانه يلعب دوراً مهماً وان الفعالية البايلوجية لهذا البروتين تعود إلى جزءه الكربوهيدراتي وبالذات حامض السياليك،وفي بعض الأحيان أساسياً في مجالات تطبيقية واسعة منها التحكم بالوزن وتشجيع نمو البكتريا النافعة وكبت وتثبيط إفرازات المعدة ،مما يؤدي إلى قلة الشهية(Thoma -Worringer,(2006 وعلاج مرض PKU وتثبيط ارتباط السموم الداخلية للكوليرا وبكتريا*E .Coli* بالمستقبلات (gangliosides) وتثبيط تجمع الصفائح الدموية antithrombotic، الفعالية ضد فيروسات الأنفلونزا (Abd El-Salam *et al* ., 1996)(Oliva; *et al*.,2002وكذلك السيطرة على العديد من أمراض الكبد بالإضافة إلى زيادة امتصاص الكالسيوم والزنك والحديد Silva Malacata (Kelleher , 2003) ; (2004,)ويدعم التأثيرات المناعية ويمنع تسوس الأسنان (٢٠٠٠, Brody) وأثبتت البحوث كونه مضاد للأكسدة ومضاد لارتفاع ضغط الدمومضاد بكتيري ومضاد للجراثيم والفيروسات (Clare *et al.*, 2000; Fitzgerald &Meisel 2000). لذلك الاستغلال الغذائي الصحيح لهذه البروتينات والببتيدات الفعالة بايلوجياً يمكن أن يفيد ويّحسن الصحة عموماًوبطرق مختلفة.

المواد وطرائق العمل

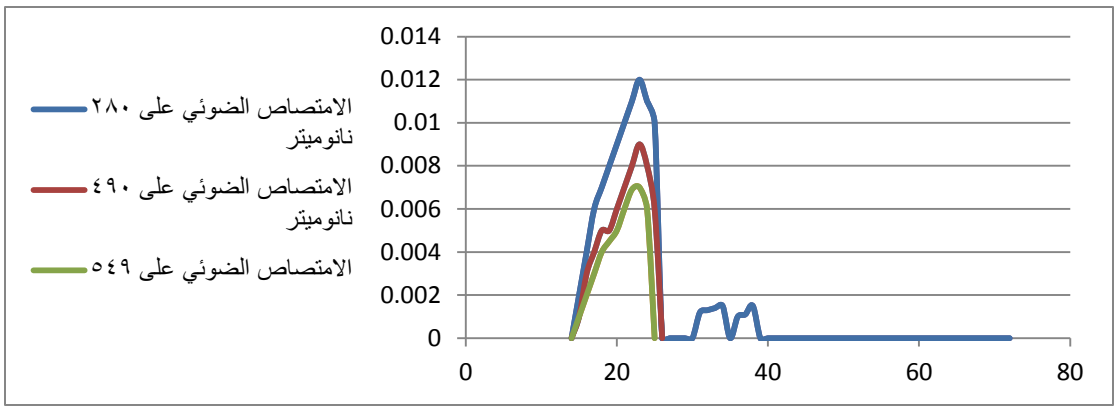
اتبعت الطريقة التي ذكرها الموسوي (٢٠٠٠)في إنتاج الجبن الطـري والحصول على الشرش منه ، بعدهـا استخدم حامض ألخليك ثلاثي الكلور(Tri Chloro Acitic acid) TCA لفصل بروتين كلايكوماكروببتايـد(Glycomacropeptide) GMP من الشـرش وذلك بإتباع الطريقـة التي وصفها(Morr&Seo, (1988 .تبعها التنقية النهائيـة لبروتيـن الكلايكوماكروبتايد باستخدام كروموتوغرافي الترشيح الهلامي باستعمال سيفادكس25 -G بإتباع الطريقة التي ذكرها Ozimek& Nakano (2000) .تم تقدير البروتين في الكلايكوماكروبتايد باستخدام طريقه Lowery *et al* (1951),. .اما الكربوهيدرات فقد قدرت بطريقة الفينول حامض الكبريتيك التي ذكرها Dubois *et al* ., (1956) .أما حامض السياليك فقد تم تقديره بطريقة Aminoff(1961) . وتم التأكد من نقاوة بروتينGMP بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد، وبالطريقة التي ذكرها المظفر(٢٠٠٥) مع إجراء بعض التحويرات عليها.

أما الوزن الجزيئي فقد تم تقديره بنفس طريقة قياس نقاوة البروتين ، باللاضافة إلى استعمال خليـط من البروتينات القياسية(Low Range Protein Markers) ،إذ كانت تتضمن بروتينات ذات مدى يتراوح مابينDa (66000- 4100) وذلك لتحديد الوزن الجزيئي لبروتين GMP .ودُرس تأثير بروتين GMP على تثبيط بكتريا *Escherichia coli*و *Staphylococcus aureus* وأتبعت الطريقة التي ذكرها(2002) Cornelia وحسبت النسبة المئوية لوسط النمو Nutrient broth وجود تراكيز مختلفة من الكلايكوماكروبتايد ،وتم قياس كثافة نمو الخلايا من خلال قياس مقدار العكارة في وسط النمو بواسطة جهاز المطياف

الضوئي Spectrophotometer UV/Visوعلى طول موجي مقداره ٥٩٥nm ومقارنتها مع الوسط القياسي الخالي من الكلايكوماكروببتايد..بعدها أجري اختبار التلازن الدموي المنفعل على بروتين الكلايكوماكروببتايد مع مستضدات كل من بكتريا *E .coli*و*Staph.aureus* وهي عباره عن سموم lipopolysaccharide استخلصت من البكتريا وذلك حسب الطريقة التي ذكرها(1973) ,Herbertوتم الحصول على عزلات البكتريا المستخدمة في قياس الفعالية الحيوية لبروتين الكلايكوماكروببتايد من كلية العلوم/قسم علوم الحياة –جامعة البصرة . أما المستضدات فقد حُضرت حسب الطريقة التي ذكرها شناوه وشاني(٢٠٠٠).وقد ضُبط تركيز البكتريا حسب طريقة مكفرلاند وكما ذكر (1977).,Garvey *et al*.ودُرس تأثير بروتين GMP على سموم بكتريا *E .coli* والتي هي Lipopoyusaccharide LPS وكل من بكتريا *E .coli* و *Staph aureus*. في داخل جسم الفئران*in vivo*.إذ قسمت المجاميع إلى خمسة مجاميع وكل مجموعة تحتوي على ثلاثة فئران وعوملت كل مجموعة بمعاملة تختلف عن الأخرى وحسب ما ذكر Michel *et al* ., (2006)مع إجراء بعض التحويرات على الطريقة (شملت اختلاف في الفحوصات التي أجريت على الدم الذي أُخذ من الفئران في أخر كل تجربة) وقد ضبط تركيز البكتريا كما مر آنفا حسب طريقة مكفرلاند وكما ذكر (1977).,Garvey *et al*،

النتائج والمناقشة

بعد فصل الشرش واستخلاص بروتين GMP منه بطريقة الترسيب بالحامض TCA، إذ كان الراشح النهائي ذا لون أصفر يحوي بروتين GMP . وتمت التنقية النهائية لهذا البروتين باستعمال سيفاد يكسG-25 الذي يقوم بإقصاء البروتينات ذات الأوزان الجزيئية القليلة ويحضر سيفاد يكسG-25 من السكريات المتعددة المسماة الديكستران (دلالي والحكيم ١٩٨٧) . يبن الشكل (٥) ظهور قمة واحدة لبروتين الكلايكوماكروببتايدp_1 في الأجزاء ألمستردة من الهلام بواسطة محلول دارئ خلات الصوديوم (٠.٠١)ع ، ورقم هيدروجيني مقداره (٧)وهي تحددت بالأنابيب(١٥- ٣٩)عند قياس الامتصاص الضوئي في جهاز الطيف الضوئيUV/Vis Spectrophotometerعلى طول موجي مقداره ٢٨٠ nm وتم التأكد من وجود الكلايكوماكروببتايد باستخدام فحص الكربوهيدرات إذ ظهرت قمة للكربوهيدرات p_2 ضمن قمة البروتين التي تمثلت بالأنابيب(١٥-٢٥)عند قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي قدره (490nm) .أما فحص حامض السياليك فقد ظهرت قمة واحدة لهذا الحامض المتمثلة في p_3 عند قراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي قدره ٥٤٩nmوظهرت قمم صغيرة تمثل ببتيدات ذات أوزان قليلة بعد نزول قمة الكلايكوماكروببتايد وهذه النتائج تتفق مع ماذكره (Nakano ,Ozimek (2000 b عند إجراء الترشيح الهلامي خلال عمودSepharcyl – S200 على رقم هيدروجيني (٧). واستخدم سيفاديكس G-25 لتنقية الكلايكوبروتينات من قبل Kamiyama ,Schmid (1962)Morr ,Seo(1988)و (2000) Nakano ,Ozimek .واستعمل الباحثين أنواع مختلفة من الهلام في الدراسات المتعلقة بتنقية الكلايكوماكروببتايد في خطوة الترشيح الهلامي Tanimoto *et al* (Yaguchi*et al* .,1968 .,1991 ; Kawasaki *et al*., 1994).ويبين الشكل(١) المخططات القياسية لكل من البروتين والكربوهيدرات وحامض السياليك في بروتين كلايكوماكروببتايد.



شكل (١) فصل الكلايكوماكروببتايدباستخدام الترشيح الهلامي على عمود سيفاديكس25–G.

محتوى الكلايكوماكروببتايد من البروتين:

تم تقدير البروتين بطريقة Lowrey في المحلول الحاوي على الكلايكوماكروببتايد بأتباع طريقة الترشيح الهلامي ،وبالاستناد إلى المنحنى القياسي لألبومين المصل ألبقري(BSA) إذ وجد انه احتوى على بروتين بنسبة ٥٢.٣% . لكن Neelima *et al.*, (2013) ذكر إن الـGMP يمكن أن تصل نسبة البروتين فيه (٧٨-٨٣.٧) ، بينما Martin- Diana *et al.*,(2002) ذكر إن نسبة البروتين في الـ GMPكانت ٢٠%وهذا مقارب إلى ما ذكره (2000) Nakano ,Ozimek.

محتوى الكلايكوماكروببتايد من الكربوهيدرات:–

أظهرت نتائج تقدير الكربوهيدرات بطريقة فينول –حامض الكبريتيك أن الكلايكوماكروببتايد المعزول من الشرش الحلو بطريقة الترسيب والمنقى بطريقة الترشيح الهلامي احتوى على كربوهيدرات بنسبة٣١.٦% وكما يظهر في جدول (١).

جدول(١) نسب كل من البروتين والكربوهيدرات وحامض السياليك في بروتين كلايكوماكروببتايد

اسم المادة	التركيز %
البروتين	٥٢.٣
الكربوهيدرات	٣١.٦
حامض السياليك	١٥.١

وهي مقاربة لما أشار إليه(Nitschmann*et al.*,(1957; Anderson *et al.*,١٩٧٣ إذ وجدوا أن الكلايكوماكروببتايد يحتوي على ٣٠% كربوهيدرات وذكرِJolles&Alais (١٩٦١) انه يحتوي على ٢٨.٧% كربوهيدرات.

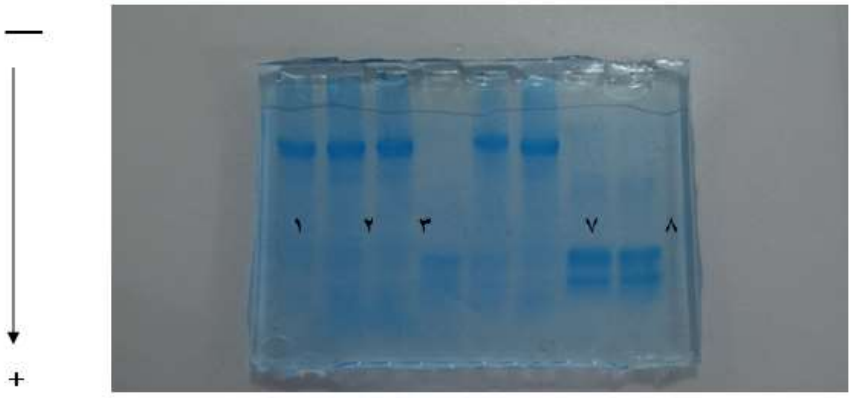
محتوى الكلايكوماكروببتايد من حامض السياليك:–

استعملت طريقة(١٩٦١)Aminoff لتقدير حامض السياليك في الكلايكوماكروببتايد المعزول من شرش الجبن المنقى بطريقة الترشيح الهلامي ووجد انه يحتوي على١٥.١% حامض السياليك، وقد ذكر Neelima *et al.*, (2013) إن الـ GMPيحوي نسبه (٧-٩) % من حامض السياليك، إن وجود هذا الحامض في الكلايكوماكروببتايد دلالة على كفاءة طرائق التنقية المستخدمة في عزل وتنقية الكلايكوماكروببتايد من شرش الجبن، ويعتقد إن الوظيفة الوقائية للكلايكوماكروببتايد تعود إلى المجاميع الكربوهيدراتية فيه لاسيما حامض السياليك إذ إن إن وجوده يعمل على تحفيز نمو بكترياBifidobacterium وتثبيط التو كسينات والالتصاقات البكتيرية والفيروسية,Ofek& Sharon (١٩٩٠)و Kawasaki ،.,*et al*(1991) وقد ذكرJolles&Alaisِ(١٩٦١) إن الكلايكوماكروببتايد يحتوي على ١٤.٣% حامض السياليك .

تعيين نقاوة الكلايكوماكروببتايدبالترحيل الكهربائي

تضمنت تعيين نقاوة بروتين الكلايكوماكروببتايد الناتج من عملية الترسيب بالـ TCAالمنقى بالترشيح الهلامي، وخلوه من أثار

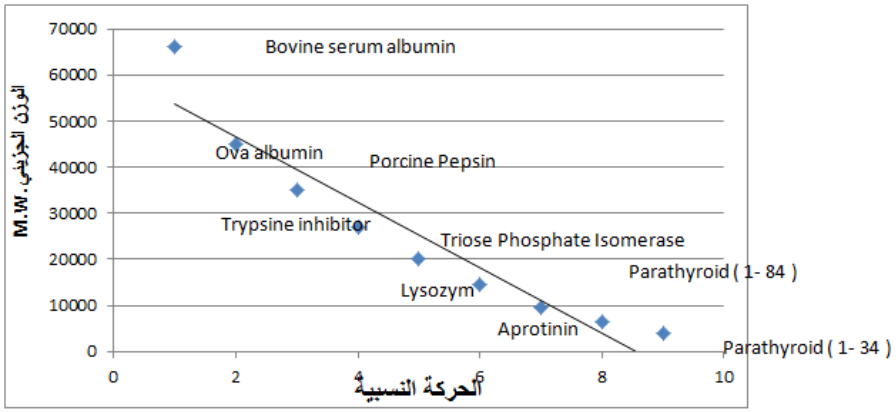
البروتينات الأخرى استخدام الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد ذي تركيز ١٢.٥ %وبوجودالمادة الماسخة SDS اتضح من النتائج ظهور حزمة واحدة نقية لبروتين الكلايكوماكروبتايد خالية من اثأر الببتيدات المرافقة، وأثار البروتينات الأخرى. مما يدل على إن طريقة عزل الكلايكوماكروبتايد من شرش الجبن ومعاملته بالـ TCA، وتنقيته بالترشيح الهلامي تعد طريقة كفوءة ،جاءت هذه النتيجة متفقة مع الباحثين(Nakano, *et al.*, ؛ Nakano &Ozimek, 2000 Doi ١٩٧٩؛2000) في الحصول على كلايكوماكروبتايـــد نقي عند استخدام الترشيح الهلامي. يوضح شكل (2) الحزمة البروتينية للكلايكوماكروبتايد الخام (crud)بطريقة الترحيل الكهربائي ومقارنته مع ألبومين المصل ألبقري القياسيBSA.



شكل(٢) الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS،يبين بروتين الكلايكوماكروبتايد (٧، ٦) و بروتين البومين المصل ألبقريBSA القياسي (٣،٢،١).

تعين الوزن الجزيئي للكلايكوماكروبتايد :-

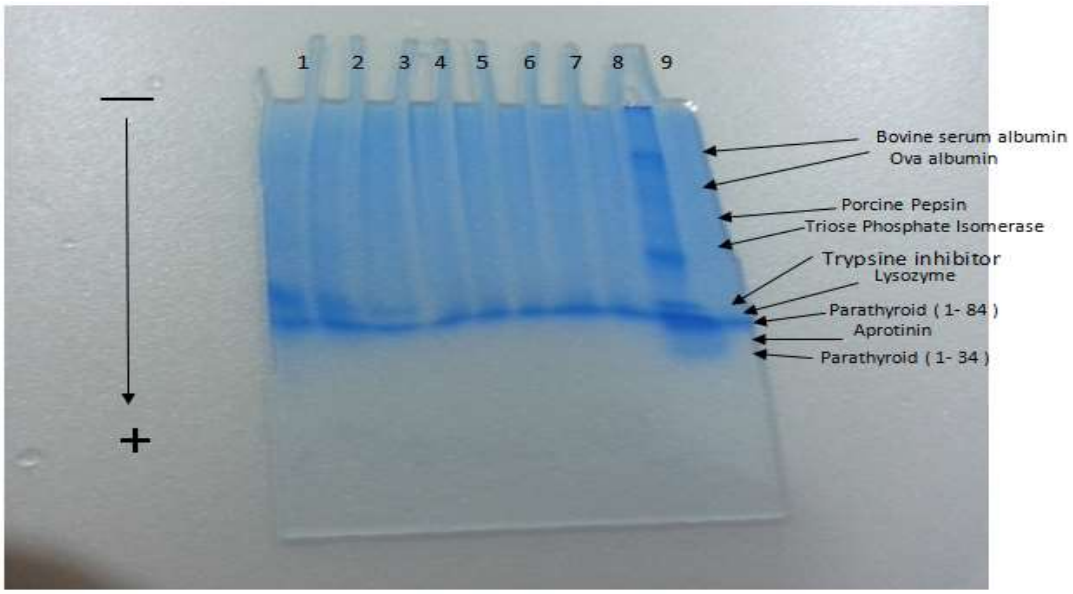
يبين الشكل (٣) الوزن الجزيئي للكلايكوماكروبتايد بواسطة الترحيل الكهربائي بهلام اكريل اماید بوجود SDS باستخدام بروتينات قياسيه للمقارنةMarker protein تتراوح أوزانها ألجزيئيه بين (٦٦.٠٠٠-٤.١٠٠)KDaوهي تتدرج من مصل الألبومين ألبقري BSA كأعلى وزن جزيئي في هذه البروتينات القياسية إلى بروتين الابروتين (Aprotinin)كأقل وزن جزيئي وكان ترحيل الكلايكوماكروبتايد مابين بروتين Trypsin Inhibitor ٢٠ DaKوبروتين Lysozyme ١٤.٤ KDa .



شكل (٣)المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين الكلايكوماكروبتايد بالمقارنة مع البروتينات القياسية عند الترحيل على هلام متعدد الاكريلامايد.

يلاحظ من الشكل (٣) إن بروتين كلايكوماكروببتايد كان ذا وزن جزيئي حوالي ١٥.٣٢٥KDaوهذا يتفق مع ما ذكره Farias *et al.*,(2010) ;Galindo –Amaya *et al.*, (2006) إذ أشار إن سلوك الكلايكوماكروببتايدGMP في الـ SDS –PAGE يدل على أن هذا الببتايد يكون بصيغة بوليمر polymeric form وبمعدل وزن جزيئي يتراوح مابين(١٤-٣٠) KDa ، بألاضافة إلى إن الوزن الجزيئي للـ GMPاكبر مرتين إلى ثلاث مرات من الوزن الجزيئي النظري ،إذ يكون بسبب تجمع الصيغ الأحادية monomer ليشكل تكتلات .ووجد Evelin ;Gabriel (2013) إن الوزن الجزيئي للـGMP يمكن أن يتراوح بين (١٤، ٢٠، ٤١) KDa اعتماداً على ألصيغة المتجمعة aggregated form. وان الوزن الجزيئي ٢٠ KDa يتوافق مع ما ذكر Galindo *et al.*, (2006)،إذ استخدم حامض TCA لترسيب الـ GMP من خليط من الشرش الحلو ومصل الحليب وقدر الوزن الجزيئي باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي SDS-PAGE .

وذكر Esther &Yoshinori(٢٠٠٣) بان الوزن الجزيئي للكلايكوماكروببتايد على رقم هيدروجيني ٧ يتراوح مابين٢٠-٥٠ KDaحيث إن الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي قد يعود إلى محتوى كلايكوماكروببتايد من الكربوهيدرات التي بدورها تعمل على إكسابه وزنا جزيئيا اكبر من الواقع في طريقة الترشيح الهلامي لإحاطته بعدد كبير من جزيئات الماء مقارنة مع البروتينات الأخرى التي لا تحتوي على جزء كربوهيدراتي، ويتفق مع نتائج Kawasaki *et al.*, (1993) الذي ذكر بان للرقم الهيدروجيني دور كبير في الوزن الجزيئي إذ إن جزيئه الكلايكوماكروببتايد على رقم هيدروجيني اكبر من ٤ توجد بشكل رباعي وخماسي البناء بينما على قيمة رقم هيدروجيني اقل من ٣ تتخذ جزيئة الكلايكوماكروببتايد الشكل ثلاثي وثنائي البناء ممايعطي وزن جزيئي اقل، ويوضح شكل (٤) ترحيل بروتين الكلايكوماكروببتايد مقارنةً مع البروتينات القياسية .



شكل(٤)الترحيل الكهربائي لبروتين الكلايكوماكروببتايد مع البروتينات القياسية

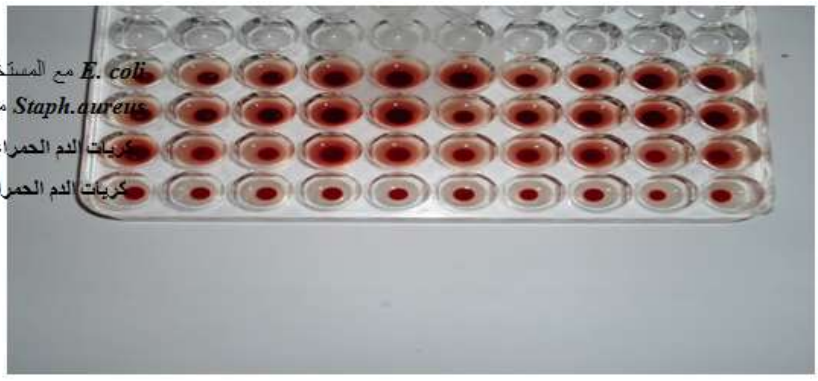
تقدير معيار التلازن الدموي لبروتين الكلايكوماكروبيتايد:-

يعد فحص التلازن الدموي من الطرائق المستخدمة في الكشف عن وجود الأضداد ، وتتضمن الطريقة ربط المستضد الذائب بجزيئات كبيره خاملة مثل كريات الدم الحمراء .إذ تتمكن الأضداد من ملازنة هذه الجزيئات المحسسة وتعتبر كريات الدم الحمراء أحسن المواد لإظهار هذا التفاعل وبوضوح واستعمل مستضد السكريات المتعددة كمستضد فاحص، إذ درس معيار التلازن الدموي لبروتين الكلايكوماكروبيتايد البقري ضد مستضدات بكتريا *E .coli* و*Staph .aureus* ودرس دور حامض السياليك في البروتين إذ عوملت السموم مع البروتين بوجود حامض السياليك وبغياب حامض السياليـــــك . يوضح الجدول (٢) إن معيار التلازن الدموي لبروتين كلايكوماكروبيتايد كان عالياً مع مستضد السكريات المتعددة الشحمية lipopolysaccharid المحضر من بكتريا *E. coli*بمقدار ١:٢٥٦ .ان بروتين الكلايكوماكروبيتايد المستخلص من شرش الجبن الطري لحليب البقر اظهر ألفة عالية للارتباط مع مستضد السكريات المتعددة الشحمية للبكتريا السالبة لصبغة كرام *E .coli*. إن قابلية البروتين هذه العالية للارتباط بسموم LPSشجعت على اقتراح استعماله في إزالة التسمم وخاص إن إنتاجه رخيص وغير مكلف.واظهر هذا البروتين المضاد الذي تم استخلاصه وتنقيته وارتباطه مع مستضدات البكتريا المبينة في جدول (٢).

جدول (٢) معيار التلازن الدموي مع مستضدات بكتريا *Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus*

البكتريا	معيار التلازن الدموي
Escherichia coli	١:٢٥٦
Staphylococcus aureus	١:٦٤

وان ارتباط الكلايكوماكروبيتايد مع المستضد المحضر من بكتريا *E .coli* يرجح أمكانية استخدام هذا البروتين لعلاج أمراض القناة الهضمية والتهاب المعدة والأمعاء .والشكل (٥) يبين معيار التلازن الدموي لبروتين الكلايكوماكروبيتايد مع مستضد السكريات الشحمية لبكتريا *E .coli*و *Staph. aureus* . وان ارتباط GMP مع مستضد السكريات الشحمية لبكتريا *Staph aureus* أعطى نتيجة جيده ولكن بكفاءة اقل من ارتباطه بسموم *E .coli*. وقد ذكرت التقارير بأن السكريات الثلاثية Trisaccharideوهي احد أنواع الكربوهيدرات في بروتين الكلايكوماكروبيتايد تتمكن من التلازن مع بكتريا *E .coli* Parkkinen, *et al.*, 1986 ;Liukkonen *et al.*,1992))



شكل رقم (٥) معيار التلازن الدموي لبروتين كلايكوماكروبيتايد مع مستضدات السكريات الشحمية لبكتريا*E. coli* و*Staph. aureus*.

تأثير بروتين كلايكوماكروبتايد على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* و*Staph. aureus* بوجود وعدم وجود حامض السياليك :-

لتقدير تأثير كلايكومايكروبتايد ضد الأحياء المجهرية المرضية، تم اختبار تثبيط نمو سلالات من بكتريا *E. coli* و*Staph. aureus* وبتراكيز مختلفة من الكلايكوماكروبتايد بوجود حامض السياليك وبعدمه. وأظهرت الجداول (٣)،(٤)، (٥)، (٦) قدرة بروتين كلايكوماكروبتايد على تثبيط نمو البكتريا تحت الاختبار، فقداثرعلى مجموعتي البكتريا السالبة لصبغة كرام *E. coli* والموجبة لصبغة كرام *Staph. aureus*. وهذا يتفق مع ما ذكره Wakabyashi *et al.,* (1998) و Shimazaki (2000) بشأن تأثير بعض الكلايكوبروتينات ضد البكتريا ألاختيارية ، إذ ذكر إن بروتين اللاكتوفرين الذي يحوي على حامض السياليك في تركيبه يؤثر في تثبيط كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام. ففي الجدول (٣) يلاحظ انه كلما زاد تركيز كلايكوماكروبتايد كلما زادت نسبة تثبيط النمو لبكتريا *E coli*،فقد كانت نسبة الزيادة في النمو ٧.٥-٤.٧ % في التركيزين ٠.١١ -٠.٦٣ ملغم/مل على التوالي .بينما كانت نسبة الزيادة في النمو صفراً عند نفس التركيزين بعد ٧٢ ساعة .وكانت نسبة النمو واضحة في الوسط القياسي الذي يحوي ماء مقطر فقط حيث كانت بحدود ٢٦.١ خلال ٧٢ ساعة.وهذا يعني إن نسبة التثبيط تزداد بزيادة تركيز الكلايكوماكروبتايد ،وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Cornelia, (2002) إن للكلايكوماكروبتايد دور كبير في تثبيط بكتريا *E. coli* .واثبت soda *et al.,* (1994) إن المواد الحاوية على حامض السياليك مثل الببتيدات أو البروتينات المرتبطة بحامض السياليك أو السكريات قليلة التسكر Oligosaccharides لها تأثير كبير في تثبيط بكتريا القولون.

جدول رقم (٣) تأثير الكلايكوماكروبتايد على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* بوجود حامض السياليك

التراكيز المضافة من GMP إلى وسط النمو السائل N.B. ملغم/١٠٠مل	الوقت							
	وقت الصفر		بعد ٢٤ساعه		بعد ٤٨ ساعة		بعد ٧٢ ساعة	
	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %
٠.١	٠.١٢٣	٠	٠.١٢٥	١.٦	٠.١٢٩	٤.٦	٠.١٣٣	٧.٥
٠.٦	٠.١٢٤	٠	٠.١٢٤	١.٦	٠.١٢٨	٤.٦	٠.١٢٨	٤.٧
١.١	٠.١٢٠	٠	٠.١٢٢	٠.٨	٠.١٢١	٠	٠.١٢٢	٠.٨
٦.٣	٠.١٢٣	٠	٠.١٢٥	١.٦	٠.١٢٥	٠	٠.١٢٦	٠
ماء مقطر	٠.١٢٣	٠	٠.١٩٨	٣٧.٨	٠.٢٦٧	٥٣	٠.٢٧٣	٥٤

- مكررين لكل معامله

أما في الجدول (٤) فيلاحظ إن ألقدرة التثبيطية للكلايكوماكروبتايد كانت اقل عند إزالة حامض السياليك ، إذ كانت نسبة نمو البكتريا بحدود ٧.٤، ٦.٢ % في التركيزين ٠.١، ٠.٦ على التوالي ،بينما كانت نسبة النمو بحدود ٢.٣، ١.٢% في التركيزين ١.١، ٦.٣ ملغم /مل كلايكوماكروبتايد خلال ٧٢ ساعة على التوالي وهذا يدل على أن لحامض السياليك تأثير في تثبيط نمو *E. coli*.وهذا يتفق مع ما ذكره Kawasaki, *et al.,* (1992)بان لحامض السياليك في الكلايكوماكروبتايد دور في تثبيط نمو *E. coli*،إذ يعمل على الالتصاق بالمستقبلات المتواجدة على سطح الخلية فيمنع التصاق البكتريا والسموم والفيروسات على هذه المستقبلات ، وبالتالي يمنع حدوث الالتهابات المرضية. وذكر Viljoen

Vogel, *et al.*, ؛Shimazaki (2000)؛ Levay&(1995) (1997) وجود بعض البروتينات الثانوية (Minor proteins) على سطح البكتريا السالبة لصبغة كرام ،وزنها الجزيئي ٣٨KDa وتكون لهذه البروتينات إلفة عالية حيال المواد التي ترتبط معها ،ويطلق عليها (porins) ومن المحتمل ان تكون هدفاً للارتباط مع الكلايكوماكروبيتايد على سطح الكائن ألمجهري ويعتقد إن فعالية الكلايكوماكروبيتايد تعتمد على قابلية ارتباطه مع الـ (porins).

جدول (٤)تأثير الكلايكوماكروبيتايد على تثبيط نمو *E. coli* بغياب حامض السياليك

التراكيز المضافة من GMP إلى وسط النمو السائل .N.B ملغم/١٠مل	الوقت							
	وقت الصفر		بعد ٢٤ساعة		بعد ٤٨ ساعة		بعد ٧٢ ساعة	
	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %
٠.١	٠.١٦٢	٠	٠.١٦٦	٢.٤	٠.١٦٧	٢.٩	٠.١٧٥	٧.٤
٠.٦	٠.١٦٣	٠	٠.١٦٧	٢.٣	٠.١٦٨	٢.٩	٠.١٧٤	٦.٢
١.١	٠.١٦٣	٠	٠.١٦٢	٠.٦	٠.١٦٣	٠.٦	٠.١٦٧	٢.٣
٦.٣	٠.١٦٢	٠	٠.١٦١	٠.٦	٠.١٦١	٠.٦	٠.١٦٠	١.٢
ماء مقطر	٠.١٦٣	٠	٠.٢٣٨	٣١.٥	٠.٢٩٦	٤٤.٩	٠.٣٠٤	٤٦.٣

- مكررين لكل معامله

ويبين الجدول (٥) الزيادة في نسبة نمو بكتريا *Staph. aureus* إذ كانت واضحة فيالتراكيز ٠.١ ، ٠.٦ ،١.١ ، ٦.٣ ملغم /مل خلال ٤٨ساعة وبنسبة اقل عند مقارنتها مع الوسط القياسي الخالي من الكلايكوماكروبيتايد ، وانخفض النمو بعد ذلك ليكون التثبيط عالياً عند٧٢ ساعة في التركيز ٦.٣إذ كان نمو البكتريا بحدود ٣.٤% بينما التركيز ١.١ كانت هناك نسبة نمو بسيط خلال ٧٢ساعة وصل إلى ٥.٨% وهي نسبة قليلة مقارنة مع الوسط القياسي إذ كانت نسبة النمو بحدود ١٩.٦%.

جدول (٥) تأثير الكلايكوماكروبيتايد على تثبيط نمو *Staph .aureus* بوجود حامض السياليك

التراكيز المضافة من GMP إلى وسط النمو السائل .N.B ملغم/١٠٠مل	الوقت							
	وقت الصفر		بعد ٢٤ساعه		بعد ٤٨ ساعه		بعد ٧٢ ساعة	
	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %
٠.١	٠.١١٢	٠	٠.١١٤	١.٧	٠.١١٦	٣.٤	٠.١١٩	٥.٨
٠.٦	٠.١١١	٠	٠.١٢٢	٩	٠.١٢٣	٩.٧	٠.١٢٢	٩
١.١	٠.١١٢	٠	٠.١١٥	٢.٦	٠.١١٨	٥	٠.١١٩	٥.٨
٦.٣	٠.١١١	٠	٠.١١٣	١.٧	٠.١١٥	٣.٤	٠.١١٥	٣.٤
ماء مقطر	٠.١١١	٠	٠.١٣٨	١٩.٦	٠.١٤٣	٢٢.٣	٠.١٣٨	١٩.٦

- مكررين لكل معاملة

وفي الجدول (٦) انخفضت نسبة النمو من ٢.٩ إلى ١.٩ لتصل ٠.٩ %في الوسط المضاف لـه٦.٣تركيز كلايكوماكروبتايد بينما كان النمو بسيطاً خلال ٤٨ ساعة للتركيز ١.١ملغم إذ وصل إلى ٢.٩ % وانخفض إلى ٠.٩% بعد ٧٢ ساعة .إن نسبة النمو ارتفعت في التركيزين٦.٣و١.١بعد ٤٢ ساعة لتنخفض بعد ٧٢ ساعة وعند مقارنة هذه النتيجة مع نمو البكتريا في الوسط القياسي، أي (استعمال الماء المقطر) فقد كانت نسبة نمو البكتريا في هذا الوسط ٣٢.٦ % بعد ٧٢ ساعة ، يتبين التأثير التثبيطي للكلايكوماكروبتايد على بكتريا *Staph aureus*.

جدول (٦) تأثير الكلايكوماكروبتايد على تثبيط نمو *Staph. aureus*بغياب حامض السياليك (مكررين لكل معامله)

التراكيز المضافة من GMP إلى وسط النمو السائل .N.B ملغم/١٠٠مل	الوقت							
	وقت الصفر		بعد ٢٤ساعه		بعد ٤٨ ساعة		بعد ٧٢ ساعة	
	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %	الامتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر	نمو البكتريا %
٠.١	٠.١٠٢	٠	٠.١٠٤	١.٩	٠.١٠٦	٣.٧	٠.١٠٧	٤.٦
٠.٦	٠.٠٩٩	٠	٠.١٠٢	٢.٩	٠.١٠٣	٣.٨	٠.١٠٢	٢.٩
١.١	٠.١٠٠	٠	٠١٠٢	٢.٩	٠.١٠٢	٢.٩	٠.١٠١	٠.٩
٦.٣	٠.٠٩٩	٠	٠.١١٢	٢.٩	٠.١٠١	١.٩	٠.١٠٠	٠.٩
ماء مقطر	٠.١٠١	٠	٠.١٢٩	٢١.٧	٠.١٣٦	٢٥.٧	٠.١٥٠	٣٢.٦

إن تثبيط البكتريا بكلايكوماكروبتايد قد لايكون كاملا لوجود أعداد من البكتريا مكونة مستعمرات ممكن أن تسبب الالتهابات (Bruck*et al* .,(2003 a .ولأعداد الخلايا الحية والميتة تأثير فقدتكون هناك نسبة من الخلايا البكتيرية غير النشطة أو الميتة ممكن أن تؤثر على نسبة العكارة، فلا نحصل على العدد الحقيقي، كما إن النشاط التثبيطي يعتمد على نوع مجموعة الكربوهيدرات ومحتواه من حامض السياليك والتركيب الثلاثي الأبعاد للبروتين(Pritchett & Paulson, 1989).

تأثير بروتين الكلايكوماكروبتايدGMPعلى أنواع كريات الدم في الفئران :-

يبين الجدول (٧) تأثير بروتين الـ GMP على مكونات الدم المختلفة مثل كريات الدم البيضاء والحمراء والصفائح ألدموية ، إذ تظهر المجموعة ٥ أعلى معدل لكريات الدم البيضاء $x10^9/L$ ٧.٦٩ أي تأثيراً معنوي (.05P<0) إذ تضمنت إعطاء الفئران بروتين GMP فقط وبدون أي معاملة ، أما المجاميع (١ ،٢، ٣، ٤)فنلاحظ فيها انخفاض معنوي (.05P<0) عن مجموعة السيطرة مجموعة (٦) التي كانت أعداد كريات الدم البيض فيها ٧.٠٩ بينما كانت أعداد الكريات للمجاميع السابقة (٦.٤١، ٦.٧٦ ,٥.٢٨)على التوالي .وهذا يدل على ان البروتين أعطى مقاومه لجسم الحيوان بزيادة أعداد كريات الدم البيض ،بحيث قاومت أجسام الفئران المستضدات (Antigen) الداخلة عليها والتي تضمنت بكتريا*E .coli* وسموم LPS بحيث بقي مستوى كريات الدم البيض قريباً من المعدل الطبيعي المتمثل بمجموعة السيطرة . وهذا مقارب إلى ما توصل إليه (2006),. Michal *et al* فقد ذكر حصول زيادة في أعداد كريات الدم البيضاء وبأنواعها المختلفة مثل Neutrophils , Neutrophil precursors eosinophils , granulocytes, مما أدى إلى زيادة مناعة أجسام الفئران . وبالتالي أكد على وجود فائدة كامنة في بروتين الـ GMP تقي من أمراض مختلفة ، إذ إن إزالة التحسس من الجهاز المناعي وتنشيط كريات الدم المختلفة يبدو انه الدور الأساسي في التأثير الواقي لبروتين GMP، فقد كانت النتائج التي حصل عليها (2006),. Michal *et al* أثبتت ورفدت

بفوائد طبية متمثله ببروتينات الحليب المشتقة وببتيداته مثل الـGMP.أما بالنسبة لكريات الدم الحمراء فقد كانت الأعداد معنوية(05P<0.) مقاربة إلى المعدل الطبيعي المتمثل بمجموعة السيطرة (مجموعه ٦)إذ كان المعدل٨.٣٥×١٠^{١٢}L/،عدا مجموعه (٣) فقد كان المعدل ٤.٧٥×١٠^{١٢}L/ إذ نلاحظ انخفاض أعداد كريات الدم الحمراء بشكل واضح وهذا قد يرجع إلى قلة تركيز بروتين GMP المستعمل ،في نفس الوقت نلاحظ ارتفاع أعداد كريات الدم الحمراء للمجموعة الأولى ،إذ كان ١٠.٣٠×١٠^{١٢}/ Lوهذا قد يعود إلى التركيز العالي للبروتينالذي كان ١٠ملغم /٠.٢ مل .نستنتج مماسبق إن زيادة أعداد كريات الدم الحمراء قد يرجع إلى الفعالية الحيوية لبروتينGMP والتي قد تكون في قدرته على تنشيط نخاع العظم المسوؤل عن إنتاج كريات الدم الحمراء.

جدول (٧) تأثير بروتين GMP على كريات الدم البيضاء والحمراء والصفائح ألدموية عند المعاملة بسموم LPS وبكتريا *E coli*.وبتركيزيين(١٠-٠.١) والمعاملة بالبروتين فقط ومحلول الـsaline.

رقم المجموعة	تركيزبروتينGMP	نوع المعاملة المستخدمة	معدل إعداد مكونات الدم		
			WBC x10^{9}\L	RBC x10^{12}\L	PLT x10^{9}\L
١	١٠ملغم/٠.٢مل saline	سموم LPS	a٦.٤١	a١٠.٣٠	a٧٠٨
٢	١٠ملغم/٠.٢ مل	بكتريا*E .coli*	b٦.٧٦	b٧.٧٧	b٥٦٤
٣	٠.١ ملغم /٠.٢مل	بكتريا *E .coli*	c٥.٢٨	c٤.٧٥	b٥٧٠
٤	٠.١ ملغم /٠.٢ مل	سموم LPS	d٨.٧٥	d٨.٧٤	c١١٦٣
٥	١٠ ملغم/٠.٢ مل	بروتينGMP	e٧.٧٩	b٧.٦٦	d٨٥١
٦	———	محلول ألـ saline	f٧.٠٩	e٨.٣٥	e٩٧٢

References المصادر

- **الشبيبي ،محسن محمد علي وطعمه، صادق جواد وشكري،نزار احمد والتكريتي ،هيلان حمادي.**(١٩٨٠) . مبادئ علم الألبان . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد .الطبعة الأولى.
- **المظفر، عدنان وهاب حبيب. (٢٠٠٥).** تصنيع متحللات بروتينية من ريش الدواجن واختبار أدائها الإنتاجي على فروج اللحم فابرو.أطروحة دكتوراه– كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- **الموسوي، أزهار جواد. (٢٠٠٠).** معادلة الحليب المحمض واستخدامه في بعض منتجات الألبان. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد.
- **شناوه، بشرى حسين وشاني ، وفاء سعدون**(٢٠٠٢) . الأسس النظرية والعلمية لعلم المناعة .الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة ،جامعة البصرة .
- **دلالي، باسل كامل والحكيم، صادق حسن .(1987)**. تحليل الأغذية. مطبعة جامعة الموصل .
- **Abd El-Salam M. H., El-Shibiny S., &Buchheim W. (1996)** Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. International Dairy Journal, 6, 327-341.
- **Alais, C. and Jolles, p. (1961).**EtudComparee des caseinoglycopeptides forms par action de la pressure surles caseins de vache et de chevre . II Etude de la Partie non-peptidique. Biochem. Bio phys. Acta, Vol. 51. pp: 315.

- **Aminoff, D**. (1961). Methods for quantitative estamation of N-acytelneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. J. Biochem, 81: 384.
- **Anderson, B. ; Hoffman, P. and Meyer, K. (1973).** Serine-Linked peptide of chondroitin sulfate. Biochem. Biophys. Acta, 74: 309.
- **Brody EP.(2000)** Biological activities of bovine glycomacropeptide. Br. J. Nutr ;84(Suppl):S39–S46. [PubMed: 11242445]
- **Bruck, W. M. ;Graverholt, G. and Gibson, G. R**. (**2003).** A two- stage continuous culture system to study the effect of supplemental alpha – lactoalbumin and glycomacropeptide on mixed cultures of human gut bacteria challenged with enteropathogenic*Escherichia coli* and *Salmonella serotype typhimurium*. J. Appl. Microbiol, 95 : 44-53.
- **Clare DA, Catignani GL and Swaisgood HE. Des ,(2003)** Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. Curr Pharm . 9(16):P. 1239-55.
- **Cornelia , (2002).** Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. Eur. J. Biochem, 269: 712-718.
- **Doi, H. ;Ibuki, F. and Kanamori, M.(1979).** Heterogeneity of reduced bovine k-casein. J.Dairy Sci., 62: 195-203.
- **Dubois, M., Gilles ,K.A., Hamilton ,J. K., Rebers, P. A., and Smith , F.(1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal .Chem., 28, 350-356.
- **Esther, W. Y. Li. and Yoshinori, M. (2003).** Technical note: Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. J.Dairy. Sci., 87: 174-177.
- **EvelinRojas; Gabriel Torres. (2013).**Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. Food Sci. Technol. vol.33 no.1; Jan./Mar.
- **Farías M, Martinez M, Pilosof A.(2010).**Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. Int Dairy J. 20:79–88.
- **Fitzgerald R .J. and Meisel H.(2000)** . MilK Protein- derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. Br J Nutr, . 84 Suppl l:P.S33-7.
- **Fox. P.F.,&McSweeney. P. L. H. (1998).** Milk proteins. Dairy chemistry and biochemistry. Kluwer, New york.146-I.
- **Galindo, L.; Valbuena, E.; Rojas, E. (2006)** Estandarización de la detección del glicomacropéptidopor PAGE-SDS comoíndice de adulteración de leche. RevistaCientíficafcv-luz, v. 16, n. 3, p. 308-314.
- **Galindo-Amaya LL, Valbuena-Colmenares E, Rojas-Villarroel E. (2006)** .Standardization ofglycomacropeptide detection with SDS–PAGE as a milk adulteration index. Rev Cient (Maracaibo) . 16:308–314.
- **Garvey, J. S. ; Cremer, N. E. and Sussdrof, D. H. (1977).** Methods in Immunology .3rd ed. W. A., Banjamin, Inc., London.
- **Herbert , w .J. (1973) .**Passive haemagglutination with special references to the tanned cell-technique . In: Handbookofexperimental immunology. Weir, D.M. (ed) Blak well scientific publication oxfoed ,20p.
- **Isoda, H. ; Kawasaki, Y. ; Tanimoto, M. ; Dosako, S. and Idota, T. (1994).**Bacterail toxin neutralizer. United States Patent 5330975.
- **Kamiyama, S. and Schmid, K. (1962).**Biochim. Biophys. Acta., 58: 8.
- **Kawasaki, Y. and Dosako, S. (1991)**. Process for producing κ-Casein Glycomacropeptide. European Patent Application 0488589 A1..

Purification of k-casein glycomacropeptide from sweet whey with undetectable level of phenylalanine. Biotechnol .Prog., 18 : 409-412.

- **Nakano T, Ozimek L.(2000).** Purification of glycomacropeptide from caseinatehydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. J Food Sci 65(4):588– 590.
- **Neelima, RajanSharma,Yudhishthir Singh Rajput, & Bimlesh Mann .January (2013).** Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk Dairy Sci Technol. 93(1): 21–43.
- **Nitschmann, H. S. ;Wissmann, H. and Henzi, R. (1957).**Proteins of milk . Composition of milk products. In " Fundamentals of dairy chemistry " edited by Byron H. Webb. Arnold, H. Johnson and John, a. alford. Dairy chemistry. P 97.
- **Ofek, I. and Sharon , N. (1990).** Adhesions as lectins: specificity and role in infection. Current Topics in Microbilogy and Immunology, 151 : 91-113.
- **Oliva, Y.; Escobar, A.; Ponce, P.(2002).**Caseinomacropéptidobovino: una alternative para la salud. Rev. Salud Anim., v.24, n.2, p.73-81 .
- **ParkkinenA,RogersGN,KorhonenT,Dahrw &Finne J.(1986).** Identification of the O-linked Sialyloligosaccharide of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated Escherichia coli Infection and Immunity 54,37-42.

- **Pritchett, T. J. and Paulson, J. C. (1989).** Biol. Chem. , 264 : 9850-9858 . (Cited from Kawasaki, Y. ; Isoda, K. ; Shinmoto, H. ; Tanimoto, M. ; Dosako, S. ; Idota, T. and Nakajima, I. (1993).Biotechnology and Biochemistry, 57:1214-1215.
- **Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., KotaKe, M., and Nakajima, T.,(1993)**ph-bependent molecular weight changes pf –casein glycol-Milchwissenschaft, 48, 191-195.
- **Kawasaki, Y. ;Dosako, S. ; Shimatani, M. and Idota, T. (1994).** Process for producing k-casein glycomacropeptides. United States Patent 5280107.
- **Levay, P. F.and Viljoen,M. (1995).**Lactoferrinagenral review. Haematologica., 80 :252-267.
- **LiukkoninJ,Haataja ,Tikkanen K, Kelm S &Finne.(1992)**. Identification of N-acetyl neuraminyl& 2-3 poly –N-acteyllactosamineglycans as the receptors of sialic acid –binding streptoccussurisstrains.Journal of biological chemistry 267,21105-21111.
- **Lowry, O.H.; Rosobrough, N.; Far, A.L.; and Randall,R.J.(1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, 193: 265-275.
- **Martin-Diana, A.B.; Pelaez, C.; Requena, T.(2003).** Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented withcaseinomacropeptide and whey protein concentrate. Journal of Dairy Science, v.86, n.5,p.1535-1540.
- **Michal Zimecki, JolantaArtym ,GrzegorzChodaczek, MajaKocieba, JacekRybka, Anna Skorska , Marian Kruzel(2006).** Glycomacropeptide protects against experimental endotoxemia and bacteremia in mice .Electronic Journal of polish agricultural universities , v.9 ,issue 2, topic veterinary medicine.
- **Morr ,C.V .and Seo, A. (1988)**. Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolyzates .Journal of food Science ,53:80-87.
- **Nakano, T. ; Silva-Hernandenz, E. R. ; Ikawa, N. and Ozimek, L.(2002).**

- **Shimazaki, K. I. (2000).** LactoferrinAmarvelous protein in milk. Animal Science Journal, 71 (4) : 329-347.

- **Thoma-Worringer,c.;Sorensen ,J.; Lopez – Fandino ,R.(2006).** Health effects and technological features of caseinomacropeptide.International Dairy Journal ,v. 16,p.1324-1333 .

- **Tanimoto, M.; Kawasaki , Y. ; Shinmoto, H. ; Dosako, S. and Tomizawa, A.(1991).** Process for producing k-casein glycomacropeptide. United States Patent 5075424

- . **Vogel, L. ;Geluk, F. ; Jansen, H. ; Pankert, J. and Alphen, I.(1997).** Human lactoferrin receptor activity in non –encapsulated homophiles influenzae. FEMS Microbiology letters. 156: 165-170.

- **Wakabyashi, H. ;Okutomi, T. ; Abe, S. ; Hayasawa, H. ; Tomita, M. and Yamaguchi, H. (1998).**Enhanded anti condida activity of neutrophils and azole anti fungal agent in the presence of lactoferrin –related compounds in : Advances in lactoferrin Research. Spik (Ed.). p: 229-237. Plenum press, New York.