



## Laktoferyna – technologia, analiza, aktywność biologiczna

Marek Adamczak\*, Bartosz Brzozowski

Katedra Inżynierii, Aparatury Procesowej i Biotechnologii Żywności  
Wydział Nauki o Żywności  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

\*Kontakt e-mail: [marek.adamczak@uwm.edu.pl](mailto:marek.adamczak@uwm.edu.pl)

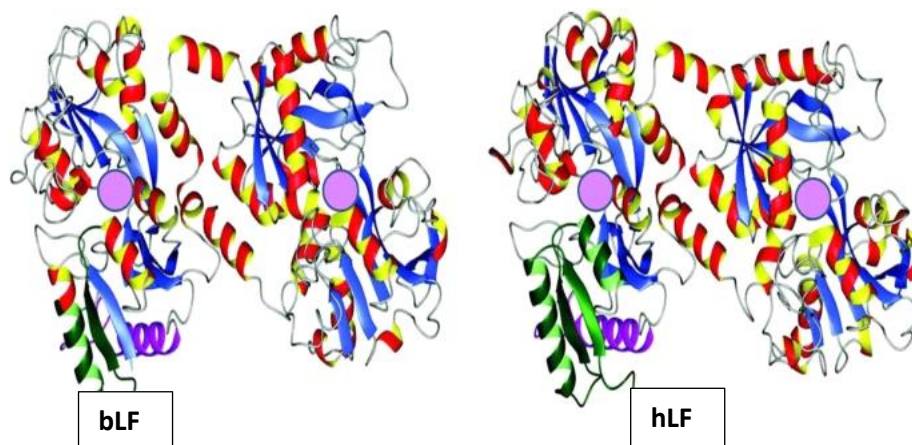
Globalny rynek laktoferyny wołowej (LF lactoferrin, bLF bovine lactoferrin) został wyceniony na 659,0 mln USD w 2023 roku, a przewiduje się, że wzrośnie z 669,9 mln USD w 2024 r. do 969,9 mln USD do 2032 r., wykazując w latach 2024-2032 średni roczny wskaźnik wzrostu na poziomie 4,7% ([www.fortunebusinessinsight.com](http://www.fortunebusinessinsight.com)). Główny udział w rynku LF w roku 2023 stanowiły produkty mlekozastępcze dla niemowląt (około 48%), a na drugim miejscu były suplementy diety zawierające LF (około 40%). Znaczne ożywienie zainteresowaniem LF widoczne było podczas pandemii COVID-19, z uwagi na przebieg infekcji wywołanej przez koronawirus SARS-CoV-2, w tym szczególnie gwałtownej reakcji immunologicznej zwanej „burzą cytokinową”. Stosowanie LF w produkcji żywności zostało zaakceptowane przez EFSA (European Food Safety Authority). Na wniosek Komisji Europejskiej panel EFSA ds. żywienia, nowej żywności i alergenów pokarmowych, żywienia i alergii (NDA) został poproszony o przeprowadzenie dodatkowej oceny LF jako składnika żywności w kontekście rozporządzenia (WE) nr 258/97 z uwzględnieniem uwag i zastrzeżeń natury naukowej zgłoszonych przez państwa członkowskie. Celem wniosku było wprowadzenie bLF do obrotu jako składnika suplementów diety, preparatów do żywienia niemowląt, dietetycznych środków spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego i odżywek dla sportowców oraz różnych rodzajów żywności. W przypadku niemowląt w wieku od 0 do 6 miesięcy wnioskodawca oszacował spożycie na około 200 mg na kg masy ciała i 1,2 g bLF dziennie. W przypadku osób dorosłych spożycie LF oszacowano na około 1,4 g do 3,4 g na dobę. Informacje toksykologiczne, w tym dane na temat genotoksyczności *in vitro*, wskazują na brak niekorzystnych skutków laktoferyny w proponowanych dawkach spożycia. Panel stwierdził, że składnik żywności bLF jest bezpieczny w ramach proponowanych zastosowań i poziomów stosowania [5]. Literatura dotycząca różnych aspektów otrzymywania, modyfikacji oraz stosowania i właściwości LF jest bardzo bogata [1, 9, 15, 18, 20, 22].

### Charakterystyka chemiczna LF

LF to wiążąca żelazo glikoproteina o masie cząsteczkowej 80 kDa z rodziny transferyn, występująca w większości płynów biologicznych i zaangażowana przede wszystkim w aktywność naturalnego układu odpornościowego ssaków. LF występuje w postaci natywnej, jako apo-laktoferyna bez żelaza i holo-laktoferyna nasycona żelazem 100%.

Ogólnie, naturalna forma proszku LF (mieszanina apo- i holo-LF) ma kolor łososiowo-różowy i charakteryzuje się 15-20% nasyceniem żelazem. Apo-LF ma masę cząsteczkową wynoszącą 75 kDa, a holo-LF 80 kDa, ale w zależności od zastosowanej metody oznaczenia uzyskiwano zróżnicowane wartości. Z wyjątkiem laktoperoksydazy, która charakteryzuje się wartością punktu izoelektrycznego (IEP) wynoszącą 9,6, wartość IEP dla LF jest znacznie większa niż innych frakcji białek mleka (kazeina 4,9-5,6; β-laktoglobulina 4,2; α-laktoalbumina 5,4; albumina surowicy 4,7; immunoglobuliny 4,8-7,8) i wynosi 9,3-9,5. Ta cecha sprawia, że proces wymiany kationów jest możliwy w celu selektywnego wydzielenia LF z mleka lub serwatki, zarówno z zastosowaniem kolumn jonowymiennych jak i chromatografii membranowej. Zbliżone wartości IEP dla LF i LPO, a także ich zbliżona masa cząsteczkowa powodują problemy podczas oczyszczania LF. Często otrzymywana mieszanina LF i LPO (lactoperoxidase) określana jest jako laktenina. LF składa się z łańcucha polipeptydowego posiadającego dwa homologiczne płaty: N- oraz C-końcowy. Struktury trzeciorzędowe LF połączone są łączykiem w postaci α-helisy. Każdy płat jest podzielony na dwie subdomeny N1 i N2; C1 i C2. Każdy płat posiada po jednym miejscu wiążącym jon żelaza Fe<sup>3+</sup> (Rys. 1). W wiązaniu jonów żelaza uczestniczą 4 reszty aminokwasowe: Asp, Tyr, Tyr oraz His, natomiast dwie reszty Arg biorą udział w wiązaniu jonu dwuwęglanowego lub wodorowęglanowego. LF wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do jonów Fe<sup>3+</sup> (stała wiązania rzędu 1022-1024 M<sup>-1</sup>) i w ten sposób jest związkiem chelatującym, chroniącym przed szkodliwym działaniem wolnego żelaza. Miejsce wiążące w LF posiada największe powinowactwo do jonów żelaza, niemniej jednak inne jony metali mogą zostać związane po uprzednim usunięciu jonów Fe<sup>3+</sup>, np. jony Ga<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, VO<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, niewiele wiadomo jednak na temat biologicznych konsekwencji wiązania innych metali przez LF.

łańcuch polipeptydowy bLF składa się z 696 aminokwasów (hLF 691 aminokwasów) połączonych 17 mostkami disiarczkowymi. Podobieństwo sekwencji bLF i hLF wynosi tylko 70%. Struktury drugorzędowe LF składają się w 33-34% z α-helis i w 17-18% struktur β-kartki. Do reszt aminokwasowych LF wiązaniami N-glikozydowymi połączone są reszty cukrowe. Udział części cukrowej wynosi 11,2% całkowitej masy białka, a jej skład różni się w zależności od źródła LF. Białko występuje w wydzielinach śluzowych i zawiera głównie N-acetyloglukozaminę, w mniejszych ilościach mannozę, galaktozę, kwas sjałowy i fukozę.



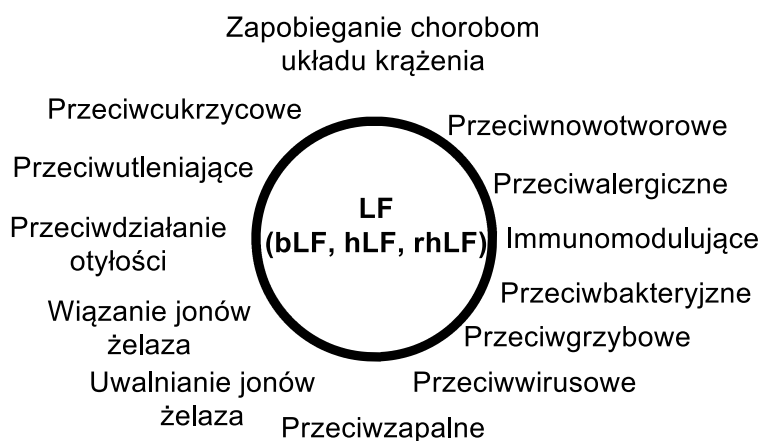
Rys. 1. Struktura laktoferyny wołowej (bLF) (PDB 1BLF), laktoferyny ludzkiej (hLF) (PDB 1BOL).  
Różowe koła reprezentują miejsca wiązania jonów żelaza (Fe<sup>+3</sup>)

### Aktywność biologiczna LF

LF charakteryzuje się różnymi rodzajami aktywności biologicznych (Rys. 2), które sprawiają, że jest przydatna jako składnik żywności, napojów, farmaceutyków, kosmetyków oraz opakowań. Nie sposób omówić w tym materiale wszystkich aktywności, w tym bardzo ważnych probiotycznych, stymulacji rozwoju właściwej mikrobioty przewodu pokarmowego [22], działania neuroprotektynowego w chorobie Parkinsona i Alzheimerera [6, 21]. LF wykazuje



aktywność przeciwbakteryjną wobec wielu patogennych organizmów, takich jak bakterie, grzyby, wirusy, jak *Herpes simplex*, choć dane wskazują na większą aktywność przeciwwirusową produktów hydrolizy LF [16] oraz nanocząstek funkcjonalizowanych LF [10]. Wykazano również, że LF działa synergistycznie z lizozymem, przeciwciałami, immunoglobulinami, laktoperoksydazą i antybiotykami przeciwko bakteriom [7]. LF przypisuje się również właściwości antynowotworowe [4], zwiększa odkładanie wapnia w osteoblastach [17], a także poprawia wydajność wzrostu zwierząt hodowlanych [3]. Uważa się, że zdolność laktoferyny do wzmacniania układu odpornościowego wynika z jej zdolności do zwiększania aktywności makrofagów, indukowania cytokin zapalnych, w tym interleukonu-8, czynnika martwicy nowotworów alfa i tlenu azotu oraz stymulowania proliferacji limfocytów, aktywnych monocytów i neutrofilii [13]. LF jest ważnym elementem układu odpornościowego, co często przypisywane jest jej powinowactwu do żelaza. Wychwytyjąc i wiążąc żelazo w organizmie, utrudnia bakteriom dostęp do jonu metalu niezbędnego do rozwoju i wzrostu. Do tej pory panowało przekonanie, że tylko powinowactwo do żelaza sprawia, że LF jest częścią układu odpornościowego. Ostatnie badania wykazały jednak bardziej bezpośredni sposób działania LF. Jak wspomniano wcześniej, N-końcowy fragment białka ma silnie dodatni ładunek. Właściwość ta umożliwia LF wchodzenie w interakcję ze ścianą komórkową bakterii i jej uszkodzenie [8]. Uwalnianie lipopolisacharydów bakterii możliwe jest także w wyniku wiązania przez LF jonów  $Ca^{2+}$  [14]. Aktywność biologiczną wykazują również peptydy, np. laktoferycyna, powstająca w wyniku hydrolizy LF katalizowanej przez pepsynę. Jest ona fragmentem N-końcowym LF, a analizy sugerują, iż peptyd ten przejawia jeszcze większą bioaktywność niż LF.

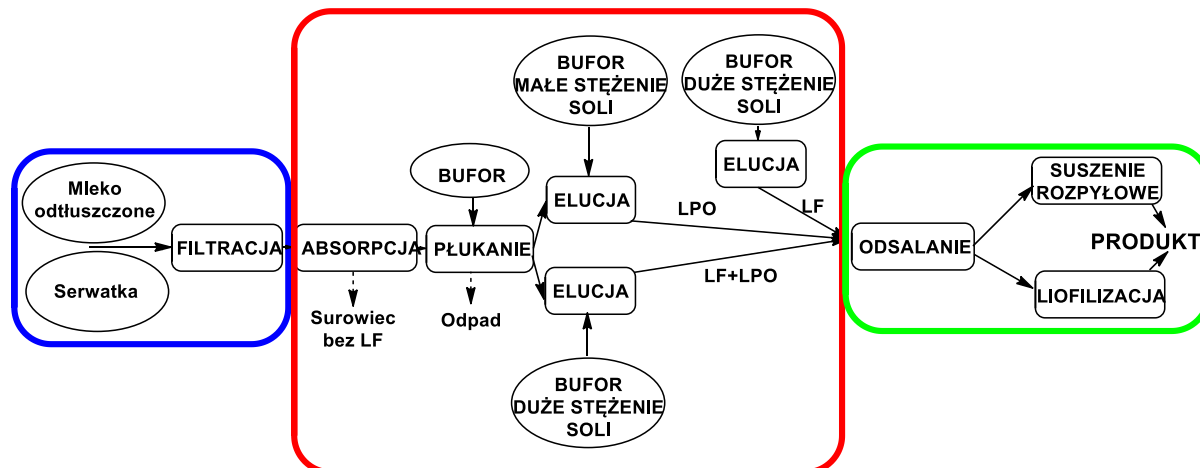


Rys. 2. Przykłady aktywności biologicznych LF

### Technologia otrzymywania laktoferyny

Laktoferyna jest przemysłowo izolowana z serwatki lub mleka odtłuszczonego przy użyciu procesów chromatografii membranowej i jonowymiennej (Rys. 3). Niewiele szczegółowych informacji dostępnych jest na temat tych procesów. Wiadomym jest, że w celu uniknięcia denaturacji LF stosowane jest jako surowiec niepasteryzowane odtłuszczone mleko lub serwatka. Po filtracji surowiec przepuszczany jest przez kolumnę kationowymienną. Zanieczyszczenia są wymywane z kolumny za pomocą buforu o małym stężeniu soli, a laktoferyna jest wymywana buforem o dużym stężeniu soli. Otrzymanie utrwalonego preparatu LF jest poprzedzone zagęszczeniem metodą ultrafiltracji i odsoleniem przez diafiltrację. Suszenie jest wymagane do przekształcenia koncentratu laktoferyny w formę nadającą się do transportu i sprzedaży. Dwie metody suszenia LF stosowane przemysłowo to liofilizacja lub suszenie rozpyłowe. Wcześniejsze analizy wskazywały, że po zastosowaniu suszenia rozpyłowego (temperatury: wlotowa 180°C, wylotowa 95°C) można uzyskać produkt o doskonałych właściwościach fizyko-chemicznych i aktywności przeciwutleniającej, lepszych nawet od produktu otrzymanego po liofilizacji [19]. W ostatnio zaprezentowanej pracy wykazano, z użyciem nowych dostępnych technik analitycznych, że LF suszona rozpyłowo wykazywała znacznie większy zakres denaturacji i mniejszą zdolność wiązania żelaza w porównaniu z płynnym

koncentratem lub produktem liofilizowanym [11]. Półprodukt i produkt wykazywały aktywność bakteriostatyczną nawet przy małych stężeniach laktoferyny wynoszących  $0,01 \text{ mg} \times \text{cm}^{-3}$ . Nie zaobserwowano natomiast działania bakteriobójczego dla żadnego stężenia lub obróbki laktoferyny.



Rys. 3. Ogólny schemat otrzymywania LF, LPO i mieszaniny LF i LPO.

Proces technologiczny polega na realizacji 3 głównych etapów: przygotowania surowca (niebieski obszar), wydzieleniu produktu metodą chromatografii (czerwony) i formułacji produktu (zielony).

## Podsumowanie

LF to wielofunkcyjne białko, glikoproteina o bardzo zróżnicowanych aktywnościach biologicznych i co za tym idzie szerokich zastosowaniach. Produkcja suplementów żywności jak i produktów spożywczych wzbogaconych w LF wymaga analiz interakcji ze składnikami matrycy produktu. Wciąż wiele technologii i technik związanych z otrzymywaniem i przygotowaniem preparatów zawierających LF wymaga doskonalenia, a bieżące zastosowania zmuszają do kontroli procesu produkcyjnego. Ważna jest nie tylko ilość LF, ale także charakterystyka funkcjonalna izolowanego białka na każdym etapie realizacji procesów i operacji jednostkowych. Jedną z pierwszych i podstawowych właściwości LF jest działanie antymikrobiologiczne. Ze względu na pojawienie się oporności na antybiotyki, wykorzystanie nutraceutyków jest alternatywną strategią dla różnych zastosowań biomedycznych. LF jest jedną z kluczowych substancji immunomodulujących występujących naturalnie w płynach ustrojowych, a szczególnie uzasadnione jest pozyskiwanie LF z mleka oraz serwatki. Znaczący jest rozwój w zakresie otrzymywania rekombinowanej LF. Podawanie LF jest skuteczne do zmniejszania ryzyka infekcji dróg oddechowych (RTI, respiratory tract infection) [2]. LF może również odgrywać korzystną rolę w leczeniu objawów i rekonwalescencji pacjentów cierpiących na RTI i wspomagać leczenie COVID-19, jednak wymaga to dalszych dowodów i analizy dużych grup pacjentów [12]. Wyniki badań wskazują na zasadność wzbogacania w LF preparatów dla niemowląt [20]. Warto zwrócić także uwagę na zmiany na rynku producentów LF, konsolidację produkcji oraz ewolucję regulacji prawnych dotyczących oceny mleka, serwatki, po wydzieleniu LF oraz innych białek.

## Literatura

1. Abd El-Hack M.E., Abdelnour S.A., Kamal M.A., Khafaga A.F., Shakoory A.M., Bagadood R.M., Naffadi H.M., Alyahyawi A.Y., Khojah H., Alghamdi S.A., Jaremko M., Świątkiewicz S. (2023). Lactoferrin: Antimicrobial impacts, genomic guardian, therapeutic uses and clinical significance for humans and animals. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 164, 114967.
2. Ali A.S., Hasan S.S., Kow C.S., Merchant H.A. (2021). Lactoferrin reduces the risk of respiratory tract infections: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition ESPEN*, 45, 26-32.

3. Ashraf M.F., Zubair D., Bashir M.N., Alagawany M.M., Ahmed S., Shah Q.A., Buzdar J.A., Arain M.A. (2024). Nutraceutical and health-promoting potential of lactoferrin, an iron-binding protein in human and animal: current knowledge. *Biological Trace Element Research*, 202, 56-72.
4. Cutone A., Rosa L., Ianiro G., Lepanto M.S., Bonaccorsi Di Patti M.C., Valenti P., Musci G. (2020). Lactoferrin's anti-cancer properties: safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules*, 10, 456.
5. EFSA-NDA (2012). Scientific opinion on bovine lactoferrin. *EFSA Journal*, 10, 2701.
6. Eker F., Bolat E., Pekdemir B., Duman H., Karav S. (2023). Lactoferrin: neuroprotection against Parkinson's disease and secondary molecule for potential treatment. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15.
7. Farnaud S., Evans R.W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395-405.
8. Gruden Š., Poklar Ulrih N. (2021). Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11264.
9. Krupińska A.M., Bogucki Z. (2024). Lactoferrin as a potential therapeutic for the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Journal of Oral Biosciences*, 66, 308-313.
10. Krzyzowska M., Chodkowski M., Janicka M., Dmowska D., Tomaszewska E., Ranoszek-Soliwoda K., Bednarczyk K., Celichowski G., Grobelny J. (2022). Lactoferrin-functionalized noble metal nanoparticles as new antivirals for HSV-2 infection. *Microorganisms*, 10, 110.
11. Morel J., Md Zain S.N., Archer R. (2022). Comparison of drying techniques for bovine lactoferrin: Iron binding and antimicrobial properties of dried lactoferrin. *International Dairy Journal*, 124, 105142.
12. Navarro R.M., Paredes J.L., Tucto L., Medina C., Angles-Yanqui E., Nario J.C., Ruiz-Cabrejos J., Quintana J.L., Turpo-Espinoza K., Mejia-Cordero F., Aphan-Lam M., Florez J., Carrasco-Escobar G., Ochoa T.J. (2023). Bovine lactoferrin for the prevention of COVID-19 infection in health care personnel: a double-blinded randomized clinical trial (LF-COVID). *BioMetals*, 36, 463-472.
13. Rascón-Cruz Q., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Nakamura-Bencomo S.I., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. (2021). Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes. *Molecules*, 26, 205.
14. Rossi P., Giansanti F., Boffi A., Ajello M., Valenti P., Chiancone E., Antonini G. (2002). Ca<sup>2+</sup> binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 41-48.
15. Sabra S., Agwa M.M. (2020). Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1046-1060.
16. Shestakov A., Jenssen H., Nordström I., Eriksson K.M. (2012). Lactoferricin but not lactoferrin inhibit herpes simplex virus type 2 infection in mice. *Antiviral Research*, 93, 340-345.
17. Takayama Y., Mizumachi K. (2008). Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrix calcification by human osteoblast-like cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 226-230.
18. Tavassoli M., Bahramian B., Abedi-Firoozjah R., Ehsani A., Phimolsiripol Y., Bangar S.P. (2024). Application of lactoferrin in food packaging: a comprehensive review on opportunities, advances, and horizons. *International Journal of Biological Macromolecules*, 273, 132969.
19. Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B. (2017). Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 985-994.
20. Wang W., An Q., Huang K., Dai Y., Meng Q., Zhang Y. (2024). Unlocking the power of lactoferrin: exploring its role in early life and its preventive potential for adult chronic diseases. *Food Research International*, 182, 114143.
21. Yong S.J., Veerakumarasivam A., Lim W.L., Chew J. (2023). Neuroprotective effects of lactoferrin in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a narrative review. *ACS Chemical Neuroscience*, 14, 1342-1355.
22. Zhao C., Chen N., Ashaolu T.J. (2023). Prebiotic and modulatory evidence of lactoferrin on gut health and function. *Journal of Functional Foods*, 108, 105741.