

استخلاص بروتين كلايكوماكروببتايد 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 الكلايكوماكروببتايد GMP 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 الكلايكوماكروببتايد GMP 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 الكلايكوماكروببتايد GMP مع مستضد السكريات الشحمية LPS المعزولة من بكتريا *Staph. aureus* فكانت ١:٦٤. أثبت بروتين الكلايكوماكروببتايد GMP فعالية تثبيطية خارج جسم الحيوان (*in vitro*) ضد عزلات بكتريا *E. coli* التي تسبب الإسهال والتهاب الأمعاء لدى الأطفال وبكتريا *Staph. aureus*. وذلك باستخدام الأوساط الغذائية السائلة Nutrient broth وباستخدام جهاز Spectrophotometer وبتركيزات مختلفة (٠.١، ٠.٦، ١.١، ٦.٣) ملغم/مل وكان أعلى تثبيط لتركيز ٦.٣ يليه ١.١. وأثبت بروتين كلايكوماكروببتايد GMP فعالية 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 vitro* 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

يحتوي حليب الأبقار حوالي ٣.٥% بروتين ويتكون من مجموعتين من البروتينات الرئيسة هما الكازينات وبروتينات الشرش، تمتاز الكازينات بوجودها بحالة غروية (Fox & Mcsweeney, 1998). وهي تتمثل في ثلاثة أنواع أساسية هي B-casein، α_s -casein، وK-casein ونسب ٥٠-٥٥%، ٢٥-٣٠%، ٨-١٥% على الترتيب الشببي (١٩٨٤). يتميز الكابا-كازين بأنه أكثر تعقيداً من الكازينات الباقية، إذ 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 الأصرة الموجودة بين الحامض الأميني ١٠٥ فنيل الانين والحامض الأميني ١٠٦ ميثايونين، منتجا "بارا-كابا-كازين وسلسلة ببتيدية كبيرة Macropeptide ويتحلل بروتين K-casein الببتيديين، الببتيد الأكبر يحوي أحماض أمينية من ١-١٠٥ ويسمى -para k-casein حيث يكون غير ذائب ويصبح جزء من خثرة الكازين أما الببتيد الأصغر فيتكون من الأحماض الأمينية المتبقية من ١٠٦-١٦٩ من الـ k-casein الذي يكون ذائب ويصبح جزء من بروتينات الشرش (Brody, 2000). وبسبب الخصائص الفريدة لـ GMP فإنه يلعب دوراً مهماً وأن الفعالية البايولوجية لهذا البروتين تعود إلى جزءه الكربوهيدراتي وبالذات حامض السيليك، وفي بعض الأحيان أساسياً في مجالات تطبيقية واسعة منها التحكم بالوزن وتشجيع نمو البكتريا النافعة وكبت وتنشيط إفرازات المعدة، مما يؤدي إلى قلة الشهية (Thoma -Worringer, 2006)، وعلاج مرض PKU وتنشيط ارتباط السموم الداخلية للكوليرا وبكتريا *E. Coli*. بالمستقبلات (gangliosides) وتنشيط تجمع الصفائح الدموية antithrombotic، الفعالية ضد فيروسات الأنفلونزا (Oliva; Abd El-Salam et al., 1996) (et al., 2002) وكذلك السيطرة على العديد من أمراض الكبد بالإضافة إلى زيادة امتصاص الكالسيوم والزنك والحديد (Silva Malacata, 2003) (Kelleher, 2003)؛ (2004)، ويدعم التأثيرات المناعية ويمنع تسوس الأسنان (Brody, 2000) وأثبتت البحوث كونه مضاد

للأكسدة ومضاد لارتفاع ضغط الدم ومضاد بكتيري ومضاد للجراثيم والفيروسات (Clare et al., 2000; Fitzgerald & Meisel, 2000). لذلك الاستغلال الغذائي الصحيح لهذه البروتينات والببتيدات الفعالة بايولوجياً يمكن أن يفيد ويحسن الصحة عموماً وبطرق مختلفة.

المواد وطرائق العمل

اتبعت الطريقة التي ذكرها الموسوي (٢٠٠٠) في إنتاج الجبن الطري والحصول على الشرش منه، بعدها استخدم حامض ألخليك ثلاثي الكلور (TCA (Tri Chloro Acitic acid لفصل بروتين كلايكوماكروبيتايد (GMP (Glycomacropeptide من الشرش وذلك بإتباع الطريقة التي وصفها (Morr & Seo, 1988). تبعتها التنقية النهائية لبروتين الكلايكوماكروبيتايد باستخدام كروموتوغرافي الترشيح الهلامي باستعمال سيفادكس G-25 بإتباع الطريقة التي ذكرها (Ozimek & Nakano, 2000). تم تقدير البروتين في الكلايكوماكروبيتايد باستخدام طريقة Lowery et al (1951). أما الكربوهيدرات فقد قدرت بطريقة الفينول حامض الكبريتيك التي ذكرها (Dubois et al., 1956). أما حامض السيليك فقد تم تقديره بطريقة (Aminoff, 1961). وتم التأكد من نقاوة بروتين GMP بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد، وبالطريقة التي ذكرها المظفر (٢٠٠٥) مع إجراء بعض التحويرات عليها.

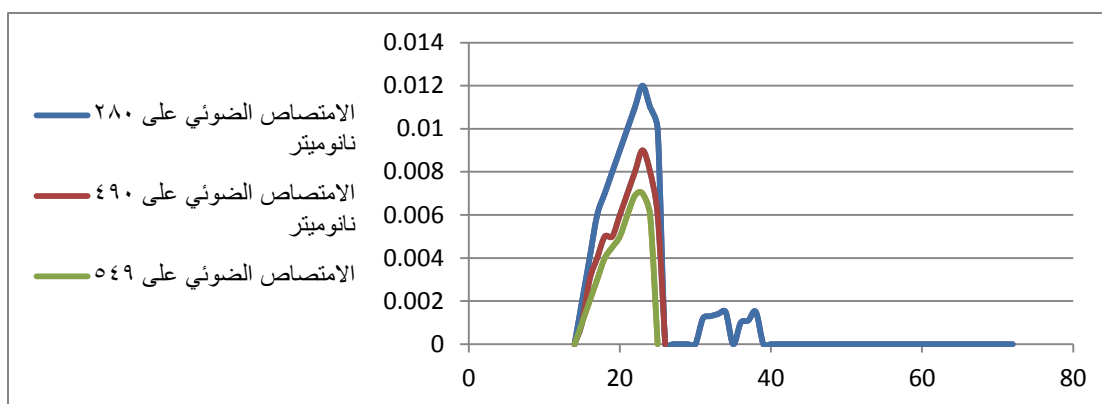
أما الوزن الجزيئي فقد تم تقديره بنفس طريقة قياس نقاوة البروتين، بالإضافة إلى استعمال خليط من البروتينات القياسية (Low Range Protein Markers)، إذ كانت تتضمن بروتينات ذات مدى يتراوح ما بين 4100-66000 Da وذلك لتحديد الوزن الجزيئي لبروتين GMP. ودرس تأثير بروتين GMP على تنشيط بكتريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus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

(١٠١) ع ، ورقم هيدروجيني مقداره (٧) وهي تحددت بالأنايب (١٥ - ٣٩) عند قياس الامتصاص الضوئي في جهاز الطيف الضوئي UV/Vis Spectrophotometer على طول موجي مقداره ٢٨٠ nm وتم التأكد من وجود الكلايكوماكروبوتايد باستخدام فحص الكربوهيدرات إذ ظهرت قمة للكربوهيدرات p_2 ضمن قمة البروتين التي تمثلت بالأنايب (١٥-٢٥) عند قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي قدره (490nm) . أما فحص حامض الساليك فقد ظهرت قمة واحدة لهذا الحامض المتمثلة في p_3 عند قراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي قدره ٥٤٩ nm وظهرت قمم صغيرة تمثل ببتيديات ذات أوزان قليلة بعد نزول قمة الكلايكوماكروبوتايد وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (Nakano, Ozimek (2000 b) عند إجراء الترشيح الهلامي خلال عمود Sepharcyl - S200 على رقم هيدروجيني (٧) . واستخدم سيفاديكس G-25 لتنقية الكلايكوبروتينات من قبل Kamiyama, Schmid (1988) (Morr, Seo (1962) و (Nakano, Ozimek (2000) . واستعمل الباحثين أنواع مختلفة من الهلام في الدراسات المتعلقة بتنقية الكلايكوماكروبوتايد في خطوة الترشيح الهلامي (Tanimoto et al., 1968, Yaguchiet al., 1994, Kawasaki et al., 1991) . ويبين الشكل (١) المخططات القياسية لكل من البروتين والكربوهيدرات وحامض الساليك في بروتين كلايكوماكروبوتايد.

الضوئي Spectrophotometer UV/Vis وعلى طول موجي مقداره ٥٩٥ nm ومقارنتها مع الوسط القياسي الخالي من الكلايكوماكروبوتايد. بعدها أجري اختبار التلازن الدموي المنفعل على بروتين الكلايكوماكروبوتايد مع مستضدات كل من بكتريا *E. coli* و *Staph. aureus* وهي عبارة عن سموم lipopolysaccharide استخلصت من البكتريا وذلك حسب الطريقة التي ذكرها (Herbert, 1973) وتم الحصول على عزلات البكتريا المستخدمة في قياس الفعالية الحيوية لبروتين الكلايكوماكروبوتايد 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 (Garvey et al., 1977) . ودرس تأثير بروتين GMP على سموم بكتريا *E. coli* والتي هي Lipopolysaccharide 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 آخر كل تجربة) وقد ضبط تركيز البكتريا كما مر آنفا حسب طريقة مكفرلاند وكما ذكر (Garvey et al., 1977) .

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 سيفاديكس G-25 الذي يقوم بإقصاء البروتينات ذات الأوزان الجزيئية القليلة ويحضر سيفاديكس G-25 من السكريات المتعددة المسماة الديكستران (دلالي والحكيم ١٩٨٧) . بين الشكل (٥) ظهور قمة واحدة لبروتين الكلايكوماكروبوتايد p_1 في الأجزاء المستردة من الهلام بواسطة محلول داري خلاص الصوديوم



شكل (١) فصل الكلايكوماكروبيبتايد باستخدام الترشيح الهلامي على عمود سيفاديكس G-25.

محتوى الكلايكوماكروبيبتايد من البروتين:

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

محتوى الكلايكوماكروبيبتايد من الكربوهيدرات:-

أظهرت نتائج تقدير الكربوهيدرات بطريقة فينول -حامض الكبريتيك أن الكلايكوماكروبيبتايد المعزول من شرش الحلو بطريقة الترسيب والمنقى بطريقة الترشيح الهلامي احتوى على كربوهيدرات بنسبة ٣١.٦ % وكما يظهر في جدول (١).

جدول (١) نسب كل من البروتين والكربوهيدرات وحامض السيليك في بروتين كلايكوماكروبيبتايد

اسم المادة	التركيز %
البروتين	٥٢.٣
الكربوهيدرات	٣١.٦
حامض السيليك	١٥.١

وهي مقارنة لما أشار إليه Nitschmann et al., (1957); Anderson et al., ١٩٧٣ إذ وجدوا أن الكلايكوماكروبيبتايد يحتوي على ٣٠% كربوهيدرات وذكر Jolles & Alais (١٩٦١) أنه يحتوي على ٢٨.٧% كربوهيدرات.

محتوى الكلايكوماكروبيبتايد من حامض السيليك:-

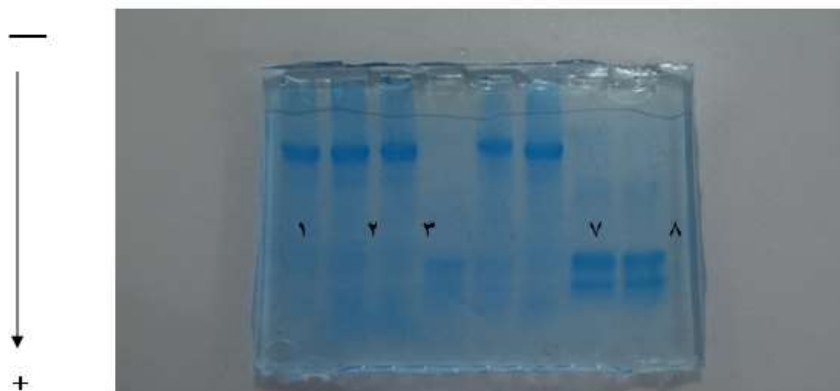
استعملت طريقة (Aminoff, ١٩٦١) لتقدير حامض السيليك في الكلايكوماكروبيبتايد المعزول من شرش الجبن المنقى بطريقة الترشيح الهلامي ووجد أنه يحتوي على ١٥.١% حامض السيليك، وقد ذكر Neelima et al., (2013) إن الـ GMP يحوي نسبة (٧-٩) % من حامض السيليك، إن وجود هذا الحامض في الكلايكوماكروبيبتايد دلالة على كفاءة طرائق التنقية المستخدمة في عزل وتنقية الكلايكوماكروبيبتايد من شرش الجبن، ويعتقد إن الوظيفة الوقائية للكلايكوماكروبيبتايد تعود إلى المجاميع الكربوهيدراتية فيه لاسيما حامض السيليك إذ إن وجوده يعمل على تحفيز نمو بكتريا Bifidobacterium وتنشيط التوكسينات والاتصاقات البكتيرية والفيروسية، Sharon & Ofek (١٩٩٠) و Kawasaki et al., (1991) وقد ذكر Jolles & Alais (١٩٦١) إن الكلايكوماكروبيبتايد يحتوي على ١٤.٣% حامض السيليك .

تعيين نقاوة الكلايكوماكروبيبتايد بالترشيح الكهربائي

تضمنت تعيين نقاوة بروتين الكلايكوماكروبيبتايد الناتج من عملية الترسيب بالـ TCA المنقى بالترشيح الهلامي، وخلوه من آثار

بالترشيح الهلامي تعد طريقة كفوءة، جاءت هذه النتيجة متفقة مع الباحثين (Nakano, et al., ؛ Nakano & Ozimek, 2000) في الحصول على كلايكوناكريوببتايد نقي عند استخدام الترشيح الهلامي. يوضح شكل (2) الحزمة البروتينية للكلايكوناكريوببتايد الخام (crud) بطريقة الترحيل الكهربائي ومقارنته مع ألبومين المصل البقري القياسي BSA.

البروتينات الأخرى استخدام الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلاميد ذي تركيز ١٢.٥% وبوجود المادة الماسخة SDS اتضح من النتائج ظهور حزمة واحدة نقية لبروتين الكلايكوناكريوببتايد خالية من اثار الببتيدات المرافقة، وأثار البروتينات الأخرى. مما يدل على إن طريقة عزل الكلايكوناكريوببتايد من شرش الجبن ومعاملته بال TCA، وتنقيته

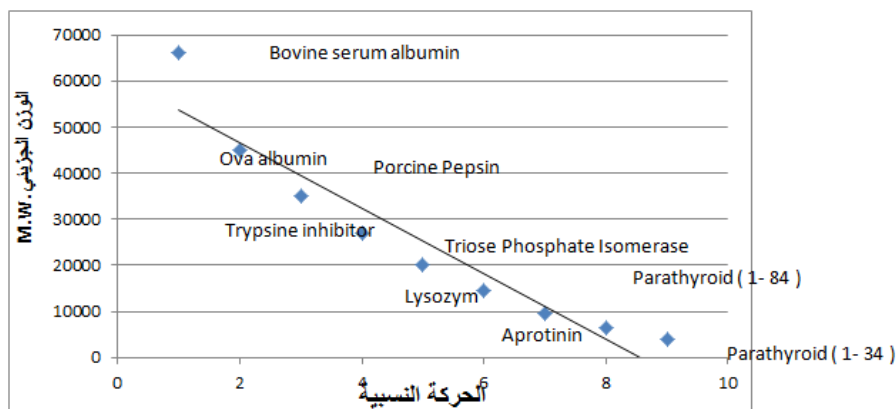


شكل (٢) الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلاميد بوجود SDS، يبين بروتين الكلايكوناكريوببتايد (٦، ٧) و بروتين البومين المصل البقري القياسي BSA (٣، ٤، ٥).

الألبومين البقري BSA كأعلى وزن جزيئي في هذه البروتينات القياسية إلى بروتين الاپروتين (Aprotinin) كأقل وزن جزيئي وكان ترحيل الكلايكوناكريوببتايد ما بين بروتين Trypsin و ٢٠ Inhibitor DaK وبروتين Lysozyme ١٤.٤ KDa.

تعيين الوزن الجزيئي للكلايكوناكريوببتايد :-

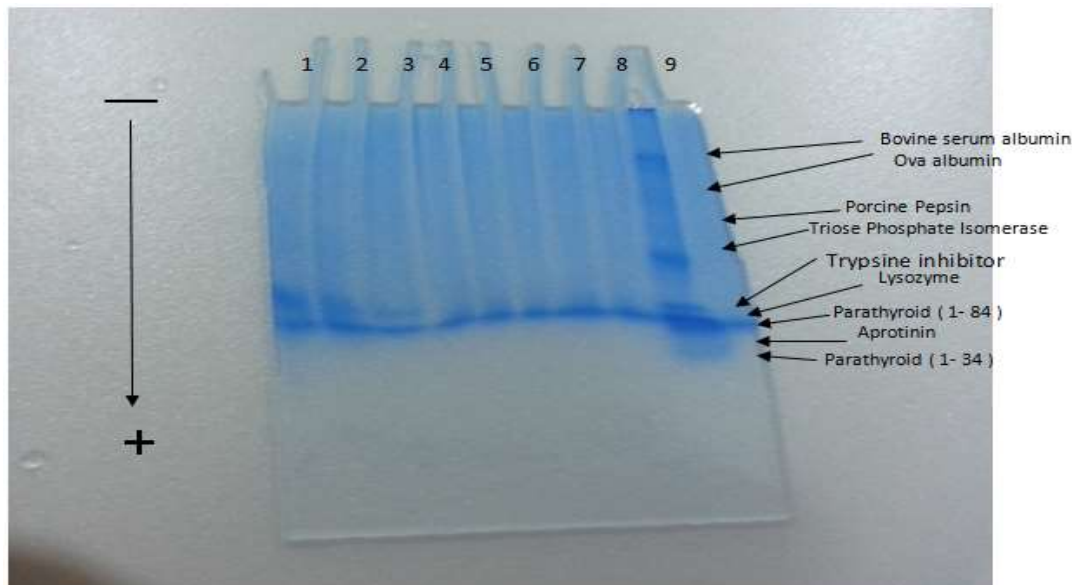
يبين الشكل (٣) الوزن الجزيئي للكلايكوناكريوببتايد بواسطة الترحيل الكهربائي بهلام اكريلاميد بوجود SDS باستخدام بروتينات قياسية للمقارنة Marker protein تتراوح أوزانها الجزيئية بين (٤.١٠٠-٦٦.٠٠٠) KDa وهي تتدرج من مصـل



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

وذكر (٢٠٠٣) Esther & Yoshinori بان الوزن الجزيئي للكلايكوماكروببتايد على رقم هيدروجيني ٧ يتراوح ما بين ٢٠-٥٠ KDa حيث إن الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي قد يعود إلى محتوى كلايكوماكروببتايد من الكربوهيدرات التي بدورها تعمل على إكسابه وزناً جزيئياً أكبر 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 أكبر من ٤ توجد بشكل رباعي وخماسي البناء بينما على قيمة رقم هيدروجيني أقل من ٣ تتخذ جزيئة الكلايكوماكروببتايد الشكل ثلاثي وتثنائي البناء مما يعطي وزن جزيئي أقل، ويوضح شكل (٤) ترحيل بروتين الكلايكوماكروببتايد مقارنة مع البروتينات القياسية .

يلاحظ من الشكل (٣) إن بروتين كلايكوماكروببتايد كان ذا وزن جزيئي حوالي ١٥.٣٢٥ KDa وهذا يتفق مع ما ذكره Farias *et al.*, (2006) Galindo – Amaya *et al.*, (2010) *al.*، إذ أشار إن سلوك الكلايكوماكروببتايد GMP في الـ SDS – PAGE يدل على أن هذا الببتايد يكون بصيغة بوليمر polymeric form وبمعدل وزن جزيئي يتراوح ما بين (٣٠-١٤) KDa ، بالإضافة إلى إن الوزن الجزيئي للـ GMP أكبر مرتين إلى ثلاث مرات من الوزن الجزيئي النظري ، إذ يكون بسبب تجمع الصيغ الأحادية monomer ليشكل تكتلات . ووجد Evelin ; Gabriel (2013) إن الوزن الجزيئي للـ GMP يمكن أن يتراوح بين (١٤ ، ٢٠ ، ٤١) KDa اعتماداً على الصيغة المتجمعة aggregated form . وإن 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 .



شكل (٤) الترحيل الكهربائي لبروتين الكلايكوماكروببتايد مع البروتينات القياسية

استخلاصه وتنقيته وارتباطه مع مستضدات البكتريا المبينة في جدول (٢).

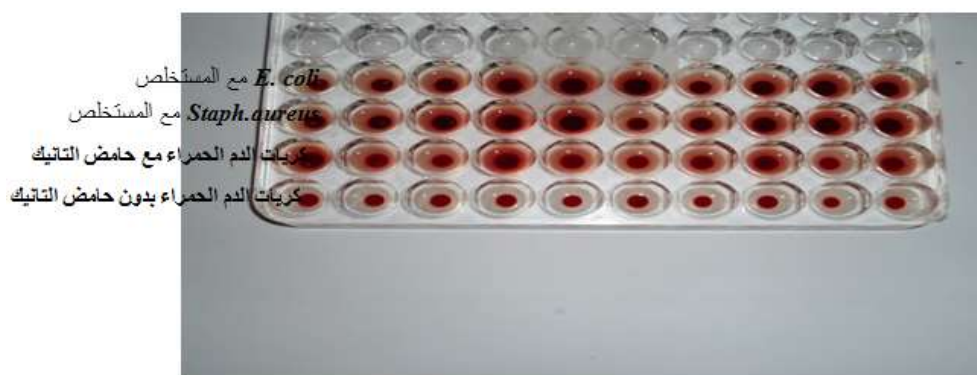
جدول (٢) معيار التلازن الدموي مع مستضدات بكتريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*

البكتريا	معيار التلازن الدموي
<i>Escherichia coli</i>	١:٢٥٦
<i>Staphylococcus aureus</i>	١:٦٤

وان ارتباط الكلايكوماكروبيتايد مع المستضد المحضر من بكتريا *E. coli* يرجح إمكانية 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 جيدة ولكن بكفاءة أقل من ارتباطه بسموم *E. coli*. وقد ذكرت التقارير بأن السكريات الثلاثية Trisaccharide وهي احد أنواع الكربوهيدرات في بروتين الكلايكوماكروبيتايد تتمكن من التلازن مع بكتريا *E. coli* (Parkkinen, et al., 1986 ;Liukkonen et al.,1992))

تقدير معيار التلازن الدموي لبروتين الكلايكوماكروبيتايد:-

يعد فحص التلازن الدموي من الطرائق المستخدمة في الكشف عن وجود الأضداد ، وتتضمن الطريقة ربط المستضد الذائب بجزيئات كبيرة خاملة مثل كريات الدم الحمراء. إذ تتمكن الأضداد من ملازمة هذه الجزيئات المحسنة 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 السياليك . 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 LPS شجعت على اقتراح استعماله في إزالة التسمم وخاص إن إنتاجه رخيص وغير مكلف. واطهر هذا البروتين المضاد الذي تم



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

زاد تركيز كلايكوماكروبيتايد 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 الكلايكوماكروبيتايد، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Cornelia, (2002) إن للكلايكوماكروبيتايد دور كبير في تثبيط بكتريا *E. coli*. واثبت *soda et al.*, (1994) إن المواد الحاوية على حامض السيليك مثل الببتيدات أو البروتينات المرتبطة بحامض السيليك أو السكريات قليلة التسكر *Oligosaccharides* لها تأثير كبير في تثبيط بكتريا القولون.

تأثير بروتين كلايكوماكروبيتايد على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* و *Staph. aureus* بوجود وعدم وجود حامض السيليك :-
لتقدير تأثير كلايكوماكروبيتايد ضد الأحياء المجهرية المرضية، تم اختبار تثبيط نمو سلالات من بكتريا *E. coli* و *Staph. aureus* وبتراكيز مختلفة من الكلايكوماكروبيتايد بوجود حامض السيليك وبعدمه. وأظهرت الجداول (٣)، (٤)، (٥)، (٦) قدرة بروتين كلايكوماكروبيتايد على تثبيط نمو البكتريا تحت الاختبار، فقد أثر على مجموعتي البكتريا السالبة لصبغة كرام *E. coli* والموجبة لصبغة كرام *Staph. aureus*. وهذا يتفق مع ما ذكره Wakabyashiet al., (1998) و Shimazaki (2000) بشأن تأثير بعض الكلايكوبروتينات ضد البكتريا الاختيارية، إذ ذكر إن بروتين اللاكتوفرين الذي يحوي على حامض السيليك في تركيبه يؤثر في تثبيط كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام. ففي الجدول (٣) يلاحظ انه كلما

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

التركيز							
المضافة من GMP							
إلى وسط النمو السائل							
N.B.							
ملغم/١٠٠ مل							
الوقت							
وقت الصفر							
بعد ٢٤ ساعة							
بعد ٤٨ ساعة							
بعد ٧٢ ساعة							
نمو	الامتصاصية	نمو	الامتصاصية	نمو	الامتصاصية	نمو	الامتصاصية
البكتريا	على ٥٩٥ نانوميتر	البكتريا	على ٥٩٥ نانوميتر	البكتريا	على ٥٩٥ نانوميتر	البكتريا	على ٥٩٥ نانوميتر
%	%	%	%	%	%	%	%
٠.١	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣
٠.٦	٠.١٢٤	٠.٦	٠.١٢٤	٠.٦	٠.١٢٤	٠.٦	٠.١٢٤
١.١	٠.١٢٠	١.١	٠.١٢٠	١.١	٠.١٢٠	١.١	٠.١٢٠
٦.٣	٠.١٢٣	٦.٣	٠.١٢٣	٦.٣	٠.١٢٣	٦.٣	٠.١٢٣
ماء مقطر	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣	٠.١	٠.١٢٣

• مكررين لكل معاملة

تأثير في تثبيط نمو *E. coli*. وهذا يتفق مع ما ذكره Kawasaki, et al., (1992) بأن لحامض السيليك في الكلايكوماكروبيتايد 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 التهابات المرضية. وذكر Viljoen

أما في الجدول (٤) فيلاحظ إن القدرة التثبيطية للكلايكوماكروبيتايد كانت أقل عند إزالة حامض السيليك، 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 كلايكوماكروبيتايد خلال ٧٢ ساعة على التوالي وهذا يدل على أن لحامض السيليك

،ويطلق عليها (porins) ومن المحتمل ان تكون هدفاً للارتباط مع الكلايكوماكروبيبتايد على سطح الكائن المجهرى ويعتقد إن فعالية الكلايكوماكروبيبتايد تعتمد على قابلية ارتباطه مع الـ (porins).

(1995) Levay & Shimazaki (2000)؛ Vogel, et al., (1997) وجود بعض البروتينات الثانوية (Minor proteins) على سطح البكتريا السالبة لصبغة كرام ،وزنها الجزيئي ٣٨ KDa وتكون لهذه البروتينات إلفة عالية حيال المواد التي ترتبط معها

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

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

• مكررين لكل معاملة

ذلك ليكون التثبيط عالياً عند ٧٢ ساعة في التركيز ٦.٣ إذ كان نمو البكتريا بحدود ٣.٤% بينما التركيز ١.١ كانت هناك نسبة نمو بسيط خلال ٧٢ ساعة وصل إلى ٥.٨% وهي نسبة قليلة مقارنة مع الوسط القياسي إذ كانت نسبة النمو بحدود ١٩.٦%.

ويبين الجدول (٥) الزيادة في نسبة نمو بكتريا *Staph. aureus* إذ كانت واضحة فيالتركيز ٠.١ ، ٠.٦ ، ١.١ ، ٦.٣ ملغم /مل خلال ٤٨ ساعة وينسبة اقل عند مقارنتها مع الوسط القياسي الخالي من الكلايكوماكروبيبتايد ، وانخفض النمو بعد

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

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

• مكررين لكل معاملة

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 للكلايكوماكروبيتايد على بكتريا *Staph aureus*.

وفي الجدول (٦) انخفضت نسبة النمو من ٢.٩ إلى ١.٩ لتصل ٠.٩ % في الوسط المضاف له ٦.٣ تركيز كلايكوماكروبيتايد بينما كان النمو بسيطاً خلال ٤٨ ساعة للتركيز ١.١ ملغم إذ وصل إلى ٢.٩ % وانخفض إلى ٠.٩ % بعد ٧٢ ساعة . إن نسبة النمو ارتفعت في التركيزين ٦.٣ و ١.١ بعد ٤٢ ساعة لتتخفف بعد

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

التركيز	الوقت							
	وقت الصفر		بعد ٢٤ ساعة		بعد ٤٨ ساعة		بعد ٧٢ ساعة	
المضافة من GMP إلى وسط النمو السائل N.B. ملغم/١٠٠ مل	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	٠.١٠٢	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

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 أن 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* . 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 وتثبيط كريات الدم المختلفة يبدو انه الدور الأساسي في التأثير الواقي لبروتين GMP ، فقد كانت النتائج التي حصل عليها (2006) *Michal et al* أثبتت ورفدت

إن تثبيط البكتريا بكلايكوماكروبيتايد قد لا يكون كاملاً لوجود أعداد من البكتريا مكونة مستعمرات ممكن أن تسبب الالتهابات (Bruck et al., 2003 a) . ولأعداد الخلايا الحية والميتة تأثير فقد تكون 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 الكلايكوماكروبيتايد GMP على أنواع كريات الدم في الفئران :-

يبين الجدول (٧) تأثير بروتين الـ GMP على مكونات الدم المختلفة مثل كريات الدم البيضاء والحمراء والصفائح الدموية ، إذ تظهر المجموعة ٥ أعلى معدل لكريات الدم البيضاء $10^9/L$ أي تأثيراً معنوي (0.05P<) إذ تضمنت إعطاء الفئران بروتين GMP فقط وبدون أي معاملة ، أما المجاميع (١ ، ٢ ، ٣ ، ٤) فنلاحظ فيها انخفاض معنوي (0.05P<) عن مجموعة

كريات الدم الحمراء للمجموعة الأولى، إذ كان $10.30 \times 10^{12}/L$ وهذا قد يعود إلى التركيز العالي للبروتين الذي كان 10 ملغم/ 0.2 مل. نستنتج مما سبق إن زيادة أعداد كريات الدم الحمراء قد يرجع إلى الفعالية الحيوية لبروتين GMP والتي قد تكون في قدرته على تنشيط نخاع العظم المسؤول عن إنتاج كريات الدم الحمراء.

بفوائد طبية متمثلة ببروتينات الحليب المشتقة وبيتيدات مثل الـ GMP. أما بالنسبة لكريات الدم الحمراء فقد كانت الأعداد معنوية ($0.05P <$) مقارنة إلى المعدل الطبيعي المتمثل بمجموعة السيطرة (مجموعه ٦) إذ كان المعدل $8.35 \times 10^{12}/L$ ، عدا مجموع (٣) فقد كان المعدل $4.75 \times 10^{12}/L$ إذ نلاحظ انخفاض أعداد كريات الدم الحمراء بشكل واضح وهذا قد يرجع إلى قلة تركيز بروتين GMP المستعمل، في نفس الوقت نلاحظ ارتفاع أعداد

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

رقم المجموعة	تركيز بروتين GMP	نوع المعاملة المستخدمة	معدل إعداد مكونات الدم		
			PLT $\times 10^9/L$	RBC $\times 10^{12}/L$	WBC $\times 10^9/L$
١	١٠ ملغم/ 0.2 مل saline	سموم LPS	a7.08	a10.30	a6.41
٢	١٠ ملغم/ 0.2 مل	بكتريا <i>E. coli</i>	b5.64	b7.77	b6.76
٣	٠.١ ملغم/ 0.2 مل	بكتريا <i>E. coli</i>	b5.70	c4.75	c5.28
٤	٠.١ ملغم/ 0.2 مل	سموم LPS	c11.63	d8.74	d8.75
٥	١٠ ملغم/ 0.2 مل	بروتين GMP	d8.51	b7.66	e7.79
٦	—	محلول الـ saline	e9.72	e8.35	f7.09

• شناهو، 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). Etude Comparée des caseinoglycopeptides forms par action de la pression sur les caseins de vache et de chevre. II Etude de la Partie non-peptidique. Biochem. Bio phys. Acta, Vol. 51. pp: 315.

المصادر

- الشبيبي، محسن محمد علي وطمعه، 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.

- 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 1: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 glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. Revista Científica cv-luz, v. 16, n. 3, p. 308-314.
 - **Galindo-Amaya LL, Valbuena-Colmenares E, Rojas-Villaruel E. (2006)** .Standardization of glycomacropeptide detection with SDS–PAGE as a milk adulteration index. Rev Cient (Maracaibo) . 16:308–314.
 - **Garvey, J. S. ; Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. (1977).** Methods in Immunology .3rd ed. W. A., Benjamin, Inc., London.
 - **Herbert , w .J. (1973)** .Passive haemagglutination with special references to the tanned cell-technique . In: Handbook of experimental immunology. Weir, D.M. (ed) Black well scientific publication Oxford, 20p.
 - **Isoda, H. ; Kawasaki, Y. ; Tanimoto, M. ; Dosako, S. and Idota, T. (1994).** Bacteriophage 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..
 - **Aminoff, D. (1961).** Methods for quantitative estimation of N-acetylneuraminic 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 κ -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

- 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 caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. *J Food Sci* 65(4):588– 590.
 - **Neelima, Rajan Sharma, Yudhishtir 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 Microbiology and Immunology*, 151 : 91-113.
 - **Oliva, Y.; Escobar, A.; Ponce, P.(2002).** Caseinomacropéptidobovino: una alternativa para la salud. *Rev. Salud Anim.*, v.24, n.2, p.73-81 .
 - **Parkkinen A, Rogers GN, Korhonen T, 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-dependent molecular weight changes of 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).** Lactoferrin: a review. *Haematologica.*, 80 :252-267.
 - **Liukkonen J, Haataja , Tikkanen K, Kelm S & Finne.(1992).** Identification of N-acetyl neuraminyl & 2-3 poly -N-acetyl lactosamine glycans as the receptors of sialic acid -binding streptococcus strains. *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 with caseinomacropéptide and whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.5, p.1535-1540.
 - **Michal Zimecki, Jolanta Artym , Grzegorz Chodaczek, Maja Kocieba, Jacek Rybka, 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-Hernandez, 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.