

Modern methods of detection and analysis of whey proteins in the context of prevention of falsification of merchandise

Współczesne metody detekcji i analizy białek serwatkowych w kontekście zapobiegania fałszowaniu towarów



DOI: 10.15199/62.2024.11.1

A detailed anal. of whey proteins, their health-promoting properties and role in the food and pharmaceutical industries was presented. Particular attention was paid to the importance of advanced protein anal. methods to ensure their authenticity and consumer safety. The main whey proteins, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, immunoglobulins, lactoferrin and bovine serum albumin, were characterized, emphasizing their diverse biol. functions and potential therapeutic applications. Methods for the detection and identification of whey proteins were discussed in detail, including MS techn., gel electrophoresis and various immunochem. approaches such as ELISA and western blot. The importance of these methods not only in scientific research but also in practical applications in the food and pharmaceutical industries was emphasized. The challenges related to the adulteration of whey protein products were highlighted, indicating the need for continuous development and implementation of new, more sensitive and specific anal. methods. The scope and content of criminal law protection of consumers against the supply of improper foodstuffs were analyzed. Attention was paid to the variety of possible configurations of actions causing such delivery, the importance of the perpetrator's motivation and the consequences of the undertaken behavior. The provisions of several laws were analyzed, such as the law on Food and Nutrition Safety, the Criminal Code, the Pharmaceutical Law and the Industrial Property Law.

Keywords: whey proteins, detection methods, MS, gel electrophoresis, product adulteration, consumer safety

Mleko jest wydzieliną gruczołu mlekowego, która pojawia się u samic ssaków w okresie laktacji w celu wykarmienia nowego potomstwa. W skład mleka wchodzi tłuszcz, węglowodany oraz białka. Jednak każdy gatunek różni się ich

Przedstawiono szczegółową analizę białek serwatkowych, ich właściwości prozdrowotne oraz rolę w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Szczególną uwagę zwrócono na znaczenie zaawansowanych metod analizy białek w celu zapewnienia ich autentyczności oraz bezpieczeństwa konsumentów. Przedstawiono charakterystykę głównych białek serwatkowych, β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy, immunoglobulin, laktoferyny oraz albuminy surowicy bydłowej (BSA), podkreślając ich zróżnicowane funkcje biologiczne oraz potencjalne zastosowania terapeutyczne. Szczegółowo omówiono metody detekcji i identyfikacji białek serwatkowych, w tym techniki spektrometrii mas, elektroforezy żelowej oraz różnorodne podejścia immunochemiczne, takie jak ELISA i *western blot*. Podkreślono znaczenie tych metod nie tylko w badaniach naukowych, ale również w praktycznych zastosowaniach w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Podkreślono wyzwania związane z fałszowaniem produktów zawierających białka serwatkowe, wskazując na konieczność ciągłego rozwijania i wdrażania nowych, bardziej czułych i specyficznych metod analitycznych. Przeanalizowano zakres i treści prawnokarnej ochrony konsumentów przed dostarczaniem im niewłaściwych środków spożywczych. Zwrócono uwagę na różnorodność możliwych konfiguracji działań powodujących takie dostarczenie, znaczenie motywacji sprawcy oraz konsekwencji podejmowanych zachowań. Przeanalizowano przepisy kilku ustaw, takich jak ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywności, Kodeks karny, prawo farmaceutyczne oraz prawo własności przemysłowej.

Słowa kluczowe: białka serwatkowe, metody detekcji, spektrometria mas, elektroforeza żelowa, fałszowanie produktów, bezpieczeństwo konsumentów

zawartością procentową w zależności od uwarunkowań genetycznych, zdrowia danego osobnika i sposobu żywienia¹⁾. Dla przykładu podano wyniki badań nad zawartością podstawowych składników w mleku różnych ras krów (tabela 1).



Dr Aleksandra PRYSHCHEPA (ORCID: 0000-0001-9586-7069) w roku 2023 uzyskała stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii tej samej uczelni. Specjalność – metody izolacji i modyfikacji białek mleka, ze szczególnym uwzględnieniem biologicznie aktywnej laktoferyny; badania dotyczące modyfikacji białek d-metalemi i związkami niskocząsteczkowymi w celu uzyskania substancji o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym; opracowywanie nowoczesnych metodologii badania właściwości fizyczno-chemicznych i biologicznych białek w celu wykazania ich identyczności, czystości i właściwości terapeutycznych.



Dr Natalia DAŠKO (ORCID: 0000-0001-9122-4883) w roku 2012 ukończyła studia na Wydziale Prawa i Administracji Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W 2016 r. uzyskała stopień doktora nauk prawnych na tym samym wydziale. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Prawa Karnego na macierzystym wydziale. Specjalność – przestępczość przeciwko własności intelektualnej i przestępczość farmaceutyczna.

*** Adres do korespondencji:**

Katedra Prawa Karnego, Wydział Prawa i Administracji, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Bojarskiego 3, 87-100 Toruń, tel.: (56) 611-41-13, e-mail: ndasko@umk.pl

Table 1. Daily yield, pH value and basic chemical composition of cows' milk of the evaluated breeds (mean \pm standard error of the mean)¹⁾

Tabela 1. Wydajność dobową, wartość pH i podstawowy skład chemiczny mleka krów ocenianych ras (średnia \pm błąd standardowy średniej)¹⁾

Rasa	n	Wydajność dobową, kg	pH	Kazeina, %	Białko ogólne, %	Tłuszcz, %	Stosunek białkowo-tłuszczowy	Laktoza, %	Sucha masa, %
Polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej	789	27,1 ^C \pm 0,3	6,70 ^B \pm 0,01	2,63 ^A \pm 0,02	3,48 ^A \pm 0,02	4,25 ^B \pm 0,02	0,82 ^B \pm 0,01	4,77 \pm 0,01	13,15 ^A \pm 0,03
Polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czerwono-białej	486	22,8 ^B \pm 0,4	6,68 ^A \pm 0,01	2,63 ^A \pm 0,02	3,49 ^A \pm 0,02	4,20 ^A \pm 0,02	0,84 ^B \pm 0,01	4,79 \pm 0,01	13,13 ^A \pm 0,04
Simentalska	768	21,5 ^{AB} \pm 0,3	6,72 ^C \pm 0,01	2,74 ^B \pm 0,01	3,62 ^B \pm 0,02	4,06 ^A \pm 0,02	0,87 ^C \pm 0,01	4,73 \pm 0,01	13,16 ^A \pm 0,03
Jersey	235	20,3 ^A \pm 0,2	6,70 ^B \pm 0,01	3,09 ^C \pm 0,03	4,0 ^C \pm 0,04	5,17 ^C \pm 0,06	0,79 ^A \pm 0,01	4,75 \pm 0,02	14,62 ^B \pm 0,08
Ogółem	2278	23,0 \pm 0,2	6,71 \pm 0,01	2,76 \pm 0,02	3,67 \pm 0,03	4,45 \pm 0,03	0,83 \pm 0,01	4,76 \pm 0,02	13,51 \pm 0,05

^{A, B, C} – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,01$

Większość białek mleka syntezowanych w komórkach wydzielniczych gruczołu mlekowego wytwarzana jest z wolnych aminokwasów dostarczanych z pożywieniem (90%), natomiast w przypadku pozostałej części ich synteza zachodzi przy udziale peptydów przenikających z krwi²⁾. Mleko innych gatunków ssaków (głównie bydła) znajduje zastosowanie w żywieniu człowieka od ok. 7000 lat i w szczególności dotyczy terenu Europy. Początkowo nie było ono tolerowane przez ludzki organizm z powodu braku enzymu laktazy odpowiedzialnego za proces hydrolizy cukru mlekowego laktozy. Jednakże w wyniku późniejszych mutacji genetycznych organizm ludzki zaadaptował się do trawienia laktozy i choć nadal znaczny odsetek populacji cechuje się nietolerancją cukru mlekowego, to mleko stało się istotnym składnikiem codziennej diety człowieka. Obecnie z mleka wytwarzana jest szeroka gama produktów spożywczych, takich jak sery podpuszczkowe i dojrzewające, jogurty, kefir, twarogi oraz masło²⁾. W wyniku procesu przetwarzania mleka powstają znaczne ilości serwatki, która do niedawna była rozpatrywana jedynie w kategoriach produktów ubocznych produkcji wyrobów mleczarskich.

Serwatka to ciecz niemal klarowna, czasem lekko żółtawa, o charakterystycznym zapachu. Szacuje się, że przechodzi do niej 50–60% suchej masy mleka. W skład serwatki wchodzi złożona mieszanina wartościowych składników odżywczych, takich jak białka, laktoza, związki wapnia i fosforu, kwasy organiczne oraz witaminy (głównie z grupy B)¹⁾. W przemyśle mleczarskim otrzymuje się dwa rodzaje serwatki, podpuszczkową z serów dojrzewających o pH 5,2–6,7 (nazywaną także słodką) oraz uboższą w białka, kwaśną z twarogów o pH 3,8–4,6²⁾. Ze względu na różnice

w zawartości protein praktyczne zastosowanie jako bogate źródło białek znalazła serwatka podpuszczkowa, z której to (pomijając problem denaturacji) można je wyizolować najpierw poprzez zagęszczenie cieczy, a następnie poprzez rozdzielenie części płynnych i stałych za pomocą techniki filtracji membranowej i ostatecznie frakcjonowanie białek serwatkowych z uwzględnieniem ich wielkości. Producenci w Polsce wytwarzają dwa rodzaje odwodnionej (deklaracja min. 95% s.m.) serwatki typu słodkiego, która zawiera w swym składzie 10–14% ogólnego białka i 65–75% laktozy: serwatkę w proszku oraz częściowo zdeminiarizowaną²⁾. Produkty te zawierają mało tłuszczu, zaledwie 1%, i są bogate w składniki mineralne¹⁾. Przedsiębiorstwa otrzymują także koncentraty białek serwatkowych (WPC) o zawartości białka nie mniejszej niż 33,8% (WPC 34), 58% (WPC 60), 63% (WPC 65) lub 80% (WPC 80), gdzie kolejno deklarowana jest zawartość 50–6% laktozy, 12–8% tłuszczu i 7–3% popiołu surowego²⁾. Wśród białek zawartych w WPC oraz proszku serwatkowym znaleźć można β -laktoglobulinę, α -laktoalbuminę, immunoglobuliny, albuminę osocza krwi bydłowej (BSA) i metaloproteiny, takie jak laktoferyna i laktotransferyna¹⁾.

Ze względu na obecność tych białek serwatka w proszku oraz WPC znalazły zastosowanie głównie w kulturystyce jako preparaty wysoko odżywcze oraz w żywieniu drobiu jako alternatywa dla wycofywanych preparatów antybiotykowych. Zadowolające wyniki badań laboratoryjnych otrzymano po zastosowaniu omawianych preparatów łącznie ze środkiem zawierającym bakterie *Enterococcus faecium* oraz z zakwaszaczem²⁾. Okazało się, że drób poprzez naturalną niezdolność do trawienia laktozy metabolizuje ją z wytwor-



Dr hab. Katarzyna RAFIŃSKA, prof. UMK (ORCID: 0000-0002-3358-7317) w roku 2012 ukończyła studia doktoranckie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie uzyskała stopień doktora nauk biologicznych. Stopień doktora habilitowanego w dyscyplinie nauk chemicznych otrzymała w 2019 r. Obecnie pracuje na stanowisku profesora uczelni na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Specjalność – analiza związków bioaktywnych oraz białek, obrazowanie układów biologicznych i chemicznych.



Mgr Paula WALENDA w roku 2023 ukończyła studia magisterskie na kierunku chemia kryminalistyczna na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie pracuje w Głównym Inspektoracie Ochrony Roślin i Nasiennictwa, gdzie zajmuje się analizą pozostałości środków ochrony roślin w materiale roślinnym. Specjalność – wysokosprawna chromatografia cieczowa, analizy spektrofotometryczne.

rzeniem kwasu mlekowego i krótkołańcuchowych, niedysocjowanych kwasów tłuszczowych (LKT). Substancje te działają bakteriostatycznie (np. na bakterie z rodzaju *Salmonella*) oraz zakwaszająco, poprzez to poprawiając i stymulując trawienie oraz zwiększając wchłanianie substancji odżywczych dostarczanych w pokarmie².

W pracy skupiono się na poszczególnych białkach serwatkowych, które okazały się mieć szeroki wachlarz prozdrowotnych właściwości.

Białka serwatkowe i ich właściwości

Białka zawarte w serwatce są niezwykle bogate w aminokwasy, szczególnie w te o łańcuchu rozgałęzionym, takie jak leucyna, izoleucyna i walina (uczestniczą w naprawie tkanek) oraz cysteina i metionina, czyli aminokwasy siarkowe biorące udział w poprawie funkcji obronnych organizmu poprzez zwiększanie wewnątrzkomórkowej syntezy glutationu³. Białka te różnią się właściwościami oraz budową, a ich ilość w mleku i w serwatce znacząco się różni ze wskazaniem, że ta druga zawiera ich zdecydowanie więcej (tabela 2).

Głównym składnikiem serwatki jest β -laktoglobulina (β -LG). Jest to białko zbudowane z 162 aminokwasów, w tym m.in. z metioniny. Ma budowę globularną, a jego masa wynosi 18,4 kDa⁴. W warunkach fizjologicznych w pH poniżej 3 dysocjuje z postaci dimerów do monomerów. Wykazuje zdolność wiązania retinolu (istotnego dla poprawnego funkcjonowania zmysłu wzroku), a także witaminy D, cholesterolu, kwasów tłuszczowych długocząsteczkowych i chlorku rtęci³. Wieloletnie badania wykazały korzystny udział β -LG w procesach antyoksydacyjnych oraz antykancerogennych, co wynika z obecności aminokwasów siarkowych, a szczególnie metioniny i cysteiny, działających stabilizująco na DNA, zapobiegając powstawaniu mutacji⁴. Odkryto także jej dobroczynny wpływ w hamowaniu infekcji wirusowych (szczególnie skupiono się na wirusie HIV), a także bakteryjnych poprzez zmniejszanie stopnia adhezji komórek bakterii⁵. Niestety obecność β -LG często wywołuje zjawisko alergii pokarmowych u dzieci podatnych na alergię.

Kolejnym białkiem występującym w serwatce w ilości 20–25% mas. jest α -laktoalbumina (α -LA), czyli hydrofilowa, trójwymiarowa albumina o masie cząsteczkowej

Table 2. Whey protein content of milk and liquid whey²

Tabela 2. Zawartość białek serwatkowych w mleku oraz płynnej serwatce²

Rodzaj białka	Mleko, g/L	Całość białek mleka, %	Serwatka, g/L	Całość białek serwatki, %
β -Laktoglobulina	3,10	7,0–12,0	2,0–4,0	50–55
α -Laktoalbumina	1,14	2,0–5,0	1,0–1,7	20–25
Immunoglobuliny	0,62	1,3–2,7	0,6–1,0	10–15
Albumina surowicy bydlęcej	0,41	0,7–1,3	0,1–0,4	5–10
Pozostałe białka	1,03	2,0–6,0	0,6–1,8	5–20

wynoszącej 14,2 kDa⁴. Jej pojedynczy łańcuch peptydowy zawiera 123 aminokwasy. Wśród nich najistotniejsze są tryptofan i cysteina (pierwszy jest prekursorem glutationu, natomiast drugi serotoniny)⁴. Pełni ona rozmaite funkcje w organizmie. Najważniejszą z nich jest uczestnictwo w syntezie laktozy, gdyż stanowi ona jedną z dwóch podjednostek kompleksu enzymatycznego, który katalizuje ostatni etap biosyntezy cukru mlecznego. Istotne jest też uczestnictwo α -LA w procesie zwalczania i zapobiegania nowotworom poprzez tworzenie z kwasem oleinowym kompleksu nazywanego HAMLET/BAMLET (pierwszy odnosi się do ludzkiej, drugi do bydlęcej α -LA), który wpływa na apoptozę komórek rakowych^{4,5}. Spożywanie α -LA wywiera również korzystny wpływ na organizm ludzi mających problemy ze stresem, gdyż tryptofan obecny w białku stanowi prekursor serotoniny. Hormon ten reguluje poziom stresu, działa antydepresyjnie oraz wpływa na prawidłowy sen i poprawia funkcje poznawcze^{3,4}. Poza tym podnosi zdolności obronne organizmu względem bakterii chorobotwórczych.

Równie istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu odgrywają zawarte w serwatce immunoglobuliny stanowiące 10–15% jej zawartości³. W rzeczywistości to mieszanina wielkocząsteczkowych białek o właściwościach stymulujących układ odpornościowy. U bydła wykazano obecność 3 klas przeciwciał: IgA, IgG: G1 i G2 oraz IgM⁵. Szczególnie duże ilości wymienionych immunoglobulin zawiera siara, czyli wydzielina pochodząca z gruczołów mlecznych ssaków wytwarzana w pierwszych dniach po porodzie, która w szczególności zawiera duże stężenie IgG (zawartość tej immunoglobuliny zmniejsza się z czasem)³. Siara charakteryzuje się odmiennymi właściwościami odżywczymi i immunologicznymi od mleka; chroni nowo



Dr hab. Janusz BOJARSKI (ORCID: 0000-0003-0590-7464) w roku 1989 ukończył studia na Wydziale Prawa i Administracji Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora uczelni w Katedrze Prawa Karnego na macierzystym wydziale. Specjalność – gospodarstwo prawo karne i interkulturowe prawo karne.



Dr Michał ZŁOCH (ORCID: 0000-0001-6169-3099) w roku 2016 ukończył Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie Matematyczno-Przyrodnicze na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, uzyskując stopień doktora nauk biologicznych. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii tej samej uczelni. Specjalność – rozwijanie metod szybkiej detekcji i identyfikacji mikroorganizmów w materiale biologicznym z wykorzystaniem zarówno technik chemii analitycznej (desorpcji/ionizacji laserem wspomaganą matrycą sprzężoną ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu MALDI-TOF/MS, spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni FT-IR), jak i technik biologii molekularnej (łańcuchowa reakcja polimerazy PCR oraz sekwencjonowanie DNA); badania z zakresu analizy

proteomicznej i lipidomicznej mikroorganizmów w celu ich pogłębionej charakterystyki i rozróżniania blisko spokrewnionych szczepów, a także rozwija nowe techniki detekcji antybiotykooporności.

narodzone potomstwo przed infekcjami i pomaga w wytworzeniu odporności swojej. W związku z faktem, że w trakcie trwania infekcji i stanów zapalnych immunoglobuliny biorą udział w odpowiedzi odpornościowej typu humoralnego (wydzielane są przez pobudzone limfocyty typu B), są one również zaliczane do klasy przeciwciał³. Częsteczki te charakteryzują się specyficzną budową przypominającą literę Y i składają się ze stałych elementów (w postaci monomeru) oraz z części zmiennych swoistych dla danej cząsteczki⁵. Część zmienna łańcucha ciężkiego nosi nazwę VH, zaś łańcucha lekkiego VL (V – *variable*), natomiast stałe oznaczone są symbolami CH (w łańcuchu ciężkim, C – *constant*) i CL (w łańcuchu lekkim)⁴. Immunoglobulinę stanowią łańcuchy ciężkie (H – *heavy*) oraz lekkie (L – *light*), które połączone są za pomocą mostków disiarczkowych⁵. Przy łańcuchach ciężkich połączenie to określone zostało regionem zawiasowym, gdyż warunkuje możliwość rozchylania ramion Ig. W rzeczywistości cząsteczka ta składa się z dwóch zasadniczych fragmentów: dwóch *Fab* (*fragment, antigen binding*; jest to antygen wiążący przeciwciała) oraz jednego *Fc* (*fragment crystallizable*; jest to antygen krystalizujący o funkcji efektorowej, czyli zjawiska zachodzące po związaniu antygenem)⁵. Immunoglobuliny wiążą za pomocą antygeny przeciwciała i rozpoczynają właściwą reakcję odpornościową organizmu w charakterystycznych dla danej klasy przeciwciała punktach i szczególnie znaczenie mają w okresie po narodzinach, gdzie dostarczane są do młodego organizmu z mlekiem matki w celu przekazania przeciwciał odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną^{3, 5}.

BSA (*bovine serum albumin*) jest dużym białkiem globularnym zbudowanym z 583 aminokwasów, stanowiącym 5–10% zawartości serwatki³. Wołowa albumina surowicza pełni istotną funkcję transportową, ponieważ może wiązać substancje, takie jak składniki odżywcze (np. kwasy tłuszczowe), hormony (np. tyroksyna) oraz produkty przemiany materii (np. hem, bilirubina)^{3, 5}. Wiązanie ligandów przez albuminę jest ważne w procesie dostarczania leku do miejsca działania lub substancji toksycznych do miejsca ich wydalania⁵.

Laktoferyna

Białkiem serwatkowym z rodziny transferyn jest laktoferyna (laktotransferyna, LTF). Jej nazwa jest stosowana naprzemiennie z nazwą laktoferyna i obie formy są poprawne⁵. LTF została zidentyfikowana przez Sørensen

u Sørensen w 1939 r., wyizolowano ją z ludzkiego mleka i scharakteryzowano w 1960 r.⁶. Jej obecność wykryto również w ślinie, żółci, płynie owodniowym, moczu, sianie i łzach⁷. Zawartość LTF różni się w zależności od wielu czynników, m.in. gatunku. Po przeprowadzeniu badań przez S. Hagiwara i współpr.^{8, 9} okazało się, że ilość LTF maleje wraz z wiekiem krów oraz jest mniejsza u krów zdrowych niż u krów z przewlekłym zapaleniem wymienia.

LTF stanowi zaledwie 1–2% zawartości płynnej serwatki³. To endogenna glikoproteina o masie cząsteczkowej wynoszącej ok. 80 kDa. Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego w dwa globularne płaty i zawiera ok. 700 aminokwasów^{6, 7, 10}. W budowie chemicznej tego białka można zauważyć dodatkowo naładowany *N*-koniec, zawierający 4 reszty argininy, oraz ujemnie naładowany *C*-koniec, połączone z α -helisą⁴. Każdy płat zawiera dwie domeny znane jako *C1*, *C2*, *M1*, *M2*^{6, 7}. Domeny te tworzą po jednym miejscu na wiązanie żelaza w obydwu płatach. Poza tym każdy jon węglanowy związany przez LTF jest także jednocześnie związany z jonem żelaza. Cztery reszty aminokwasowe najbardziej istotne dla wiązania żelaza to histydyna, dwie tyrozyny, kwas asparaginowy oraz arginina, której łańcuch wiąże jon CO_3^{2-} ⁷. Proces przyłączania metali przez LTF zaobserwowano także w stosunku do jonów Cu^+ , Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} i Zn^{2+} ^{7, 10}. Jednak zdecydowanie największe powinowactwo wykazuje w stosunku do jonów żelaza. W związku z zawartością żelaza w cząsteczce można wyróżnić trzy rodzaje LTF: apolaktotransferynę pozbawioną jonów Fe^{3+} , monolaktotransferynę z jednym jonem Fe^{3+} oraz hololaktotransferynę z dwoma jonami Fe^{3+} . Apo-LTF ma konformację otwartą, natomiast holo-LTF zamkniętą, co przekłada się na jej oporność na trawienie trypsyną¹⁰. Dzięki temu silnemu wiązaniu z żelazem zachowuje swoją strukturę nawet w pH poniżej wartości 4, co ma szczególne znaczenie podczas stosowania LTF w infekcjach bakteryjnych i wirusowych, gdzie pH spada poniżej 4,5^{6, 7}. LTF wykazuje wielokierunkową aktywność biologiczną. Kluczową rolę odgrywa działanie antybakteryjne, zarówno bakteriobójcze, jak i bakteriostatyczne^{3, 5, 6, 11, 12}. W przypadku oddziaływania na bakterie Gram-dodatnie poprzez ujemnie naładowaną warstwę lipidową komórki (ze względu na obecność kwasu lipotechojowego) i dodatnio naładowaną powierzchnię LTF następują zmiany elektrostatyczne i zmienia się przepuszczalność błony komórki^{10, 12}. Dzięki procesowi neutrali-



Prof. dr hab. Jerzy P. ŁUKASZEWICZ (ORCID: 0000-0001-6270-2938) jest profesorem nauk chemicznych na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. W tej samej uczelni uzyskał stopień doktora oraz doktora habilitowanego. Jest autorem i współautorem ok. 270 opublikowanych materiałów naukowych, z czego ok. 100 zamieszczono w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej. W 2022 r. należał do grona 2% najczęściej cytowanych naukowców na świecie wg klasyfikacji Uniwersytetu Stanforda i Scopus. Specjalność – technologie pozyskiwania zielonego wodoru, węglowych materiałów elektrodowych do elektrochemicznego magazynowania i generowania energii oraz grafenu.



Dr hab. Paweł POMASTOWSKI, prof. UMK (ORCID: 0000-0002-1594-0623) w roku 2016 ukończył studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie uzyskał stopień doktora nauk chemicznych. Stopień naukowy doktora habilitowanego otrzymał w 2019 r. na tej samej uczelni. Obecnie pracuje jako profesor uczelni w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Specjalność – chemia mleczarstwa, w szczególności analiza białek, identyfikacja mikroorganizmów, synteza nanokompozytów metali i tlenków metali, analiza spektrometryczna w układach laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą oraz nanostrukturami.

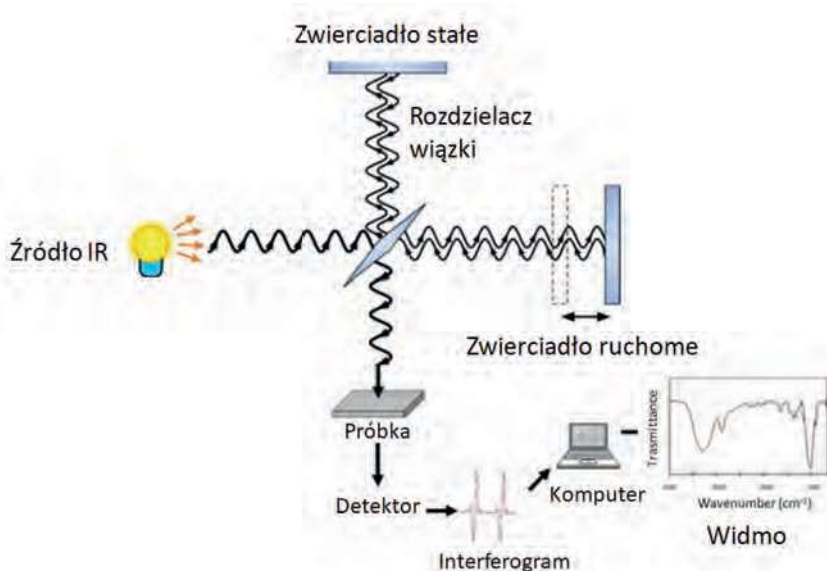


Fig. 1. Schematic of the FT-IR spectrometer modified from²²⁾

Rys. 1. Schemat spektrometru FT-IR zmodyfikowany na podstawie²²⁾

zacji ładunku możliwe jest wnikanie do wnętrza komórki lizozymu, enzymu o działaniu antybakteryjnym. W przypadku bakterii Gram-ujemnych LTF wiąże się z błoną komórkową bakterii, powodując zwiększone uwalnianie lipopolisacharydów (LPS), czemu towarzyszy zwiększona przepuszczalność i uszkodzenie błony, co udowodniono w badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Ellisona¹⁰⁾. Niezwykle istotnym elementem działania przeciwdrobnoustrojowego LTF jest jej silne powinowactwo do jonów żelaza, na skutek czego białko wyłapuje wolne i dostępne jony Fe^{3+} nie dopuszczając do ich pobierania przez komórki bakterii chorobotwórczych wymagających żelaza do wzrostu, co wykazane zostało w badaniach na kulturach *E. coli* przez Brocka w 1980 r.⁶⁾ Z drugiej strony LTF może pełnić funkcję donora jonów żelaza dla bakterii o działaniu pozytywnym dla organizmu człowieka, jak choćby bakterii probiotycznych *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp.¹⁰⁾.

W 1971 r. Kirkpatrick wykazał także działanie przeciwgrzybicze LTF na przykładzie *Candida* sp., które opiera się na analogicznych mechanizmach co w przypadku bakterii chorobotwórczych^{5, 10)}. Antywirusowe działanie LTF wynika z jej zdolności wiązania się z glikozoaminoglikanami otoczki wirusa, w wyniku czego zapobiega jego wnikaniu do wnętrza komórek gospodarza i hamuje rozwój infekcji w jej wczesnej fazie^{5, 6, 10)}. W przypadku pasożytów mechanizmy działania LTF są zróżnicowane.



Dr hab. Andrzej ADAMSKI jest emerytowanym profesorem prawa karnego na Wydziale Prawa i Administracji Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 1975 ukończył z wyróżnieniem studia na Wydziale Prawa i Administracji UMK w Toruniu. Stopień doktora nauk prawnych uzyskał w 1985 r., a stopień doktora habilitowanego nauk prawnych w zakresie prawa karnego otrzymał w 2000 r. Specjalność – prawne i fenomenologiczne aspekty problemu cyberprzestępczości oraz zagadnienia podrobienia i handlu podrobionymi towarami, w tym lekami i wyrobami medycznymi.

Badania nad *Toxoplasma gondii* przeprowadzone przez Dzitko w 2007 r. wykazały blokowanie wewnątrzkomórkowego wzrostu tego pasożyta przez komórki gospodarza przy udziale LTF¹⁰⁾. Z kolei w przypadku pasożyta *Pneumocystis carini* hamowanie jego rozwoju przez LTF następuje poprzez konkurencję o jony żelaza. Jednakże zdarza się także sytuacja odwrotna, jak w przypadku grzyba *Tritrichomonas foetus*, gdzie LTF stanowi dawcę jonu żelaza, pozwalając tym samym na wzrost inwazyjnego organizmu⁶⁾. Istotne znaczenie mają właściwości przeciwnowotworowe LTF. W wielokrotnych testach *in vivo* na myszach z zaindukowanym nowotworem^{13–15)} wykazano indukcję apoptozy poprzez aktywację przekazywania sygnału do receptora FAS, a także blokowanie przemiany z etapu G1 do S w cyklu komórkowym komórek rakowych⁶⁾. Znalazło to potwierdzenie w badaniach *in vivo* na ludziach, gdzie poprzez działanie LTF blokowana była proliferacja komórek rakowych oraz znaczny spadek ich liczby w organizmie^{5, 10)}. Laktoferyna może wspierać proliferację, różnicowanie i aktywację komórek układu odpornościowego oraz wzmacniać odpowiedź immunologiczną¹¹⁾. Z drugiej strony LTF działa jako czynnik przeciwapalny. Dzięki swojej aktywności przeciwbakteryjnej i zdolności wiązania LPS lub też receptorów komórkowych, białko to może zapobiegać rozwojowi stanów zapalnych powodujących uszkodzenie tkanek, wynikających z uwalniania cytokin prozapalnych i reaktywnych form tlenu⁶⁾. Efekt ochronny LTF przejawia się w zmniejszonej produkcji pewnych cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów (TNF α) i interleukin IL-1 β oraz IL-6¹¹⁾. LTF jest białkiem o wyjątkowych właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych i immunomodulujących. Wykazuje szerokie spektrum działania i stanowi przedmiot intensywnych badań naukowych oraz medycznych.

Produkcja i wykorzystanie LTF jest prawnie regulowana zarówno na terenie Unii Europejskiej, jak i w Stanach Zjednoczonych, choć w różnych kontekstach. W Unii Europejskiej LTF bydlęca została zatwierdzona jako nowy składnik żywności. Decyzja Komisji Europejskiej z 22 listopada 2012 r. zezwala na wprowadzenie LTF bydlęcej do obrotu jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) Parlamentu Europejskiego i Rady¹⁶⁾. W Stanach Zjednoczonych FDA uznała LTF za substancję generalnie dopuszczalną i bezpieczną (GRAS) w niektórych zastosowaniach. Na przykład została uznana za GRAS jako składnik w napojach zastępujących posiłki i w żywności medycznej, z maksymalną dzienną dawką 610 mg/osobę¹⁷⁾. Co więcej Agencja Żywności i Leków FDA (Food and

Drug Administration) ogłosiła w 2003 r., że nie widzi przeciwwskazań związanych z bezpieczeństwem stosowania aktywowanej LTF (activin™) jako środka do konserwacji tusz wołowych, gdzie LTF jest nanoszona na powierzchnię wołowiny w postaci spreju w trakcie procesu pakowania. Zabieg ten powoduje zahamowanie wzrostu bakterii, ale producent nie podaje stopnia zmniejszenia liczby mikroorganizmów. Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe, redukcja ta może nie być wystarczająca, aby móc stosować ją jako jedyny środek konserwacji żywności, stąd powinna być używana jako dodatkowa interwencja w celu zminimalizowania obecności patogenów¹⁸⁾. W obu przypadkach regulacje te odzwierciedlają zrozumienie i uznawanie właściwości i potencjalnych zastosowań LTF, ale jednocześnie podkreślają potrzebę dokładnej oceny bezpieczeństwa i skuteczności w każdym konkretnym zastosowaniu. LTF, znana ze swoich właściwości prozdrowotnych, jest używana nie tylko jako składnik żywności, ale także w suplementach diety. Organizacje regulujące, takie jak EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności), dokładnie oceniają bezpieczeństwo i zastosowanie LTF w różnych produktach, w tym w suplementach diety. Dzięki temu użytkownicy mogą mieć pewność, że produkty zawierające LTF, które spełniają te regulacje, są bezpieczne do stosowania¹⁹⁾.

Metody detekcji i identyfikacji białek

Pierwszym krokiem, który często należy podjąć, zajmując się badaniem białek, jest ich oczyszczenie. W ten sposób oddziela się białko od innych, niepotrzebnych składników, które wchodzi w skład komórki. Stosując takie podejście, unika się interferencji, które mogą powodować zanieczyszczenia. Rozdzielenie białek można przeprowadzić ze względu na ich odmienną rozpuszczalność, ładunek, wielkość oraz predyspozycje do wiązania. Po etapie oczyszczenia białka można określić jego sekwencję aminokwasową. W tym przypadku konieczne jest określenie sekwencji małego fragmentu białka (peptydu), aby znaleźć jego całkowitą sekwencję w bazie danych. Innym sposobem, na który powinno się zwrócić szczególną uwagę w późniejszym etapie pracy jest spektrometria mas. Jest to odpowiednie narzędzie analityczne pozwalające na określenie masy cząsteczkowej oraz sekwencji aminokwasowej białek. Gdy białko jest oczyszczone i jego identyfikacja została potwierdzona, definiuje się jego funkcje w warunkach możliwie najbardziej zbliżonych do warunków fizjologicznych. Najczęściej stosowanymi sondami do lokalizacji białek oraz do pomiaru ich ilości są przeciwciała. Przeciwciała monoklonalne są w stanie rozpoznać swoiste białka. Można je wytworzyć w dużych ilościach i następnie zastosować do wykrycia oraz kwantyfikacji białek wyizolowanych i białek pozostających w komórkach²⁰⁾.

Metody spektrofotometryczne oznaczania białek

Stosując metody spektrofotometryczne, korzysta się ze zjawiska, jakim jest absorbowanie promieniowania przez

analizowane substancje w celu ustalenia ich tożsamości lub określenia ich zawartości. Metody te wchodzi w skład bezpośrednich metod oznaczania białek i dzielą się na kolorymetrię (spektroskopia absorpcyjna w świetle widzialnym, np. metoda biuretowa, Lowry'ego) oraz spektrofotometrię w nadfiolecie i podczerwieni. Do spektrofotometrycznych metod oznaczania zawartości białka można wykorzystać metodę opisaną przez Bradforda. W tym przypadku obserwuje się powstanie kompleksu barwnik-białko. Stosowanym do tego celu barwnikiem jest Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB-G250), który wiąże się poprzez wiązania jonowe oraz hydrofobowe do grup aminowych białek. Z barwnikiem Coomassie reagują głównie reszty argininy, w niewielkim stopniu reszty lizyny, tyrozyny, histydyny, tryptofanu i fenyloalaniny. Barwnik charakteryzuje się brunatnym kolorem w środowisku kwaśnym, a reagując z białkiem, zmienia zabarwienie na błękitne, czemu towarzyszy zmiana maksimum absorbancji z 465 na 595 nm. Najczęściej stosowanym wzorcem do oznaczania zawartości białka jest albumina bydlęca. Wiedząc, że intensywność zabarwienia zależy od zawartości białka w roztworze, w celu określenia stężenia białka tworzy się krzywą wzorcową. Metoda ta jest powszechnie stosowana ze względu na swoją prostotę oraz dobrą czułość. Metoda biuretowa polega na dodaniu siarczynu miedzi(II) oraz pomiarze absorbancji przy długości fali 540 nm. Służy do detekcji wiązań peptydowych. Aby zanalizować białko tą metodą, konieczne jest, aby zawierało co najmniej 2 wiązania peptydowe obok siebie. Zmiana zabarwienia analizowanego roztworu wywołana jest utworzeniem kompleksu Cu^{2+} z co najmniej dwiema grupami peptydowymi. Wykorzystanie kwasu bicynchoninowego (BCA) stanowi modyfikację metody biuretowej. Powstaje stabilny kompleks z jonami miedzi. W środowisku zasadowym następuje redukcja jonów Cu^{2+} do Cu^+ przez m.in. cysteinę i tryptofan. Metody spektrofotometryczne należą do metod czułych, prostych oraz szybkich²¹⁾.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

Spektrometr IR z transformacją Fouriera (FT-IR) różni się jednym elementem od spektrofotometrów klasycznych, zamiast monochromatora jest interferometr, najczęściej Michelsona. W skład spektrometru FT-IR wchodzi rozdzielacz wiązki, zwierciadło stałe i zwierciadło ruchome z systemem napędowym (rys. 1). Promieniowanie IR kierowane jest ze źródła na próbkę, a następnie przez zwierciadło przechodzi do interferometru Michelsona. Pierwotna wiązka promieniowania ulega rozszczepieniu na dwie wiązki, z których jedna kierowana jest na zwierciadło ruchome, a druga na zwierciadło stałe. Wiązki po odbiciu interferują ze sobą, tworząc kolejną wiązkę, która następnie jest rejestrowana przez detektor. Położenie zwierciadła ruchomego zmienia się, a w konsekwencji zmienia się również różnica dróg optycznych między interferującymi wiązkami. Obraz interferencyjny pełni funkcję różnicy dróg optycznych

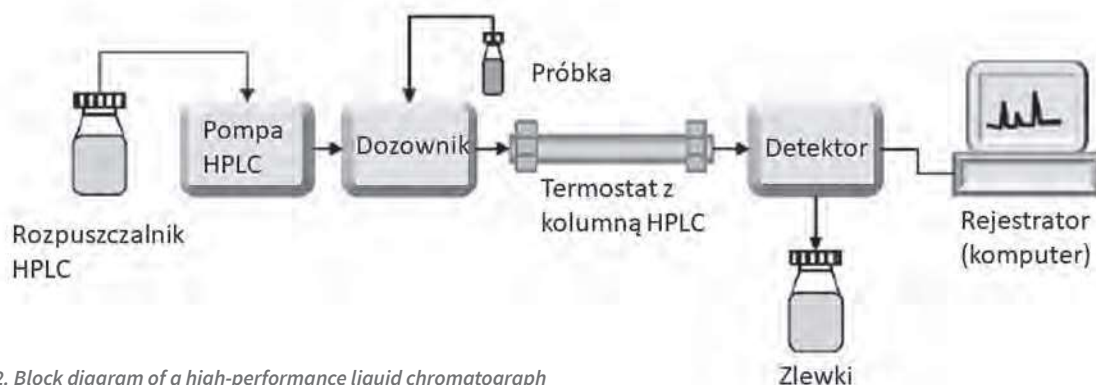


Fig. 2. Block diagram of a high-performance liquid chromatograph

Rys. 2. Schemat blokowy wysokosprawnego chromatografu cieczonego

między wiązkami i stanowi transformatę Fouriera widma promieniowania, które pada na interferometr²².

Spektrometry FT-IR pozwalają na precyzyjne, a zarazem szybkie zbieranie widm absorpcyjnych do analizy jakościowej lub ilościowej. Otrzymane widmo pozwala na identyfikację grup funkcyjnych. Wykorzystuje się w tym celu charakterystyczne pasma absorpcyjne. Tą techniką można identyfikować związki organiczne i nieorganiczne, a także analizować białka, polipeptydy, aminokwasy, kwasy nukleinowe, błony biologiczne i cukry²³.

Chromatografia cieczowa

Chromatografia stanowi jedną z głównych technik separacyjnych stosowanych do analizy związków chemicznych. Oparta jest na dwóch niemieszających się ze sobą fazach: fazy nieruchomej i fazy ruchomej poruszającej się wzdłuż fazy stacjonarnej. Separacja próbki zachodzi dzięki temu, że składniki dzielą się między obie fazy w różny sposób, co powoduje, że poruszają się przez fazę ruchomą z różną prędkością. Składniki próbki pierwsze opuszczające układ chromatograficzny to te, które wykazują większe powinowactwo do fazy ruchomej. Składniki próbki wykazujące większe powinowactwo do fazy stacjonarnej poruszają się wolniej. Do rozdziału składników próbki wykorzystuje się różną szybkość migracji określonych składników próbki.

Główne elementy chromatografu cieczonego przedstawiono na rys. 2. Pompa dostarcza fazę ruchomą ze zbiorników. Następnie faza ruchoma jest tłoczona pod ciśnieniem przez dozownik do kolumny chromatograficznej, skąd dalej trafia do detektora. Próbkę stanowi roztwór, który jest wprowadzony do strumienia fazy ruchomej w dozowniku. Faza ruchoma z próbką kierowana jest do kolumny, gdzie zachodzi rozdział chromatograficzny, a następnie trafia do detektora. Detektor wysyła sygnał do komputera, dzięki czemu otrzymuje się chromatogram^{24, 25}.

Elektroforeza żelowa

Elektroforeza żelowa stanowi metodę służącą do sprawdzenia efektywności procedury oczyszczania badanej substancji. Technika elektroforezy w żelu pozwala na ustalenie, czy liczba różnych białek w preparacie z każdym kolejnym etapem ulega zmniejszaniu. W tym celu najczęściej stosowany jest żel poliakrylamidowy. Jest to

najbardziej skuteczna technika służąca do rozdzielania mieszanin białkowych. Można ją wykorzystać również do rozdziału innych makrocząstek, np. DNA. Zjawisko zwane elektroforezą polega na tym, że cząsteczka o ładunku wypadkowym porusza się w polu elektrycznym. Wzór (1) przedstawia zależność szybkości migracji cząsteczki w polu elektrycznym od natężenia pola elektrycznego (E), ładunku wypadkowego białka (z) oraz współczynnika tarcia (f).

$$Y = Ez/f \quad (1)$$

Siła elektryczna wyrażona jako Ez prowadzi cząsteczkę, która jest naładowana w kierunku przeciwieście naładowanej elektrody i tym samym przeciwdziała pojawiającemu się oporowi lepkości. Opór lepkości występuje ze względu na tarcie, które zachodzi pomiędzy medium a poruszającą się w nim cząsteczką. Współczynnik f zależy od trzech czynników: masy cząsteczkowej, lepkości ośrodka (η) oraz od kształtu migrującej cząsteczki. Wzór (2) na współczynnik tarcia odnosi się do kuli o promieniu r :

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

Porowaty żel używany jest do elektroforezy ze względu na to, że działa jak sito molekularne, co wspomaga separację cząstek. Rozdział może być również przeprowadzony na stałym podłożu (bibuła). Małe cząsteczki poruszają się łatwo, a cząsteczki większe, czyli takie, których średnica jest większa niż pory żelu praktycznie się nie przemieszczają. Zaś średniego rozmiaru cząsteczki poruszają się ze zróżnicowaną prędkością przez żel. Wszystkie cząsteczki są zmuszone do migrowania w tym samym podłożu. Pole elektryczne przyłożone jest tak, aby białka wędrowały z elektrody ujemnej do elektrody dodatniej. Żel poliakrylamidowy jest umieszczony w postaci cienkich i ustawionych pionowo tafli, które charakteryzują się chemiczną obojętnością oraz łatwością formowania.

W celu separacji białek ze względu na masę cząsteczkową, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym może być prowadzona w denaturujących warunkach. Do tego należy przygotować mieszaninę białek poprzez rozpuszczenie jej w roztworze SDS (roztwór soli sodowej siarczanu dodecylu), który stanowi detergent anionowy. SDS jest w stanie rozzerwać znaczną większość oddziaływań nieko-

walencyjnych w białkach natywnych. Do redukcji mostków disiarczkowych może być użyty 2-tioetanol. Aniony SDS łączą się z głównymi łańcuchami w stosunku 1 anion SDS do 2 reszt aminokwasowych. Otrzymany ładunek ujemny jest zwykle o wiele większy niż ładunek białka natywnego.

Rozdział elektroforetyczny białek wykorzystuje się w dziedzinie biochemii, biologii molekularnej, medycynie sądowej, diagnostyce, weterynarii, farmakologii, a nawet w kontroli żywności. Elektroforeza umożliwia szybkie obliczenie przybliżonej zawartości białek, które znajdują się w badanej mieszaninie. Za jej pomocą można wyznaczyć masę molową białka, ustalić jego tożsamość i określić stopień jego oczyszczenia²⁶⁾.

Metody oparte na zastosowaniu przeciwciał

Białka można również analizować, wykorzystując techniki immunologiczne. Za sprawą rozwoju badań immunologicznych możliwe stało się zastosowanie przeciwciał jako odczynników służących do odszyfrowywania funkcji białek w komórkach. Przeciwciała charakteryzują się specyficnością rozpoznawania docelowych białek i w ten sposób umożliwiają ustalenie tożsamości białek. Zatem przeciwciała umożliwiają oznaczenie ilości białek, ich wyizolowanie oraz wizualizację. Podstawą immunologii jest proces tworzenia przeciwciał swoistych dla ściśle określonego białka. Przeciwciała, zwane również immunoglobulinami (Ig), należą do białek. Z tego względu możliwe jest wykorzystanie tego aspektu w metodach immunologicznej detekcji. Przeciwciało rozpoznaje swoisty antygen, który nazywany jest również epitopem lub determinantą antygenową. Opracowując możliwość detekcji wybranego antygeny, należy wziąć pod uwagę możliwość zastosowania zarówno przeciwciał monoklonalnych, jak i poliklonalnych, co jest zależne od celu badawczego, jaki jest planowany. Immunocytochemia wykorzystuje przeciwciało jako odczynnik do oznaczenia i zwizualizowania białka w obrębie komórki, natomiast testy ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) można zastosować, aby wykryć i oznaczyć ilościowo obecność białka w próbce. Metoda *western blot* jest polecana do wykrywania białek wtedy, gdy zostały one wcześniej poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu. Immunocytochemia wykorzystuje znacznik fluorescencyjny, którym może być fluoresceina emitująca zielone światło. Znacznik jest połączony z przeciwciałem, które następnie jest nakładane na utrwaloną komórkę. Miejsce, w którym wiąże się przeciwciało znakowane fluorescencyjnie można zlokalizować metodą immunofluorescencyjnej mikroskopii optycznej²⁷⁾.

Test immunosorpcyjny/immunoenzymatyczny z wykorzystaniem enzymów ELISA jest na tyle czułą metodą, że wykrywane białko może występować w próbce w ilościach mniejszych niż 1 ng (10^{-9} g)^{27, 28)}. Test opiera się na wykorzystaniu enzymu, który zmienia bezbarwny substrat w barwny produkt końcowy. Enzym wiąże się kowalencyjnie ze swo-

istym przeciwciałem, które następnie identyfikuje docelowy antygen. W przypadku obecności antygeny, przyłącza się do niego przeciwciało-enzym w postaci kompleksu. Po dodaniu substratu powstaje barwny produkt ze względu na obecność enzymu katalizującego reakcję. Zmiana barwy, oznacza obecność produktu, a tym samym badanego antygeny. Testy ELISA charakteryzują się wysoką czułością oraz wiarygodnością wyników, szczególnie w przypadku zastosowania przeciwciał monoklonalnych. Test pośredni ELISA wykorzystuje się do wykrywania obecności przeciwciała, który m.in. stanowi podstawę popularnego testu obecności wirusa HIV (ludzki wirus niedoboru odporności)²⁸⁾.

Technika *western blot* jest wykorzystywana do identyfikacji niewielkich ilości białka w komórkach lub w płynach ustrojowych. Początkowo poddaje się próbkę elektroforezie w żelu SDS-PAGE. Następnie na żel nakłada się membranę nylonową lub nitrocelulozową. Białka, które uległy rozdzielaniu przenoszą się z żelu na membranę. Membrana jest następnie przemywana roztworem, który w swoim składzie zawiera swoiste przeciwciało dla szukanego białka. Takie przeciwciało nazywane jest pierwotnym/pierwszorzędowym, wiąże się ono z antygenem. Kompleks zawierający przeciwciało i antygen może być wychwycony przez ponowną inkubację membrany w roztworze zawierającym przeciwciało drugorzędowe/wtórne, czyli takie, które wykazuje swoistość do przeciwciała pierwszorzędowego. Zazwyczaj przeciwciało wtórne łączy się z enzymem tworzącym barwny produkt lub wykazującym chemiluminescencję/fluorescencję. Procedura umożliwia zarówno identyfikację, jak i oznaczenie ilościowe badanego białka²⁹⁾.

Metody oparte na spektrometrii mas

Wykorzystanie spektrometrii mas do identyfikacji białek pozwala na bardzo czuły i precyzyjny pomiar składu atomowego analitu. Jest to efektywna metoda, ze względu na to, że pozwala na ustalenie tożsamości białek mimo niewielkich ich stężeń oraz złożonych mieszanin. Spektrometria mas opiera się na jonizacji cząsteczek i analizie jonów. W źródle dochodzi do jonizacji oraz fragmentacji analizowanych cząsteczek. Od tego momentu cząsteczki występują jako jony w fazie gazowej. Jonizacja jest procesem, w którym tworzy się z cząsteczki jon molekularny (R^{+}), czyli kationorodnik. Ze względu na to, że czas jego życia jest wyjątkowo krótki (10^{-8} – 10^{-10} s), rozkłada się na wolny rodnik oraz kation fragmentacyjny. Rozkład kationorodnika obrazuje schemat: $R^{+} \rightarrow R^{*} + R^{+}$. W rezultacie kolejnych jego fragmentacji mogą wytwarzać się następne, nowe kationy fragmentacyjne wg schematu: $R^{+} \rightarrow R_1^{+} + R_2^{*}$ i $R_1^{+} \rightarrow R_3^{+} + R_4^{*}$ ²⁶⁾.

Analizator ma za zadanie rozdzielenie wiązki jonów wg stosunku masy do ładunku, czyli m/z . W większości przypadków detektorami są powielacze elektronów. Układ elektrod wtórnych pozwala osiągnąć wzmocnienie sygnału na poziomie 10^6 ³⁰⁾. Jony są odczytywane bezpośrednio z widma

masowego, ze względu na to, że zazwyczaj wytworzone kationy mają dodatni ładunek $z = 1$. Uzyskuje się również obraz fragmentacji, co w zależności od liczby zachodzących reakcji jest mniej lub bardziej złożone²⁰. Ze względu na swoją małą lotność oraz dużą masę cząsteczkową białka jeszcze do niedawna nie należały do grona cząsteczek, które można było jonizować w sposób wydajny. Dzięki postępowi technologicznemu obecnie jest to możliwe za sprawą jonizacji przez elektrorozpylanie ESI (*electrospray ionization*), wspomaganej matrycą desorpcji/ionizacji laserowej MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)³⁰. Analiza jakościowa w dużej mierze skupia się na wykorzystaniu spektrometrii „odcisku palca” (*fingerprint*). To nic innego jak profil mas jonów peptydowych oraz ich fragmentów. Zmierzone profile mas porównuje się z wartościami mas białek i ich fragmentów w proteomach znajdujących się w referencyjnej bazie danych, w której umieszczone są sekwencje białek. Łącząc informacje zawarte w bazach danych sekwencji białek oraz spektrometrię mas, można ustalić tożsamość określonego białka i wyznaczyć jego sekwencję aminokwasową. Ze względu na to, że spektrometry mas mają zazwyczaj ograniczony zakres detekcji mas, do których mogą być mierzone cząsteczki białek (limit górny), konieczne może stać się zastosowanie etapu trawienia enzymatycznego przed analizą MS. Wraz ze wzrostem mas ustalanie tożsamości cząsteczki staje się procesem bardziej skomplikowanym³¹. Proteomika zmierza w kierunku identyfikacji składników białek, czyli wyznaczenia ich mas cząsteczkowych, struktury, modyfikacji potranslacyjnych i profili molekularnych³². Czynnikiem, który spowodował, że spektrometria mas stała się bardziej interesująca pod kątem analizy białek była poprawa inżynierii analizatorów mas. Analizatory mas wraz z ulepszonymi detektorami umożliwiają dokładny pomiar jonów peptydów, z wysoką precyzją oraz niezwykle wysoką czułością. W tym aspekcie istnieje kilka możliwości do wyboru. Można zdecydować się na kwadrupol, który wyszukuje i steruje peptydami w określonym zakresie mas. Następnie pole elektromagnetyczne może posłużyć do przeniesienia chmury jonu do innej komory, aby zmierzyć masy wszystkich peptydów, posługując się pułapką jonową IT (*ion trap*), analizatorem masy jonów, który w swoim składzie zawiera dwie elektrody zewnętrzne, odseparowane izolatorem, i jedną elektrodę wewnętrzną (*orbitrap*), lub detektorem czasu przelotu jonów TOF (*time of flight*). Wybierany jest przeważnie jeden pojedynczy peptyd, który kieruje się do komory, gdzie następuje jego fragmentacja. Następnie otrzymywane jest widmo, które odzwierciedla sekwencję aminokwasów w peptydzie^{32, 33}. Możliwa jest również praca z tandemowym analizatorem czasu przelotu (TOF-TOF).

MALDI

Technika MALDI jest metodą desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą. W metodzie tej jony tworzy się za pomocą lasera, który pracuje przede wszystkim w zakresie UV. Matrycę stanowi związek aromatyczny,

który towarzyszy analitowi przy odparowywaniu go do sucha i dostarcza po desorpcji dużych ilości protonów potrzebnych do jonizacji badanej substancji. Najczęściej stosowanymi matrycami są kwasy alfa-cyano-4-hydroksycynamonowy (α -CN) i 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB). Rolą lasera jest wzbudzenie oraz odparowywanie matrycy, doprowadzając przy tym część cząsteczek w przejście do fazy gazowej. Następnie w fazie gazowej dochodzi do kolizji, które doprowadzają ostatecznie do jonizacji cząsteczki (analitu) oraz przenoszenia ładunku między cząsteczkami³⁰. Powstałe jony są przyspieszane i przechodzą do kolejnej części spektrometru mas, czyli do analizatora mas. W analizatorze jony są rozdzielane ze względu na stosunek ich masy do ładunku. Jony charakteryzują się nieznacznym nadmiarem energii oraz niewielką predyspozycją do fragmentacji, co powoduje, że metoda ta może być stosowana do analizy mieszanin białek i innych biopolimerów komórkowych. Technice MALDI towarzyszy generowanie wysokiego tła (szumu), co jest ściśle związane z obecnością matrycy oraz różnego rodzaju adduktów (samego związku, matrycy oraz związku z matrycą). Technika MALDI pozwala na analizę związków o masie cząsteczkowej nawet do 200–300 kDa.

MALDI jest zaliczana do technik łagodnej jonizacji, w której to można wyróżnić 5 głównych etapów; są to (*i*) pochłanianie energii przez matrycę; (*ii*) jonizacja matrycy wraz z jonizacją analitu, co spowodowane jest transferem energii; (*iii*) desorpcja, czyli uwalnianie cząsteczek z płytki spowodowane silnymi oddziaływaniami kulombowskimi, które występują między jonami; (*iv*) jonizacja ze względu na kolizje między cząsteczkami, które zachodzą w chmurze zdesorbowanych cząsteczek; (*v*) aktywacja potencjału przyspieszającego, który kieruje jony w stronę analizatora²⁰.

MALDI MS może stanowić niezwykle użyteczne narzędzie analityczne w kontekście badań dużych biomolekuł, takich jak białka, co w połączeniu z jej możliwością jonizacji białek w formie niezdegradowanej pozwalającej na określanie ich mas molekularnych sprawia, że technika ta ma szczególne znaczenie w badaniu produktów mlecznych. Pozwala ona na precyzyjne określanie izoform białek, istotnego parametru wpływającego na właściwości biologiczne białek, takie jak stabilność wobec trawienia enzymatycznego lub też właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jak ma to miejsce w przypadku laktoferyny występującej w mleku krowim w dwóch formach, LTF-a i LTF-b. Jak wskazują badania, zastosowanie techniki MALDI w trybie liniowym umożliwia łatwe rozróżnienie obu form³³. Ponadto szeroki zakres analizowanych mas (5–500 kDa) oraz możliwość uzyskiwania informacji o sekwencji poszczególnych aminokwasów w peptydach (analiza hydrolizatów enzymatycznych z wykorzystaniem technologii fragmentacji LIFT (*laser induced fragmentation technology*)) sprawiają, że technika ta z powodzeniem znalazła zastosowanie w potwierdzaniu tożsamości izolowanych z serwatki białek (np. LTF), identyfikacji obecności różnego rodzaju domieszek oraz analizie modyfikacji potranslacyjnych białek³⁴.

NALDI

Jonizacja/desorpcja laserowa wspomagana nanostrukturami NALDI (*nanostructure-assisted laser desorption/ionization*) należy do metod, które można wykorzystać do detekcji związków charakteryzujących się małą masą cząsteczkową. Zastosowanie w tym przypadku klasycznej techniki MALDI wiązałoby się z powstawaniem efektu supresji sygnałów badanego analitu, związanej m.in. z dużą liczbą sygnałów w zakresie do 700 Da, w tym pochodzących od matrycy i jej adduktów. Wiąże się to z wysokim tłem chemicznym w obszarze małych mas cząsteczkowych. Zjawisko negatywnie wpływa na poziom czułości metody. Ponadto należy brać pod uwagę również fakt, że matryce stosowane w technice MALDI wykazują kwasowy charakter, co w przypadku niskocząsteczkowych związków biologicznie aktywnych może generować problem z ich nietrwałością. Aby wyeliminować ten problem, można posłużyć się jonizacją wspomaganą nanomateriałami. Bazując na dotychczasowym stanie wiedzy, mechanizm jonizacji zachodzący za pośrednictwem nanomateriałów nie jest wciąż w pełni zdefiniowany. Przyjmuje się, że jest on związany z występowaniem zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Wskazuje się, że układy nanocząsteczkowe (np. AuNPs – nanocząstki złota) służą jako dawcy (donor) ładunku. Laser powoduje przeniesienie elektronów z nanocząstek na cząsteczki analitu. Powierzchnia płytki wykazuje silną hydrofobowość, co jest wykorzystywane do oczyszczania próbki lub izolacji związków ze złożonych mieszanin typu krew. Próbka jest umieszczana na płytce, a następnie dochodzi do zaadsorbowania związków hydrofobowych. Następnie usuwa się substancje interferujące, które mogłyby zakłócić proces pomiaru analitu, np. sole, poprzez płukanie powierzchni płytki. W ten sposób związane na podłożu anality są jednocześnie selektywnie wzbogacane. Nanomateriały, jakie dotychczas znalazły zastosowanie w technice NALDI, to nanocząstki metali oraz ich tlenków, nanomateriały na bazie węgla, nanokompozyty, a także metaloorganiczne szkielety. NALDI należy do metod szybko rozwijających się i są już wzmianki o jej zastosowaniu w kryminalistyce, np. do badania odcisków palców, gdzie wykorzystuje się obecność cząsteczek organicznych, które są materiałem dostarczającym informacji chemicznych o składzie, które odcisk palców pozostawia. Takie informacje to związki egzo- i endogenne typu materiały wybuchowe, narkotyki, toksyny i trucizny. Przykłady związków endogennych, które są obecne na skórze to peptydy, białka, lipidy, aminokwasy, mocznik, sole organiczne i nieorganiczne. Informacje chemiczne można wykorzystać do stwierdzenia zażywania narkotyków, identyfikacji biometrycznej lub też analizy antydopingowej. Szczególnie wysoką rozdzielczość uzyskuje się, stosując NALDI do obrazowania ukrytego odcisku palca z wykorzystaniem TOF/TOF-MS w połączeniu z mikroskopem. MALDI i NALDI są tak naprawdę metodami jonizacji, które mogą się uzupełniać. Ich stosowanie umożliwia analizę związków biologicznie aktywnych w szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Technika MALDI wykorzystywana jest do

analizy makrocząsteczek, w dużej mierze białek, lipidów, antybiotyków oraz cyklotoli. NALDI wykazuje zaś większą efektywność w analizie mas niskocząsteczkowych np. peptydów, aminokwasów, pigmentów i małych cząsteczek leków³⁵. W eksperymencie przeprowadzonym przez Kütt i współpr.³⁶ analizowano peptydy znajdujące się w sianie (*colostrum*) oraz w mleku, które są źródłem różnych białek o wysokiej aktywności biologicznej. Są nimi immunoglobuliny, cytokiny, LTF, peptydy oraz białka przeciwdrobnoustrojowe (np. defensyny). Ze względu na wciąż rozwijającą się dziedzinę dotyczącą oczyszczania i analizy jakościowej peptydów charakteryzujących się małą masą cząsteczkową, w badaniach wykorzystano technikę NALDI. W doświadczeniu badacze położyli szczególny nacisk na możliwie najprostszy sposób przygotowania próbki, niewymagający dużego nakładu pracy, a więc możliwie najkrótszy czas do uzyskania wyników TAT (*turn around time*). W doświadczeniu wykonano zarówno analizę MALDI, jak i NALDI z uwzględnieniem rozcieńczenia próbek. W rezultacie zaobserwowano, że zastosowanie techniki NALDI pozwalało na detekcję sygnałów nawet po rozcieńczeniu próbki milion razy, a technika okazała się być wielokrotnie czulsza od standardowej techniki MALDI. Co więcej, jej połączenie z tandemową spektrometrią mas pozwoliło również na ujawnienie sekwencji aminokwasowej peptydów. Opierając się na przedstawionych przez badaczy wynikach, można stwierdzić, że metoda NALDI jest wyjątkowo przydatna w przypadkach, gdy celem molekularnym analizy są niskocząsteczkowe peptydy, szczególnie w kontekście problemu detekcji zafałszowań. Cechuje się ona zarówno łatwością aplikacji, jak i wysoką czułością. Intensywność sygnałów była znacznie większa niż w przypadku zastosowania metody MALDI.

Aspekty prawne

Jeżeli chodzi o zapewnianie jakości, bezpieczeństwa i oryginalnego pochodzenia suplementów diety, rola prawa karnego jest szczególna. Ustawodawca zdecydował bowiem, że właściwe standardy wspomnianych produktów osiągnięte zostaną w drodze przestrzegania wprowadzonych regulacji administracyjnych. Podstawową rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa w tym zakresie zapewnić mają przepisy ustawy z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia³⁷. Nie jest to jedyna ustawa dotycząca sfery wprowadzania do organizmu substancji chemicznych. Wspomnieć należy przede wszystkim o Prawie farmaceutycznym z 6 września 2001 r.³⁸, ustawie z 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych³⁹, ale także ustawie o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 r.⁴⁰. Ustawodawca ogranicza dostęp do wytwarzania produktów spożywczych, leczniczych i kosmetycznych oraz wymaga przestrzegania odpowiedniego reżimu, czyli chce zapewnić posiadanie i właściwe wykorzystanie odpowiedniej wiedzy, co jest niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowia i życia konsumentów. Wskazać można na pewien stan-

dardowy model ram prawnych w tym zakresie. Ustalony zostaje zakres wymagań wobec podmiotu zajmującego lub zamierzającego się zajmować danym rodzajem działalności wytwórczej lub handlowej, co często wiąże się z koniecznością uzyskania odpowiedniego pozwolenia, a także sposób kontroli wypełniania takich wymagań. Nieprzestrzeganie właściwej procedury produkcji i sprzedaży, a także zajmowanie się taką działalnością przez nieuprawnione podmioty obwarowane jest różnymi sankcjami. Ustawodawca stosuje w nich różne modele zapewnienia odpowiedniego postępowania z substancjami będącymi ich przedmiotem. W przypadku ustawy o produktach kosmetycznych nieprzestrzeganie zawartych tam regulacji grozi jedynie sankcjami administracyjnymi. W pozostałych przypadkach wprowadzone zostały przepisy karne.

Obydwa znajdują się w ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia³⁷. Tutaj wskazane zostaną normy prawa karnego. Artykuł 9 ust. 1 stanowi, że kto prowadzi działalność gospodarczą w zakresie sprzedaży żywności „na odległość” (sprzedaży wysyłkowej), w tym sprzedaży przez Internet, bez złożenia wniosku o wpis do rejestru zakładów, podlega karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do roku. Zgodnie z art. 96 ust. 1 kto produkuje lub wprowadza do obrotu środek spożywczy powszechnie spożywany szkodliwy dla zdrowia lub życia człowieka, ten podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 2. Natomiast art. 96 ust. 2 stanowi, że podlega karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 3 ten, kto produkuje lub wprowadza do obrotu szkodliwy dla zdrowia lub życia człowieka środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, suplement diety lub nową żywność. Czym są produkty wymienione w tym przepisie, określa ustawa. Warto zwrócić uwagę, że ust. 1 i 2 art. 96 nie wymagają wystąpienia bezpośrednio niebezpieczeństwa. Działanie nieumyślne, czyli kiedy przestępstwo zostaje popełnione na skutek niezachowania ostrożności wymaganej w danych okolicznościach, mimo że możliwość popełnienia tego czynu sprawca przewidywał albo mógł przewidzieć, zagrożone jest zgodnie z ust. 4 karą ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do roku. Artykuł 97 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia przewiduje karę grzywny, ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do roku dla tego, kto produkuje lub wprowadza do obrotu środek spożywczy zepsuty lub zafałszowany.

Omawiane przepisy karne ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia, czyli art. 96 i 97, należy rozpatrywać łącznie z art. 165 § 1 pkt. 2 Kodeksu karnego⁴¹. Przestępstwo to popełnia ten, kto sprowadza niebezpieczeństwo dla życia lub zdrowia wielu osób albo dla mienia w wielkich rozmiarach, wyrabiając lub wprowadzając do obrotu szkodliwe dla zdrowia substancje, środki spożywcze lub inne artykuły powszechnego użytku lub też środki farmaceutyczne nieodpowiadające obowiązującym warunkom jakości. W przypadku działania umyślnego sprawcy

grozi kara pozbawienia wolności od 6 miesięcy do lat 8. Natomiast gdy sprawca działa nieumyślnie, podlega karze pozbawienia wolności do lat 3. Jeżeli następstwem czynu umyślnego jest śmierć człowieka lub ciężki uszczerbek na zdrowiu wielu osób, sprawca podlega karze pozbawienia wolności od 2 do 15 lat. Jeżeli takie następstwo wystąpi w przypadku czynu nieumyślnego, przewidziana jest kara pozbawienia wolności od 6 miesięcy do lat 8.

Falszowanie suplementów diety może podpadać także pod przepisy Prawa farmaceutycznego³⁸. Z taką sytuacją będziemy mieli do czynienia wtedy, gdy dany produkt spełnia jednocześnie kryteria produktu leczniczego oraz kryteria innego rodzaju produktu, w szczególności suplementu diety, produktu kosmetycznego lub wyrobu medycznego (art. 3a ustawy³⁸). Zgodnie z art. 2 pkt. 32 produktem leczniczym jest substancja lub mieszanina substancji przedstawiana jako posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt albo podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne czy metaboliczne. Przepisy Prawa farmaceutycznego zawierają szereg typów czynów zabronionych o różnym ciężarze gatunkowym, od wprowadzania produktu leczniczego do obrotu przez podmiot, który nie dysponuje pozwoleniem na dopuszczenie do obrotu (art. 124 p.f.), po zakazaną reklamę (art. 129 p.f.) i przypisywanie właściwości produktu leczniczego produktowi, który nie spełnia wymogów określonych w ustawie (art. 130 p.f.).

Zgodnie z art. 124 p.f. kto wprowadza do obrotu lub przechowuje w celu wprowadzenia do obrotu produkt leczniczy, nie posiadając pozwolenia na dopuszczenie do obrotu, podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 2.

Odstępstwa od wymaganych procedur na etapie produkcji mogą mieć na celu zmniejszenie kosztów i sprzedaż klientowi gorszego produktu w cenie lepszej, często podszywając się pod renomowanego producenta. Dlatego zasygnalizować trzeba możliwość popełnienia przestępstwa oszustwa poprzez wprowadzenie do obrotu środka spożywczego nieodpowiadającego właściwościom, składowi lub producentowi, deklarowanym przy wprowadzaniu środka do obrotu. Jeżeli sprawca wprowadza w błąd lub wyzyskuje błąd i w celu osiągnięcia korzyści majątkowej, doprowadza inną osobę do niekorzystnego rozporządzenia własnym lub cudzym mieniem, podlega karze pozbawienia wolności od 6 miesięcy do lat 8 (art. 286 § 1 k.k.). Istotnym aspektem, na jaki należy zwrócić uwagę, analizując problem fałszowania towarów, są naruszenia praw ochronnych na znaki towarowe. W grę wchodzi tu Prawo własności przemysłowej⁴². Znaki cieszące się zaufaniem klientów i dobrze radzące sobie na rynku często padają ofiarą fałszerzy, którzy wykorzystują pozycję danego znaku, by sygnować nim swoje własne produkty, zazwyczaj znacznie odbiegające od nich jakościowo. W przypadku suplementów diety mogą to być

produkty nie tylko pozbawione deklarowanych właściwości, ale również niebezpieczne dla życia i zdrowia. Zjawisko jest tym poważniejsze, że często zajmują się nim zorganizowane grupy przestępcze⁴³). Tego rodzaju zachowanie kryminalizowane jest przez art. 305 ust. 1 ustawy, zgodnie z którym kto, w celu wprowadzenia do obrotu oznacza towary podrobionym znakiem towarowym, w tym podrobionym znakiem towarowym Unii Europejskiej, zarejestrowanym znakiem towarowym lub znakiem towarowym Unii Europejskiej, którego nie ma prawa używać lub dokonuje obrotu towarami oznaczonymi takimi znakami, podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 2.

Reasumując powyższe uwagi, należy stwierdzić, że niezgodność deklarowanego składu środka spożywczego z jego rzeczywistą zawartością może stanowić podstawę do prawnokarnej reakcji. Podstawowe znaczenie mogą mieć w takim przypadku przepisy karne ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Jej przepisy pozwalają na stosunkowo proste udowodnienie wypełnienia znamion czynu zabronionego. Jednakże w przedstawionych powyżej rozważaniach wykazano, że wprowadzenie do obrotu takiego środka może powodować też dalej idące konsekwencje oraz naruszać bardzo zróżnicowane dobra. W grę wchodzić mogą bowiem nie tylko życie i zdrowie, ale też różnego rodzaju prawa majątkowe. Dlatego możliwe są do zastosowania również przepisy Kodeksu karnego, prawa farmaceutycznego, a także prawa własności przemysłowej. Takie zróżnicowanie możliwych do zastosowania przepisów karnych wynika z bardzo szerokiego spektrum potencjalnych sposobów działania sprawcy, jego motywacji oraz konsekwencji podejmowanego działania. Z tego powodu w konkretnej sytuacji kwalifikacja prawna czynu może być zróżnicowana. Zauważyć wypada, że obecny stan ustawodawstwa z zakresu prawa karnego zawiera kompleksowe regulacje chroniące konsumentów, aczkolwiek jak zawsze w przypadku przestępstw związanych z prowadzeniem działalności gospodarczej, podstawowym problemem pozostaje możliwość udowodnienia niezgodnego z prawem zachowania. Aby można było egzekwować wspomniane regulacje, konieczne są możliwości wykrycia i udowodnienia odstępstw od wymaganej jakości produktów, co uwidoczni istotę przedstawionych powyżej badań.

Praca została sfinansowana w ramach projektu pt. „Karnoprawne i kryminologiczne aspekty fałszowania towarów i produktów leczniczych” NCN, OPUS 12, 2016/23/B/HS5/03790.

Otrzymano: 25-06-2024
Zaakceptowano: 07-10-2024

Zrecenzowano: 30-09-2024
Opublikowano: 20-11-2024

LITERATURA

- [1] J. Król, A. Brodziak, A. Litwińczuk, *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 2011, **4**, nr 77, 74.
- [2] W. Szczurek, *Wiad. Zootech.* 2008, **4**, 41.
- [3] <https://altmedrev.com/wp-content/uploads/2019/02/v13-4-341.pdf>, dostęp 3 czerwca 2024 r.
- [4] J. Król, A. Litwińczuk, A. Zarajczyk, *Med. Wet.* 2008, **64**, nr 12, 1375.
- [5] P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry. Proteins: Basic aspects*, t. 1A, Springer, 2013.
- [6] L. Adlerova, A. Bartoskova, M. Faldyna, *Vet. Med.* 2008, **53**, nr 9, 457.
- [7] E.N. Baker, H.M. Baker, *Cell Mol. Life Sci.* 2005, **62**, nr 22, 2531.
- [8] S. Hagiwara, K. Kawai, A. Anri, H. Nagahata, *J. Vet. Med. Sci.* 2003, **65**, nr 3, 319.
- [9] P.P. Ward, E. Paz, O.M. Conneely, *Cell Mol. Life Sci.* 2005, **62**, nr 22, 2540.
- [10] S.A. Gonzalez-Chavez, S. Arevalo- Gallegos, Q. Rascon-Cruz, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, **33**, e1.
- [11] D. Legrand, E. Elass, M. Carpentier, J. Mazurier, *Cell Mol. Life Sci.* 2005, **62**, nr 22, 2549.
- [12] N. Orsi, *BioMetals* 2004, **17**, 189.
- [13] J. Bezault, R. Bhimani, J. Wiprovnick, P. Furmanski, *Cancer Res.* 1994, **54**, nr 9, 2310.
- [14] W.P. Wang, M. Iigo, J. Sato, K. Sekine, I. Adachi, H. Tsuda, *Jpn. J. Cancer Res.* 2000, **91**, 1022.
- [15] J.S. Wolf, D. Li, R.J. Taylor, B.W. O'Malley, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 2003, **65**, nr 5, 245.
- [16] Decyzja wykonawcza 012/727/UE Komisji z dnia 22 listopada 2012 r. zezwalająca na wprowadzenie do obrotu laktoferyny bydłowej jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem nr 258/97/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, *Dz.U.* L 327.
- [17] <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.html>, dostęp 3 czerwca 2024 r.
- [18] <https://www.cidrap.umn.edu/foodborne-disease/fda-nod-lactoferrin-be-used-antimicrobial-beef>, dostęp 3 czerwca 2024 r.
- [19] C.V. Agostoni, *EFSA J.* 2012, **10**, nr 5, 2701.
- [20] J.M. Berg, L. Stryer, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto. *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- [21] N.J. Kruger, *Methods Mol. Biol.* 1994, **32**, 9.
- [22] B. Faramarzi, M. Moggio, N. Diano, M. Portaccio, M. Lepore, *Biophysica* 2023, **3**, nr 1, 158.
- [23] S.A. Tatulian, *FTIR analysis of proteins and protein-membrane interactions*, Springer, New York 2019.
- [24] M.S.H.K. Akash, Rehman, *Essentials of pharmaceutical analysis*, Springer Nature, Singapore 2020.
- [25] S. Czapllicki, *Chromatography in bioactivity analysis of compounds*, InTech, 2013.
- [26] J.F. Rabek, *Biopolimery. Metody badań strukturalnych w praktyce*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2023.
- [27] A. Görlich, *Wszechświat* 2016, **117**, nr 4–6, 107.
- [28] S. Aydin, *Peptides* 2015, **72**, 4.
- [29] <http://laborant.pl/wybrane-metody-oznaczania-bialek>, dostęp 4 czerwca 2024 r.
- [30] U. Leurs, U.H. Mistarz, K.D. Rand, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, **93**, 95.
- [31] P. Sosnowski, *Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii MALDI-MSI*, praca doktorska, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 2015.
- [32] P. Pomastowski, B. Buszewski, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014, **53**, 167.
- [33] O. Pryshchepa, G. Sagandykova, J. Rudnicka, P. Pomastowski, M. Sprynskyy, B. Buszewski, *JDS* 2022, **105**, nr 3, 1940.
- [34] O. Pryshchepa, J. Pałczyńska, A. Radtke, P. Pomastowski, *Przegl. Mlecz.* 2024, nr 1, 13.
- [35] P. Pomastowski, B. Buszewski, *Nanomaterials* 2019, **9**, nr 2, 260.
- [36] M.L. Kütt, M. Malbe, J. Stagsted, *Agron. Res.* 2011, **9**, 415.
- [37] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, *Dz.U.* 2023, poz. 1448.
- [38] Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne, *Dz.U.* 2024, poz. 686.
- [39] Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych, *Dz.U.* 2018, poz. 2227.
- [40] Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii, *Dz.U.* 2023, poz. 1939 z późn. zm.
- [41] Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r. Kodeks karny, *Dz.U.* 2024, poz. 17 z późn. zm.
- [42] Ustawa z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej, *Dz.U.* 2023, poz. 1170.
- [43] N. Daško, *Prawnokarna ochrona znaków towarowych*, Warszawa 2017, 79–118.