

әл – Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ: 60:664 (574) (043)

Қолжазба құқығында

НАРМУРАТОВА ЖАНАР БАХЫТОВНА

**Бие сүті сарысу белогының биологиялық белсенді пептидтерін алу
технологиясы**

6D070100 - Биотехнология мамандығы

**Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация**

**Ғылыми кеңесшілер:
Отандық ғылыми кеңесші б.ғ.к.,
профессор м.а. Нармуратова М.Х.**

**Шет елдік ғылыми кеңесші HDR,
профессор: Céline Sakir-Kiefer
(Лотарингия университеті, Франция)**

**Қазақстан Республикасы
Алматы, 2024**

МАЗМҰНЫ

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	4
НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР	5
АНЫҚТАМАЛАР	6
КІРІСПЕ	7
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	12
1.1 Дүниежүзіндегі және Қазақстандағы сүт өндірісі	12
1.2 Ауыл шаруашылығы жануарлары сүтінің химиялық құрамы	17
1.3 Сүттің белоктық құрамы	23
1.4 Лактоферрин - көп функционалды сарысу белогы	25
1.5 Сүт белоктарының пептидтері	30
2 ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІСІ МЕН ӘДІСТЕРІ	39
2.1 Зерттеу объектісі	39
2.2 Зерттеу әдістері	39
2.2.1 Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштерін анықтау	39
2.2.2 Сарысу белоктарын бөліп алу	39
2.2.3 SDS-PAGE электрофорез әдісі	40
2.2.4 Лактоферринді бөліп алу	40
2.2.5 Лактоферриннің антиоксиданттық қасиетін анықтау	42
2.2.6 Лактоферриннің металл иондарын байланыстыру (хелаттаушы) қасиетін анықтау	45
2.2.7 Лактоферринді ферментативті гидролиздеу	48
2.2.8 Лактоферрин және оның пептидтерінің антимикробтық қасиетін анықтау	48
2.2.9 MS талдау әдісі	49
2.2.10 Белокты және пептидтерді сипаттауда қолданылған деректер базасы	50
2.2.11 Статистикалық өңдеу әдістері	51
3 АЛЫНҒАН НӘТИЖЕЛЕР ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	52
3.1 Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштері және сарысу белоктарын бөліп алу	52
3.2 Бие сүті сарысу белоктарынан лактоферринді бөліп алу	55
3.3 Лактоферрин белогының аминқышқылдық тізбегі мен құрамы	59
3.4 Лактоферрин белогының биологиялық белсенді қасиеттерін зерттеу	63
3.4.1 Лактоферрин белогының антиоксиданттық қасиеті	63
3.4.2 Лактоферрин белогының металл иондарын байланыстыру қасиеті	68
3.4.3 Лактоферрин белогын гидролиздеу және антимикробтық қасиетін анықтау	77
3.5 Лактоферрин белогының биологиялық белсенді пептидтерін анықтау	79

3.6 Лактоферрин және оның пептидтерін алу технологиясының сызбасы	92
ҚОРЫТЫНДЫ	96
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	97
ҚОСЫМШАЛАР	111

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

ЛФ	Лактоферрин
ТФ	Трансферрин
2,6 – ДХФИФ	2,6 – дихлорфенолиндифенол
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Жылдам протеинді сұйық хроматография)
K _a :	Байланыстыру константасы
K _D :	Диссоциация константасы
SDS-PAGE:	Натрий додецилсульфаты-Полиакриламид гелі
°T	Тернер градусы
eLF	Бие сүті лактоферрин белогы (Equine lactoferrin)
bLF	Сиыр сүті лактоферрин белогы (Bovine lactoferrin)
cNL	Комплементарлы нанолевер
ИТК (ITC)	Изотермиялық титрлеуші калориметрия (Isothermal titration calorimetry)
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
ABTS ⁺	2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоқыслоты)
ЭДТА	Этилендиаминтетрааірке қышқылы
FRAP	Темірді тотықсыздандырушы антиоксиданттық қабілетті талдау (Ferric reducing activity)
AERC	Аскорбин қышқылына эквивалентті тотықсыздандыру сыйымдылығы (Ascorbic Acid Equivalent Reducing Capacity)
ROS	Оттегінің белсенді түрлері
ACE	Ангиотензин конвертеуші фермент
NCBI	Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығы
МемСТ	Мемлекеттік стандарт

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертациялық жұмыста келесідей стандарттарға сілтемелер қолданылды:

МемСТ 5343-8	Сүт сарысуы. Техникалық шарттар.
МемСТ 3624-92	Сүт және сүт өнімдері. Қышқылдығын анықтаудың титрометриялық әдістері.
МемСТ 26754-85	Сүт және сүт өнімдері. Температураны өлшеу әдістері.
МемСТ 25179-90	Сүт және сүт өнімдері. Белоктың массалық үлесін анықтау әдістері.
МемСТ 26781-85	Сүт және сүт өнімдері. Электрометрлік әдіс арқылы рН - метрде белсенді қышқылдылықты анықтау әдістері (рН – 121).
МемСТ 3628-78	Сүт және сүт өнімдері. Қантты анықтау.
МемСТ 5867-90	Сүт және сүт өнімдері. Майды анықтау әдістері.
МемСТ 3624-73	Сүт және сүт өнімдері. Қышқылдықты анықтау әдістері.
МемСТ 3625-84	Сүт және сүт өнімдері. Тығыздығын анықтау әдісі.

АНЫҚТАМАЛАР

Лактоферрин – трансферриндер тобына жататын полифункционалды белок. Молекулалық салмағы шамамен 80 кДа болатын глобулярлы, бір полипептидті тізбекті гликопротеин. Организмнің шырышты эпителий клеткаларынан бөлінетін сұйықтықтарда кездеседі және ондағы бос темірдің деңгейін реттеуде маңызды роль атқарады.

Биологиялық белсенді пептидтер жоғары тағамдық құндылыққа ие, организмнің белгілі бір қызметіне және адам денсаулығына оң әсер ететін белоктағы белгілі бір аминқышқылдарының реттілігі (тізбегі) ретінде анықталады.

Антиоксиданттар – реактивті оттегі түрлерін бейтараптандыруға көмектесетін қосылыстар.

Хелаттау – органикалық молекуланың, хелаттандырушы агенттің күрделі сақина құрылымына минералды ионды немесе катионды байланыстыруды білдіреді.

switchSENSE® DRX – металл иондары мен органикалық заттардың байланысуын анықтайтын биосенсорлық анализатор.

Ион алмасу хроматографиясы – иондар мен полярлы молекулаларды зарядына қарай бөлетін әдіс. Бұл әдісті іс жүзінде кез келген зарядталған молекуланы, соның ішінде белоктарды, нуклеотидтерді және амин қышқылдарын бөлу үшін пайдалануға болады.

Полиакриламидті гель электрофорезі – тұрақты электр өрісіндегі зарядталған биологиялық макромолекулалардың қозғалысына негізделген белоктар мен нуклеин қышқылдарын молекулалық массасын анықтау мақсатында қолданылатын молекулалық биологияның және биохимияның әдісі.

MS талдауы – зерттелетін заттың ион шоғыры алынуына негізделген физикалық зерттеу және анализдеу әдісі; бұл шоғыр массасының зарядына қатынасы бойынша жеке компоненттерге бөлініп, осы компоненттердің салыстырмалы мөлшері тіркеледі. Әдістің артықшылығы затты аз мөлшерде анықтауға, талдауға қабілетті.

Бие – құлындаған, сауатын аналық жылқы түрі.

КІРІСПЕ

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы: Сүт сарысуы сүтті өңдеу нәтижесінде алынатын жанама өнім. Сарысу белоктары алмасатын және алмаспайтын аминқышқылдары мен биологиялық белсенді пептидтердің қайнар көзі болып табылады. Бие сүті сарысу лактоферринінің биологиялық қасиеттері (антиоксиданттық, антимикробтық, металл иондарын байланыстыру және т.б.) оның асқазан-ішек жолдарында ферменттік гидролизге ұшырап, нәтижесінде түзілетін пептидтер негізінде сіңімділігі артады. Лактоферриннің биологиялық қасиеттері құрамында кездесетін аминқышқылдары тізбегіне байланысты болады. Диссертациялық жұмыс бие сүті сарысу белогы лактоферринді бөліп алуға және оның биологиялық белсенді пептидтерін анықтауға негізделген.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі: Белоктық құрамы бойынша үй жануарларының ішінде, бие сүті ана сүтіне жақын. Бие сүтінің құрамы басқа жануарлардың сүтінен айтарлықтай ерекшеленуі оның биологиялық құндылығы мен сіңімділігінің жоғарылығына байланысты. Бие сүтінде басқа сүтқоректілер сүтімен салыстырғанда сарысу белогының үлесі шамамен 39%, сиыр сүтінен (18%) жоғары мөлшерінің болуына байланысты «альбуминдік сүт» типі болып саналады. Құрамында сарысу белогы мөлшерінің жоғары болуы балалар мен қарт адамдар рационы үшін тиімділігін көрсетеді. Сарысу белоктары аргинин, гистидин, триптофан және лейциннің қосымша көзі, сонымен қатар теңдестірілген қатынаста фенилаланин және тирозин аминқышқылдары кездеседі. Бие сүті сарысу белоктарының құрамы келесідей: β -лактоглобулин, α -лактальбумин, сарысу альбумині, иммуноглобулиндер, лактоферрин, лизоцим. Жоғарыда келтірілген белоктардың бірі лактоферрин, организмнің шырышты эпителий клеткаларынан бөлінетін сұйықтықтарда (сүт, сілекей, көз жасы және әртүрлі биологиялық сұйықтықтарда) кездесетін глобулярлы белок. Лактоферриннің сүт құрамындағы мөлшері сиыр сүтімен (0,03-0,2 г/л) салыстырғанда бие сүтінде бірнеше есе жоғары (0,2-2 г/л), бірақ ана сүтінен (1-7 г/л) кейінгі орында.

Лактоферрин организмнің гомеостазын сақтап тұруға бағытталған көп функционалды қасиетіне (антибактериялық, антиоксиданттық, иммуномодуляциялық, жараға, ісікке қарсы белсенділікке ие бола отырып, әртүрлі биохимиялық реакцияларды катализдеуге қабілетті және т.б.) байланысты, соңғы жылдары ғалымдардың қызығушылығын арттыруда. Сонымен қатар, бос темірдің деңгейін реттеуде және жасуша рецепторларымен байланысу қабілетінің негізінде иммуномодулеуші қасиеттерге ие.

Белок ағзаға нативті түрде қабылданады, алдымен асқазан-ішек жолында тіршілік ететін микрофлораның асқорыту ферменттерінің әсерінен пептидтер немесе жекелеген аминқышқылдары (алмастырылатын/ алмастырмайтын) түрінде қан айналымына енеді. Түзілетін пептидтердің

сіңімділігі оның аминқышқылдық құрамымен байланысты болады. Соңғы жылдары жапон ғалымдарының мәліметтері бойынша, протеолиз кезінде түзілген пептидтер биологиялық қасиеттері нативті белоктарға қарағанда белсенділігі жоғары болған. Сондықтан, лактоферриннің биологиялық қасиеттері оның пептидтеріне тәуелді болуы мүмкін. Лактоферрин мен оның биологиялық белсенді пептидтері иммунитетті жақсартуға, қан қысымын қалыпты сақтауға, қабыну үдерісін бақылауға және т.б. жауап береді.

Пептидті кешендер негізінде тағамдық, емдік және профилактикалық жаңа заттар алуға жол ашылуда. Тағам өнеркәсібі үшін әртүрлі ұзындықтағы пептидтерге ди-, три- және полипептидтер түрінде адамдардың рационалды тамақтану стратегиясының ең маңызды элементі бола алады. Күнделікті тағам құрамында ұзақ мерзімді белоктың немесе кейбір аминқышқылдарының жетіспеушілігі бірқатар ауруларға алып келеді. Сондықтан, пептидтердің құрылымдық-функцияналдық қасиеттерін зерттеу нәтижесінде биологиялық белсенді пептидтерді анықтаудың қажеттілігі туындап отыр. Қазіргі уақыттағы зерттеу жұмыстары негізінен әртүрлі созылмалы аурулардың дамуын алдын-алуға, ағзаның иммунитетін жоғарылатуда пептидті препараттарды пайдалануға бағытталған, бірақ олардың профилактикалық әсеріне қатысты мәліметтер келтірілмеген. Пептидтердің биологиялық белсенді қасиеттерін негізге ала отырып, әртүрлі функцияналдық қасиеті бар, емдік-профилактикалық заттар мен тағамдық қоспалар әзірлеу қажет.

Пептидтер ағзаны патогенді микрофлораның көбеюінен қорғайды, асқазан-ішек жолдарының шырышты қабатының регенерациясын және жаңаруын ынталандырады. Ағза үшін алмастырылмайтын амин қышқылдарының көзі ғана емес, сонымен қатар кальций, темір, мырыш т.б. минералды элементтерін байланыстырып, ішек энтероциттері арқылы оның ерігіштігін және сіңірілуін арттыру тұрғысынан да үлкен сұранысқа ие. Пептидтер құрамындағы ароматты амин қышқылдары есебінен антиоксиданттық, иммуномодуляциялық қасиет көрсетеді.

Сүт сарысу белогынан пептидтерді алуда, оның ішінде биологиялық белсенді пептидтерді анықтауда жаңа тиімді технологиялар жасау өзекті мәселенің шешімі болады. Алынған нәтижелер, бие сүті сарысу белогынан бөлініп алынған пептидтердің емдік-профилактикалық мақсатта, ағзаның иммунитетін жоғарылатуда тағам мен денсаулық қатынасы туралы іргелі білім алудың тиімді жолдарын жетілдіруге ықпалын тигізеді.

Зерттеу тақырыбының мақсаты: Бие сүті сарысуынан лактоферрин белогын және оның пептидтерінің биологиялық белсенді қасиеттерін зерттеу және бөліп алу технологиясын жасау.

Қойылған мақсатқа жету үшін зерттеудің негізгі міндеттері:

1. Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштерін анықтау және сүт сарысу белоктарын жіктеу;
2. Сүт сарысу белоктарынан лактоферрин белогын бөліп алу және оның амин қышқылдық тізбегін сипаттау;

3. Лактоферрин белогының антиоксиданттық, антимикробтық және металл иондарын байланыстыру (хелаттаушы) қасиеттерін зерттеу;

4. Лактоферрин белогын ферменттік гидролиздеу және пептидтерінің биологиялық қасиеттерін анықтау;

5. Лактоферрин және оның пептидтерін алудың технологиялық сызбасын әзірлеу.

Зерттеу объектісі: Бие сүті, лактоферрин, пептидтер.

Зерттеу әдістері: Жұмыста биотехнологиялық, биохимиялық, микробиологиялық, молекулалық-генетикалық, физико-химиялық және статистикалық әдістер қолданылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы:

Сүт сарысуы - сүт өнімдері өндірісінің жанама өнімі, құрамына кіретін белоктар және олардың пептидтері биологиялық белсенділіктің жоғары деңгейімен сипатталады. Патогенді микроорганизмдерге қарсы және иммуномодуляциялық қасиеті бар сарысу белогының бірі лактоферрин. Алғаш рет Қазақстандық бие сүтінен сарысу белогы лактоферрин бөліп алынды. Бие сүті лактоферринінің аминқышқылдық қатарының реттілігі анықталып, биологиялық белсенді қасиеттері (антиоксиданттық, антимикробтық, металл иондарын байланыстыру) зерттелді.

Сонымен қатар, лактоферриннің белсенді пептидтері алынып, олардың антимикробтық, бос темір иондарын байланыстыру әсері анықталды. Трипсинмен ферментативті өңдеу нәтижесінде жалпы саны – 56 катионды, анионды және бейтарап пептидтер алынды. Пептидтердің биобелсенділігі, суда ерігіштігі мен аллергенділігі сипатталып және пептидтердің темір иондарын байланыстыратын 28 пептид анықталды.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде лактоферрин және оның пептидтерін алу технологиясының сызбасы ұсынылды.

Теориялық маңыздылығы: Сүт сарысу белоктары мен оның биологиялық белсенді пептидтері ағзаны бос радикалдардан бейтараптандыратын антиоксиданттық белсенділікке ие. Пептидтер ағзада минералды элементтердің сіңуі мен биожетімділігін жақсартуға қатысады. Құрамында гистидин, цистеин, серин, аспарагин және глутамин қышқылынан тұратын пептидтер екі валентті металл иондарын (кальций, темір, мырыш, магний т.б.) байланыстырып, нәтижесінде, еритін пептид-металл кешені (комплексерін) түзіледі, осылайша минералды элементтердің жетіспеушілігінің қаупін азайтады.

Сондай-ақ, пептидтердің ағзаны жақсартуға мүмкіндік беретін функционалды тағамдық өнімдер үшін табиғи ингредиенттердің көзі ретінде пайдалануға болады. Ғылыми жұмыс нәтижесі бойынша сүт сарысуынан маңызды биологиялық белсенді пептидтер алуға болады.

Практикалық маңыздылығы: Зерттеу жұмысында анықталған бие сүті лактоферрині мен оның пептидтерінің биологиялық қасиеттерін ескере отырып, зерттеу нәтижелерін медициналық, косметикалық және тағамдық мақсатта физиологиялық тиімді препараттар жасау үшін қолдануға болады.

Бие сүті сарысу белоктарын өңдеу негізінде лактоферринді бөліп алудың технологиялық сызбасы әзірленді және жұмыс нәтижелері бойынша ҚР патенті алынды («Бие сүтінен лактоферринді бөліп алу және тазарту тәсілі», №6702, 26.11.2021 ж.), сонымен қатар сүтті кептіру жұмыстары бойынша авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік алынды («Құрғақ сүт өндіру технологиясы (техникалық нұсқау)», №6859, 22.04.2021 ж.).

Зерттеу нәтижелері бойынша сүт сарысуынан таза белоктарды бөліп алу және бөлініп алынған белоктардың тазалығын анықтау әдістері жетілдірілді. Лактоферрин және оның пептидтерінің антимиқробтық, антиоксиданттық, металдарды байланыстыру әдістерінің хаттамалары дайындалады. Зерттеу жұмысының ережелері мен тұжырымдамалары негізінде жоғары оқу орындарында білім алушыларға (студенттер мен магистранттар) арналған тағамдық биотехнология, биохимия, микробиология пәндері бойынша әдістемелік нұсқаулық шығаруға ұсыныс беріледі.

Алынған нәтижелер коммерциялық потенциалға ие.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

1. Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштері анықталды және сүт сарысу белоктары жіктелді.
2. Сүт сарысу белоктарынан лактоферрин белогы бөліп алынды және оның амин қышқылдық тізбегі сипатталды.
3. Лактоферрин белогының антиоксиданттық, антимиқробтық және металл иондарын байланыстыру (хелаттаушы) қасиеттері зерттелді.
4. Лактоферрин белогына ферменттік гидролиз жүргізілді және алынған пептидтердің биологиялық қасиеттері анықталды.
5. Лактоферрин белогын және оның пептидтерін алудың технологиялық сызбасы әзірленді.

Қорғауға ұсынылатын ғылыми жұмыс нәтижелерінің жасақталуына қосқан диссертанттың жеке үлесі

Диссертациялық жұмыстың барлық тәжірибиелер мен нәтижелері диссертанттың жеке қатысуымен орындалды. Ғылыми әдебиеттерге деректерге шолу жасалды, жұмыстың мақсат-міндеттері анықталды, зерттеу объектісі мен концепциясы таңдалды. Сонымен қатар тәжірибиелік зерттеулер жүргізілді және орындалуы жоспарланды, алынған нәтижелерге статистикалық өңдеу мен талдау жүргізілген, мақалалар дайындалып, ҚР патенті мен авторлық куәлік алынды.

Диссертациялық жұмыстың апробациясы: Диссертациялық жұмыстың негізгі қағидалары мен зерттеу нәтижелері төмендегідей халықаралық-ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда баяндалды және талқыланды:

- Студенттер мен жас ғалымдарға арналған «Фараби әлемі» Халықаралық ғылыми конференциясы (9-10 сәуір 2019 ж., Алматы, Қазақстан).

- The International Scientific conference of young scientists. “Fundamental research and innovations in molecular biology, biotechnology, and biochemistry” dedicated to the 80th anniversary of academician Murat Aitkhozhin (28-29 қараша 2019 ж., Алматы, Қазақстан).

- 8th IDF International Symposium on sheep, goat, and other non-cow milk (4-6 қараша 2020 ж., Бельгия).

- Студенттер мен жас ғалымдарға арналған «Фараби әлемі» Халықаралық ғылыми конференциясы (6-8 сәуір 2021 ж., Алматы, Қазақстан).

- Polysac 2nd International Conference, Chelation of divalent metals and antioxidant activities of equine lactoferrine (11-13 желтоқсан 2021 ж., Тунис (Tunisia)).

- The 3rd International Scientific and practical conference dedicated to the 85th anniversary of the Tashkent Pharmaceutical Institute «Modern pharmaceuticals: actual problems and prospects» (2 қараша 2022 ж., Ташкент, Өзбекстан).

Басылымдар. Зерттеу жұмысының нәтижелері 14 ғылыми еңбекте жарияланды, олардың қатарында *Web of Science* және *Scopus* базасына кіретін *LWT-Food Science and Technology* журналында (Q1) - 1 мақала, Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім саласында сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынатын ғылыми журналдарда – 3 мақала, Халықаралық конференциялар мен симпозиумдар жинақтарында – 8 тезис жарық көрді. Сонымен қатар, 1 Патент және 1 авторлық куәлік алынған.

Диссертацияның құрылымы. Диссертациялық жұмыс 112 мәтіндік беттен жазылған және белгілеулер мен қысқартулар, нормативтік сілтемелер, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды бөлімдерінен, 190 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен, 11 кестеден, 36 суреттен тұрады.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Дүниежүзіндегі және Қазақстандағы сүт өндірісі

Дүниежүзінде сүт өндірісі ауыл шаруашылығының маңызды бөлігі және адамзатты қоректік заттармен қамтамасыз етуде сүт негізгі тағам өнімдерінің бірі болып табылады. Сүт өнімдері тағам нарығының маңызды сегменті болып табылады. Сүт өндіру және өңдеу агроөнеркәсіптік кешеннің перспективалы және қарқынды дамып келе жатқан салаларының бірі. Дүние жүзіндегі халық санының өсуіне байланысты сүт пен сүт өнімдерін тұтыну артып келеді. Сүтті тұтыну сүт өндіру саласының дамуын сипаттайтын негізгі көрсеткіш болып саналады [1-3].

Бүкіл әлемде сүт пен сүт өнімдеріне сұраныс халық санының өсуімен, урбанизация және т.б. өзгерістермен артуда. Сүт өнімдерінің әлемдік тұтынуы бір адамға есептегенде 2009 жылы 103,8 кг-ға жетті (2008 жылмен салыстырғанда 0,2% артық) [2]. Ал, 2015 жылы бір адам басына шаққандағы сүт өнімдерін тұтыну жылына 111,3 кг болса, 2018 жылы – 115 кг-ды, 2020 жылы – 116 кг [4; 5] құрады, бірақ әлемнің әртүрлі аймақтарында айтарлықтай айырмашылықтар бар. Мысалы, Ирландия жан басына шаққанда пастерленген сүт өнімдері мен ұзақ мерзімді сүт өнімдерін тұтыну деңгейі бойынша әлемдік көшбасшы болып табылады – бір адамға есептегенде жылына 160 кг, ал Қытайда-небәрі 19 кг. Дамыған елдердің ішінде ең ірі сүтті тұтынушылардың ондығына Ұлыбритания, АҚШ, Канада, Жапония, Оңтүстік Корея және Австралия (негізінен пастерленген сүт), сондай-ақ Франция, Германия, Италия кіреді. Бұл елдерде сұйық сүт өнімдерін тұтыну 66,7 млрд/кг – аталған өнімдерді тұтыну барлық нарықтың 76%-ы және бүкіл әлемде 23,5% құрайды. Дүние жүзіндегі ұзақ сақталатын сұйық сүт өнімдеріне (бөлме температурасында сақтауға болатын тағамдар) сұраныстың артуы сүт өндірісінің негізгі бағыттарының бірі. Осы орайда ескеретін жағдай, жаңадан сауылған сүт өнімдері саудасының көлемі төмен күйінде қалып отыр [1-3].

2019-2022 жылдар аралығындағы COVID-19 вирусы салдарынан болған әлемдік пандемия ғаламдық нарықтың көптеген секторларына кері әсерін тигізді. Дегенмен, пандемия кезеңінде ауыл шаруашылығы саласы мен сүт және сүт өнімдеріне деген сұраныс артты. 2020 жылы әлемдік нарықта сүт өндіру көлемі 2019 жылмен салыстырғанда 2,0% - ға өсіп, 906 млн тоннаны құрады [4-6]. International Farm Analysis Network (IFCN) сарапшыларының 2011-2021 жылдары бағалауы бойынша, дамушы елдерде сүтті тұтыну жылына 3,3%-ға артты, сәйкесінше дамыған елдерде жылына 1,2%-ды құрады. Ал, әлемдік сүт өндірісі 2022 жылы 0,7%-ға өсіп, шамамен тоғыз жүз млн.тоннаға жуық құраған. IFCN болжамы бойынша 2021-2030 жылдары дамушы елдерде сүтті тұтыну жылына орта есеппен 2,6%-ға артады, дамыған елдерде жылына 0,4%-ды құрайды. Еурокомиссияның мәліметінше, Қытай мен Жапониядан басқа Азия елдері 2020-2022 жылдармен салыстырғанда 2032 жылға қарай сүт тұтынуды 35%-ға арттырады [7-8].

Сүтті тұтыну бойынша, Еуразия материгінің Азия бөлігінде орналасқан мемлекеттер сүт тұтыну көлемі бойынша алдыңғы қатарда. Бұл үрдіс Шығыс және Оңтүстік-Шығыс Азияда, әсіресе Қытай, Индонезия және Вьетнам сияқты халық тығыз қоныстанған елдерде байқалады. Сүт пен сүт өнімдеріне сұраныстың артуы халық саны көп қала маңындағы аудандардағы өндірушілерге өндірісті ұлғайту арқылы олардың өмір сүру деңгейін көтеруге жақсы мүмкіндік береді [9-10].



Сурет 1 – Біріккен Ұлттар Ұйымының азық-түлік және ауылшаруашылық қауымдастығының сүт өндірісі бойынша мәліметі 2022 жыл [3; 8]

Әлемдік нарықта сүт өнімдерінің негізгі экспорттаушылары-Жаңа Зеландия, ЕО, АҚШ, Австралия, Аргентина, Канада және Беларусь. Еуропа континентінің елдерінде сыртқы сауда қызметі негізінен Германия, Франция және Нидерландымен ұсынылған. Сүттен дайындалатын негізгі өнімдердің жаһандық экспорты (сүтке есептегенде) 2009 жылы 38,6 млн тоннаны құрады, бұл 2008 жылғы деңгейден (40,5 млн тонна) 4,7% - ға төмен [2; 11].

Сүт тағамдарының ішінде, бие сүті мен бие сүтінің қосалқы өнімдері Орталық Азия, Түркия, Башқұртстан (Ресей), Қырғызстан, Моңғолия және Өзбекстан, әсіресе Қазақстан тұрғындары жақсы тұтыныды. Бие мен есек сүтімен қамтамасыз етілу кәдімгі сүт түрлерімен салыстырғанда өте төмен. Бүкіл әлем бойынша бие сүт өндірісі туралы нақты статистикалық деректер жоқ, олардың үлесі 0,1%-дан аз болуына байланысты. Miraglia және т.б. (2020) авторлардың деректері бойынша бие сүті азық-түліктік емес секторда (косметикалық өнімдердің ингредиенті ретінде), сонымен қатар азық-түлік саласында, әсіресе иммунитеті төмен адамдар мен сиыр сүті белогына аллергиясы бар балалар сияқты сезімтал тұтынушылар үшін қолданылады. Uniacke-Lowe (2010) және Miraglia *et al.* (2020) деректері бойынша дүние жүзінде бие сүтін өндіру туралы нақты деректер келтірілмеген, алайда бие

сүтін 30 миллионға жуық адам тұтынатыны туралы хабарланған (әсіресе Орталық Азияда) [20; 22; 47-48].

Экономикалық тұрғысынан сипаттағанда, сүт күнделікті өндіріледі, сондықтан тұрақты ақшалай кірісті қамтамасыз ете алады. Фермада сүттің бағасы сүттің құрамдық, гигиеналық сапасына және жыл мезгіліне негізделуі мүмкін. Дегенмен, дамушы елдердегі шағын өндірушілер бағаны көбінесе сүттің майлылығына негізделе қояды. Сүт өнімдерін өндірушілердің табыс көздеріне сүт сатудан түскен кірістерден басқа, сойылған жануарлар мен төлдерді сату және көнді сату басқа да кірістері кіреді. Сүт өндірісі көптеген нарықтық емес экономикалық пайда береді, соның ішінде шаруашылықта отын немесе органикалық тыңайтқыш ретінде пайдалануға арналған көң (өсімдік шаруашылығына арналған қоректік заттардың көзі). Сонымен қатар, сүтті малдың ұрлану немесе өлу қаупі де бар. Дамушы елдерде сүт беретін жануарлар егін шаруашылығымен айналыспайтын халықтың негізгі кәсібі және байлығы болып табылады [11-12].

Сүт өнімдерін өңдеу – егін жинаудан кейінгі көптеген секторлар сияқты – ауқымды экономика үшін жоғары потенциалға ие. Сүт шаруашылығын дамыту экономикалық өсуге, азық-түлік қауіпсіздігіне, кедейшілікті азайтуға қол жеткізудің тұрақты әділ және қуатты құралы. Себебі сүт шаруашылығына: тұрақты табыс көзін қамтамасыз етеді, қоректік тағаммен қамтамасыз етеді, ресурстарды пайдалануды жақсартып, шаруашылықта және шаруашылықтан тыс жұмыспен қамтуды қалыптастырады, қаржылық тұрақтылық пен әлеуметтік жағдайды қамтамасыз етеді т.б. [8-12].

Азық-түлікпен қамтамасыз ету және тағам өнімдері нарығын, атап айтқанда сүт және сүт өнімдері нарығын дамыту Covid-19 жаңа коронавирустық инфекциясының таралуы салдарынан туындаған әлемдік сауда қатынастары мен гуманитарлық дағдарыстың жағдайында ерекше өзектілікке ие болды. Сүт және сүт өнімдері нарығының өзіндік ерекшелігі бар, атап айтқанда өндірілген өнімнің 91%-ы ішкі нарықта тұтынылады және тек 9% - ы халықаралық саудаға экспортталады [2-4].

Көлемі бойынша сұйық сүт - бүкіл әлемде ең көп тұтынылатын өнім. Дәстүр бойынша, қалалық орталықтарда сұйық сүтке және ауылдық жерлердегі ашытылған сүтке сұраныс артып келеді, бірақ көптеген елдерде өңделген сүт өнімдері маңызды бола бастады. Дүние жүзінде 6 миллиардтан астам адам сүт пен сүт өнімдерін тұтынады, бұл адамдардың көпшілігі дамушы елдерде тұрады. Сүтті өндіру бойынша алдыңғы орынды Индия және АҚШ мемлекеттері алса, одан кейінгі орынды Ресей Федерациясы, Қытай, Бразилия, Германия мемлекеттері. Аталған мемлекеттер жалпы сүттің 62% жуығын өндіреді [9-10].

1960 жылдардың басынан бастап дамушы елдерде жан басына шаққандағы сүт тұтыну екі есеге жуық өсті. Соңғы жиырма жылда Сахараның оңтүстігінде Африкада жан басына шаққандағы сүт тұтыну төмендеді. Адам басына шаққандағы сүтті тұтыну [9-12]:

- *жоғары* (жылына жан басына шаққанда 150 кг) Аргентина, Армения, Австралия, Коста-Рика, Еуропа, Израиль, Қырғызстан, Солтүстік Америка және Пәкістан;

- *орташа* (адам басына жылына 30-дан 150 кг -ға дейін) Үндістан, Иран Ислам Республикасы, Жапония, Кения, Мексика, Моңғолия, Жаңа Зеландия, Солтүстік және Оңтүстік Африка, Таяу Шығыстың көп бөлігінде және Латын Америкасы мен Кариб аралдары

- *төмен* (жылына жан басына шаққанда <30 кг) Вьетнам, Сенегал, Орталық Африканың көп бөлігінде, шығыс және Оңтүстік-Шығыс Азияның басым бөлігінде тұтынады [9-10].

Біріккен Ұлттар Ұйымының Азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымының (ФАО) мәліметтері бойынша дүние жүзінде сүтті 6 миллиард адам тұтынады. Әлемде өндірілген сүттің негізгі үлесі сиыр сүтіне 81,1% тиесілі және буйвол сүті 15% құрайды. Соңғы бірнеше жыл ішінде жекелеген мемлекеттердің сүт нарығы айтарлықтай "құлдырады", бірақ пандемия мен қатаң мемлекет аралық сауда шектеулері әлемдік сүт пен сүт өнімдерін тұтынуға кері әсер етпеді [6; 8-12].

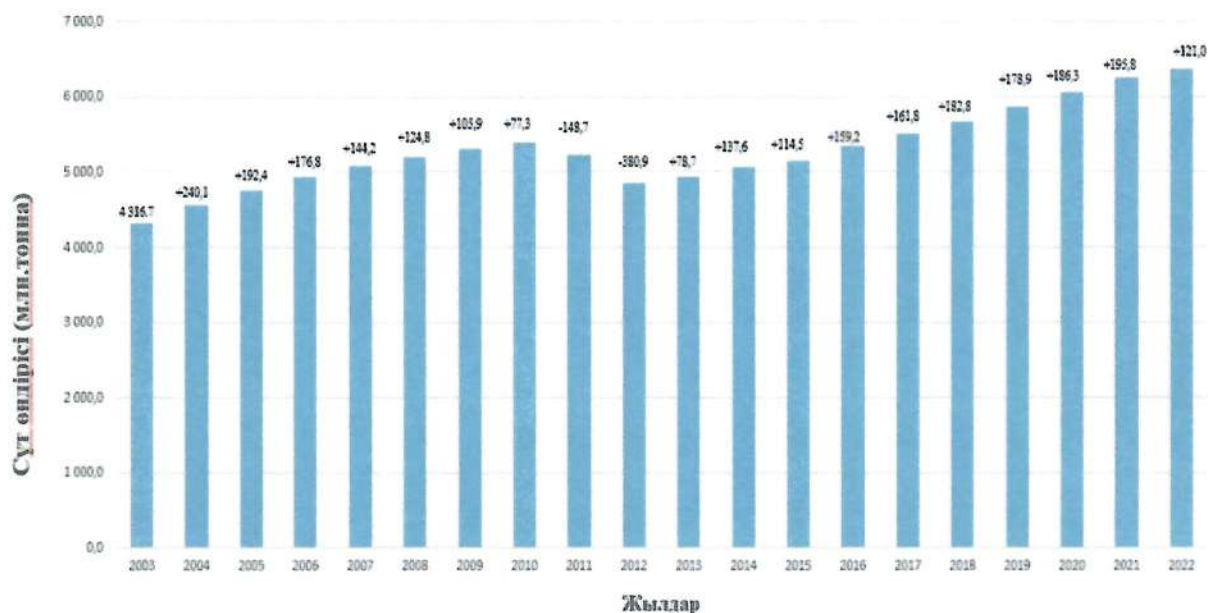
Сүт өнімдері тағамның құнды түрі болып табылады: олардағы қоректік заттардың құрамы жақсы теңдестірілген. Сүт өнімдері оңтайлы мөлшерде дененің өсуі мен дамуына қажетті барлық заттарды қамтиды. Сүт пен сүт өнімдерін диетаға қосу олардың биологиялық құндылығын арттырады және сіңімділігін жақсартады. Денсаулықты қалыптастыруда, нығайтуда және сақтауда маңызды рөл атқаратын сүт және сүт өнімдері халық ұсынған және жиі қолданатын өнімдердің қатарына жатады. Себебі, жер шарындағы жеті миллиард адамның алты миллиардқа жуығы сүтті тұтынады. Ал, сүт өнімдеріне әлемдік сұраныс жыл сайын 15 миллион тоннаға артып келеді [13].

Қазақстандағы сүт нарығы. Қазақстанда ауыл шаруашылығы экономикада маңызды рөл атқарады, сүт өндіру де осы саланың маңызды бөлігі болып табылады. Сүт және сүт өнімдері – әлем елдерінде соның ішінде Қазақстанда ең көп тұтынылатын тағам өнімдерінің бірі [14]. Сүт және сүт өнімдері маңызды аминқышқылдары мен басқа да қажетті қоректік заттарға бай. Бұл өнімнің құндылығы белоктың жоғары құрамында, оның қажеттілігі жыл сайын артуда [15]. Белокқа деген қажеттілік жер шарындағы халық саны мен оның әл-ауқатының өсуімен бірге жыл сайын артып келеді. Сүт тағам өнеркәсібінің, фармацевтиканың және т.б. тауарлар өндірісінің әртүрлі қосалқы салаларында қолданылатын тағам өнімдерінің кең ассортиментін өндіру үшін шикізат ретінде қолданылады [16]. Бүкіл әлемде сүт өнеркәсібінің дамуы оның орта және ұзақ мерзімді перспективаларын анықтайтын жаһандық саяси, экономикалық, технологиялық және басқа трендтердің әсерінен болады. Оларды уақытылы анықтау сүт өнімдерін өндірудің перспективалы жағына қарай әртараптандыруға мүмкіндік береді. Сүт және сүт өнімдері нарығы алуан түрлі және өндіріс әдісімен, технологиямен және тұтынушылардың қалауымен ерекшеленеді. Әлемнің жетекші елдерінде сүт өндірісін дамыту

тәжірибиесін талдау саланың өнімділігі мен оның рентабельділігінің артуына әсер ететін ерекшеліктерді анықтауға мүмкіндік береді [14].

Қазақстан нарығында сүт және сүт өнімдері тағам өнеркәсібінің құрамдас бөлігі болып табылады. Сүт шаруашылығы және сүт өнеркәсібі республиканың агроөнеркәсіптік кешенінің маңызды кіші жүйелерінің бірі. Сүт өнеркәсібі - бұл сүтті тұтас сүтке, ашытылған сүт өнімдеріне, сары май мен еріген сары майға, табиғи ірімшіктерге, балқытылған ірімшіктерге, тұзды ерітінділерге, ірімшіктерге, тұтас сүт ұнтағына және т. б. дайындауды және кешенді өңдеуді жүзеге асыратын кәсіпорындар жиынтығы [17].

Қазақстан – мал шаруашылығымен айналысатын сүт өндірушілердің бірі. Сүт нарығында Қазақстан сүт өндіру бойынша әлемде 35-ші орында. Статистика агенттігінің мәліметі бойынша 2017 жылы сүт тұтынудың орташа деңгейі жан басына шаққанда 264 кг болған. Сол жылы ашытылған сүт өнімдерін өндіру 192,9 мың тоннаны, құрғақ сүт өндіру көлемі 4,9 мың тоннаны құрады. Ірімшіктер мен сүзбе өндірісіне келетін болсақ, олардың өндірісі 25,2 мың тоннаға дейін өсті, бұл 2014 жылмен салыстырғанда 15%-ға жоғары. Сүт сарысуының экспорты 2019 жылы 748,7 тоннаны құрады, бұл көрсеткіш 2016 жылмен салыстырғанда екі есеге азайған [17].



Сурет 2 – Қазақстан Республикасындағы 2003-2022 жылдар арасындағы сүт өндірісі [17]

ҚР статистика агенттігінің сүт өндірісі ақпараты бойынша 2003 жылы 4 316,7 млн.тонна болса, 2004-2010 жылдар аралығында 35 125,3 млн.тоннаны құрап, ~13%-ға артты, 2011-2020 жылдары 53 685,38 млн.тоннаны құрап ~65%-ға сүт өндірісі артқанын байқауға болады. Пандемиядан кейінгі жылдары 2021 жылы 6 247,2 млн. тонна, 2022 жылы 6 368,2 млн. тонна сүт өндірілген. Статистика агенттігінің ақпаратында көрініп тұрғандай пандемиядан кейінгі жылдары сүт өндіру қарқындылығы артқанын көруге

болады (сурет 2). Қазақстанның Алматы, Алматы облысы, Солтүстік Қазақстан облысы сияқты ауылшаруашылық аймақтары сүт өндірудің негізгі бағыттары болып табылады. Соның ішінде, сүт өндіру бойынша 2022 жылы ҚР облыстарының ішінде: Алматы облысында 537,6 мың тонна, Түркістан облысында 776,7 мың тонна, Солтүстік Қазақстан облысында 647,9 мың тонна, Абай облысында 575,7 мың тонна, Шығыс Қазақстан облысында 497,9 мың тонна сүт өндірілген. Басқа облыстарда жоғарыда келтірілген облыстармен салыстырғанда төмен. Қазақстанда сүт өнеркәсібін дамыту елдің азық-түлік қауіпсіздігін қамтамасыз ету тұрғысынан да, экономиканың аграрлық секторын дамыту тұрғысынан да маңызды, өйткені бұл кәсіпорындар ауыл шаруашылығы өнімдерінің ірі тұтынушылары болып табылады [17-19].

1.2 Ауыл шаруашылығы жануарлары сүтінің химиялық құрамы

Қазіргі уақытта тіркелген сүт өндірісінің 84-85% ірі қараға, 12,3-15% буйволға, 1,3-2% қойға және 0,2-0,4% басқа жануар түрлеріне, яғни жылқы, есек, түйе, және т.б. тиесілі [9-10; 20-21]. Дүние жүзінде 30 миллионнан астам адам бие сүтін үнемі тұтынатындығы туралы болжам бар, соңғы жылдары бұл көрсеткіш айтарлықтай өскен [22].

Сүтқоректі жануарлардың түрі, оның тұқымы, жасы мен қорегі, сонымен қатар лактация кезеңі, төлдеу саны, өсіру жүйесі, физикалық орта және жыл мезгілі сүттің түсіне, дәміне, құрамына әсер етеді. Әртүрлі сүт өнімдерін өндіруге мүмкіндік береді. Жиі тұтынатын жануарлар сүтінің ерекшелігіне тоқталып өтсек.

Сиыр сүтінде 3-4% май, 3.5% белок және 5% лактоза құрайды, бірақ сиыр сүтінің жалпы химиялық құрамы тұқымына байланысты өзгереді. Мысалы, әдетте *Bos indicus*-тың майлылығы *B.taurus* ірі қара малына қарағанда жоғары. *B.indicus* ірі қара малының сүтіндегі май мөлшері 5,5% пайызға жетуі мүмкін.

Буйвол сүтінің майлылығы жоғары, ол сиыр сүтінен орташа есеппен екі есе көп. Буйвол сүтіндегі май мен белоктың қатынасы шамамен 2:1 құрайды. Ірі қара мал сүтімен салыстырғанда, буйвол сүтінде де казеиннің белокқа қатынасы жоғары. Казеиннің құрамында кальцийдің көп болуы ірімшік жасау өндірісін жеңілдетеді.

Түйе сүтінің құрамы сиыр сүтіне ұқсас, бірақ сәл тұзды. Түйе сүтінде сиыр сүтіне қарағанда С витаминіне бай (үш есе көп) болуымен ерекшеленеді, бұл дегеніміз шөл және шөлейтті аймақтарда тұратын адамдар үшін С витаминінің маңызды көзі. Себебі, олар көбінесе жемістер мен көкөністерден С витаминін тұрақты қабылдай алмайды. Түйе сүті қанықпаған май қышқылдары мен В витаминіне де бай. Әдетте түйе сүті шикі немесе ашытылған түрде тұтынылады [9-10; 20].

Қой сүтінде ешкі мен сиыр сүтіне қарағанда май мен белок көп; тек буйвол мен топоз (уак) сүтінде май көп. Қой сүтінде сиыр, буйвол мен ешкі сүтіне қарағанда лактоза мөлшері жоғары. Белоктың жоғары мөлшері мен қой сүтінің жалпы құрамы оны ірімшік пен йогурт жасауға қолайлы. Қой сүтінің

Жерорта теңізі аймағында маңызы зор, оның көп бөлігі пекорино (pecorino), кациокавалло (casiosavallo) және фета (feta) сияқты ірімшіктерге өңделеді.

Бие сүті: Бие мен есек сүтінің құрамы ұқсас. Бие сүті, адам сүтіне ұқсас, казеин белоктары сарысу белоктарынан төмен, алайда, лактозаға бай. Басқа сүт түрлерімен салыстырғанда бие сүтінде май мен белок мөлшері аз. Бие сүтінің көп бөлігі ашытылған түрінде тұтынылады және ірімшік жасауға жарамайды [9-10].

Кодекс Алиментариуста сүт өнімін "құрамында тағамдық қоспалар мен өңдеуге қажетті басқа ингредиенттер болуы мүмкін кез-келген сүтті өндеуден алынған өнім" деп анықтайды. Сүт өнімдерінің ассортименти тамақтану әдеттеріне, қол жетімді сүт өндеу технологиясына, нарықтық сұранысқа және әлеуметтік-мәдени жағдайларға байланысты аймақтан аймаққа және бір аймақтың елдері арасында айтарлықтай өзгереді.

Бие сүті: құрамы, биологиялық қасиеттері, сиыр сүтімен салыстырғандағы артықшылықтары. Бие сүті жаңадан туылған құлын үшін екі – үш ай аралығында негізгі және алмастырылмайтын қорек көзі. Осы кезеңде жас жылқылардың дамуы мен өсуі анасының сүтіндегі белоктар, макро- және микроэлементтердің мөлшеріне тәуелді [23]. Түзілетін сүт көлемі және оның құрамы лактация кезеңіне, биенің жасына және күнделікті берілетін жем-шөптің түріне тікелей байланысты [23 - 24]. Биеден өндірілетін сүт мөлшеріне күнделікті берілетін жем-шөп тікелей әсер етеді. Ең жақсы сапалы шөпті таңдаңыз. Себебі, құрамындағы кейбір заттар мен элементтердің жеткіліксіздігі өнімділіктің пен рентабельділіктің төмендеуіне әкеледі. Жылқы/биелер астық тұқымдас және бұршақ тұқымдас өсімдіктерден тұратын шөпті жақсы жейді және арнайы құрама жем сүт көлемін арттыруға мүмкіндік береді.

Бие сүті құрамында су мөлшерінің жоғары болуы және калорияның төменділігімен ерекшеленеді. Бие сүтіндегі химиялық заттардың мөлшері лактация кезеңдерінде өзгереді. Лактацияның алғашқы 25 күн өткенде сүтте еріген заттар мен белоктардың мөлшері азайып, құрамы тұрақталады [23-25]. Лактация соңында белоктар мөлшері аздап төмендесе, еріген заттар мен липидтің мөлшері жоғарылауы немесе өзгеріссіз қалуы мүмкін [26]. Лактация кезеңінің ортасында жалпы бие сүтінің орташа пайыздық құндылығы: еріген бөлшектер – 10,5%, май – 1,25-1,3%, белок – 1,93-2,1%, лактоза – 6,4-6,91% [23; 26]. Бие және адам сүті табиғи белоктар және лактоза мөлшері бойынша ұқсас. Бие сүтінде сиыр сүтіне қарағанда бірнеше минералды тұздар болады [27-35]. Казеин мен майдың мөлшері құрамында аз болғандықтан бие сүті сыр және май өндірісінде қолданылмайды. Оның құрылымы 40⁰С-тан жоғары температурада тұрақсыз болуына байланысты, сұйық күйінде сауып алғаннан бастап 6-9 сағат арасында қолданылған дұрыс [26-40].

Белоктық құрамы бойынша бие сүті адам сүтіне жақын. Бие сүті «сарысу сүті» болып саналады, өйткені бие сүтінде басқа сүтқоректілермен салыстырғанда сарысу белогының мөлшері жоғары. Басқа компоненттік (бөлшектік) құрамын салыстырғанда, бие сүтінде сарысу белоктарының

пайыздық көрсеткіші сиыр сүтіне қарағанда 20 % көбірек, шамамен 40 % құрайды, бірақ адам сүтіне қарағанда төменірек (50%). Сиыр сүтінде казеиннің ең көп мөлшері болады. Сондықтанда, ол *казеиндік* типтегі сүт, ал бие және адам сүті *альбуминдік* сүт типі деп аталады [25-27]. Сарысу белоктарының және алмасатын/алмаспайтын амин қышқылдары бие сүтінде жоғары мөлшерде кездесуіне байланысты сиыр сүтімен салыстырғанда адам үшін құнды заттардың көзі болып табылады.

Лактоза және көмірсулар. Бие сүті сиыр сүтіне қарағанда лактозаға бай. Лактоза организмге тек сүттің құрамымен ғана беріледі. Сүттің бір бөлігі ретінде, лактоза асқорыту жолындағы микроорганизмдердің таралуына әсер етуі мүмкін. Лактоза құрамындағы галактоза жас организмдерде мидың жақсы дамуына, миелинизация процесіне қатысады. Аталған процестерге көп мөлшерде галактозилцерамидтер мен галактолипидтер қажет [30].

Бие сүтінде лактозаның мөлшері жоғары болғандықтан оның дәмі тәтті [26]. Сүттегі лактозаның жоғары мөлшері ішек микрофлорасының өсуіне оң әсер етеді және патогенді микроорганизмдер санын азайтуы мүмкін [28]. Сонымен қатар, лактоза организмге кальцийдің сінуін ынталандыратындықтан, сәби дамуының алғашқы айларында сүйектің минерализациялану процесінде маңызды болуы мүмкін [26].

Көмірсулар сүтте олигосахаридтер түрінде де болады. Олар липидті глобулалар сыртқы қабатының беткі жағында болады. Адам сүтіне ұқсас, бие сүтінде көмірсулар тармақталған құрылымда болады, ал керісінше сиыр сүтінде болмайды. Осындай құрылымның ерекшелігі, майлардың асқорыту жүйесінде тасымалдануын баяулатады. Нәтижесінде, өт тұздары мен липазаның жұмыс әрекетін ұзартады. Бие сүтінде кездесетін кейбір олигосахаридтер бактериялық инфекцияны тежейді, бифидобактериялардың өсуі мен белсенділігін жақсартады. Осы олигосахаридтер адам сүтінде де кездеседі [26; 28; 41].

Витаминдер. Дәрумендердің және басқа да элементтердің мөлшері биенің лактация маусымына және қоректену режимдеріне тәуелді. Бие сүтінде А, Д₃, Е, К₂, С, В₁, В₂, В₆, В₁₂ дәрумендердің, пантотен, никотин және фолий қышқылдарының болатындығы дәлелденген. С дәруменін есептемегенде басқа да дәрумендердің бие және сиыр сүттеріндегі мөлшері айтарлықтай ерекшеленбейді [24; 29].

Бие сүті С дәруменіне бай, өзінің тотығуға төзімділігі, қабынуға қарсы қасиеттеріне байланысты осы дәруменнің құндылығы да жоғары. Бие сүтіндегі оның мөлшері құлындағаннан 1,5 айдан кейін 17,2 мг/кг, сосын 12,87 мг/кг дейін төмендейді [28-29]. Бие және сиыр сүтіндегі А дәруменінің мөлшері ұқсас, бірақ адам сүтінде көбірек мөлшерде кездеседі. Соңғы зерттеулердің нәтижесіне сәйкес, Д дәруменінің мөлшері бие сүтінде адам сүтіне қарағанда көбірек [24; 42]. Д дәрумені тұтыну орташа жасқа дейінгі және ісік салдарынан болатын өлу факторларын азайтады, жалпы денсаулыққа оң әсер етеді. Кобаламиннің мөлшері бие сүтінде көп. Бие сүтінде В тобына жататын

дәрумендердің мөлшері орташа, ал адам сүтінде аз, ал сиыр сүтінде көп мөлшерде кездеседі [26].

Макро- және микроэлементтер. Сүттің негізгі маңызды компоненттерінің бірі құрамындағы минералды элементтер. Минералды элементтер фракциясы 10 мг/л-ден жоғары концентрацияда болатын макроэлементтерден (кальций, магний, натрий, калий, цитрат, хлорид, бейорганикалық фосфат) тұрады [44]. Сүтте басқа элементтер де кездеседі (бар), олар темір, мырыш, мыс (<1 мг/л) аз мөлшерде үнемі кездесетін микроэлементтер. Сиыр сүтіне қарағанда, адам және бие сүттерінде минералдар мөлшері азырақ (кесте 1). Натрий катиондық формада жасушадан тыс сұйықтық пен қанның құрамдас бөлігі ретінде маңызды қызмет атқарады. Ал, калийде катион ретінде жасушааралық сұйықтықтардың тұрақтылығын қамтамасыз етуге қатысады. Сүт жалпы кальций мен фосфордың көзі, олар сүйектің өсуі мен дамуында, ал сүйектердің минерализациясына магний маңызды [28]. Лактацияның алғашқы аптасында минералдың мөлшері жоғары болады, кейін біртіндеп азаяды. Бие сүтінде олардың мөлшері тұрақты өзгеретін болғандықтан, олардың нақты орташа концентрациясын анықтау қиын. Сүтте кездесетін минералды элементтер адам және жануарларға байланысты өзгеріп отырады және бірінші кестеде келтірілген.

Кесте 1 – Адам, сиыр, түйе және бие сүтінің құрамындағы минералды элементтердің мөлшері [29]

Минералды (мг/100 мл)	Адам	Сиыр	Түйе	Бие
Кальций	28-34	112-123	105-157	50-135
Фосфат	14-43	59-119	58-104	20-121
Калий	53-62	106-163	124-179	25-87
Магний	3-4	7-12	8-16	3-12
Натрий	10-18	58	36-73	8-85
Цитрат	0	160-176.8	128-185	
Хлорид	60-63	100-119	132	19
Темір	0.04-0.2	0.03-0.1	0.07-0.37	0.02-0.15
Мырыш	0.2-0.4	0.3-0.55	0.19-0.6	0.09-0.64
Мыс	0.02-0.06	0.01-0.08	0.01-0.19	0.02-0.11

Минералды элементтер көптеген функцияларға қатысады: минералдану, су балансын бақылау, ферменттік және гормондық жүйелер, жүйке-бұлшықеттік қозғыштық, жүйке және иммундық жүйелер т.б. Сонымен қатар, ағзаға маңызды минералды тұздар болмаса, көмірсу, май, белок, витаминдер сияқты барлық басқа қоректік заттар адам ағзасына дұрыс жеткізілмейді, сондықтан дененің дұрыс жұмыс істеуіне ықпал етеді [29].

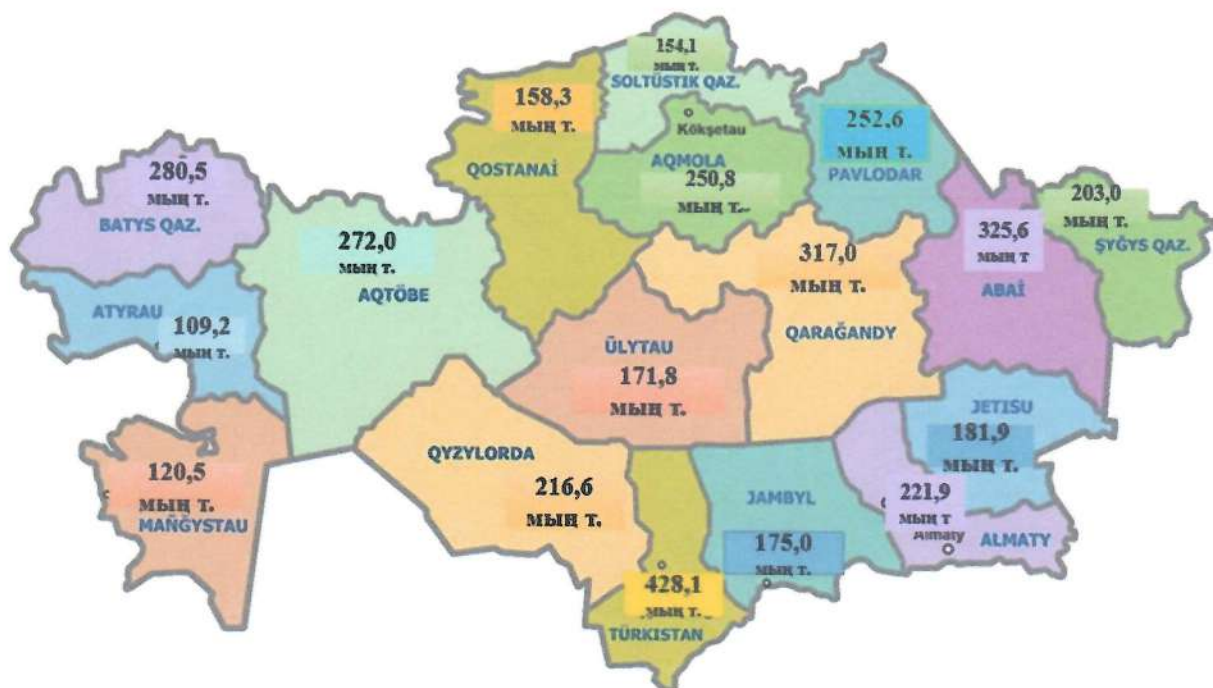
Минералдар маңызды қоректік заттар болып саналады, бірақ олар басқа қоректік заттардан ерекшеленеді, өйткені олар энергия өндірмейді және белок, май және көмірсулар сияқты калория бөлмейді. Мысалы, қалқанша безінің гормоны йодсыз, гемоглобин темірсіз, бұлшықеттің жиырылуы кальций, калий, магнийсіз мүмкін емес. Йод, фтор және кобальтты қоспағанда, барлық

басқа минералды элементтер көптеген функцияларды атқарады. Соңғы ғылыми ақпарат пен эксперименттік дәлелдердің жоқтығына байланысты басқа да минералдар әлі де маңызды деп танылмайды [45].

Адам мен сиыр сүтінің энергиялық құндылығы ұқсас (шамамен 60 ккал/кг), бірақ бие сүтінен шамамен 200 ккал/кг жоғары [26]. Бие сүтінде аз мөлшерде холестерол және көп мөлшерде қанықпаған майқышқылдары болады. Әсіресе, экзогенді линолеин және α – линолейн май қышқылдарының мөлшері көбірек, осы молекулалар адам диетасында маңызды. Линолеин май қышқылы простогландиндер көзі, ол ішек жарасының алдын алуға қатысады [27]. Жоғарыда аталған, май қышқылдары қан тамырлардың қалыпты жұмыс жасауында, ми мен көз торының (retina) дұрыс дамуында маңызды.

Бие сүтіндегі қанықпаған май қышқылдарымен аталық тышқандарды қоректендіргенде олардың организмінде ерекше иммундық төзімділік пайда болған. Жоғарыдағы нәтижеге сәйкес, осы заттардың адам денсаулығына қаншалықты пайдалы екендігін болжауға болады [26]. Бие сүтіндегі қанықпаған май қышқылдарының денсаулыққа келесі пайдалары бар: қабынуды қоздырушы цитокиндер синтезін тежейді, холестеролдың деңгейін азайтады, жүректің ишемиялық ауруы тәжідік (коронарлық) артериялы аурулардың алдын алады. Сондай – ақ, линолейн май қышқылының ісікке қарсы және антиоксиданттық қасиеті бар, бірақ оның мөлшері аз болғандықтан әсері жақсы байқалмаған [46].

Қазақстанда бие сүтін тұтынудың ерекшелігі. Тағамтану тұрғысынан сүт және сүт өнімдері ағзаны әртүрлі биологиялық белсенділігі бар белоктармен, витаминдермен, минералдармен (кальций мен магний т.б.) және микроэлементтермен (темір, мырыш т.б.) қамтамасыз ететін маңызды тағамдық өнім. Сүт құрамында ағзаның қалыпты жұмыс істеуі үшін қажетті барлық аминқышқылдары кездеседі. Сүттен ірімшік, йогурт, май, кілегей, балмұздақ, десерттер және т.б. күнделікті өмірде қолданылатын тағам түрлері дайындалады. Сүт тағамдарының ішінде, бие сүтінен дайындалатын өнімдердің маңыздылығы орасан. Бие сүті мен бие сүтінің қосалқы өнімдері Орталық Азия, Түркия, Башқұртстан (Ресей), Қырғызстан, Моңғолия және Өзбекстан, әсіресе Қазақстанда жақсы тұтынады. Қазақстанның ауылшаруашылық және балық шаруашылығы статистика агенттігінің мәліметтері бойынша ҚР-да 2022 жылы жалпы жылқылар саны 3 856,0 млн.бас болған (сурет 3). Соның ішінде, Түркістан облысында 428,1 мың бас болса, Абай және Қарағанды облысында сәйкесінше, 325,6 мың бас пен 317,0 мың бас бар [17]. Басқа облыстардағы жылқылар саны 3 суретте көрсетілген. Жылқылар санына байланысты, ұлттық статистика бюросының мәліметі бойынша, 2019 жылы бие сүті Қазақстанда 27,6 мың тонна өндірілген. Негізгі көлем Қарағанды облысына (7490,4 тонна), Түркістан облысында (5931,7 тонна) және Шығыс Қазақстан облысында (2861,8 тонна) тиесілі. Одан кейінгі орында Жамбыл облысы (2367,3 тонна) және Алматы облыстары (1846,8 тонна) [17].



Сурет 3 – Қазақстан Республикасындағы 2022 жылдағы жылқылар саны [17]

Miraglia және т.б. авторлардың деректері бойынша бие сүті азық-түліктік емес секторда (косметикалық өнімдердің ингредиенті ретінде), сонымен қатар азық-түлік саласында, әсіресе иммунитеті төмен адамдар мен сиыр сүті белогына аллергиясы бар балалар сияқты сезімтал тұтынушылар үшін қолданылады. *Uniacke-Lowe* және *Miraglia* т.б. деректері бойынша дүние жүзінде бие сүтін өндіру туралы нақты деректер келтірілмеген, алайда бие сүтін 30 миллионға жуық адам тұтынатыны туралы хабарланған (әсіресе Орталық Азияда) [20; 22; 47-48].

Қазақ халқы ерте заманнан бері жылқы еті мен сүтін негізгі ұлттық тағамдардың бірі ретінде тұтынады. Бие сүтінен ашытылған сүт өнімі қымыз, йогурт, балмұздақ және шоколад т.б. дайындалады. Қымыздың пайда болуы көшпелі өмір салтымен тығыз байланысты. Қымызды өндірудің мақсаты сүттегі маңызды қоректік заттарды сақтау. Өнімнің сүт өнімдерінен айырмашылығы ол бие сүтінен жасалады. Тұтастай алғанда, қымыз сүт қышқылды ашыту және спирттік ашыту тәрізді екі негізгі ашытудан тұрады. Қымыз 0,6%-3% спирт пен аздаған көмірқышқыл газын береді. Данова және т.б. (2005) қымызды сүт қышқылының құрамына негізделген үш түрін сипаттады: күшті, орташа және жеңіл қымыз. Қышқылдық құрамының өзгеруі қымызды жасауда әртүрлі сүт қышқылы бактерия дақылдарын қолдануымен байланысты. Қымыз –метаболизмді, жүйке жүйесі мен асқорыту жолдары бездерінің жұмысын жақсартатын денсаулыққа пайдалы тағамдық өнім ретінде тұтынады [49].

Сонымен қатар, бие сүтінен шоколад жасалынады. Оны, Қазақстандық ғалым, Қазақ тағамтану академиясының президенті Т.Шарманов жетекшілігімен бие сүтінен дайындалған алғашқы шоколадты батончиктер, балмұздақ пен йогуртты жасады. Бие сүті нәзік, оны сиыр сүті сияқты

пастерлеуге немесе қайнатуға болмайды. Ұнтақ түрінде ол бір жылға дейін пайдалы қоректік заттарды сақтайды. Шоколад өнімінің бір ерекшелігі - оның құрамында қант жоқ, қант адамдардағы ауруларын асқындыруы мүмкін (қант диабеті). Ғалым қантты қолдануға тыйым салады, оның орнына сүттегі табиғи қант лактозаны қолданады. Дегенмен, балмұздақ майдың аздығына байланысты аздап сулы болады, алайда балмұздақ тәтті болып шығады [50-57]. Сонымен қатар, йогурт өндіру үшін пастерленген бие сүтін сұйық және құрғақ күйінде пайдалануға болады. Профессор Синявский Ю.И. және оның командасы бие сүті негізінде ашытылған сүт өнімі мен сүзбе массасын жасап, 1 жастан 11 жасқа дейінгі балалар үшін белок, май, көмірсуларға, линол және α -линолен қышқылына, С витаминіне физиологиялық қажеттілік нормаларын есеп, олардың тағамдық құндылығын анықтады. Жүргізілген зерттеулер оларды балалар тағамында қолданудың артықшылығын көрсетеді. Кептірілген бие сүтін қосып, шоколад өндіру әдісі жасалған [50-57].

Бие сүтінен жасалған өнімдерге талдау жасалатын болса, онда оның адам денсаулығына пайдалылығы туралы көп ақпарат кездестіруге болады. Бие сүтін гепатит пен асқазан жарасын емдеу үшін қолдануға болады. Кранс ауруымен және қант жарасымен зардап шегетін адамдарға бие сүті берілген, нәтижесінде науқастан адамдарда аурудың жеңілдегендігі, нәжісте қанның азайғандығы байқалған. Осы зерттеу нәтижесі бие сүтін аурулардың симптомдарын жеңілдету үшін қолдануға болады деп ұсынған [26; 58].

1.3 Сүттің белоктық құрамы

Сүт белоктары жоғары сапалы, «толық» белоктар болып табылады және олардың әрқайсысының өзіне тән қызметі мен қасиеттері бар. Жануарлар сүтінің белоктары ағзаны қажетті алмасатын және алмаспайтын аминқышқылдарымен қамтамасыз етеді. Ауыл шаруашылығы жануарларының сүтінде кездесетін негізгі белоктар:

Казеиндер. Бие сүтінде казеиндердің - α_{S1} және α_{S2} – түрлері кездеседі, бұл барлық казеиндердің 40%-ын құрайды. Сиыр сүтіне ұқсас, бие сүтінде β - казеин (барлық казеиндердің шамамен 50%) және γ – казеин (шамамен 10%) кездеседі [27-29]. Қосымша, бие сүтінен k – казеин табылған, осы казеиннің қасиеттері сиыр мен адам сүтінде болатын k – казеинге ұқсас. Бие сүтіндегі казеин мицеллаларының диаметрі 255 нм, адамда (64 нм) және сиырда (182 нм) сүттеріндегі казеин мицеллаларынан үлкенірек [26-27]. Сиыр сүтіне қарағанда (казеин 80%, сарысу 20%) бие сүтінде казеин мөлшері төмен (казеин 50-55%, сарысу 40-45%) болғандықтан оның қорытылу уақыты да қысқа. Бие мен адам сүті асқазанда шамамен 2 сағат ішінде қорытылады, ал сиыр сүтінің коагуленттінің қорытылуына 3-5 сағат кетеді [28; 59-68].

α -лактальбумин - сүт бездерінде түзілетін кальций-металдық белок [40]. α -лактальбумин N-ацетилпластозаамид 3- α -галактозилтрансферазалармен бірге әрекет ету арқылы глюкозаның галактозаға айналуына және лактозаның синтезделуіне жауапты. Ол Ca^{2+} байланыстыруға және оны тасымалдауға қабілетті және оның жасушалық сиымдылығы төмен [28]. α -лактальбумин 123

аминқышқылы қалдығынан тұрады. Түйе және адам сүтіне құрылымы ұқсас, тек кейбір аминқышқылдардың алмасуы бойынша ғана ерекшеленеді [20]. α -лактальбуминнің пайыздық мөлшері сиыр сүтінде 52,9-53,6 %, адам сүтінде 30,3-45,4 %, бие сүтінде 27,5-29,7 % болатындығы көрсетілген [23].

β -лактоглобулин. Бұл молекула ретинолды байланыстыру қабілетіне ие. Бие сүтіндегі β -лактоглобулин адам сүтіндегі ретинол байланыстырушы белокқа ұқсас [28]. Сиыр сүтіндегі β -лактоглобулинге жүргізілген зерттеулер оның май қышқылдармен, холестеролмен, D₃ дәруменімен және басқа да майда еритін дәрумендермен байланыс түзе алатын қабілеті болатындығын көрсеткен. Бұл адам сүтінде болмайды, бие сүтінде оның мөлшері (25,3-36,3%) сиыр сүтіне (18,4-20,1%) салыстырғанда көбірек болып келеді. Бие сүтіндегі β -лактоглобулиннің сіңірілуі оның гипоаллергиялық қасиетіне себепші болуы мүмкін [23; 26; 59].

Иммуноглобулиндер. Бие уызындағы негізгі иммуноглобулин IgG, бірақ сүтінде IgA болады. Адамдарда IgG анадан балаға жатырда плацента арқылы тасымалданады. Жылқылар мен күйіс қайыратын жануарларда қарама – қарсы (сондықтан жылқы уызын тек құлынға береді), осы жануарлардың жаңадан туылған төлдері уыздағы IgG төлдердегі мөлшері ересектердікіне ұқсас [20]. Бие (18,7-20,9%) және адам сүтінде (15,1-19,7%) иммуноглобулиндердің мөлшері ұқсас, ал сиыр сүтінен (10,1-11,8%) анағұрлым жоғары болып келетіндігі көрсетілген.

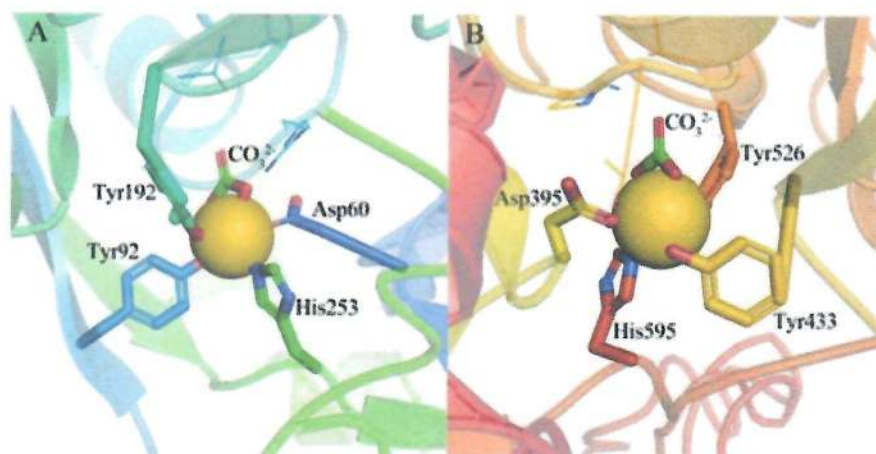
Лизоцим. Бие және адам сүтінің микробиологиялық қорғаныштық қасиеттері негізінен осы белокқа байланысты. Ол бактериялардың жасуша мембранасындағы гликозидтік байланыстардың гидролизін катализдейді. Бие сүтінде лизоцим осы сүттің коагуляциясында маңызды қызмет атқарады, осыған қосымша оның Ca²⁺ байланыстыру қабілеті бар [28]. Сонымен қатар, оның антивирустық қасиеті де бар – ол вирустармен бірге ерімейтін кешен түзеді. Бұл оның нуклеин қышқылдарымен қарым-қатынасқа түсе алатындығын болжауға мүмкіндік береді [20]. Жасушаның сыртында лизоцим вирустардың уыттарын белсендендіреді. Бие сүтіндегі лизоцим қышқылда тұрақты, ал сілтіде тұрақсыз, оның тұрақтылығы адам лизоциміне қарағанда жоғарырақ [20; 69-70]. Лизоцимнің бактерицидтік, иммунитетті нығайтушы және қабынуға қарсы қасиеттері бар [58]. Сиыр сүтінде лизоцимнің мөлшері аз. Осы себепті сиыр сүтінің қорғаныштық қызметі сары уыз иммуноглобулиндеріне негізделген [27]. Дегенменде, бие сүті осы органикалық затқа адам және сиыр сүттеріне қарағанда анағұрлым бай болып келеді.

Бие сүтінде лизоцим (6,59%) және лактоферриннің (9,89%) жоғары концентрацияда болуымен ерекшеленеді. Олар бактериялар мен вирустарды бейтараптандырады, сондай – ақ, фунгицидтік қасиеті болғандықтан бие сүтін медицинада қолдануға болады. Атопиялық дерматитпен зардап шегетін адамдарды бие сүтімен емдегенде олардың денсаулығында жақсы өзгерістер байқалған [58]. Атопиялық дерматит организмнің сәйкес емес иммундық реакциясынан туындайтын ауру, осы кезде организмде жоғары мөлшерде Ig E

бөлінеді. Нәтижесінде, тері құрғап қызарады және іріндейді. Бие сүтін ішкен адамдарда осы симптомдардың біртіндеп азайғандығы байқалған. Осыған қосымша, Ig 16 мөлшері де азайған, ол атопиялық дерматит реакцияның көрінуіне және таралуына жауап беретін молекула. Бие сүтінің пайдасы оның ішек микрофлорасын реттеуші қасиетімен байланысты, себебі ішек микрофлорасы иммундық жүйеге әсер етеді. ЛФ лизоциммен бірге кейбір бактериялардың өсуін ынталандырады және IgA-мен бірге патогенді бактериялардың өсуін тежейді [26; 58].

1.4 Лактоферрин - көп функционалды сарысу белогы

Лактоферрин сүтқоректілерде кездесетін, трансферриндер тобына жататын белок. Лактоферрин (ЛФ) молекулалық салмағы шамамен ~80 кДа болатын бір полипептидті тізбекті гликопротеин [71-72]. Ол табиғи иммунитетті қалыптастыруда маңызды мультифункциялық қызмет атқарады. ЛФ әртүрлі сүтқоректілердің шырышты эпителий жасушаларынан бөлінеді. ЛФ концентрациясы бие сүтінде 0,2-2 г/л, ол ана сүтінен төмен (1-7 г/л), түйе сүтіне ұқсас (0,02-2,1 г/л), бірақ сиыр сүтіне қарағанда (0,03-0,2 г/л) жоғары. Сонымен қатар, аталған белок барлық экзокринді бездер сөлдерінен анықталған, көз жасында (2 мг/мл немесе 0,4 мг/мл), сілекей (0,013 мг/мл), бронх, өт сөлдерінен (0,0042 мг/мл), панкреатит сөлінен, ұрық сұйықтығынан (0,518 мг/мл), зәр (0,00005 мг/мл), тер (0,0025 мг/мл). Сүттегі казеиннен кейінгі ең кең таралған белок [73-74].



Сурет 4 – Лактоферриннің темірмен байланысатын аймағының көрінісі [46]

Сүт бездерінде ЛФ бөлінуін (транскрипция және трансляция) пролактин бақылайды, ал жыныс жолдарында ЛФ экспрессиясы стероидты гормон – эстроген индуцирленеді. Қан түзілу жүйесінде ЛФ миелоциттердің пісіп-жетілу сатысында дамып жатқан нейтрофилдерде синтезделеді [73-85]. Нейтрофилдердің екіншілік түйіршіктерінде қорға жинақталады. Олардағы белоктың мөлшері нейтрофилдердің $15 \text{ мкг}/10^6$ құрайды [74]. Сонымен қатар, ЛФ қаннан (0,001 мг/мл) және амнион сұйықтығынан (0,006 мг/мл)

анықталған. Қандағы қалыпты мөлшері шамамен 1 мкг/мл, дегенмен қабыну кезінде оның мөлшері 200 мкг/мл дейін жетуі мүмкін [73].

Сүтқоректілердің дене сұйықтықтарындағы бос темірдің деңгейін реттеуде ЛФ-нің маңызы зор. Оның Fe^{3+} байланыстыру қабілеті жоғары ($K_D \approx 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$). Құрамында екі гомологты глобулярлы домен (N және C-бөлік) бар. N- және C-бөліктердің әрқайсысында шамамен 345 аминқышқылдары бар және тиісінше N1, N2 және C1, C2 екі доменінен тұрады, темірмен байланыстыру орны доменаралық саңылауда орналасқан. ЛФ-тің C-бөлігі, оның N-бөлігімен салыстырғанда темірді байланыстыру бойынша жоғары қабілетін көрсетеді. ЛФ құрамындағы аминқышқылдарының маңыздыларын сипаттайық. Темір иондары шар түрінде берілген bLF (деректер банкының коды: 1bLF) жалпы құрылымы. bLF жабық формасындағы металл иондарын байланыстыру орындары, соның ішінде N бөлігінде (A) Asp60, Tyr92, Tyr192, His253 және C бөлігінде (B) Asp395, Tyr433, Tyr526, His595 қалдықтары [46]. ЛФ белогында темірдің әрбір атомы төрт белоктық лигандпен үйлестірілген: Tyr-92 және Tyr-192 фенолят-иондардағы (сәйкесінше Tyr-435 және Tyr-528 C-соңында) екі оттегі атомдарымен, His-253 (His-597) имидазолдағы $\text{Ne}2$ азот атомымен және Asp-60 (Asp-395) карбоксильдегі оттегімен (сурет 4). Темірдің әрбір атомының октаэдрлік ортасы бар, дегенмен де, төрт белок лигандты алты позицияның тек төртеуі ғана алып жатады. Зерттеулерге сәйкес жоғарыда сипатталған 4 байланыстың қалған екі позициясында CO_3^{2-} немесе HCO_3^- аниондары орналасады [82; 86-90]. Темірді трансферрин мен ЛФ-пен байланыстыру үшін *in vivo* карбонат болып табылатын синергетикалық анион қажет. Анион темірді байланыстыруда және босатуда маңызды рөл атқарады деп саналады [73].

Анион пептидтің оң зарядталған N-соңымен және Arg-121 радикалымен байланысады. Мутагенез бойынша жасалған тәжірибелерде, белсенді орталықтағы кез келген 4 амин қышқылы қалдығының алмастырылуы темірді байланыстыру қабілетінің бірден нашарлауына алып келетіндігі дәлелдеген. ТФ молекуласында лизиннің – Lys-206 және Lys-296 – қалдықтарының болуы ЛФ және ТФ қызметтеріндегі айырмашылыққа себепші болуы мүмкін. Осы екі қалдық ерекше сутектік байланыс түзеді. Arg-121 қалдық бойынша мутация да дәл осындай әсерге алып келеді [73; 88-91].

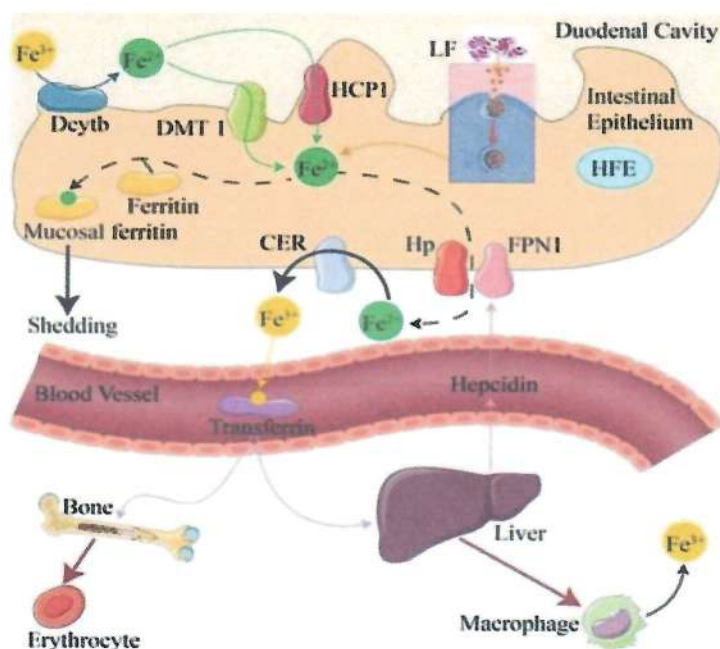
Адам ЛФ белогының осы жұп Arg-210 және Lys-301 қалдықтармен алмасқан. Дегенмен, сиыр, буйвол, жылқы және түйе ЛФ-де ТФ-ғы позицияға ұқсас лизиннің екі қалдығы болады – Lys-2010 және Lys-301. Бірақ, осы екі қалдық арасында байланыс түзілмейді, сәйкесінше белоктардан ерекшелік байқалмайды [73; 88]. ЛФ болжам бойынша серинді протеазалар тобына жатуы мүмкін, себебі олардың ингибиторлары белоктың белсенділігіне қайтымсыз ингибирлеуші әсер етеді. ЛФ молекуласынан сериннің үш қалдығы табылған (Ser-12, Ser-183 және Ser-284) [73]. Олар депротондалған күйде болады және бейтарап ортада олар күшті нуклеофилдер.

ЛФ сонымен қатар, бактериостатикалық және антиоксиданттық қасиеттерге ие. Сүттегі темірге қаныққан ЛФ жаңа туылған сәбилердің ішегінде темірдің сіңуіне әсер етеді және темірдің көзі. Сүттегі және уыздағы ЛФ жас төлдің ішегінде микробтардың өсуінің алдын алады. Осылайша, сәбилердің тіршілігінің алғашқы аптасында өміршендігін арттырып, төлдердің (құлындардың) табиғи иммунитетінің дамуына әсер етеді [69]. ЛФ-дегі оң зарядталған аминқышқылдары бірқатар бактерия, вирус, саңырауқұлақтар мен паразиттердің беткі жағында болатын аниондық компоненттермен қарым-қатынасқа түсуі мүмкін, осының нәтижесінде жасушалардың лизиске ұшырауына себепші болады. Липополисахаридтердің жасуша мембранасынан босап шығуы мембрананың жартылай өткізгіштігін өзгертіп, лизоцим мен басқа да антимикробтық агенттерге жасушаның сезімталдылығын арттырады. ЛФ-тың антимикробтық белсенділігі оның кейбір пептидтерінде байқалады. Лактоферрин пептидтері тұтас ЛФ-ге қарағанда күшті антимикробтық, фунгицидтік және антипаразиттік қасиеттер көрсеткен [69; 73].

Лактоферриннің темірмен байланысу және in vivo шығарылу механизмі. ЛФ-нің темірмен байланысуы және шығарылуы оның in vivo қызметімен тығыз байланысты. 5-суретте көрсетілгендей тағамдағы Fe^{3+} он екі елі ішек цитохромы b (Dcytb) арқылы Fe^{2+} -ге айналады, ал Fe^{2+} рекомбинантты екі валентті металл тасымалдаушы 1 (DMT1) немесе гем тасымалдаушы белок 1 (HCP1) арқылы аш ішек эпителийіне түседі. ЛФ жіңішке ішек эпителийіне эндоцитоз арқылы енеді және ЛФ тасымалдайтын Fe^{3+} ішектегі тұз қышқылымен Fe^{2+} -ге айнала алады. Жаңадан енген темірдің сіңуі алдыңғы темір қорының жалпы көлеміне байланысты. Он екі елі ішекте темірді тасымалдайтын сенсор, HFE белок бар, HFE генінің транскрипциялық экспрессиясы он екі елі ішекте темірдің сіңуін реттеу үшін Dcytb және гефаестинге (Hr) әсер ете алады. Fe^{2+} үшін екі жолы бар, біріншісі цитоплазмада шырышты ферритин ретінде болатын ферритинмен байланысу арқылы жүзеге асырылады және кейіннен қалыпты эпителий регенерацияланатын жасушадан тыс шығарылады; екіншісі- Fe^{2+} ферропортин 1 (FPN1) және Hr біріккен әсерінен ішек эпителий жасушаларының базальді мембранасына енеді және кейіннен жіңішке ішек эпителийінде церулоплазминмен (CER) Fe^{3+} -ке айналады [86].

Fe^{3+} қан тамырларына еніп, трансферринмен байланысып, сүйек пен бауырға тасымалданады. Белгілі бір мөлшерде Fe^{3+} гемоглобин мен эритропоз синтезі үшін қан арқылы сүйек кемігіне енеді, соңында темір әртүрлі ұлпалар мен мүшелерде қолданылады. Fe^{3+} бір бөлігі ТФ- Fe^{3+} түрінде тасымалданады, олар порталдық жүйе арқылы бауырға жетеді, бауырға түскен Fe^{3+} гепцидин (Нерс) деп аталатын белоктың түзілуін ынталандырады, ол реттегіш және ингибитор болып табылады. Гепцидин - темір алмасуын реттейтін бауырдан өндірілетін белок. Гепцидин темірді тасымалдаушы ферропортинді инактивациялау арқылы ішек, бауыр және макрофаг жасушаларынан қанға темірдің экспортын шектейді. Нерс тым көп Fe^{3+}

қабылдағанын сезгенде, Нерс FPN1-ге Fe^{2+} өндірісін тежеу үшін FPN1 енді Fe^{2+} қабылдамайынша әрекет етеді, бұл кезде цитоплазмадағы Fe^{2+} шырышты ферритин ретінде жасуша сыртына шығып, нәжіспен немесе несеппен шығарылады. Сонымен қатар, HFE гені Dcytb және Hр-ге әсер етіп, олардың ЛФ трансляциялық қабылдануын тежейді. Егер Fe^{3+} тым аз болса, Нерс Fe^{2+} өндірісін арттыру үшін FPN1-ге әсер етеді, ал HFE гені Dcytb және Hр-ге олардың ЛФ трансляциялық сіңірілуіне ықпал етеді. Ағзадағы темір гомеостазын сақтаудың да жолы бар, Fe^{3+} көп болған кезде Нерс макрофагтарға Fe^{3+} шығаруды тоқтатқанға дейін әсер етеді. Fe^{2+} аз болғанда, Нерс макрофагтарға әсер етпейді және макрофагтар қалыпты жағдайда Fe^{3+} шығара береді. Денедегі темірдің көп бөлігі қартайған эритроциттер макрофагтармен фагоцитозданғаннан кейін гем темірінің қайта өңделуінен пайда болады, ал басқа бөлігі тағамнан темірдің сіңуі нәтижесінде пайда болады, ал аш ішек темірді сіңіретін жалғыз орын болып табылады. ЛФ-нен темірдің бөлінуі темірді байланыстырудың кері жолы арқылы жүзеге асырылады, жабық темір байланыстыратын жердің құрылымдық домені ашылады, содан кейін темірдің бөлінуі жүреді.



Сурет 5 – Темірді байланыстыру және босату механизмі *in vivo* [86]

Темірдің бөлінуіне қажетті құрылымдық өзгерістерге үш фактор ықпал етеді: қан сарысуындағы трансферринге ұқсас спецификалық рецептордың болуы, Fe^{3+} -тің Fe^{2+} -ге айналуы және қоршаған ортадағы рН-ның төмендеуі [90-92]. Темірдің сіңуі он екі елі ішектің проксимальды бөлігінде жүреді [86; 93]. Темір иондары бар ЛФ ішекке жеткенде, ол жасуша бетіндегі рецепторлармен арнайы байланысады (сурет 5), темір мен зақымдалмаған ЛФ энтероцитке енуін және Fe^{3+} иондарының эндоцитоз арқылы шығарылуын жеңілдетеді [86; 94-95]. Содан кейін сіңірілген ЛФ микросомалар арқылы тасымалданады және ақырындап сәті келгенде темір циклінің тотығу-

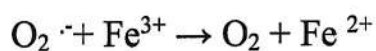
тотықсыздану реакцияларына қатысады [96-97]. ЛФ темірмен байланысу арқылы ішекте темірдің сіңуін жақсартады және гемоглобин мен сарысудағы темірдің деңгейін реттейді, осылайша денедегі және жасушалардағы темірдің гомеостазын сақтайды [98-99].

ЛФ металл-белок кешендері, атап айтқанда, барлық тірі организмдерде маңызды рөл атқаратын гликопротеин. Осы металлопротеиндердің денсаулыққа қатысты зерттеулерге қатысуына байланысты металды байланыстыратын аймақтағы металл иондардың биоаффинділігін тереңірек түсіну ғылыми зерттеу жұмысының қызығушылығын тудырады. Трансферрин туысы өкілдері белоктарымен темірді сіңіру элементті патогендік микроорганизмдерге қолжетімсіз етеді, олардың әрі қарай дамуына мүмкіндік бермейді. Металдардың шексіз күйдегі каталитикалық рөліне байланысты пайда болатын бос радикалдардың түзілуі басқа да көптеген зиянды биохимиялық процестерді тудыратындықтан, ЛФ-нің темірді байланыстыруы тірі организмдерді оттегінің асқын тотығу стрессінен қорғауы мүмкін [100]. Барлық организмдер үшін металлопротеиндердің көпшілігінде метаболизм мен детоксикациядағы химиялық өзгерістерге әсер ететін және заряд тасымалдау орталықтары үшін маңызды қоректік заттар ретінде өтпелі металл кофакторлары бар екені назар аударарлық [100; 101].

Металл иондарын сіңіру механизмі метал иондарының биологиялық қол жетімділігіне немесе металл иондарымен байланысатын металлопротеиндердің қатысуымен жүретіндігіне негізделген. ЛФ-нің құрылымы мен функциясындағы металл иондарының рөлін терең түсіну денсаулық, ауруларды диагностикалау және терапия үшін шешуші мәнге ие [100]. ЛФ-нің апо-формасы әртүрлі иондарды, әдетте жоғары оң зарядталған катиондарды, соның ішінде Cu^{2+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , VO^{2+} , лантанид катиондарын және Th^{4+} байланыстыра алады. Шексіз күйдегі металдардың каталитикалық рөліне байланысты бос радикалдардың түзілуі басқа да көптеген зиянды биохимиялық процестерді тудыратындықтан, металл иондары ЛФ-мен байланысуы жасушаларды тотығу стрессінің зақымдануынан қорғай алады. Сонымен қатар, әртүрлі зерттеулер ЛФ тотығу-тотықсыздануға негізделген реакцияларға қатысатын кейбір антиоксиданттық ферменттерді белсендірудегі рөліне байланысты немесе радикалды бейтараптау қасиеттерін көрсету арқылы антиоксиданттық белсенділікті көрсетеді. ЛФ-нің металдарды соның ішінде минералды элементтерді байланыстыруда маңызы орасан [73-92; 100].

Хабиб Н. және басқалардың зерттеу еңбектерінде, биологиялық жүйелердегі тотығу зақымданулардың көп бөлігі металл иондары мен O_2 және H_2O_2 арасындағы реакция нәтижесінде пайда болатын OH^- әсерінен болатындығы айтылған [102]. Нәтижелер ультрафиолетпен, H_2O_2 және FeSO_4 өңделген плазмидты ДНҚ-ның толық деградациясын көрсеткен. Бұл зақым ЛФ қатысуымен ультракүлгін, H_2O_2 және FeSO_4 өңделген ДНҚ-да азайтылды. ЛФ кез-келген каталитикалық темірді байланыстыра отырып, Хабер-Вайс

реакциясын тежей отырып, антиоксиданттық қорғаныс механизміне қатыса алады.



Лактоферрин - антиоксиданттық қасиеті жоғары белок, осылайша антиоксидантты белсенділікке ие. ЛФ-нің реактивті оттегі түрлерін немесе бос радикалдарды бейтараптандыру қасиеті бар болатындығы туралы сипатталған.

Сарысу белоктарының ішінде лактоферрин ағзадағы иммундық жүйенің белсенділігін жақсартуда маңызды рөл атқарады. ЛФ серум трансферринге ұқсас, бірақ плазмада болмайды. Олардың физикалық-химиялық қасиеттері әртүрлі, бірақ екеуінің де темір байланыстырушы қабілеті бар [73].

1.5 Сүт белоктарының пептидтері

Сүт белоктарының пептидтері – ас қорыту немесе ашыту кезінде белоктардың ыдырауы нәтижесінде түзілетін аминқышқылдарының қысқа тізбегі. Бұл пептидтер әртүрлі биологиялық белсенділікке ие және адам ағзасына әртүрлі әсер етуі мүмкін. Сонымен қатар, сүт белоктары және олардың пептидтік өнімдері биологиялық белсенділіктің жоғары деңгейімен сипатталады. Сүт биологиялық белсенді пептидтердің көзі және табиғи түрде сүтте кездеседі. Сүтте әртүрлі белоктар болады, сондықтан әртүрлі пептидтер түзіледі. Атап айтқанда, лизоцим, ЛФ, иммуноглобулиндер т.б. және оларды табиғи белоктардың гидролизі арқылы да алуға болады [103]. Сүттен алынған биологиялық белсенді пептидтер әдетте шифрланады және сүт белогының бастапқы құрылымында белсенді емес болып қалады және олар казеиннің (α -, β -, γ - және κ -казеин) және сарысу белоктарының (β -лактоглобулин, α -лактальбумин, сарысу альбумині, иммуноглобулиндер, ЛФ және протеаза-пептон фракциялары) протеолизі арқылы түзіледі [104-105].

Жануарларға жүргізілген тәжірибеде нативті белокпен салыстырғанда биологиялық белсенді пептидтердің белсенділігі жоғары болғандығы көрсетілген. Сүт белоктары мен пептидтері және олардың аминқышқылдары денсаулықты жақсартатын бірнеше қасиеттерге ие. Атап айтқанда, антиоксиданттық (бос радикалдарды жою), қабынуға қарсы және иммуностимуляциялық, антиоксиданттық ферменттерді белсендіру арқылы адам ағзасындағы прооксидант/антиоксиданттық гомеостазды реттеуде, металл иондарын байланыстыруда, белоктардағы -SH тиол топтарын қалпына келтіру және асқазанда химиялық жолмен зақымдалған жараның түзілуіне кедергі жасау қасиеттерімен сипаттауға болады [105].

Соңғы жылдары сарысу пептидтері көбірек зерттелуде. Олар тағам дизайнында қолданылатын "нативты" белоктарға балама ретінде қарастырылады. Себебі, адамдардың денсаулығы мен тамақтану

қажеттіліктерін қанағаттандыру маңызды [106]. Белоктарды гидролиздеу, оларды ферменттермен өңдеу арқылы немесе асқорыту жолымен ұсақ бөлшектерге бөлу - олардың функционалдығын жақсартудың және биологиялық белсенді пептидтерді түзудің тиімді әдісі. Осыған байланысты, белоктық құрамы, белоктың гидролизі және денатурация дәрежесі де маңызды рөл атқарады.

Пептидтердің түзілуі бірнеше жолмен: ферментативті гидролиз немесе микробтық ашыту, трипсин, пепсин сияқты ас қорыту ферменттері арқылы *in vivo* және асқорыту жолындағы микроорганизмдері өндіретін ферменттері көмегімен, тағамды өңдеу кезінде, бөлінген ферменттерді қолдану арқылы *in vitro* гидролизі арқылы бірнеше жолмен индукциялануы мүмкін. Денсаулықты жақсартуда ықпал ететін көптеген әсерлер сүт белоктарынан ферментативті протеолиз арқылы бөлінетін сүттен алынған биологиялық белсенді пептидтерге, соның ішінде тромбозға қарсы, гипертензияға қарсы, қабынуға қарсы, тотығуға қарсы, микробқа қарсы және семіздікке қарсы әсері байқалған [104].

Сонымен қатар антибиотиктерді қабылдау барысында пептидті кешен ішекте дисбактериоздың дамуына жол бермеген [103; 107]. Биологиялық белсенді пептидтердің антимикробтық, антиоксидантты, гипертензияға қарсы, гипохолестеринемиялық, металл иондарын (ауыр металдар) байланыстыру сияқты [102-109], әртүрлі функцияларға ие болуы мүмкін.

Ферменттермен әсер ету арқылы белокты гидролиздеген кезде, кейбір ЛФ фрагменттерінің бастапқы белокқа қарағанда бактерицидтік белсенділігі жоғары болғандығы анықталған. Атап айтқанда, сиыр сүтінің ЛФ белогын шошқа пепсинімен гидролиздеген кезде лактоферрициннің пептидтік фрагменті [LFcin; ЛФ(17-41)] алынып, жоғары антимикробтық потенциалды және ісікке қарсы белсенділікті көрсеткен. ЛФ N1-доменінде анықталған тағы бір микробқа қарсы пептид - лактоферрампин [LFampin; ЛФ(268-284)], молекуланың 3 өлшемді құрылымындағы LFcin тізбегіне іргелес қалдықтары бар. Дегенмен, асқазанның рН, тұтынушының жасы және фермент:субстрат қатынасы сияқты факторлар маңызды болып көрінеді. Барлық *in vitro* үлгісіндегі ас қорытулардағы қиындық - фермент, қышқыл және өт тұзы секрециясының вариациясы сияқты физиологиялық параметрлерді модельдеу; субстраттың болуы; асқазан мен он екі елі ішектегі астың өту уақыты [110].

Тағаммен алынған антиоксиданттардың денсаулықты нығайтудағы және аурудың алдын алудағы пайдалы әсерлері барған сайын танылуда. Соңғы уақытта сүттен алынған пептидтерге ерекше назар аударылды; антиоксиданттардың көзі ретінде бұл пептидтер белоктың тізбегінде белсенді емес, бірақ фермент гидролизі кезінде босатылуы мүмкін. Гидролизден кейін пептидтер бос радикалдарды бейтараптау, металл иондарын байланыстыру қасиеттері және липидтердің асқын тотығуын тежеу қабілеті бар екендігі көрсетілді [111-112]. Сарысу белогының гидролизі кезінде антиоксиданттық қабілеті жоғары пептидтер бөлінеді. Алайда ЛФ антиоксиданттық қабілеті темірмен қанығуға пропорционалды түрде төмендейді [73; 93; 97].

Пептидтердің биологиялық белсенділігі аминқышқылдарының реттілігімен, құрылымымен, конфигурациясымен және молекулалық салмағымен анықталады. Триптофан, тирозин, гистидин, пролиннен тұратын пептидтер күшті антиоксиданттар болып табылады. Пептидтердің құрылымында болатын гидрофобты аминқышқылдары (лейцин немесе валин) пептидтердің антиоксиданттық белсенділігіне және олардың липидтердің асқын тотығын тежеу қабілетіне әсер етеді [95].

Сүт белоктары мен пептидтері антиоксиданттық әсер көрсетеді. Олар оттегінің белсенді түрлерімен (ROS), хелат металдарымен байланысады және ROS өндіруге және жоюға қатысатын ферменттерді модуляциялайды. Казеин фракциялары көптеген биопептидтердің, соның ішінде антиоксиданттық пептидтердің прекурсорлары болып табылады [111-112]. Казеиннің гидролизі дивалентті катиондарды байланыстыратын, тасымалдайтын және биожетімділігін арттыратын, сондай-ақ, ROS-ны жоятын b-казоморфиндер мен казеин фосфопептидтерінің түзілуіне әкеледі. Олар липидтердің асқын тотығынан болатын зақымдануды азайту және сутегі асқын тотығына қарсы қорғаныс әсерлерін көрсету қабілеті Сасо-2 жасушалық желісінде көрсетілген. Сондай-ақ казеин фосфопептидтері глутатион (GSH) деңгейін жоғарылату, каталаза белсенділігін индукциялау және жасушалық циклды реттеу арқылы жасуша тіршілігін күшейтетіні анықталды. CPP-нің липидтердің асқын тотығынан қорғайтын әсерлері металл иондарын байланыстыру қасиетіне байланысты болуы мүмкін [113].

β -лактоглобулиннің антиоксиданттық белсенділігі құрамында күкірті бар аминқышқылдарының жоғары мазмұнымен, атап айтқанда Cys-121 деп атауға болады. β -лактоглобулин шикі сүттің жалпы антиоксиданттық сыйымдылығының шамамен 50%-ына жауап береді [114]. β -лактоглобулин әртүрлі гидрофобты молекулаларды, соның ішінде А дәрумені мен полифенолдарды байланыстырады, бұл белоктардың аллергиялық потенциалын төмендетеді және оның аш ішекте тотығын азайту арқылы антиоксиданттық қабілетті арттырады [105]. β -лактоглобулиннен бөлінген пептидтер бос радикалдарды жоюға қабілетті. Олардың бірі, құрамында жоғары триптофан, тирозин және метионин бар β -лактоглобулиннің (19-29) аралығындағы пептиді жоғары антиоксиданттық белсенділігімен сипатталады [115].

Құрамында күкірт бар аминқышқылдарының құрамында сульфгидрил тобы бар және олар белок құрылымын, жасуша тұтастығын анықтайды, тотығу-тотықсыздану реакцияларын реттейді, ксенобиотиктер мен ROS жоюға қатысады. Метионин мен цистеин ROS-тың барлық түрлеріне сезімтал және олар S-аденозилметионин, күкіртті сутегі, таурин және GSH прекурсорлары ретінде әрекет етеді. Бұл өнімдер тотығу стрессін жеңілдетеді және тіндерді зақымданудан қорғайды [116].

Сүт белоктарында бірқатар ACE тежейтін пептидтер бар және сүт казеинінен (казокининдер) және сарысу белоктарынан (лактокининдер) күшті ACE ингибиторлары сипатталған. Атап айтқанда, *L.helveticus* және

Saccharomyces cerevisiae ашытылған қышқыл сүттен ірі қара сүтінің казеинінен екі күшті ингибиторлық три-пептидтер, Val-Pro-Pro және Ile-Pro-Pro бөлініп алынған [104]. Сонымен қатар, α -лактальбуминнен VAGTWYHIRL, YG, YLLF; β -лактоглобулиннен ALPMHIR, LAMA, VKF т.б. пептидтер анықталған [104].

Гидролизденген белоктардың қасиеттері қолданылатын протеаза түріне және рН, температура, гидролиз ұзақтығы және фермент-субстрат қатынасына байланысты өзгереді. Осы биологиялық белсенді пептидтердің арасында белоктық гидролизаттардан алынған молекулалық салмағы төмен пептидтерге [117; 118] және олардың белгілі бір металл иондарын (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} т.б.) хелаттау белсенділігіне қызығушылық артуда. Аталған иондар биожетімділігі, ерігіштігі, сіңірілуі мен тұрақтылығын жоғарылату тұрғысынан биологиялық қасиеттері бойынша үлкен сұранысқа ие [117]. Организмде минералды заттардың сіңуі мен биожетімділігі тағамдық белоктардан алынған пептидтердің негізінде жақсаруы мүмкін. Гистидин, цистеин, серин, аспарагин қышқылы және глутамин қышқылы сияқты амин қышқылдарының қалдықтарынан тұратын пептидтер екі валентті металдарды (кальций, темір, мырыш, магний т.б.) хелаттайтын белсенділікке ие, осылайша еритін пептид-металл кешендері (комплексдерін) түзіледі. Мысалы, глутатион мен металлотионеин пептидтері маңызды және улы элементтерді де хелаттау арқылы байланысады, тасымалданады және шығарылады.

Тағамдық белоктардан алынған «биологиялық белсенді пептидтер» денсаулыққа пайдалы диеталық қосылыстардың бірі. Пептидтердің көрсететін биологиялық белсенділігі олардың кальций (Ca^{2+}), мырыш (Zn^{2+}), темір (Fe^{2+}), мыс (Cu^{2+}) және т.б. екі валентті металдармен кешен (комплекс) құру қабілеттерімен түсіндіруге болады. Пептидтер тағамдық минералдардың биожетімділігін жақсарту үшін тасымалдаушы (тасымалдағыш) немесе диффузиялық агент ретінде қызмет ете алады, осылайша минералдардың жетіспеушілік қаупін немесе пайда болуын азайтады [108; 117-119].

Пептидті кешеннің әсері белгілі бір мәнге дейінгі мөлшерге пропорциональді өседі, нақты дозадан арттырған кезде оның мөлшерінің артуы ешқандай оң нәтиже бермейді. Бұл құбылыс жасушаның өсуіне жауап беретін рецепторлармен агенттердің қанығып қалу мүмкіндігімен түсіндірілуі мүмкін. Амин қышқылдар тізбегінің ұзындығы және оның құрамы, тізбектегі орны сияқты ерекшеліктері пептидтердің бактерия жасушаларымен байланысуына әсер етуі мүмкін [103]. Белоктармен/пептидтердің микроэлементтермен байланысуына тоқталайық.

Темір - жануарлар мен өсімдіктердің тіршілігі үшін қажетті маңызды минералды элемент. Негізгі қызметі - организмдегі оттегіні тасымалдауға қабілетті «гемоглобин», қаңқа бұлшықеттерінде оттегін сақтауға арналған «миоглобин» металлопротеиндерін және тағы басқа кешендерді қалыптастыру [120]. Темір жасушалық тыныс алу процестеріне, ДНҚ мен РНҚ синтезіне, сондай-ақ гендердің экспрессиясы мен реттелуіне қатысады. Сонымен қатар, электронды тасымалдау (беру) реакцияларына, жасушалардың өсуі мен

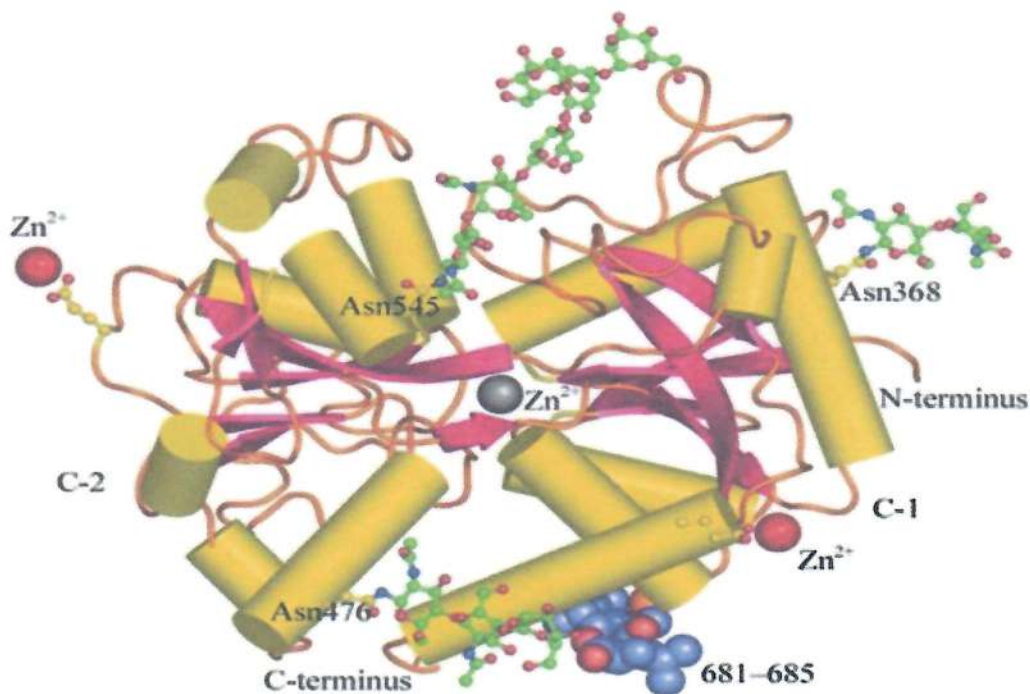
дифференциациясына жауап береді. Темір гомеостазы трансферрин, церулоплазмин, гефестин, ферропортин және екі валентті металл тасымалдаушы 1 (DMT1) сияқты бірнеше белоктармен реттеледі. Fe-нің нашар реттелуі темір тапшылығы анемиясына, гемохроматозға, Хантингтон хорейсына, Паркинсон ауруына, Альцгеймер ауруына және бүйірлік амиотрофиялық склерозға себеп болуы мүмкін [120].

Темір ішекте металды сіңіру тасымалдаушыларына байланысу үшін ауыр металл Cd-мен бәсекелеседі, соның ішінде екі валентті металл тасымалдаушы-1 (DMT1) және металл тасымалдаушы белок 1 (MTP1), бұл темірді байланыстырғаннан кейін ішекте Cd сіңуінің төмендеуімен түсіндіріледі. Сонымен қатар, бұл тасымалдаушылардың экспрессиясы көбінесе темір және мырыш сияқты маңызды минералдардың тағамдық күйімен модуляцияланады. Мысалы, темір тапшылығы ішек эпителийінде DMT1 экспрессиясын жоғарылататыны туралы хабарланған. Демек, темір қоспасы мұндай тасымалдаушылардың экспрессиясын азайту арқылы Cd сіңуін болдырмайды немесе шектей алады. Екінші жағынан, темір гем кешенінің құрамдас бөлігі болғандықтан, темірдің жетіспеушілігі гем синтезі жүйесіне Pb уыттылығын арттырады. Кальций және магний сияқты басқа маңызды металдар Cd және Pb уыттылығына қарсы тиімді болатындығы айтылған. Бұл маңызды металдар ішекте сіңуі үшін Pb немесе Cd-мен бәсекелесе отырып, ауыр металдардың ағзаға сіңуін азайтады және ферменттердің белсенді учаскелерімен бәсекелестік байланысы арқылы ауыр металдан туындаған ұлпалардың зақымдалуын болдырмайды [121].

Мырыш - организмдегі маңызды элементтің бірі, шамамен 2 г құрайды, оның 95%-ы жасушаішілік болып келеді [122]. Мырыш жасушалық метаболизмдегі процестерге қатысады, оның ішінде өсу, даму және иммундық жүйенің дұрыс жұмыс жасауына әсер етеді [123]. Белоктар үшін қажет, олсыз белоктар белсенділіктерін атқара алмайды. Биоақпараттық зерттеулер мырышпен байланысуға барлық кодталған белоктардың ~ 10% сәйкес келетінін, яғни 3000 белокқа дейін қатысатынын көрсеткен [124]. Сонымен қатар, 300-ден астам металлоферменттердің каталитикалық кофакторы. Мырыштың әсері биологиялық процестердің көпшілігінде маңызды, ол жасушалық процестерге (жасушалардың бөлінуі, көбеюі және дифференциациясы), нуклеин қышқылының синтезіне, гендердің экспрессиясына қатысады. Иммундық жүйе мырышқа да тәуелді, өйткені ағзада мырыш жетіспегенде жасушаның иммундық реакциясы асқынуы мүмкін [125].

Мырыштың сіңуі он екі елі ішекте және ішектің проксимальды бөлігінде жүреді, ал мырыш энтероциттерге тасымалданады және апикальды мембранада көрінеді [126]. Мырышпен байытылған тағамдар мен мырыш қоспаларын диетада көп тұтыну мырыш жетіспеушілігін болдырмайды. Өкінішке орай, диеталық мырыштың сіңуін фитат, полифенолдар мен сапониндер тежейді, олар асқазан-ішек жолында сіңірілмейтін немесе ерімейтін мырыш комплекстерін түзе алады. Сонымен қатар, мырыш

сульфаты сияқты мырыш қоспаларын ұзақ уақыт қабылдау асқазан-ішек жолдарының тітіркенуін тудыруы мүмкін. Екінші жағынан, мырыштың сіңірілуі биожетімділікті жақсарту үшін мырыш байланыстырушы лиганд ретінде әрекет ете алатын белоктар, пептидтер мен аминқышқылдары сияқты еритін органикалық қосылыстармен күшейтіледі [127].



Сурет 6 – Лактоферриннің С-терминал бөлігінің схемалық көрінісі [129]

ЛФ-тың темірді байланыстыратын аймағында әртүрлі металл иондары байланысатыны көрсетілген [88-92]. Сол сияқты, басқа металл иондары да оның окшауланған С-терминал бөлігімен байланысады. ЛФ-тың мырышпен қаныққан түрі темірге қаныққан немесе апо- формасымен салыстырғанда жоғары патогенді бактерияларға қарсы белсенділік көрсетеді. Сонымен қатар, ЛФ полиовирусты инфекция дамуының бастапқы фазасында кедергі келтіреді және ЛФ мырышпен қаныққан түрде вирустың қожайын жасушаларында инфекция фазасын тежеуге қабілетті белоктың жалғыз түрі [128]. Жұқпалы жағдайлар әдетте қышқыл рН-ға ие, сондықтан қышқыл рН кезінде ЛФ металды байланыстыру қабілеті маңызды функционалды мәнге ие. Fe^{3+} және Zn^{2+} иондарының диссоциациялануының рН-қа тәуелділігі айтарлықтай өзгереді. Темірдің белоктан бөлінуінің басталуы рН 5,7-ден басталады, ал Zn^{2+} үшін сәйкес мән рН 4,6. С-терминал бөлігінде Zn^{2+} толық қаныққан кезде Fe^{3+} -ке қарағанда салыстырмалы түрде төмен рН мәніне дейін сақталады.

Лактоферриннің С-терминал бөлігінің схемалық көрінісінде Asn368, Asn476 және Asn545 байланысқан үш гликан тізбегі шар және таяқша көрінісінде көрсетілген (сурет 6). Үш мырыш иондары, біреуі металды байланыстырушы жарықта (сұр) және екеуі бетінде (қызыл) көрсетілген. C1 және C2 домендері де көрсетілген. Гидролизденген, бірақ С-С-байланыстырылған фрагмент 681-685 СРК (Кори-Полинг-Колтун) моделі түрінде көрсетілген. ЛФ белогының С-терминал бөлігі рН 3,8 кезінде Zn^{2+}

ионын оқшаулауға қабілетті. Бұл мырыш иондарын рН диапазонында оқшаулауға болатындығын көрсетеді. Металды байланыстыру зерттеулері Zn^{2+} ЛФ молекуласындағы рН 5,0 кезінде диссоциацияланатын Fe^{3+} үшін байқалғанға қарағанда айтарлықтай төмен рН мәніне (3,8-ге дейін) байланысты болып қалатынын көрсетті. Бұл қышқыл жағдайда мырыш иондарын байланыстыру арқылы ЛФ молекуласының пайдалы рөліне байланысты. Zn^{2+} иондарының Fe^{3+} байланыстыратын саңылауларда болуы және бетіндегі екі нақты жерде С-терминал бөлігінің құрылымын өзгертпейтіні байқалған. Asn545-ке қосылған гликан тізбегі де С-терминал бөлігінен темірдің бөлінуіне белгілі бір әсер етуі мүмкін [129].

Cd және Pb физикалық және химиялық қасиеттері бойынша мырышқа ұқсас болғандықтан, олар белоктардағы мырыш иондарының байланысу орындары үшін бәсекелеседі. Себебі, мырыш ауыр металдардың уыттылығын жеңілдету үшін ең жақсы зерттелген маңызды металдардың бірі. Мырышты қабылдау сонымен қатар металлотионеиннің (MT) синтезін индукциялайды, ол Cd-ге жоғары жақындығы бар және Cd байланыстыру арқылы детоксикацияны тудырады. Мырыш қоспасы қандағы δ -аминолевулин қышқылы дегидратазасының (ALAD), Pb уыттылығына сезімтал мырышқа тәуелді ферменттің белсенділігін тиімді қорғайды. Сонымен қатар, мырышты қабылдау Cd және Pb әсерінен туындаған тотығу стрессін жеңілдететіні туралы хабарланған, бұл мырыштың антиоксиданттық фермент мыс/мырыш-супероксид дисмутазасының (Cu/Zn SOD) кофакторы ретіндегі функционалдылығына байланысты болуы мүмкін [121].

Кальций – адам ағзасындағы басым минерал. Диеталық кальций остеопороз, ішек қатерлі ісігі, қан қысымының жоғарылауы сияқты кейбір аурулар арасындағы байланыс өзекті тақырыпқа айналып отыр. Осыдан бастап ғылыми қауымдастық осы аурулардың алдын-алуда диеталық кальцийдің әсері мен маңыздылығын түсінді. Кальций-сүйектердің негізгі құрамдас компоненті. Ересек адамның денесінде оның 1 кг-ға жуық немесе дене салмағының шамамен 2% құрайды, басым көпшілігі қаңқада (99%) [130-131], ал аз бөлігі дене сұйықтықтарында, сондай-ақ ұлпаларда (май, бұлшықет, талшықты тін, қан тамырлары, лимфа тамырлары) кездеседі. Кальций сүйек метаболизмі, қанның ұюы, жүйке-бұлшықет реакциясы және жүйке импульстарын беру сияқты әртүрлі процестерде маңызды рөл атқарады. Кальцийдің ұсынылатын тәуліктік мөлшері тұрғылықты жеріне, жынысына байланысты ересек адам үшін тәулігіне 800-ден 1000 мг-ға дейін өзгереді, ал жасөспірімдер мен қарттар үшін күніне 1200 мг құрайды [132].

Спектроскопиялық деректер кальций лигандтары ретінде жылжымалы карбоксилат топтарын көрсетеді. Екі гликан тізбегіндегі сиал қышқылы қалдықтарының карбоксилаттары ең ықтимал кандидаттар болып табылады, өйткені bLf рентгендік кристалдық құрылымында Ca^{2+} катиондық байланыстырушы сайттардың бар екендігі туралы нақты дәлел жоқ. Бұл гипотезаны растау үшін сиал қышқылының қалдықтары нейраминидаза көмегімен жойылды. LPS молекулалары анионды болып табылады және

мембрана ішінде байланысты катиондармен, ең алдымен, Ca^{2+} және Mg^{2+} арқылы тұрақталады. Шын мәнінде, LPS құрамында Ca^{2+} байланыстыру сайттарының біртекті популяциясы бар деп санауға болмайтындықтан, микромолярлық диапазонда Ca^{2+} диссоциациясының тұрақтысына ие bLf Ca^{2+} үшін әлсіз Ca^{2+} байланыстыру сайттарымен тиімді бәсекелесе алады [130-132].

Ca^{2+} байланысуы нәтижесінде пайда болған bLf тұрақтануы бірқатар факторларға байланысты болуы мүмкін, соның ішінде, кальций сиал қышқылының қалдығымен байланысқан кезде көмірсулар тізбегінің белок бетімен күшті әрекеттесуі және гликанның өзара әрекеттесуінің маңыздылығымен байланысты болатындығын көрсетеді. Ca^{2+} көмегімен тұрақты кешеннің түзілуі белок бетіндегі гликандар мен аминқышқылдары арасындағы өзара әрекеттесуінің жоғарылауы арқылы белокты тұрақтандырады, өйткені лиганд белоктың бүктелген күйіне артықшылықпен байланысуы әдетте табиғи белоктың тұрақтылығын арттырады [131-132].

Мыстың негізгі қызметі - оксидазалар ретінде әрекет ететін белгілі бір металлоферменттерді катализдеу. Мысалы, феррооксидаза темірді трансферринмен байланыстыру үшін темірді тотықтырады, осылайша плазмада айналып, ұлпаларға жеткізілуі мүмкін. Сонымен қатар, мыс жараларды емдеу процесінде және ангиогенезде маңызды рөл атқарады: қан тамырларының эндотелий өсу факторы мыстың болуына сезімтал және жасушадан тыс матрицаны қайта құруды жақсартуға мүмкіндік береді. Мыс гомеостазы мыстың аш ішектен сіңуін және оның өтпен шығарылуын реттеу арқылы бақыланады. Асқазан-ішек жүйесі тағамдық мыстың 30-дан 40% -на дейін сіңіруге қабілетті [133]. Қартаю мыс гомеостазының тиімділігін төмендетеді, соның салдарынан егде жастағы адамдар плазмасында мыс концентрациясы жоғарылайды. Сонымен қатар, жынысқа байланысты физиологиялық айырмашылықтар мыс мөлшеріне әсер етуі мүмкін, осылайша әйелдердегі кейбір ауытқушылықтар мыстың жоғарылауымен түсіндіріледі. Химиялық сипаттамалары ұқсас минералдармен толықтыру мысты сіңіруді төмендетуі мүмкін. Бұл қасиетті фармакологияда қолдану үшін іздейді, мысалы, Вилсон ауруы кезінде.

Иммобилизацияланған металл иондарының ұқсастық хроматография әдісімен белоктардың адсорбциясы негізінен белок бетінде экспозицияланған гистидин қалдықтарының болуымен анықталады. Бұл қалдықтың болуы (яғни, гистидин, цистеин және триптофан), көрші топтар арасындағы өзара әрекеттесуі және жергілікті конформация сияқты факторлар белокты сақтауда маңызды рөл атқарады. Мыс иондары жағдайында адсорбция бір гистидин қалдығы арқылы жүреді. ЛФ белогының бастапқы құрылымында екі гистидин қалдығы болады, нәтижесінде ЛФ-тың IDA- Cu^{2+} -криогельде жоғары байланысуы байқалады. IDA- Cu^{2+} -криогель кешені ірімшік сарысуынан ЛФ-ті бөлу және тазарту үшін перспективалы нәтижелерді көрсеткен [133-134].

Жоғарыда аталған металдардың ішінде, темір мен мырыш, мыс, никель сияқты минералды элемент иондары спецификалық белоктармен комплекстер түзеді және адам ағзасында жақсы реттеледі. Алайда, дамудың әртүрлі

кезеңдерінде қажеттіліктерді қанағаттандырмайтын кездер болуы мүмкін. Ағзада күнделікті минералды элементтерді қабылдау тұрақты болмаса, уақыт өте келе жетіспеушілікке алып келеді. Минералды элементтердің биожетімділігі адам дамуының кейбір кезеңдері (балалар, қарттар, әйелдер) үшін тамақтану проблемаларының бірін білдіреді. Бұл жағдайда ағзаның қалыпты жұмыс істеуі үшін тағамдық қоспаны қолдану туралы ойланған жөн. Минералды элементтерді жинақтаудың баламасы ұсынылды: жетіспеушіліктерді азайту үшін минералдарды бейорганикалық тұздар түрінде қосу [120-134]. Алайда, бұл тұздардың шектеулері бар, оны қосу тағамның ерігіштігіне, дәмі мен түсіне әсер етеді. Соңғы жылдары минералдардың биожетімділігін жақсартудың жаңа баламасы кең таралды: хелатталған пептидтерді қолдану.

Маңызды минералды элементтер ішекте Cd және Pb сіңуін төмендетеді, гомеостазды қалпына келтіреді және Cd және Pb уыттылығынан туындаған тотығу стрессін жеңілдетеді. Диетаға байланысты маңызды металды қоспалар балалар мен жүкті әйелдерде маңызды минералды элемент тапшылығы бар адамдар үшін өзекті. Ауыр металдардың сіңуін болдырмайтын маңызды минералды элементтер қоры болмағандықтан, бұл адамдар ауыр металдардың уыттылығына сезімтал болады. Сондай-ақ, Cd және Pb экспозициясы маңызды минералды элементтердің жоғалуын тудырады, бұл темір тапшылығы анемиясы және остеопороз сияқты асқынуларға әкеледі. Сондықтан маңызды минералды элемент қоспаларының тиісті концентрациясы осы асқынулардың алдын алу үшін де пайдалы [121].

2 ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІСІ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу объектісі: Зерттеу объектісі балғын бие сүті (*Equus caballus*) болды. Бие сүті Қазақстан Республикасы, Алматы облысы, Қарасай ауданы, Іргелі ауылында орналасқан «Боз бие» бие өсіру шаруашылығынан алынды. Бие сүтінің үлгілері термиялық ыдыста зертханаға жеткізілгеннен кейін $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ температурада тоңазытқышта сақталды.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштерін анықтау

Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштерін анықтау үшін стандартты зертханалық талдау әдістері қолданылды. Кейбір негізгі көрсеткіштер мен оларды анықтау әдістері келесідей: бие сүтінің активті қышқылдылығы рН МЕТЕР-410 құрылғысымен (МемСТ 26781-85), титрлік қышқылдылығы Тернер (°Т) әдісімен (МемСТ 3624-92; МемСТ 3624-73) анықталды. ЛАКТАН 1-4 сүт анализаторы көмегімен сүттің биохимиялық көрсеткіштері (липидтің пайыздық үлесі, сүттің құрғақ зат қалдығы, тығыздық) сипатталды. Қышқылды тұндыру арқылы сүттің құрамындағы казеин белогының мөлшері және 2,6-ДХФИФ оксидо-редуктазалық титрлеу әдісімен витамин С мөлшері анықталды [135]. Зерттеу нәтижелерінің орташа арифметикалық мәні есептелді.

2.2.2 Сарысу белоктарын бөліп алу

Бие сүтінен сарысу белоктарын бөліп алуға бие фермасынан жаңадан сауылған бие сүті 4°C температурада 30 минут сақталды. Сүт үлгілері центрифуга ыдыстарына құйып, 30 мин 5000 айналым/мин центрифугалағаннан кейін майсыздандырылды. Сүттің беткі қабатындағы май қабатынан тазартылды. Сарысу белогын бөліп алу үшін казеинді тұнбаға түсіруге 1 М HCl-мен сүттің рН 4.2 келтіріп, 30 минут бөлме температурасына қалдырылды. Белгіленген уақыт өткеннен кейін 5000 айналым/минутта 30 минут центрифугаға қойылды. Тұнбаға казеин белоктары түсіп, супернатант сарысу белогы бөлінді. Алынған супернатант (сарысуы бар белоктар) 1 М NaOH көмегімен рН 6.8-ге келтіріп, тұздардан тазарту үшін дистильденген суда 72 сағат 4°C температурада диализге қойылды (диализдік мембрана қапшығы = 6-8 000 Да, SpectraPor; Spectrum Labs Inc., Rancho Dominguez, Калифорния, АҚШ). Белоктарды басқа қоспалардан диализ арқылы тазарту әдісі белоктар үлкен молекулалы болғандықтан жартылай өткізгіш мембранадан өте алмайтын қасиетіне негізделген. Диализ уақыты аяқталғаннан кейін сарысу белоктары келесі тәжірибиелерге қолдану үшін кептірілді [136].

2.2.3 SDS-PAGE электрофорез әдісі

Полиакриламид геліндегі электр өрісі бойымен бөлінуге сәйкес белоктардың молекулалық массасын анықтау Laemmli және Favre (1973) әдісі бойынша жүргізілді [137].

а) Белоктардың молекулалық массасын анықтауға SDS-PAGE (Bio-Rad компаниясы) аппараты қолданылды. 12% гель-электрофорез әдісін қолдану барысында екі гель дайындалды (бөлуші және концентрлі). Бөлуші гель құрамына: акриламид/бисакриламид ерітіндісі (1:29), Трис-буфері (pH 8,8), dH₂O, 10% SDS, тетраметилэтилендиаминмен (TEMED) және 100 мг/мл аммоний персульфаты ерітінділерін пробиркаға құйып, мұқият араластырылды. Дайын болған ерітіндіні электрофорезде орнатылған екі шыны әйнектер арасына құйылды. Концентрлі гельді дайындау үшін акриламид/бисакриламид ерітіндісі (1:29), концентрлі гельге қолданылатын Трис-буфер (pH 6,8), dH₂O, 10% SDS, тетраметилэтилендиаминмен (TEMED) және 100 мг/мл аммоний персульфаты ерітінділерін екінші пробиркаға құйып араластырылды. Тарақшаларды бөлуші гельдің үстіне қойып, концентрлі гельді құйдық. Гель дайын болғаннан кейін, тарақшалар алынып сарысу белоктары үлгілері құйылды. Сарысу белогы үлгілерін дайындау үшін белоктың әр үлгісі 1:1 қатынасында (50% глицерин, 10% SDS, 2-меркаптоэтанол, бромфенол көк) 5 минут ішінде 100°C температурада үлгілерге арналған буфермен инкубацияланды. Гель кассеталары электрофорез контейнеріне салып үстіне электрод буфері құйылды (электрод буфері 10 есе сұйылтылды). Жұмыс уақыты 60 мА, 30 Вт, 200 В кезінде шамамен 35-55 минутты құрады (қалыңдығы 0,1 мм 6,7 x 8,6 см гель үшін).

Белоктардың гель бойымен жүру уақыты аяқталғаннан кейін, гельді мұқият шығарып, 12% үшхлорсірке қышқылына 1 сағатқа қойылды. Содан кейін гельді *Coomassie blue R250* (0,1% масса/көлем) бояуымен боялды (Sigma). Боялған гелдер визуалды түрде көрсетіліп, гельдегі кескіндер жарық астында суретке түсірілді. SDS-PAGE электрофорез әдісінде белоктардың молекулалық массасын анықтау үшін молекулалық стандартты маркер (M3913 Sigma Marker мол.мас. 6500-66000 Да) қолдану арқылы анықталды.

б) *Трицин SDS-PAGE* 1-100 кДа массалық диапазондағы белоктарды бөлу үшін қолданылады. Бұл 30 кДа-нан төмен белоктарды ажырату үшін қолайлы электрофорездік әдіс. Гельдерде қолданылатын акриламидтің концентрациясы басқа гелдермен салыстырғанда төмен. Трицин SDS-PAGE *Coomassie* көк немесе күміс бояу және электроблоттау үшін тиімді әдістерді қамтиды, осылайша тәсілдің әмбебаптығын арттырады.

2.2.4 Лактоферринді бөліп алу

Гель-сүзгі әдісі бойынша хроматография арқылы лактоферринді бөліп алу. Белоктарды ажыратып бөлу үшін бағаналық гель-сүзгі пайдаланды. Ол үшін ерітіндідегі белоктар қоспасын шыны бағанадағы матрикстер арқылы өткізеді. Бағаналы гель-хроматографияда қолданылатын матрикстер зерттелініп отырған белоктардың биологиялық белсенділігін сақтай отырып

олардың молекулалық массасы, заряды бойынша бөліп алуға мүмкіндік береді. Матрикс ретінде ион алмастырушы смола – сефадекс қолданылды. Сефадекс шамасы әр түрлі саңылауы бар, жоғары полимерлі көлденең тігісті түйіршік түріндегі полисахаридтер (декстрандар). Жоғары гидрофильді қасиетке ие. Сефадекстер бөлшектерінің көлемімен, көлденең байланыстарының («тігістер») мөлшерімен/санымен ерекшеленеді. Осы айырмашылықтар ісіну дәрежесін анықтайды. Сефадекстің әртүрлі маркерлері ісінуге қабілеті бойынша ерекшеленеді. Мұндай сүзгіден белоктардың өту жылдамдығы олардың молекулалық салмағына байланысты. Сондықтан ЛФ-ті бөліп алу үшін сефадекс G-100 қолданылды. Бөліп алынатын белоктардың зарядына байланысты сәйкес ион алмастырғыш тандап алғаннан кейін, рН шамасы сәйкес келетін буферлік ерітіндіні дайындалды. Тәжірибие барысында 0.01 М натрий фосфатты буфері (рН 6.8) тандалды және сефадекс G-100 геліндегі белоктарды шаюда қолданылды. Микроорганизмдерден ластану салдарынан қорғалған жағдайда ғана дайындалған Sephadex G-100 гелін бірнеше қайтара қолдануға болады. Сефадекстен өткен белок ерітінділері арнайы пробиркаларға жинайды және әр фракциядағы белок шамасын анықтайды. Сарысу үлгілері гель-фльтрация хроматографиясына жүктегеннен кейін үлкен молекулалар кішкене молекулаларға қарағанда жылдамырақ гель бойымен жылдам қозғалды. Гельден бірінші үлкен молекулалар, содан кейін ұсақ молекулалар ағып шығады. Ерітіндідегі белоктардың концентрациясы 280 нм толқын ұзындығында спектрофотометрде өлшенді (*Apel co., ltd. Japan. PD-303 UV*). Әрбір пик нүктесінде жинақталған жеке фракцияларды дистельденген суға диализге қалдырылды. Ерітіндідегі белок фракцияларынан тазартылған лактоферринді анықтау үшін SDS-PAGE әдісі қолданылды [138-139].

FPLC (Fast protein liquid chromatography) хроматография әдісімен сарысу белоктарының фракцияларын алу үшін FPLC (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) қолданылды. Бие сүтінің сарысу белоктарынан жеке белокты бөліп алу үшін қолданылатын буферді (А және Б) дайындау: А буфері (рН 8.0): 20 mM Трис (гидроксиметил) аминотан гидрохлориді (Tris/HCl), 0,02% NaN_3 . Б буфері (рН 8.0): 20 mM Tris-HCl және құрамында 1 M NaCl. Дайындалған буферлерді N816 Laboport аппаратының көмегімен көлемі 0.45мм болып келетін Multipure фильтрін қолдану арқылы өткізілді. Хроматографиялық анализ жасауға 20 mM Tris/HCl буфері ерітіндісінде ерітілген сарысу белогы (10 мг/мл) қолданылды. Буферде ерітілген сарысу белогы 0.20 μm Minisart (Single use filter unit. Non-pyrogenic) фильтрінен өткізілді. Дайын үлгілер ÄKTA-FPLC аппаратында, HiTrap SP FF 1/5 катион алмасу колонналары арқылы жүйелі түрде сарысуды енгізу арқылы жүргізілді. Бір сынама 40 минут уақытпен аяқталды. Элюцияланған белоктар 280 нм-де анықталды. Әрбір пайда болған пик нүктелердегі фракциялар жеке – жеке пробиркаларға құйылды [140].

Сарысу белогын концентрлеу. Хроматографиядан бөлініп алынған фракциялардың (F1, F2, F3) концентрациясын шоғырландыру мақсатында

Centricon Plus-20 Centrifugal Filter Devices Millipore (Biomax 5K) фильтрі қолданылды. Себебі, құрамындағы буфердің мөлшерін азайтып, сарысу белогының мөлшерін жинақтау үшін жасалды. Жекелеген фракциядағы үлгі 4000 айналым × 10 минут центрифугаланды. Белгіленген уақыт аяқталғаннан кейін, фильтрден өткен сұйықтықты бір пробиркаға, фильтрден өтпеген сұйықтықты екінші пробиркаға жинақталды. Пробиркаға жинақталған сарысу белогы фракцияларын шоғырландырылғаннан кейін диализге (4°C) қалдырылды. Диализден кейін әрбір жеке фракциялар кептірілді (лиофильді кептіргіште). Лиофилді кептіру материалдың биологиялық және химиялық қасиеттерін сақтайды, себебі төмен температурада және вакуум жағдайында жүреді. Бұл әдіс биологиялық үлгілер, фармацевтика және тамақ өнімдері сияқты ыстыққа сезімтал және тез бұзылатын материалдарды кептіру үшін кеңінен қолданылады.

Beer-Lambert law заңына сәйкес ерітіндідегі белоктардың концентрациясы және осы белоктардың жарықты сіңіруі арасында сызықтық қарым-қатынас болады [141]. Ерітіндідегі белоктың жарықты сіңіруі оның ерітіндідегі концентрациясына тура пропорционал. Бұл келесі теңдеумен сипатталады:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c; \quad c = A / \varepsilon \cdot l \quad (1)$$

мұндағы,

A - үлгінің белгілі бір толқын ұзындығында сіңіретін жарық мөлшері;

ε - молярлық сіңірілу коэффициенті;

l – жарықтың оптикалық ұзындығы;

c – молярлық концентрация.

Бредфорд әдісі. Белоктарды анықтаудың кең тараған спектрофотометриялық әдісі. Бұл спектрофотометриялық әдіс бояғышпен белоктың байланысуына байланысты байқалатын көк 90 (Coomassie brilliant blue R-250) бояғыш қышқылының оптикалық тығыздығының абсорбциялық максимумының 470 нм-ден 595 нм-ге ығысуына негізделген. Бояғыш белоктың аргинин мен лизинінің қалдықтарымен белсенді түрде байланысады. Стандарт ретінде пайдаланылатын белок сыналатын белокпен бірдей болуы керек [142].

2.2.5 Лактоферриннің антиоксиданттық қасиетін анықтау

ЛФ-тің антиоксиданттық белсенділігі антиоксиданттық қасиетін анықтайтын бірнеше әдістерді қолдану арқылы анықталды.

1. *DPPH бос радикалдарын байланыстыру белсенділігі.* Лактоферриннің DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) бос радикалын байланыстыру белсенділігі Кирби және Шмидт (1997) әдісімен анықталды [143]. DPPH талдауы сутегі атомы донорының (немесе бір электрон) белсенділігін өлшейді, сондықтан бос радикалдарды байланыстыру үшін антиоксиданттық белсенділіктің көрсеткішін береді. DPPH – күлгін түсті тұрақты бос радикал; ол сары түсті дифенилпикрилгидразинге дейін тотықсызданады (сурет 7).

Жұмыс барысын қысқаша сипаттайтын болсақ, 0-3.0 мг/мл әртүрлі концентрациядағы Milli-Q суында дайындалған үлгілерден 20 мкл алып, оны 90 мкл этанолмен (99%) және 90 мкл этанолдағы DPPH-ның ерітіндісімен (0,04% салм/көлем) араластырылды. Гомогенизациядан кейін алынған қоспаны бөлме температурасында (25°C) қараңғы жерде 45 минут инкубацияланды. Бақылау ретінде аскорбин қышқылы қолданылды.



Сурет 7 – Антиоксидантпен тотықсызданғаннан кейін DPPH радикалының химиялық құрылымы мен түсінің өзгеруі

Абсорбция $\lambda = 517$ нм (A_{517}) толқын ұзындығында анықталды. DPPH бос радикалдарын байланыстыру белсенділігі төмендегі теңдеумен (2) есептелді.

$$\text{DPPH бос радикалдарын байланыстыру белсенділігі (\%)} = \left[\frac{A_{\text{бақылау}} - (A_{\text{үлгі}} - A_{\text{бос}})}{A_{\text{бақылау}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Мұндағы,

$A_{\text{бақылау}}$ – бақылау реакциясында (аскорбин қышқылы) белок үлгісі қосылмаған;

$A_{\text{бос сынама}}$ – белок үлгілері (DPPH ерітіндісі қосылмаған);

$A_{\text{үлгі}}$ – DPPH ерітіндісіндегі белок.

2. *ABTS⁺ радикалды бейтараптандыру белсенділігі.* Бос радикалдарды бейтараптандыру белсенділігі Sadat және т.б. (2011) пен Re және т.б. (1999) әдісі бойынша анықталды [144; 145]. ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) радикалы 7мМ ABTS⁺-ті 2,45мМ калий персульфатында (ди-калий пероксисульфаты) 15 сағат 22°C температурада қараңғы жерде еріту арқылы дайындалды. Содан кейін ABTS⁺ радикалы 5мМ натрий фосфатының буферінде (рН 7.4) қолданар алдында сұйылтылды. Сұйықтық сіңірімділігі 0.70 болу үшін 740 нм толқын ұзындығында тексерілді. Катион радикалы 22°C-та кем дегенде 1 сағат тұрақты болу керек. Содан кейін 300 мкл ABTS⁺ радикалды реагентінде ерітілді. Барлық талдаулар үш қайталамада жасалды. Антиоксидантты белсенділік пайызбен көрсетіліп, келесі теңдеуге сәйкес есептелді:

$$\text{Активтілік (\%)} = [1 - A_r - A_b] / (A_i - A_b) \times 100 \quad (3)$$

Мұнда A_i бастапқы $ABTS^+$ радикалының сіңіргіштігі, A_r қалған радикалдың сіңіргіштігі және A_b дайындаманың сіңірілуі (фосфат буфері: $A_b = 0.09$) болды.

Әрбір сарысу белогының концентрациясынан алынған көлбеу регрессиясының сызықтық мәндері Trolox® реактиві арқылы алынған мәнмен салыстырылды. Өлшенген TEAC мәнінің өлшем бірлігі μmol .

$$TEAC = \frac{a_s}{a_0} \quad (4)$$

Мұндағы:

a_s : графикке енгізілген әрбір лактоферрин концентрациясының антиоксиданттық белсенділігінен алынған көлбеу регрессиялық мәні және ЛФ концентрациясы (μM);

a_0 : графикке енгізілген Trolox реактиві арқылы алынған антиоксиданттық белсенділік нәтижесінен өлшенген көлбеу регрессиялық мәні және ЛФ концентрациясы (μM).

IC_{50} мәні 50% $ABTS^+$ радикалдарын байланыстыруға қажетті белок концентрациясымен анықталады, яғни тәжірибиелік ерітіндіде қалған радикалдың ($A_i - A_b$) сіңірілуі байланыстырылған радикалдар мәнімен тең болған кездегі шама $[(A_i - A_b) - (A_r - A_b)]$. Осылайша, $\log(IC_{50})$ мәні $\log[(A_i - A_b)/(A_i - A_r)]$ қисығындағы (графиктегі) x -интерсепт пен $\log$ [үлгі концентрациясы] мәндерінің қатынасын білдіреді.

3. *Темірді тотықсыздандыру қабілетін анықтау (FRAP)*. FRAP талдауы негізінен Fe^{3+} иондарын Fe^{2+} дейін антиоксиданттармен қалпына келтіруге негізделген. Лабораториялық жағдайда бөлініп алынған eLF және салыстыру мақсатында bLF (Sigma) зерттеуге алдынды. eLF және bLF темірді тотықсыздандыру қабілеті (FRAP) 0-ден 40 мкм-ге дейін ($=0,32$ мг/мл), сондай-ақ бақылау ретінде қолданылатын аскорбин қышқылы 0-ден 200 мкм-ге дейін ($=0,035$ мг/мл) аралығында Yen және Chen әдісі (1995) негізінде жүргізілді [146]. 200 мМ фосфат буферінде (рН 6,6) дайындалған 70 мкл үлгі 35 мкл 1% калий феррицианидінімен араластырылды, содан кейін 50°C температурада 20 минут инкубацияға қойылды. Инкубация уақыты аяқталғаннан кейін 135 мкл ультра таза су, 33 мкл 10% үшхлорсірке қышқылы (Sigma-Aldrich) және 27 мкл 0,1% темір хлоридін (Sigma-Aldrich) қосып, бөлме температурасында 10 минут инкубацияға қалдырдық. Соңында, 96 ұяшықты микропластиналы оқу құралын қолдана отырып, 700 нм (A_{700}) толқын ұзындығында өлшенді. FRAP сыйымдылықтары пайызбен (%) көрсетілді және келесі теңдеумен есептелді:

$$FRAP(\%) = 100 - \left[\frac{A_0 - A_{\text{үлгі}}}{A_0} \times 100 \right] \quad (5)$$

Мұндағы $A_0 (=0,8)$ тотықсыздандырғыш компоненті жоқ бір реакциялық ортада өлшенген 66 μM Пруссиялық көк бояу ерітіндінің жұтылуы және $A_{\text{үлгі}}$ – белок үлгілерінің сіңіруі.

Әрбір белок үлгісі үшін алынған қисықтың көлбеуі аскорбин қышқылы қисығының көлбеуімен салыстырылды және аскорбин қышқылының эквивалентті сыйымдылығының (AERC) индексі келесідей анықталды:

$$AERC = \frac{a_s}{a_0} \quad (6)$$

Мұндағы,
 a_s көмегімен: - үлгінің молярлық концентрациясына байланысты темірді тотықсыздандыру қисығының көлбеуі (%), ал a_0 -аскорбин қышқылы қисығының көлбеуі.

2.2.6 Лактоферриннің металл иондарын байланыстыру (хелаттаушы) қасиетін анықтау

1. *Темір (II) хелаттау қабілеті.* Лактоферрин темір иондарын хелаттау қабілеті Carter (1971) әдісіне сәйкес өзгерістер енгізу арқылы анықталды [147]. Дистельденген суда дайындалған белоктың 0,5-3,0 мг/мл аралығындағы әртүрлі концентрациясынан 500 мкл алып, оның үстіне 20 мкл темір хлоридінің (2 мМ FeCl₂) ерітіндісі қосылды. Бөлме температурасында (25°C) 5 минут араластырып, инкубацияға қалдырылды. Инкубация уақыты біткеннен кейін, 500 мкл феррозин ерітіндісін (1 мМ) қосып араластырып, 5 минут 25°C инкубацияға қойылды. Бақылау ретінде ЭДТА (этилендиаминтетрацет қышқылы) қолданылды. Барлық эксперименттер үш қайталамада жүргізілді. Феррозин-Fe²⁺ кешенінің түзілуін ингибирлеу дәрежесі микропланшеттерге арналған оқу құрылғысын (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, MA, USA) пайдалану арқылы 562 нм (A_{562}) толқын ұзындығын өлшегеннен кейін анықталды. Темір иондарын хелаттау белсенділігі келесі теңдеумен есептелді.

$$\text{Темір (II) байланыстыру белсенділігі (\%)} = \left[\frac{A_{\text{бақылау}} - (A_{\text{үлгі}} - A_{\text{бос бланк}})}{A_{\text{бақылау}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

Мұндағы, $A_{\text{бақылау}}$ - белок қосылмаған, $A_{\text{бос тәжірибе}}$ - бос тәжірибенің сіңіру қабілеті (феррозин қосылмаған), $A_{\text{үлгі}}$ - белок фракциясының сіңірілуі қабілеті.

2. *Мыс (II) хелаттау қабілеті.* Лактоферриннің мыс иондарын хелаттау қабілеті Peng және Liu т.б. (2010) сипаттаған әдісті қолдану арқылы зерттелді [148]. 200 мкл мыс (II) сульфаты (2мМ CuSO₄) 200 мкл пиридинмен (10%, көлем/көлем) және 20 мкл пирокатехол күлгінімен (0,1%, масса/көлем) біркелкі араластырылды. Гомогенизациядан кейін (2 мин, 25°C) әр түрлі 0,5-3,0 мг/мл концентрациядағы лактоферрин белогының ерітінділері қосылды және қоспа қараңғы жерде бөлме температурасында 2 минут инкубацияланды. Бақылау ретінде ЭДТА қолданылды және 96 ұяшықты микропланшетте оптикалық тығыздығы 632 нм (A_{632}) толқын ұзындығында өлшенді. Барлық тәжірибиелер үш қайталамада жүргізілді. Мыс (II) иондарын хелаттау белсенділігі келесі теңдеумен (8) анықталды.

$$\text{Мысты байланыстыру белсенділігі (\%)} = \left[\frac{A_{\text{бақылау}} - (A_{\text{үлгі}} - A_{\text{бос тәжірибе}})}{A_{\text{бақылау}}} \right] \times 100 \quad (8)$$

Мұндағы, $A_{\text{бақылау}}$ - реакциясының (үлгінің болмауы), $A_{\text{бос тәжірибе}}$ - бақылау дайындаманың (мыс сульфатынан басқа) және $A_{\text{үлгі}}$ - ерітінділердегі белоктың сіңіргіштік дәрежесінің мәнін білдіреді.

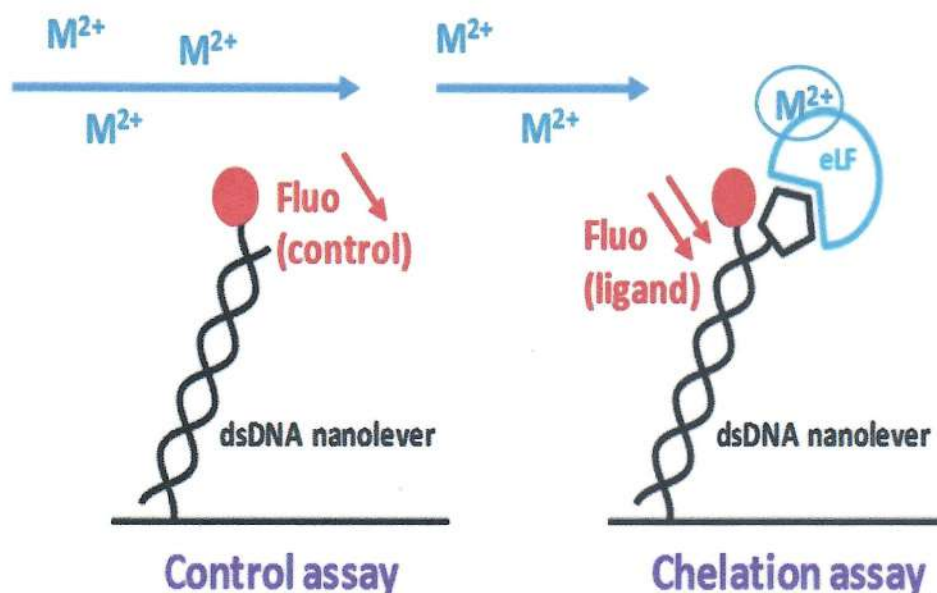
3. *Нақты уақыттағы switchSENSE талдауымен металл иондарын байланыстыруды анықтау (Real-time switchSENSE analysis).* Бие сүті лактоферрин белогына (eLF) металдарды (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} және Zn^{2+}) байланыстыру тәжірибиесі switchSENSE® DRX биосенсорлық анализатор (Dynamic Biosensors GmbH, Planegg, Германия) қосқышына енгізілген MPC-48-2-R1-S биочип көмегімен жүргізілді. SwitchSENSE технологиясының принциптерін Langer *et al.* және оның әріптестері жақсы түсіндірген (2013) [149].

Биочип төрт тәуелсіз каналдан тұрады, әрбір каналда алты электрод орналасқан. Лиганд (лактоферрин белогы) 48-нж ssDNA-мен ковалентті байланысады (комплементарлы нанолевер немесе cNL деп аталады), содан кейін осы 48-нж ssDNA басқа электродтардың алтын бетіне жабыстырылған ssDNA-мен будандастырылған. Осы екінші ssDNA-ның бос ұшында флуоресцентті зонд орналасқан (максималды эмиссиясы 670 нм және Cy5 бояуымен қанықтырылған). Флуоресцентті жақындық (FPS) – көлемге тәуелсіз. Ол аналиттердің (мысалы металл иондары) байланысы орын алатын молекулалық ортадағы кинетикалық өзгерістерді өлшейді.

Биосенсорлық өлшемдерді алмастан бұрын, лактоферрин лиганды cNL-ге (комплементарлы нанолевер) ковалентті байланыстырылады. Осы ковалентті байланыс Dynamic Biosensors компаниясы ұсынылған 48-мер-ге арналған амин тобын байланыстырушы аппаратта компанияның хаттамасына сәйкес жүзеге асырылды. Ультратазасуда ерітілген 100 мг лактоферрин белогы (жойылу коэффициенті 280 нм $81,425 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ұзындықта; UniProtKB/Швейцария прот. Нөмірі: F6XLB1) алдын-ала кросс линкерде активтендірілген cNL-мен араластырылады, содан кейін 22°C температурада кемінде 1 сағатқа инкубацияға қойдық.

Белок-cNL кешені автоматтандырылған proFIRE® (Динамикалық биосенсорлар) анализаторындағы ион-алмастырушы хроматография көмегімен тазартылады. Осы процесс фосфат-буферлі тұзды буферде pH 7.2 теңестірілген. 0,1-1 М NaCl сызықтық градиенті 1 мл.мин⁻¹ ағынының жылдамдығында қолданылды және CNL-eLF конъюгатын анықтау 260 нм-де тіркелді. CNL-eLF конъюгатына сәйкес келетін фракция центрифуга көмегімен бөлініп алынды. Лактоферрин құрамындағы темір иондарынан тазарту үшін центрифугадан алынған фракциялар 10 mM EDTA-да 10 минут аралығында бөлме температурасында өңделді. Ары қарай CNL-eLF конъюгаты сүзу/центрифугалау арқылы құрамында 40 mM NaCl және 0.05% Tween 20 бар 10 mM Tris-HCl буферде (pH 7.4) шоғырландырылды. Соңғы концентрациясы шоғырланған өнімнің көлемі 50 мл болды.

proFIRE® бағдарламалық жасақтамасында концентрациясы, мөлшері және тазалық деңгейі анықталды. Биосенсорлық анализдерге дейін, CNL-eLF конъюгаты Tris-HCl буферінде 200 нмЛ дейін сұйылтылды, оның 25 мЛ жоғарыда сипатталған чиптегі электродты каналдардың біріне құйылды. FPS өлшеу үшін әрбір металл иондарының ерітіндісі 100 мкЛ Tris-HCl буферінде сұйылтылды. Дайын ерітінділерден $50 \mu\text{L min}^{-1}$ ағыстық жылдамдықпен 2 минутқа (ассоциялық кинетика) енгізілді. Нақты уақыттағы өлшеулер 25°C температурада алынды. Таза металл иондары жоқ буфер жасалып, сигналды қалыпқа келтіру үшін қолданылды. Бақылау лактоферрин белогын қоспай жүргізілді, ал тәжірибелік үлгілерде әр металл лактоферрин белогымен зерттелді (сурет 8).



Сурет 8 – Real-time switchSENSE биосенсорлық анализаторында ДНҚ нанолеверге (лиганд) орнықтырылған бие сүті лактоферрині және әртүрлі металл иондары (аналиттер M^{2+}) арасындағы молекулалық өзара әрекеттесуді талдау. Бақылау лигандсыз (белоксыз) жүргізілді

Ассоциация және диссоциация кинетикасының тұрақтылығы ($k_{\text{асс}}$ және $k_{\text{дисс}}$), диссоциацияның тұрақтығы КД ($k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$) және қателік мәндері нақты уақыт аралығында FPS режимінде бақыланды. Барлық қисық сызықтар динамикалық биосенсор ұсынатын switchANALYSIS® бағдарламалық жасақтамасымен талданды. Нәтижелердегі қателік басқа зерттеу қателіктеріне сәйкес келеді. Тәжірибиелер екі рет қайталама жасалды.

4. *Изотермиялық титрлеу калориметрия әдісі* (ИТК). Изотермиялық титрлеу калориметриясы (ИТК) - ерітіндідегі өзара әрекеттесудің термодинамикалық параметрлерін анықтау үшін қолданылатын физикалық әдіс. Лактоферрин белогының тұрақтылығын өлшеуге арналған изотермиялық титрлеу калориметриялық талдауы (MicroCalITC200, Microcal Inc.) ASA платформасында жүргізілді. Барлық үлгі 5 мМ Tris буферінде ерітілген, рН 6,8. Үлгілерге арналған камера ЛФ-пен инъекторы бар шприцпен және

араластырғыш металл ерітіндісімен (Ca, Fe, Cu, Zn) толтырылды. Бірінен соң бірі енгізілген инъекциялар арасындағы уақыт аралығы 180 сек. құрады. Титрлеу ұяшығына металл ерітіндісінің 2 мкл бөліктері (алғашқы 10 инъекцияны қоспағанда, олар 1 мкл болды) кезекпен енгізіліп, жылу ағыны өлшенді. Металдарды ЛФ-тың ерітіндісіне қосу арқылы өлшенетін жылудың өзгеруі металл мен белоктың өзара әрекеттесу кинетикасын алуға мүмкіндік берді [150].

Шығарылған/сіңірілген жылуды дәл өлшеу мәндері байланыстырушы тұрақтылықты (K_a), энтальпияны (ΔH), энтропияны (ΔS) және реакция стехиометриясын (n) ерітіндідегі екі немесе одан да көп молекулалардың өзара әрекеттесуін анықтау үшін қолданылды, осылайша молекулалық байланыстың толық термодинамикалық параметрін алуда осы әдісті қолдануға болады. Осы бастапқы алынған өлшемдерден Гиббстің бос энергиясы (ΔG) және энтропия өзгертулер (ΔS) қатынасын қолдану арқылы төмендегі теңдеумен анықталды:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

Мұндағы, R - газ тұрақтысы; T - абсолюттік температура.

Байланыстырушы жақындығын өлшеу үшін термограмманың қисығы сигмоидты болуы керек. Қисық профилі c мәнімен анықталады, ол төмендегі теңдеудің көмегімен есептеледі.

$$c = n * K_a * M \quad (10)$$

Мұндағы, n – байланыстың стехиометриясы; K_a – ассоциация константасы; M – молекуланың концентрациясы.

2.2.7 Лактоферринді ферментативті гидролиздеу

Пептидтерді алу үшін лактоферринді трипсин ферменті көмегімен (ірі қара, T1426, SigmaAldrich) гидролиз жасалды. Белок гидролизі 37°C температурада инкубатор-шейкерде фермент-субстрат (белок) 1:100 қатынасында 7 сағатқа дейін үздіксіз араластырумен жүргізілді. Үлгілер (2 мл) әр 30 минут сайын алынып, ферменттің белсенділігін тоқтату үшін 15 минут 95°C температурада қыздырылды, -20°C температурада сақталды және уақыт бойынша гидролиз үлгісін бақылау үшін электрофорез арқылы талданды. Пептидтерді келесі тәжірибиелерге қолдану үшін -20°C температурада сақталды. Гидролиз нәтижесінде алынған пептидтердің молекулалық массасын 15% SDS-PAGE гель электрофорезбен анықталды [151].

2.2.8 Лактоферрин және оның пептидтерінің антимикробтық қасиетін анықтау

Лактоферрин белогының антимикробтық белсенділігі агарға дискілік диффузия әдісімен жүргізілді. *Escherichia coli* (ATCC 8799) және

Staphylococcus aureus штамдары әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің микробиология зертханасынан алынды.

Стерильді Петри табақшаларына ет пептонды агарлы қоректік ортасы қалыңдығы 4 мм болатындай етіп құйылды. Содан кейін, микроорганизм дақылының суспензиясы дайындалды. Бұл жағдайда қатты қоректік ортада өсірілген таза тәуліктік дақыл пайдаланылды. Ілмектің ұшымен микроорганизм колонияларынан алынған материалдың аз мөлшері стерильді тұз ерітіндісі бар пробиркаға $2,3 \times 10^5$ КТБ/мл сәйкес алынды. Қоректік ортасы бар Петри табақшасының бетіне 2 мл көлемінде құйып, ақырын біртекті жаю арқылы бетіне біркелкі таралды. Микроорганизм дақылы біркелкі таралғаннан кейін қоректік ортаға стерильді жағдайда диаметрі 12 мм дөңгелек дискілермен тесіп, орналастырылды. Стерильді дөңгелек дискілерге лактоферриннің әр түрлі концентрация ерітіндісінің 100 мкл құйылды. Лактоферринсіз өсірілген қоректік орта бақылау ретінде қолданылды. Петри табақшалары термостатқа салынып, 24-36 сағат бойы 37°C температурада инкубацияланды. Инкубация уақыты біткеннен кейін *E.coli* өсуінің тежелу аймағы өлшенді [152-153].

2.2.9 MS талдау әдісі

Масс-спектрлік талдау DionexUltiMate3000 нано-HPLC хроматографиялық бөлу жүйесі бар ImpactII квадрупольді MS (Брукер) құрылғысында жасалды [154].

SDS-PAGE электрофорезінен кейін Coomassie-мен боялған гельдерден зерттелетін белок жолақтары кесіліп алынды және 0,5 мл пластик түтіктерге орналастырылды. Бояғыш және SDS-тен тазарту үшін 50 mM NH_4HCO_3 құрамындағы 300 мкл 50% ацетонитрил қосып, гельді тұрақты шайқау арқылы 25°C температурада 10 минут жуылды. Сұйықтық алынып, құрамындағы суынан тазарту үшін үлгіге 300 мкл 100% ацетонитрил қосылды. 25°C температурада 10 минут инкубациядан кейін ацетонитрил алынып, 300 мкл 50 mM аммоний бикарбонаты қосылды және 10 минут 25°C температурада жуылды. Әрі қарай, гель бөлігі үш рет 50% ацетонитрилмен және екі рет 100% ацетонитрилмен жуылды. Сұйықтық алынып, гель төмендетілген қысымда кептірілді және SpeedVac құрылғысында 10 минут қыздырылды. Содан кейін 7 мкл трипсин ерітіндісі (20 мкг/мл 50 mM NH_4HCO_3) қосылды және бөлме температурасында 10 минут инкубацияға қойылды, 25 мкл 50 mM NH_4HCO_3 қосып, 37°C-та белок протеолизі гелде 15 сағат жүргізілді. Ерітінді төмендетілген қысымда кептірілді және толық кебу үшін SpeedVac құрылғысында 30 минут қыздырылды. Алынған пептидтерді экстракциялау үшін 20 мкл 0,05% құмырсқа қышқылының 3% ацетонитрилдегі ерітіндісін қосып, пробирканы бөлме температурасында 15 минут инкубацияға қою арқылы жүзеге асырылды. Қоспаны 20 000 айн/мин және бөлме температурасында 5 минут центрифугаға қойылды. Нәтижесінде белоктардан алынған пептидтік «гель жолақтары» масс-спектрометрге арналған пробиркаларға ауыстырылды. Алынған пептидтердің қоспасы MALDI-TOF

масс-спектрометрия әдісі арқылы талданды. Әрі қарай, SwissProt дерекқорында (UniProtKB) BLAST2 бағдарламасы (<http://cn.expasy.org/tools>) арқылы зерттелген белоктарға гомологтық белоктар іздестірілді.

Масс-спектрометрия әдісімен (MALDI Biotyper жүйесімен жабдықталған Microflex LT (Bruker) масс-спектрометрі) белоктардың аминқышқылдарының тізбегін анықтау әдісі сипатталған. Әдіс белоктың ферментативті және/немесе химиялық ыдырауы белок пептидтерінің жиынтығын қамтиды, содан кейін жоғары тиімді сұйық хроматография арқылы фракцияланды. Құрамында 10-15 пептидті құрайтын әрбір фракция анализатордағы қайталама иондармен/соқтығысумен белсендірілген диссоциациямен сұйық масс-спектрометрия комбинациясы арқылы қосымша тазартусыз тікелей талданады. Соқтығысумен белсендірілген диссоциацияның масс-спектрлерінің интерпретациясы сипатталған және трипсинмен өңдеу нәтижесінде алынған еритін пептидтерді зерттеу нәтижелері келтірілген.

2.2.10 Белокты және пептидтерді сипаттауда қолданылған деректер базасы

Белоктар мен пептидтер туралы ақпаратты сақтау және қамтамасыз ету үшін пайдаланылатын көптеген деректер базасы бар [155]. Деректер базасын белоктар мен пептидтерді идентификациялау үшін пайдалану қысқа уақыт ішінде күрделі қоспалардың массалық спектрлерін ашуға мүмкіндік береді. Қазіргі уақытта белгілі белоктар мен пептидтердің аминқышқылдарының реттілігі жалпыға қолжетімді деректер базасына біріктірілген. Олардың әрқайсысында деректерді сақтаудың өзіндік форматы, артықшылығы, сәйкес немесе ұқсас деректер базалары бар. Биоинформатика саласындағы жиі қолданылатын деректер базасының кейбіреулеріне тоқталайық:

Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығы (NCBI): NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [156] әртүрлі құралдар мен дерекқорларды қамтамасыз етеді.

Белок және пептидтің молекулалық салмағы мен изоэлектрлік нүктесінің есептелген мәндері ExPASy ProtParam бағдарламасы (<https://web.expasy.org/protparam/>) [157] көмегімен анықталды.

Лактоферрин белогын трипсин ферментімен өңдегеннен кейін MS талдау нәтижесінде алынған барлық пептидтердің биобелсенділігі PeptideRanker бағдарламасы көмегімен сипатталды (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) [158].

Алынған пептидтердің суда ерігіштігі де сипатталды. Пептидтердің ерігіштігі <https://perpcalc.com/peptide-solubility-calculator.php> [159] сайтында қол жетімді пептидтік қасиеттер калькуляторы арқылы болжалды. Суда еритін белсенді пептидтердің реттілігі анықталды.

Жоғарыда келтірілген деректер базасы белоктар мен пептидтердің әртүрлі аспектілерін зерттеуге және талдауға мүмкіндік береді.

2.2.11 Статистикалық өңдеу әдістері

Зерттеу жұмысындағы барлық тәжірибиелер минимум 3 қайталау арқылы жүргізілді. Алынған нәтижелер *Microsoft Excell* программасы арқылы өңделіп, орташа мәндер және стандартты қателіктер ($\pm$) түрінде көрсетілді. Сонымен қатар, деректерді талдау RStudio бағдарламалық құралының көмегімен орындалды (2022.07.2+576 «Spotted Wakerobin» нұсқасы, RStudio PBC, 2022). ANOVA-да сыналатын факторлардың айтарлықтай әсерін көрсеткен кезде құралдарды жұптық салыстыру үшін Tukey HSD сынақтары орындалды. Содан кейін өңдеулер әріп бойынша кему ретімен жіктеліп, диаграммалар/графиктертер түрінде көрсетілді. Маңыздылық $p < 0,05$ деңгейінде жарияланды.

Пирсон корреляциясы және негізгі компоненттерді (құрамдас) талдауы (PCA) RStudio бағдарламалық құралының (2023.06.0 нұсқасы, 421 құрастыру, RStudio PBC, 2023) көмегімен орындалды.

3 АЛЫНҒАН НӘТИЖЕЛЕР ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштері және сарысу белоктарын бөліп алу

Бие сүті – ақ немесе аздап көгілдір түсті, өзіне тән тәттілеу дәмі мен иісі бар, сіңімділігі жоғары табиғи өнім. Бие сүті биохимиялық құрамы бойынша ана сүтіне жақын.

Физика-химиялық көрсеткіштері бойынша бие сүті басқа үй жануарлары түрлерінің сүтінен аздап ерекшеленуі мүмкін. Бие сүті мен сиыр сүті үлгілерінің физика-химиялық қасиеттері салыстырмалы зерттелді. Сүттің бастапқы температурасы 22-23°C болды. Бие сүтінің физика-химиялық көрсеткіштерін сипаттауда: белсенді активті қышқылдығы (pH), жалпы (титрленетін) қышқылдылығы, тығыздық және жалпы белок, майлылығы, майсызданған құрғақ сүт қалдығы, лактоза, витамин С анықталды. Физика-химиялық қасиеттерінің өзгерісі бойынша сүттің сапасын сипаттауға болады. Екінші кестеде сүттің физикалық көрсеткіштері келтірілді.

Сүттің белсенді активті қышқылдығы (pH) – сүттің балғындығын, одан әрі өңдеуге және пастерлеуге жарамдылығын сипаттайтын сүт сапасының маңызды көрсеткіштерінің бірі. Зерттеуге алынған бие сүті үлгілерінде pH 6,6, ал сиыр сүтінде pH 6,4 мәнге тең болды (кесте 2). Сүттің құрамында белоктық заттардың, органикалық және органикалық емес қышқылдар, минералды тұздар сүттің жалпы қышқылдығын ($^{\circ}\text{T}$) көрсетеді. Зерттеуге алынған бие сүтінің титрлік қышқылдылығы $7,3^{\circ}\text{T} \pm 0,02$ құрады, сиыр сүті үлгісінде $18,5^{\circ}\text{T} \pm 0,01$ мәнге тең болды. Алынған нәтижелер сүттің балғындығын сипаттады.

Кесте 2 – Бие және сиыр сүт үлгілерінің физикалық көрсеткіштері ($n=5$, $p<0,05$)

Үлгілер	pH	Температура, $^{\circ}\text{C}$	Тығыздығы, $\text{кг}/\text{м}^3$	Қышқылдық, $^{\circ}\text{T}$
Бие сүті	$6,6 \pm 0,03$	$22 \pm 0,01$	$1031,88 \pm 0,03$	$7,3 \pm 0,02$
Сиыр сүті	$6,4 \pm 0,01$	$23 \pm 0,02$	$1026,23 \pm 0,02$	$18,5 \pm 0,03$

Сүт анализаторы (Лактан 1-4 М) көмегімен сүттің тығыздығы, майлылығы, майсызданған құрғақ сүт қалдығы анықталды. Сүт үлгілері тығыздығының орташа пайыздық көрсеткіштері анықталды. Бие сүті үлгілерінде тығыздық көрсеткіші $1031,88 \text{ кг}/\text{м}^3$ болса, сиыр сүтінде $1026,23 \text{ кг}/\text{м}^3$ мәнді көрсетті. Сүт майының мөлшері жоғары болғанда тығыздығы төмендейді, керісінше сүт майының мөлшері төмен болғанда тығыздық жоғарылайды. Сондықтан бие сүтінің майлылығы төмен болуына байланысты, тығыздығы сиыр сүтімен салыстырғанда жоғары болатындығы анықталды. Сүттің тығыздығы жануар түріне, жем-шөппен азықтануына, сүттің химиялық құрамына, майсыздандырылған құрғақ сүт қалдығы мен майдың үлесіне байланысты өзгереді.

Зерттеу үлгілерінің физикалық көрсеткіштерімен қатар, биохимиялық параметрлері де сипатталды (кесте 3). Сүт құрамындағы май, белок, майсызданған құрғақ сүт қалдығы, витамин С анықталды. Сүттегі минералды тұздар мен витаминдер сүттің құрғақ затын құрап, оның бағалы биологиялық және тағамдық құндылығын айқындайтындығы әдебиет көздерінен белгілі. Бие сүтінде майсызданған құрғақ заттың пайыздық көрсеткіші $8,76\% \pm 0,04$ болса, сиыр сүтінде $7,96 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) мөлшерде болатындығы анықталды. Бие сүтінде майсызданған құрғақ заттың мөлшері сиыр сүтімен салыстырғанда жоғары болуы минералды тұздар мен витаминдерге бай болып келуіне байланысты болуы мүмкін.

Кесте 3 – Бие және сиыр сүт үлгілерінің биохимиялық көрсеткіштері ($n=5$, $p < 0,05$)

Үлгілер	Майсызданған құрғақ сүт қалдығы (%)	Майлылығы (%)	Лактоза (%)	Белок (%)
Бие сүті	$8,76\% \pm 0,04$	$1,42 \pm 0,02$	$6,67 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,01$
Сиыр сүті	$7,96 \pm 0,03$	$4,45 \pm 0,01$	$4,6 \pm 0,03$	$3,5 \pm 0,02$

Бие сүті құрамындағы сүт майлылығының көрсеткіші $1,42\%$ болса, сиыр сүтінде $4,45\%$ ($p < 0,05$) болды. Алынған нәтижелер бойынша, бие сүтінің липидтік құрамы сиыр сүтімен салыстырғанда 2,5-3 есеге төмен болуы, бие сүтінің төмен калориялы, сіңімділігі жоғары болатындығын сипаттайды. Бие сүтінің май түйіршіктері көлемі ұсақ, тез эмульгацияланады, гидролизденіп, асқазан-ішек жолдары арқылы қанға оңай сіңеді.

Бие сүтінде лактозаның көрсеткіші $6,67 \pm 0,02$, сиыр сүтінде $4,6 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) мөлшерін құрады. Бие сүті үлгілерінде лактоза мөлшері сиыр сүті үлгілерімен салыстырғанда жоғары болды. Сәйкесінше, лактоза мөлшерінің жоғары болуы бие сүтіне тәттілеу дәм береді, сондай-ақ, спирттік және сүтқышқылды ашу процесінде ашытқы микроорганизмдері үшін негізгі энергия көзі болып табылады. Лактоза көрсеткіші бойынша бие сүті басқа ауыл шаруашылығы жануарларының сүтінен айтарлықтай ерекшеленеді. Бие сүтінің сүт қанты жоғары белсенді бифидогендік фактор болуына байланысты тағам өнімдерінде қолданылады.

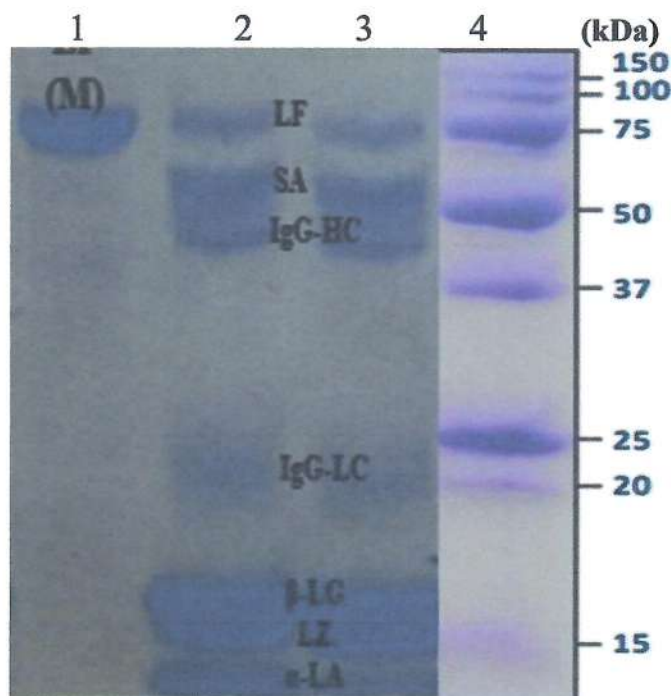
Витаминдер тобынан бие сүті және сиыр сүті үлгідерінде аскорбин қышқылы (витамин С) анықталды. Витамин С организмдегі тотығу-тотықсыздану, көмірсу алмасуында, коллагендердің түзілуінде маңызды қызмет атқарады. Бие сүтін тұрақты тұтынған жағдайда адам иммунитеті жақсаратыны белгілі. Витамин С концентрациясы бие сүтінде $90,5$ мг/мл, сиыр сүтінде $18,43$ мг/мл ($p < 0,05$) болды. Бие сүтінде витамин С мөлшері сиыр сүті үлгілерімен салыстырғанда төрт-бес есе жоғары болды. Аскорбин қышқылы адам организмінде синтезделмейтіндіктен күнделікті жануартекті өнімдерден, соның ішінде сүт және сүт өнімдерін тұтыну арқылы толықтырылады.

Сүттегі маңызды компоненттердің бірі белок. Бие сүті құрамында белок көрсеткіші $2,4 \pm 0,01$. Бие сүтінде казеиннің мөлшері сәйкесінше $1,37\%$ - $1,25\%$ -

ды ($p<0,05$), ал сиыр сүтінде 2,5-2,8%-ды ($p<0,05$) құрады. Зерттеу жұмысының келесі міндеттеріне бие сүті казеин белоктары қарастырылмағандықтан тоңазытқышқа (-20°C) қалдырылды. Сарысу белоктары келесі зерттеу жұмыстарына қолданылды. Сүттің белоктық құрамы оның тағамдық құндылығы мен тағам өнеркәсібінде қолданылуын қарастырғанда маңызды фактор болып табылады.

Сүттің физика-химиялық, биохимиялық көрсеткіштері жануардың жем-шөптік, азықтық қоректену жағдайына, климаты мен жануарлардың жеке физиологиялық даму ерекшеліктеріне байланысты өзгеруі мүмкін. Сүттің физика-химиялық параметрлерін қадағалау тағам өнеркәсібінде бие сүтін өндіру және пайдалану үшін маңызды.

Бие сүтінің сарысу белоктарын жіктеу. Бие сүті қышқылды тұндыру арқылы казеин белоктарынан тазартылғаннан кейін сарысу құрамындағы белоктарды анықтау үшін SDS-PAGE әдісі қолданылды. Сарысу белоктарының қозғалмалы фракциялары 9-суретте көрсетілген. Электрофорез нәтижесінде геледегі белоктардың жолақтарын молекулалық массасы стандартты маркермен сәйкестендіргенде, сарысу белоктары келесідей жіктелді: β -лактоглобулин~18 кДа, α -лактальбумин~14 кДа, сарысу альбумині~69 кДа, иммуноглобулиндер IgG-НС~50-53 кДа, IgG-LC ~20-25 кДа, лизоцим~15 кДа, лактоферрин 75-80 кДа молекулалық массасы болатыны анықталды.



Сурет 9 – Бие сүті сарысу белоктарының фракциялары
(Ескерту: 1-адамның ЛФ; 2-3 бие сүтінің сарысуы; 4-стандартты маркер)

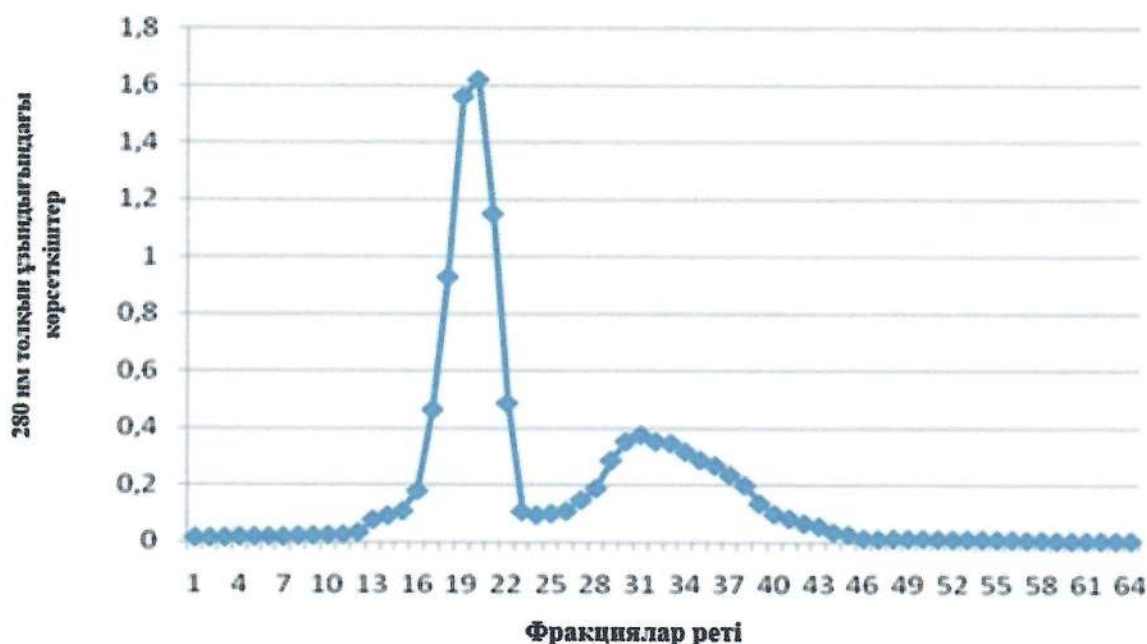
Алынған нәтижелер Мати (Mati) және т.б. ғалымдардың ұсынған деректерге сәйкес келеді [69], бұл биенің α -лактальбуминінің молекулалық салмағы 14,4 кДа және қан сарысуындағы альбуминнің молекулалық салмағы

сәйкесінше 69 кДа болатынын көрсетті. Электрофорез әдісінен кейін бие сүтінің сарысу белоктары келесі тәжірибиелерге қолданылды.

Бие сүті сарысу белоктары бойынша алынған электрофорез нәтижелері зерттеу жұмысының сарысудан белоктарды тазартып бөліп алу және олардың пептидтерінің қасиеттерін әрі қарай бағалау үшін құнды материал болып табылады. Дегенмен, географиялық орны маңызды рөл атқаруына байланысты, Қазақстандық бие сүті белоктарының қасиеттері толық зерттелмегендіктен ерекше қызығушылық тудырады. Сондықтан бұл бағыттағы зерттеулер халықаралық ғылыми қауымдастықтың қызығушылығын тудырып, бұл жұмыстың маңыздылығын арттырады. Ағымдағы зерттеудің нәтижелері Қазақстан аумағында мекендейтін бие сүті белоктары мен пептидтерін одан әрі зерттеуге негіз болады.

3.2 Бие сүті сарысу белоктарынан лактоферринді бөліп алу

Белокты бөліп алу және тазарту белок өндірісіндегі биохимиялық зерттеулерде маңызды қадам болып табылады. Белоктарды бөліп алу бұл күрделі органикалық қоспадан оқшаулау және бөгде заттардан тазарту үшін бірқатар процестерді қамтиды. Қазіргі уақытта белоктарды жоғары деңгейде таза түрінде бөліп алудың қарапайым, арзан және масштабты әдістерін әзір-

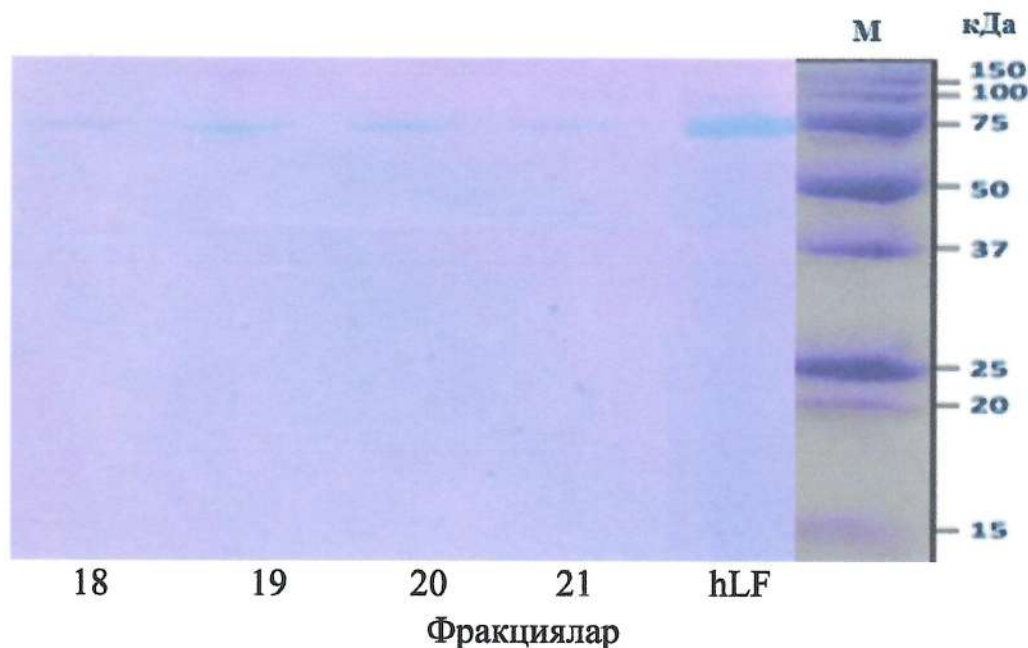


Сурет 10 – Гель-филтрация әдісімен сарысу белоктарынан лактоферринді бөліп алу

леуге назар аударылуда. Белокты тазартудың арзан әдістері биоэкономикада маңызды, себебі белоктарды, ферменттерді төмен бағада сату үшін қарқынды түрде өндіру жоғары сұранысқа ие. Сарысу белоктарын бөліп алуда гельді сүзу хроматографиясы кеңінен қолданылады. Сефадекс бағаналы гель-филтрация хроматографиясы сарысу белоктарын бөліп алу мен тазартуда тиімді.

Зерттеу жұмысында, бағаналы гель-филтрация (Sephadex G-100) әдісі көмегімен лактоферрин белогын бөліп алу үшін бие сүтінің сарысу белоктары гельден екі рет өткізілді. Сарысу белоктарын гельден өткізу нәтижелері бойынша екі пик (шын) нүктесі анықталды (10-сурет). Сарысу белоктарын гельден өткізу барысында молекулалық салмағы жоғары белок кешені басқа белоктармен салыстырғанда бағанадан жылдам элюцияланды. Оныншы суретте көрсетілгендей, бірінші пик нүктесі 17-22 аралығындағы фракцияларды көрсетсе, екінші пик нүктесі 28-40 аралығындағы фракцияларды құрады. Осы пик нүктелердің фракцияларындағы белокты 12 % SDS-PAGE әдісі қолдану арқылы анықталды (сурет 11).

Үлгілерді SDS-PAGE геліне енгізерден алдын, сынамалар буфермен денатурацияланды. Зарядтың, молекулалық массаның айырмашылығына байланысты белоктар SDS-PAGE гелінде әртүрлі қозғалу қабілетіне ие. SDS-PAGE әдісінен алынған нәтижеге сәйкес, стандартты маркермен және hLF (Sigma) сәйкестендендіріп қарағанда 18-21 фракциядан алынған белок ерітіндісі лактоферрин белогын көрсетті.



Сурет 11 – 12% SDS-PAGE әдісінде Сефадекс G-100 бағаналы гель-филтрациядан өткізілген сарысу белоктарының 18-21 фракциялары

Бөліп алынған лактоферрин белогының таңдалған фракциялардағы (17-22) концентрациясы Бир-Ламберт (Beer- Lambert) теңдеуін қолдану арқылы анықталды.

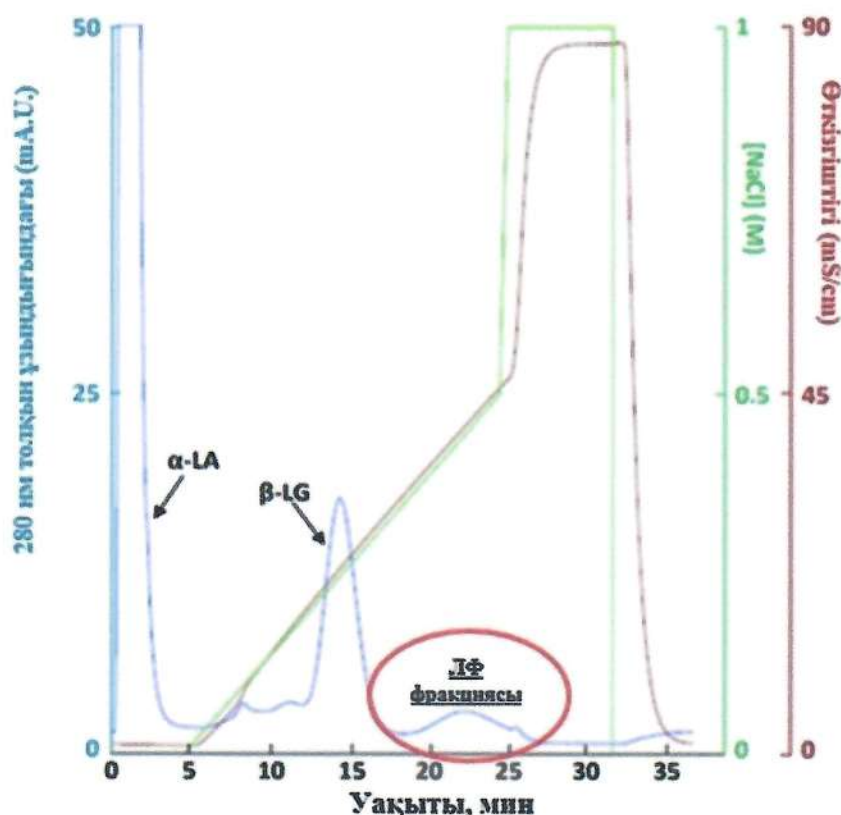
Белок концентрациясы шамамен:

- 17 - фракцияда: 5,7 μM ;
- 18 - фракцияда: 11,5 μM ;
- 19 - фракцияда: 19 μM ;
- 20 - фракцияда: 20 μM ;
- 21 - фракцияда: 14 μM ;
- 22 - фракцияда: 6 μM

Лактоферрин белогының концентрациясы Beer-Lambert теңдеуі негізінде бірінші пик нүктедегі 17 фракциядан бастап жоғарылап, 21 фракциядан кейін төмендеді. Осыған байланысты, 18-21 фракцияларда ЛФ-тың концентрациясы жоғары мөлшерде бөлінді. Осы ретпен, гель-филтрация әдісі көмегімен ЛФ-ты бөліп алу бірнеше қайталама жасалып жүргізілді, бірінші пик нүктесіндегі фракциялар жинақталды.

Лактоферринді тазартуда гель-филтрация әдісімен қатар FPLC хроматография әдісі қолданылды. Белоктардың қасиеттерін зерттеу үшін құрылымдық жағынан ұқсас белоктарды белок сұйықтығынан бөліп алу қажет. Бөліп алу және тазарту тәжірибиелік зерттеулердің негізгі және алғашқы қадамдарының бірі болуына байланысты, белоктардың молекулалық массасына, заряд пен полярлық сипаттамаларына негізделді. Ион алмасу хроматографиясы белоктарды бөліп алудың тиімді әдісі ретінде қарастырылды. Осы зерттеуде катион - алмасу хроматографиясы ÄKTA-FPLC технологиясы көмегімен бие сүтінің сарысуынан лактоферрин белогын бөліп алу және тазарту әдісі сипатталды.

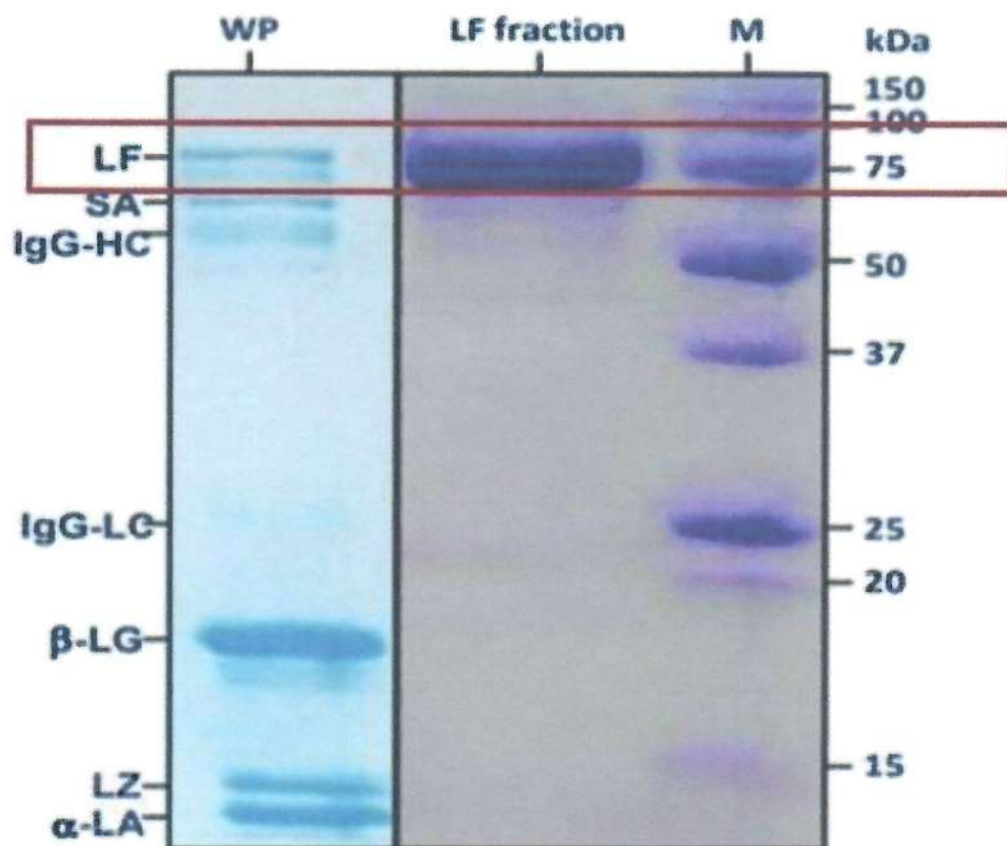
FPLC хроматографиясында HiTrap SP FF 1/5 катион алмасу бағандарында сарысу белоктарының үш пик (шыңы) нүктелері (F1, F2, F3) анықталды. ÄKTA-FPLC хроматографиясының нәтижелері 12-суретте көрсетілген.



Сурет 12 – ÄKTA-FPLC технологиясында HiTrap SP FF 1/5 бағанасын қолдану арқылы лактоферринді тазарту

Хроматографиядан кейінгі фракциялар құрамындағы белоктарды анықтауда SDS-PAGE әдісі қолданылды. SDS-PAGE әдісі гелі нәтижелерінде

бөлінген фракциялардың молекулалық массасы стандартты маркер көмегімен сипатталды (сурет 13). Суретте көрсетілгендей, бірінші пик – α -лактальбумин, екінші пик – β -лактоглобулин, үшінші пик – лактоферрин белогы анықталды. Лактоферрин мен лизоцим (изоэлектрлік нүкте: 8.32) 14-15 минут ұстау уақытында элюцияланды және 20-25 минутта жоғары тазалықпен бөлінді.



Сурет 13 – ÄKТА-FPLC технологиясымен алынған фракция құрамындағы лактоферринді SDS-PAGE әдісімен идентификациялау

Катион алмасу бағанынан бөлінгеннен кейін SDS-PAGE нәтижелері бойынша үшінші пик (F3) лактоферрин белогын көрсетті. Алынған нәтижелер *El Hatmi* (2014) және басқалар нәтижелеріне ұқсас, жақын мәндерге ие болды [140]. Осы ретпен, бие сүті сарысу белоктарынан жоғары мөлшерде лактоферринді бөліп алу үшін тәжірибие бірнеше қайталама жасалды. Әрбір қайталамадан үшінші пик нүктесіндегі фракциялар жинақталды. Жинақталған фракцияны келесі тәжірибиелерге қолданылды.

Белоктың концентрациясын есептеуде Бир-Ламберт заңы теңдеуі қолданылды. Үшінші пик нүктеден жинақталған фракцияларды ЛФ-тың концентрациясы 0,95 мкг/мл. Пьезка және т.б. (2016 жылғы) мәліметтері бойынша [26] бие сүтіндегі лактоферрин мөлшері 0,2 ден 2 г/кг-ға дейін, бұл адам сүтіне (7 г/кг) қарағанда 3,5 есе төмен, бірақ сиыр сүтімен салыстырғанда 10 есеге жуық жоғары. Сүттегі ЛФ концентрациясы жануарлардың түріне, жинақталған жыл мезгіліне, уақытқа байланысты өзгеруі мүмкін.

3.3 Лактоферрин белогының аминқышқылдық тізбегі мен құрамы

Зерттеу жұмысының осы бөлімінде, бие сүті сарысуынан бөліп алынған лактоферрин белогының аминқышқылдық тізбегі мен құрамы қарастырылды. Лактоферриннің аминқышқылдық тізбегі MS талдау әдісімен анықталды. Алынған нәтиже көрсеткендей, бие сүті лактоферрин белогы 695 аминқышқылы қалдығынан түзілген полипептидтік тізбектен тұратын гликопротеин (сурет 14).

1					60
LGLCLAAPRK	SVRWCTISPA	EEAKCAKFQR	NMKKVRGPSV	SCIRKTSSFE	CIQAIAANKA
61					120
DAVTLDGGLV	YEAGLHPYKL	RPVAAEVYQT	RGKPQTRYA	VAVVKKGS GF	QLNQLQGVKS
121					180
CHTGLGRSAG	WNIPIGTLRP	YLNWTGPPEP	LQKAVANFFS	ASCVPCADGK	QYPNLCRLCA
181					240
GTEADKCACS	SQEPYFGYSG	AFKCLENGAG	DVAFVKDSTV	FENLPDEADR	DKYELLCPDN
241					300
TRKPVD AFKE	CHLARVPSHA	VVARSV DGRE	DLIWRL LHRA	QEEFGRNKSS	AFQLFKSTPE
301					360
NKDLLFKDSA	LGFVRIPSQI	DSGLYLGANY	LTATQNLRET	AAEVAARRER	VVWCAVGPEE
361					420
ERKCKQWSDV	SNRKVACASA	STTEECIALV	LKGEADALNL	DGGFIYVAGK	CGLVPVLAEN
421					480
QKSQNSNAPD	CVHRPPEGYL	AVAVVRKSDA	DLTWNSLSGK	KSCHTGVGRT	AGWNIPMGLL
481					540
FNQTGSCKFD	KFFSQSCAPG	ADPQSSLCAL	CVGNNEENK	CMPNSEERY Y	GYTGAFRCLA
541					600
EKAGDVA FVK	DVTVLQNTDG	KNSEPWAKDL	KQEDFELLCL	DGTRKPVAEA	ESCHLARAPN
601					660
HAVVSQSDRA	QHLKKVFLQ	QDQFGGNGPD	CPGKFCLFKS	ETKNLLFNDN	TECLAELQ GK
661			695		
TTYEQYLGSE	YVTSITNLRR	CSSSPLLEAC	AFLRA		

Сурет 14 – Бие сүті лактоферрин белогының аминқышқылдық тізбегі

Белок құрамындағы дисульфидтік байланыстар белок құрылымы мен қызметын сақтауда маңызды. MS талдауы бойынша, лактоферрин белогы 17 дисульфидтік байланысы бар болатындығын көрсетті (дисульфидті байланысқа қатысатын цистеин аминқышқылы қалдықтары: C15-C51, C25-C42, C121-C204, C163-C179, C166-C189, C176-C187, C237-C251, C354-C386, C364-C377, C411-C690, C431-C653, C463-C538, C487-C681, C497-C511, C508-C521, C579-C593, C631-636).

ProtParam бағдарламасында өңдеу нәтижесінде алынған ақпаратқа сәйкес (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>), бие сүті лактоферрин белогының теориялық молекулалық массасы 75,977 кДа. Белоктардың өзіне тән физика-химиялық қасиетінің бірі 280 нм УК-сәулені жұтуға қабілеттігі. Бұл қасиет белоктардың құрамында ароматты аминқышқылдарының бар болуымен түсіндіріледі және белоктардың сандық мөлшерін анықтауға мүмкіндік береді.

Бие сүті лактоферрин белогының изоэлектрлік нүктесі (pI) 8,30 тең болды. Изоэлектрлік нүктесі деп амин қышқылының оң зарядтары сол амин қышқылының теріс зарядтарына тең болатын рН мәні. Ал, әдебиет көздерінде бие сүтінің pI 8,0-9,7 аралығында [73-74] ауытқитындығы туралы ақпарат келтірілген.

Бие сүті лактоферринінің pI – 8,30 болған уақытта, оның молярлық жоғалу коэффициенті (molar extinction coefficient) 280 нм-де $\epsilon=81425 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ мәнге тең. Молярлық жоғалу коэффициенті тәжірибиелердегі таза белокты концентрациясын анықтауда қажет. Белоктың концентрациясын *Beer-Lambert law* формуласымен есептеуде молярлық жоғалу коэффициенті маңызды көрсеткіш.

Лактоферрин белогын организмге қабылдағаннан кейін, оның антимиқробтық, антиоксиданттық, металл иондарын байланыстыру және т.б. қасиеттерін зерттеуде аминқышқылдық тізбегі мен құрамын анықтау маңызды. Амин қышқылдар – белоктарды түзетін құрылымдық, химиялық бірліктер. Аминқышқылы қалдықтарынан белоктар құрылады және фермент, гормондар түзіледі, олар организмдегі барлық тіршілік процестерінде маңызды қызмет атқарады. Бие сүті лактоферрин белогының аминқышқылдық құрамы сандық және пайыздық көрсеткішпен көрсетілді (сурет 15).

Сүт және сарысу белоктары алмаспайтын аминқышқылдарына бай болып келеді. Алмаспайтын аминқышқылдары адам организмінде синтезделмейтін, жануар/өсімдіктекті өнімдер арқылы сырттан тағаммен бірге қабылданатындығы белгілі. Бие сүті ЛФ құрамында алмаспайтын аминқышқылдары валин, лейцин, треонин, метионин, гистидин, триптофан, цистеин бар. Бие сүті лактоферринінің құрамында организмде зат алмасу мен бұлшық ет ұлпаларына қажетті валин аминқышқылы жоғары мөлшерде (47) кездесіп, белоктың 6,8% пайызын құрады. Лактоферриннің құрамында изолейцин аминқышқылы 13 рет кездесіп, 1,9% пайызды құрады. Изолейцин гемоглобинді синтездеуге қатысады және қанттың мөлшерін реттеп, қалыпқа келтіреді. Триптофан 9 рет кездесіп, 1,3% пайызды құрады, жүрек ауруларының алдын алуға, гормондардың түзілуіне әсер етеді және никотиннің әсерін төмендетеді. Организмде триптофан жетіспеушілігінен қант диабеті дамиды. Лизин (48, 6,9%) және треонин (31, 4,5%), фенилаланин (29, 4,2%) аталған аминқышқылдары белок алмасуына және коллагендердің түзілуінде маңызды қызмет атқарады. Ал, метионин (3, 0,4%) болса, липидтің дұрыс ыдырауына жауап береді, бауырға май жиналуының алдын алып, тамырда қанның ұюына жол бермейді және глюкоза синтезіне қатысады. Бұл аталған аминқышқылдары, организмде алмаспайтын, яғни организмде өздігінен түзілмейтін аминқышқылдары қатарына жатады. Қалыпты жағдайда белок мөлшерін, жеткілікті түрде дұрыс қабылдап отыру организмді аминқышқылдарымен толық қамтамасыз етеді.

Аминқышқылдары ортаның pH мәніне байланысты амин қышқылы оң зарядталған, теріс зарядталған және бейтарап (оң және теріс зарядтары бірдей) болуы мүмкін. Оң зарядталған аминқышқылдары лизин мен аргинин қасиеттері бойынша өте жақын. Бұл аминқышқылдарының екеуінде де ұштарында зарядты тасымалдайтын ұзартылған бүйірлік тізбектер болады, ал екі теріс зарядталған аминқышқылдары (Asp + Glu) болса, бүйірлік тізбектің ұзындығы бойынша ғана ерекшеленеді.

ProtParam

User-provided sequence:

```

10  20  30  40  50  60
LGICLAAPRK SVRWCTISPA EAAKCAKQK NKKVGRGSPV SCIRKTSFFE CIQAIANA
70  80  90 100 110 120
DAVTLOGGLV YEAGLHPYKL RPYAAEVYQT RGPQTRYVA VAVVKGSGGF QLNQLQGVKS
130 140 150 160 170 180
CHTGLRSAG WNIPIGTILRP YLNIITGPPEP LQKAVANIFFS ASCVPCADGK QYPHILCRCA
190 200 210 220 230 240
GTEADKACS SQEPVGYSG AFKCLENGAG DVAFVKDSTV FEHLPDEADR DRYELLCPDN
250 260 270 280 290 300
TRKPVDAFKE CHLARVPSHA VVARSDGRE DLINRLHRA QEEFGRNKSS AFQLFKSTPE
310 320 330 340 350 360
NKDLLFKDSA LGFVRIPSQI DSGLYLGANY LTATQNLRET AAEEVAARRER VMACAVGPEE
370 380 390 400 410 420
ERKCKQWSDV SHRKVACASA STTEECIALV LKGEADALNL DGGFIYVAGK CGLVPVLAEN
430 440 450 460 470 480
QKSQNSNAPD CVHRPPEGYL AVAVVRKSDA DLTWMSLSGK KSCHTGVGRT AAMNIPMGLL
490 500 510 520 530 540
FNIQTGCKFD KEFSQSCAPG ADQSSSLCAL CVGMNENENK CNPISEERY YGYTGAFCCLA
550 560 570 580 590 600
EKAGDVAFYK DVTVLQNTDG KNSEPMWKDL KQEDFELLCL DGTRKPVAAEA ESCHLARAPN
610 620 630 640 650 660
HAVVSQSDRA QHLKKVLFLQ QDQFGGNGPD CPQKFCLEFKS ETKNILLFDIN TECLAELQGK
670 680 690
TTYEQVLGSE WYTSITILRR CSSSPILLEAC AFLRA

```



Number of amino acids: 695

Molecular weight: 75991.23

Theoretical pI: 8.30

CSV format

Amino acid composition:

Ala (A)	74	10.6%
Arg (R)	37	5.3%
Asn (N)	35	5.0%
Asp (D)	34	4.9%
Cys (C)	35	5.0%
Gln (Q)	29	4.2%
Glu (E)	43	6.2%
Gly (G)	50	7.2%
His (H)	10	1.4%
Ile (I)	13	1.9%
Leu (L)	64	9.2%
Lys (K)	48	6.9%
Met (M)	3	0.4%
Phe (F)	29	4.2%
Pro (P)	35	5.0%
Ser (S)	49	7.1%
Thr (T)	31	4.5%
Trp (W)	9	1.3%
Tyr (Y)	20	2.9%
Val (V)	47	6.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Сурет 15 – Лактоферрин белогының аминқышқылдық құрамы

Төртінші кестеде көрсетілгендей, лактоферрин құрамындағы оң зарядталған аминқышқылы қалдықтардың жалпы саны – 85. Ал, теріс зарядталған аминқышқылы қалдықтарының жалпы саны – 77. Аминқышқылдық құрамына байланысты бие сүтінің лактоферрин белогы катионды гликопротеин болып табылады.

Кесте 4. Бие және адам сүтіндегі лактоферриннің құрамындағы теріс және оң зарядталған аминқышқылы қалдықтары

	Бие	Адам
Теріс зарядталған қалдықтардың жалпы саны (Asp + Glu)	77	79
Оң зарядталған қалдықтардың жалпы саны (Arg + Lys)	85	90

Катионды гликопротеиндер құрамындағы аминқышқылдарының басым бөлігі оң зарядталуына байланысты теріс зарядталған ДНҚ молекулаларымен байланысады. Сонымен қатар, ДНҚ зақымдануынан қорғауда маңызды қызмет атқарады. Молекула құрамында бір немесе бірнеше амин топтары бар карбон және дикарбон қышқылдарының туындылары, органикалық қосылыстардың маңызды тобы аминқышқылдарын құрайды. Осыған сәйкес, аминқышқылдарының бүйірлік тізбектері маңызды қызмет атқарады. Сондықтан да белок молекулаларының құрылымының түрлі ерекшеліктері және қызметі оның химиялық табиғатына және аминқышқылы радикалдарының физико-химиялық қасиеттеріне байланысты.

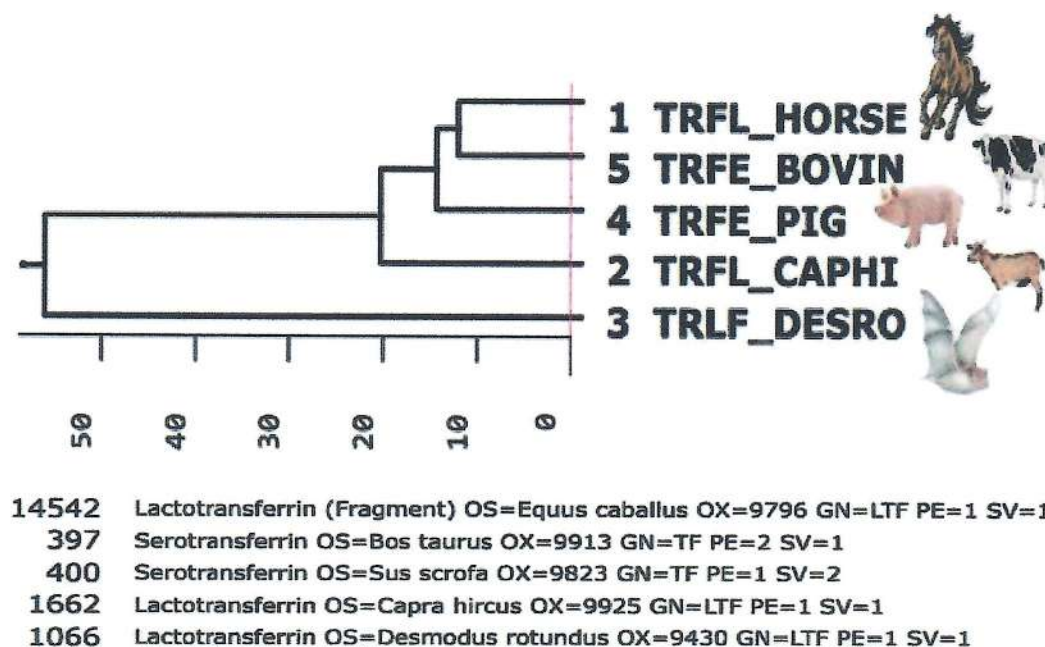
Аминқышқылдары немесе белоктардың құрамында кездесетін көміртек, сутек, оттегі, азот, күкірт атомдары органикалық қосылыстардың маңызды өкілдері. Лактоферрин белогы молекуласының атомдық құрамы көрсетілді (кесте 5). Бие сүтінен бөлініп алынған лактоферриннің аминқышқылдық тізбегі, атомдық құрамы сипатталды, зерттеу жұмысының келесі сатысы лактоферриннің филогенетикалық талдауы жасалды.

Кесте 5. Бие сүтіндегі лактоферрин белогы молекуласының атомдық құрамы

	Атауы						Атомдардың жалпы саны:
		Көміртегі (C)	Сутегі (H)	Азот (N)	Оттегі (O)	Күкірт (S)	
1	Бие	3331	5235	947	1014	38	10565

Белок туыстарының филогенетикалық талдауы гомологиялық белоктар арасындағы эволюциялық қатынастарды анықтау үшін қолданылады. Белок тізбегінің филогенетикалық бұтақтарын түсіндіру осы тізбектермен байланысты түрлердің таксономиялық қасиеттерін зерттеуді қажет етеді. Зерттеу жұмысындағы, филогенетикалық талдау нәтижесінде, АҚТА-FPLC технологиясында HiTrap SP FF 1/5 бағанын қолдану арқылы бөліп алынған бие

сүтінің лактоферрин белогы болып табылатындығы анықталды (сурет 16). Белок туысының ұсынылған топшаларға бөлінуінің дұрыстығы туралы соңғы қорытынды филогенетикалық талдау деректері негізінде жасалды. Филогенетикалық талдаудың нәтижелері аминқышқылдарының реттілігін жұппен салыстыру негізінде жасалған туыстардың топшаларға бөлінуін нақтылай алады.



Сурет 16 – Белокты талдау негізінде тұрғызылған филогенетикалық бұтақ

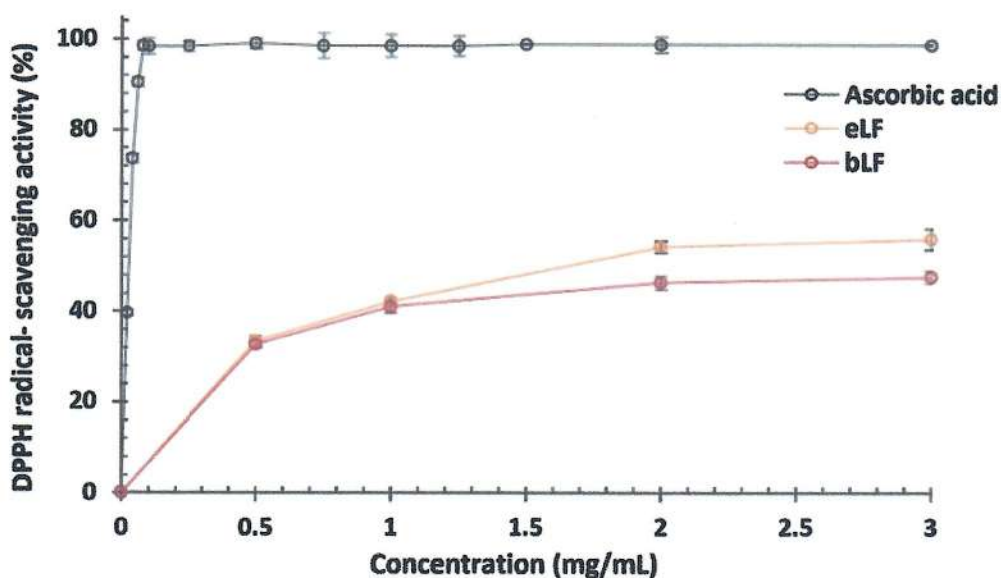
MS талдау жүргізілген жұмыстарының көрсеткіштері бойынша филогенетикалық бұтақ келесідей нәтиже алынды. Шартты түрде 2 топқа бөлінгенін байқауға болады (сурет 16). Бірінші топта жарқанат (Desro) жануары сыртқы топта (outgroup) жекеленсе, екінші топта бие, сиыр шошқа және ешкі жануарларын біріктірді. Алайда, ешкі сүтінің белок құрамы бұл топта өзара жекеленгенін көруге болады. Зерттеу жұмысында бие сүтінің лактоферрин белогын талдау барысында сиыр сүтінің лакторферрин белогы құрамына біршама жақын болғаны анықталды.

3.4 Лактоферрин белогының биологиялық белсенді қасиеттерін зерттеу

3.4.1 Лактоферрин белогының антиоксиданттық қасиеті

Биологиялық белсенді молекулалардың антиоксиданттық қасиетін бір әдіспен анықтау олардың антиоксиданттық белсенділігін сипаттау үшін жеткіліксіз болып табылады [160]. Бөліп алынған eLf-тің антиоксиданттық қасиетін bLf-пен (Sigma) салыстырмалы түрде антиоксиданттық белсенділігін сипаттайтын химиялық талдауларды қолдана отырып DPPH, ABTS радикалдарын бейтараптандыру және темірді тотықсыздандыру қабілетін анықтау (FRAP) әдістері арқылы анықталды.

1. Лактоферриннің DPPH бос радикалдарын байланыстыру белсенділігі. eLF және bLF-тің бос радикалдарды байланыстыру белсенділігі DPPH тотығуын тежеу пайызын талдау арқылы бағаланды (сурет 17). Бақылау ретінде аскорбин қышқылы қолданылды. Он жетінші суретте көрсетілгендей, bLF және eLF концентрацияға-тәуелді антиоксиданттық белсенділік көрсетті. eLF IC_{50} мәні 1,80 мг/мл (22,5 μ M) жақын концентрацияға тәуелді бос радикалды бейтараптандыру белсенділікті көрсетті, алайда бақылау ретінде алынған аскорбин қышқылында (10,0 мкг/мл, 56,8 μ M) төмен болды.



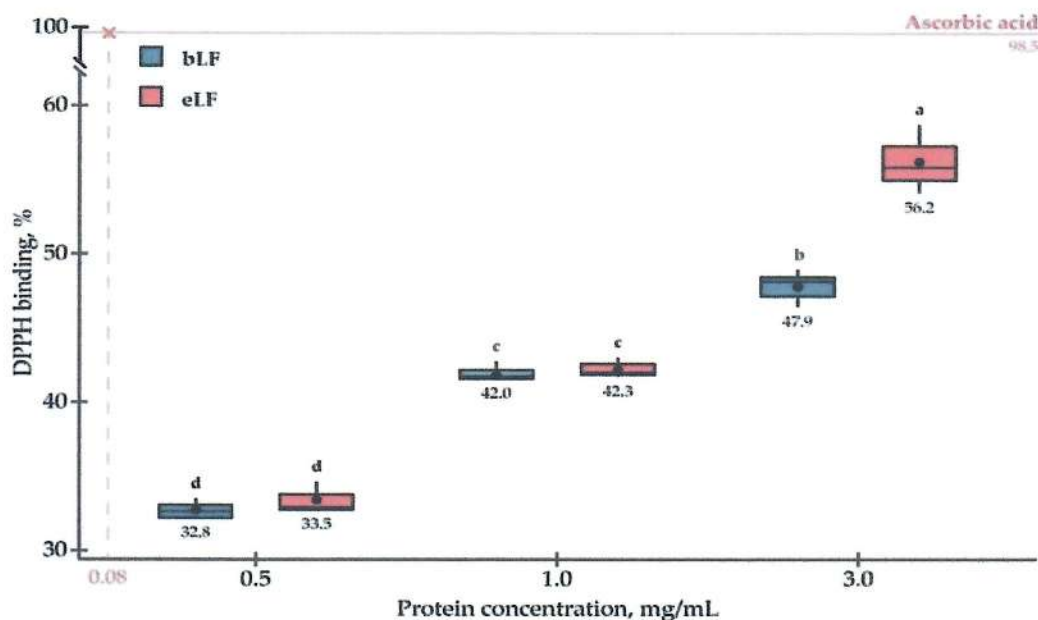
Сурет 17 – Лактоферриннің DPPH бос радикалдарын бейтараптандыру белсенділігі. Орташа мәндер $\pm$ S.D (n = 3)

Бақылау ретінде қолданынылған аскорбин қышқылы лактоферрин белогымен (0-3,0 мг/мл) салыстырғанда бос радикалдарды бейтараптау белсенділігінің жоғары дәрежесін көрсетті. eLF-тің DPPH радикалдарды байланыстыру қабілеті 0.50 мг/мл концентрацияда шамамен $33,46 \pm 1,15\%$ құрады және 3,0 мг/мл концентрацияда шамамен $56,22 \pm 2,30\%$ дейін өсті. Аскорбин қышқылының 0,08 мг/мл концентрациясында DPPH бос радикалдарын байланыстыруы шамамен $98,5 \pm 1,04\%$ көрсеткішті көрсетті, содан кейін аскорбин қышқылының концентрациясы 3,0 мг/мл-ге дейін теңестірілді (сурет 17). Аскорбин қышқылының қанықтыру күйіне 0,08 мг/мл-де жетуге болатындығын көрсетеді.

Бірдей концентрацияны салыстыру кезінде, eLF-тің DPPH бос радикалдарын байланыстыру қабілеті bLF концентрациясымен салыстырғанда 18%-ға жоғары болды. bLF-нің DPPH бос радикалдарын бейтараптандыру белсенділігі 0,50 және 3,0 мг/мл концентрациясында, шамамен $32,83 \pm 0,71\%$ -дан $47,85 \pm 1,34\%$ құрады, бұл eLF-ге жақын. 1,0 мг/мл-де eLF DPPH бос радикалдарына қарсы антиоксидантты қасиет көрсетті ($42,34 \pm 0,70\%$). Жалпы ереже бойынша, антиоксидантты белоктардың DPPH бос радикалдарды

бейтараптау әсері олардың сутегіні беру (донорлық) қабілетімен байланысты болуы мүмкін.

DPPH бос радикалдарды байланыстыру талдауы сиыр және бие сүті лактоферринінің (eLF, bLF) 0.5 мг/мл концентрациясында DPPH байланыстыру белсенділігі 32,8% және 33,5% көрсетті. Концентрацияны 1,0 мг/мл-ге дейін арттырғанда, DPPH байланыстыру белсенділігі сәйкесінше статистикалық дәлелді түрде 1,28 және 1,26 есе өсті (сурет 18).



Сурет 18 – Лактоферриннің DPPH бос радикалдарын бейтараптандыру белсенділігінің статистикалық дәлелді айырмашылығы

Жоғарыда келтірілген концентрацияларда сиыр мен бие сүті лактоферриндерінің DPPH байланыстыру белсенділігі арасында статистикалық дәлелді айырмашылық байқалмады. Белоктың концентрациясы жоғарылатқан кезде (3,0 мг/мл) белсенділіктің тұрақты өсуінен басқа, лактоферринмен байланысу белсенділігі арасындағы статистикалық дәлелді айырмашылық анықталды. Атап айтқанда, eLF байланыстыру белсенділігі bLF белсенділігінен 1,17 есе жоғары болды ($p < 0,05$). Болжам бойынша, бие сүті лактоферрин концентрациясының артуы 3,0 мг/мл-де сиыр сүті лактоферрині белсенділігімен статистикалық дәлелді айырмашылықтың болуын ескере отырып, DPPH бос радикалды бейтараптандыру белсенділігін айтарлықтай арттыруы мүмкін.

2. *ABTS⁺ радикалды бейтараптандыру әдісімен алынған нәтижелер.* Сүт өнімдерінің антиоксиданттық белсенділігін анықтау үшін бірнеше стандартталған әдістер қолданылады. Соның ішінде, ABTS⁺-антиоксиданттың белсенділігін өлшеу әдістердің бір бөлігі. Бұл реагент, молекуланың тотықтырғыш екенін анықтауға мүмкіндік береді. Бос радикалдарға қарсы молекулалар реакциясының негізінде нәтижелерді жылдам алу үшін ABTS⁺ радикалды катион қатысында TEAC тест сынағы қолданылды.

Trolox 0-250 мкм диапазонындағы концентрацияға жауап қисығынан сызықтық байланыс табылды. Осы зерттеуде сиыр сарысуы лактоферрин белогы мен бие сарысуы лактоферрин белогының антиоксидантты белсенділігі (%-мен), сондай-ақ IC_{50} мәндері (μM -де) анықталып, Галь қышқылы мен Тролокс екі молекула бірқатар оң бақылау ретінде пайдаланылып салыстырылды. Эксперименттік жағдайларда Trolox IC_{50} мәні 157,9 μM болды. Нәтижелер 1 мг/мл концентрациядағы eLF $46,3 \pm 5,1 \mu M$ экв Trolox/mg eLF ($n=4$) потенциалымен ABTS тотығуы нәтижесінде түзілген радикалды тұрақтандыруға қабілетті болатынын көрсетті.

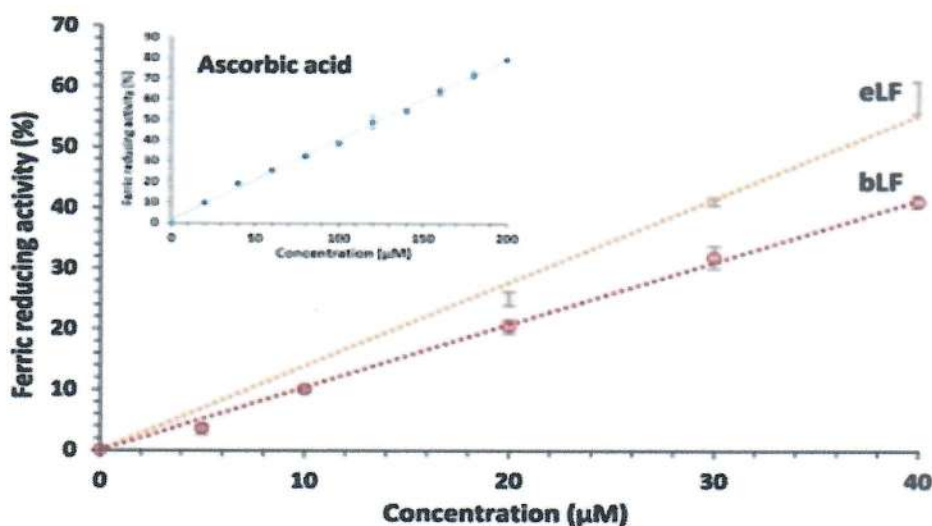
Лактоферрин белоктарында Trolox тәрізді антиоксидантты қасиет байқалды, оның ең жоғары белсенділігі 25 μM -де 79,6% жетті, ал бие сарысуы белогының максималды белсенділігі (78,22%) төмен болды. Тәжірибие нәтижесіне сәйкес ЛФ-ның концентрациясы (мг/мл) 5 және 50 есеге жоғарлатқан кезде, оның белсенділігі 16,92% -дан 79,89% -ға дейін артты. Ал, бие сүті сарысуын (мг/мл) 5 және 50 есеге жоғарлатқан кезде антиоксиданттық белсенділігі 11,9%-дан 78,22 % артатындығы анықталды. ЛФ пен сүт сарысу белоктарының концентрациясы неғұрлым жоғары болса, соғұрлым олардың антиоксиданттық белсенділігі артады деген тұжырымға тоқталуға болады. Лактоферриннің реактивті оттегі түрлерін бейтараптандыру немесе бос радикалдарды байланыстыру қасиеті бар болатындығы айқындалды.

Ғылыми зерттеу жұмысында DPPH, ABTS химиялық әдістерін қолдану арқылы бие сүтінен тазартылған eLF-ның бос радикалдарды бейтараптандыру белсенділігі зерттелді. DPPH талдауларынан алынған эксперименттік деректер bLF және eLF бос радикалдарды бейтараптандыруы концентрацияға тәуелді және максималды белсенділік деңгейіне шамамен 2 мг/мл ($= 25 \mu M$) жеткенін көрсетті. Бақылау ретінде пайдаланылатын аскорбин қышқылынан әлдеқайда төмен (100% белсенділік шамамен 0,25 мг/мл немесе 1,42 μM жетеді). 1,0 мг/мл-де eLF DPPH радикалдарына қарсы маңызды антиоксиданттық қабілетті анықтады ($42,3 \pm 0,5\%$), осындай концентрациядағы рекомбинантты шошқа ЛФ (46,0%) үшін ұқсас нәтиже болды [161] және bLF ($41,1 \pm 1,7\%$) үшін де өлшенген. eLF және bLF радикалдарды бейтараптандыру белсенділігі сәйкесінше олардың белок мөлшеріне, аминқышқылдарының құрамына, молекулалық салмағына және тазалық дәрежесіне байланысты болатындығын атап өткен жөн. Бос радикалдарды бейтараптандыру белсенділігі ABTS әдісі арқылы eLF үшін расталды.

Лактоферриннің құрамында триптофан және тирозин кездеседі, олардың бүйірлік тізбектерінде электронға бай ароматты сақиналары бар аминқышқылдары болғандықтан оңай тотығады. Триптофан молекуласының құрамында бес сақина атомы (төрт көміртегі атомы және бір азот атомы) бар пиррол сақинасы болғандықтан, ол тотықтырғыштарға сезімтал. Атап айтқанда, тирозин күшті электрон беретін гидроксил (ОН) тобы арқылы жоғары белсендірілген бензол сақинасына ие, сондықтан тотықтырғышқа әлсіз. Цистеин және метионин сияқты бүйірлік тізбектерінде күкірт атомдары бар аминқышқылдары да оңай тотығады. Себебі күкірт атомында екі жалғыз

электрон жұбы оның тотығуын жеңілдетеді. Белгілі бір дәрежеде бүйірлік тізбектерінде азот атомдары бар аминқышқылдары, мысалы, гистидин, лизин және аргинин оңай тотығады. Себебі, азот атомында бір ғана электрон жұбы болады, сондықтан бұл аминқышқылдарына тотықтырғыш әсер етуі мүмкін.

3. *FRAP әдісімен талдау.* DPPH және ABTS радикалдарын бейтараптандыру қабілеттерінен басқа, FRAP әдісі арқылы eLF және bLF металл иондарын байланыстыру белсенділігі зерттелді. Fe^{3+} (%) төмендету мүмкіндігі және ЛФ-тың AERC индексі сиыр ЛФ (bLf, Sigma) және биенің ЛФ (лабораториялық жағдайда бөліп алынған) екі түрі үшін анықталды, бақылау ретінде аскорбин қышқылымен салыстырылды (сурет 16).



Сурет 19 – eLF пен bLF әртүрлі концентрациядағы темірді тотықсыздандыру қабілеті. Орташа мәндер $\pm$ S.D. (n = 3)

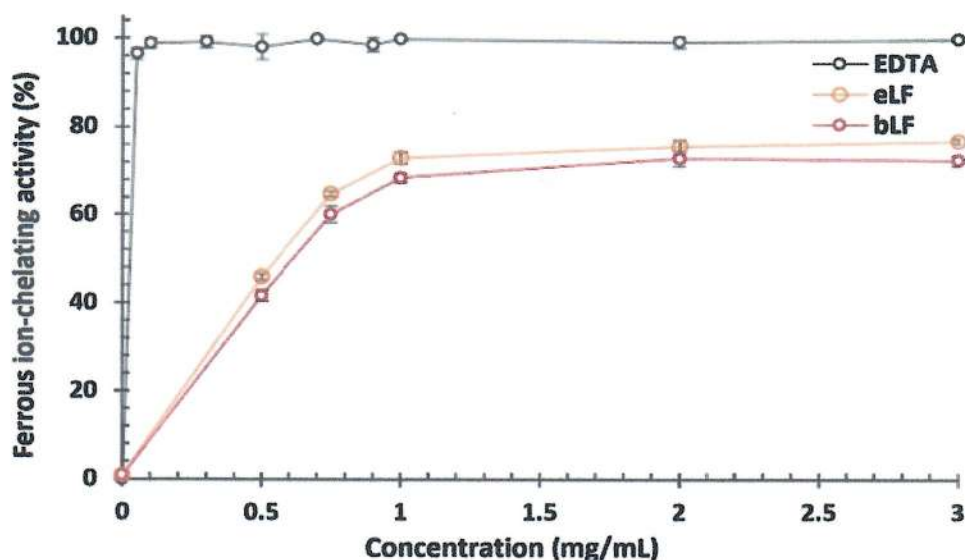
Темірді тотықсыздандыру қабілеті мен аскорбин қышқылының 0-200 μM (0-0,035 мг/мл) және ЛФ-тың 0-40 μM (0-3,2 мг/мл) диапазонындағы концентрация арасындағы сызықтық байланыс анықталды. Осы қисықтардан алынған IC_{50} мәндері bLF үшін $> 40 \mu\text{M}$ ($> 3,2$ мг/мл) және аскорбин қышқылы үшін 120 μM (0,021 мг/мл) қарсы eLF үшін 35 μM (2,8 мг/мл) болды. 0-ден 40 μM -ге дейінгі концентрация аралығында eLF және bLF сәйкесінше AERC 3,7 және 2,6 мкм мәндерімен жоғары тотықсыздандыру қабілетін көрсетті.

Бие сүті ЛФ-ы қазіргі тәжірибелік жағдайларда сиыр сүтімен салыстырғанда темір ионын азайту үшін біршама тиімдірек болды. Берілген 40 μM концентрацияда, яғни бірдей молярлық концентрацияда eLF маңызды темірді тотықсыздандыру қабілетін (шамамен $61,5 \pm 2,6\%$) анықтады, бұл bLF (шамамен $41,3 \pm 1,0\%$) және рекомбинантты шошқа ЛФ (шамамен 40,0%) үшін көрсетілгенінен жоғары болды [161].

3.4.2 Лактоферрин белогының металл иондарын байланыстыру қасиеті

Белоктардың хелаттаушы қабілеті бағалау үшін бір әдісті қолдану олардың нақты металл иондарын байланыстыру қасиеті туралы нақты түсінік беруге жеткіліксіз болуы мүмкін. Сондықтан, bLF (Sigma) салыстырмалы түрде пайдаланылды. Лактоферрин белогының келесідей металл иондарын байланыстыру әдістерін қолдана отырып талданды: Темір (II), мыс (II) хелаттау қабілеті, ИТС және биотехнологиялық заманауи әдіс нақты уақыттағы switchSENSE талдауы қолданылды.

1. *Темір (II) хелаттаушы қабілеті.* Fe^{2+} кешеніне ЛФ қабілеттілігі 20 суретте көрсетілгендей A_{562} -де Феррозин- Fe^{2+} кешенінің бұзылуын өлшеу арқылы бағаланды. Темір иондарын хелаттаушы қабілеті eLF және bLF концентрациясына байланысты ұқсас түрде өсті ($64,70 \pm 0,56\%$ және $60,06 \pm 0,90\%$), бірақ 0,75 мг/мл концентрациядағы ЭДТА металдарының синтетикалық хелаторы үшін тіркелген мәндермен салыстырғанда ($99,75 \pm 0,35\%$) төмен болды. Себебі, 0,060 мг/мл концентрацияда EDTA-ның темір ионын байланыстыру қасиеті шамамен $96,42 \pm 0,90\%$ құрады, содан кейін 3,0 мг/мл дейін теңестірілді (сурет 20).

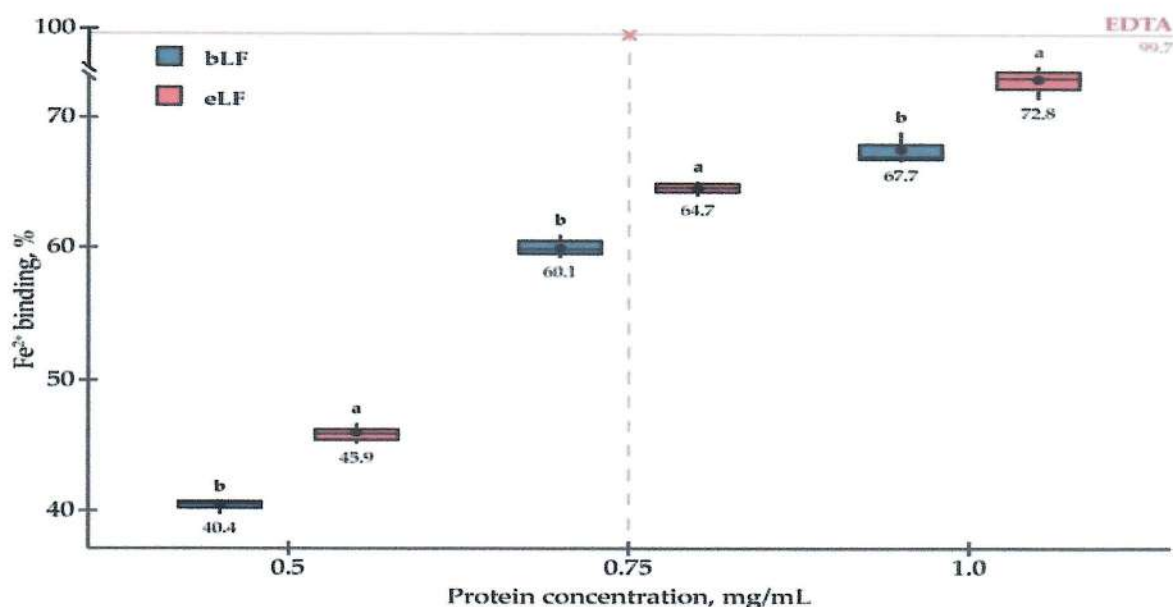


Сурет 20 – Темір ионының хелаттаушы белсенділігі.
Орташа мәндер $\pm$ S.D. (n = 3)

Бұл қанықтыру күйіне 0,060 мг/мл EDTA жетуге болатынын көрсетеді. Екі валентті темір иондарын байланыстыру қабілеті eLF 0,50 мг/мл концентрациясында шамамен $45,90 \pm 0,78\%$ құрады, 1,0 мг/мл концентрациясында шамамен $72,84 \pm 1,24\%$ -ға дейін өсті. Аталған белок концентрациясы 3,0 мг/мл-ге дейін теңестіріліп, eLF қаныққан күйге қол жеткізілгенін көрсетеді.

Жиырма бірінші суреттен көрініп тұрғандай, лактофериннің (бие немесе сиыр) темір ионының байланысу пайызы белок концентрациясына тәуелді болды (сурет 21). Осылайша, Fe^{2+} байланысу пайызы барлық зерттелген

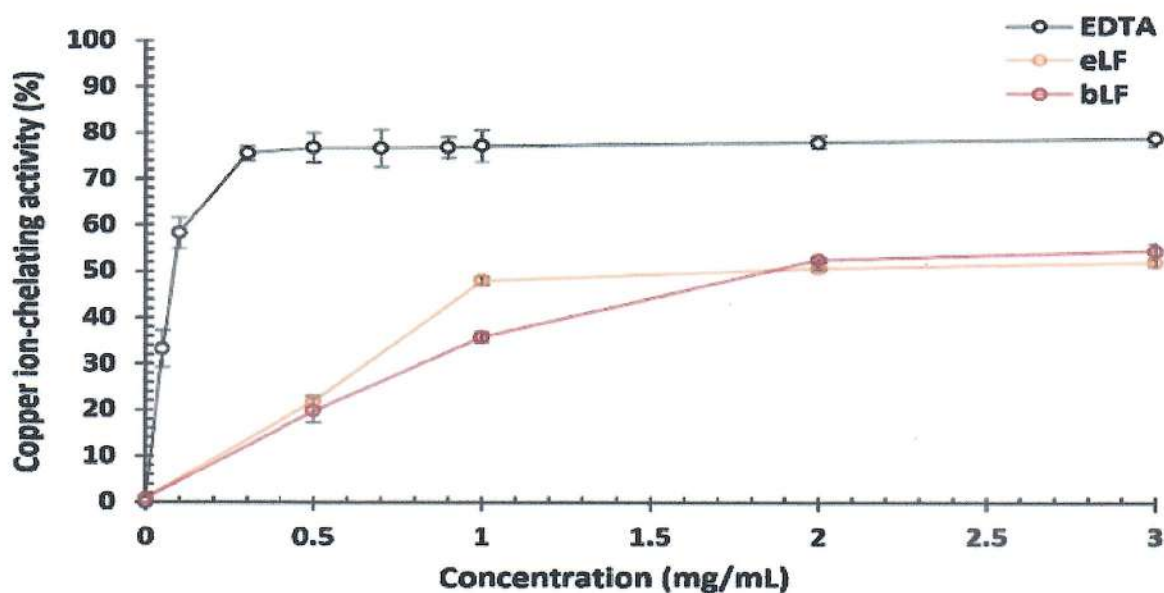
концентрацияларда бие сүті лактоферринінде статистикалық дәлелді айырмашылығы айтарлықтай жоғары болды. Лактоферрин концентрациясының жоғарылауымен байланысу пайызының артуын ескере отырып, зерттеуді жалғастыру орынды. ЛФ-тың темірмен қанықтыру дәрежесі, сондай-ақ тирозин, гистидин және аспарт қышқылы сияқты белгілі бір аминқышқылдарының болуы белоктардың темір ионын байланыстыру белсенділігін (антиоксиданттық қасиеттерін) арттыруы мүмкін.



Сурет 21 – eLF пен bLF-нің әр түрлі концентрациядағы темір ионын байланыстыру белсенділігінің статистикалық дәлелді айырмашылығы

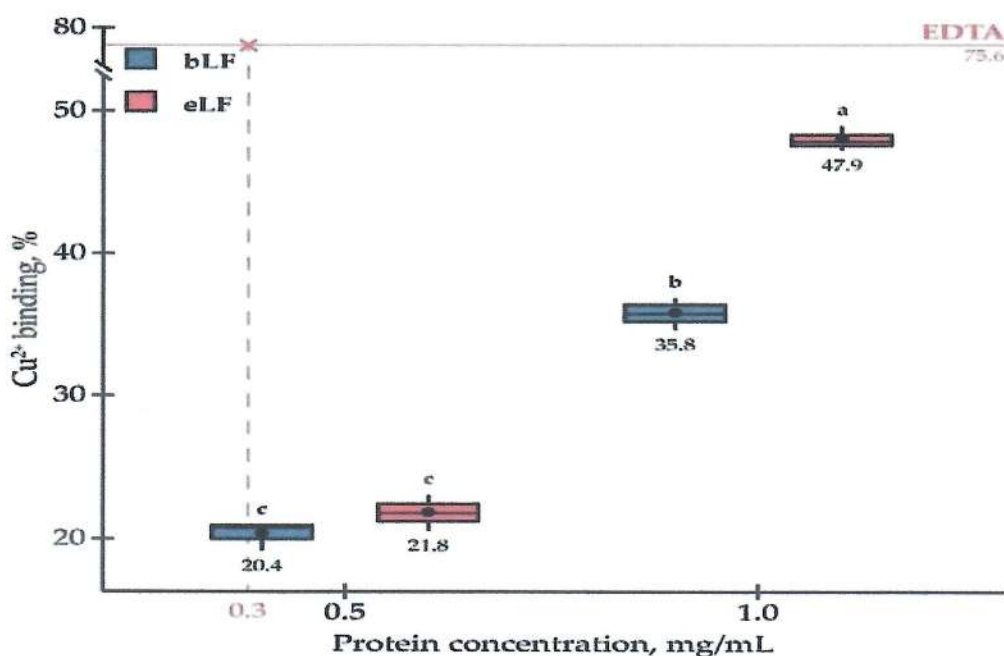
ЛФ пептидтерін талдау белоктың радикалдарды бейтараптандыру қабілетін *in vitro* асқорыту жолындағы ферменттер көмегімен Tyr, Trp, Met, Cys немесе His сияқты қалдықтары бар шағын өлшемді пептидтер арқылы тазартуын көрсетті. Бұл аминқышқылдары оң зарядталған металл иондары O, N және S сияқты атомдары арқылы байланыстыруда шешуші рөл атқарады [162].

2. *Мыс (II) хелаттаушы қабілеті*. Мыстың хелаттаушы қабілеті eLF және bLF концентрациясының жоғарылауымен (0,5-тен 3,0 мг/мл дейін) артады, тиісінше 1,0 мг/мл кезінде A_{632} толқын ұзындығында $47,92 \pm 0,89$ % және $35,75 \pm 1,12$ % мәндері анықталды. Талдауда eLF мыс пен темірді иондарын байланыстыру қасиеті 0,50 мг/мл концентрациясында шамамен $21,83 \pm 1,25$ % құрады, 0,25 мг/мл концентрациясында шамамен 50,51% дейін өсті және 3.0 мг/мл дейін теңестірілді (сурет 22), бұл қанықтыру күйіне 1,0-1,50 мг/мл eLF көмегімен қол жеткізілетіндігін көрсетеді.



Сурет 22 – eLF пен bLF-нің әр түрлі концентрациядағы мыс ионымен хелаттаушы белсенділігі. Орташа мәндер $\pm$ S.D. ($n = 3$).

ЭДТА мен байланысу белсенділігі 0,30 мг/мл концентрациясында шамамен $75,57 \pm 1,46\%$ құрады, содан кейін 3,0 мг/мл дейін теңестірілді, яғни ЭДТА қанықтыру күйіне 0,30 мг/мл концентрацияда жетуге болатынын көрсетеді. Екінші жағынан, бірдей концентрацияларды (0-ден 3,0 мг/мл дейін) салыстырған кезде, eLF-тің темір мен мысты хелаттау қабілеті bLF -ке қарағанда жоғары болды.

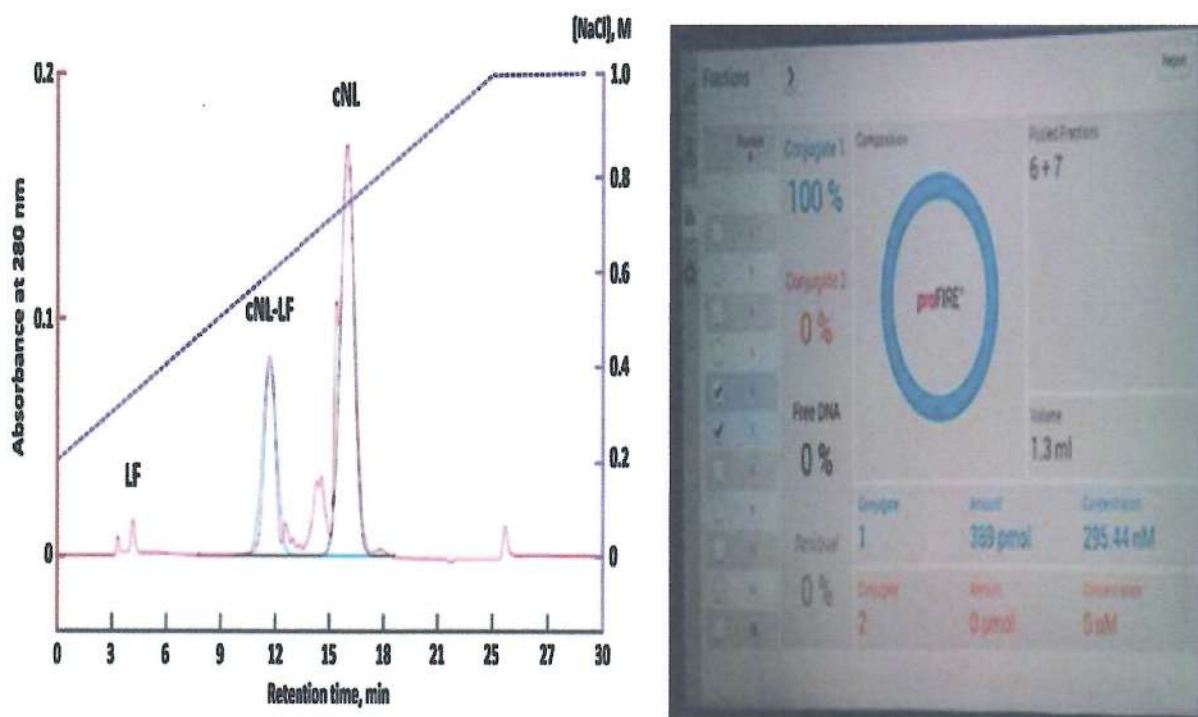


Сурет 23 – eLF пен bLF-нің әр түрлі концентрациядағы мыс ионымен хелаттаушы белсенділігінің статистикалық дәлелді айырмашылығы

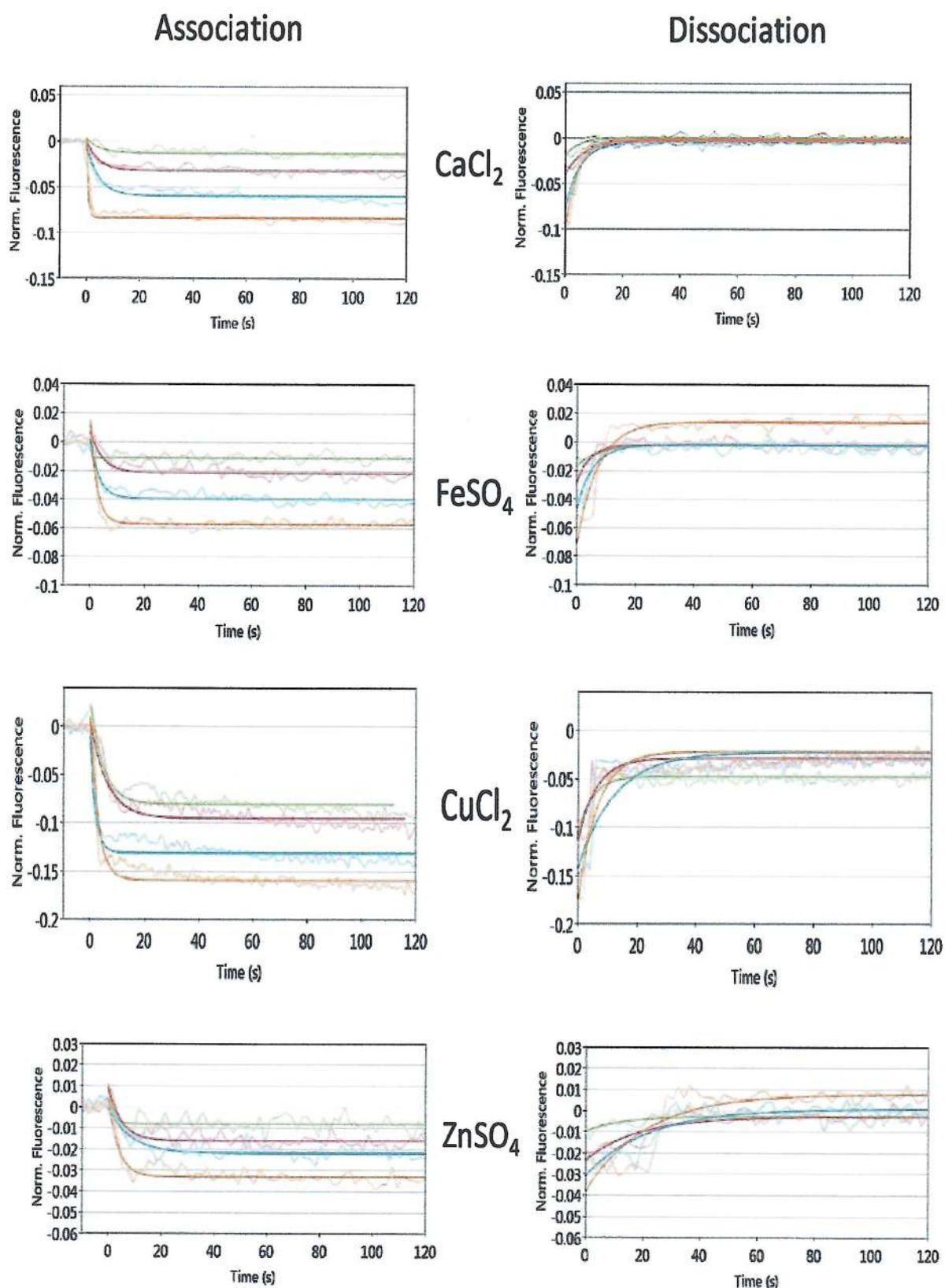
Екі валентті мыс ионының байланысу белсенділігін зерттеген жағдайда лактоферриннің табиғаты мен олардың концентрацияларының жиынтық әсері байқалады. Осылайша, 0,5 мг/мл концентрацияда Cu^{2+} лактоферринмен байланысу пайызы бірдей, ал концентрация 1 мг/мл-ге дейін арттырғанда бие сүті лактоферрині айтарлықтай жоғары (1,34 есе көп) байланысу белсенділігін көрсетеді (сурет 23). Бұл нәтижелер switchSENSE технологиясы арқылы алынған нәтижелермен сәйкес келді.

3. *Нақты уақыттағы switchSENSE талдауы (Real-time switchSENSE analysis)*. Адам қанының сарысуындағы металл иондары, атап айтқанда Ti^{4+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} және Cu^{2+} металды байланыстыру және биологиялық иондарды тасымалдау процестері үшін маңызды элементтер. Металл иондарын сіңіру механизмі метал иондарының биологиялық қол жетімділігіне немесе металл иондарымен байланысатын металлопротеиндердің қатысуымен жүретіндігіне негізделген. ЛФ белогының құрылымы мен функциясындағы металл иондарының рөлін терең түсіну денсаулық, ауруларды диагностикалау және терапия үшін шешуші мәнге ие [100].

ЛФ-тың екі валентті метал иондарын (кальций, мыс, темір, мырыш) байланыстыру қабілеті нақты-уақыттағы молекулалардың байланысын талдауға негізделген switchSENSE® әдісімен зерттелді. switchSENSE® молекулалар арасындағы байланыстарды анықтауға сезімтал әдіс [163; 164]. Кинетикалық анализдер алдында таза cNL-eLF конъюгаты (100% тазалық; 24-сурет) proFIRE® құрылғысымен дайындалды.



Сурет 24 – cNL-LF конъюгатын proFIRE® құрылғысымен тазарту



Сурет 25 – Мырыш және темір сульфаты, кальций және мыс хлоридімен өзара әрекеттесетін ЛФ теңдеулерін кинетикалық талдау switchSENSE технологиясын қолдана отырып жасалды. Алынған деректер әр аналиттың әр түрлі концентрацияларына арналған сызық деректермен толықтырылған (жасыл: 12,5 μM металл ионы; қызыл: 25 μM ; көк: 50 μM ; қызғылт сары: 100 μM)

Жиырма төртінші суретте көрсетілгендей, реакцияға түспеген белок фракциясы сызықтық градиенттің басында элюирленген, ал ssDNA (cNL) артық мөлшері 0,2-1,0 М NaCl сызықтық градиентінің соңында элюирленген. Конъюгаттың тазалық дәрежесі, концентрациясы мен мөлшері proFIRE® бағдарламасы көмегімен тұрғызылған қисық сызықтан (көк сызық) анықталды (сурет 24). Ары қарай осы таза бөлініп алынған cNL-eLF конъюгаты будандастыру арқылы чипті функционалдау үшін пайдаланылды. Әрбір металл ионымен жүргізілген тәжірибиелерде оңтайлы жұмыс істеді, себебі барлық ssDNA тізбектері конъюгатпен будандасады.

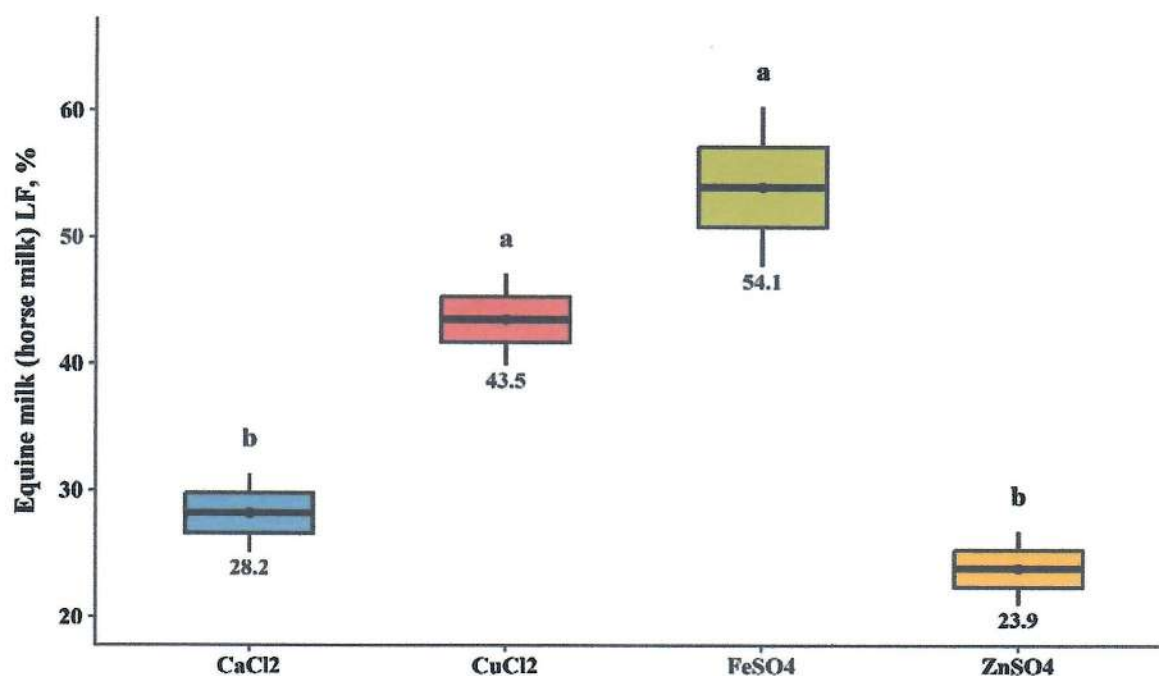
Осылайша, белоксыз нанолеврлермен бақылау үш металл иондарының (мыс, темір және мырыш) әрқайсысының қатысуымен жүзеге асырылды және лигандпен анықталған қисықтардан алынып тасталды. Кальций элементі болған жағдайда флюорофордың сөнуі байқалмады. Сондықтан, буферсіз кальций хлориді көмегімен бланк (бос) жасалынды және алынған нәтижелер сигналды қалыпқа келтіру үшін өңделмеген деректерден алынады (кесте 6). eLF-тың металл иондарына аффинділігі (жақындығы) диссоциациялық тұрақтылықты $K_{\text{тұр}} = k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$ анықтау арқылы зерттелді. Ассоциация жағдайында (хелаттау), $k_{\text{асс}}$ мәні аналиттің C концентрациясына тәуелді және бақыланған ассоциация тұрақтылығынан алынып тасталды, $k_{\text{obs}} = C \cdot k_{\text{асс}} + k_{\text{дисс}}$. $K_{\text{тұр}}$ мәні шамасы μM өлшемдер барлық ауыр металдары үшін тестілеуден өткізілді (6-кесте; сурет 25).

Кесте 6. switchSENSE технологиясымен анықталған металл-ЛФ өзара әрекеттесуінің кинетикасының нәтижелер (күлгін түстегі мәндер таңдалды)

	$K_{\text{асс}} (10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_{\text{дисс}} (10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_{\text{тұр}} (\mu\text{M})$
CaCl ₂	$7,39 \pm 1,10$	$208,0 \pm 9,0$	$28,2 \pm 4,4$
ZnSO ₄	$2,02 \pm 0,32$	$48,3 \pm 2,4$	$23,9 \pm 4,0$
FeSO ₄	$2,64 \pm 0,41$	$143,0 \pm 7,0$	$54,1 \pm 8,9$
CuCl ₂	$2,54 \pm 0,27$	$111,0 \pm 6,0$	$43,5 \pm 5,1$

Ең жақсы жақындықтар Zn^{2+} ($K_{\text{тұр}} = 23,9 \pm 4,0 \mu\text{M}$) және Ca^{2+} ($K_{\text{тұр}} = 28,2 \pm 4,4 \mu\text{M}$), одан кейін Cu^{2+} ($K_{\text{тұр}} = 43,5 \pm 5,1 \mu\text{M}$) және Fe^{2+} ($K_{\text{тұр}} = 54,1 \pm 8,9$) байқалды. Жоғары жақындық реті Zn^{2+} және Ca^{2+} , содан кейін Cu^{2+} және Fe^{2+} металдарына байқалды. Темір хлориді мен мырыш хлориді арасында өзара әрекеттесу байқалмады, ал темірмен және мырыш сульфаттарымен арасындағы әрекеттесу тиімді болды. Бұл қарама-қарсылық әсерді көрсетті, дегенмен оның маңыздылығы төмен (темір мен мырыш хлоридтері үшін деректер келтірілмеген). 6-кестедегі алынған нәтижелер, Cu^{2+} , Ca^{2+} және Zn^{2+} металл иондары Fe^{2+} қарағанда аз мөлшерде ЛФ металл иондарын байланыстырғаны туралы алдыңғы бақылаулармен сәйкес келеді.

Статистикалық талдау бойынша, сәйкестік коэффициентінің ең жоғары мәндері Cu және Fe металл иондарында табылғанын көрсетті, бұл Ca және Zn металл иондарына қарағанда статистикалық тұрғыдан айтарлықтай жоғары ($p < 0,05$) (сурет 26). Металдардың шектелмеген күйдегі каталитикалық рөліне байланысты пайда болатын бос радикалдардың түзілуі көптеген биохимиялық процестерге кері әсер ететіндіктен, ЛФ-пен темірді байланыстыру тірі ағзаларды тотығу стресінен қорғауы мүмкін.



Сурет 26 – Металл тұздарымен өзара әрекеттесетін лактоферрин теңдеулерін кинетикалық талдау switchSENSE технологиясын қолдану арқылы алынған нәтижелердің статистикалық дәлелді айырмашылығы

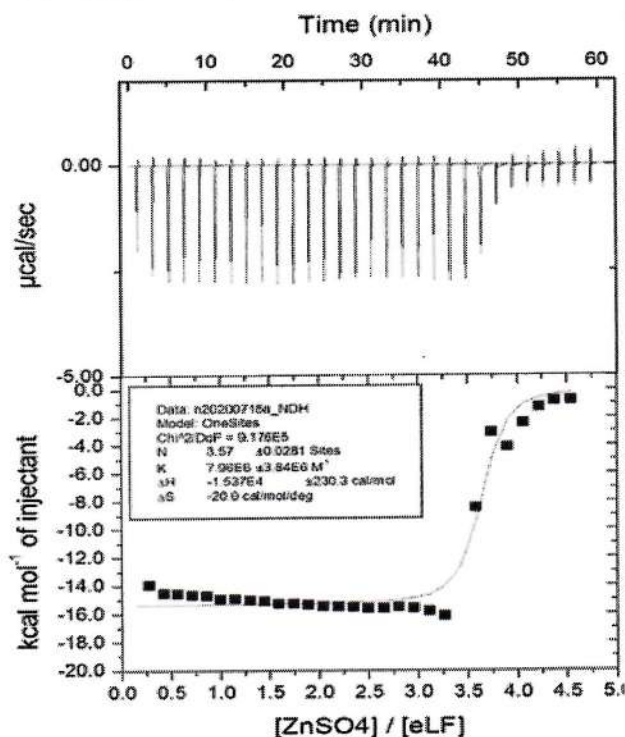
Зерттеушілер мырыштың хелат түзу пептидтерін зерттеуге және тағамдық мырыштың сіңуін жақсарту қажеттілігіне назар аударуда. Себебі, пептидтер ағзаға жақсы сіңіп, ішек шырышты қабығының бүрлері мен бүр жасушалары арқылы қанға тасымалданады. Мырыштың пептидтермен байланысы ас қорыту жолындағы ерімейтін қосылыстардың түзілуін тежеп, минералдардың ағзаға сіңуін жақсартады.

Жануарлар мен адамдарда жүргізілген көптеген зерттеулер мырыш, кальций немесе темір сияқты маңызды металдардың жетіспеушілігі Cd және Pb тәрізді ауыр металдардың жоғары мөлшерде сіңуіне және уыттылығына әкелуі мүмкін. Сондықтан маңызды металдармен толықтыру Cd және Pb интоксикациясынан қорғаныс әсерін қамтамасыз ете алады деп болжауға болады [120-121].

4. *Изотермиялық титрлеу калориметриясы әдісімен ЛФ-тың металдарды байланыстыру қасиетін анықтау.* ИТК технологиясы биомолекулалық өзара әрекеттесулердің термодинамикалық қасиеттерін

сипаттауда қолданылатын әдіс, мысалы, минералды элемент пен белок әрекеттесуі. ИТК екі лиганд арасындағы әлсіз өзара әрекеттесулерді сипаттауға мүмкіндік беретін артықшылыққа ие. Соңғы жылдары ИТК әдісі әртүрлі құбылыстарды зерттеу үшін тағам/технология ғылымында құнды құралға айналды, алайда тағамтану саласында қолдану әлі де шектеулі. ИТК әдісі жылуы жақындық константасы (K), стехиометрия (N), байланыс энтальпиясының өзгеруі (ΔH) және энтропияның өзгеруі (ΔS) анықталатындай етіп өлшенеді. ЛФ-тың ИТК әдісімен Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} металл иондарын байланыстыруы зерттелді.

Мырыш кешендерінің физико-химиялық қасиеттерінің ішінде мырыштың байланыстыру жақындығын өлшеу, мырыштың қалай әсер ететінін түсіну және тағамда мырыштың биожетімділігі үшін маңызды. Зерттеу жұмысында, бие сүті сарысу белогы лактоферринмен мырыш ионы байланысуының термодинамикалық параметрлері механизмін талқылау үшін ИТК әдісімен анықталды (сурет 27).



Сурет 27 – ИТК әдісімен лактоферриннің $ZnSO_4$ ионымен әрекеттесуі

Аминқышқылдары, пептидтер мен белоктар сияқты тағамдық компоненттердің мырышпен байланысын изотермиялық титрлеу калориметриясы арқылы байланыстыру реакциясы кезінде жылудың өзгеруін тікелей өлшеу арқылы бақылауға болады. Үлгіні титрлеу кезіндегі жылу өзгерістерінен белоктың концентрациясын жоғарылату үшін мырыштың белгіленген мөлшерімен немесе мырыш концентрациясын жоғарылату үшін белоктың белгіленген мөлшерімен бақыланатын энтальпия (ΔH_{obs}) және байланыстыру константасы (K_a) тікелей алынады. ЛФ мен ауыр металдар арасындағы изотермиялық титрлеудің калориметриялық анализінің нәтижелері көрсетілген (кесте 7). Изотермиялық титрлеу калориметриясы

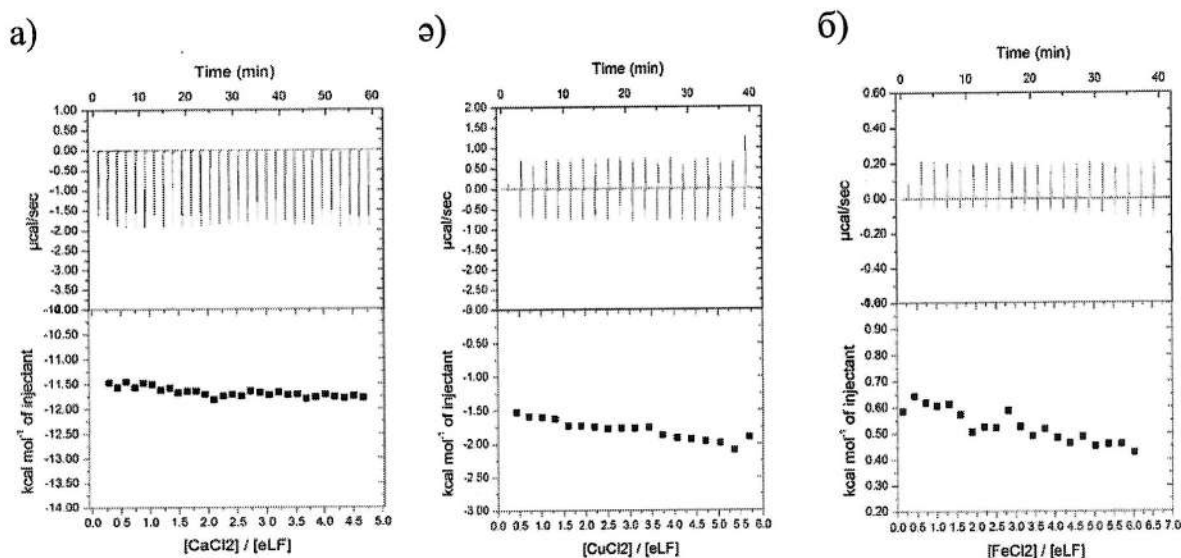
әдістің дұрыстығын анықтайтын маңызды аспект, сәйкесінше белок пен лигандтың нақты концентрациясын анықтауда маңызды.

Кесте 7. ЛФ-тың мырышпен әрекеттесуінің термодинамикалық параметрлері

Лиганд (2 mM)	Белок ΔM	N (mol/mol)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	T ΔS (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	K ($\times 10^3 M^{-1}$)
Zn ²⁺	ЛФ	3,57 $\pm$ 0,03	-15,37 $\pm$ 2,03	-20,0	5 960	5 944	7,96 $\pm$ 3,84

Мырышпен байланысу кезінде мономерлердің айқаспалы байланысы жоғары пептидтік концентрацияларда қолайлы болады деп күтілді. Мырыш ионын байланыстыруға арналған орындарының екі түрінің ықтимал болуы қарастырылды, бұл жоғары K-мен сипатталатын негізгі түрі. ЛФ тексерілген төрт металл ионының ішінде Zn²⁺ жоғары жақындықты көрсетті, K_{мені} 7,96 $\times 10^3 M^{-1}$.

Аминқышқылдары немесе пептидтік кешендер мырыштың сінуін жақсартады, алайда мырыш ионы мен осы потенциалды лигандтар арасындағы өзара әрекеттесудің термодинамикасы жақсы сипатталмаған. Сондықтан мырыштың аминқышқылдарына, пептидтерге және сарысу белоктарымен байланысы изотермиялық титрлеу калориметриясымен зерттелді, ол мырыштың биожетімділігін жақсарту үшін пайдалы ақпарат алуға мүмкіндік береді [90].

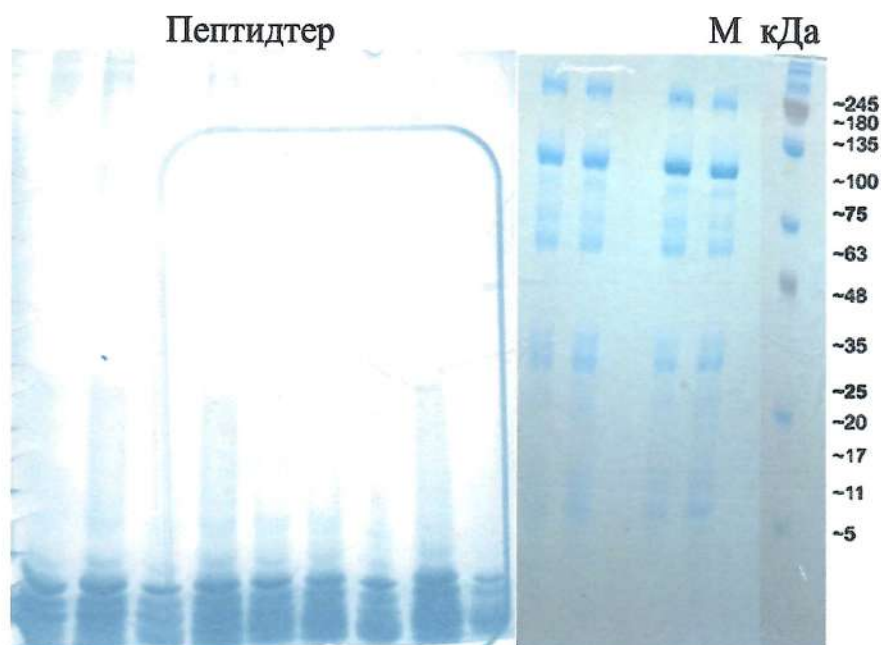


Сурет 28 – ИТК әдісімен лактоферриннің металл ионы тұздарымен байланысы (а. CaCl₂; ә. CuCl₂; б. FeCl₂)

Жиырма сегізінші суретте көрсетілгендей, ЛФ белогының Fe²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ ионы тұздарымен байланысуына ИТК әдісі тиімсіз болды (сурет 28).

3.4.3 Лактоферрин белогын гидролиздеу және антимикробтық қасиетін анықтау

Трипсин ферментімен өңделген лактоферрин белогының пептидтерін 15% Трицин SDS-PAGE электрофорез әдісімен сипатталды (сурет 29). Трицин SDS-PAGE гель электрофорезі төмен молекулалы массалық (1-30 кДа) белоктарды/пептидтерді жіктеудің тиімді әдісі.



Сурет 29 – 15% Трицин SDS-PAAG гелі арқылы пептидтерді сипаттау

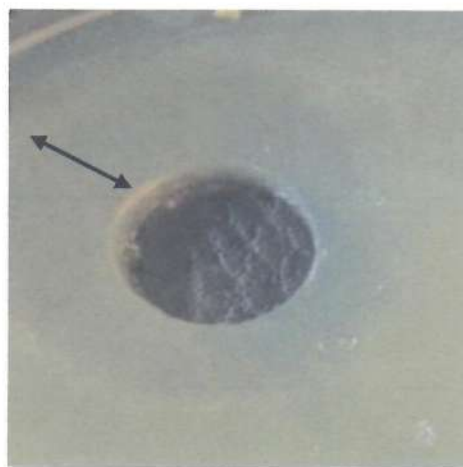
Лактоферринді ферментпен әсер еткенде пептидтер алынды. Олардың молекулалық массасы стандартты маркермен салыстырып қарағанда 600 Да - 3,6 кДа аралығында болды. ЛФ пептидтерінің басым көпшілігі антимикробтық қасиет көрсететін қасиетіне байланысты, олардың антимикробтық белсенділігі тексерілді.

ЛФ және оның пептидтерінің антимикробтық белсенділігі. Бүкіл әлем бойынша денсаулық сақтау секторында антибиотиктерге төзімді бактериялар таралуының жоғарылауы олардың ауруханада, қоғамдық орындарда кеңінен таралуына байланысты қауіпті болуда. Сондықтан антибиотиктерге төзімді бактериялармен күресу үшін жаңа препараттарды табу және дамыту қажет. Осы себепті, жануар және өсімдік текті шикізат құрамынан биологиялық белсенді заттарды бөліп алу қажеттілігін тудырып отыр. Бие сүтінен бөлініп алынған ЛФ белогының емдік қасиеттері туралы әдебиеттерде келтірілген, сондықтан, пептидтер ағзаның туа пайда болған иммунитетін тағамдық қосылыстармен бірлесе әсер ету арқылы жақсартады.

ЛФ-тың антимикробтық белсенділігі *E.coli* штамында тексерілді. ЛФ тәжірибиелік үлгілерде бактерия жасушаларының өсуі бақылау тобымен салыстырғанда ЛФ және оның пептидтері бар ортада төмен болды (сурет 30).



Бақылау 1 (dH₂O)



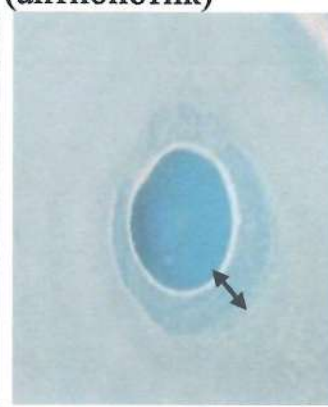
Бақылау 2 (антибиотик)



90 минутта



120 минутта



ЛФ

Сурет 30 – ЛФ және оның пептидтерінің *E. coli*-штамы өсуінің тежелуіне әсері (n=3)

ЛФ және оның пептидтері қосылған ортада *E. coli* өсуі бақылаумен салыстырып қарағанда айтарлықтай тежелді.

Кесте 8. Лактоферрин және оның пептидтерінің антимикробтық әсері

№	Үлгілер	Тест штамдары өсуінің тежелу аймағы (мм)	
		<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
1	Бақылау 1 (dH ₂ O)	-	-
2	Бақылау 2 (антибиотик)	26,2 ± 0,02	23,5 ± 0,02
3	Лактоферрин	12,3 ± 0,02	9,6 ± 0,01
4	Пептидтер (90 минутта)	16,8 ± 0,02	14,7 ± 0,03
5	Пептидтер (120 минутта)	13,4 ± 0,04	11,2 ± 0,03

E. coli өсуінің тежелу аймағы ЛФ-та 12,4±0,02 мм болса, 90 минутта алынған пептидте 16,8 мм±0,02, 120 минуттан кейін алынған пептидте 13,4мм±0,04 болды (кесте 8). Бақылау 2 (антибиотик қосылған) нұсқасында *E. coli* өсуінің тежелу аймағы 26,2мм±0,02 құрады. Алынған нәтижелер көрсеткендей, сынама үлгілерінің ішінен ЛФ пептидтері максималды *E. coli* өсуінің тежеу белсенділігін 90 минут пен 120 минутта көрсетті. ЛФ-тің *E. coli*-

ге қарсы әсерін зерттеу нәтижесінде шартты патогенді бактериялардың жасушаларының өсуіне тежегіш әсер көрсететіндігі анықталды. Сонымен қатар, лактоферрин және оның пептидтері *Staphylococcus aureus* штаммының өсуін тежейтін аймағы *E.coli*-мен салыстырғанда төмен болды. Сондықтан, лактоферрин пептидтері бактериялардың өсуін тежейтін қасиетін көруімізге болады. Алдыңғы зерттеулерге сәйкес, бие сүті ЛФ мен оның пептидтері патогенді бактерияға қарсы белсенділігі оның амин қышқылдық құрамына байланысты болуы мүмкін. Олар лактоферрин белогы пептидтерінің микробқа қарсы белсенділігі негізінен гидрофобтылықпен, катиондық зарядқа байланысты. Олардың көпшілігі мембрана деполяризациясын тудыруы мүмкін.

Bushra Niaz және т.б. зерттеулеріне сәйкес [173], түйе сүтіндегі ЛФ-тың антимикробтық қасиеті мөлшерге тәуелді болған. Бактериялардың өсу аймағының тежелуі ең төменгі концентрацияда басталып, мөлшері артқан сайын сәйкесінше тежелу зонасының да үлкейгендігі байқалған. *Escherichia coli* жағдайында ингибирлену зонасы 10 мм-ден 28 мм-ге дейін, ал *Staphylococcus aureus* бактериясында 10 мм-ден 20 мм дейін жеткен. Бұл әртүрлі сүтқоректі жануарлардан алынған ЛФ байланысты болған. Дегенмен, түрлі сүтқоректі жануарлардың ЛФ құрылымы анағұрлым ерекшеленетін болғандық, сәйкесінше әртүрлі деңгейде антибактериялық қасиет көрсетеді.

Әдебиет көздерінде келтірілгендей, ЛФ және оның пептидтерінің бактерицидтік әсері, оның бактерия жасушасының мембранасымен байланысуына тікелей тәуелді. ЛФ грамм теріс бактериялардың сыртқы жасушасында болатын А липополисахаридтегі липидпен тікелей байланысу арқылы сыртқы жасушаны зақымдайтындығы туралы айтылған. Белоктың оң зарядталған N-соңы бактерия мембранасындағы липополисахаридтердің Ca^{2+} және Mg^{2+} катиондармен байланысқа түсуіне кедергі келтіріп, А липидтің мембранадан босап шығуына алып келеді, нәтижесінде мембрана зақымданып, бактерия тіршілігін жояды. ЛФ-тың полисахаридпен байланысуы сонымен қатар лизоцим сияқты табиғи антибактериялық агенттердің әсерін күшейтеді. Грамм оң бактерияларға қарсы ЛФ әсері оң зарядталған белок бактерияның беткі жағындағы липотейхой қышқылы сияқты аниондық молекулалармен байланысуына негізделген. Нәтижесінде жасуша қабығының оң заряды азаяды, салдарынан лизоцимнің пептидогликанмен байланысуын қамтамасыз етіп, оның ыдырауына алып келеді.

3.5 Лактоферрин белогының биологиялық белсенді пептидтерін анықтау

Лактоферрин белогы антимикробтық, иммуномодуляциялаушы және гипертензияға қарсы әсері бар әртүрлі пептидтерді өндіру үшін жақсы биологиялық материал болып табылады. Пептидтер аминқышқылдарынан тұратын қысқа тізбекті белок молекулалары. Олар жасушалардың бөлінуін қамтамасыз етіп, қартаюдың алдын алады. Сондай-ақ, пептидтерді препарат

ретінде қолдану қатерлі ісіктердің дамуын азайтып, адамның өмір сүру ұзақтығын арттырады [165].

Ағзада белоктардың ыдырауы протеазалармен (пепсин, трипсин және химотрипсин) жүзеге асады. Пепсин тұз қышқылымен белсеніп, асқазандағы белоктардың бастапқы гидролизіне жауап береді. Ол тирозин, фенилаланин және триптофан аминқышқылы қалдықтарының жанындағы пептидтік байланыстарды үзеді. Белок гидролизі одан әрі ішектегі трипсин мен химотрипсиннің әсерімен аяқталады. Трипсин лизин мен аргинин аминқышқылы жанындағы пептидтік байланыстарды үзеді. Осылайша полипептидті тізбек гидролизінен қысқа, ди-, үш- және ұзын тізбекті (олиго) пептидтер түзіледі.

Сүт сарысуы құрамындағы лактоферрин ауыз қуысында механикалық әсерге ұшырамай, тікелей асқорыту жолына түседі. Оның ыдырауы жоғарыда сипатталғандай пепсин ферментімен басталып, одан әрі ішекте трипсин ферментімен толық гидролизденеді. Нәтижесінде түрлі биологиялық қасиеттерге бар белсенді пептидтері түзіледі.

Сондықтан, бие сүті лактоферрин белогын трипсин ферментімен өңдеп, MS талдау нәтижесінде қысқа тізбекті және ұзын тізбекті 56 пептид анықталды. Түзілген пептидтерді *ProtParam* бағдарламасымен өңдеу нәтижесінде теориялық молекулалық салмағы мен изоэлектрлік нүктесінің мәндері анықталды. Биоинформатикалық бағдарламалар көмегімен пептидтердің биологиялық белсенділігі мен суда ерігіштік қасиеті сипатталды. Сонымен қатар, пептидтерді бөліп алу, қолдану саласы және т.б. мақсаттарға сәйкес төмендегідей жіктелді.

Лактоферрин белогының пептидтерін *катионды*, *анионды* және *бейтарап пептидтер* (катионды және аниондыға жатпайтын пептидтер) тізбегіне жіктелді. Катионды пептидтер полипептидтердің кіші топтарының бірі болып табылатын бактерияға қарсы әсердің кең спектрімен ерекшеленеді, тек бактериялық инфекцияларға ғана емес, сонымен қатар микоздар мен протозооноздарға да әсер етеді [166]. Потогенді микроорганизмдерге қарсы белсенділігі және/немесе иммуномодуляциялық белсенділігі бар катионды пептидтер кез келген тірі организмде кездеседі және олардың ішкі қорғаныс жүйесінің маңызды құрамдас бөлігі.

Бифидобактериялар пептидтер әсерінен активтенуін негізінен белгілі функционалдық жүктемені тасымалдаушы төменгі молекулалық катионды пептидтердің нативті белоктан босап шыққан соң жасушаның беткі жағында мембраналық рецепторлармен байланысып, ары қарай жасушаға жеңіл енуі мүмкін. Бұл процесс қабыну және иммундық жауап кезінде жасушалардағы биологиялық функцияларды жақсарту арқылы патогенді микроорганизмдерге қарсы белсенділікті арттырып және иммунитетті жақсартады.

Пептидтік тізбектердің ішінде оң зарядталған аминқышқылы қалдықтары санының (Arg+Lys) жоғары болуына байланысты катиондық пептидтер тізіміне жіктелді. Бие сүті лактоферрин белогындағы катионды пептидтердің аминқышқылдық тізбегі (кесте 9) келтірілді.

Катиондық пептидтер саны – 13. Пептидтер бес аминқышқылы (FCLFK) және он бес аминқышқылы қалдығы (KSDADLTWNSLSGKK, KTSSFECIQAIANK) аралығында болды. Катионды пептидтердің теориялық молекулалық массасы бойынша ең төмен 656.84 Да FCLFK пептиді болса, сәйкесінше молекулалық массасы жоғары 1652.95 Да RCSSSPLEACAFLR пептиді болды. Сонымен қатар, теориялық және MS талдау нәтижесінде анықталған он үш пептидтің бесеуінде молекулалық массасына байланысты айырмашылықтар байқалды (GPSVSCIR; KTSSFECIQAIANK; QYPNLCR; FCLFK; RCSSSPLEACAFLR). Молекулалық массасы бойынша айырмашылы бар пептидтер тоғызыншы кестеде көрсетілді. Пептидтердің молекулалық массасы арасындағы айырмашылық темір ионының атомдық массасына ~56 сәйкес келді, яғни бұл көрсеткіш лактоферрин белогының темір иондарын байланыстыру, тасымалдау және темірдің деңгейін реттеу тәрізді ерекше қасиетімен тығыз байланыстылығына сәйкес болуы мүмкін.

Аминқышқылдары амин және карбоксилат бөліктері (N, O-хелаттау) арқылы әртүрлі металл иондары бар тұрақты бес мүшелі хелаттар түзеді. Бірнеше аминқышқылдарының бүйірлік тізбегінде металдарды байланыстыра алатын орны бар және осылайша әртүрлі құрылымдары бар металл кешендерін құрайды. Гистидин имидазол сақинасы (His), тирозин фенол сақинасы (Tyr) және цистеин тиол тобы (Cys) сияқты топтар белоктардағы металдарды байланыстыратын маңызды орындар болып табылады, сонымен қатар сәйкесінше аспартат (Asp) және глутамат (Glu) b - және G-карбоксилат топтары және тиоэфир бөлігі метиониндер (Met) металдарды байланыстыруға жиі қатысады [167]. Белоктар мен пептидтедің биологиялық функциясының жүзеге асуы лигандты байланыстыратын аминқышқылы қалдықтары мен металл иондарының өзара әрекеттесуіне байланысты. Молекулалық механизм металл иондарын белоктардағы белгілі бір қалдықтармен байланыстыруды қамтиды [168]. ЛФ-тың 680-694 аралығында орналасқан RCSSSPLEACAFLR пептидінің басқа катиондық пептидтерден айырмашылығы екі темір молекуласын байланыстыруымен ерекшеленді. Себебі, цистеин аминқышқылының тиол тобы (Cys) темір иондарын байланыстыру қасиетімен түсіндіріледі. Биологиялық белсенді пептидтердің құрамында цистеин аминқышқылы темір молекуласын байланыстыруда маңызды қызмет атқарады.

Катионды пептидтердің биологиялық белсенділігі мен суда ерігіштігі сипатталды. *PeptideRanker* көрсеткіші бойынша 0,5-тен жоғары пептидтер биологиялық белсенді пептид ретінде белгіленеді [169]. Биологиялық белсенділік көрсеткіштері 0,50-ден жоғары пептидтер көрсетілген (кесте 8). Биологиялық белсенділік көрсеткіші неғұрлым жоғары болса, пептидтің белсенді болу ықтималдығы соғұрлым жоғары болады. Катионды пептидтердің ішінде *PeptideRanker* шегі 0,5-тен төмен көрсеткіш көрсеткен бес пептид анықталды. Олар келесідей: KGS GFQLNQLQGVK, KTSSFECIQAIANK, VPSHAVVAR, LRPVAAEVYQTR, YYAVAVVK. Бір

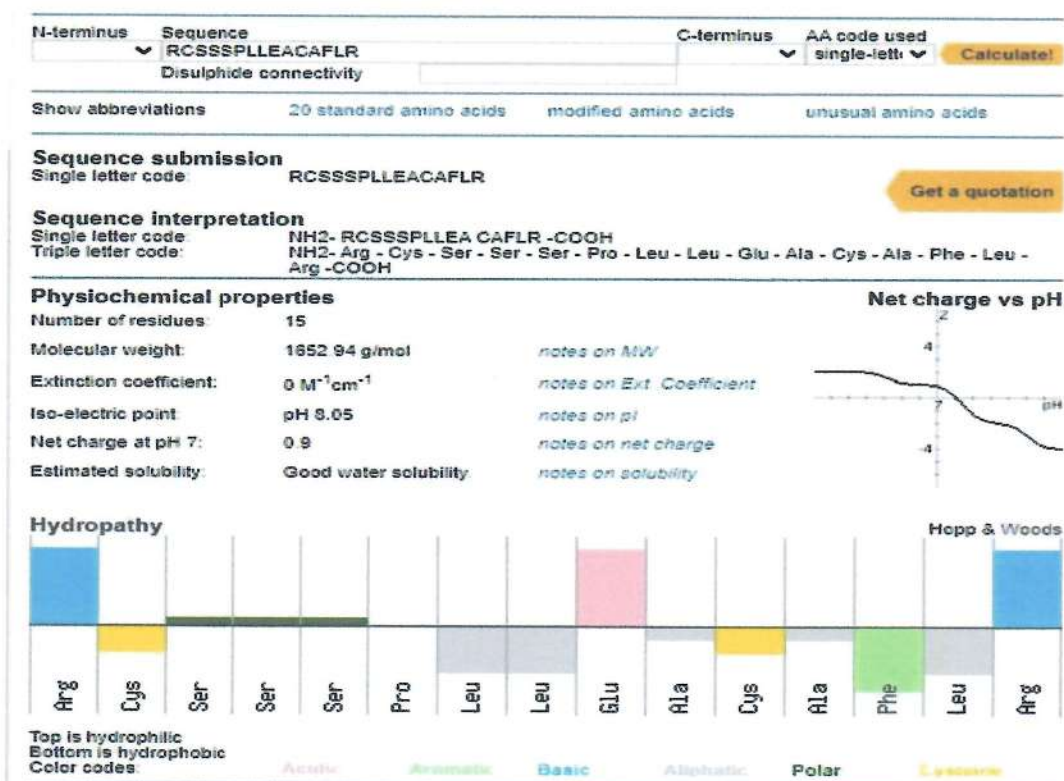
Кесте 9. Лактоферрин белогының катионды пептидтері

P/c	ЛФ белогында кездесетін аймағы	Пептидік тізбегі	Аминк ышқыл ы саны	Мол. салмағы (Da)		pI	Био. белсенділік	Суда ерігіштігі	Формуласы
				MS	Теориял ық				
1	635 – 639	FCLFK	5	713.348	656.84	8,22	0.946878	нашар	C ₃₃ H ₄₈ N ₆ O ₆ S ₁
2	680 – 694	RCSSSPLEACAFLR	15	1765.86	1652.95	8,07	0.855151	жақсы	C ₇₀ H ₁₁₇ N ₂₁ O ₂₁ S ₂
3	289 – 296	SSAFQLFK	8	926.48	927.07	8,47	0.853383	нашар	C ₄₄ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₂
4	171-177	QYPNLCR	7	949.44	893.03	8,22	0.749108	нашар	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₂ O ₁₁ S ₁
5	529 – 537	YYGYTGAFR	9	1096.50	1097.20	8,5	0.624263	нашар	C ₅₃ H ₆₈ N ₁₂ O ₁₄
6	37 – 44	GPSVSCIR	8	874.43	817.96	8,25	0.60367	жақсы	C ₃₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₁₁ S ₁
7	447 – 461	KSDADLTWNSLSGKK	15	1648.85	1649.82	8,5	0.590291	жақсы	C ₇₁ H ₁₁₆ N ₂₀ O ₂₅
8	107-119	GSGFQLNQLQGVK	13	1374.73	1375.55	10,12	0.531161	нашар	C ₆₀ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₉
9	106-119	KGSGFQLNQLQGVK	14	1502.82	1503.72	10	0.472252	жақсы	C ₆₆ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₂₀
10	45 – 59	KTSSFECIQAIANK	15	1666.84	1610.85	8,2	0.243536	жақсы	C ₆₉ H ₁₁₅ N ₁₉ O ₂₃ S ₁
11	256-264	VPSHAVVAR	9	934.53	935.09	9,73	0.240973	нашар	C ₄₁ H ₇₀ N ₁₄ O ₁₁
12	80-91	LRPVAAEVYQTR	12	1401.77	1402.62	8,75	0.126952	жақсы	C ₆₂ H ₁₀₃ N ₁₉ O ₁₈
13	98-105	YYAVAVVK	8	911.51	912.10	8,5	0.0912264	нашар	C ₄₅ H ₆₉ N ₉ O ₁₁

темір атомын байланыстыратын KTSSFECIQAIANK пептиді биологиялық белсенділігі төмен пептидтердің қатарында кездесті. Биологиялық белсенділігі жоғары, суда жақсы еритін пептид RCSSSPLEACAFLR (ID 170657277448062) анықталды.

Биологиялық белсенді пептидтердің суда ерігіштігі олардың физиологиялық функцияларында маңызды рөл атқарады [170]. Дәрілік заттардың суда ерігіштігі олардың сіңіру және таралу сипаттамалары үшін өте маңызды [171]. Дәрілік препараттардың сәтсіздігі, әдетте нашар ерігіштігіне байланысты жеткіліксіз сіңірілуден туындайды [172]. Катионды пептидтердің суда ерігіштігі жақсы пептидтер саны алтау және суда ерігіштігі нашар жеті катионды пептид анықталды.

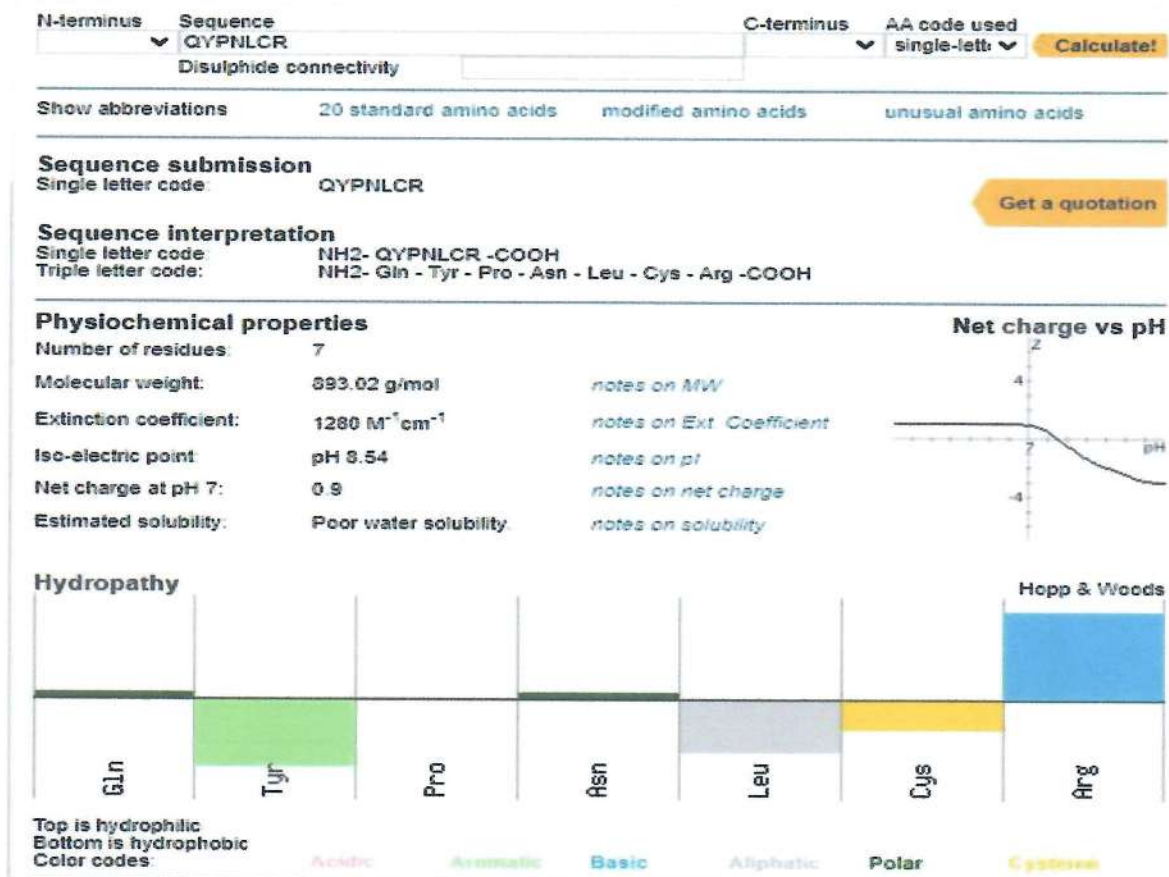
Темір иондарын байланыстыратын пептидтердің ішінде суда жақсы еритіндері RCSSSPLEACAFLR, GPSVSCIR, KTSSFECIQAIANK пептидтері анықталды, дегенмен KTSSFECIQAIANK пептидінің биологиялық белсенділігі төмен пептид қатарында. Катионды пептидтердің



Сурет 31 – Катионды пептидтердің ішіндегі суда ерігіштігі жақсы RCSSSPLEACAFLR пептиді

арасынан RCSSSPLEACAFLR пептиді екі темір ионын байланыстыратын, суда ерігіштігі жақсы және биологиялық белсенділігі жоғары пептид болып табылды (сурет 31).

Сонымен қатар, темір ионын байланыстыратын пептидтердің арасынан биологиялық белсенділігі жоғары, бірақ суда ерігіштігі нашар QYPNLCR катионды пептиді анықталды (сурет 32).



Сурет 32 – Катионды пептидтердің ішіндегі суда ерігіштігі нашар QYPNLCR пептиді

Пептидтік тізбектердің ішінде теріс зарядталған аминқышқылы қалдықтардың жалпы саны (Asp+Glu) жоғары болуына байланысты аниондық пептидтер тізіміне жіктелді. Анионды пептидтердің аминқышқылдық тізбегі (кесте 10) келтірілді. Анионды пептидтер саны – 23. Пептидтер алты аминқышқылы (EDLIWR) және отыз алты аминқышқылы қалдығы (VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK) аралығында болды. Анионды пептидтердің теориялық молекулалық массасы бойынша ең төмен 830,94 Да EDLIWR пептиді болса, жоғары 3601.10 Да VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK пептиді болды.

Анионды пептидтердің теориялық және MS талдау нәтижесінде анықталған жиырма үш пептидтің он үшінші молекулалық массасында айырмашылықтар байқалды (DSTVFENLPDEADRDKYELLCPDNTR; LCAGTEADKACSSQEPYFGYSGAFK, VLFLQQDQFGGNGPDCPGK, QEDFELLCLDGTR, DLKQEDFELLCLDGTR, CLENGAGDVAFVK, FFSQSCAPGADPQSSLCALCVGNENENK, VACASASTTEECIALVLK, VVWCAVGPEEERK, NLLFNDNTECLAELQGK, VVWCAVGPEEER, YELLCPDNTR, VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK). Молекулалық массасы бойынша айырмашылы бар пептидтер оныншы кестеде көрсетілді. Пептидтердің молекулалық массасы арасындағы айырмашылық темір ионының атомдық массасына ~56 сәйкес келді, яғни бұндай көрсеткіш

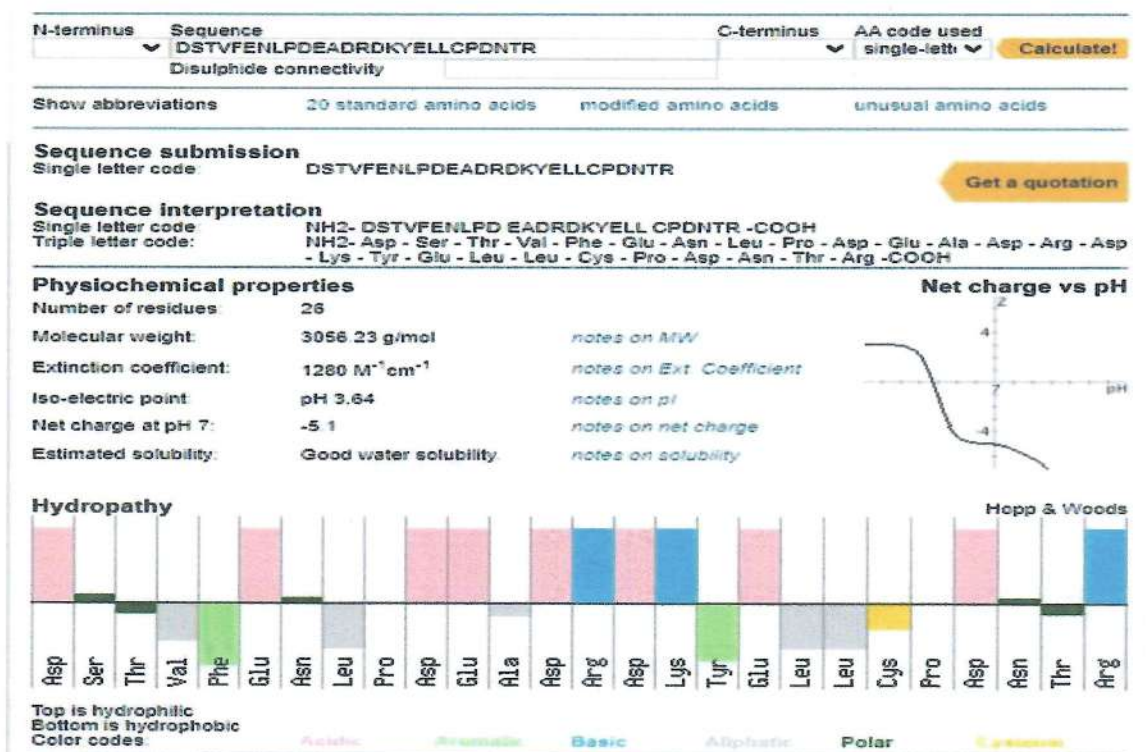
Кесте 10. Лактоферриннің анионды пептидтері

P/c	ЛФ белогында кездесетін аймағы	Пептидтік тізбегі	Саны	Мол. салм. (Da)		pI	Био белсенділігі	Суда ерігіштігі	Формуласы
				MS	Теориялық				
1	217-242	DSTVFENLPDEADRDKYELLCPDNTR	26	3111.42	3056.26	4,03	0.576631	жақсы	C ₁₂₉ H ₁₉₉ N ₃₅ O ₄₉ S ₁
2	178-203	LCAGTEADKCACSSQPERYFGYSGAFK	26	2903.23	2734.02	4,68	0.547725	жақсы	C ₁₁₈ H ₁₇₃ N ₂₉ O ₄₀ S ₃
3	270 – 275	EDLIWR	6	830.43	830.94	4,37	0.538623	жақсы	C ₃₈ H ₅₈ N ₁₀ O ₁₁
4	60-79	ADAVTLGGGLVYEAGLHPYK	20	2088.05	2089.33	4,54	0.521757	нашар	C ₉₅ H ₁₄₅ N ₂₃ O ₃₀
5	616 – 634	VLFLQQDQFGGNGPDCPGK	19	2075.99	2020.25	4,21	0.520063	жақсы	C ₈₉ H ₁₃₄ N ₂₄ O ₂₈ S ₁
6	572 – 584	QEDFELLCLDGTR	13	1594.7364	1538.69	3,92	0.518295	жақсы	C ₆₅ H ₁₀₃ N ₁₇ O ₂₄ S ₁
7	393 – 410	GEADALNLDGGFIYVAGK	18	1808.9003	1809.99	4,03	0.51662	жақсы	C ₈₁ H ₁₂₄ N ₂₀ O ₂₇
8	569 – 584	DLKQEDFELLCLDGTR	16	1950.9435	1895.11	4,11	0.507307	жақсы	C ₈₁ H ₁₃₁ N ₂₁ O ₂₉ S ₁
9	492 – 520	FFSQSCAPGADPQSSLCALCVGNENENK	29	3200.37	3031.29	4,14	0.502186	жақсы	C ₁₂₅ H ₁₉₂ N ₃₆ O ₄₆ S ₃
10	448 – 460	SDADLTWNSLSGK	13	1392.66	1393.47	4,21	0.496031	жақсы	C ₅₉ H ₉₂ N ₁₆ O ₂₃
11	204-216	CLENGAGDVAFVK	13	1378.66	1322.50	4,37	0.374738	жақсы	C ₅₇ H ₉₁ N ₁₅ O ₁₉ S ₁
12	265-275	SVDGREDLIWR	11	1344.69	1345.48	4,56	0.36692	жақсы	C ₅₈ H ₉₂ N ₁₈ O ₁₉
13	375 – 392	VACASASTTEECIALVLK	18	1921.9620	1809.12	4,53	0.254547	нашар	C ₇₆ H ₁₃₃ N ₁₉ O ₂₇ S ₂
14	351 – 363	VVWC AVGPEERK	13	1557.77	1501.72	4,79	0.245985	жақсы	C ₆₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₂₀ S ₁
15	644 – 660	NLLFNDNTECLAELQK	17	1977.95	1922.14	4,14	0.228142	жақсы	C ₈₂ H ₁₃₂ N ₂₂ O ₂₉ S ₁
16	351 – 362	VVWC AVGPEER	12	1429.67	1373.55	4,25	0.201303	жақсы	C ₆₀ H ₉₂ N ₁₆ O ₁₉ S ₁
17	233-242	YELLCPDNTR	10	1279.60	1223.37	4,37	0.200803	жақсы	C ₅₂ H ₈₂ N ₁₄ O ₁₈ S ₁
18	375 – 410	VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK	36	3712.8641	3601.10	4,18	0.119972	нашар	C ₁₅₇ H ₂₅₅ N ₃₉ O ₅₃ S ₂
19	217-232	DSTVFENLPDEADRDK	16	1849.84	1850.91	3,96	0.10765	жақсы	C ₇₇ H ₁₁₉ N ₂₁ O ₃₂
20	217-230	DSTVFENLPDEADR	14	1606.72	1607.65	3,77	0.0986029	жақсы	C ₆₇ H ₁₀₂ N ₁₈ O ₂₈
21	551 – 561	DVTVLQNTDGK	11	1188.60	1189.29	4,21	0.0757897	жақсы	C ₄₉ H ₈₄ N ₁₄ O ₂₀
22	661 – 679	TTYEQYLGSEYVTSITNLR	19	2237.10	2238.44	4,53	0.069327	нашар	C ₉₉ H ₁₅₂ N ₂₄ O ₃₅
23	339 – 347	ETAAEVAAR	9	916.46	916.99	4,53	0.0597562	жақсы	C ₃₇ H ₆₄ N ₁₂ O ₁₅

лактоферрин белогының темір иондарын байланыстыру, тасымалдау және темірдің деңгейін реттеу тәрізді ерекше қасиетімен тығыз байланыстылығына сәйкес болуы мүмкін.

Аталған аниондық пептидтердің басқа аниондық пептидтерден айырмашылығы темірді байланыстыру белсенділігі жоғары. ЛФ-тың 375-410 VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK, 375-392 VACASASTTEECIALVLK, аралығында орналасқан пептидтің басқа аниондық пептидтерден айырмашылығы екі темір молекуласын байланыс-руымен ерекшеленді. Сонымен қатар, аниондық пептидтердің ішінде 492-520 (FFSQSCAPGADPQSSLCALCVGNENENK) орналасқан пептид үш темір молекуласын байланыстыруымен ерекшеленді. Биологиялық белсенді катионды пептидтермен салыстырғанда анионды пептидтерде темір молекуласын байланыстыру белсенділігі жоғары болатындығы анықталды.

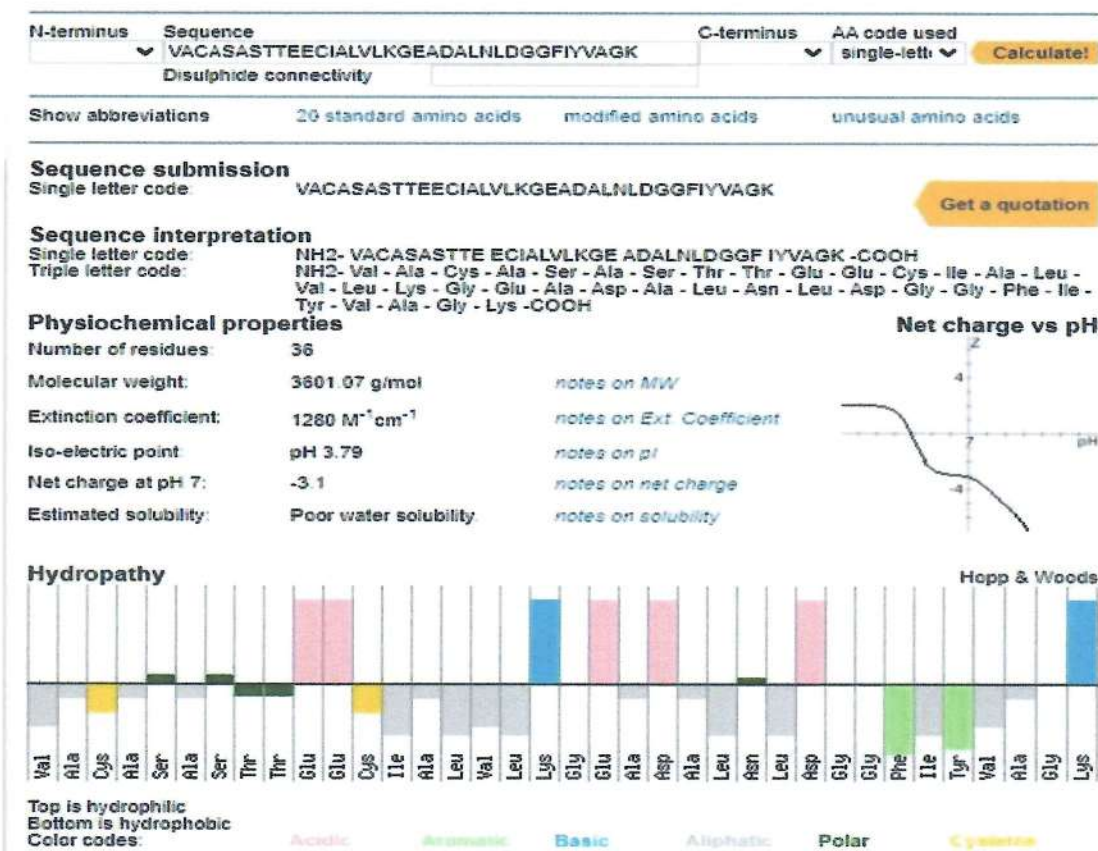
Суда ерігіштігі жақсы анионды пептидтер саны он тоғыз және суда ерігіштігі нашар төрт анионды пептид анықталды. Темір иондарын байланыстыратын пептидтердің ішінде суда жақсы еритін (сурет 33) DSTVFENLPDEADRDKYELLCPDNTR, DLKQEDFELLCLDGTR, VLFLQQDQFGGNGPDCPGK, LCAGTEADKACSSQEPYFGYSGAFK, QEDFELLCLDGTR, FFSQSCAPGADPQSSLCALCVGNENENK, CLENGAGDVAFAVK, VVWCAVGPEEERK, NLLFNDNTECLAELQGK, VVWCAVGPEEER, YELLCPDNTR пептидтері анықталды.



Сурет 33 – Анионды пептидтердің ішіндегі суда ерігіштігі жақсы DSTVFENLPDEADRDKYELLCPDNTR пептиді

Сонымен қатар, темір иондарын байланыстыратын анионды пептидтердің арасынан, суда нашар еритін пептидтер қатарында

VACASASTTEECIALVLK, VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIY-VAGK болатындығы анықталды (сурет 34).



Сурет 34 – Анионды пептидтердің ішіндегі суда ерігіштігі нашар VACASASTTEECIALVLKGEADALNLDGGFIYVAGK пептиді

Анионды пептидтердің биологиялық белсенділік *PeptideRanker* көрсеткіштері 0,50-тен жоғары пептидтер көрсетілген (кесте 10). Биологиялық белсенділігі бойынша, анықталған жиырма үш анионды пептидтердің ішінен тоғыз пептидтің биологиялық белсенділігі *PeptideRanker* көрсеткіштері 0,50-тен жоғары болды. Анионды пептидтердің ішінде *PeptideRanker* шегі 0,5-тен төмен көрсеткіш көрсеткен он төрт пептид анықталды. Соның ішінде, биологиялық белсенділігі жоғары лактоферрин белогының 217-242 аминқышқылы аралығында орналасқан DSTVFENLPDEADRDKYELLCPDN-TR (ID 170657492448166) пептиді болса, керісінше биологиялық белсенділігі төмен пептидке лактоферрин белогының 339-347 аминқышқылы аралығында орналасқан ETAAEVAAR (ID 170657505148171) пептиді анықталды.

Катиондық және аниондық пептидтер қатарына жатпайтын аминқышқылынан түзілген тізбектерді бейтарап пептидтер деп жіктелді. Бейтарап пептидтер саны – 20. Пептидтер жеті аминқышқылы (NSEPWAK) және жиырма төрт аминқышқылы қалдығы (SQNSNAPDCVHRPPEGYLAVAVVR) аралығында болды. Бейтарап

Кесте 11. Бие сүті лактоферрин белогының бейтарап пептидтері

P/c	ЛФ белогында кездесетін аймағы	Пептидтік тізбегі	Саны	Мол. салм (Da)		pI	Био белсенділік	Суда ерігіштігі	Формуласы
				MS	Теориялық				
1	681 – 694	CSSSPLEACAFLR	14	1609.77	1496.76	5,99	0.906249	нашар	C ₆₄ H ₁₀₅ N ₁₇ O ₂₀ S ₂
2	187-203	CACSSQEPYFGYSGAFK	17	1957.80	1845.03	5,99	0.76135	нашар	C ₈₂ H ₁₁₃ N ₁₉ O ₂₆ S ₂
3	154-170	AVANFFSASCVPADGK	17	1799.80	1686.92	5,86	0.692434	нашар	C ₇₃ H ₁₁₁ N ₁₉ O ₂₃ S ₂
4	316 – 338	IPSQIDSGLYLGANYLTATQNLRL	23	2507.32	2508.81	5,83	0.687433	нашар	C ₁₁₁ H ₁₇₈ N ₃₀ O ₃₆
5	303 – 315	DLLFKDSALGFVR	13	1479.80	1480.73	5,96	0.65786	жақсы	C ₆₉ H ₁₀₉ N ₁₇ O ₁₉
6	308 – 315	DSALGFVR	8	863.45	863.97	5,84	0.623991	жақсы	C ₃₈ H ₆₁ N ₁₁ O ₁₂
7	615 – 634	KVLFLLQQDQFGGNGPDCPGK	20	2204.08	2148.42	5,95	0.52697	жақсы	C ₉₅ H ₁₄₆ N ₂₆ O ₂₉ S ₁
8	447 – 460	KSDADLTWNSLSGK	14	1520.76	1521.65	5,96	0.498055	жақсы	C ₆₅ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₂₄
9	562 – 568	NSEPWAK	7	830.39	830.90	6,00	0.471141	жақсы	C ₃₇ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₂
10	297 – 307	STPENKDLLFK	11	1290.68	1291.47	5,79	0.416373	жақсы	C ₅₈ H ₉₄ N ₁₄ O ₁₉
11	585 – 597	KPVAEAEESCHLAR	13	1466.74	1410.61	6,75	0.410762	жақсы	C ₅₉ H ₉₉ N ₁₉ O ₁₉ S ₁
12	366 – 373	QWSDVSNR	8	990.45	991.03	5,84	0.408838	жақсы	C ₄₁ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₅
13	543 – 550	AGDVAFVK	8	805.43	805.93	5,88	0.384077	жақсы	C ₃₇ H ₅₉ N ₉ O ₁₁
14	14 – 24	WCTISPAEAAK	11	1232.59	1176.35	5,99	0.296886	жақсы	C ₅₂ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₆ S ₁
15	411 – 422	CGLVPVLAENQK	12	1326.69	1270.51	5,99	0.286924	нашар	C ₅₅ H ₉₅ N ₁₅ O ₁₇ S ₁
16	423 – 446	SQNSNAPDCVHRPPGEGYLA VAVVR	24	2635.30	2579.87	6,47	0.235445	жақсы	C ₁₁₀ H ₁₇₅ N ₃₅ O ₃₅ S ₁
17	46-59	TSSFECIQAIANK	14	1538.74	1482.67	5,66	0.232932	нашар	C ₆₃ H ₁₀₃ N ₁₇ O ₂₂ S ₁
18	374 – 392	KVACASASTTEECIALVLK	19	2050.05	1937.30	6,13	0.227817	жақсы	C ₈₂ H ₁₄₅ N ₂₁ O ₂₈ S ₂
19	598 – 609	APNHAVVSQSDR	12	1279.63	1280.36	6,79	0.123789	жақсы	C ₅₂ H ₈₅ N ₁₉ O ₁₉
20	661 – 680	TTYEQYLGSEYVTSITNLRR	20	2393.20	2394.62	5,81	0.0680152	жақсы	C ₁₀₅ H ₁₆₄ N ₂₈ O ₃₆

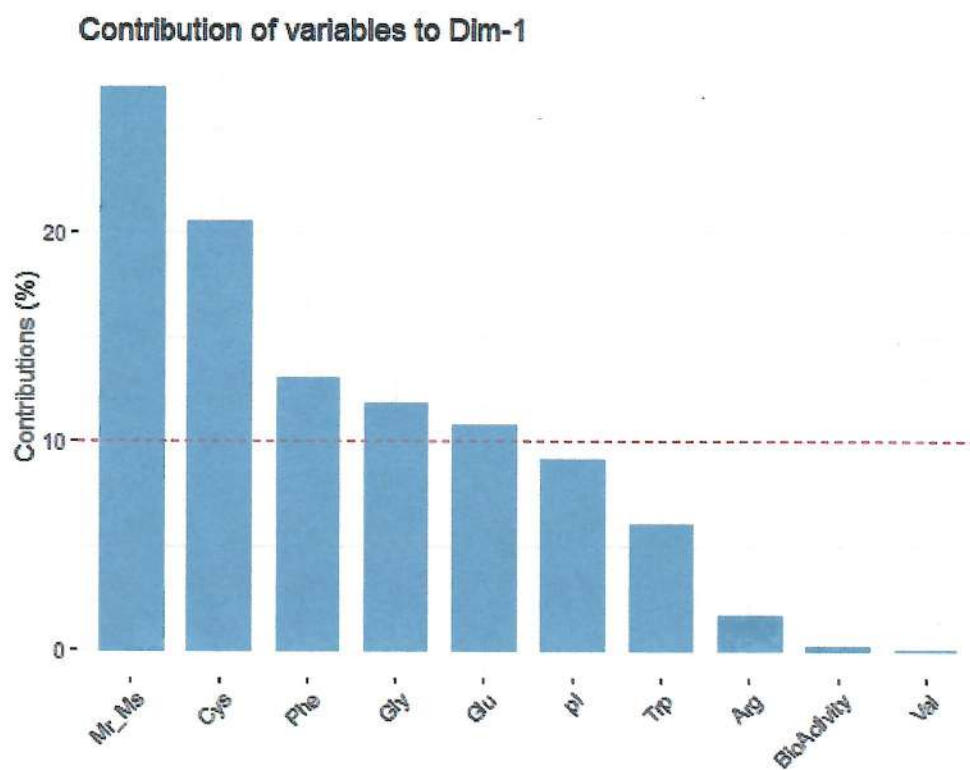
пептидтердің теориялық молекулалық массасы бойынша ең төмен 830,90 Да EDLIWR пептиді болса, жоғары 2579,87 Да SQNSNAPDCVHRPPEGYLAVA-VVR пептиді болды.

Бейтарап пептидтердің теориялық және MS талдау нәтижесінде анықталған жиырма пептидтердің арасынан темір ионы молекуласын байланыстыратын он пептид анықталып, қанық қара түспен ерекшеленді (кесте 11). Бейтарап пептидтердің арасынан екі темір молекуласын байланыстыратын пептидтер тізімі келесідей: AVANFFSASCVPCADGK (154-170), CACSSQEPYFGYSGAFK (187-203), KVACASASTTEECIALVLK (374-392), CSSSPLLEACAFLR (681- 694).

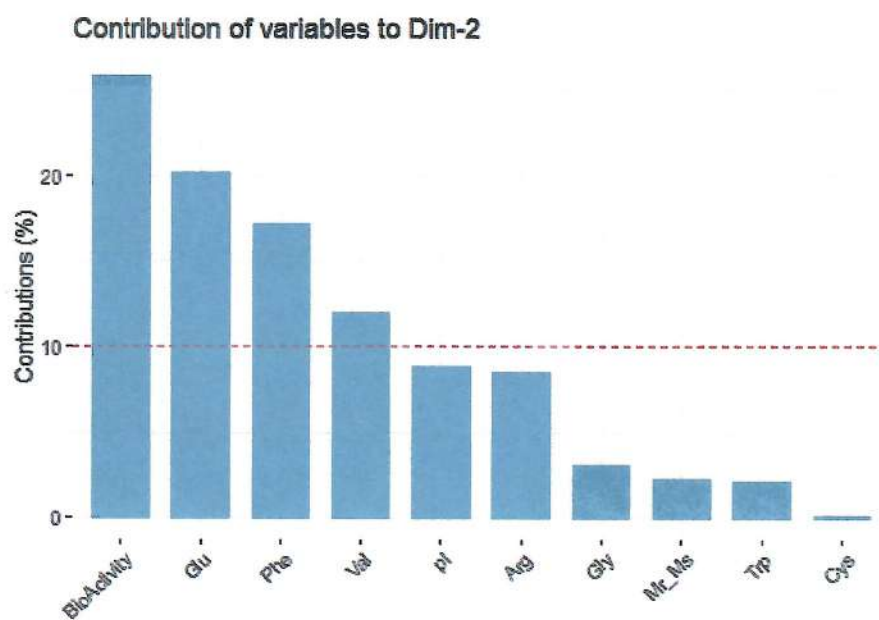
Бейтарап пептидтердің биологиялық белсенділік көрсеткіштері *PeptideRanker* шегі 0,50-ден жоғары пептидтер көрсетілген (кесте 11). Биологиялық белсенділігі бойынша, анықталған жиырма бейтарап пептидтердің ішінен жеті пептидтің биологиялық белсенділігі жоғары болды. Бейтарап пептидтердің ішінде *PeptideRanker* шегі 0,50-ден төмен көрсеткіш көрсеткен он үш пептид анықталды. Соның ішінде, биологиялық белсенділігі жоғары лактоферрин белогының 681-694 аминқышқылы аралығында орналасқан CSSSPLLEACAFLR (ID 17070283149054) анықталса, керісінше биологиялық белсенділігі төмен пептидке лактоферрин белогының 661-680 аминқышқылы аралығында орналасқан TTYEQYLGSEYVTSITNLRR (ID 17070283499081) пептиді анықталды.

Бейтарап пептидтер арасынан суда ерігіштігі жақсы пептидтер саны он төрт және суда ерігіштігі нашар алты пептид анықталды. Темір иондарын байланыстыратын пептидтердің ішінде суда жақсы еритін KVLFLQQDQFGGNGPDCPGK, SQNSNAPDCVHRPPEGYLAVAVVR, KPVAEAESECHLAR, WCTISPAEAAK, KVACASASTTEECIALVLK пептидтері анықталды. Темір ионын байланыстыратын пептидтердің ішінен биологиялық белсенділігі жоғары және суда ерігіштігі жақсы KVLFLQQDQFGGNGPDCPGK (615-634) пептиді анықталды.

Зерттеу нәтижесінде алынған пептидтердің аминқышқылдарының құрамы, ион алмасуы, суда ерігіштігі, молекулалық салмағы, биологиялық белсенділігі, pI және аллергенділігі сияқты көрсеткіштердің өзара корреляциясын анықтау үшін Пирсон корреляциясы қолданылды.

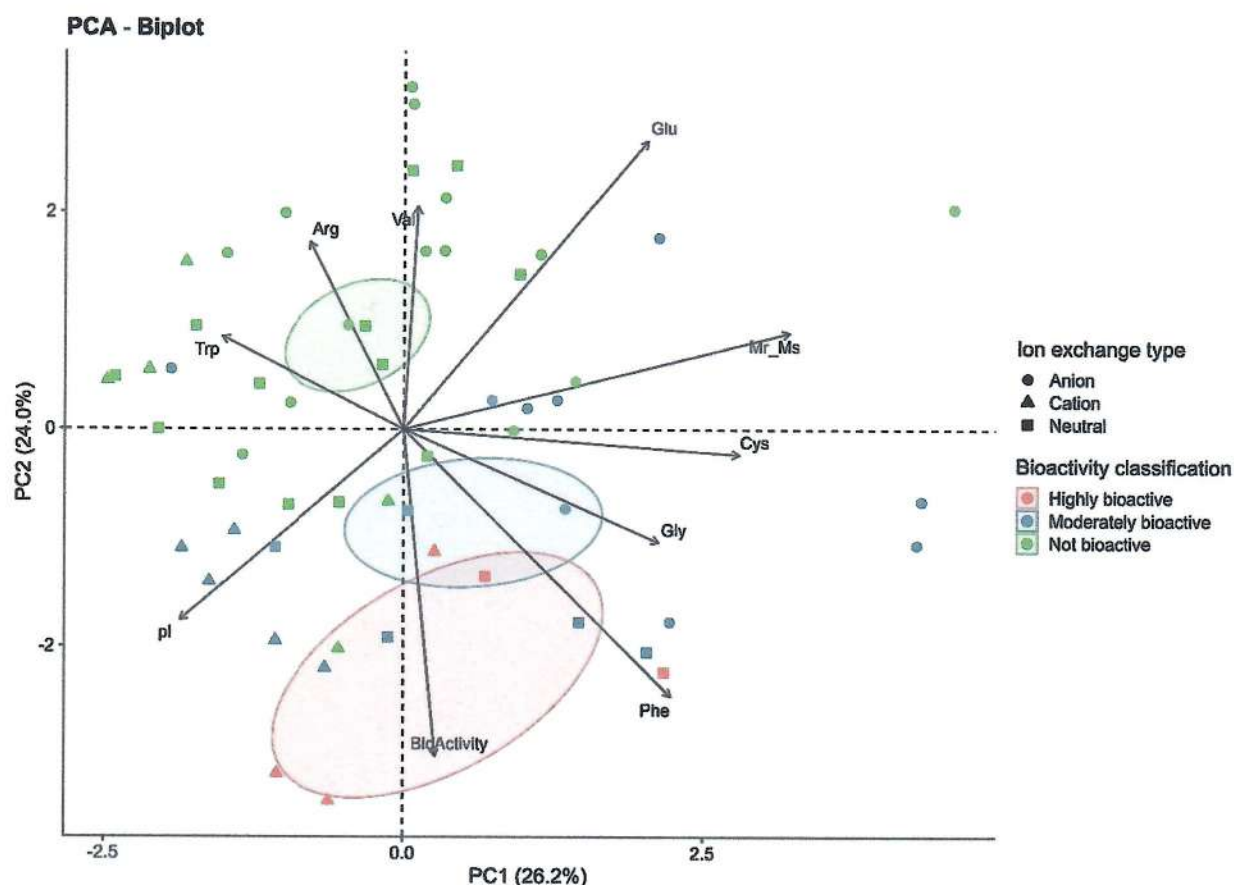


b)



c)

Сурет 36 – PCA нәтижелері. а) Scree plot; б) айнымалылардың PC1 үлесі; с) айнымалылардың PC2 үлесі



Сурет 37 – PC1-PC2 biplot

Скрипт сызбасына сүйене отырып, 1-негізгі компонент деректер жиынындағы өзгергіштіктің 26,2%, ал PC2 24,0% қамтиды деп қорытынды жасауға болады (сурет 36-37). Зерттелетін пептидтердің құрамында метионин (Met), пирролизин (Pyl) және селеноцистеин (Sec) аминқышқылдары болмағанын атап өткен жөн. Зерттеуге алынған 56 пептидтерінің ішінде тек катиондық және бейтарап пептидтер тамаша биологиялық белсенділік көрсетті ($>0,75$). Сонымен қатар, *biplot* деректеріне сүйене отырып, пептидтердің биоактивтілігі құрамында фенилаланин (Phe) бар пептидтерде жоғарым, ал валин (Val) амин қышқылы кездесетін пептидтерде теріс төмен екендігін көрсетті. Шынында да, биоактивті емес және биоактивті пептидтер PC2-ге анықтауға айтарлықтай үлес қосатын молекулалық массасы (Mr), глутамин қышқылы (Glu), Phe және валин (Val) құрамы сияқты айнымалылар бойынша екі топқа бөлінген.

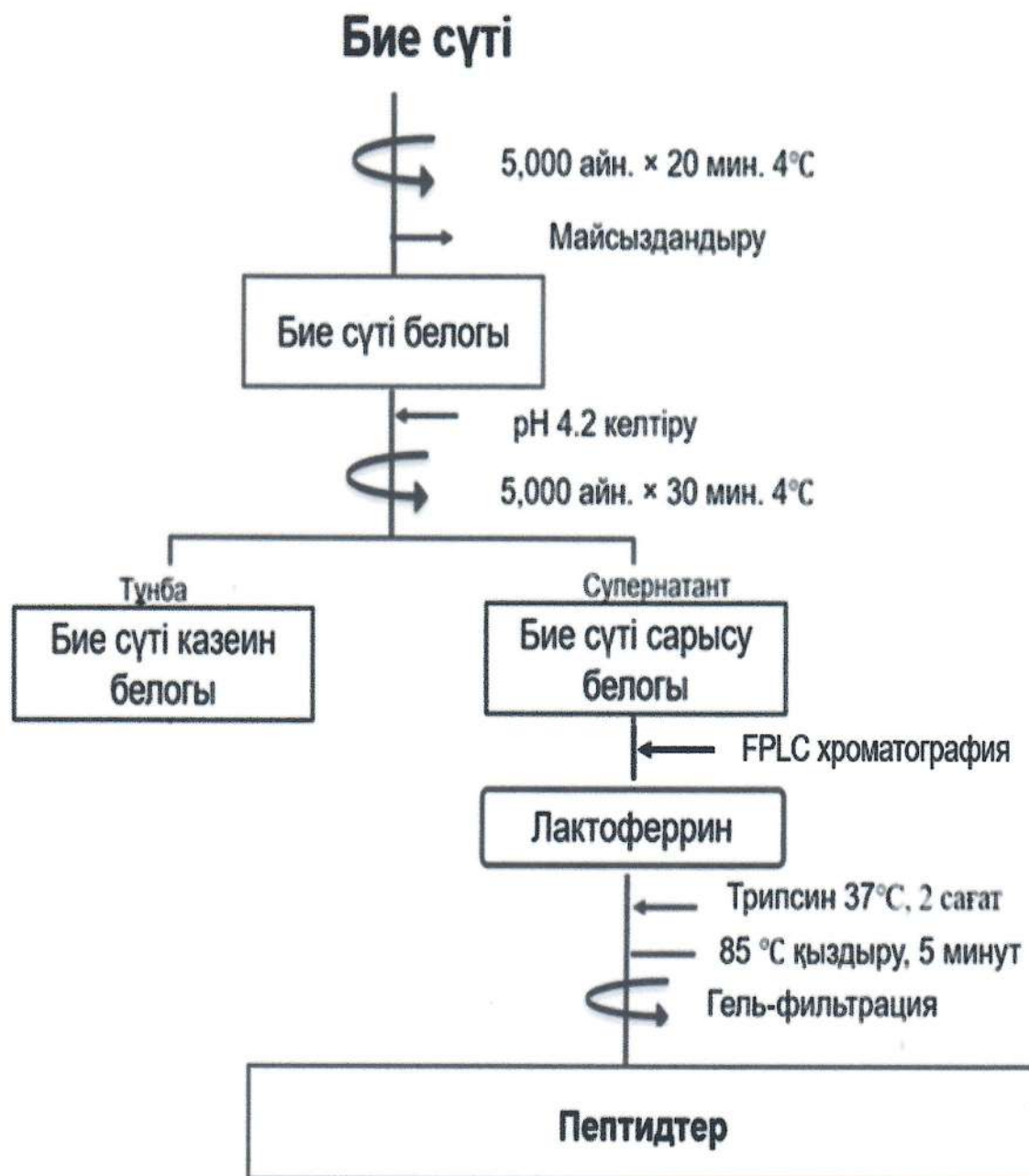
3.6 Лактоферрин және оның пептидтерін алу технологиясының схемасы

Сарысу - ірімшік, казеин және йогурт өндірісінің екіншілік сұйық жанама өнімі, қол жетімді диеталық белок көздерінің бірі.

2013 жылы шамамен 180 миллион тоннаны құраған әлемдік сарысу өндірісінде 1,5 миллион тоннаға жуық құндылығы жоғары белоктар

анықталған. Соңғы жылдары жүргізілген зерттеулерде сарысу белоктары қоректік жағынан құнды белок болып табылады. Сондықтан, сүт өнеркәсібіне спорт, денсаулық және балалар мен қарт адамдарға тағамдық өнімдерді өндірушілердің үлкен инвестиция салуына байланысты бірінші лабораториялық жағдайда, сосын өндірістік жағдайда бөліп алу маңызды. Себебі, құрамында β -лактоглобулин, α -лактальбумин, лактоферрин және иммуноглобулин сияқты "табиғи белоктардың" толық жиынтығы бар.

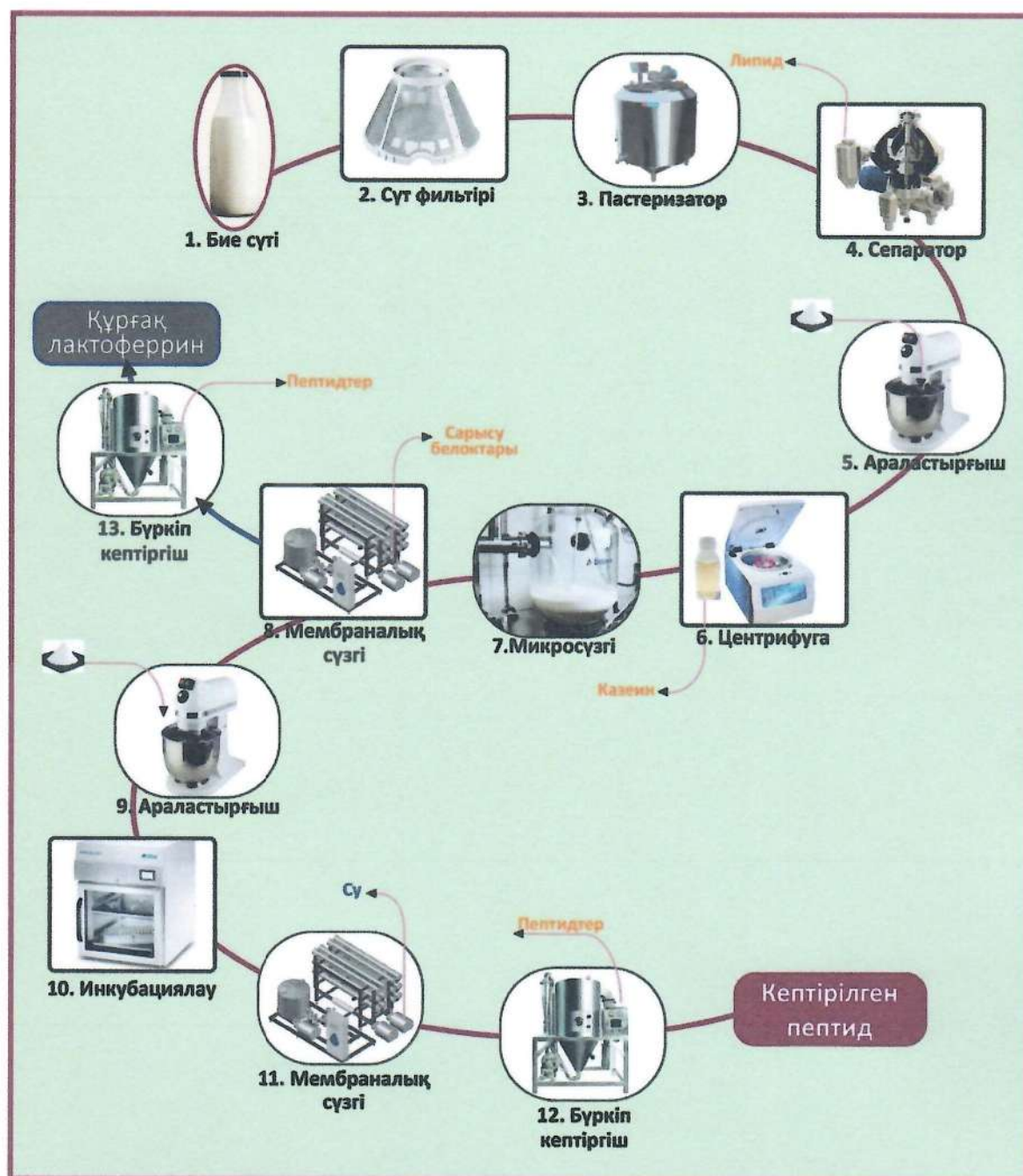
Сүт өнімдерін өндіру процесі жеке технологиялық операциялардан тұрады, оларды екі топқа бөлуге болады: жалпы және жеке. Жалпы



Сурет 38 – Биологиялық белсенді пептидтерді алу технологиясының схемасы

технологиялық операциялар барлық дерлік сүт өнімдерінің өндіріс процесіне кіреді, жеке - бір немесе бірнеше ұқсас топтардың өндірісінде қолданылады.

Сүт және сүт өнімдерінің технологиясы шикізат ретінде сүтке қойылатын талаптарды негіздейді, сүтті өңдеу және сүт өнімдерін өндірудің технологиялық схемалары мен технологиялық параметрлерін, технологиялық



Сурет 39 – Биологиялық белсенді пептидтерді бөліп алудың технологиялық схемасы

1-Пастеризатор, 2-Сепаратор, 3-араластырғыш, 4 - центрифуга, 6 -микросүзгі, 7-мембраналық сүзгі, 8 - бүркіп кептіргіш құрылғы, 9 - араластырғыш, 11 - микросүзгі, 12-мембраналық сүзгі, 13 - бүркіп кептіргіш құрылғы, 14 - дайын өнім

процестердің мәнін, өнімнің тауарлық және тағамдық қасиеттерін қалыптастыруды, сапасын бақылау және бағалау.

Бие сүтінен ЛФ және оның биологиялық белсенді пептидтерін алу технологиясы келтерілді. Лабораториялық жағдайда алынған белоктар мен пептидтердің технологиялық сызбасын келтіру тиімді. Себебі, біріншіден көлемі аз болғандықтан лабораториялық құрылғыларды қолданып (pH METER, центрифуга, диализ және SDS-PAGE т.б.) анықталды (сурет 38).

Сарысуды ірімшік өндіру процесінде тікелей алу ұсынылады, оны буферлік резервуарда қысқа уақыт сақтау керек, содан кейін одан әрі өндеуді күтіп, микросүзгі, мембраналық сүзгі және кептіру керек. Лактоферриннің өнеркәсіпте алу майсыздандырылған сүттен белокты, ірімшік сарысуынан тікелей мембраналық сүзгілеу арқылы бөліп алу және тазарту тәрізді қадамдарды қамтиды (сурет 39). Концентрациясы шоғырланған лактоферрин төмен температурада немесе бүркіп кептіргіш құрылғыда ұнтақ күйінде кептіру ұсынылады.

Пептидтерді өндірудің технологиялық сызбасы пептидтерді тазарту және сипаттау үшін бірқатар қадамдарды қамтиды. Арнайы процесс пептидтің түріне және ұзындығына, сондай-ақ мақсатты қолдану түріне байланысты өзгеруі мүмкін. Тазарту: Хроматография: пептид әдетте HPLC немесе пептидті қоспалардан бөлу үшін басқа хроматографиялық әдістер арқылы тазартылады. Ал, MS арқылы молекулалық массасын анықтауға және пептидтің аминқышқылдық сәйкестігі расталады. HPLC көмегімен пептидтің тазалығы бағаланады.

Лиофилизация: Белок пен пептидтерді сақтау мен тасымалдауды жеңілдететін ұнтақ түрін алу үшін жиі мұздатып кептіріледі.

Сапа бақылауы: Пептидтің тазалығын, сәйкестігін және ластаушы заттардың жоқтығын қоса, талап етілетін сипаттамаларға сәйкес келуін қамтамасыз ету үшін қатаң сапаны бақылау сынақтары орындалады.

Қаптама және сақтау: Пептидтің тұрақтылығы мен тұтастығын сақтау үшін бақыланатын жағдайларда қолайлы контейнерлерге салынады.

Пептидтерді өндіру пептидтің күрделілігіне және қолданудың нақты талаптарына байланысты өзгерістер мен қосымша қадамдарды қамтуы мүмкін болатындығын ескеру маңызды. Сонымен қатар, пептидтерді тазартып бөліп алу технологияларындағы жетістіктер жалпы процестің тиімділігін арттыру үшін жаңа әдістер мен тәсілдерді енгізілуі мүмкін.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Бие сүтінің физико-химиялық көрсеткіштері бойынша (тығыздығы, майлылығы, майсызданған құрғақ сүт қалдығы, лактоза, витамин С және белок) сиыр сүтінен ерекшеленді: бие сүтінің майлылығы $1,42 \pm 0,02\%$, сиыр сүтімен салыстырғанда 2,5-3 есеге төмен ($p < 0,05$), лактоза $6,67 \pm 0,02\%$, сиыр сүтінде $4,6 \pm 0,03\%$ құрады. Витамин С мөлшері бие және сиыр сүтінде $90,5 \pm 0,03$ мг/мл және $18,43 \pm 0,02$ мг/мл ($p < 0,05$). Бие сүті сарысу белоктары лактоферрин, сарысу альбумині, иммуноглобулиндер (IgG-НС, IgG-LC), β -лактоглобулин, α -лактоальбумин, лизоцим белоктарына жіктелді.

2. Лактоферринді ÄKTA-FPLC хроматография әдісімен бөліп алынды және оның 695 аминқышқылы қалдығынан тұратындығы анықталды, әрбір жеке аминқышқылының саны мен пайыздық үлесі анықталды.

3. Бие сүті лактоферринінің антиоксиданттық белсенділігі сиыр сүтімен салыстырғанда жоғары, биеLF $56,22 \pm 2,30\%$ болса, сиырLF $47,85 \pm 1,34\%$ көрсеткіш көрсетті ($p < 0,05$). Хелаттаушы қасиеті бойынша лактоферрин темір ионынан басқа Cu^{2+} , Ca^{2+} және Zn^{2+} иондарымен байланыса алатындығы дәлелденді. Нативті лактоферринге қарағанда гидролизаттарының антимикробтық қасиеті жоғары.

4. Лактоферрин белогын гидролиздеу нәтижесінде алынған 56 пептидтің тек катионды **RCSSSPLLEACAFLR** және бейтарап **CSSSPLLEACAFLR** пептидтер жоғары биологиялық белсенділік көрсететіндігі ($> 0,75$).

5. Лактоферрин және оның пептидтерін алу технологиясының сызбасы жасалды.

ПАЙДАЛАНЫЛГАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Гусаков В.Г. и др. Совершенствование системы сбыта в агропромышленной сфере. Теория, методология, практика, – Минск: Ин-т системных исследований в АПК НАН Беларуси, 2010. – 252 с.
- 2 Метрик Л.В. Молочная отрасль: мировые тенденции и перспективы экспорта // Журнал Проблемы экономики. - 2011. - №2. - С.171-182.
- 3 Мелещенко А.В., Климова М.Л. Анализ тенденций развития мирового рынка молока // Белорусское сельское хозяйство. - 2010. - № 4. – С.58-60.
- 4 Федорова М.А. Современные тенденции производства и потребления молока и молочной продукции в России и зарубежных странах в условиях локдауна // Социально-экономический и гуманитарный журнал. - 2022. - №2, ч.1. – С. 3-19.
- 5 Восемь главных трендов молочного рынка в мире в 2020 году // Информационное агентство "Milknews". 31.12.2020. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: <https://milknews.ru/longridy/trendy-mir-2020.html> (дата обращения: 17.04.2021).
- 6 Белякова Г.Я., Озерова М.Г., Гаврилова О.Ю. Функционирование и устойчивое развитие молочного скотоводства в зарубежных странах // Социально-экономический и гуманитарный журнал Красноярского ГАУ. - 2019. -№ 1 (11). -С. 12-24.
- 7 Конец молока © DairyNews.today [Электронный ресурс]. -2022. – <https://dairynews.today/news/konets-moloka-.html>
- 8 Dairy and dairy products OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032 © OECD/FAO 2023. -P.202-213.
- 9 <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/milk-composition/en/>.
- 10 Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>.
- 11 FAOSTAT – Agriculture [Электронный ресурс]. -2011. – Режим доступа: <http://www.fao.org/corp/statistecs/site/339/default.aspx>. – Дата доступа: 25.10.2011.
- 12 Food and agriculture organization of the United Nations. ateway to dairy production and products (Economica). [https://www.fao.org/dairy-production-products/socioeconomics/economics/en/#:~:text=Dairy%20production%20provides%20many%20non,of%20nutrients%20for%20crop%20production\)](https://www.fao.org/dairy-production-products/socioeconomics/economics/en/#:~:text=Dairy%20production%20provides%20many%20non,of%20nutrients%20for%20crop%20production)).
- 13 Портной А.И. Влияние плотности молока на технологические показатели производства жирного и полужирного творога. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства// Животноводство и молочное дело. - 2019. - С. 70-76.
- 14 Турлий С.И. Современные тенденции развития мирового рынка молока и молочной продукции // Научный журнал «Вестник АГУ, сер. «Экономика». - 2020. - Т. 777, Вып. 2. - С. 3-19.
- 15 Britt J.H., Cushman R.A., Dechow C.D., Dobson H., Humblot P., Hutjens M.F., Jones G.A., Mitloehner F.M., Ruegg P.L., Sheldon I.M., Stevenson J.S. Review: Perspective on high-performing dairy cows and herds // Animal. - 2021. —P. 1751-7311. doi: 10.1016/j.animal.2021.100298.

- 16 Сурай Н.М., Носов В.В., Диброва Ж.Н. и др. Мировой и отечественный опыт в развитии рынка молока и молочных продуктов // Экономика и управление народным хозяйством. -2019. -Т. 2, Вып. 171. - С. 71-79.
- 17 Данные Комитета по статистике Республики Казахстан (<https://stat.gov.kz/ru/industries/business-statistics/stat-forrest-village-hunt-fish/>)
- 18 Ахмедьяров Е.А. Современное состояние производства и переработки молока в Казахстане. Конкурентоспособность национальной экономики // Central Asian Economic Review. – 2019. – Т. 2, № 125. - С. 148-157.
- 19 Кинеев М.А. Продуктивность молочного скота Казахстана. Казахский НИИ животноводства и кормопроизводства [Электрон. ресурс]. – 2018 - URL: <http://zhivotnovodstvo.kz/produktivnostmolochno-skota-kazahstana/> (дата обращения: 27.11.2018).
- 20 Uniacke-Lowe T., & Fox P. F. Milk | Equid Milk // Encyclopedia of Dairy Sciences. -2011. – Vol. 3, No 2. - P.518-529.
- 21 Barreto Í.M.L.G., Rangel A.H.N., Urbano S.A., Bezerra J. da S., Oliveira C.A.de A. Equine milk and its potential use in the human diet // Food Science and Technology, Campinas. - 2019. - Vol. 39, No 2. - P.1-7.
- 22 Gregić M., Mijić P., Baban M., Aladrović J., Pađen L., Gantner V. and Bobić T. Changes in the Fatty Acid Composition of Milk of Lipizzaner Mares during the Lactation Period // Metabolites. - 2022. - Vol. 12, No 6. - P.506.
- 23 Pieszka M., Łuszczynski J. Main composition and macroelements content in mare milk during first month after parturition and occurrence of “heat diarrhoea” in their foals // Nauka Przyroda Technologie. - 2013. -Vol. 7, No 3. - P.1-8.
- 24 Markiewicz-Kęszycka M., Wójtowski J., Kuczyńska B., Puppel K., Czyżak - Runowska G., Bagnicka E., Strzałkowska N., Jóźwik A., Krzyżewski J. Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mare milk // International Dairy Journal. - 2013. - Vol. 31, No 2. - P.62-64.
- 25 Pecka E., Dobrzański Z., Zachwieja A., Szulc T., Czyż K. Studies on composition and major protein level in milk and colostrum of mares // Animal science journal. -2012. - Vol.83, No 2. - P.162-168.
- 26 Magdalena P., Jarosław Ł., Monika Z., Romana A., Bogusława D., Magdalena H. Is mare milk an appropriate food for people? – A review // Annals of Animal Science. - 2016. -Vol. 16, No. 1. -P. 33-51.
- 27 Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk // International Dairy Journal. -2002. -Vol.12, No 11. -P. 869-877.
- 28 Sheng Q., Fang X. Bioactive components in mare milk. In: Park Y.W., Bioactive components in milk and dairy products. – Printed in Singapore: Wiley-Blackwell, Oxford, 2009. - P. 195-213.
- 29 Clayer W.L., Verraes C., Cardoen S., De Block J., Huyghebaert A., Raes K. Mare milk as a food for people. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits // Food Control. - 2014. -Vol. 42. -P.188-201.

- 30 Faye B., Konuspayeva G. The sustainability challenge to the dairy sector - the growing importance of non-cattle milk production worldwide // *International Dairy Journal*. - 2012. - Vol. 24, No 2. - P. 50-56.
- 31 Scherf B.D., Pilling D. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture; FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments: Rome, Italy, 2015.
- 32 Shi T., Nishiyama K., Nakamata K., Aryantini N.P.D., Mikumo D., Oda Y., Yamamoto Y., Mukai T., Sujaya I.N., Urashima T., & Fukuda K. Isolation of potential probiotic lactobacillus rhamnosus strains from traditional fermented mare milk produced in Sumbawa Island of Indonesia // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. - 2012. - Vol. 76, No 10. - P.1897-1903.
- 33 Danków R., Pikul J., Osten-Sacken N., Teichert J. Characteristics and salubrious properties of mare milk // *Nauka Przyroda Technologie*. - 2012. - Vol. 6. – P.1-12.
- 34 Guo L., Xu W.-L., Li C.D., Ya M., Guo Y.-S., Qian J.-P., Zhu J.-J. Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China // *Food Science and Nutrition*. -2020. -Vol. 8, No 1. - P. 257-264.
- 35 Musaev A., Sadykova S., Anambayeva A., Saizhanova M., Balkanay G., Kolbaev M. Mare's milk: Composition, properties, and application in medicine // *Archives of Razi Institute*. - 2021. -Vol. 76, No 4. -P. 1125-1135.
- 36 Król J., Brodziak A., Chabuz W., Litwińczuk Z., Barłowska J. Effect of the feeding system and the production season on the protein fraction content in milk // *Mljekarstvo*. - 2019. - Vol. 69, No 2. -P. 98-107.
- 37 Barłowska J., Polak G., Janczarek I., Próchniak T. Chemical composition, whey protein profile, and fatty acid profile of milk from Sokólski horses in relation to Polish Halfbred horses // *Annals of Animal Science*. - 2023. - Vol. 23, No 2. -P. 587-596.
- 38 Pietrzak-Fiećko R., Tomczyński R., Smoczyński S.S. Effect of lactation period on the fatty acid composition in mares' milk from different breeds // *Archiv fur Tierzucht*. - 2013. - Vol. 56, No 33. -P.335-343.
- 39 Mazhitova A.T., Kulmyrzaev A.A. Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season // *Journal of Dairy Science*. - 2016. - Vol. 99, No 4. - P. 2480-2487.
- 40 Nikkhah A. Equidae milk promises substitutes for cow and human breast milk // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. - 2012. - Vol. 36, No 5. - P. 470-475.
- 41 Jastrzębska E., Wadas E., Daszkiewicz T., Pietrzak-Fiećko R. Nutritional Value and Health-Promoting Properties of Mare's Milk – a Review // *Czech J. Anim. Science*. -2017. - Vol. 62, No 12. - P. 511-518.
- 42 Salamon R.V., Salamon S., Csapó - Kiss Z., Csapó J. Composition of mare's colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents // *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*. - 2009. - Vol. 2, No 1. - P.119-131.
- 43 Abdel-Salam A. M., Al-Dekheil A., Babkr A., Farahna M., & Mousa H.M. High fiber probiotic fermented mare's milk reduces the toxic effects of mercury in rats // *North American Journal of Medical Sciences*. - 2010. - Vol. 2, No 12. - P. 569-575.

- 44 Lazzaro F. Comprendre les comportements des micelles de caséines dans des environnements variés, de leur équilibre minéral à leurs propriétés colloïdales et fonctionnelles: émulsion et coagulation présure. (Thèse de doctorat, Agrocampus Ouest). 2018. Repéré à: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01814679>
- 45 Mehri A. Trace Elements in Human Nutrition (II) - An Update // International Journal of Preventive Medicine. - 2020. - Vol.11, No 1. -P.1-18.
- 46 Orlandi M., Goracci J., Curadi M.C. Fat composition of mare's milk with reference to human nutrition // Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa. - 2003. - Vol.56. - P. 97-104.
- 47 Miraglia N., Salimei E., Fantuz F. Equine Milk Production and Valorization of Marginal Areas - A Review // Animals. - 2020. - Vol. 10, No 2. - P. 353.
- 48 Бимбетов Б.Р., Жангабылов Б.Р., Бенберин В.В. и др. Кобылье молоко в гастроэнтерологии (обзорная статья) // Медицина (Алматы). - 2019. -Т. 207, №9. - С. 73-78.
- 49 Muhammad A., Farhan S., Fatima A., Numra W., Muzzamal H., Ali I., Huda A., Faqir M.A., Hafiz S. Nutritional and ethnomedicinal scenario of koumiss: A concurrent review // Food Science & Nutrition. - 2021. - Vol. 9, No 2. - P. 6421-6428.
- 50 Синявский Ю.А., Шарманов Т.Ш., Якунин А.В., Макеева Р.К.. Сухая смесь для получения мороженого на основе кобыльего молока (Патент). Номер патента: 31596. Опубликовано: 30.09.2016.
- 51 Шарманов Т.Ш., Бердыгалиев А.Б., Датхабаева Г.К., Амантай А.Т. Динамика изменений биохимических показателей крови лиц пожилого возраста в процессе применения лечебно-профилактических продуктов на основе кобыльего молока // Вестник КазНМУ. - 2018. - №3. - С. 227-229.
- 52 Гильмутдинова Л.Т., Кудаярова Р.Р. Янгурина Н.Х. Уникальный состав кобыльего молока-основа лечебных свойств кумыса // Вестник башкирского Государственного аграрного университета. - 2011. - №33. - С. 74-80.
- 53 Шарманов Т.Ш. Питание - важнейший фактор здоровье человека. - Алматы: Асем-Систем, 2010. - С 158-212
- 54 Шарманов Т.Ш. Казахстан в контексте глобальных проблем питания. - Алматы, 2000. - С. 224.
- 55 Пилат Т.Л., Шарманов Т.Ш., Абдуллабекова Р.М., Костенко В.В. Основные принципы фармаконутрициологии (Биологически активные добавки к пище). Астана-Алматы-Шымкент: [б.и.], 2001. -С.312. - ISBN 9965505527
- 56 Шарманов Т.Ш. «Алматы в новом тысячелетии человеческого развития» Изд.4-ое доп. Перераб. // Казахская Академия питания. - Алматы - Вашингтон – Женева: 2013. - С. 136.
- 57 Кадырова Р.Х. Верблюжье и кобылье молоко в лечебном питании. - Алма-Ата: Казахстан, 1985. - 158 с.
- 58 Foekel C., Schubert R., Kaatz M., Schmidt I., Bauer A., Hipler U.C., Vogelsang H., Rabe K., Jahreis G. Dietetic effects of oral intervention with mare's milk on the severity scoring of atopic dermatitis, on fecal microbiota and on immunological parameters in patients with atopic dermatitis // International Journal of Food Sciences and Nutrition. - 2019. - Vol. 60, No 7. -P. 41-52.

59 Inglingstad R.A., Devold T.G., Ellen K., Eriksen E.K., Holm H., Jacobsen M., Liland K.H., Rukke E.O., Vegarud G.E. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes // Dairy Science and Technology. - 2010. - Vol. 90, No 5. -P.549-563.

60 Holt C., Carver J.A., Ecroyd H., Thorn D.C. Invited review: caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods // Journal Dairy Science. - 2013. - Vol. 96, No 10. - P.6127-6146.

61 Gonzalez-Jordan A., Thomar P., Nicolai T., Dittmer J. The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution // Food Hydrocoll. - 2015. - Vol. 51. - P. 88-94.

62 Liu Z., Juliano P., Williams R.P. & et al. Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk // Journal of Dairy Research. - 2014. – Vol. 81, No 2. - P. 146-155.

63 Philippe M., Le Grae't Y., Gaucheron F. The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles // Food Chem. - 2015. - Vol.90, No 4. -P.673-683.

64 Nakagawa K., Jarungrumlert T., Adachi S. Structural changes in casein aggregates under frozen conditions affect the entrapment of hydrophobic materials and the digestibility of aggregates // Chemical Engineering Science. - 2016. - Vol.143. - P. 287-296.

65 Atamer Z., Post A. E., Schubert T., Holder A., Boom R. M., & Hinrichs, J. Bovine *b*-casein: isolation, properties and functionality. A review // International Dairy Journal. -2017. -Vol.66. -P.115-125.

66 Bachar M., Mandelbaum A., Portnaya I., Perlstein H., Even-Chen S., Barenholz Y., & Danino D. Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled b-casein micelles // Journal of Controlled Release. - 2012. - Vol.60, No 2. - P.164-171.

67 Turovsky, T., Portnaya, I., Kesselman, E., Ionita-Abutbul, I., Dan, N., & Danino, D. Effect of temperature and loading on the structure of b-casein/ibuprofen assemblies // Journal of Colloid and Interface Science. – 2015. - Vol. 449, No 1. - P. 514-521.

68 Esmaili M., Ghaffari S.M., Moosavi-Movahedi Z., Sadat Atri M., Sharifizadeh A., Farhadi M., Yousefi R., Chobert J-M., Haertlé T., Akbar Moosavi-Movahedi A. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application // LWT-Food Science and Technology. – 2011. - Vol. 44, No 10. - P. 2166-2172.

69 Mati A., Senoussi-Ghezali C., Ahmed Zennia S.I., Almi-Sebbane D., El Hatmi H., Girardet J-M. Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities - A review // International Dairy Journal. -2017. - Vol.73. - P. 25-37.

70 Danków R., Pikul J., Osten - Sacken N. (2011). Effect of lactation on some milk physicochemical traits of Polish cold blood breed mares. In: IDF International Symposium on Sheep, Goat and Other Non-Cow Milk. Athens, Greece, 16-18.05.2011. IDF, Athens: session 4, poster 5.

- 71 Redwan E.M., Uversky V.N., El-Fakharany E.M. and Al-Mehdar H. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses // *Comptes Rendus Biologies*. – 2014. – Vol. 337. – P. 581-595.
- 72 Iglesias-Figueroa B.F., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview // *International Dairy Journal*. – 2019. – Vol. 89. – P. 37-41.
- 73 Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологические активные добавки (обзор) // *Биофармацевтический журнал*. – 2010. – Т. 2, №3. – С. 3-19.
- 74 Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – Vol. 33, No 4. – P. 301-308.
- 75 Moreno-Expósito L., Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L., Ruiz C., Ramos-Torrecillas J. and de Luna-Bertos E. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin // *Life Sciences*. – 2018. – Vol. 195. – P. 61–64.
- 76 Hao L., Shan Q., Wei J., Ma F. and Sun P. Lactoferrin: Major physiological functions and applications // *Current Protein and Peptide Science*. – 2019. – Vol. 20, No 139. – P. 139-144.
- 77 Pietrantoni A., Di Biase A.M., Tinari A., Marchetti M., Valenti P., Seganti L. and Superti F. Bovine lactoferrin inhibits adenovirus infection by interacting with viral structural polypeptides // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2003. – Vol. 47, No 8. – P. 2688-2691.
- 78 Jenssen H., Hancock R.E. Antimicrobial properties of lactoferrin // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, No 1. – P. 19-29.
- 79 Puddu P., Valenti P., Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, No 1. – P. 11-18.
- 80 Actor J.K., Hwang S.A. and Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – Vol. 15, No 17. – P. 1956-1973.
- 81 Legrand D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator // *Journal of Pediatrics*. – 2016. – Vol. 173. – P. 10-15.
- 82 Нармуратова М.Х., Байдуллаева А., Муратбекова А.Е., Мэзбаева Д.М., Нармуратова Ж.Б. Коронавирус қоздырғышына қарсы имуномодуляциялық агент ретінде сүт лактоферринінің қасиетін сипаттау // *Микробиология и вирусология*. – 2023. – Т. 40, №1. – С. 47-71.
- 83 Луцева О.А., Коханов А.В., Воронкова М.Ю., Иримия Р.Н., Зеленцова Я.В. Уровни лактоферрина в сыворотке крови и фекальном экстракте при некоторых воспалительных заболеваниях кишечника // *Современные проблемы науки и образования*. – 2019. – Том 15, № 1. – С. 32-47. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/en/article/view?id=28541>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 01.09.2020.
- 84 Caccavo D., Pellegrino N.M., Altamura M., Rigon A., Amati L., Amoroso A., Jirillo E. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential

- therapeutic application // *Journal of Endotoxin Research*. - 2002. - Vol. 8, No 6. - P. 403-417.
- 85 Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview // *Cellular and Molecular Life Sciences*. -2005. -Vol. 62, No 22. - P. 2540-2548.
- 86 Jianing F., Liu Y., Dehong T., Ling L. Iron transport mechanism of lactoferrin and its application in food processing // *Food Science and Technology*. -2023. -Vol.43. - P.1-12.
- 87 Rastogi N., Singh A., Singh P.K., Tyagi T. K., Pandey S., Shin K., Kaur P., Sharma S., & Singh T.P. Structure of iron saturated C-lobe of bovine lactoferrin at pH 6.8 indicates a weakening of iron coordination // *Proteins*. – 2016. - Vol.84, No5. - P. 591-599.
- 88 Baker H.M., Baker E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release // *BioMetals*. – 2004. - Vol. 17, No 3. - P.209-216.
- 89 Voswinkel, L., Vogel, T., & Kulozik, U. Impact of the iron saturation of bovine lactoferrin on adsorption to a strong cation exchanger membrane // *International Dairy Journal*. – 2016. -Vol. 56. - P. 134-140.
- 90 Baker H.M., Baker E.N. A structural perspective on lactoferrin function // *Biochemistry and Cell Biology*. – 2012. - Vol. 90, No 3. - P. 320-328.
- 91 Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin // *Biochimie*. - 2009. - Vol. 91. - P. 3-10.
- 92 Baker E.N., Baker H.M., Kidd R.D. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework // *Biochemistry and Cell Biology*. -2002. - Vol. 80, No 1. - P. 27-34.
- 93 Cassat J.E., & Skaar E.P. Iron in infection and immunity // *Cell Host & Microbe*. – 2013. - Vol. 13, No 5. - P. 509-519.
- 94 Jiang R., Lopez V., Kelleher S. L., & Lönnerdal B. Apo-and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK- signaling and cell proliferation in Caco-2 cells // *Journal of Cellular Physiology*. – 2011. - Vol. 226, No 11. - P. 3022-3031.
- 95 Suzuki Y.A., Lopez V., & Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. - Vol. 62, No 22. - P.2560-2575.
- 96 Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: health, nutrition, and implications for infant formulas // *The Journal of Pediatrics*. - 2016. - Vol.173. - P. 4-9.
- 97 Lönnerdal B., Jiang R., & Du X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. - 2011, - Vol. 53, No 6. - P. 606-614.
- 98 Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., & Levy E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2016. -Vol. 24, No 14. - P. 813-836.
- 99 Sienkiewicz M., Jaśkiewicz A., Tarasiuk A., & Fichna J. Lactoferrin: an overview of its main functions, immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical

significance // Critical reviews in food science and nutrition. – 2022. - Vol. 62, No 22. - P.6016-6033.

100 Bahareh H., Suvardhan K. and Krishna B. Theoretical insights into the competitive metal bioaffinity of lactoferrin as a metal ion carrier: a DFT study // New Journal of Chemistry. – 2019. - Vol. 43, No 41. - P. 16374-6384.

101 Neumann W., Hadley R.C. and Nolan E.M. Transition metals at the host-pathogen interface: how *Neisseria* exploit human metalloproteins for acquiring iron and zinc, in Bioinorganic Chemistry, ed. S. J. Lippard and J. M. Berg, -2017, -P.211-223.

102 Habib H.M., Ibrahim W.H., Schneider-Stock R., & Hassan H.M. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities // Food Chemistry. - 2013. -Vol. 141. - P. 148-152.

103 Самохина Л.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Комолова Г.С., Головин М.А. Бифидогенные свойства пептидов лактоферрина из коровьего молока // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2016. -№2. - С. 49-53.

104 Simone M., Orina B., Desmond J., Fitzgerald. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis // British Journal of Clinical Pharmacology. - 2017. -Vol. 83, No 1. - P.152-162.

105 Marika B., Grazyna C., Hanna C. Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates - A review // International Dairy Journal. - 2022. - Vol. 127. -P. 105-208.

106 Walters M.E., Esfandi R. and Tsopmo A. Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption // Foods. - 2018. -Vol. 7, No 10. - P.172.

107 Самохина Л.С., Комлова Г.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Семенов Г.В. Противодисбактериозное действие композиции гидролизатов альфа-лактальбумина и лактоферрина // Известия ВУЗов, Пищевая технология. -2012. -№ 5-6. -С. 17-20.

108 Torres-Fuentes C., Alaiz M. and Vioque J. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides // Food Chemistry. - 2012. - Vol.134, No 3. - P. 1585-1588.

109 Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives // BioMetals. - 2004. -Vol.17, No 3. - P.189-196.

110 Furlund C.B., Ulleberg E.K., Devold T.G., Flengsrud R., Jacobsen M., Sekse C., Holm H. and Vegarud G.E. Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes // Journal of Dairy Science. - 2013. - Vol. 96, No 1. - P.75-88.

111 Power-Grant O., William G. McCormack, Ramia De Cap M., Amigo-Benavent M., Richard J. Fitzgerald, Phil Jakeman. Evaluation of the antioxidant capacity of a milk protein matrix *in vitro* and *in vivo* in women aged 50-70 years // International Journal of Food Sciences and Nutrition. - 2016. -Vol. 67, Iss. 3. - P. 325-334.

112 Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides // Amino Acids. - 2013. - Vol. 44, No 3. - P. 797-820.

- 113 García-Nebot M.J., Cilla A., Alegría A., Barberá R. Caseinophospho- peptides exert partial and site-specific cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells // *Food Chemistry*. - 2011. - Vol. 129, Iss. 4. - P. 1495-1503.
- 114 Liu H.C., Chen W.L., Mao S.J.T. Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin // *Journal of Dairy Science*. - 2007. -Vol. 90, Iss. 2. - P. 547-555.
- 115 Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B. and Amigo L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2005. - Vol. 53, No 3. - P. 588-593.
- 116 Bin P., Huang R., Zhou X. Oxidation resistance of the sulfur amino acids: methionine and cysteine // *BioMed research international*. - 2017. - Vol. 6. - P. 1-6.
- 117 Miao S.J., Liao W., Pan, Z., Wang Q., Duan S., Xiao S., Yang Z. and Cao Y. Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates // *Food Function*. - 2019. - Vol. 10. - P. 2372-2381.
- 118 Jaiswal A., Bajaj R., Mann B. and Lata K. Iron (II)-chelating activity of buffalo α _s-casein hydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme // *Journal of Food Science Technology*. - 2014. - Vol.52, No 6. – P. 3911-3918.
- 119 Caetano-Silva M.E., Netto F.M., Bertoldo-Pacheco M.T., Alegría A., & Cilla A. Peptide-metal complexes: obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. - 2020. - Vol. 61, No 9. -P.1470-1489.
- 120 Kim J.-J., Kim Y.-S., Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategie // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. - 2019. - Vol. 54. - P. 226-231.
- 121 Qixiao Zh., Arjan N. and Wei Ch. Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity – Review // *Nutrients*. - 2015. - Vol. 7. - P. 552-571.
- 122 Livingstone C. Zinc: Physiology, deficiency, and parenteral nutrition. *Nutrition in Clinical Practice*. - 2015. - Vol. 30, No 3. - P. 371-382.
- 123 Zhu K.-X., Wang X.-P., Guo X.-N. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates // *Journal of functional foods*. - 2014. - Vol.12. -P. 23-32.
- 124 Andreini C., Banci L., Bertini I., & Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome // *Journal of Proteome Research*. - 2006. -Vol. 5, No 1. - P. 196-201.
- 125 Walsh C.T., Sandstead H.H., Prasad A.S., Newberne P.M., and Fraker P.J. Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s // *Environmental Health Perspective*. - 1994. -Vol.102, No 2. -P. 5-46.
- 126 Turnlund J.R., King J.C., Keyes W.R., Gong B., & Michel M.C. A stable isotope study of zinc absorption in young men: Effects of phytate and alpha-cellulose // *American Journal of Clinical Nutrition*. - 1984. - Vol. 40, No 5. -P.1071-1077.
- 127 Carbonell-Capella J.M., Buniowska M., Barba F.J., Esteve M.J., & Frigola A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. - 2014. - Vol. 13, No 2. -P.155-171.

- 128 Marchetti M., Superti F., Ammendolia M. G., Rossi P., Valenti P. & Seganti L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin // *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. -1999. - Vol.187, No 4. -P. 199-204.
- 129 Jabeen T., Sharma S., Singh N., Bhushan A., & Singh T.P. Structure of the zinc-saturated C-terminal lobe of bovine lactoferrin at 2.0 Å resolution // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. - 2005. - Vol. 61, No 8. -P. 1107-1115.
- 130 Rossi P., Giansanti F., Boffi A., Ajello M., Valenti P., Chiancone E., & Antonini G. Ca²⁺ binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide // *Biochemistry and Cell Biology*. - 2002. - Vol.80, No 1. - P.41-48.
- 131 Charles P. Calcium absorption and calcium bioavailability // *Journal of Internal Medicine*. - 1992. - Vol. 231, No 2. -P.161-168.
- 132 Guéguen L., Pointillart A. The Bioavailability of Dietary Calcium // *Journal of the American College of Nutrition*. - 2013. -Vol.19, No 2. - P. 119-136.
- 133 Wapnir R.A. Copper absorption and bioavailability // *American Society for Clinical Nutrition*. - 1998. - Vol.67, No 5. - P.1054S-60S.
- 134 Carvalho B.M.A., Carvalho L.M., Silva W.F., Minim L.A., Soares A.M., Carvalho G.G.P., da Silva S.L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions // *Food Chemistry*. - 2014. - Vol. 154. -P. 308-314.
- 135 Narmuratova Zh.B., Narmuratova M.Kh., Aralbaev N.A. Comparative study of the physical and chemical properties of kumys, mares and cow milk // *Ізденістер, нәтижелер-Исследования, результаты*. - 2019. – Т. 81, №1. - P. 2304-3334.
- 136 Narmuratova Zh., Hentati F., Girardet J-M., Narmuratova M., Cakir-Kiefer C. Equine lactoferrin: Antioxidant properties related to divalent metal chelation // *LWT – Food Science and Technology*. - 2022. - Vol. 161. - P. 113426.
- 137 Laemmli U.K., & Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*. - 1973. - Vol. 80, No 4. -P. 575-599.
- 138 Kee-Sung K., Ji-Sun K., Mi-Soon S., HaeWon N., Sang-Dong L., Duvjir S., Alimaa J. Purification and characterization of Mongolian mare lactoferrin // *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. - 2009. - Vol. 29, No 2. -P. 164-167.
- 139 Narmuratova M.Kh., Céline Cakir-Kiefer, Narmuratova Zh. Isolation and purification of lactoferrin from Kazakhstan mare milk. *International Journal of Biology and Chemistry*. - 2019. - Vol. 12, No 2. - P. 64.
- 140 El Hatmi H., Jrad Z., Khorchani T., Dary A., & Girardet J-M. Fast protein liquid chromatography of camel α-lactalbumin fraction with radical scavenging activity // *Emirates Journal of Food and Agriculture*. - 2014. - Vol. 26, No 4. -P. 309–316.
- 141 Swinehart D.F. The Beer-Lambert Law // *Journal of Chemical Education*. - 1962, Vol.39, No 7. -P.333-335.
- 142 Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Analytical Biochemistry*. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.

- 143 Kirby A.J., & Schmidt R.J. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo Herbs-I // *Journal of Ethnopharmacology*. - 1997. - Vol.56, No 2. - P. 103-108.
- 144 Sadat L., Cakir-Kiefer C., N'Negue M.-A., Gaillard J.-L., Girardet J.-M., & Miclo L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin // *International Dairy Journal*. - 2011. - Vol. 21, No 4. - P. 214-221.
- 145 Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., & Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biology and Medicine*. - 1999. - Vol. 26, No 9-10. - P.1231-1237.
- 146 Yen G.C., & Chen H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. -1995. - Vol. 43, No 1. - P. 27-32.
- 147 Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine) // *Analytical Biochemistry*. -1971. - Vol. 40. - P. 450-458.
- 148 Peng X., Kong B., Xia X., & Liu Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase // *International Dairy Journal*. - 2010. - Vol. 20, No 5. - P. 360-365.
- 149 Langer A., Hampel P.A., Kaiser W., Knezevic J., Welte T., Villa V., *et al.* Protein analysis by time-resolved measurements with an electro-switchable DNA chip // *Nature Communications*. - 2013. - Vol. 4, No 1. - P. 2099.
- 150 Zidane F., Matéos A., Cakir-Kiefer C., Miclo L., Rahuel-Clermont S., Girardet J.-M., Corbier C. Binding of divalent metal ions to 1-25 β -caseinophosphopeptide: An isothermal titration calorimetry study // *Food Chemistry*. - 2012. - Vol. 132, No 1. - P. 391-398.
- 151 Cakir-Kiefer C., Le Roux E., Balandras F., Trabalon M., Dary A., Laurent F., Gaillard J., and Miclo L. *In Vitro* Digestibility of α -Casozepe, a Benzodiazepine-like Peptide from Bovine Casein, and Biological Activity of Its Main Proteolytic Fragment // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2011. -Vol. 59, No 9. - P. 4464-4472.
- 152 Barry A.I., Thornsberry C. Susceptibility tests: Diffusion test procedures. In: Murray P., editor. *Diffusion test procedures*. Washington D.C.:ASM Press; 1993
- 153 Barry A.L., Thornsberry C. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A., Hausser W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D. and Shamody H.J., Eds., *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC. -1991. -P.1117-1125.
- 154 Brosch M., Yu L., Hubbard T., & Choudhary J. Accurate and Sensitive Peptide Identification with Mascot Percolator // *Journal of Proteome Research*. -2009. - Vol.8, No 6. - P. 3176-3181.
- 155 Бебяков Н.А., Бебяков А.М., Хромова А.В., и др. Молекулярно-генетические базы данных (примеры работы и справочные материалы): учебное пособие. -Архангельск: Изд-во Северного государственного медицинского университета, 2020. - С.1-83.
156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
157. <https://web.expasy.org/protparam/>

158. Tu M., Liu H., Cheng S., Mao F., Chen H., Fan F., Lu W., Du M. Identification and characterization of a novel casein anticoagulant peptide derived from in vivo digestion // Food Funct. -2019. -Vol.10. -P.2552-2559. <https://doi.org/10.1039/C8FO02546K> <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>
159. Биоинформатикалық бағдарлама <https://pepcalc.com/peptide-solubility-calculator.php>
- 160 Canabady-Rochelle L.L., Harscoat-Schiavo C., Kessler V., Aymes A., Fournier F. & Girardet, J-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods // Food Chemistry. - 2015. - Vol. 183. - P. 129-135.
- 161 Lee K.-C., Hsieh K.-T., Chen R.-B., Lin W.-C., Wang C.-S., Lee T.-T., *et al.* Expression and characterization of rice-produced recombinant porcine lactoferrin and its antioxidant activities // The Open Biotechnology Journal. - 2020. -Vol. 14, No 1. - P. 94-106.
- 162 Kontoghiorghes G. J., & Kontoghiorghes C. N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: New approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases // Cells. - 2020. - Vol. 9, No 6. - P. 1456.
- 163 Perrot T., Schwartz M., Saiag F., Salzet G., Dumarçay S., Favier F., *et al.* Fungal glutathione transferases as tools to explore the chemical diversity of amazonian wood extractives // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. - 2018. - Vol. 6, No 10. - P.13078-13085.
- 164 Schiedel M., Daub H., Itzen A., Jung M. Validation of the slow off-kinetics of sirtuin-rearranging ligands (SirReals) by means of label-free electrically switchable nanolever technology // ChemBioChem. - 2020. - Vol. 21, No 8. - P. 1-7.
- 165 Wenzhu Zhao, Xin Li, Zhipeng Yu, Sijia Wu, Long Ding, Jingbo Liu. Identification of lactoferrin-derived peptides as potential inhibitors against the main protease of SARS-CoV-2 // LWT-Food Science and Technology. -2022. -Vol. 154. -P. 112684.
- 166 Асманов А.И., Пивнева Н.Д. Применение комплексных препаратов катионных пептидов в терапии острых фарингитов // Вестник оториноларингологии. - 2020. - Т.85, №5. -С. 57-60.
- 167 Yuichi Shimazaki, Masako Takanib and Osamu Yamauchi. Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties // Dalton Trans. - 2009. - No 38. - P. 7854-7869.
- 168 Xiaoyong Cao, Xiuzhen Hu, Xiaojin Zhang, Sujuan Gao, Changjiang Ding, Yonge Feng, Weihua Bao. Identification of metal ion binding sites based on amino acid sequences // PLoS ONE - 2017. - Vol. 12, No 8. - Art. e0183756
- 169 Mooney C., Haslam N., Pollastri G., & Shields D. Towards the Improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, No 10. - Art. e45012.
- 170 Lee J.-S., Hong D. Y., Kim E. S., Lee H. G. Improving the water solubility and antimicrobial activity of silymarin by nanoencapsulation. Colloids and Surfaces B: // Biointerfaces. - 2017. - Vol. 154, No 1. - P. 171-177.

- 171 Kumar V., Indra B., Kamlesh K., & Prashant S. Thiazolidinones: Potential human novel coronavirus (SARS-CoV-2) protease inhibitors against COVID-19 // Biological and Medicinal Chemistry -2020. –Vol.2. -P.1-36. doi: 10.26434/chemrxiv.12891656.v2
- 172 Babi'c, I., Boji'c, M., Males, Z., Zadro, R., Goj'ceta, K., Duka, I., *et al.* Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation // Acta Pharmaceutica. - 2019. - Vol. 69, No 4. -P.607-619.
- 173 Bushra Niaz, Tahir Zahoor, Muhammad Atif Randhawa and Amer Jamil. Isolation of Lactoferrin from camel milk through fast protein liquid chromatography and its antagonistic activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // Pakistan journal of Zoology. - 2016. - Vol. 49, No 4. - P.1307-1313.
- 174 Rastogi N., Nagpal N., Alam H., Pandey S., Gautam L., Sinha M., Singh T.P. Preparation and Antimicrobial Action of Three Tryptic Digested Functional Molecules of Bovine Lactoferrin // PLoS ONE. - 2014. – Vol. 9, No 3. – P. 90011.
- 175 Armstrong McD J., Hopper K.E., McKenzie H.A., Murphy W.H. On the column chromatography of bovine whey proteins // Biochim Biophys Acta. - 1970. - Vol. 214, No 3. -P. 419-426.
- 176 La O A.A. Isolation and structure-functional characterization of human colostral lactoferrin // Biotechnologia Aplicada. -2000. -Vol.17, No 3. -P.177-182
- 177 Мэри К. Кэмпбелл, Шон О.Фаррелл. Биохимия. Т. 1. (қазақ тіліне аударған Б.С.Набиева). Алматы, 2013, 336 б. Т. 2. (қазақ тіліне аударғандар А.Е.Ережепов, Д.А.Ережепов). Алматы, 2014, 558 б.
- 178 Elzoghby A.O., Abdelmoneem M.A., Hassanin I.A., Abd Elwakil M.M., Elnaggar M.A., Mokhtar S., *et al.* Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand // Biomaterials. - 2020. - Vol. 263. -P. 120355.
- 179 Tang N., Skibsted L.H. Zinc bioavailability from whey. Enthalpy-entropy compensation in protein binding // Food Research International. - 2016. - Vol. 89. - P.749-755.
- 180 Kumar P., Sharma SM. An overview of purification methods for proteins // International Journal of Applied Research. - 2015. - Vol. 1, No 12. - P. 450-459.
- 181 Seganti L., Di Biase A.M., Marchetti M., Pietrantonio A., Tinari A., & Superti F. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses // BioMetals. - 2004. -Vol. 17, No 3. -P. 295-299.
- 182 Smialowska A., Matia-Merino L. and Carr A.J. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates // Journal of Dairy Science. - 2017. - Vol. 100, No 4. - P. 2553-2563.
- 183 Sun N., Jin Z., Li D., Yin H. and Lin S. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide, Asp-His-Thr-Lys-Glu, and in vitro calcium absorption studies of peptide-calcium complex // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2017. - Vol.65, No 44. - P. 9782-9789.
- 184 Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., and Sutton D. Heavy Metal Toxicity and the Environment // Molecular. Clinical and Environmental Toxicology. - 2012. - Vol.101. - P.133-164.

185 Udechukwu M.C., Collins S.A., & Udenigwe C.C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides // *Food & Function*. - 2016. - Vol. 7, No 10. -P. 4137-4144.

186 Uniacke - Lowe T. Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance // *International Dairy Journal*. -2010. - Vol. 20. - P. 609-629.

187 Vijay Kumar Srivastava and Rupali Yadav (2019). Isothermal titration calorimetry. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Elsevier Inc. All rights reserved. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5>.

188 Maret, W., & Sandstead, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. - 2006. - Vol. 20, No 1. - P. 3-18.

189 Kochanczyk T., Drozd A., Krezel A. Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins - insights into zinc regulation // *Metallomics*. - 2015. - Vol. 7, No 2. - P. 244-257.