

# Влияние температурного воздействия на концентрацию лактоферрина в коровьем молоке

Донская Галина Андреевна

ФГАНУ «ВНИМИ»

Адрес: 115093, Москва, ул. Люсиновская, д.35, корп.7

E-mail: [g\\_donskaya@vniimi.org](mailto:g_donskaya@vniimi.org)

Чумакова Ирина Валерьевна

ФГАНУ «ВНИМИ»

Адрес: 115093, Москва, ул. Люсиновская, д.35, корп.7

E-mail: [e\\_chumakova@vniimi.org](mailto:e_chumakova@vniimi.org)

Объектом настоящего исследования являлся сывороточный протеин лактоферрин (ЛФ), который обладает защитными функциями и признан важным компонентом врожденного иммунитета организма. Этот белок проявляет антимикробные, противовирусные свойства, регулирует воспалительный процесс и участвует в активации иммунных клеток. ЛФ определяется в различных биологических жидкостях, но большая его концентрация показана в молозиве и молоке в составе сывороточных белков. Целью настоящей работы является выделение ЛФ из нативного (сырого) и термически обработанного молока для установления влияния температурных режимов на концентрацию этого белка. Объекты исследования: лактоферрин; сырое термически необработанное молоко, полученное из индивидуального хозяйства; пастеризованное молоко. Лактоферрин выделяли из обезжиренного молока с помощью ионообменной хроматографии. Анализы образцов ЛФ проводили методом ВЭЖХ. Концентрацию белка, выделенного из молока, определяли колориметрическим методом по Брэндфорд. Установили, что в молоке, пастеризованном при температуре  $(78 \pm 2)^\circ\text{C}$  с выдержкой 20 сек., концентрация ЛФ, в сравнении с нативным молоком, снижалась до 29,1%. При температурном воздействии  $(92 \pm 1)^\circ\text{C}$  с выдержкой 2 мин. концентрация ЛФ составляла менее 1% от концентрации ЛФ в нативном молоке. Очевидно, что снижение температуры пастеризации молока ниже  $78^\circ\text{C}$  будет способствовать большему сохранению сывороточного белка ЛФ, однако при этом потребуются длительная временная выдержка, которая приведёт к изменению физико-химических показателей молока. В связи с высокой термолабильностью сывороточного белка, целесообразно рассмотреть технологии деконтаминации молока без применения высоких температур.

**Ключевые слова:** лактоферрин, хроматография, сырое молоко, термически обработанное молоко

## Введение

В современных научных работах уделяется большое внимание биологической роли белков молока, что особенно важно при создании продуктов функциональной направленности.

Известно, что коровье молоко обладает антиоксидантной и противомикробной активностью благодаря присутствию таких сывороточных белков, как лактоферрин, лактопероксидаза, иммуноглобулины и др. Особая роль отводится лактоферрину, который синтезируется эпителиальными клетками желез внешней секреции млекопитающих. Белок ЛФ входит в состав таких биологических жидкостей организма, как слюна, слеза, кровь, молоко (Gonzales-Chavez, Arevalo-Gallegos, Rascon-Gruz, 2009, p. 301.e1–301.e8; Fang, Zhang,

Jiang, Guo, Zheng, 2014, p. 535–543; Асафов, Танькова, Искакова, Харитонов, Курченко, Головач, 2019, с. 20–25)). ЛФ относится к семейству трансферринов (переносчиков железа), является гликопротеином, связывающим 2 иона  $\text{Fe}^{3+}$ .

Прежде всего, ЛФ – это важнейший многофункциональный белок грудного молока человека, который является ключевым компонентом врожденного иммунитета и защищает организм новорожденного от патогенных микроорганизмов (Pierce, Legrand, 2009, p. 361–369) Первоначально ЛФ рассматривали как железосвязывающий белок молока с бактериостатическими свойствами. Известно, что при воспалительном процессе ЛФ связывает избыток железа и других металлов, препятствуя развитию патогенной микрофлоры (Костевич, Соколов, Захарова, Васильев, 2014, с. 80–86).

Позднее было установлено, что ЛФ успешно защищает организм не только от различных патогенных микробов (Ward, 2005, p. 2540–2548; Зобкова, Федотова, Фурсова, Зенина, Гаврилина, Шелагинова, 2016, с. 91–100), но и проявляет антивирусную активность (Scarino, 2007, p. 161–162; Chow, Subbaraman, Sheardown, 2009, p. 71–82). Лактоферрин регулирует воспалительные процессы в кишечнике, вызываемые патогеном *Helicobacter pylori*, приводящим к возникновению язвы желудка и двенадцатиперстной кишки (Sachdeva, Nagpal, 2009). ЛФ значительно снижает токсичность при высоком инфицировании *E. coli* (Jenssen, Hancock, 2009, p. 19–29). Известна противогрибковая активность ЛФ (Lupetti, Paulusma-Annema, Welling, Dogterom-Ballering, Brouwer, Senesi, Van Dissel, Nibbering, 2003, p. 262–267).

### Литературный обзор

Исследованиями новозеландских учёных установлено, что ЛФ активизирует рост костной ткани и защищает её от истончения (Lorget, Clough, Oliveira, Daury, Sabokbar, Offord, 2002, p. 261–266).

Белок ЛФ вызывает дифференциацию и пролиферацию определенных клеток. Так рост и развитие пищеварительной системы и костной ткани у новорождённых, питающихся материнским молоком, происходит быстрее, чем при вскармливании искусственными молочными смесями (Donovan, 2009, p. 49–61).

Показана важная роль ЛФ при железодефицитной анемии у детей. Для нормализации содержания железа необходимо, в первую очередь, грудное вскармливание (Sachdeva, Nagpal, 2009, p. 720–730). В Италии получены успешные результаты по применению ЛФ для лечения анемии у беременных (Paesano, Pacifici., Benedetti, Berlutti, Frioni, Polimeni, Valenti, 2014, p. 999–1006).

Установлена возможность использования ЛФ в качестве терапевтического агента при острой лучевой болезни. Внутривенное введение ЛФ приводит к улучшению состава периферической крови и обеспечивает высокую выживаемость облучённых сублетальной дозой лабораторных животных (Патент № 2294755, 2007<sup>1</sup>).

Показано многочисленное использование ЛФ в пищевой промышленности и медицинской практи-

ке (Комолова, Тихомирова, Ионова, Комолов, 2011, с. 70–71); (Зобкова, Мишина, Бегунова, 2007, с. 60; Зобкова, Мишина, Бегунова, 2008, с. 64–65; Зобкова, Мишина, 2009, с. 49–52; Зобкова, Мишина, Смолянинов, Шехватова, 2009, с. 21–22).

В Японии разработан препарат на основе коровьего ЛФ для лечения диареи у детей, вызванной различными ротовирусными инфекциями (Wakabayashi, Oda, Yamauchi, Abe, 2011, p. 666–671).

Отечественной компанией «Лактобио» разработан ряд препаратов на основе ЛФ. К ним относится «Биферрин», в состав которого входят ЛФ, цинк и витамин Е. Применение этого препарата, содержащего натуральные антиоксиданты, позволяет снизить интоксикацию организма после химиотерапии, нормализовать кроветворение. «Биферрин» хорошо зарекомендовал себя для профилактики анемии, остеопороза и лечения кожных расстройств у подростков<sup>2</sup>.

Известно, что в Японии и Южной Корее большая часть детского питания производится с добавлением ЛФ. Такое же направление использования ЛФ принято в 2019г. в Китае.

Австралия, наряду с США и Новой Зеландией, является крупнейшим производителем ЛФ. В России производство ЛФ ничтожно мало, хотя для его получения достаточно сырьевых ресурсов.

### Теоретическое обоснование

Ранее во ВНИМИ проводились исследования по выделению ЛФ из молока с помощью ионообменной хроматографии (Зобкова, Мишина, 2009, с. 49–52).

Сотрудниками ГУ пищевых производств предложена модифицированная методика выделения ЛФ из обезжиренного молока с использованием двойной ионообменной хроматографии (Титов, Тихомирова, Ионова, 2019, с. 91–95). В качестве сорбента применяли карбоксиметилцеллюлозу производства Германии и сорбент США Macro Prep High Support. Рекомендовано использование этой методики для получения ЛФ из сборного молока на предприятиях молочной промышленности. Очевидно, что промышленное производство ЛФ во многом решило бы проблему оздоровления, в первую очередь, детского населения и эта проблема актуальна.

<sup>1</sup> Средство лечения острой лучевой болезни: пат. 2294755 Рос. Федерация / Ю.Б. Дешевой, А.А. Иванов, В.Н. Мальцев, А.М. Уланова ; заявл. 21.06.05 ; опубл. 10.03.07. 4 с.

<sup>2</sup> Всей семье здоровья с Лактоферрином [Электронный ресурс]. URL: <https://www.lactobio.ru/> (дата обращения: 13.08.2020).

С другой стороны, необходимо создать такие условия обработки молока, чтобы максимально сохранить в его составе биологически активные нутриенты.

Научными исследованиями показано, что потребление сырого (парного) коровьего молока снижает риск возникновения респираторных инфекций (Loss, Depner, Ulfman, vanNeerven, Nose, 2015, p. 56–62), тогда как переработанное женское и коровье молоко (после пастеризации, кипячения, ультравысокотемпературной обработки) не оказывает профилактического воздействия на эти заболевания у новорожденных (Dritsakou, Liosis, Valsami, Polychronopoulos, Skouroliakou, 2016, p. 1131–1138). Это можно объяснить денатурацией и разрушением присутствующих в сыром молоке активных белков во время нагревания. Тепловая обработка, применяемая в технологии молочных продуктов, подавляет защитные свойства сывороточных белков молока (Brick, Ege, Voeren, Bock, von Mutius, Vervont, Hettinga, 2017, p. 1–14).

## Исследование

Цель данных исследований – установление влияния температурных режимов на концентрацию биологически активного сывороточного белка ЛФ в коровьем молоке.

Задачи исследований: выделение ЛФ из нативного термически необработанного молока и из молока, прошедшего термическую обработку; определение концентрации выделенного ЛФ и сравнительный анализ концентраций ЛФ в сыром и термически обработанном молоке.

## Материалы и методы исследований

Объектами исследований являлись: лактоферрин, молоко нативное, термически необработанное; молоко пастеризованное.

ЛФ выделяли из обезжиренного молока. Обезжиривание проводили на центрифуге при 1500 об/мин., в течение 30 мин. при 30°C. Для выделения ЛФ использовали катионообменную смолу сульфопропилсефарозу. Полученные фракции ЛФ анализировали на системе ВЭЖХ. Коммерческий препарат ЛФ применяли как маркерный белок для ВЭЖХ анализа и экспериментов по термообработке образцов. Для определения концентрации белка в растворах использовали

колориметрический метод Бредфорда (Bradford, 1976, p. 248–254).

Ионообменную хроматографию проводили на катионообменном сорбенте сульфопропилсефароза (SP-sepharose BB, GE). Этот сорбент разработан компанией Дженерал Электрик для выделения биополимеров из различных биосубстанций (клеточные лизаты, сыворотки, культуральные жидкости, молоко) без предварительных этапов очистки (осаждения, высаливания и т.д.) (Kong, Liu, Di, Wang, Du, Zhang, 2012, p. 2290–2293). Колонку с 10 мл сорбента сульфопропил-сефароза уравнивали 10 мМ раствором Na-фосфатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl. Присутствие 0,5 М соли не позволяет связываться с сорбентом лактопероксидазе, которая имеет близкую изоточку с ЛФ и часто загрязняет фракцию этого белка при выделении. Обезжиренное молоко (1 л) доводили до pH 6,8 1М раствором Трис, добавляли NaCl до 0,5 М и неионный детергент Твин-60 до 0,001%. Перед хроматографией молоко отфильтровывали от крупных казеиновых гранул на стеклянном фильтре №3. Молоко прокачивали через колонку со скоростью 20 мл/мин при помощи перистальтического насоса, затем сорбент промывали посадочным буфером до нулевых (базовых) значений при 280 нм проточного спектрофотометра. Фракцию ЛФ, связанную с катионообменником, элюировали 1М NaCl в 10 мМ фосфатном буфере.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Полученные фракции белка ЛФ анализировали на системе ВЭЖХ Аджилент 1100 с использованием колонки Симметрии-300, С4, диаметр 4,9 мм, 150мм (Symmetry-300, C4, Waters).

Белковый раствор ЛФ диализовали против 10мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,8, в течение ночи при температуре 8°C и 10 мкл диализата наносили на ВЭЖХ колонку с последующей элюцией в линейном градиенте ацетонитрила (от 5 до 80%). В качестве контроля использовали коммерческий препарат ЛФ (ООО «Лактобио»). Элюированные белки детектировали при 280 нм и после интегрирования определяли степень гомогенности ЛФ по площади пика, который ему соответствовал.

## Результаты и обсуждение

Так, время выхода пика ЛФ для коммерческого препарата соответствовало 10,78 мин, а чистота белка после интегрирования составила 95,71%. ВЭЖХ анализ коммерческого препарата лактоферрина показан на Рисунке 1.

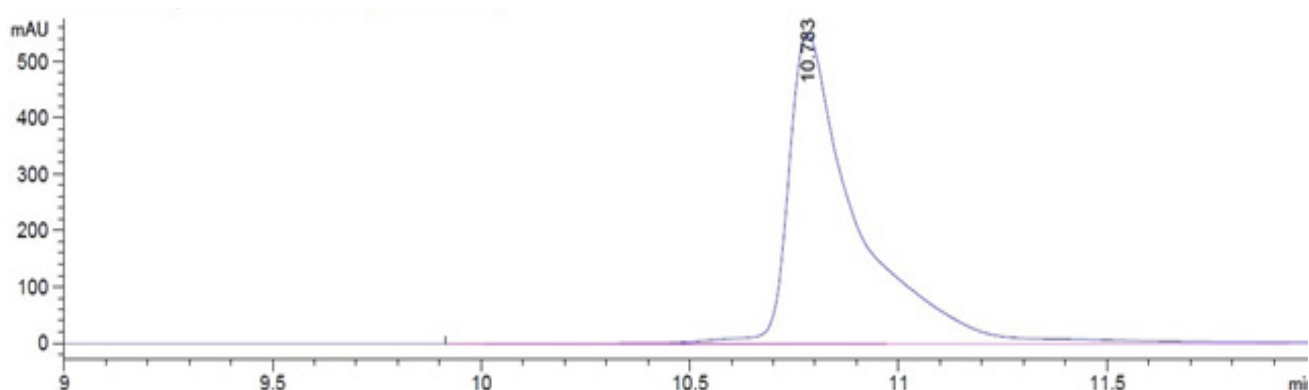


Рисунок 1. ВЭЖХ анализ коммерческого препарата лактоферрина

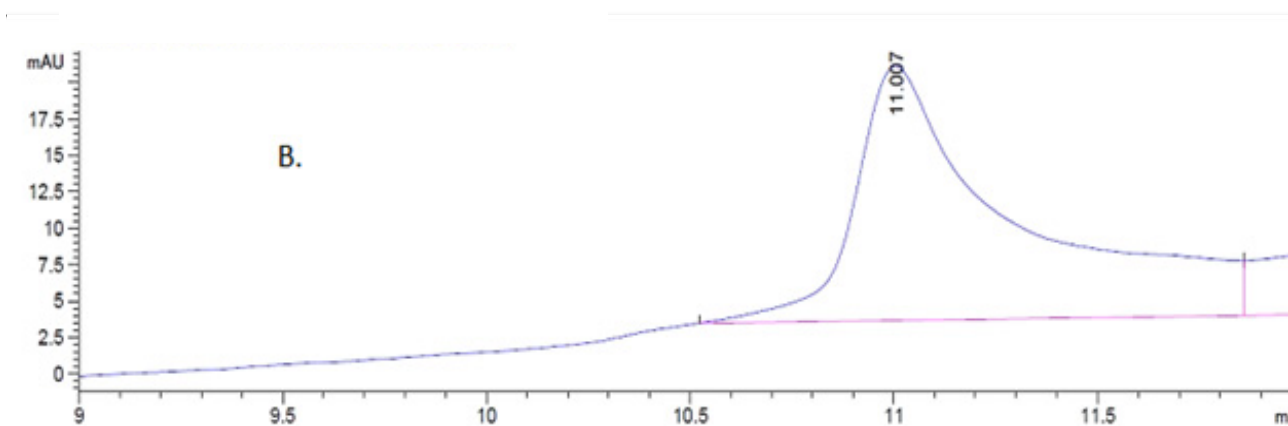
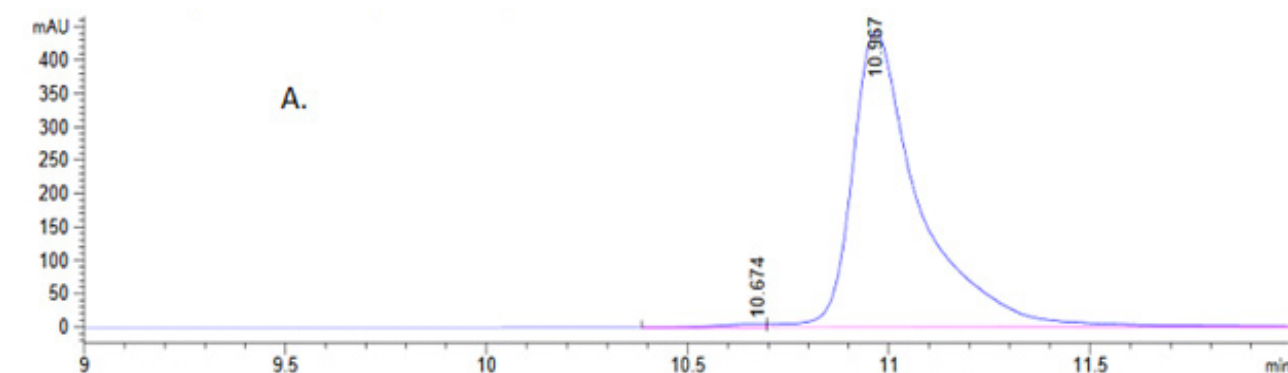


Рисунок 2. ВЭЖХ анализ коммерческого препарата лактоферрина после различных температурных воздействий. А – раствор ЛФ, обработанный при 78°C, 20 секунд., В - раствор ЛФ, обработанный при 92°C в течение 2 минут

На Рисунке 2 представлены результаты ВЭЖХ анализа коммерческого препарата ЛФ после различных режимов термообработки. Пастеризацию образцов проводили при 78°C в течение 20 сек. (А), и при 92°C в течение 2 мин. (В). Затем образцы центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин. для осаждения возможных денатурированных по-

липептидов, фильтровали через шприцевую насадку 0,22 мкм и анализировали на ВЭЖХ колонке.

Результаты эксперимента представлены в сводной Таблице 1, где показаны остаточные концентрации белка ЛФ в коммерческом препарате после различных режимов нагревания.

Таблица 1

Остаточные количества ЛФ в коммерческом препарате после пастеризации при различных температурных режимах

Образцы ЛФ	Концентрация общего белка*	ВЭЖХ анализ ЛФ**	Концентрация ЛФ в образце	% сохранения ЛФ
ЛФ без термообработки	20.0 мг/мл	95,7%	19.1 мг/мл	100%
ЛФ после при 78°C 20сек	15.7 мг/мл	95,23%	14.9 мг/мл	78%
ЛФ после 92°C /2 мин.	2.2 мг/мл	40,93%	0.9 мг/мл	4,7%

\*Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976),

\*\*Процент ЛФ в образцах определяли по интегрированию хроматографических пиков, которые соответствовали ЛФ.

На Рисунке 3 представлены результаты анализа ЛФ, выделенного с использованием катионообменной хроматографии из сырого коровьего молока (А) и из молока, прошедшего термообработку при 78°C с выдержкой 20 сек. (В) и при 92°C с выдержкой 2 мин. (С). Подготовку выделенного белка для анализа на ВЭЖХ проводили также, как и для коммерческого препарата ЛФ.

В Таблице 2 представлены результаты концентрации ЛФ, выделенного с использовани-

ем ионообменной хроматографии из образцов нативного молока и термически обработанного молока.

Установлено, что концентрация маркерного препарата ЛФ после температурных воздействий (78°C и 92°C) снижалась до 78% и 4,7% соответственно. Это указывает на большую термоустойчивость предварительно выделенного белка ЛФ по сравнению с ЛФ, который подвергался термообработке в составе молока.

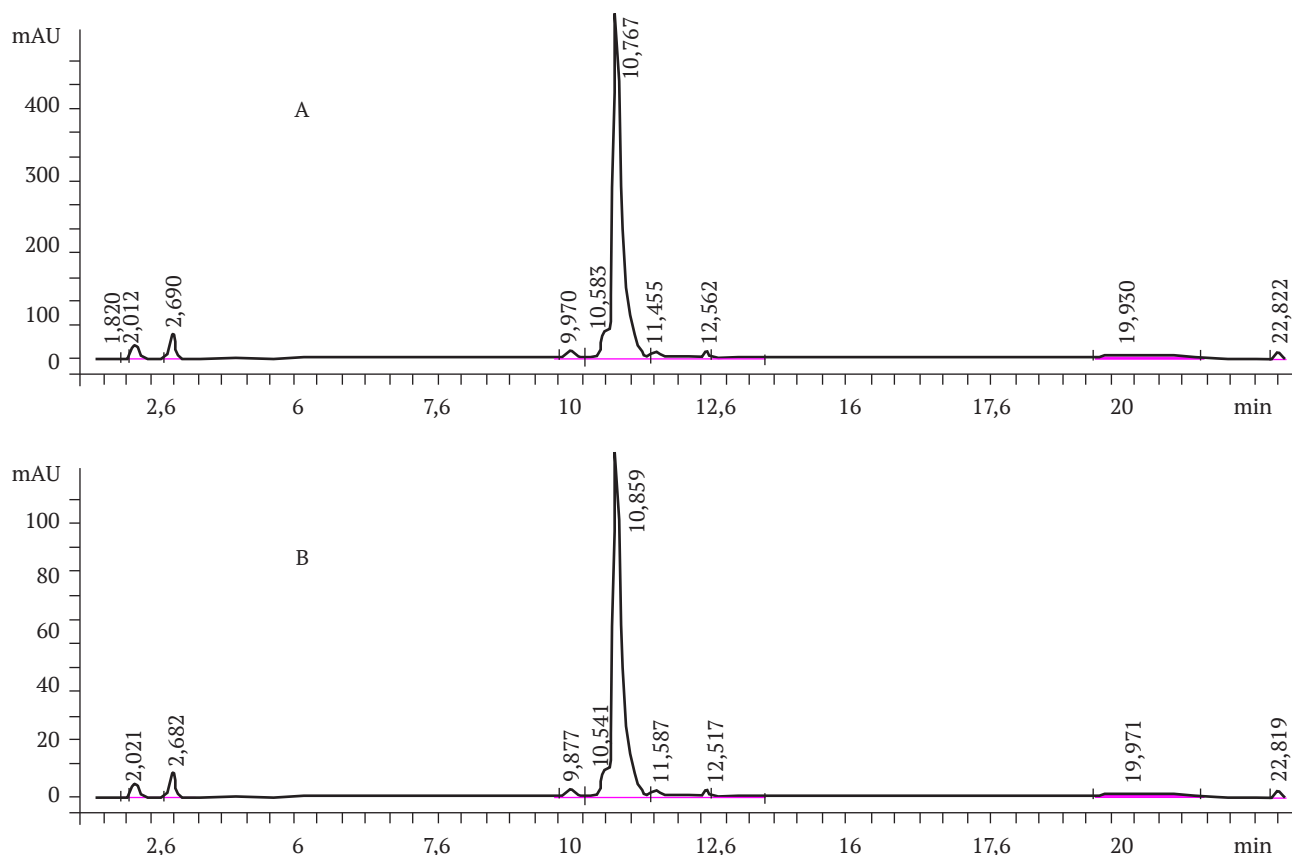


Рисунок 3. ВЭЖХ анализ фракций ЛФ, полученных из сырого коровьего молока с помощью катионообменной хроматографии и термически обработанного молока А, В

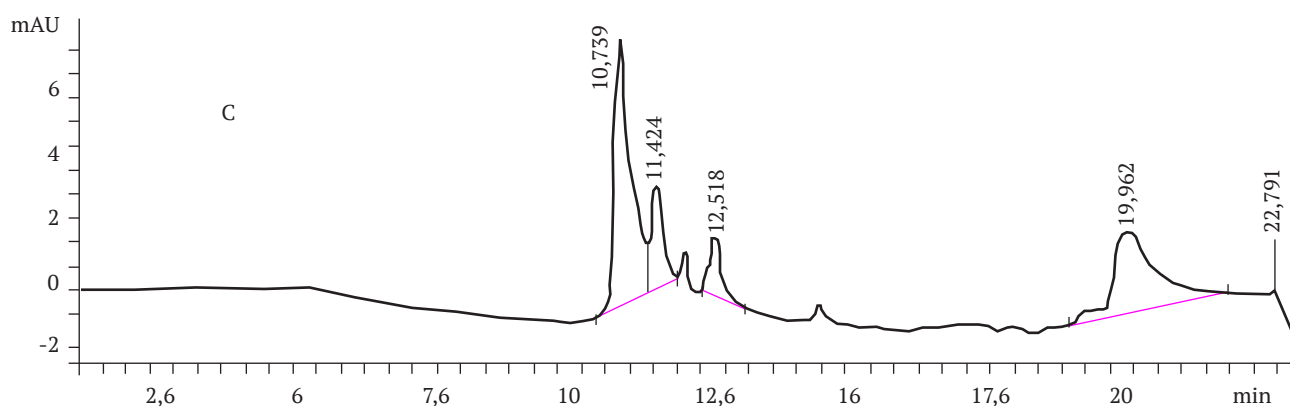


Рисунок 3. ВЭЖХ анализ фракций ЛФ, полученных из сырого коровьего молока с помощью катионно-обменной хроматографии и термически обработанного молока С

Таблица 2

Остаточные количества ЛФ, выделенного из образцов сырого и термически обработанного молока при различных температурных режимах

Образцы молока	Концентрация общего белка*	ВЭЖХ анализ ЛФ**	Концентрация ЛФ в образце	% сохранения ЛФ
Молоко без термообработки	24 мг/мл	84.16%	20.2 мг/мл	100%
Молоко после обработки 78°C/20 сек.	7.3 мг/мл	80.36%	5.87 мг/мл	29,1%
Молоко после обработки 92° С/2 мин	1.2 мг/мл	42.29%	0.51 мг/мл	0,025%

\*Концентрацию белка во фракции, полученной после ионообменной хроматографии, определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976),

\*\*Процент ЛФ в образцах определяли по интегрированию хроматографических пиков, которые соответствовали белку ЛФ по времени выхода

## Выводы

Проведено выделение лактоферрина из сырого (нативного) и термически обработанного молока с использованием ионообменной хроматографии.

Определена концентрация лактоферрина, выделенного из нативного и термически обработанного молока.

Исследовано влияние температурных режимов пастеризации молока на содержание в нём биологически-активного сывороточного белка лактоферрина.

Показано, что при температуре пастеризации молока (78+2)°С с выдержкой 20 секунд концентрация ЛФ снижалась на 70,9% относительно сырого молока. При температурном режиме обработки молока (92+2)°С с выдержкой 2 минуты проис-

ходила практически полная денатурация лактоферрина. Полученные результаты коррелируют с исследованиями других авторов, изучающих влияние температурных воздействий на сывороточные белки (Rynne, Beresford, Kelly, Guinnee, 2004, p. 989–1001; Dissanayake, Ramchandran, Donkor, Vasiljevic, 2013, p. 93–99).

Установлено, что при указанных выше температурных режимах происходит резкое снижение концентрации ЛФ, вплоть до его полной денатурации, что снижает биологическую ценность молочного сырья. Очевидно, что уменьшением температуры пастеризации можно добиться большего сохранения ЛФ, но при этом потребуется значительное увеличение временной выдержки, что приведёт к изменениям физико-химических показателей молока.

В связи с этим представляется целесообразным рассмотреть возможность использования новых

технологий обработки молока, которые обеспечивают сохранение биологически активных сывороточных белков.

В настоящее время разрабатываются мембранные технологии пищевой холодной стерилизации (Tomasula, Bonnaillie, 2015, p. 1–32; Panopoulos, Moatsou, Psychogyiouroulou, Moschoroulou, 2020, p. 284–294), обеспечивающие сохранение нативных свойств продуктов. Перспективными являются и технологии по использованию высокого давления для деконтаминации молочного сырья без температурных воздействий (Rashmi, Warriar, 2020, p. 25–49). Указанные технологии могут быть предметом дальнейших научных изысканий.

### Литература

- Асафов В.А., Танькова Н.Л., Исакова Е.Л., Харитонов В.Д., Курченко В.П., Головач Т.Н. Некоторые аспекты регулирования микробиологического состава молозива // Пищевая индустрия. 2019. № 4(42). С. 20–25. <https://doi.org/10.24411/9999-008A-2019-10015>
- Зобкова З.С., Мишина А.В. Наночастицы лактоферрина в производстве функциональных молочных продуктов // Хранение и переработка с/х сырья. 2009. № 12. С. 49–52.
- Зобкова З.С., Мишина А.В., Бегунова А.В. Антимикробные свойства лактоферрина // Молочная промышленность. 2007. № 10. С. 60.
- Зобкова З.С., Мишина А.В., Бегунова А.В. О бифидогенных свойствах лактоферрина // Молочная промышленность. 2008. № 7. С. 64–65.
- Зобкова З.С., Мишина А.В., Смолянинов В.В., Шехватова Г.В. Технология экстрагирования лактоферрина из сырого молока // Молочная промышленность. 2009. № 12. С. 21–22.
- Зобкова З.С., Федотова, О. Б., Фурсова Т.П., Зенина Д.В., Гаврилина А.Д., Шелагинова И.Р. Исследование антибактериальных свойств лактоферрина в сметане // Научное обеспечение молочной промышленности: сборник трудов. М.: ФГБНУ «ВНИМИ», Издательство «Франтера», 2016. С. 91–100.
- Комолова Г.С., Тихомирова Н.С., Ионова И.И., Комолов С.А. Лактоферрин коровьего молока // Молочная промышленность. 2011. № 7. С. 70–71.
- Костевич В.А., Соколов А.В., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Анализ содержания и насыщенности железом и медью лактоферрина в молоке у женщин с первого дня и до 5 лет лактации // Медицинский академический журнал. 2014. Т. 14, ч. 1. С. 80–86.
- Титов Е.И., Тихомирова Н.А., Ионова И.И. Выделение и изучение железосвязывающей способности лактоферрина коровьего молока // Вопросы питания. 2019. Т. 88, № 1. С. 91–95. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10011>
- Bradford M.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, issues 1–2. P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brick T., Ege M., Boeren S., Bock, A., von Mutius E., Vervont J., Hettinga K. Effect of processing intensity on immunologically active bovine milk serum proteins // Nutrients. 2017. Vol. 9, issue 9. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9090963>
- Chow L.M., Subbaraman L.N., Sheardown H. Kinetics of in vitro Lactoferrin deposition on Silicone hydrogel and FDA group II and group IV hydrogel contact lens materials // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2009. Vol. 20, issue 1. P. 71–82. <https://doi.org/10.1163/156856208X393509>
- Dissanayake, Ramchandran M., Donkor L., Vasiljevic O.T. Denaturation of whey proteins as function of heat, Ph and protein concentration // International Dairy Journal. 2013. Vol. 31, issue 2. P. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.002>
- Donovan S. Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future needs // The Journal of Pediatrics. 2006. Vol. 149, issue 5. P. 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.06.052>
- Dritsakou K., Liosis G., Valsami G., Polychronopoulos E., Skouroliakou M. Improved outcomes of feeding low birth weight infants with predominantly raw human milk versus donor banked milk and formula // Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2016. Vol. 29, issue 7. P. 1131–1138. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1038232>
- Fang B., Zhang M., Jiang T., Guo H., Zheng F. Bovine Lactoferrin binds oleic acid to form an antitumor complex similar to hamlet // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids. 2014. Vol. 1841, issue 4. P. 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.008>
- Gonzales-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Gruz Q. Lactoferrin structure, function and application // International Journal of Antimicrobial Agents. 2009. Vol. 33, issue 4. P. 301.e1–301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Jenssen H., Hancock R. Antimicrobial properties of Lactoferrin // Biochimie. 2009. Vol. 91, issue 1. P. 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>
- Kong Y. Y., Liu M., Di W., Wang C., Du M., Zhang L. W. Purification and identification of lactoferrin from bovine milk // Advanced Materials Research. 2012. Vol. 524–527. P. 2290–2293. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.524-527.2290>

- Lorget F., Clough J., Oliveira M., Daury M., Sabokbar A., Offord E. Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002. Vol. 296, issue 2. P. 261–266. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00849-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00849-5)
- Loss G., Depner M., Ulfman L.H., van Neerven R.J., Hose A.J. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections // *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 2015. Vol. 135, issue 1. P. 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.044>
- Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M. M., Dogterom-Ballering H., Brouwer C. P., Senesi S., Van Dissel J.P., Nibbering P.H. Synergistic activity of the n-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. Vol. 47, issue 1. P. 262–267. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.262-267.2003>
- Paesano R., Pacifici E., Benedetti S., Berlutti F., Frioni A., Polimeni A., Valenti P. Safety and efficacy of Lactoferrin versus ferrous sulphate in curing Iron deficiency and iron deficiency anaemia in hereditary thrombophilia pregnant women: An interventional study // *BioMetals*. 2014. Vol. 27, issue 5. P. 999–1006. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9723-x>
- Panopoulos, G. Moatsou, C., Psychogyiopoulos C., Moschopoulos E. Microfiltration of ovine and bovine Milk: Effect on microbial counts and biochemical characteristics // *Food*. 2020. Vol. 9, issue 3. P. 284–294. <https://doi.org/10.3390/foods9030284>
- Pierce A., Legrand D. Lactoferrin: A Multifunctional Protein // *Medecine Sciences*. 2009. Vol. 25, issue 4. P. 361–369. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254361>
- Rashmi K., Warriar A. Non-thermal processing of dairy foods // *Dairy Processing: Advanced Research to Applications* / J. Minj, V. Sudhakaran, A. Kumari. Singapore: Springer, 2020. P. 25–49. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_2)
- Rynne N., Beresford T., Kelly A., Guinnee T. Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat cheddar cheese // *International Dairy Journal*. 2004. Vol. 14, issue 11. P. 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.010>
- Sachdeva A., Nagpal J. Meta-analysis: efficacy of bovine lactoferrin in *Helicobacter pylori* eradication // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2009. Vol. 29, issue 7. P. 720–730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.03934.x>
- Scarino M.L. A sideways glance: Take it or leave It? The role of Lactoferrin in Iron sequestration and delivery within the body // *Genes & Nutrition*. 2007. Vol. 2, issue 2. P. 161–162. <https://doi.org/10.1007/s12263-007-0054-1>
- Tomasula P.M., Bonnaillie L.M. Crossflow micro-filtration in the dairy industry // *Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry* / N. Datta, P.M. Tomasula. N.Y.: John Wiley & Sons Editors, 2015. P. 1–32. <https://doi.org/10.1002/9781118560471.ch1>
- Wakabayashi H., Oda H., Yamauchi K., Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections // *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2014. Vol. 20, issue 11. P. 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.003>
- Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional roles of Lactoferrin: A critical overview // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005. Vol. 62. P. 2540–2548. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5369-8>



# Temperature Impact on Lactoferrin Concentration in Bovine Milk

**Galina A. Donskaya**

FGANU "VMINI"

35/7, Ljusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russian Federation

E-mail: g\_donskaya@vnimi.org

**Irina V. Chumakova**

FGANU "VMINI"

35/7, Ljusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russian Federation

E-mail: e\_chumakova@vnimi.org

The focus of current research was Lactoferrin (LF), whey protein that possesses protective functions and is regarded as an important component of innate immune system. This protein demonstrates antimicrobial and antiviral properties, regulates inflammation and participates in immune cells activation. LF is present in various biological fluids but most of it accumulates in whey proteins of colostrum and milk. The objective of this study was the isolation of LF from native (raw) and heat-treated milk to identify impact of various degrees of heat treatment on LF concentration. The object of research – Lactoferrin; raw unprocessed milk obtained from individual farm; pasteurized milk. Lactoferrin was isolated from skim milk with Ion-exchange Chromatography. Lactoferrin sample analysis was conducted with HPLC. Concentration of protein isolated from milk was done by Bredford calorimetric method. Results demonstrated that in milk, pasteurized at  $(78 \pm 2)^\circ\text{C}$  with holding time 20 sec, LF concentration decreased and reached 29.1% when compared with native milk. Lactoferrin concentration at  $(92 \pm 1)^\circ\text{C}$  and holding time 2 min was less than 1% of LF concentration in native milk. It is clear that keeping pasteurization temperature below  $78^\circ\text{C}$  will promote higher LF stability, however, it will require longer holding time that will impact physico-chemical parameters of milk. Based on high heat resistance of whey protein, it is advisable to evaluate milk decontamination technology without significant heat stress application.

**Keywords:** lactoferrin, chromatography, raw milk, heat-treated milk

## Reference

- Asafov V.A., Tanjkova N.L., Iskakova E.L., Kharitonov V.D., Kurchenko V.P., Golovach T.N. Nekotorye aspekty reulirovaniya mikrobiologicheskogo sostava moloziva [Some aspect of microbiological milk composition regulation]. *Pischevaya industriya [Food industry]*, 2019, vol. 42, no. 4, pp. 20–25. <https://doi.org/10.24411/9999-008A-2019-10015>
- Komolova G.S., Tikhomirova N.S., Ionova I.I., Komolov S.A. Lactoferrin korovjego moloka [Bovine lactoferrin]. *Molochnaja promyshlennost [Dairy industry]*, 2011, no. 7, pp. 70–71.
- Kostevic, V.A., Sokolov A.V., Zaharova E.T., Vasiljev V.B. Analiz sodержaniya i nasyschennosti zhelezom lactoferrina v molokee zhenschin s pervogo dnja b lj 5 let lactacii. [Composition analysis and satiety level of lactoferrin with iron and copper in human milk from the first day and up to 5 years of lactation]. *Medicinskij akademicheskij zhurnal [Medical academic journal]*, 2014, vol. 14, part 1, pp. 80–86.
- Titov E.I., Tikhomirova N.A., Ionova I.I. Vydelenie i izuchenie zhelezosvjyvajuschei sposobnosti lactoferrina korovkjego moloka [Isolation and re-search of iron-binding potential of bovine milk lactoferrin]. *Voprosy pitaniya [Nutrition issues]*, 2019, vol. 88, no. 1, pp. 91–95.
- Zobkova Z.A., Mishina A.V. Nanochasticy lactoferrina v proizvodstve funkcionalnyh molochnyh produktov [Nanoparticles of lactoferrin in production of functional dairy products]. *Hranenie i pererabotka selkhozsyrya cyrja [Storage and processing of farm products]*, 2009, no 12, pp. 49–52.
- Zobkova Z.S., Fedotova O.B. Fursova T.P., Zenina D.V., Gavrilina A.D., Shelaginova I.R. Issledovaniye antibakterialnyh svojstv lactoferrina v smetane: sbornik Trudov VNIMI [Research of antibacterial lactoferrin properties in sour cream: Collection of works of All-Russian Research Institute of Dairy Industry]. Moscow: FGBNU "VNIMI", Izdatel'stvo "Frantera", 2016, pp. 1–100.
- Zobkova Z.S., Mishina A.V., Begunova A.V. Antimikrobnyye svoestva lactoferrina [Antimicrobial properties of lactoferrin]. *Molochnaja promyshlennost [Dairy industry]*, 2007, no. 10, pp. 60.
- Zobkova Z.S., Mishina A.V., Begunova A.V. O bifidogennyh svojstvah lactoferrina [About bifidogenic

- properties of lactoferrin]. *Molochnaya promyshlennost [Dairy industry]*, 2008, no. 7, pp. 64–65.
- Zobkova Z.S., Mishina A.V., Smoljaninov V.V., Shekvatova G.V. Tehnologija ekstrahirivanja lactoferrina iz syrogo moloka [Lactoferrin extraction technology from raw milk]. *Molochnaya promyshlennost [Dairy industry]*, 2009, no. 12, pp. 21–22.
- Bradford M.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, issues 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brick T., Ege M., Boeren S., Bock, A., von Mutius E., Vervont J., Hettinga K. Effect of Processing Intensity on Immunologically Active Bovine Milk Serum Proteins. *Nutrients*, 2017, vol. 9, issue 9, p. 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9090963>
- Chow L.M., Subbaraman L.N., Sheardown H. Kinetics of in Vitro Lactoferrin Deposition on Silicone Hydrogel and Fda Group II and Group IV Hydrogel Contact Lens Materials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, vol 20, issue 1, pp. 71–82. <https://doi.org/10.1163/156856208X393509>
- Dissanayake, Ramchandran M., Donkor L., Vasiljevic O.T. Denaturation of Whey Proteins as Function of Heat, Ph And Protein Concentration. *International Dairy Journal*, 2013, vol. 31, issue 2, pp. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.002>
- Donovan S. Role of Human Milk Components in Gastrointestinal Development: Current Knowledge and Future Needs. *The Journal of Pediatrics*, 2006, vol. 149, issue 5, pp. 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.06.052>
- Dritsakou K., Liosis G., Valsami G., Polychronopoulos E., Skouroliahou M. Improved Outcomes of Feeding Low Birth Weight Infants with Predominantly Raw Human Milk Versus Donor Banked Milk and Formula. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016, vol. 29, issue 7, pp. 1131–1138. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1038232>
- Fang B., Zhang M., Jiang T., Guo H., Zheng F. Bovine Lactoferrin Binds Oleic Acid to form an Antitumor Complex Similar to Hamlet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, vol. 1841, issue 4, pp. 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.008>
- Gonzales-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Gruz Q. Lactoferrin Structure, Function and Application. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, vol. 33, issue 4, pp. 301.e1–301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Jenssen H., Hancock R. Antimicrobial Properties of Lactoferrin. *Biochimie*, 2009, Vol. 91, issue 1, pp. 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>
- Kong, Y. Y., Liu, M., Di, W., Wang, C., Du, M., Zhang, L. W. Purification and Identification of Lactoferrin from Bovine Milk. *Advanced Materials Research*, 2012, vol. 524–527, pp. 2290–2293. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.524-527.2290>
- Lorget F., Clough J., Oliveira M., Daury M., Sabokbar A., Offord E. Lactoferrin Reduces in Vitro Osteoclast Differentiation and Resorbing Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, vol. 296, issue 2, pp. 261–266. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00849-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00849-5)
- Loss G., Depner M., Ulfman L.H., vanNeerven R.J., Hose A.J. Consumption of Unprocessed Cow's Milk Protects Infants from Common Respiratory Infections. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 2015, vol. 135, issue 1, pp. 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.044>
- Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M. M., Dogterom-Ballering H., Brouwer C. P., Senesi S., Van Dissel J.P., Nibbering P.H. Synergistic Activity of the N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin and Fluconazole against Candida Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, vol. 47, issue 1, pp. 262–267. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.262-267.2003>
- Paesano R., Pacifici E., Benedetti S., Berlutti F., Frioni A., Polimeni A., Valenti P. Safety and Efficacy of Lactoferrin Versus Ferrous Sulphate in Curing Iron Deficiency and Iron Deficiency Anaemia in Hereditary Thrombophilia Pregnant Women: An interventional Study. *BioMetals*, 2014, vol. 27, issue 5, pp. 999–1006. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9723-x>
- Panopoulos, G. Moatsou, C., Psychogyiopoulos C., Moschopoulou, E. Microfiltration of Ovine and Bovine Milk: Effect on Microbial Counts and Biochemical Characteristics. *Food*, 2020, vol. 9, issue 3, pp. 284–294. <https://doi.org/10.3390/foods9030284>
- Pierce A., Legrand D. Lactoferrin: A Multifunctional Protein, 2009, vol. 25, issue 4, pp. 361–369. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254361>
- Rashmi K., Warriar A. Non-thermal Processing of Dairy Foods. In J. Minj, V. Sudhakaran, A. Kumari. *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*. Singapore: Springer, 2020. P. 25–49. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_2)
- Rynne N., Beresford T., Kelly A., Guinnee T. Effect of Milk Pasteurization Temperature and in Situ Whey Protein Denaturation on the Composition, Texture and Heat-Induced Functionality of Half-Fat Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 2004, vol. 14, issue 11, pp. 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.010>

- Sachdeva A., Nagpal J. Meta-analysis: efficacy of bovine lactoferrin in *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2009, vol. 29, issue 7, pp. 720–730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.03934.x>
- Scarino M.L. A Sideways Glance: Take It or Leave It? The Role of Lactoferrin in Iron Segregation and Delivery within the Body. *Genes & Nutrition*, 2007, vol. 2, issue 2, pp. 161–162. <https://doi.org/10.1007/s12263-007-0054-1>
- Tomasula P., Bonnaillie L. Crossflow Microfiltration in the Dairy Industry. In N. Datta, P.M. Tomasula. *Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry*. N.Y.: John Wiley & Sons Editors, 2015. P. 1–32. <https://doi.org/10.1002/9781118560471.ch1>
- Wakabayashi H., Oda H., Yamauchi K., Abe F. Lactoferrin for Prevention of Common Viral Infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2014, vol. 20, issue 11, pp. 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.003>
- Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional Roles of Lactoferrin: A Critical Overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, vol. 62, pp. 2540–2548. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5369-8>