

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia

mgr inż. Anna Jańczuk-Grabowska

Rozprawa doktorska

**Zastosowanie laktoferyny jako składnika
o szczególnych właściwościach prozdrowotnych
w żywieniu osób o określonym profilu genetycznym**

*The use of lactoferrin as an ingredient with special health-promoting
properties in the nutrition of people with a specific genetic profile*

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych oraz Vitagenum Sp. z o.o.
w ramach Programu MNiSW (MEiN) „Doktorat Wdrożeniowy”
(0029/DW/2018)

Promotor: dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni

Opiekun zakładowy: dr inż. Tomasz Czernecki

Lublin, 2023

Składam serdeczne podziękowania

*Pani dr hab. Anecie Brodziak, prof. Uczelni,
za anielską cierpliwość i ogromne
zaangażowanie na każdym etapie
powstawania niniejszej rozprawy.*

Dziękuję

*Wiceprezesowi Zarządu
VITAGENUM Sp. z o. o. w Lublinie
Panu dr. Tomaszowi Czerneckiemu
za wsparcie i możliwość uczestnictwa
w Programie „Doktorat Wdrożeniowy”
oraz za udostępnienie infrastruktury
przedsiębiorstwa do celów
badawczo-rozwojowych.*

Rozprawę dedykuję

*Kochanym Rodzicom
i wspierającemu Mężowi.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem promotora nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami,
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego,
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data Podpis autora.....

Wykaz prac naukowych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej

PUBLIKACJA I

Jańczuk A., Brodziak A., Czernecki T., Król J. (2023) Lactoferrin – The Health-Promoting Properties and Contemporary Application with Genetic Aspects. *Foods*, 12 (1), 70.

Punkty MEiN: 140

IF: 5,200

PUBLIKACJA II

Jańczuk A., Brodziak A., Król J., Czernecki T. (2023) Properties of Yoghurt Fortified in Lactoferrin with Effect of Storage Time. *Animals*, 13 (10), 1610.

Punkty MEiN: 100

IF: 3,000

PUBLIKACJA III

Jańczuk-Grabowska A., Czernecki T., Brodziak A. (2023) Gene – Diet Interactions: Viability of Lactoferrin-Fortified Yoghurt as an Element of Diet Therapy in Patients Predisposed to Overweight and Obesity. *Foods*, 12, 2929.

Punkty MEiN: 140

IF: 5,200

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MEiN za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obowiązującego w roku wydania pracy: 380 pkt

Impact Factor publikacji zgodnie z listą Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania: 13,400

Liczba cytowań (bez autocytowań) według Web of Science/Scopus: 3 (2) na dzień 15.09.2023 r.

Spis treści

1. Streszczenie.....	6
2. Wykaz skrótów	10
3. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej	12
4. Hipoteza i cel rozprawy	14
5. Struktura przeprowadzonych badań.....	16
5.1. Etapy weryfikacji hipotez badawczych	16
6. Metody i materiały do badań	19
6.1. Materiały do badań.....	19
6.2. Metody badawcze	22
7. Wyniki i dyskusja.....	30
7.1. Badania dotyczące zastosowania laktoferyny jako funkcjonalnego dodatku w produkcji jogurtów naturalnych (PII, badania własne) – Etap II i IV	30
7.1.1. Jakość laktoferyny zastosowanej w celu fortyfikacji jogurtów	30
7.1.2. Jakość jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych (PII) – Etap II	31
7.1.3. Jogurty wytworzone w skali przemysłowej (RD) – Etap IV	51
7.2. Badania dotyczące możliwości wykorzystania jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w dietoterapii osób z genetyczną predyspozycją do nadwagi i otyłości (PIII, badania własne) – Etap III, V i VI.....	62
7.2.1. Plan żywieniowy (badania własne) – Etap III	62
7.2.2. Dobór grupy badawczej i interwencja żywieniowa (PIII) – Etap V	65
7.2.3. Analiza korelacji (badania własne) – Etap VI	72
8. Wnioski	79
9. Literatura.....	81
10. Załączniki.....	94

1. Streszczenie

Choroby cywilizacyjne, w tym otyłość to problem, który dotyczy coraz większej ilości społeczeństwa. W ostatnich latach liczba osób cierpiących na otyłość uległa potrojeniu, dlatego tak ważne jest prowadzenie badań dotyczących poszukiwania składników prozdrowotnych, które potencjalnie mogą wspomóc leczenie nadwagi i otyłości. Jednym z takich składników może być laktoferyna, która od 2012 roku dozwolona jest do stosowania jako składnik żywności. Laktoferyna wykazuje szereg właściwości prozdrowotnych, w tym przeciwzapalne, przeciwbakteryjne czy przeciwgrzybicze. Laktoferyna może również wspierać redukcję tłuszczu trzewnego, ograniczać przerost tkanki tłuszczowej, regulować poziom cholesterolu i trójglicerydów. Na rynku istnieją już produkty fortyfikowane laktoferyną, jednak obecnie stosowana jest głównie jako składnik farmaceutyków i kosmetyków. Wzrost zainteresowania konsumentów żywnością funkcjonalną skłania producentów do wykorzystywania laktoferyny w fortyfikacji produktów spożywczych, które stanowią codzienny element diety. Do produktów takich zaliczane są, m.in. fermentowane produkty mleczne – jogurty, które stanowią idealną matrycę dla laktoferyny, gdyż stanowi ona integralny składnik mleka.

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja technologii produkcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną, a następnie włączenie go do żywienia osób z nadwagą i otyłością o określonym obrazie funkcjonalnym organizmu na podstawie badań DNA oraz biochemicznych i antropometrycznych.

W początkowym etapie dokonano analizy literatury celem oceny możliwości wykorzystania laktoferyny w przemyśle spożywczym oraz poznania jej potencjalnych właściwości prozdrowotnych w kontekście chorób cywilizacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem gospodarki węglowodanowej organizmu oraz nadwagi i otyłości.

Kolejno opracowano technologię wytwarzania jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w skali laboratoryjnej oraz przeprowadzono obserwacje zmian wyróżników jakości podczas 28-dniowego okresu przechowywania w warunkach chłodniczych. W otrzymanych jogurtach z dodatkiem laktoferyny, wyprodukowanych na bazie kultur starterowych zawierających szczepy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, dokonano analizy właściwości fizyko-chemicznych (m.in. wartość odżywcza, kwasowość, tekstura, barwa oceniana instrumentalnie, aktywność wody, synereza), jakości mikrobiologicznej oraz cech organoleptycznych. Odnotowane zmiany nie wpłynęły negatywnie na ogólną jakość i akceptowalność jogurtów fortyfikowanych laktoferyną. Jogurty fortyfikowane

charakteryzowały się wysoką jakością mikrobiologiczną przez cały okres przechowywania chłodniczego.

Następnym etapem było przeskalowanie produkcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną do skali przemysłowej. Otrzymane parametry dla jogurtów wytworzonych w skali przemysłowej były zbliżone do jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej, głównie ze względu na wykorzystanie surowca z jednego źródła, identycznych kultur starterowych oraz podobnego procesu produkcji. Efektem tego etapu było pozyskanie jogurtów do dalszych badań żywieniowych.

W dalszym etapie wykonano ocenę skuteczności opracowanej interwencji dietetycznej z wykorzystaniem jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w żywieniu osób posiadających polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) predysponujące do zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz nadwagi i otyłości. W celu precyzyjnego doboru grupy badawczej posłużono się narzędziami biologii molekularnej. Wykonano badania przesiewowe z wykorzystaniem genotypowania 137 osób populacji polskiej na obecność wariantów ryzyka w czterech polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (rs1121980 - gen FTO, rs993960 - gen FTO, rs10830963 - gen MTNR1B i rs7903146 - gen TCF7L2). Wytypowana 19-osobowa grupa badawcza ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) $> 25 \text{ kg/m}^2$ lub stosunkiem masy ciała do wzrostu (WHtR) ≥ 49 uczestniczyła w 21-dniowej interwencji dietetycznej (badanie krzyżowe), prowadzonej zgodnie z opracowanym planem żywieniowym, uwzględniającym jogurt fortyfikowany laktoferyną (200 mg/dzień). Zanotowano różnicę w rozkładzie wariantów genetycznych w analizowanych polimorfizmach pojedynczego nukleotydu w badanej populacji, w porównaniu do populacji europejskiej. Największe różnice zanotowano w rozkładzie rs9939609 – wariant AA (badanie własne – 31,0%; populacja europejska – 19,9%) i rs1121980 – wariant AA (badanie własne – 34,0%; populacja europejska – 23,3%). Interwencja dietetyczna z zastosowaniem jogurtu z dodatkiem laktoferyny wykazała statystycznie istotnie wyższą skuteczność w redukcji masy ciała i hemoglobiny glikowanej (HbA1c), w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano również bliską wartości „1” dodatnią korelację między redukcją masy ciała, a obniżeniem poziomu HbA1c.

Uzyskane wyniki wskazują, że jogurt fortyfikowany laktoferyną wydaje się wartym uwagi produktem spożywczym, który może być wykorzystany w dietoterapii osób z określoną predyspozycją genetyczną do zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz nadwagi i otyłości.

Słowa kluczowe: laktoferyna, jogurt, otyłość, dieta, nutrigenomika, nutrigenetyka

Summary

Civilisational diseases, such as obesity, are a problem affecting a growing part of the world's population. In recent years, the number of individuals suffering from obesity has tripled, which underscores the importance of research aimed at identifying dietary ingredients with health-promoting properties that could potentially contribute to the treatment of overweight and obesity. One of the same may be lactoferrin which has been approved for use as a food ingredient since 2012. Lactoferrin has been shown to have a number of health benefits, including in terms of its anti-inflammatory, antibacterial, and antimycotic properties. It can also potentially facilitate the reduction of visceral fat, limit the accumulation of fatty tissue, and aid in the regulation of cholesterol and triglyceride levels. Certain products fortified with lactoferrin are already available on the market, although it is still used mainly as an ingredient in pharmaceuticals and cosmetics. However, given the growing consumer interest in functional food, producers are increasingly exploring the possibility of fortifying various everyday food products with lactoferrin. The latter include e.g. fermented dairy products – yoghurts, which, incidentally, provide an ideal matrix for lactoferrin, itself an integral ingredient of milk.

The aim of the dissertation was to develop and optimize the technology of producing yoghurt fortified with lactoferrin, and subsequently include it in the diet of patients suffering from overweight and obesity who shared a specific functional organic profile, as determined on the basis of preliminary DNA, biochemical, and anthropometric tests.

The initial stage of the study entailed a literature review aimed at evaluating the actual applicability of lactoferrin in the food industry and identifying its potential health benefits in the context of civilisational diseases, with a particular focus on carbohydrate metabolism, overweight and obesity.

Subsequently, the technology of manufacturing lactoferrin-fortified yoghurt on the laboratory scale was developed and relevant quality markers were observed over a 28-day cold storage period. The obtained yoghurts containing lactoferrin, produced using starter cultures containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* bacterial strains, were analysed in terms of their physicochemical properties (including nutritional value, acidity, texture, instrumentally measured colour, water activity, syneresis), microbiological quality, and organoleptic characteristics. The observed changes did not have a negative impact on the general quality and palatability of the lactoferrin-fortified yoghurts.

The products were found to retain high microbiological quality throughout the cold storage period.

The next stage entailed scaling up the production process to industrial standards. The parameters of yogurt produced on an industrial scale were similar to those measured at the laboratory production stage - the raw materials were obtained from the same source, identical starter cultures were used, and similar production processes were employed. The products obtained were then used in the subsequent dietary study.

The next stage of the research aimed to evaluate the efficacy of the proposed dietary intervention using lactoferrin-fortified yoghurt in patients diagnosed with single nucleotide polymorphisms (SNP) that predisposed them for carbohydrate metabolism disorders, overweight and obesity. To ensure that the study group was precisely selected, molecular biology methods were employed. Genotype screening was done for 137 potential participants from Poland to identify cases of risk variants present in four single nucleotide polymorphisms (rs1121980 – FTO gene, rs993960 – FTO gene, rs10830963 – MTNR1B gene, and rs7903146 – TCF7L2 gene). This allowed the selection of 19 subjects with the body mass index (BMI) > 25 kg/m² or weight to height ratio (WHtR) ≥ 49, who subsequently underwent a 21-day dietary intervention (cross-over study) in accordance with the prepared dietary plan that included the consumption of lactoferrin-fortified yoghurt (200 mg/day). Differences were observed in terms of the distribution of the genetic variants of the relevant single nucleotide polymorphisms between the analysed population and the overall European population. The greatest differences were recorded for rs9939609 – AA variant (present study – 31.0%; European population – 19.9%) and rs1121980 – AA variant (present study – 34.0%; European population – 23.3%). The dietary intervention entailing the consumption of lactoferrin-fortified yoghurt was shown to have statistically higher effectiveness in terms of body mass and glycated haemoglobin (HbA1c) reduction as compared to the control group. A positive correlation of nearly “1” was also observed between body mass reduction and lower HbA1c levels.

The obtained results indicate that yoghurt fortified with lactoferrin may be a noteworthy food product with potential therapeutic dietary applications in individuals suffering from specific genetic predispositions for carbohydrate metabolism disorders, overweight and obesity.

Key words: lactoferrin, yoghurt, obesity, diet, nutrigenomics, nutrigenetics

2. Wykaz skrótów

Skrót	Znaczenie
a_w	Aktywność wody
bLF	Laktoferyna bydlęca
BMI	Wskaźnik masy ciała
CPM	Całkowita przemiana materii
d	Dni
EPS	Egzopolisacharydy
FMI	Wskaźnik tłuszczowej masy ciała
HbA1c	Hemoglobina glikowana
jtk	Jednostki tworzące kolonię
LF	Laktoferyna
m.c.	Masa ciała
NMC	Należna masa ciała
p.p.	Punkt procentowy
PAL	Współczynnik poziomu aktywności fizycznej
PCR	Reakcja łańcuchowej polimerazy
PI	Publikacja I
PII	Publikacja II
PIII	Publikacja III
PPM	Podstawowa przemiana materii
PWP	Polimeryzowane białka serwatkowe
r	Współczynnik korelacji Pearsona
RD	Rozprawa doktorska
RP-HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RPM	Liczba obrotów na minutę
RS	Analiza korelacji porządku rang Spearmana
SNP	Polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SWS	Spontaniczna synereza serwatki powierzchniowej
tys.	Tysiący
tys./ml	Tysiący w jednym mililitrze

UE	Unia Europejska
WHC	Zdolność zatrzymywania wody
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
WHR	Wskaźnik stosunku obwodu talii do obwodu bioder
WHtR	Wskaźnik stosunku obwodu talii do wzrostu
WPC	Koncentrat białek serwatkowych

3. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Laktoferyna (LF) jest białkiem, które należy do rodziny transfery i stanowi integralny składnik mleka. Została odkryta w mleku krowim w 1939 roku. LF stanowi około 1% wszystkich białek serwatkowych. Jej stężenie jest zmienne w zależności od etapu laktacji. Najwyższe wartości notuje się w siarze, gdy w kolejnych etapach wartość ta stopniowo spada notując najniższe wartości w mleku dojrzalym (Franco i in., 2018; Jamka, 2017; Maciel i in., 2020).

LF posiada właściwości przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne czy przeciwnowotworowe (Król i in., 2013; Maciel i in., 2020; Wajs i in., 2021). W ostatnich latach wykazano, że może chronić ludzkie komórki przed COVID-19 (Poti, 2020). Jest powszechnie stosowana w leczeniu anemii i niedoborów żelaza, gdyż posiada znacznie wyższą biodostępność żelaza w porównaniu z nieorganicznymi solami żelaza (Ke i in., 2015; Paesano i in., 2010, 2014; Rosa i in., 2020). Przyjmowanie LF może być również pomocne w przebiegu alergii, a dokładniej w atopowym zapaleniu skóry i zapaleniu opłucnej wywołanym albuminą jaja kurzego (Fujishima i in., 2020; Zimecki i in., 2012).

Opublikowane dotychczas badania, prowadzone na zwierzętach, wskazują na potencjalne obszary wykorzystania prozdrowotnego potencjału laktoferyny. Suplementacja LF znalazła zastosowanie we wspomaganiu leczenia nadwagi i otyłości. LF wspomaga redukcję tłuszczu trzewnego, zmniejsza przyrost tkanki tłuszczowej, obniża poziom leptyny, glukozy, cholesterolu całkowitego i LDL oraz trójglicerydów (Li i in., 2022; Morishita i in., 2013; Sun i in., 2016; Xiong i in., 2018). W dzisiejszych czasach otyłość staje się coraz większym problemem zdrowotnym (Xiong i in., 2018). W latach 1976-2016 wzrosła trzykrotnie liczba osób chorujących na otyłość. Według WHO w 2016 roku aż 13% dorosłej populacji było otyłe, a 39% miało nadwagę (WHO, 2023). W związku z narastającym problemem otyłości i powiązanych z tym licznych negatywnych konsekwencji zdrowotnych istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań w walce z tą chorobą cywilizacyjną. Jednym z takich rozwiązań może stać się spożywanie LF, która prawnie posiada status nowej żywności. Początkowo w Unii Europejskiej LF zgodnie z prawem wykorzystywana było jedynie jako składnik suplementów diety, ponieważ przed 15 maja 1997 roku udokumentowane zostało jej spożycie jedynie w tej kategorii. Natomiast po kolejnych nowelizacjach aktów prawnych, zgodnie z aktualnie obowiązującym Rozporządzeniem Komisji (UE) 2018/1023 z dnia

23 lipca 2018 roku, LF została dozwolona do stosowania w określonych kategoriach żywności, w tym w napojach na bazie fermentowanego mleka czy produktach na bazie jogurtu.

Dodatkowo, zainteresowanie konsumentów żywnością funkcjonalną stale wzrasta, dlatego dodatek LF do jogurtów, czyli do produktów, w których stanowi ona integralny składnik występujący w surowcu przerobowym, wydaje się zasadny. Dodatek LF wzmacnia prozdrowotne właściwości jogurtu, m.in. ograniczenie akumulacji tkanki tłuszczowej czy regulacji glikemii (Madjd i in., 2016; Panahi i Tremblay, 2016).

Sama otyłość ma podłoże wieloczynnikowe i oprócz czynników, tj. nadmierna podaż energii z pożywieniem czy brak aktywizacji hormonalnie czynnej tkanki mięśniowej, bardzo ważne znaczenie mają również aspekty genetyczne. Niektóre z polimorfizmów w genie FTO są ściśle związane z ryzykiem występowania otyłości, wyższym wskaźnikiem masy ciała BMI, zaburzeniami glikemii czy cukrzycą typu 2 (Denisova i in., 2022; Frayling i in., 2007; Kar i in., 2023). Polimorfizm rs7903146 w genie TCF7L2 wpływa na homeostazę glukozy we krwi. Obecność allelu T zwiększa ryzyko wystąpienia insulinooporności czy cukrzycy typu 2 (Bhatt i in., 2020; Cropano i in., 2017; Reinehr i in., 2008; Wrzosek i in., 2019). Kolejnym polimorfizmem powiązany z otyłością jest rs10830963 występujący w genie MTNR1B. Allel G odpowiada za zwiększone ryzyko cukrzycy, cukrzycy ciążowej i otyłości (De Luis i in., 2020; Huang i in., 2019).

W literaturze naukowej niestety niewiele jest doniesień dotyczących wpływu suplementacji LF czy zastosowania jogurtu fortyfikowanego LF w dietoterapii nadwagi i otyłości. Dotychczas nie opublikowano również badań dotyczących efektów spożycia laktoferyny w grupach osób o określonym profilu genetycznym.

Biorąc pod uwagę osiągnięcia farmakogenomiki w profilowaniu, dedykacji i wzrostu skuteczności leków w określonych genetycznie populacjach, zastosowanie narzędzi nutrigenomicznych i podobnego modelu postępowania badawczego w obszarze technologii żywności i żywienia niesie nadzieję na dostrzeżenie zależności umożliwiających skuteczne dedykowanie żywności osobom z określonym garniturem genetycznym.

4. Hipoteza i cel rozprawy

Na podstawie potrzeb i problemu badawczego zgłoszonego przez firmę VITAGENUM Sp. z o. o. oraz dokonanego przeglądu literaturowego sformułowano następujące hipotezy badawcze, które zweryfikowano w niniejszej rozprawie:

1. Laktoferyna może być stosowana jako funkcjonalny składnik w produkcji jogurtów naturalnych.
2. Fortyfikacja laktoferyną jogurtów naturalnych nie powoduje znaczącej modyfikacji parametrów fizyko-chemicznych, mikrobiologicznych i organoleptycznych produktu gotowego.
3. Jogurty fortyfikowane laktoferyną mogą być wykorzystane jako element dietoterapii osób o określonym profilu genetycznym, cierpiących na nadwagę lub otyłość.
4. Wykorzystanie jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w dietoterapii osób o określonym profilu genetycznym wpływa na poprawę parametrów masy ciała i gospodarki węglowodanowej organizmu.

W związku ze sformułowanymi hipotezami badawczymi, celem rozprawy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja technologii produkcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną, a następnie włączenie go do żywienia osób z nadwagą i otyłością o określonym obrazie funkcjonalnym organizmu na podstawie badań DNA oraz biochemicznych i antropometrycznych.

Cele szczegółowe badań obejmowały:

- analizę i ocenę aktualnej wiedzy w zakresie wykorzystania laktoferyny jako suplementu i składnika funkcjonalnego żywności, ze szczególnym uwzględnieniem chorób cywilizacyjnych takich, jak nadwaga i otyłość w ujęciu nutrigenomicznym;
- opracowanie i zoptymalizowanie technologii wytwarzania jogurtów fortyfikowanych laktoferyną w skali laboratoryjnej, nie powodującej znaczącej modyfikacji parametrów fizyko-chemicznych, mikrobiologicznych i organoleptycznych produktu gotowego;
- badania *in silico* oraz wybór miejsc markerowych w genomie człowieka predysponujących do nadwagi, otyłości i zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz

opracowanie testów molekularnych do oznaczania wybranych miejsc markerowych w genomie;

- badanie przesiewowe ukierunkowane na genotyp i parametry antropometryczne celem wyłonienia grupy badawczej;
- wytworzenie jogurtów fortyfikowanych laktoferyną w skali przemysłowej, celem przeprowadzenia badań żywieniowych;
- ocenę skuteczności działania opracowanej dietoterapii z wykorzystaniem innowacyjnego jogurtu wzbogacanego w laktoferynę w ramach przeprowadzenia wstępnych, pilotażowych badań populacyjnych obejmujących wybraną grupę testerów.

5. Struktura przeprowadzonych badań

5.1. Etapy weryfikacji hipotez badawczych

Weryfikacji hipotez badawczych dokonano poprzez wykonywanie odpowiednich doświadczeń, analiz i opracowań, zgodnie z założeniami przedstawionymi w Tabeli 1. Efekty dokonanej weryfikacji hipotez załączono w formie trzech publikacji, jak również nieopublikowanych wyników badań i opracowań własnych, które łącznie stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej.

Tabela 1. Etapy weryfikacji hipotez badawczych

Etap	Hipoteza	Założenia	Publikacja
I	1,3	Przygotowanie przeglądowej publikacji naukowej przedstawiającej aktualną wiedzę na temat laktoferyny, ze szczególnym uwzględnieniem jej aplikacji w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym oraz właściwości prozdrowotnych w kontekście chorób cywilizacyjnych, z odniesieniem do nutrigenomiki i nutrigenetyki.	
II	2	Badania dotyczące możliwości zastosowania laktoferyny jako funkcjonalnego dodatku do produkcji jogurtów naturalnych.	
III	4	Opracowanie planu żywieniowego wraz z zaleceniami.	Nieopublikowane opracowanie własne (RD).
IV	2	Ocena właściwości fizyko-chemicznych, mikrobiologicznych i organoleptycznych produktu gotowego – jogurtu fortyfikowanego laktoferyną, wytworzonego w warunkach przemysłowych, przeznaczonego do badań żywieniowych.	Nieopublikowane badania własne (RD).
V	3,4	Badania oceniające skuteczność dietoterapii otyłości z wykorzystaniem jogurtu fortyfikowanego laktoferyną u osób włączonych do badań.	
VI	4	Przeprowadzenie analizy korelacji uzyskanych wyników.	Nieopublikowane badania własne (RD).

Metody zastosowane w poszczególnych etapach badań wyszczególniono w Tabeli 2.

Tabela 2. Metody weryfikacji hipotez badawczych

Metody	Etap I	Etap II	Etap III	Etap IV	Etap V	Etap VI
Przegląd literatury	✓	✓			✓	
Podstawowy skład chemiczny		✓		✓		
Zawartość laktoferyny		✓		✓		
Kwasowość		✓		✓		
Jakość mikrobiologiczna		✓		✓		
Tekstura		✓		✓		
Aktywność wody, zdolność zatrzymywania wody i synergeza		✓		✓		
Barwa oceniana instrumentalnie		✓		✓		
Jakość organoleptyczna		✓		✓		
Opracowanie dietoterapii			✓			
Badania <i>in silico</i> i projektowanie starterów PCR					✓	
Genotypowanie					✓	
Dietoterapia					✓	
Pomiary antropometryczne					✓	
Pomiary biochemiczne krwi					✓	
Opracowanie statystyczne		✓		✓	✓	✓

6. Metody i materiały do badań

6.1. Materiały do badań

Materiał do badań w ramach niniejszej dysertacji stanowił **jogurt naturalny kontrolny oraz fortyfikowany certyfikowaną laktoferyną**, wytworzony w warunkach laboratoryjnych i na skalę przemysłową. **(PII, PIII oraz nieopublikowane badania własne – RD) – Etap II i IV**

W badaniach genetycznych wykorzystano komórki nabłonka policzka, a do badań biochemicznych krew żylną. **(PIII) – Etap V**

Jogurt

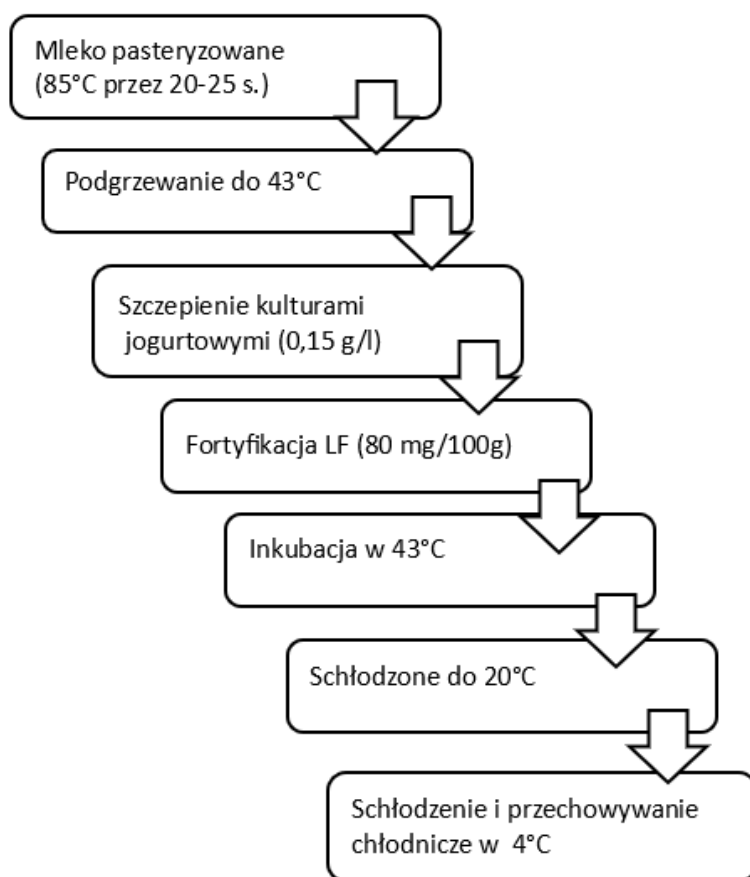
Produkcja jogurtu naturalnego fortyfikowanego LF w warunkach laboratoryjnych

Mleko do produkcji jogurtu metodą termostatową pozyskano z mleczarni zlokalizowanej na terenie województwa lubelskiego. Surowiec został znormalizowany na zawartość tłuszczu (3,2%) i spasteryzowany w temperaturze 85°C przez 20-25 s. Mleko było transportowane do laboratorium Katedry Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych w warunkach chłodniczych i użyte do produkcji jogurtów. Mleko było pobierane z mleczarni trzykrotnie.

W celu wytworzenia jogurtów mleko podgrzano do temperatury 43°C i zaszczerpiono termofilnymi kulturami jogurtowymi FD-DVS YC-X11 Yo-Flex (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) w ilości 0,15 g/l (Chr. Hansen, Dania) (Glibowski i Rybak, 2016). Do fortyfikacji jogurtów zastosowano certyfikowaną LF (Biolive Innovation, Polska) w ilości 80 mg/100 g (Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/1023). Jest to ilość jaką maksymalnie można zastosować w jogurtach zgodnie z obowiązującym prawem. Jogurt niefortyfikowany LF służył jako kontrolny. Po zaczepieniu i dodaniu LF mleko było inkubowane w 100 ml pojemnikach w temperaturze 43°C do uzyskania wartości pH = 4,6 (około 5 godzin), zgodnie z wytycznymi producenta. Następnie jogurt natychmiast chłodzono do temperatury około 20°C w celu przerwania inkubacji. Otrzymane jogurty były przechowywane do pierwszej analizy przez około 16 godzin w warunkach chłodniczych w temperaturze 4°C. Analizy były wykonywane co 7 dni (tj. w dniu 0, 7, 14, 21 oraz 28). W oczekiwaniu na kolejny etap badań próbki były przechowywane w temperaturze 4-6°C. Łączna ilość jogurtów objętych badaniami wynosiła 210 – trzy pobrania mleka, a z każdego

70 szt. przygotowanych jogurtów. Łącznie w warunkach laboratoryjnych wytworzono 105 naturalnych jogurtów kontrolnych i 105 jogurtów z dodatkiem LF. **(PII)**

Na Rysunku 1 przedstawiono schemat produkcji w warunkach laboratoryjnych jogurtu fortyfikowanego LF wraz z pramateriami procesu. Produkcja jogurtu kontrolnego przebiegała równoległe – z wyłączeniem etapu fortyfikacji.



Rysunek. 1. Schemat produkcji jogurtu z dodatkiem LF. **(PII)**

Na poniższym zdjęciu (Zdjęcie 1) przedstawiono jogurt kontrolny i doświadczalny wytworzony w warunkach laboratoryjnych.



Zdjęcie 1. Jogurt kontrolny (K₁) i fortyfikowany laktoferyną (D₁) wytworzony w warunkach laboratoryjnych (fot. A. Jańczuk) **(RD)**

Produkcja jogurtu naturalnego fortyfikowanego LF w warunkach przemysłowych

Mleko do produkcji jogurtu pochodziło z mleczarni zlokalizowanej na terenie województwa lubelskiego, w której odbywał się proces produkcji jogurtów w warunkach przemysłowych. Obróbka surowca była analogiczna, jak dla jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej. Łącznie przetworzono około 160 l mleka. Do inokulacji zastosowano te same kultury bakteryjne, które zostały wykorzystane w skali laboratoryjnej i w tej samej ilości. Proces produkcyjny przebiegał zgodnie z Rysunkiem 1, z uwzględnieniem mieszania po dodaniu laktoferyny. Jogurty bezpośrednio przekazywano pacjentom wytypowanym do badań. Każda osoba otrzymała 42 jogurty fortyfikowane laktoferyną i 14 jogurtów kontrolnych (bez dodatku laktoferyny) na cały okres trwania interwencji żywieniowej, zachowując łańcuch chłodniczy. Liczba pobranych próbek do analiz laboratoryjnych była analogiczna do ilości próbek pobranych dla jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej. **(PIII, RD)**

Komórki nabłonka policzka

Dawcy komórek proszeni byli o niespożywanie pokarmów stałych i płynów przez 1 do 2 godzin przed pobraniem materiału badawczego w postaci komórek nabłonka policzka. Pobranie polegało na 10-krotnym potarciu, ruchem rotacyjnym, wewnętrznej strony policzka za pomocą wiskozowej wymazówki. Pobrany na wymazówkę materiał umieszczano w próbówce. Z tak przygotowanych próbek dokonywano izolacji materiału generycznego. **(PIII)**

Krew

Krew do badań pobierana była w pozycji siedzącej, poprzez nakłucie żyły kończyny górnej przez uprawnioną osobę. Kolekcję krwi żyłnej, pełnej prowadzono w próbkach. W pierwszym etapie przygotowania próby z pobranej krwi pełnej żyłnej pozyskano surowicę. W tym celu pobraną krew pozostawiano w temperaturze otoczenia na około 40 minut celem wykrzepienia. Po tym czasie oddzielono skrzep od ścianek próbki. Surowicę przenoszono do eppendorfa i wirowano w wirówce MiniSpin (Eppendorf, Niemcy) przez 10 minut przy sile wirowania (RPM) 1300 x g w temperaturze 4°C. Dalsze postępowanie z przygotowaną surowicą prowadzone było zgodnie z procedurą wskazaną przez producenta testu ELISA Kit (FineTest, USA). **(PIII)**

6.2. Metody badawcze

Etap II i IV

Mleko

W mleku surowym przeznaczonym do produkcji jogurtów oznaczano **kwasowość**, w tym kwasowość czynną – wartość pH (pH-metrem Pioneer 65, Radiometer Analytical, Francja) i kwasowość potencjalną (°SH) metodą miareczkową (według PN-86/A-86122). W celu określenia **jakości higienicznej** określono liczbę komórek somatycznych aparatem Somacount 150 (Bentley Instruments, USA), jak również ogólną liczbę bakterii aparatem BactoScan FC (Foss, Dania). Analizowano także **podstawową wartość odżywczą**,

tj. zawartość tłuszczu, białka ogólnego i laktozy, aparatem Infrared Milk Analyzer (Bentley Instruments, USA), a w oparciu o wymienione parametry obliczono zawartość suchej masy. **Zawartość laktoferyny** oznaczano z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) chromatografem ProStar (Varian, USA). Próbkki zostały przygotowane zgodnie z metodyką opisaną przez Brodziak i in. (2012). **(RD)**

Jogurty

Analiza podstawowego składu chemicznego. Zawartość białka ogólnego określono metodą Kjeldahla według normy PN-EN ISO 8968-1:2014 z zastosowaniem mineralizatora Tecator Digeator Auto 20 (FOSS Analytics, Dania) oraz automatycznego analizatora KjelROC (OPIS LiquidLINE, Szwecja), **tłuszczu** – metodą wagową przy użyciu urządzenia ekstrakcyjnego Soxtec Avanti® (FOSS Analytics, Dania) oraz wagi analitycznej PS 750/X (Radwag, Polska), zaś **suchej masy** – metodą suszenia w temperaturze 102°C w suszarce laboratoryjnej (Memmert, Niemcy) według PN-A-86061:2006. Zawartość **węglowodanów** ogółem obliczono po określeniu zawartości podstawowych składników żywności, tj. wilgotności (na podstawie suchej masy), białka, tłuszczu i popiołu ogólnego (metoda wagowa po spopieleniu w temperaturze 550°C). Suma węglowodanów jest dopełnieniem sumy pozostałych składników chemicznych do 100%. Zawartość białka ogólnego, tłuszczu, węglowodanów i suchej masy oznaczono w g/100 g produktu, jednak dla ujednolicenia wyników w całości rozprawy wartości podano w %. **Wartość energetyczna** została określona metodą obliczeniową, z uwzględnieniem kalorii pochodzących z podstawowych składników. **(PII, RD)**

Oznaczenie zawartości LF przeprowadzono z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) przy użyciu chromatografu ProStar (Varian, USA), według Brodziak i in. (2012) z modyfikacją – zamiast 5 ml mleka użyto 5 ml jogurtu. **(PII, RD)**

Określenie kwasowości, w tym **kwasowości aktywnej (wartości pH)** – za pomocą pH-metru CP-401 (Elmetron, Polska) i **kwasowości potencjalnej** – metodą miareczkową, wyrażonej jako procentowa zawartość kwasu mlekowego. **(PII, RD)**

Jakość mikrobiologiczna, próbki przygotowano w dziesięciokrotnie rozcieńczonym roztworze Ringera. Postępowano według norm PN-EN ISO 7218:2008/A1:2013-10 i PN-EN ISO 6887-5:2020-10. Określono: **całkowitą liczbę mezofilnych bakterii tlenowych** – na podłożu agarowym przez 48 godzin w temperaturze 30°C według PN-ISO 7889:2007, **całkowitą liczbę grzybów** – na podłożu Sabourauda przez 5-7 dni w temperaturze 30°C według PN-ISO 6611, **całkowitą liczbę bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* sp.** – na podłożu MRS przez 3-5 dni w temperaturze 30°C według PN-ISO 20128:2012, **całkowitą liczbę bakterii z rodzaju *Clostridium* sp.** – na agarze z siarczkiem żelaza przez 48 godzin w temperaturze 37°C według PN-ISO 15213:2005, **całkowitą liczbę bakterii z grupy *Coli*** – na podłożu Endo przez 24 godzin w temperaturze 37°C według PN-ISO 4832:2007, **całkowitą liczbę bakterii z grupy *Coli* typu kałowego** – na podłożu mFC przez 18-24 godziny w temperaturze 44°C według PN-ISO 4832:2007, **obecność bakterii *Campylobacter*** – według PN-ISO 10272-2:2017 oraz **obecność bakterii *Salmonella*** – na podłożu SS przez 24 godziny w temperaturze 37°C według PN-EN ISO 6579-1:2017-04. Po inkubacji kolonie zliczono za pomocą automatycznego licznika Scan 300 (Interscience Laboratories, Francja) a liczbę poszczególnych typów morfologicznych liczono jako liczbę jednostek tworzących kolonie w 1 g jogurtu (jtk/g). **(PII, RD)**

Ocena tekstury obejmowała jędrność, zwięzłość i siłę spójności skrzepów jogurtowych. Parametry te określono w temperaturze 10°C za pomocą jednokolumnowej maszyny wytrzymałościowej BDO-FB0.5TS (Zwick GmbH and Co., Niemcy). Próbki były przygotowywane oddzielnie w specjalnie dobranych zlewkach szklanych (50 mm średnicy i 150 mm wysokości). Pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach po około 20 godzinach przechowywania w temperaturze 4-6°C. Próbkę umieszczono pod cylindrycznym tłokiem o średnicy 45 mm i wysokości 5 mm, którym ścisano skrzep do głębokości 25 mm z prędkością 1 mm/s. Na podstawie uzyskanych krzywych siła-czas wyznaczono wymienione parametry. Wyniki opracowano przy użyciu oprogramowania TestXpert®II (2011, Zwick GmbH and Co, Niemcy). **Pomiary reologiczne** – określenie **lepkości dynamicznej** (mPa·s) wykonano przy użyciu reometru HAAKE Viscotester iQ (Thermo Fisher Scientific, USA) wyposażonego w rotor cylindryczny. **(PII, RD)**

Aktywność wody mierzono urządzeniem HygroLab C1 (Rotronic, Szwajcaria). Pomiar przeprowadzono po 15 minutach od osiągnięcia przez jogurty temperatury pokojowej, używając trybu AWQ. **(PII, RD)**

Zdolność zatrzymywania wody (WHC) oznaczono metodą wirowania według Bong i Moraru (2014) przy użyciu 10 g jogurtu. Próbkę wirowano w wirówce laboratoryjnej (UNIVERSAL 320, Hettich, Niemcy) przez 10 min w 5°C przy sile wirowania (RPM) 1250 x g. Następnie ważono wytrąconą serwatkę (Radwag, Polska). **(PII, RD)**

Spontaniczna synereza serwatki powierzchniowej (SWS) została oznaczana zgodnie z Narayana i Gupta (2015) oraz Cais-Sokolińska i Walkowiak-Tomczak (2021). Plastikowy pojemnik zawierający 100 ml jogurtu przechowywano w temperaturze 4-6°C. Bezpośrednio po wyjęciu z lodówki pojemnik przechylano pod kątem 45° w celu zebrania serwatki powierzchniowej. SWS wyrażono bezpośrednio jako objętość serwatki spontanicznie wydzielonej ze 100 ml jogurtu. **(PII, RD)**

Instrumentalna ocena barwy, oparta na systemie CIELab, była dokonana za pomocą chromometru Minolta CR-310 (Minolta Camera Co. Ltd., Japonia), stosując D65 jako standardowego źródła światła. Pomiar wykonywano w pojemnikach, w których jogurt był przechowywany. Za pomocą głowicy pomiarowej (apertura 50 mm średnicy, geometria 0°) mierzono współczynnik odbicia przez powierzchnię skrzepu jogurtowego. Parametry ocenione w systemie CIELab obejmowały koordynaty: L* – jasność, a* – zaczerwienienie/zielenie i b* – żółcenie/niebieskość (CIE, 2004). **(PII, RD)**

Ocena organoleptyczna, obejmująca ocenę: barwy, konsystencji, smaku, zapachu i ogólnej akceptacji jogurtów, została przeprowadzona przez odpowiednio przeszkolony panel 10-cio osobowy (7 kobiet i 3 mężczyzn) według metody normy ISO 4121:2003. Próbkę w temperaturze pokojowej oceniono według skali 5-cio punktowej, zgodnie z kwestionariuszem. Ocena „1” oznaczała jakość dyskwalifikującą, zaś „5” jako całkowicie akceptowalną, charakterystyczną dla jogurtu (Baryłko-Pikielna i Matuszewska, 2014). **(PII, RD)**

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji – ANOVA (StatSoft Inc. Statistica wer. 13.1; Dell, USA). Istotność różnic między średnimi dla grup została określona przy zastosowaniu testu Kruskala-Wallisa przy poziomach istotności $p = 0,05$ i $0,01$. Wyniki zaprezentowano jako średnie \pm odchylenie standardowe (SD). **(PII, RD)**

Etap III

Plan żywieniowy został zaprojektowany w oparciu o wskaźniki antropometryczne uczestników badania. Zastosowanie jednolitych kryteriów włączających do badania, skutkujących podobnym zapotrzebowaniem energetycznym w grupie kobiet i w grupie mężczyzn, pozwoliło na agregację założeń dietetycznych i ograniczenia liczby planów dietetycznych do jednego dla kobiet i jednego dla mężczyzn.

Plan żywieniowy dla kobiet i mężczyzn składał się z 7 dni, a każdy dzień zawierał 4 posiłki: śniadanie, II śniadanie, obiad i kolacja. Plan żywieniowy został ułożony przy wykorzystaniu oprogramowania Kcalmar.pro. Do obliczenia **podstawowej przemiany materii (PPM)** wykorzystano wzór Mifflina, a **całkowitą przemianę materii (CPM)** obliczono przez pomnożenie otrzymanej wartości przez **wskaźnik aktywności fizycznej (PAL)** równy 1,2 dla wszystkich uczestników badania. Dzieląc CPM przez 24 godzin, obliczono zapotrzebowanie na białko w gramach mnożąc należną masę ciała (**NMC**), obliczoną ze wzoru Lorentza, przez 1,1. Dzieląc zapotrzebowanie na białko przez 100, obliczono zapotrzebowanie na białko w g/osoba/dobę, a zapotrzebowanie na tłuszcz w gramach obliczono dzieląc 25% wartości całkowitej przemiany materii przez 9. Przyjęto zapotrzebowanie na błonnik w ilości 40 g/osoba/dobę, a zapotrzebowanie na węglowodany przyswajalne obliczono odejmując od wartości całkowitej przemiany materii dobową wartość energetyczną białka, tłuszczu oraz błonnika i podzieleniu otrzymanej wartości przez 4. W planie żywieniowym uwzględniono dwie porcje jogurtu o masie 125 g, fortyfikowanego LF w ilości 80 mg LF/100 g produktu. **(RD)**

Etap V

Grupa badawcza składała się z uczestników płci męskiej i żeńskiej pochodzących z różnych regionów Polski. Przesiewowe genotypowanie przeprowadzono u 135 osób, w tym 37 mężczyzn i 98 kobiet. Do kolejnych etapów badania zakwalifikowano wyłącznie osoby posiadające allel ryzyka (homozygota lub heterozygota) w co najmniej 3 z 4 oznaczanych polimorfizmach pojedynczego nukleotydu z preferencją osób z największą liczbą homozygotycznych alleli ryzyka. Jako kryterium włączenia uczestnika do dalszych badań stosowano następujące homozygotyczne i heterozygotyczne allele ryzyka dla poszczególnych polimorfizmów SNP: rs9939609 – wariant AA i AT, rs7903146 – wariant TT i CT, rs10830963 – wariant CC i CG oraz rs1121980 – wariant AA i AG. Dodatkowym warunkiem było posiadanie wskaźnika masy ciała – BMI > 25 kg/m² lub stosunku masy ciała do wzrostu – WHtR ≥ 49 oraz wyrażenie zgody na udział w badaniu. Badanie otrzymało pozytywną opinię komisji bioetycznej i zostało przeprowadzone zgodnie z zatwierdzeniem badań numer KE-0254/276/2017. **(PIII)**

Interwencja dietetyczna trwała 28 dni i została zaprojektowana w układzie badań naprzemiennych (AB:BA). Udział w badaniu wzięło 19 wytypowanych osób, w tym 8 mężczyzn i 11 kobiet. Grupa kontrolna (A) przez 7 dni stosowała interwencję placebo – jogurt bez LF, a grupa badana (B) przez 21 dni otrzymywała jogurt z LF. Po 7 dniach w grupie A zastosowano interwencję z jogurtem z LF przez 21 dni, zaś w grupie B po 21 dniach włączono interwencję placebo przez 7 dni. Nie zastosowano okresu przejściowego między zamianą grup. W grupie B dziennie podawano łącznie 250 g jogurtu w dwóch porcjach po 125 g, zawierającego 80 mg LF/100 g jogurtu (Biolive Innovation, Polska), wyprodukowanego przez mleczarnię na potrzeby realizacji doświadczenia. Grupa kontrolna A otrzymywała taką samą ilość jogurtu naturalnego bez dodatku LF przez 7 dni. **(PIII)**

Genotypowanie. Badany materiał (komórki nabłonka policzka) został pobrany od pacjentów z wewnętrznej części policzka przy użyciu wymazówek. DNA wyizolowano przy wykorzystaniu zestawu Gene MATRIX Swab-Extract DNA purification Kit (EurX, Polska), zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta. Czystość i stężenie pozyskanego DNA oceniono przy wykorzystaniu spektrofotometru DS-11 (DeNovix, USA), stosując pomiar

absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Elektroforezę w żelu agarowym (1%) wykorzystano do oceny jakości wyizolowanego DNA. Wizualizacji produktu dokonywano przy użyciu barwnika SimplySafe (EurX, Polska) w świetle UV. Pozostałą część wyizolowanego DNA odpowiednio opisano i przechowywano w temperaturze 20°C na poczet dalszych badań. Reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) przeprowadzono przy użyciu termocyklera Biorad T-100 (BioRad, USA). Do zaprojektowania odcinków starterowych do reakcji PCR wykorzystano oprogramowanie Primer 3 wersja 4.1.0. Amplifikację przeprowadzono w 45 cyklach. Elektroforezę przeprowadzono w żelu agarowym (1,5%) oraz dokonano wizualizacji produktu w świetle UV, barwiąc barwnikiem SimplySafe (EurX, Polska) w celu potwierdzenia amplifikacji szukanego produktu. Sekwencjonowanie amplikonów wykonano przy zastosowaniu technologii Sangera, używając sekwenatora kapilarnego 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) i stosując odczynniki BigDye Termiantor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). **(PIII)**

Pomiary antropometryczne wykonane zostały za pomocą taśmy antropometrycznej Gulick w pozycji stojącej z dokładnością do 0,1 cm. Taśma podczas pomiarów była utrzymywana równoległe do podłogi. Mierzone osoby zostały poinformowane, że podczas pomiarów powinny przyjąć postawę z stopami rozstawionymi na szerokość klatki piersiowej. **Pomiary odvodu talii** przeprowadzono w połowie odległości między dolnym brzegiem łuku żebrowego, a górnym grzebieniem kości biodrowej podczas standardowego wydechu. **Obwód bioder** zmierzono w najszerszym punkcie, a obwód uda (najszerszy obwód) poniżej fałdu pośladkowego, podczas utrzymywania zrównoważonej postawy. Pomiary wykonano w podwójnym powtórzeniu. Jeżeli różnice pomiędzy pomiarami przekraczały 0,7 cm, przeprowadzano kolejny, trzeci pomiar. Wynik pomiarów uśredniano. **Wysokość ciała** zanotowano w pozycji stojącej, bez butów, z ciałem w pełni wyprostowanym i złączonymi stopami. Pomiar obejmował odległość od podstawy stadiometru ADE MZ10038 (ADE, Niemcy) do najwyższego punktu anatomicznego na głowie, nazywanego *vertex*, przy czym kontrolowano, by kanał słuchowy był w jednej linii z kością policzkową. **Pomiar masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej** wykonano za pomocą analizatora składu ciała Tanita MC 780 MA (Tanita, Polska). Pomiar masy ciała prowadzono w lekkim ubraniu, bez obuwia, z równomiernie rozłożonym ciężarem na obie nogi. **Wskaźnik masy ciała (BMI)** obliczano jako stosunek masy ciała w kilogramach do kwadratu wysokości w metrach (kg/m^2). Przyjęto następujące kryteria interpretacyjne: 18,50-24,99 – masa ciała prawidłowa, 25,00-29,99 –

nadwaga, 30,00-34,99 – otyłość I stopnia oraz 35,00-39,99 – otyłości II stopnia. **Stosunek obwodu talii do wysokości (WHtR)** obliczano jako stosunek obwodu talii do wysokości (oba pomiary w cm) pomnożony przez 100. Przyjęto następujące kryteria interpretacyjne: do 35,00 – niedożywienie, 35,01-42,00 – niedowaga, 42,01-46,00 – lekka niedowaga, 46,01-54,00 – nadwaga, 54,01-58,00 – poważna nadwaga, a powyżej 58,00 – otyłość. **(PIII)**

Wskaźnik tłuszczowej masy ciała (**FMI**) obliczono dzieląc masę tkanki tłuszczowej przez wzrost do kwadratu. **(PIII, RD)**

Pomiar poziomu hemoglobiny glikowanej (Hb1AC) został wykonany metodą Sandwich ELISA. Do przeprowadzenia analizy użyto zestawu Human HbA1c (ang. glycosylated hemoglobin A1c) ELISA Kit (FineTest, USA) zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta. **(PIII)**

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA wersja 13.1 (StatSoft, Niemcy). Rozkład normalny wyników sprawdzono z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów nieparametrycznych takich, jak test chi-kwadrat, testy analizy regresji Wilcoxona i Kruskala-Wallisa. Za wyniki statystycznie istotne uznano te, dla których przedział ufności wynosił 95,0% przy $p \leq 0,05$. **(PIII)**

Etap VI

Analiza statystyczna obejmowała rutynowe techniki statystyczne jak obliczenie średniej, odchylenia standardowego oraz analizę korelacji rang Spearmana (RS), którą obliczono wykorzystując programu STATISTICA wersja 13.1 (StatSoft, Niemcy). W ocenie istotności otrzymanych wyników posłużono się poziomem istotności, którego wartość dla istotnych statystycznie rezultatów przyjęto na poziomie $p \leq 0,05$. **(RD)**

7. Wyniki i dyskusja

7.1. Badania dotyczące zastosowania laktoferyny jako funkcjonalnego dodatku w produkcji jogurtów naturalnych (PII, badania własne) – Etap II i IV

7.1.1. Jakość laktoferyny zastosowanej w celu fortyfikacji jogurtów

Laktoferyna wykorzystana do badań posiadała certyfikat potwierdzający jakość fizykochemiczną i mikrobiologiczną (Tabela 3), dostarczony przez producenta (Biolive Innovation, Polska). Przedstawione poniżej wyniki nie zostały wcześniej opublikowane w żadnej z prac stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej.

Tabela 3. Charakterystyka laktoferyny dodawanej do jogurtów

Charakterystyka	Metoda analizy	Jednostka	Specyfikacja	Wynik
Wilgotność	PN-ISO 5550:2010	%	0,00 – 4,50	3,10
Białko – metoda Kjeldahla (N*6,38)	PN-EN ISO 8968-1:2014	%	93,0 – 100,0	97,00
Popiół – metoda spopielenia (550°C)	ISO 6810:1995	%	0,00 – 1,00	0,31
pH – roztwór 2% (w/v)	PN-ISO 5546:2012	-	5,50 – 6,50	6,10
Liczba bakterii mezofilnych tlenowych (jtk/g)	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	jtk/g	0 – 1000	<10
Salmonella (50 g)	PN-EN ISO 6579-1:2017-04/A1:2020-09	jtk/g	0	0
Gronkowce koagulazo-dodatnie (1 g)	PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004	jtk/g	0	0
Drożdże i pleśnie	ISO 6611:2007	jtk/g	0 – 10	<5

w/v – stężenie procentowe masowo-procentowe.

Uzyskane przez producenta wyniki zostały zawarte w specyfikacji. Czystość wykorzystanej LF wynosiła 97,00%, wilgotność 3,10%, zaś ilość popiołu była na poziomie 0,31%. Użyta LF była czysta mikrobiologicznie.

7.1.2. Jakość jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych (PII) – Etap II

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano opracowania i zoptymalizowania technologii produkcji wybranych produktów mlecznych – jogurtów naturalnych wzbogacanych w LF w warunkach laboratoryjnych. Przeprowadzono również ocenę jakości fizyko-chemicznej, mikrobiologicznej i organoleptycznej uzyskanych jogurtów kontrolnych (bez dodatku LF) i doświadczalnych (z dodatkiem LF).

Podstawowa wartość odżywcza

Coraz więcej konsumentów przed podjęciem decyzji o zakupie artykułu spożywczego zwraca uwagę na wartość odżywczą produktów, w związku z czym ważnym elementem badań była analiza podstawowego składu chemicznego wytworzonych jogurtów. Dodatek LF w ilości 80 mg/100 g jogurtu wpłynął istotnie ($p \leq 0,05$) na zawartość suchej masy, w tym białka ogólnego, czego nie potwierdzono dla wartości energetycznej jogurtów oraz zawartości tłuszczu, w porównaniu do jogurtów naturalnych bez dodatku LF. Świeże jogurty z LF zawierały 3,25% tłuszczu, 3,33% białka ogólnego i 12,36% suchej masy (Tabela 4). Uzyskane wartości są porównywalne do wartości otrzymanych w jogurtach bez dodatku LF. Przechowywanie jogurtów w warunkach chłodniczych przez okres 28 dni nie wpłynęło istotnie ($p > 0,05$) na zawartość tłuszczu. Zaobserwowano jednak statystycznie istotne różnice w przypadku białka ogólnego ($p \leq 0,05$) i suchej masy ($p \leq 0,01$) w zależności od dnia przechowywania jogurtów. Zawartość wszystkich składników odżywczych ulegała obniżaniu wraz z czasem przechowywania. Prawdopodobnie zmiany te zachodziły ze względu na aktywność zastosowanych kultur starterowych i procesy enzymatyczne (Tavakoli i in., 2019). Badania własne stanowią potwierdzenie wyników uzyskanych przez Akal i in. (2022). Stwierdzili, że dodatek LF i lizozymu do jogurtów wytworzonych na bazie mleka oślego spowodował spadek zawartości suchej masy oraz tłuszczu podczas 30 dniowego okresu przechowywania kontrolnego jogurtu naturalnego i trzech jogurtów eksperymentalnych (jogurty z dodatkiem LF, lizozymu i natamycyny), przy czym różnice nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). W jogurcie z dodatkiem LF zawartość białka ogólnego wzrosła w trakcie przechowywania produktu (z 4,05 do 4,36%, przy $p > 0,05$). Warto jednak dodać, że dla jogurtu kontrolnego, jogurtu z dodatkiem lizozymu i jogurtu z dodatkiem natamycyny kierunek zmian zanotowany przez autorów był jak w badaniach własnych, czyli ilość białka

zmaląa w czasie przechowywania (odpowiednio o: 0,58%, 0,15% i 0,25%). Autorzy nie wyjaśnili jednak przyczyny tych zmian. W badaniach Brodziak i in. (2020), dotyczących zastosowania dodatku koncentratu białek serwatkowych do jogurtu, stwierdzono porównywalną ilość białka i tłuszczu w początkowym (dzień 0) i końcowym (28 dzień) okresie przechowywania chłodniczego jogurtów. Zmniejszeniu uległa jednak zawartość suchej masy beztłuszczowej i suchej masy ogółem.

Tabela 4. Podstawowy skład chemiczny i wartość energetyczna jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Wartość energetyczna (kcal/100 g)	Białko ogólne (%)	Tłuszcz (%)	Sucha masa (%)
Jogurt kontrolny	0	3	63 \pm 3	3,14 ^{bx} \pm 0,05	3,26 \pm 0,06	12,27 ^{Bx} \pm 0,26
	7	3	63 \pm 4	3,12 ^{bx} \pm 0,08	3,22 \pm 0,08	12,18 ^{Bx} \pm 0,20
	14	3	62 \pm 3	3,07 ^{abx} \pm 0,11	3,16 \pm 0,12	11,99 ^{Bx} \pm 0,31
	21	3	63 \pm 4	2,98 ^{ax} \pm 0,09	3,12 \pm 0,10	11,34 ^{Ax} \pm 0,25
	28	3	62 \pm 5	2,88 ^{ax} \pm 0,12	3,10 \pm 0,15	10,95 ^{Ax} \pm 0,43
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	64 \pm 2	3,33 ^{by} \pm 0,04	3,25 \pm 0,07	12,36 ^{Cy} \pm 0,30
	7	3	64 \pm 3	3,22 ^{by} \pm 0,07	3,23 \pm 0,11	12,29 ^{BCy} \pm 0,37
	14	3	64 \pm 4	3,16 ^{by} \pm 0,13	3,18 \pm 0,14	12,12 ^{By} \pm 0,40
	21	3	63 \pm 4	3,08 ^{ay} \pm 0,11	3,15 \pm 0,12	11,49 ^{Ay} \pm 0,33
	28	3	63 \pm 6	3,00 ^{ay} \pm 0,10	3,11 \pm 0,16	11,10 ^{Ay} \pm 0,52

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

a, b, A, B, C – różnice dla poszczególnych składników w obrębie rodzaju jogurtu, a, b – istotne przy $p \leq 0,05$, A, B, C – istotne przy $p \leq 0,01$.

x, y – różnice dla poszczególnych składników pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,05$.

Wartość energetyczna jogurtów (jogurt kontrolny i jogurt fortyfikowany LF) była bardzo zbliżona, zarówno w obrębie rodzaju jogurtu, jak i okresu przechowywania, wynosząc 62-64 kcal dla 100 g produktu. Wartość ta jest porównywalna z wartością energetyczną większości jogurtów naturalnych dostępnych w komercyjnej sprzedaży.

Zawartość laktoferyny

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) 2018/1023 (2018), jogurt został fortyfikowany 80 mg LF/100 g. W Tabeli 5 zaprezentowano zawartość LF w jogurcie kontrolnym i eksperymentalnym podczas 28-dniowego okresu przechowywania. W świeżym jogurcie kontrolnym ilość tego białka serwatkowego była na poziomie 47,69 mg/100 g, natomiast w fortyfikowanym – 131,15 mg/100 g. Naturalnie LF występuje w surowym krowim mleku w ilości 0,1-0,3 mg/ml, jednakże, podczas procesów technologicznych, w wyniku zastosowanej obróbki termicznej, jej ilość zmniejsza się.

Tabela 5. Zawartość laktoferyny w jogurtach wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Liczba próbek *	Dzień przechowywania	Laktoferyna (mg/100 g)
Jogurt kontrolny	3	0	47,69 ^{bX} \pm 2,95
	3	7	47,12 ^{bX} \pm 2,51
	3	14	45,24 ^{abX} \pm 4,25
	3	21	44,01 ^{abX} \pm 4,90
	3	28	41,17 ^{aX} \pm 4,86
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	3	0	131,15 ^{bY} \pm 9,17
	3	7	130,37 ^{bY} \pm 12,01
	3	14	129,20 ^{bY} \pm 11,38
	3	21	126,64 ^{abY} \pm 14,10
	3	28	123,55 ^{aY} \pm 14,84

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

^{a, b} – różnice dla zawartości laktoferyny w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.
^{X, Y} – różnice dla zawartości laktoferyny pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,01$.

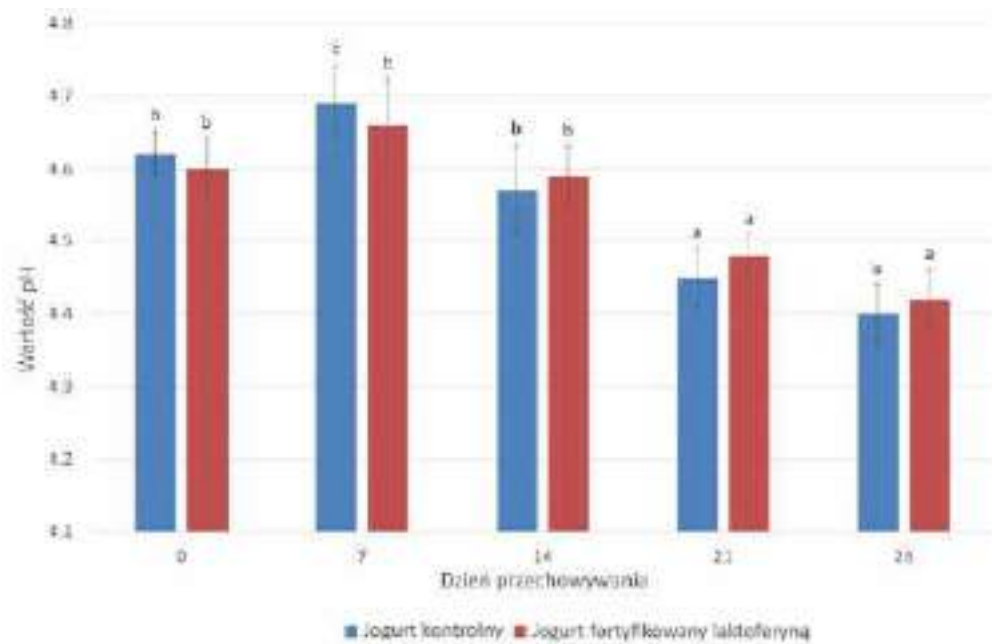
W badaniach Brodziak i in. (2014) zauważono, że rodzaj wykorzystywanej obróbki termicznej wpływa na denaturację białek w mleku spożywczym. Claeys i in. (2014) stwierdzili, że całkowita inaktywacja LF zachodzi podczas ogrzewania przez 30 min w temperaturze 85°C. Z kolei, Darmawan i in. (2020) podali, że zmiany strukturalne apo-laktoferyny oraz interakcje z β -laktoglobuliną i α -laktoalbuminą również zachodzą podczas wysokich temperatur. W innych badaniach Conesa i in. (2008) wskazano, że stabilność LF wzrasta, gdy jest ona nasycona żelazem. Liu i in. (2020) potwierdzili, że obecność żelaza zwiększa stabilność LF w wysokich temperaturach. Z kolei, według Matijašić i in. (2020) LF wykazuje stabilność w pH od 4 do 11, niezależnie od stopnia nasycenia żelazem.

Wykazano wpływ okresu przechowywania na zawartość tego białka. Niezależnie od rodzaju jogurtu, w czasie 28-dniowego przechowywania chłodniczego zawartość LF zmniejszyła się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) średnio o 14% (Tabela 5). Stanowi to potwierdzenie badań Brodziak i in. (2017), analizujących zmiany zawartości związków bioaktywnych, w tym poszczególnych białek serwatkowych, w mleku spożywczym.

Kwasowość (wartość pH i zawartość kwasu mlekowego)

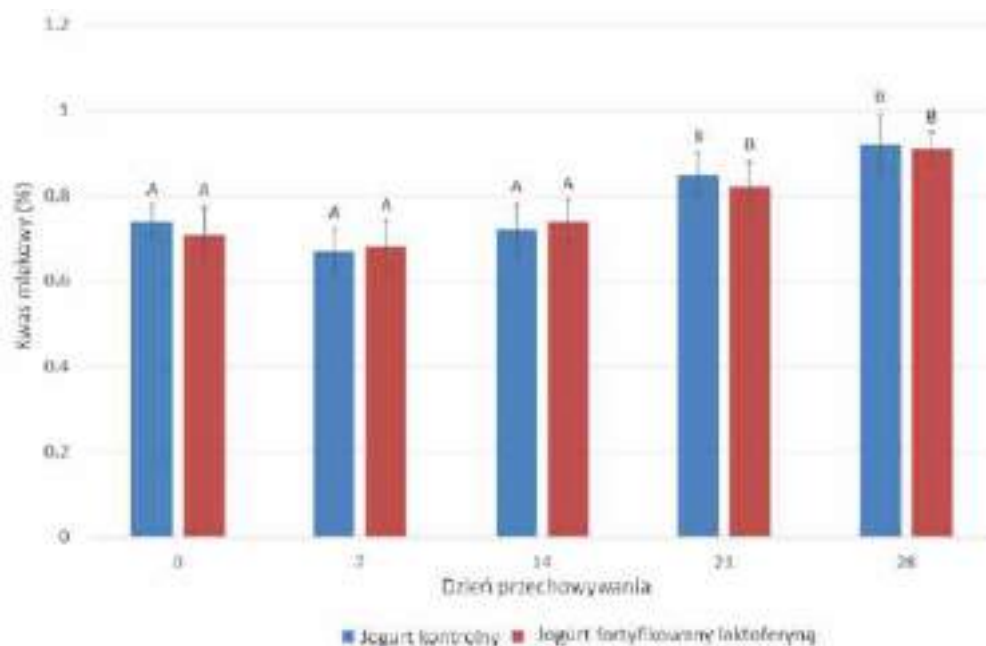
Inkubacja została zatrzymana, gdy jogurty osiągnęły wartość pH około 4,60. Wykresy 1 i 2 prezentują zmiany wartości pH oraz procentowej zawartości kwasu mlekowego w trakcie 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego. Punkt „0” na osi x na Wykresie 1 prezentuje wartości, które zostały odnotowane w pierwszym dniu przechowywania w temperaturze 4°C. W ostatnim dniu przechowywania, tj. 28-go dnia, odnotowano wartość pH równą 4,40 w jogurcie kontrolnym i 4,41 w jogurcie fortyfikowanym omawianym białkiem. Podczas okresu przechowywania wartości pH jogurtów oscylowały w akceptowalnym zakresie. Zgodnie z przypuszczeniami, wartości pH obniżały się wraz z czasem przechowywania, a spadek ten (średnio o 0,20) był statystycznie istotny ($p \leq 0,05$). Zmiany wartości pH związane są z rodzajem zastosowanej kultury bakteryjnej oraz z temperaturą przechowywania. W temperaturze wyższej niż 4°C wzrasta ilość bakterii fermentujących, co przyczynia się do obniżenia kwasowości czynnej – wartości pH (De Brabandere i De Baerdemaeker, 1999). Według Franco i in. (2010), zmiany wartości pH jogurtów fortyfikowanych były związane z zastosowanym dodatkiem LF. W badaniach tych autorów, wyższa koncentracja LF wpływała na wyższe wartości pH jogurtów fortyfikowanych w porównaniu do jogurtów kontrolnych.

Oceniając zawartość kwasu mlekowego, w obu badanych rodzajach jogurtu uzyskano wzrost na poziomie średnio 0,20 p.p. w czasie przechowywania chłodniczego – Wykres 2. Oba rodzaje jogurtu w ostatnim dniu przechowywania zawierały niewiele ponad 0,91% kwasu mlekowego. Wpływ okresu przechowywania został potwierdzony statystycznie ($p \leq 0,01$), czego nie uzyskano dla dodatku laktoferyny ($p > 0,05$). Amadarshane i in. (2022) uzyskali spadek wartości pH z 4,92 do 3,58 i dwukrotny wzrost zawartości kwasu mlekowego (do 1,24%) w czasie 21-dniowego okresu przechowywania naturalnych jogurtów kontrolnych wytworzonych na bazie tych samych szczepów, co w badaniach własnych. Jest to wynikiem fermentacji laktozy przez bakterie kwasu mlekowego zastosowane w produkcji jogurtu, które wytwarzają właśnie kwas mlekowy. Wysoka aktywność metaboliczna bakterii zastosowanych do produkcji jogurtów zmniejsza się zaraz po inkubacji w wyniku chłodzenia jogurtów, lecz aktywność enzymatyczna bakterii dalej trwa w okresie przechowywania (Tamime i Deeth, 1980). Arslaner i in. (2021) uzyskali mniejsze różnice i wskazali na obniżenie wartości pH jogurtów kontrolnych o 0,15 (z 4,31 do 4,16, $p \leq 0,01$) a wzrost zawartości kwasu mlekowego o 0,08% (z 1,00 do 1,08%, $p \leq 0,01$) w okresie trzech tygodni. Stosując dodatek WPC do jogurtów, Brodziak i in. (2020) wskazali na wzrost kwasowości czynnej (obniżenie wartości pH) przy jednoczesnym wzroście zawartości kwasu mlekowego w jogurtach z dodatkiem, w stosunku do produktów kontrolnych. Wyniki z miesięcznego okresu przechowywania zostały potwierdzone statystycznie. Dodatek białek serwatkowych przyczynia się do zwiększenia właściwości buforujących mleka, co wpływa na kwasowość potencjalną – zawartość kwasu mlekowego. Te same tendencje uzyskali Karam-Allah i in. (2022) w okresie 10-dniowego przechowywania jogurtów z dodatkiem bawolej i krowiej siary i laktoferyny, jak również Akal i in. (2022) w jogurtach na bazie mleka oślego z dodatkiem lizozymu, laktoferyny i natamycyny. Jak wykazali Karam-Allah i in. (2022), dodatek siary do jogurtów wpływał na obniżenie kwasowości miareczkowej bezpośrednio po wytworzeniu, ale również podczas przechowywania. Prawdopodobnie było to wynikiem obecności w siarze składników bioaktywnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, w tym samej laktoferyny, zmniejszając szanse fermentacji. Zakaria i in. (2020) zanotowali, że obniżenie kwasowości czynnej (wartości pH) i wzrost kwasowości miareczkowej w mniejszym stopniu następowały w jogurtach z udziałem białka serwatkowego niż w kontrolnych w okresie 7-dniowego przechowywania, co dla wartości pH potwierdzili również Karam-Allah i in. (2022). Może to wynikać z częściowej inhibicji kwasu mlekowego przez laktoferynę. W badaniach własnych te różnice były porównywalne z jogurtem kontrolnym.



a, b, c – różnice dla wartości pH w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

Wykres 1. Zmiany wartości pH ocenianych jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia, SD)



A, B – różnice dla wartości pH w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,01$.

Wykres 2. Zmiany zawartości kwasu mlekowego (%) w ocenianych jogurtach wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia, SD)

Ocena mikrobiologiczna

Bezpieczeństwo zdrowotne produktów spożywczych to jeden z najważniejszych aspektów. Badania mikrobiologiczne pozwalają określić higienę procesu produkcji, jakość zastosowanych dodatków czy wytworzonego produktu. Wyniki z przeprowadzonej oceny jakości mikrobiologicznej zostały zamieszczone w Tabeli 6. Ocena całkowitej liczby bakterii wskazała ich nieobecność, zarówno w jogurtach fortyfikowanych LF, jak i jogurtach kontrolnych w pierwszym tygodniu przechowywania. Zanotowano jednak istotne zmiany ($p \leq 0,01$) w jogurcie kontrolnym od 14-go dnia przechowywania, które utrzymywały się na tym samym poziomie do ostatniego dnia badań. W obu rodzajach jogurtów, przez cały okres przechowywania chłodniczego, nie zostały wykryte bakterie *Coli* typu kałowego (mFC), *Coli* (Endo), *Clostridium* sp., pałeczki *Campylobacter* i *Salmonella*. Ponadto, nie zaobserwowano również wzrostu grzybów w jogurcie kontrolnym i fortyfikowanym przez cały okres przechowywania. Jogurty stanowią źródło bakterii kwasu mlekowego. W wytworzonych jogurtach ogólna ich liczba wynosiła $6,9-7,1 \times 10^7$ jtk/ml w początkowym dniu badań. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w liczbie tych bakterii wraz z upływem czasu przechowywania. Warto podkreślić, że jogurty spełniały wymagania Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 (2005) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Jednym z czynników decydujących o walorach terapeutycznych, profilaktycznych i dietetycznych jogurtów jest obecność w nich żywych kultur bakterii starterowych (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) przez cały okres ich deklarowanej przydatności do spożycia (Kycia i Krysiński, 2014). Zgodnie z FAO/WHO *Codex Alimentarius* (2003), liczba charakterystycznej mikroflory jogurtu musi wynosić nie mniej niż 10^7 jtk w 1 g w ciągu całego okresu przydatności do spożycia produktu. Zgodnie z polską normą żywe kultury bakterii powinny stanowić co najmniej 10^6 jtk w 1 g (PN-A-86061:2006).

Tabela 6. Jakość mikrobiologiczna analizowanych jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (jtk/g, średnia)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Całkowita liczba bakterii	Całkowita liczba grzybów	Całkowita liczba bakterii kwasu mlekowego	Całkowita liczba bakterii z rodzaju <i>Clostridium</i> sp.	Całkowita liczba bakterii <i>Coli</i> (Endo)	Całkowita liczba bakterii <i>Coli</i> typu kałowego (mFC)	Obecność pałeczek <i>Salmonella</i>	Obecność pałeczek <i>Campylobacter</i>
Jogurt kontrolny	0	3	0	0	$6,9 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	7	3	0	0	$7,6 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	14	3	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$6,4 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	21	3	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$5,9 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	28	3	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$5,2 \times 10^7$	0	0	0	0	0
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	0	0	$7,1 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	7	3	0	0	$7,4 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	14	3	0 ^X	0	$6,5 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	21	3	0 ^X	0	$5,8 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	28	3	0 ^X	0	$5,0 \times 10^7$	0	0	0	0	0

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

“0” – oznacza “nie wykryto”.

^{X, Y} – różnice dla całkowitej liczby bakterii pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,01$.

Franco i in. (2010) odnotowali, że liczba bakterii kwasu mlekowego przez cały okres przechowywania chłodniczego trwający 28 dni była taka sama, niezależnie od wykorzystanej formy LF. Średnia liczba *Streptococcus thermophilus* wynosiła 8,87 log jtk/ml, natomiast dla *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* – 6,37 log jtk/ml. Podobne badania realizowali także Kim i in. (2004), stwierdzając, że zastosowana forma LF wpływała na wzrost liczby bakterii kwasu mlekowego. Holo-laktoferyna wspomagała bowiem wzrost *Lactobacillus acidophilus*. W badaniach własnych nie określano jednak form zastosowanej laktoferyny, również z uwagi na brak jej dostępności na rynku. Oceniając jakość mikrobiologiczną jogurtów na bazie mleka oślego, Akal i in. (2022) uwzględnili całkowitą liczbę drożdży i pleśni (brak obecności w świeżych jogurtach) oraz tlenowych bakterii mezofilnych (niższa liczba w przypadku jogurtów fortyfikowanych LF – 1,07 log jtk/g niż w jogurtach kontrolnych – 2,54 log jtk/g). W trakcie przechowywania chłodniczego nastąpił wzrost liczby mezofilnych bakterii tlenowych, zarówno w jogurtach kontrolnych, jak i doświadczalnym z LF. Odnotowano również rozwój drożdży i pleśni w jogurtach kontrolnych. Natomiast dla jogurtów fortyfikowanych LF i lizozymem wartości pozostały bez zmian. Działanie przeciwdrobnoustrojowe, w tym przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, LF jest związane z jej zdolnością do wiązania żelaza (Steijns i Van Hooijdonk, 2000). Warto wspomnieć, że w tych badaniach (Akal i in., 2022) lizozym okazał się ogólnie skuteczniejszy w swoim działaniu przeciwdrobnoustrojowym niż LF. W badaniu własnym jogurty fortyfikowane LF charakteryzowały się większą stabilnością mikrobiologiczną niż jogurty kontrolne. Ważna jest jednak kontrola czystości mikrobiologicznej LF stosowanej do fortyfikacji.

Tekstura

Tekstura stanowi bardzo istotny wyznacznik jakości i akceptowalności jogurtów. Końcowa struktura fermentowanych produktów mlecznych wynika z układu strukturalnego, w tym sieci mikrostrukturalnej, białek (Mudgil i in., 2018). W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej w ocenie tekstury wytworzonych jogurtów uwzględniono: jędrność (określaną również jako twardość), zwięzłość, spoistość i lepkość dynamiczną. Do produkcji jogurtów użyto szczepów bakterii *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, które są zdolne do syntezy egzopolisacharydów (EPS), wydzielanych z komórki w postaci śluzu lub związanych z powierzchnią komórki (Nguyen i in., 2020; Sørensen i in., 2022). Badania potwierdzają, że wykorzystanie do produkcji jogurtów szczepów zdolnych do

syntezy EPS poprawia ich właściwości reologiczne, lepkość i zwięzłość, w porównaniu do zastosowania szczepów niezdolnych do syntezy tych polimerów (Hassan i in., 2003).

W przemyśle spożywczych stosuje się dodatek białek w postaci białek serwatkowych lub proszku w celu poprawy lub modyfikacji konsystencji produktu. Białka wpływają na poprawę lepkości, działają jako stabilizatory, wiążą wodę oraz redukują synerżę w trakcie przechowywania chłodniczego. W badaniach własnych zastosowano dodatek LF w ilości 80 mg/100 g jogurtu ze względu na wysoki koszt, ale również ograniczenia prawne (Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/1023). Ze względu na niewielką ilość wykorzystanej LF, nie odnotowano znaczących różnic w parametrach tekstury, w porównania do jogurtów kontrolnych (Tabela 7). Oceniane parametry tekstury świeżych jogurtów naturalnych z dodatkiem laktoferyny kształtowały się następująco: jędrność – 3,35 N, zwięzłość – 2,01 mJ, siła spójności – 1,20 N i lepkość dynamiczna – 850 mPa·s. Wartości dla jogurtów kontrolnych były zbliżone – $p > 0,05$.

Okres przechowywania jogurtów w warunkach chłodniczych spowodował wzrost jędrności ($p \leq 0,01$), zwięzłości ($p \leq 0,01$) oraz lepkości dynamicznej ($p \leq 0,01$), natomiast statystycznie nieistotnie zmniejszyła się siła spójności, zarówno w jogurtach kontrolnych, jak i z zastosowaniem LF jako dodatku. W literaturze naukowej doniesienia dotyczące zmian w parametrach tekstury są zróżnicowane. Domagała i in. (2013) oraz Moschopoulou i in. (2018) zaobserwowali podobne tendencje, jak w badaniach własnych. Z kolei, Bierzuńska i in. (2019) wskazali na odmienne zależności, a uzyskane przez nich wartości były wyższe. Według Das i Seth (2017), dodatek siary do jogurtów naturalnych może poprawić właściwości reologiczne. Jest to związane ze zwiększeniem w produkcie zawartości białek serwatkowych, które są bezpośrednio zaangażowane w tworzenie wewnętrznych wiązań w strukturze wyrobu. Wartości parametrów tekstury będą również wzrastać wraz z większym udziałem zawartości suchej masy w jogurcie, w tym białka i tłuszczu (Ayar i in., 2016). W jogurcie z mleka oślego, w którym wykorzystano dodatek lizozymu i LF, nie zaobserwowano znaczącego wpływu tych białek serwatkowych na teksturę, w porównaniu do jogurtu kontrolnego. W czasie 30-dniowego okresu przechowywania jogurtów z mleka oślego z dodatkiem LF jędrność wzrosła o 4%, spoistość – o 12%, a zwięzłość – o 25%. Lepkość zmniejszyła się natomiast o 18% (Akal i in., 2022). Autorzy wskazali, że wzrost jędrności podczas przechowywania jest wynikiem kurczenia się żelu białkowego, związanego z zachodzącymi jednocześnie zmianami pH. Jędrność jogurtu jest zatem ściśle związana z aktywnością bakterii fermentacji mlekowej (Franco i in., 2010; Gürbüz i in., 2021).

Tabela 7. Parametry tekstury jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Jędrność (N)	Zwięzłość (mJ)	Siła spójności (N)	Lepkość dynamiczna (mPa·s)
Jogurt kontrolny	0	3	3,89 ^A \pm 2,17	2,38 ^A \pm 0,40	1,18 \pm 0,12	812 ^A \pm 86
	7	3	4,43 ^B \pm 1,51	2,82 ^A \pm 0,14	1,16 \pm 0,10	950 ^A \pm 102
	14	3	4,73 ^{AB} \pm 1,34	3,09 ^B \pm 0,23	1,13 \pm 0,10	1130 ^A \pm 76
	21	3	6,23 ^C \pm 1,02	3,85 ^C \pm 0,29	1,10 \pm 0,14	1292 ^B \pm 100
	28	3	6,45 ^C \pm 1,10	3,73 ^C \pm 0,42	1,07 \pm 0,15	1975 ^C \pm 143
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	3,35 ^A \pm 2,09	2,01 ^B \pm 0,28	1,20 \pm 0,09	850 ^A \pm 62
	7	3	4,21 ^B \pm 1,38	2,47 ^A \pm 0,60	1,17 \pm 0,13	910 ^A \pm 57
	14	3	4,08 ^{AB} \pm 1,21	2,26 ^B \pm 0,35	1,13 \pm 0,12	1090 ^A \pm 91
	21	3	6,09 ^C \pm 1,42	4,06 ^C \pm 0,55	1,13 \pm 0,11	1209 ^B \pm 126
	28	3	6,27 ^C \pm 1,35	4,08 ^C \pm 0,34	1,10 \pm 0,16	1370 ^B \pm 107

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

^{A, B, C} – różnice dla parametrów tekstury w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,01$.

Aktywność wody

Aktywność wody (a_w) kształtowała się ogólnie w przedziale od 0,937 do 0,978. Wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 8. Kontrolne jogurty naturalne charakteryzowały się niższą a_w (0,937), w porównaniu do jogurtów z dodatkiem LF (0,948). Wraz z okresem przechowywania wartości tego parametru wzrastały, co potwierdzono statystycznie ($p \leq 0,05$). Największą aktywnością wody charakteryzował się jogurt z dodatkiem LF w ostatnim dniu przechowywania (0,978). W badaniach dotyczących jogurtów aktywność wody jest rzadko ocenianym parametrem. Na zbliżone wartości dla jogurtów naturalnych wskazują Cais-Sokolińska i Walkowiak-Tomczak (2021), uzyskując a_w na poziomie 0,978. Podobne tendencje zanotowano w innych badaniach (Brodziak i in., 2020), z uwzględnieniem okresu przechowywania produktów. Wyższy wskaźnik a_w jest związany z szybszą proliferacją mikroorganizmów, dla których woda jest niezbędna do przeprowadzania zachodzących procesów. Jedną ze strategii zarządzania aktywnością wody jest kontrolowanie pH produktów mlecznych (Godlewska, 2012).

Tabela 8. Aktywność wody w jogurtach wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Aktywność wody
Jogurt kontrolny	0	3	0,937 ^a \pm 0,008
	7	3	0,945 ^a \pm 0,007
	14	3	0,960 ^{ab} \pm 0,013
	21	3	0,964 ^b \pm 0,009
	28	3	0,971 ^b \pm 0,005
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	0,948 ^a \pm 0,006
	7	3	0,957 ^a \pm 0,014
	14	3	0,952 ^a \pm 0,009
	21	3	0,961 ^a \pm 0,010
	28	3	0,978 ^b \pm 0,007

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

^{a, b} – różnice dla aktywności wody w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

Zdolność zatrzymywania wody i synerезa

Zjawisko wydzielania się serwatki z jogurtu jest procesem naturalnym, jednak przez konsumentów jest postrzegane jako pogorszenie jakości produktu (Brodziak i in., 2020). Zdolność zatrzymywania serwatki w strukturze żelu to zdolność zatrzymywania wody (WHC) (Lee i Lucey, 2010). W badaniach własnych świeże jogurty kontrolne i z dodatkiem laktoferyny cechowały się porównywalną WHC, wynoszącą 86,25% i 87,00%, odpowiednio (Tabela 9). Wraz z czasem przechowywania zaobserwowano statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) obniżenie WHC, które w dniu 28 było o 10% niższe niż w dniu początkowym. Na podobne tendencje wskazali również Brodziak i in. (2020) w jogurtach z koncentratem białek serwatkowych (WPC), dla których okres przechowywania chłodniczego wiązał się z redukcją WHC. Z kolei, w badaniach Bierzuńskiej i in. (2019), dodatek białek serwatkowych w postaci polimeryzowanych białek serwatkowych (PWP) w ilości 28% w/v istotnie ($p < 0,05$) wpłynął na podwyższenie stopnia WHC (97,70%), a dodatek koncentratu białek serwatkowych (WPC) w ilości 5,62% w/v na obniżenie (92,41%, $p < 0,05$), w porównaniu do jogurtu kontrolnego (95,23%). 21-dniowy okres przechowywania chłodniczego wpłynął na redukcję WHC w jogurtach z dodatkiem WPC aż o 20%, podczas gdy dla jogurtów z dodatkiem PWP zmniejszenie nastąpiło na poziomie jedynie 3%. Kierunek opisanych zmian w przypadku zastosowania WPC potwierdzili również Cais-Sokolińska i Walkowiak-Tomczak (2021), Kozioł i in. (2014) oraz Akalin i in. (2012). Ponad dwukrotnie większym brakiem stabilności cechowały się jogurty analizowane przez Akal i in. (2022). Jogurty na bazie mleka oślego bez i z dodatkiem białek (lizozymu, laktoferyny i natamycyny) charakteryzowały się bardzo zbliżoną zdolnością, mieszczącą się w przedziale 38,82-39,25%. 30-dniowy okres przechowywania nie wpłynął istotnie na omawiany parametr, przy czym wartości nieznacznie wzrosły (do 43%).

Tabela 9. Zdolność zatrzymywania wody w jogurtach wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Zdolność zatrzymywania wody – WHC (%)
Jogurt kontrolny	0	3	86,25 ^c \pm 0,62
	7	3	82,94 ^b \pm 0,53
	14	3	80,79 ^a \pm 0,94
	21	3	80,05 ^a \pm 1,68
	28	3	78,04 ^a \pm 1,15
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	87,00 ^c \pm 0,34
	7	3	84,46 ^b \pm 0,60
	14	3	81,63 ^a \pm 0,87
	21	3	80,17 ^a \pm 1,79
	28	3	79,02 ^a \pm 1,52

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

^{a, b, c} – różnice dla WHC w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

W badaniach własnych oceniono również spontaniczną synerezę serwatki, określaną też jako synerezę lub wydzielanie serwatki (Tabela 10). Jest ważnym, możliwym do zaobserwowania okiem, zjawiskiem występującym podczas przechowywania niektórych produktów mlecznych, w tym jogurtów. Podobnie jak w przypadku WHC, synereza serwatki widoczna jest gołym okiem i wpływa na odbiór produktu przez klienta. Może ograniczyć jego akceptowalność i okres przydatności do spożycia (Dimitrellou i in., 2020). Zjawisko to zachodzi w wyniku osłabienia struktury żelu i utraty zdolności do zatrzymania serwatki (De Brabandere i De Baerdemaeker, 1999). Zjawisko to występuje naturalnie i jest zależne od wielu czynników, tj. zawartość suchej masy, białka czy hydrokolidów, rodzaj zastosowanego mleka czy kultur starterowych, jak również wartość pH. Spontaniczną separację serwatki zwiększać będzie także obecność EPS (Lee i Lucey, 2010; Zielińska i in., 2021). Producenci starają się je ograniczać, stosując różne dodatki, np. polisacharydy, białka mleka, błonnik pokarmowy czy prebiotyki (Znamirowska i in., 2018).

W badaniach własnych zaobserwowano porównywalny stopień synerazy w obu rodzajach jogurtów, co przedstawiono w Tabeli 10. Dodatek białka był zbyt mały, aby wpłynąć istotnie na synerazę. Znotowano jednak statystycznie istotny ($p \leq 0,01$) wzrost spontanicznej synerazy serwatki wraz z upływem okresu przechowywania chłodniczego. SWS w jogurcie fortyfikowanym była 10-krotnie większa (1,0%) w dniu 28. w odniesieniu do dnia początkowego (0,1%). Z kolei, w jogurcie kontrolnym SWS wzrosła aż 12-krotnie (z 0,1% do 1,2%) w trakcie przechowywania. Porównywalne wartości dla SWS dla jogurtów naturalnych odnotowali Cais-Sokolińska i Walkowiak-Tomczak (2021) oraz Bierzuńska i in. (2019). W badaniach Cais-Sokolińskiej i Walkowiak-Tomczak (2021) stopień synerazy w świeżym jogurcie kontrolnym wynosił także 0,1%, a po 3 tygodniach przechowywania nie zaobserwowano synerazy. Coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania surowców pochodzenia roślinnego w celu kontrolowania synerazy i WHC. Możliwość wykorzystania białego owocu sapote (*Casimiroa edulis*) zaproponowali Khalil i in. (2022). Odnotowali pozytywny wpływ dodatku owocu w formie pulpy na WHC oraz synerazę w jogurtach probiotycznych (na bazie *Bifidobacterium longum*), zarówno świeżych, jak i przechowywanych chłodniczo przez okres 21 dni.

Tabela 10. Syneraza w jogurtach wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	Spontaniczna syneraza serwatki - SWS (%)
Jogurt kontrolny	0	3	0,1 ^A \pm 0,0
	7	3	0,5 ^B \pm 0,1
	14	3	0,8 ^B \pm 0,2
	21	3	1,0 ^{BC} \pm 0,3
	28	3	1,2 ^C \pm 0,2
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	0,1 ^A \pm 0,1
	7	3	0,4 ^B \pm 0,1
	14	3	0,5 ^B \pm 0,3
	21	3	0,8 ^{BC} \pm 0,2
	28	3	1,0 ^C \pm 0,3

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

^{A, B, C} – różnice dla SWS w obrębie danego rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,01$.

Instrumentalna ocena barwy

CIELab (Lab*) jest obecnie najczęściej stosowanym systemem opisu barwy różnych produktów żywnościowych i stanowi podstawę współczesnych systemów zarządzania barwą. Instrumentalnie zostały zmierzone koordynaty: L* (jasność), a* (przesunięcie od zielonego do czerwonego) i b* (przesunięcie od niebieskiego do żółtego).

Jogurty kontrolne okazały się jaśniejsze (97,75) w porównaniu do jogurtów z dodatkiem LF (91,06; $p > 0,05$), prawdopodobnie ze względu na naturalny różowy odcień dodawanej LF (Tabela 11). Jasność jogurtów wraz z upływem czasu przechowywania stopniowo zmniejszała się, osiągając najniższe wartości w ostatnim dniu badań (28 dzień). Wyniki te zostały potwierdzone statystycznie ($p \leq 0,01$). Barwa świeżych jogurtów z dodatkiem laktoferyny przyjęła wartości bardziej zbliżone do barwy czerwonej (parametr a* – $p \leq 0,01$) i żółtej (b* – $p \leq 0,05$) w stosunku do jogurtów kontrolnych. Wraz z upływem czasu przechowywania analizowane jogurty stawały się zarazem bardziej czerwone (zmiana wartości parametru a* w kierunku bliżej zera, tj. z -4,43 do -3,16 – jogurt kontrolny; z -2,04 do -0,85 – jogurt wzbogacany), jak i bardziej żółte (parametr b*, tj. z 18,12 do 18,57 – jogurt kontrolny; z 17,68 do 18,12 – jogurt wzbogacany). W opublikowanych dotychczas kilku pracach nawiązujących do laktoferyny w produktach mlecznych nie uwzględniono instrumentalnej oceny barwy. Nie ma zatem możliwości bezpośredniego odniesienia uzyskanych wyników do badań innych autorów. Istnieją jednak doniesienia, w których ocena barwy została przeprowadzona dla jogurtów naturalnych. W badaniach przeprowadzonych na jogurtach naturalnych dostępnych w sprzedaży komercyjnej, Pires i in. (2018) uzyskali L* na poziomie 93, parametr a* – -3,5, zaś parametr b* – 9,8, przy zawartości tłuszczu wynoszącej 3,3% i pH = 4,3. W przypadku koordynat L* i a* wartości te były zbliżone do wyników własnych uzyskanych dla jogurtów wzbogacanych. Korespondują także z wynikami opublikowanymi przez Cais-Sokolińską i Walkowiak-Tomczak (2021) dla jogurtów naturalnych (L* – 89,7, a* – -2,1). Okres 3-tygodniowego przechowywania spowodował zmianę wartości dla parametrów L* i a*, w tym wartość dla L* statystycznie istotnie się obniżyła ($p \leq 0,05$). W innych badaniach (Cais-Sokolińska i Pikul, 2006) wykazano, że w miarę upływu czasu przechowywania jogurtów, parametry barwy L*, a* i b* ulegały redukcji, co zostało potwierdzone w badaniach własnych jedynie dla jasności (L*). Dodatkowo, na zmiany parametrów barwy podczas okresu przechowywania mają również wpływ inne czynniki, np. proces pasteryzacji czy zmiany wartości pH podczas przechowywania. Bierzuńska i in. (2019) wskazali, że jogurty kontrolne

oraz jogurty z dodatkiem spolimeryzowanych białek serwatkowych (PWP) stawały się bardziej białe wraz z upływem czasu przechowywania, natomiast jogurty z dodatkiem koncentratu białek serwatkowych (WPC) traciły swoją biel. Bazując na powyżej cytowanych doniesieniach, można stwierdzić, że wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących trendów zmian jest trudne do ustalenia. Natomiast, instrumentalna ocena barwy wydaje się dobrym narzędziem, które można stosować do optymalizacji i doboru warunków realizacji procesu technologicznego. Ocena wzrokowa dokonywana przez konsumenta nie zawsze będzie natomiast odzwierciedlała instrumentalną ocenę barwy. Ludzkie oko nie jest na tyle czułe, żeby dostrzec niektóre zmiany, które rejestrowane są przez urządzenia.

Tabela 11. Parametry barwy ocenianej instrumentalnie dla jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Liczba próbek *	L*	a*	b*
Jogurt kontrolny	0	3	97,75 ^{By} \pm 1,69	-4,43 ^{AX} \pm 0,18	18,12 ^{ay} \pm 0,14
	7	3	96,48 ^{By} \pm 1,37	-4,01 ^{AX} \pm 0,23	18,15 ^{ay} \pm 0,10
	14	3	96,01 ^{By} \pm 1,25	-3,82 ^{AX} \pm 0,27	18,32 ^{ay} \pm 0,08
	21	3	94,62 ^{ABy} \pm 1,90	-3,57 ^{ABX} \pm 0,37	18,45 ^{aby} \pm 0,11
	28	3	93,71 ^{Ay} \pm 1,86	-3,16 ^{BX} \pm 0,38	18,57 ^{by} \pm 0,13
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	3	91,06 ^{Bx} \pm 1,71	-2,04 ^{AY} \pm 0,22	17,68 ^{ax} \pm 0,20
	7	3	90,43 ^{Bx} \pm 1,15	-1,75 ^{AY} \pm 0,16	17,73 ^{ax} \pm 0,14
	14	3	90,02 ^{Bx} \pm 1,38	-1,44 ^{ABY} \pm 0,29	17,84 ^{ax} \pm 0,15
	21	3	88,31 ^{ABx} \pm 1,20	-1,18 ^{BY} \pm 0,36	17,96 ^{abx} \pm 0,20
	28	3	87,15 ^{Ax} \pm 1,42	-0,85 ^{BY} \pm 0,45	18,12 ^{bx} \pm 0,23

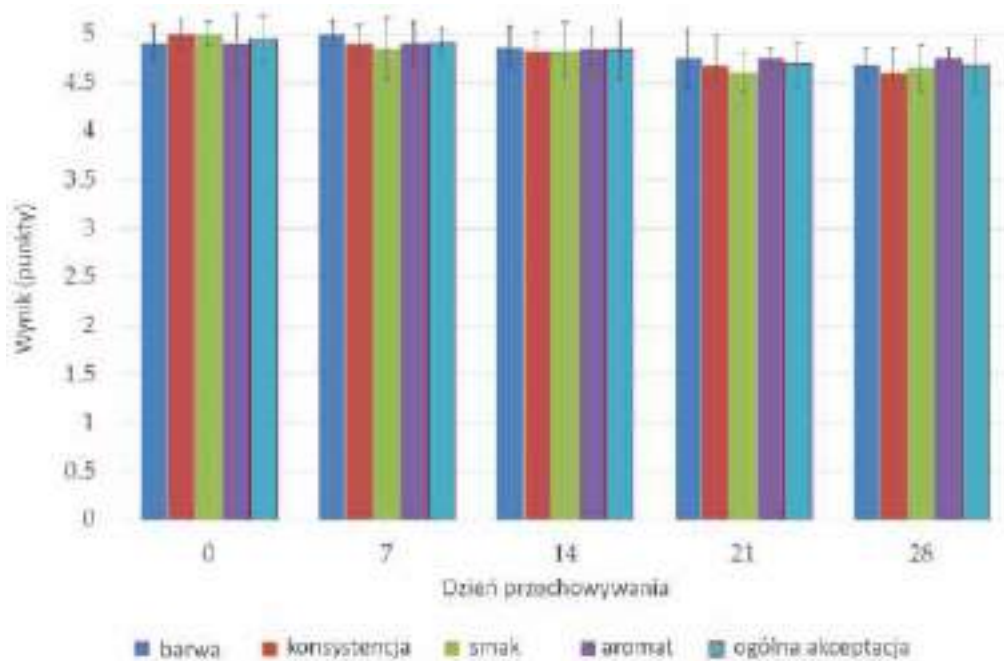
L* – jasność, a* – zmiana w zakresie od zielonego do czerwonego, b* – zmiana w zakresie od niebieskiego do żółtego (system CIELab).

* – nowe próbki pobierano do analiz w kolejnych dniach przechowywania. Całkowita liczba próbek objętych badaniami w tym obszarze jest sumą wszystkich wymienionych.

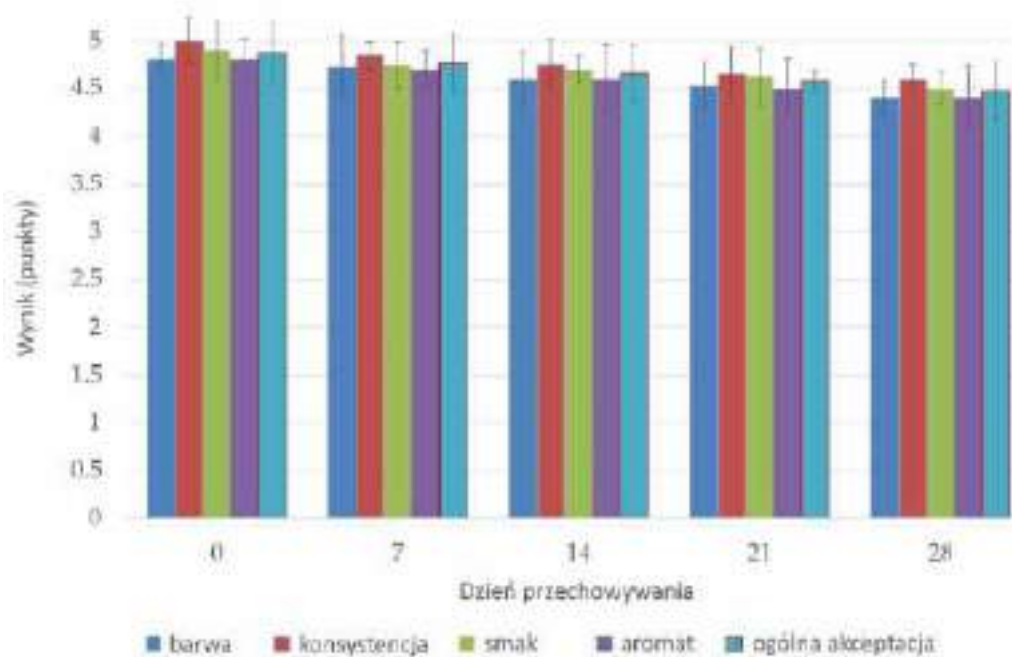
a, b, A, B – różnice dla poszczególnych koordynat barwy pomiędzy dniem przechowywania w obrębie typu jogurtu; a, b – istotne przy $p \leq 0,05$, A, B – istotne przy $p \leq 0,01$.
^{x, y, X, Y} – różnice dla poszczególnych koordynat barwy pomiędzy typami jogurtów w obrębie dnia przechowywania; ^{x, y} – istotne przy $p \leq 0,05$, ^{X, Y} – istotne przy $p \leq 0,01$.

Cechy organoleptyczne

Badania konsumenckie są bardzo ważnym elementem oceny każdego nowego produktu spożywczego (Karam-Allah i in., 2022; Routray i Mishra, 2011). W przeprowadzonej ocenie organoleptycznej jogurtów uwzględniono ich smak, zapach, barwę, konsystencję i ogólną akceptację. Cechy te są ściśle związane z zawartością w jogurcie wolnych kwasów tłuszczowych, związków lotnych i kwasu mlekowego. Jogurty fortyfikowane LF uzyskały wysokie noty, porównywalne do ocen dla jogurtu kontrolnego. Wartości te zostały przedstawione na Wykresach 4A i 4B. Świeże jogurty fortyfikowane otrzymały identyczną ocenę ogólną, jak kontrolne, tj. 4,90 pkt/5 pkt max. Dodatek LF nie spowodował zatem zmian w ogólnej ocenie organoleptycznej produktu, co można uznać za zadowalający wynik. Ważne jest bowiem, aby nowy produkt posiadał wysoką akceptowalność konsumencką. Wraz z upływem czasu przechowywania punkty przyznane w ramach oceny organoleptycznej zmniejszały się, średnio osiągając wartości 4,68 pkt/5,00 max. Efekt ten był jednak nieistotny statystycznie ($p > 0,05$), czyli nie uzyskano znaczących, negatywnych zmian w percepcji. Badania Arslaner i in. (2021) również potwierdzają powyższą tendencję dla jogurtu naturalnego. Według Cais-Sokolińskiej i Walkowiak-Tomczak (2021), przechowywanie jogurtu naturalnego przez 3 tygodnie spowodowało obniżenie poziomu akceptacji jogurtów przez członków panelu oceniającego. Z badań Karam-Allah i in. (2022) wynika, że dodatek LF spowodował poprawę cech organoleptycznych jogurtu. Jogurt z dodatkiem LF z siary charakteryzował się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) wyższym wynikiem w ocenie tekstury i wyglądu, ale niższym w aspekcie smaku, w porównaniu do jogurtu kontrolnego. Inne badania, przeprowadzone na różnych produktach mlecznych, wykazały również, że dodatek laktoferyny (Akal i in., 2022), lizozymu (Saad i in., 2019) i natamycyny (Nottagh i in., 2020) nie miał niekorzystnego wpływu na właściwości organoleptyczne produktów mlecznych. Akalin i in. (2012) również nie stwierdzili znaczących różnic w smaku, wyglądzie, zapachu i ogólnej akceptowalności jogurtów o różnym dodatku WPC w trakcie okresu przechowywania ($p > 0,05$). Zakaria i in. (2020) przeprowadzili jedynie 7-dniową ocenę jogurtu z dodatkiem LF, który pierwszego dnia po wytworzeniu został niżej oceniony niż jogurt kontrolny. Ponadto, w 7-mym dniu przechowywania jogurt doświadczalny otrzymał niższe noty w porównaniu do analiz z dnia początkowego, przy czym nie potwierdzono tego statystycznie.



A)



B)

Wykres. 4. A) Zmiany jakości organoleptycznej (barwy, konsystencji, smaku, zapachu i ogólnej akceptacji) jogurtów kontrolnych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego. B) Zmiany jakości organoleptycznej (barwy, konsystencji, smaku, zapachu i ogólnej akceptacji) jogurtów fortyfikowanych laktoferyną, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego

7.1.3. Jogurty wytworzone w skali przemysłowej (RD) – Etap IV

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano przeskalowania produkcji jogurtów fortyfikowanych laktoferyną ze skali laboratoryjnej do skali przemysłowej (we współpracy z technologiemi zakładowymi) w celu uzyskania materiału do dalszych badań żywieniowych. Analogicznie przeprowadzono ocenę jakości fizyko-chemicznej, mikrobiologicznej i organoleptycznej wyprodukowanych jogurtów fortyfikowanych laktoferyną w skali przemysłowej. Uzyskane wyniki zestawiono identycznie jak w przypadku jogurtów wytworzonych w warunkach laboratoryjnych i zamieszczono jedynie w niniejszej dysertacji. Ocena obejmowała również jakość surowca przerobowego z mleczarni.

Mleko przerobowe

W Tabeli 12 przedstawiono jakość mleka surowego przeznaczonego do produkcji jogurtów fortyfikowanych LF w mleczarni. Wartość pH wynosiła 6,72, a kwasowość potencjalna 7,00 °SH. Zawartość procentowa białka ogólnego w mleku surowym była równa 3,53%, tłuszczu 4,12%, laktozy 4,95% i suchej masy 13,03%. Jakość higieniczna mleka była akceptowalna, zgodna z Rozporządzeniem Komisji (WE) 853/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. Surowe mleko krowie powinno zawierać maksymalnie 400 tys. komórek somatycznych w 1 ml. Mleko spełniało również wymagania dotyczące ogólnej liczby drobnoustrojów, gdyż uzyskana wartość była poniżej 100 tys. jtk/ml. Zawartość laktoferyny w analizowanym surowcu wynosiła 135,7 mg/l.

Tabela 12. Jakość surowego mleka przerobowego przeznaczonego do produkcji jogurtów przemysłowych

Kwasowość		Wartość odżywcza				Jakość higieniczna	
Aktywna (wartość pH)	Potencjalna (°SH)	Białko ogólne (%)	Tłuszcz (%)	Laktoza (%)	Sucha masa (%)	Ogólna liczba bakterii (tys. jtk/ml)	Liczba komórek somatycznych (tys./ml)
6,72	7,00	3,53	4,12	4,95	13,03	49	208

Jogurt

Podstawowa wartość odżywcza

W Tabeli 13 zamieszczono podstawowy skład chemiczny jogurtów kontrolnych i doświadczalnych wytworzonych w skali przemysłowej. Wartość energetyczna, zawartość białka, tłuszczu i suchej masy była bardzo zbliżona do jogurtów kontrolnych i fortyfikowanych LF wytworzonych w skali laboratoryjnej. Jogurty fortyfikowane wyprodukowane w skali przemysłowej charakteryzowały się wartością energetyczną wynoszącą 66 kcal/100 g i zawierały 3,46% białka, 3,22% tłuszczu oraz 12,78% suchej masy, a w stosunku do jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej wartości te wynosiły, odpowiednio o: 2 kcal/100 g więcej, 0,13 p.p. więcej, 0,03 p.p. mniej i 0,42 p.p. więcej. Dodatkowo, uwzględniono zawartość węglowodanów, wynoszącą 5,02% dla jogurtów fortyfikowanych w dniu początkowym. Podobne wyniki związane są z wykorzystaniem do produkcji surowca z tego samego źródła oraz zastosowaniem tych samych kultur starterowych.

Tabela 13. Podstawowy skład chemiczny i wartość energetyczna jogurtów wytworzonych w warunkach przemysłowych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Wartość energetyczna (kcal/100 g)	Białko ogólne (%)	Tłuszcz (%)	Węglowodany (%)	Sucha masa (%)
Jogurt kontrolny	0	63 \pm 2	3,15 ^{bx} \pm 0,03	3,29 \pm 0,04	5,07 ^b \pm 0,03	12,65 ^{bx} \pm 0,19
	7	62 \pm 4	3,15 ^{bx} \pm 0,05	3,27 \pm 0,04	5,00 ^b \pm 0,09	12,60 ^{bx} \pm 0,31
	14	62 \pm 3	3,10 ^{bx} \pm 0,08	3,21 \pm 0,09	4,93 ^b \pm 0,16	12,49 ^{bx} \pm 0,39
	21	62 \pm 3	3,02 ^{ax} \pm 0,09	3,15 \pm 0,11	4,80 ^a \pm 0,34	11,86 ^{ax} \pm 0,65
	28	62 \pm 4	2,90 ^{ax} \pm 0,08	3,14 \pm 0,10	4,76 ^a \pm 0,27	11,54 ^{ax} \pm 0,54
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	66 \pm 3	3,46 ^{by} \pm 0,07	3,22 \pm 0,05	5,02 ^b \pm 0,09	12,78 ^{bx} \pm 0,15
	7	66 \pm 4	3,42 ^{by} \pm 0,06	3,22 \pm 0,08	4,94 ^b \pm 0,17	12,62 ^{bx} \pm 0,26
	14	64 \pm 4	3,38 ^{by} \pm 0,11	3,17 \pm 0,15	4,90 ^b \pm 0,23	12,25 ^{ax} \pm 0,44
	21	64 \pm 6	3,30 ^{ay} \pm 0,08	3,12 \pm 0,14	4,77 ^a \pm 0,30	12,03 ^{ax} \pm 0,46
	28	63 \pm 5	3,23 ^{ay} \pm 0,16	3,13 \pm 0,10	4,73 ^a \pm 0,38	11,56 ^{ax} \pm 0,63

^{a, b} – różnice dla poszczególnych składników w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

^{x, y} – różnice dla poszczególnych składników pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,05$

Zawartość laktoferyny

Tabela 14 prezentuje zmiany zawartości LF w jogurtach kontrolnych i fortyfikowanych wytworzonych w skali przemysłowej w ciągu 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego. Zawartość LF w jogurcie fortyfikowanym wytworzonym w skali przemysłowej w pierwszym dniu przechowywania wynosiła 138,76 mg/100 g i była o około 6% wyższa w odniesieniu do jogurtu wytworzonego w skali laboratoryjnej (131,15 mg/100 g). Na zawartość LF w produktach mlecznych wpływa zastosowany proces obróbki termicznej. Całkowita denaturacja LF następuje prawdopodobnie w wyniku ogrzewania mleka w temperaturze 85°C przez 30 min (Claeys i in. 2014). Ponadto, na stabilność LF wpływa również jej budowa, a dokładniej nasycenie żelazem, które zwiększa stabilność białka (Liu i in. 2020; Conesa i in., 2008). Wraz z 28-dniowym okresem przechowywania chłodniczego zanotowano zmniejszenie zawartości LF w obu rodzajach jogurtów wytworzonych w warunkach przemysłowych. W jogurcie fortyfikowanym różnica ta wynosiła około 7% (Tabela 14).

Tabela 14. Zawartość laktoferyny w jogurtach wytworzonych w warunkach przemysłowych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

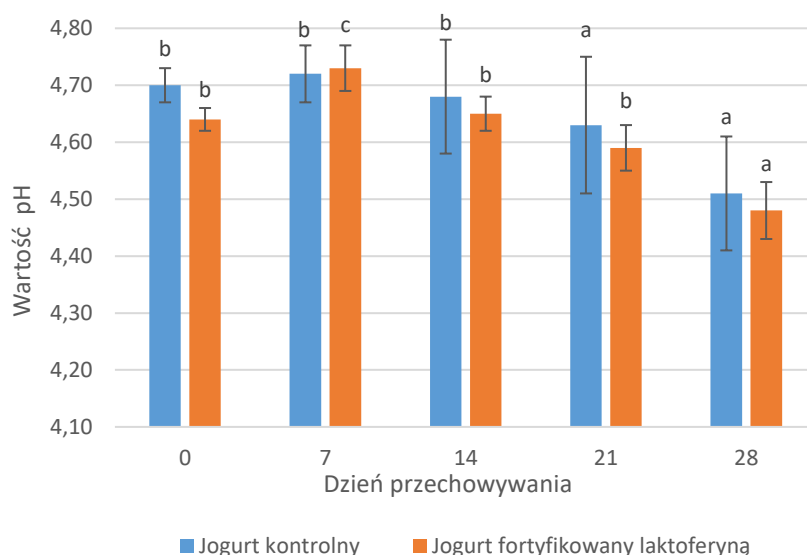
Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Laktoferyna (mg/100 g)
Jogurt kontrolny	0	51,39 ^{bX} \pm 1,85
	7	48,95 ^{bX} \pm 1,67
	14	46,67 ^{bX} \pm 3,69
	21	43,58 ^{aX} \pm 4,15
	28	39,02 ^{aX} \pm 6,07
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	138,76 ^{bY} \pm 2,98
	7	137,49 ^{bY} \pm 2,43
	14	134,21 ^{bY} \pm 3,72
	21	134,05 ^{aY} \pm 2,84
	28	129,68 ^{aY} \pm 4,51

^{a, b} – różnice dla zawartości laktoferyny w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

^{X, Y} – różnice dla zawartości laktoferyny pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,01$.

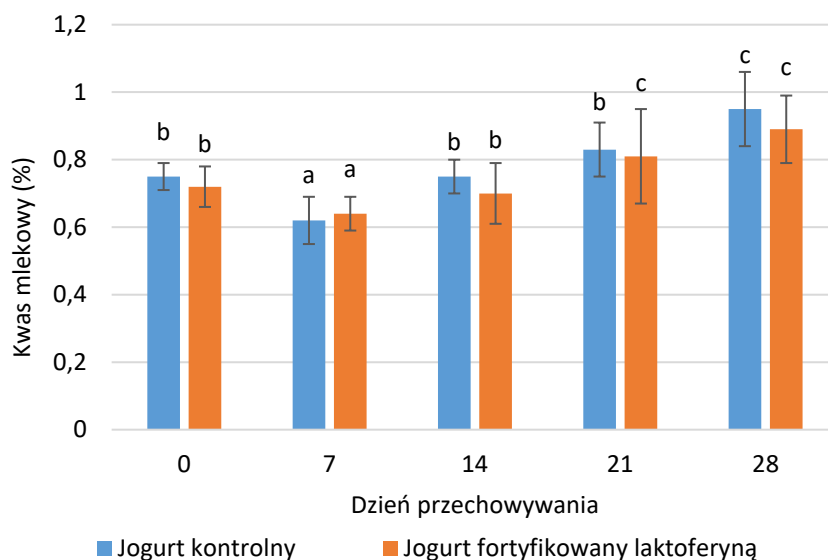
Kwasowość (wartość pH i zawartość kwasu mlekowego)

Zmiany wartości pH oraz procentowej zawartości kwasu mlekowego w trakcie 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego jogurtów wytworzonych w skali przemysłowej przedstawiono na Wykresach 5 i 6. Uzyskane wartości i tendencje zmian były porównywalne do jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej. Świeży jogurt fortyfikowany zawierał 0,72% kwasu mlekowego, a wartość pH była na poziomie 4,64. W trakcie przechowywania wartość pH zmniejszyła się o 0,16, zaś zawartość kwasu mlekowego wzrosła o 0,18 p.p. W obu przypadkach zmiany były statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$. Zmiany wartości pH w trakcie okresu przechowywania są zjawiskiem normalnym wynikający z temperatury przechowywania oraz zastosowanych kultur starterowych (De Brabandere i De Baerdemaeker, 1999).



^{a, b, c} – różnice dla wartości pH w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

Wykres 5. Zmiany wartości pH ocenianych jogurtów wytworzonych w warunkach przemysłowych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia, SD)



^{a, b, c} – różnice dla wartości pH w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

Wykres 6. Zmiany zawartości kwasu mlekowego (%) w ocenianych jogurtach wytworzonych w warunkach przemysłowych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia, SD)

Ocena mikrobiologiczna

Wyniki z przeprowadzonej oceny jakości mikrobiologicznej jogurtów wytworzonych w warunkach przemysłowych zostały zamieszczone w Tabeli 15. Jogurty spełniały wymagania higieniczne w kontekście bezpieczeństwa żywności. Zarówno w jogurtach kontrolnych, jak i fortyfikowanych nie wykryto obecności bakterii *Coli* typu kałowego (mFC), *Coli* (Endo), *Clostridium* sp., pałeczek *Campylobacter* i *Salmonella*, jak i grzybów. Okres przechowywania nie wpłynął na pogorszenie jakości mikrobiologicznej jogurtów. Całkowita liczba bakterii kwasu mlekowego w świeżych jogurtach kształtowała się na poziomie $7,3 \times 10^7$ jtk/g (niezależnie od rodzaju), a po 28-miu dniach przechowywania wynosiła $5,4 \times 10^7$ jtk/g w jogurtach kontrolnych i $5,6 \times 10^7$ jtk/g w fortyfikowanych. Wartości w obu przypadkach spełniały wymogi standardu FAO/WHO *Codex Alimentarius* (2003), jak i polskiej normy PN-A-86061:2006.

Tabela 15. Jakość mikrobiologiczna analizowanych jogurtów wytworzonych w warunkach przemysłowych, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (jtk/g, średnia)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Całkowita liczba bakterii	Całkowita liczba grzybów	Całkowita liczba bakterii kwasu mlekowego	Całkowita liczba bakterii z rodzaju <i>Clostridium</i> sp.	Całkowita liczba bakterii z grupy <i>Coli</i> (Endo)	Całkowita liczba bakterii z grupy <i>Coli</i> typu kałowego (mFC)	Obecność bakterii <i>Salmonella</i>	Obecność bakterii <i>Campylobacter</i>
Jogurt kontrolny	0	0	0	$7,3 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	7	0	0	$7,8 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	14	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$7,0 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	21	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$6,2 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	28	$<1,5 \times 10^1$ ^Y	0	$5,4 \times 10^7$	0	0	0	0	0
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	0	0	$7,3 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	7	0	0	$7,8 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	14	0 ^X	0	$6,7 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	21	0 ^X	0	$6,0 \times 10^7$	0	0	0	0	0
	28	0 ^X	0	$5,6 \times 10^7$	0	0	0	0	0

“0” – oznacza “nie wykryto”.

^{X, Y} – różnice dla całkowitej liczby bakterii pomiędzy rodzajem jogurtu w obrębie dnia przechowywania, istotne przy $p \leq 0,01$.

Tekstura

Jędrność, zwięzłość, spoistość i lepkość dynamiczna ocenianych jogurtów wytworzonych w skali przemysłowej (Tabela 16) nie odbiegała od wartości zaprezentowanych dla jogurtów laboratoryjnych w Tabeli 7. Fortyfikacja laktoferyną nie wpłynęła statystycznie istotnie ($p > 0,05$) na oceniane parametry. Jędrność skrzepu jogurtu fortyfikowanego wynosiła 2,96 N w dniu początkowym i wzrosła do 6,13 N w ostatnim dniu przechowywania ($p \leq 0,01$). Wraz z upływem czasu przechowywania istotne zmiany uzyskano również dla zwięzłości – wzrost o 44% ($p \leq 0,01$) i lepkości dynamicznej – wzrost o 46% ($p \leq 0,05$).

Tabela 16. Wybrane parametry tekstury jogurtów fortyfikowanych laktoferyną wytworzonych w skali przemysłowej, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Jędrność (N)	Zwięzłość (mJ)	Siła spójności (N)	Lepkość dynamiczna (mPa·s)
Jogurt kontrolny	0	3,65 ^a \pm 0,58	2,32 ^A \pm 0,40	1,27 \pm 0,04	854 ^A \pm 37
	7	4,17 ^b \pm 0,39	2,47 ^A \pm 0,14	1,24 \pm 0,09	928 ^A \pm 24
	14	5,02 ^{ab} \pm 0,67	2,24 ^A \pm 0,23	1,20 \pm 0,10	1097 ^A \pm 65
	21	5,93 ^c \pm 0,56	3,16 ^B \pm 0,29	1,18 \pm 0,15	1362 ^B \pm 94
	28	6,20 ^c \pm 0,71	3,75 ^B \pm 0,42	1,10 \pm 0,14	1594 ^C \pm 102
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	2,96 ^A \pm 0,17	2,21 ^A \pm 0,30	1,34 \pm 0,07	875 ^A \pm 22
	7	3,90 ^B \pm 0,38	2,39 ^A \pm 0,24	1,26 \pm 0,10	985 ^A \pm 31
	14	4,44 ^B \pm 0,63	2,17 ^A \pm 0,62	1,24 \pm 0,14	1116 ^B \pm 49
	21	5,76 ^C \pm 1,14	3,31 ^B \pm 0,49	1,17 \pm 0,11	1454 ^C \pm 44
	28	6,13 ^C \pm 1,02	3,98 ^B \pm 0,53	1,15 \pm 0,18	1620 ^C \pm 63

^{a, b, c} – różnice pomiędzy dniem przechowywania w obrębie rodzaju jogurtu; istotne przy $p \leq 0,05$, ^{A, B, C} – istotne przy $p \leq 0,01$.

Aktywność wody (a_w), zdolność zatrzymywania wody i synerеза

Wyniki uzyskane dla aktywności wody, zdolności zatrzymywania wody i spontanicznej synerезы serwatki zestawiono w Tabeli 17. Kierunek zaobserwowanych zmian był również

zbieżny z wynikami własnymi uzyskanymi dla jogurtów wytworzonych w skali laboratoryjnej (PII). Dodatek laktoferyny nie wpłynął statystycznie istotnie na omawiane parametry, natomiast istotne zmiany uzyskano w trakcie przechowywania obu rodzajów jogurtów. W czasie 28-mio dniowego okresu przechowywania a_w jogurtów fortyfikowanych wzrosła o 4% ($p \leq 0,05$), WHC obniżyła się o 11% ($p \leq 0,05$), a SWS wzrosła aż 10-krotnie ($p \leq 0,01$).

Tabela 17. Aktywność wody, zdolność zatrzymywania wody i synereza jogurtów fortyfikowanych laktoferyną wytworzonych w skali przemysłowej, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Rodzaj jogurtu	Dzień przechowywania	Aktywność wody	Zdolność zatrzymywania wody – WHC (%)	Spontaniczna synereza serwatki – SWS (%)
Jogurt kontrolny	0	0,914 ^a \pm 0,004	87,92 ^c \pm 0,11	0,1 ^A \pm 0,1
	7	0,920 ^a \pm 0,006	85,36 ^{bc} \pm 0,15	0,4 ^B \pm 0,2
	14	0,925 ^a \pm 0,007	82,55 ^b \pm 0,26	0,7 ^{BC} \pm 0,2
	21	0,939 ^b \pm 0,010	79,82 ^a \pm 0,31	1,0 ^C \pm 0,3
	28	0,947 ^b \pm 0,009	77,43 ^a \pm 0,44	1,0 ^C \pm 0,3
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	0,925 ^a \pm 0,003	88,16 ^c \pm 0,08	0,1 ^A \pm 0,1
	7	0,934 ^a \pm 0,05	85,72 ^b \pm 0,13	0,3 ^A \pm 0,1
	14	0,939 ^a \pm 0,004	83,91 ^b \pm 0,20	0,5 ^B \pm 0,2
	21	0,944 ^{ab} \pm 0,006	81,02 ^a \pm 0,17	0,8 ^{BC} \pm 0,3
	28	0,959 ^b \pm 0,007	78,35 ^a \pm 0,36	1,1 ^C \pm 0,3

a, b, c, A, B, C – różnice dla ocenianego parametru pomiędzy dniem przechowywania w obrębie rodzaju jogurtu; a, b, c – istotne przy $p \leq 0,05$, A, B, C – istotne przy $p \leq 0,01$.

Instrumentalna ocena barwy

Parametry barwy (L^* , a^* , b^*) oznaczano w systemie CIELab. Stwierdzono, że zarówno dodatek laktoferyny, jak i okres przechowywania były czynnikami istotnie determinującymi uzyskane wyniki (Tabela 18). W świeżych jogurtach fortyfikowanych jasność była o 5% mniejsza w porównaniu do jogurtów kontrolnych. Zmniejszyła się również wartość parametru b^* – o 3%. Jednak największe zmiany uzyskano dla parametru a^* , którego wartość wzrosła

o 45% w świeżych jogurtach fortyfikowanych, świadcząc o większym udziale barwy czerwonej. Wraz z okresem przechowywania, niezależnie od rodzaju, jogurty traciły na jasności. Wraz z upływem czasu przechowywania następowało przesunięcie wartości w kierunku barwy czerwonej i żółtej.

Tabela 18. Oceniana instrumentalnie barwa jogurtów wytworzonych w skali przemysłowej, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego (średnia \pm SD)

Dzień przechowywania	Dzień przechowywania	L*	a*	b*
Jogurt kontrolny	0	99,14 ^{by} \pm 0,23	-4,27 ^{aX} \pm 0,06	17,87 ^{ay} \pm 0,07
	7	97,65 ^{by} \pm 0,17	-4,22 ^{aX} \pm 0,08	18,10 ^{ay} \pm 0,10
	14	95,27 ^{by} \pm 0,19	-4,11 ^{aX} \pm 0,10	18,12 ^{ay} \pm 0,16
	21	93,41 ^{ay} \pm 0,28	-3,86 ^{abX} \pm 0,13	18,32 ^{aby} \pm 0,11
	28	92,96 ^{ay} \pm 0,40	-3,45 ^{bX} \pm 0,17	18,50 ^{by} \pm 0,19
Jogurt fortyfikowany laktoferyną	0	93,77 ^{cx} \pm 0,15	-1,92 ^{aY} \pm 0,06	17,50 ^{ax} \pm 0,09
	7	92,28 ^{cx} \pm 0,12	-1,68 ^{aY} \pm 0,09	17,65 ^{ax} \pm 0,11
	14	91,56 ^{bcx} \pm 0,25	-1,41 ^{abY} \pm 0,07	17,87 ^{ax} \pm 0,25
	21	89,03 ^{bx} \pm 0,29	-1,30 ^{bY} \pm 0,10	18,19 ^{abx} \pm 0,18
	28	86,62 ^{ax} \pm 0,33	-0,98 ^{cY} \pm 0,12	18,33 ^{bx} \pm 0,34

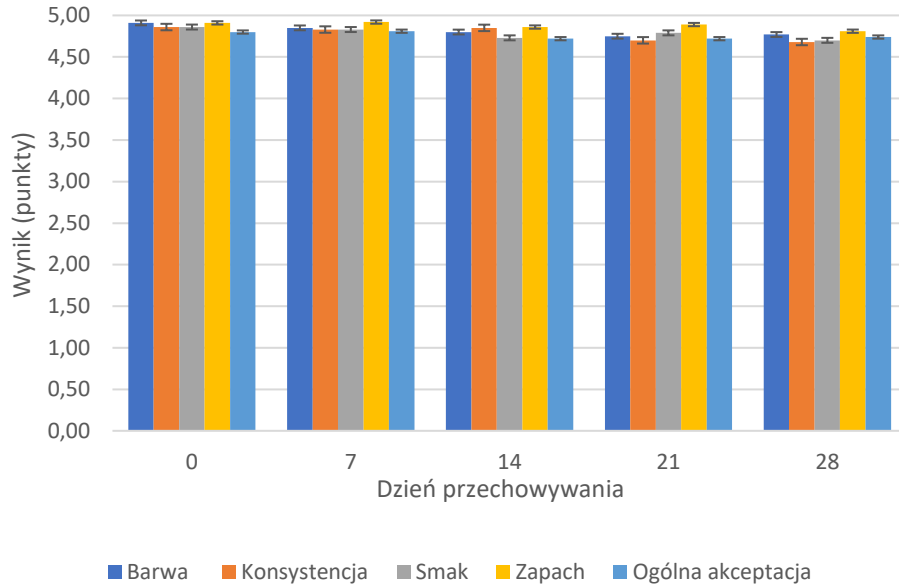
L* – jasność, a* – zmiana w zakresie od zielonego do czerwonego, b* – zmiana w zakresie od niebieskiego do żółtego (system CIELab).

a, b, c – różnice dla poszczególnych koordynat barwy pomiędzy dniem przechowywania w obrębie rodzaju jogurtu, istotne przy $p \leq 0,05$.

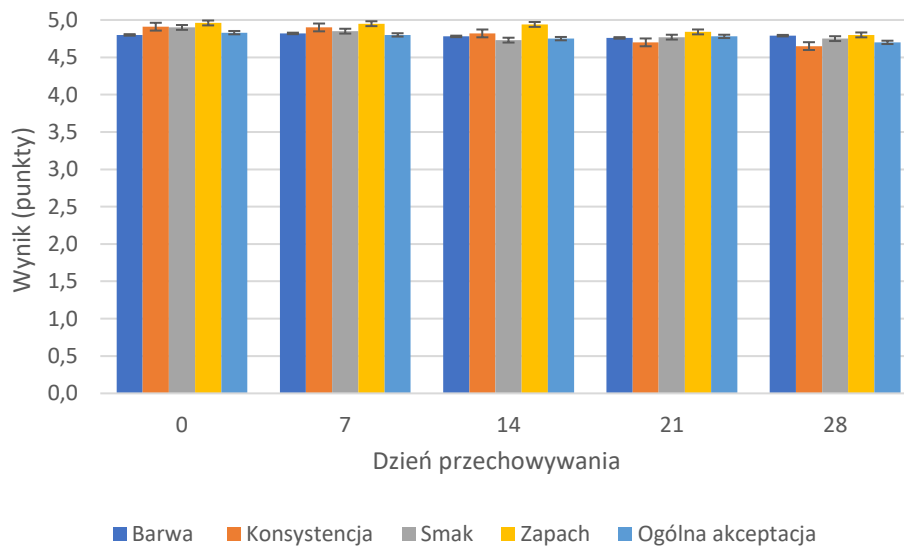
^{x, y, X, Y} – różnice dla poszczególnych koordynat barwy pomiędzy rodzajami jogurtów w obrębie dnia przechowywania; ^{x, y} – istotne przy $p \leq 0,05$, ^{X, Y} – istotne przy $p \leq 0,01$.

Cechy organoleptyczne

Na podstawie przeprowadzonej oceny organoleptycznej zaobserwowano, że jogurty kontrolne i fortyfikowane LF uzyskały bardzo wysokie noty dla wszystkich ocenianych cech (w zakresie 4,65-4,91) – Wykresy 7A i 7B. Niższe noty przyznawano w końcowym okresie przechowywania.



A)



B)

Wykres 7. A) Zmiany jakości organoleptycznej (barwy, konsystencji, smaku, zapachu i ogólnej akceptacji) jogurtów kontrolnych wytworzonych w skali przemysłowej, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego. **B)** Zmiany jakości organoleptycznej (barwy, konsystencji, smaku, zapachu i ogólnej akceptacji) jogurtów fortyfikowanych laktoferyną wytworzonych w skali przemysłowej, z uwzględnieniem 28-dniowego okresu przechowywania chłodniczego

Podsumowanie – Etap II i IV

Fortyfikacja jogurtu laktoferyną w ilości 80 mg/100 g nie wywarła negatywnego wpływu na większość analizowanych parametrów fizyko-chemicznych, mikrobiologicznych czy organoleptycznych. Zastosowanie dodatku LF istotnie wpłynęło na parametry takie, jak zawartość białka ogólnego, suchej masy, laktoferyny, ogólną liczbę bakterii oraz zmianę wartości parametrów barwy ocenianych instrumentalnie. Zaobserwowano istotny wpływ okresu przechowywania chłodniczego na zawartość białka ogólnego, LF, kwasowość – wartość pH i zawartość kwasu mlekowego, parametry tekstury (jędrność, zwięzłość i lepkość dynamiczną), aktywność wody, zdolność zatrzymywania wody, spontaniczną synerезę serwatki oraz wartości parametrów barwy ocenianych instrumentalnie. Jogurty fortyfikowane LF wyprodukowane w warunkach przemysłowych charakteryzowały się porównywalnymi parametrami fizyko-chemicznych, mikrobiologicznymi czy organoleptycznymi, jak jogurty wytworzone w skali laboratoryjnej. Otrzymane wyniki wskazują na wysoką stabilność oraz akceptowalność produktu.

7.2. Badania dotyczące możliwości wykorzystania jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w dietoterapii osób z genetyczną predyspozycją do nadwagi i otyłości (PIII, badania własne) – Etap III, V i VI

7.2.1. Plan żywieniowy (badania własne) – Etap III

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej opracowano zalecenia dietetyczne oraz 7-miodniowy plan żywieniowy dla kobiet i mężczyzn, składający się z 4 posiłków (śniadanie, II śniadanie, obiad i kolacja) i uwzględniający dwie porcje po 125 g jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w ilości 80 mg/100g.

Badana populacja została podzielona na dwie grupy: kobiet i mężczyzn. Otrzymane pomiary antropometryczne posłużyły do obliczeń takich parametrów, jak: NMC, PPM i CPM oraz podaży poszczególnych makroskładników. Uzyskane wyniki zostały uśrednione i przedstawione w Tabeli 19. Otrzymana wartość NMC w grupie kobiet wyniosła 57,36 kg, a w grupie mężczyzn – 67,44 kg. Nie odnotowano istotnych różnic dla PPM pomiędzy kobietami (1322 kcal) a mężczyznami (1635 kcal) oraz dla CPM (kobiety – 1586 kcal, mężczyźni – 1963 kcal). Porównywalne wyniki uzyskano również dla makroskładników zastosowanych w jadłospisach, odpowiednio dla kobiet i mężczyzn: białko – 56,79 i 66,76 g,

tłuszcze – 44,08 i 54,53 g oraz węglowodany przyswajalne – 220,72 i 281,31 g.

Ze względu na fakt, że różnice pomiędzy omawianymi parametrami były nieznaczne, w ramach niniejszej rozprawy został zaproponowany jeden plan żywieniowy, zarówno dla kobiet, jak i mężczyzn.

Tabela 19. Parametry antropometryczne uczestników badania oraz obliczone wartości NMC, PPM, CPM i makroskładników zastosowanych w jadłospisach (średnia \pm SD)

	Kobiety	Mężczyźni
Masa ciała (kg)	79,77 \pm 5,44	88,69 \pm 6,83
Wzrost (cm)	164,73 \pm 3,89	173,25 \pm 4,02
Wiek (lata)	35,45 \pm 5,16	38,75 \pm 7,34
NMC (kg)	57,36 \pm 1,94	67,44 \pm 3,02
PPM (kcal)	1322 \pm 45	1635 \pm 45
CPM (kcal)	1586 \pm 54	1963 \pm 54
Białko (g)	56,79 \pm 1,92	66,76 \pm 2,99
Tłuszcze (g)	44,08 \pm 1,53	54,53 \pm 1,51
Węglowodany przyswajalne (g)	220,72 \pm 8,74	281,31 \pm 8,11
Błonnik (g)	40,00 \pm 0,00	40,00 \pm 0,00

NMC – należna masa ciała, PPM – podstawowa przemiana materii, CPM – całkowita przemiana materii.

W przypadku mężczyzn tygodniowa podaż energetyczna została ustalona na 13741 kcal, a dla kobiet – 11107 kcal.

Bilans opracowanych jadłospisów został przedstawiony w Tabeli 20. W zależności od parametru, mieścił się w przedziale od 94,84 do 102,99% w przypadku kobiet oraz od 95,91 do 101,75% w przypadku mężczyzn.

Tabela 20. Założenia i bilans makroskładników w 7-dniowym jadłospisie

Parametr	Kobiety – wyznaczona norma	Bilans (%)	Mężczyźni – wyznaczona norma	Bilans (%)
CPM (kcal)	11107	102,99	13741	101,39
Białko (g)	397,53	101,78	467,34	102,6
Tłuszcze (g)	308,53	94,84	381,70	95,91
Węglowodany przyswajalne (g)	1545,05	99,25	1969,16	101,75
Błonnik (g)	280,000	99,76	280,00	97,4

Oprócz tygodniowego jadłospisu, zostały również opracowane zalecenia dla pacjentów, które zostały zamieszczone poniżej.

Zalecenia

Pamiętaj:

- Dbaj o higienę snu i staraj się ograniczyć ilość stresujących sytuacji. Jeśli jesteś narażony na stres lub zbyt mało śpisz, ogranicz kaloryczność diety.
- Posiłki spożywaj powoli. Twój organizm może później odczuwać uczucie sytości i szybciej stawać się głodny. Dzięki wolniejszemu spożywaniu posiłków dajesz swojemu organizmowi więcej czasu na odebranie sygnału sytości.
- Planuj swoje zachowania żywieniowe. Nie zawsze chęć spożycia posiłku jest związana z faktycznym głodem.
- Spożywaj posiłki w spokoju nie w towarzystwie ekranu telewizora, komputera czy telefonu.
- Staraj się włączyć do swojego planu dnia codzienną umiarkowaną aktywność fizyczną na poziomie 60-75% tętna maksymalnego. Ćwiczenia powinny trwać nie mniej niż 60 minut dziennie. Przykładem takiego typu aktywności może być spacer czy jazda na rowerze.
- Uważaj na wpływ reklam w szczególności żywności typu fast-food. Osoby z Twoim wariantem genetycznym są bardziej na nie podatne. Oglądanie reklam czy przekazów z apetyczną żywnością może doprowadzić u Ciebie do niewłaściwych zachowań żywieniowych.

7.2.2. Dobór grupy badawczej i interwencja żywieniowa (PIII) – Etap V

W ramach niniejszej rozprawy, w celu doboru grupy badawczej, przeprowadzono przesiewowe genotypowanie w obrębie czterech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu: rs9939609, rs1121980, rs7903146 i rs10830963. Do dalszych badań włączono uczestników, którzy charakteryzowali się obecnością alleli ryzyka w co najmniej 3 z 4 oznaczanych SNP oraz BMI > 25 kg/m² lub WHtR ≥ 49. Wytypowani uczestnicy zostali poddani interwencji żywieniowej trwającej 28 dni w układzie badania naprzemiennego. W ramach interwencji dietetycznej grupa badana otrzymywała dziennie 250 g (2 x 125 g) wytworzonego w ramach eksperymentu jogurtu z dodatkiem LF 80 mg/100 g przez 21 dni. W grupie kontrolnej podawano jogurt naturalny przez 7 dni. Następnie następowała zamiana grup. Analizie zostały poddane takie parametry, jak: poziom hemoglobiny glikowanej czy parametry antropometryczne.

Genotypowanie

Na Wykresie 8 zaprezentowano wyniki przesiewowego genotypowania przeprowadzonego na grupie 135 osób (37 mężczyzn i 98 kobiet) populacji Polskiej. Wyniki zestawiono z danymi populacji europejskiej z bazy 1000 Genomów (Fairley i in., 2020). Wykres 8A ilustruje rozkład wariantów genetycznych w SNP rs9939609. Uzyskane wyniki wskazują na obecność 32,6% homozygot AA w badanej grupie, gdy w populacji referencyjnej wartość ta wynosiła 19,9%. Heterozygoty AT stanowiły 41,5% i 42,9%, odpowiednio w badaniu własnym i bazie referencyjnej. Z kolei, homozygoty TT nie niosące wariantu ryzyka reprezentowały 25,9% badanej populacji i 37,2% w bazie 1000 Genomów.

Na Wykresie 8B zaprezentowano rozkład wariantów genetycznych w SNP rs1121980. Różnice w dystrybucji wariantu największego ryzyka AA były bardzo widoczne, porównując aż 35,6% badanej populacji i tylko 23,3% w bazie referencyjnej. Wyniki rozkładu wariantu heterozygotycznego – AG były niemalże identyczne, gdyż stanowiły 42,2% i 42,1%, odpowiednio w badaniu własnym i bazie referencyjnej. Różnice zostały zaobserwowane w rozkładzie wariantu GG, który w badaniu własnym występował tylko u 22,2% populacji badanej, a w populacji europejskiej stanowił 34,6%.

Wykres 8C ilustruje rozkład wariantów genetycznych w SNP rs7903146. Niezwiązany z większym ryzykiem zaburzeń w gospodarce węglowodanowej wariant CC występował najczęściej (53,3% w badaniu własnym i 48,1% w bazie 1000 Genomów). Wariant

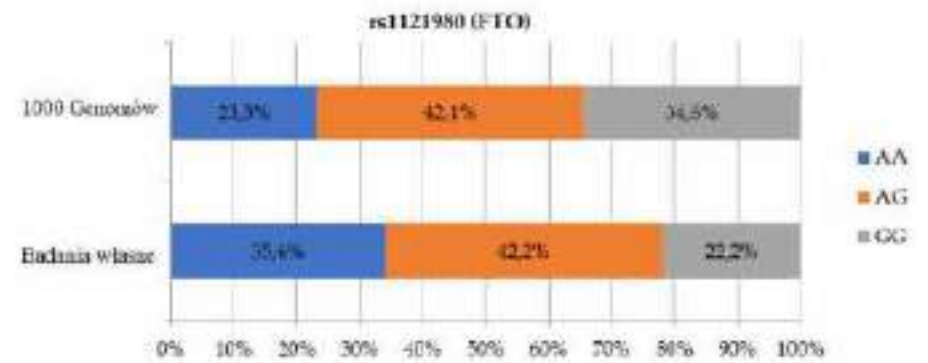
heterozygotyczny CT stwierdzono u 37,8% populacji w badaniu własnym i 40,4% w bazie referencyjnej. Homozygoty TT, noszące dwa allele ryzyka, stanowiły 8,9% i 11,5%, odpowiednio.

Natomiast, na Wykresie 8D przedstawiono rozkład wariantów genetycznych w SNP rs10830963. Wariant CC występował częściej w badaniu własnym (51,01%), niż w bazie referencyjnej (50,3%). Większą różnicę można było zaobserwować w rozkładzie wariantu heterozygotycznego CG, który stanowił 34,1% w badaniu własnym i 41,7% w bazie 1000 Genomów. Najrzadziej występował wariant ryzyka GG, tj. u 14,8% populacji w badaniu własnym i 8,0% w bazie 1000 Genomów.

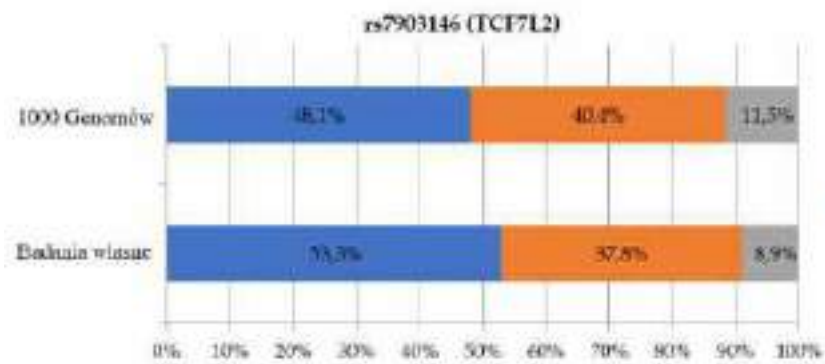
Jako uczestników badania wytypowano 19 osób, w tym 11 kobiet i 8 mężczyzn, którzy we wcześniejszym etapie wzięli udział w przesiewowym genotypowaniu i charakteryzowali się obecnością przynajmniej jednego allelu ryzyka w 3 z 4 oznaczanych SNP (rs9939609, rs1121980, rs7903146, rs10830963). W Tabeli 21 zamieszczono rozkład wariantów genetycznych w grupie zakwalifikowanej do badania. Każdy z uczestników badania charakteryzował się obecnością co najmniej jednego allelu ryzyka – A w rs9939609, który może przyczyniać się do zwiększonego spożycia pokarmu poprzez wpływ na regulację poziomu greliny i acylogreliny (Di Renzo i in., 2018; Saldaña-Alvarez i in., 2016). Dodatkowo, wszyscy członkowie grupy badanej posiadali przynajmniej jeden taki allel ryzyka w SNP rs1121980, z czego 68,42% było nosicielem wariantu AA i 31,58% AG. Allel A w SNP rs1121980 niesie ze sobą ryzyko częstszego występowania otyłości II i III stopnia oraz sprzyja wzmożonej konsumpcji pokarmów wysokotłuszczowych (Candráková i in., 2016; Saldaña-Alvarez i in., 2016). Z kolei, obecność allelu T w SNP rs7903146 ma powiązanie z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, np. brakiem poprawy insulinowrażliwości (Reinehr i in., 2008). W badanej grupie aż 78,95% populacji charakteryzowało się obecnością wariantu homozygotycznego TT, a wariant CT prezentowało 21,05%. Najmniej badanych było nosicielem allelu ryzyka G w rs10830963 – 42,11% skorelowanego z mniej efektywnymi osiąganiami w redukcji masy ciała podczas przebywania na diecie redukcyjnej (Goni i in., 2014).



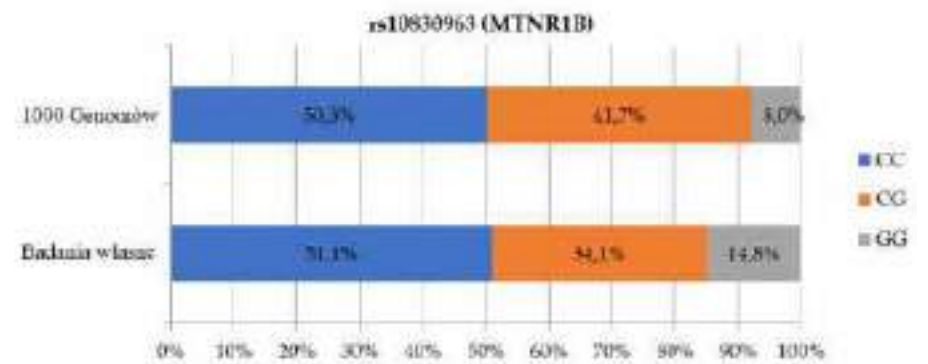
A)



B)



C)



D)

Wykres 8. Rozkład SNP A) rs9939609 B) rs1121980 C) rs7903146 D) rs10830963 w badanej populacji w odniesieniu do populacji europejskiej

Tabela 21. Rozkład wariantów ryzyka predysponujących do otyłości i zaburzeń gospodarki węglowodanowej w badanej populacji

Gen	SNP	Wariant genetyczny *	Kobiety (%)	Mężczyźni (%)	Populacja (%)
FTO	rs9939609	AA	100,00	62,50	84,21
		AT	0,00	37,50	15,79
		TT	0,00	0,00	0,00
FTO	rs1121980	AA	81,82	50,00	68,42
		AG	18,18	50,00	31,58
		GG	0,00	0,00	0,00
TCF7LN	rs7903146	TT	72,73	87,50	78,95
		CT	27,27	12,50	21,05
		CC	0,00	0,00	0,00
MTNR1B	rs10830963	GG	0,00	25,00	10,53
		CG	18,18	50,00	31,58
		CC	81,82	25,00	57,89

* rs9939609 – A (allel ryzyka), rs1121980 – A (allel ryzyka), rs7903146 – T (allel ryzyka), rs10830963 – G (allel ryzyka).

Parametry antropometryczne uczestników badania

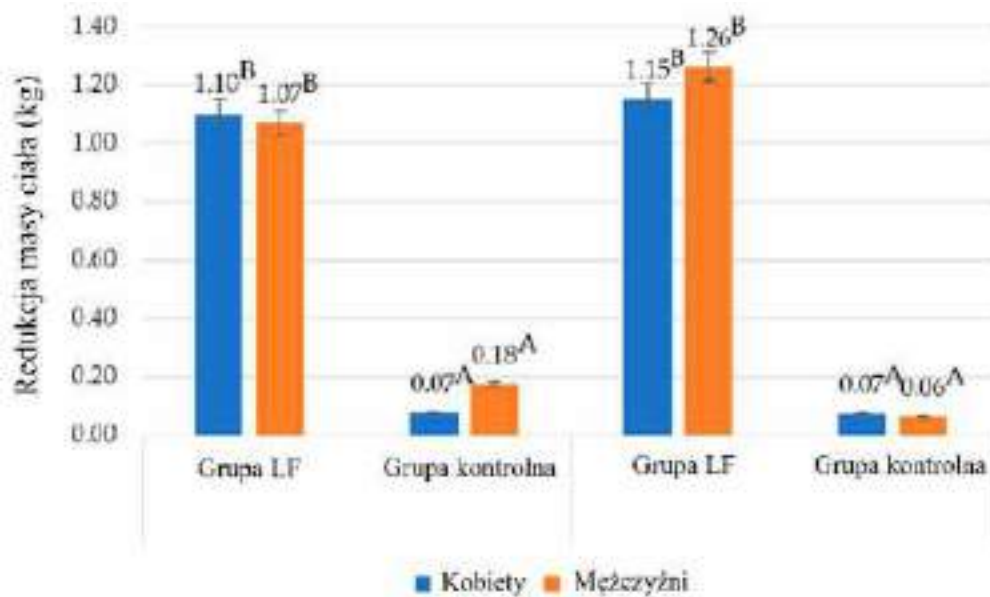
Charakterystyka uczestników badania została zaprezentowana w Tabeli 22. Średni wiek uczestników zakwalifikowanych do badania wynosił dla mężczyzn 38,8 lat a 35 lat dla kobiet. Średnia masa ciała była statystycznie istotnie ($p = 0,009$) niższa u kobiet – 79,8 kg, niż u mężczyzn – 88,7 kg. Obwód talii u kobiet wynosił średnio 96,3 cm, a u mężczyzn – 101,8 cm ($p = 0,032$). Identyczne wyniki dla kobiet i mężczyzn uzyskano w przypadku obwodu bioder – 107,3 cm. Dodatkowo, niemal identyczne okazały się również wartości dla BMI: kobiety – 29,4 kg/m², a mężczyźni – 29,5 kg/m² i wskaźnika WHtR: kobiety – 58,5, a mężczyźni – 58,7. Większe obwody uda zarejestrowano u kobiet – 59,1 cm, niż u mężczyzn – 58,4 cm. Znaczną ($p = 0,001$) rozbieżność odnotowano w przypadku procentowej zawartości tkanki tłuszczowej, która średnio wynosiła u kobiet 37,3%, a u mężczyzn – 28,5%.

Tabela 22. Charakterystyka uczestników badania (średnia \pm SD)

Parametr	Kobiety	Mężczyźni	p
Wiek (lata)	35,0 \pm 5,2	38,8 \pm 7,3	0,536
Wzrost (cm)	164,0 \pm 3,9	173,3 \pm 4,0	0,001
Masa ciała (kg)	79,8 \pm 5,4	88,7 \pm 6,8	0,009
Talia (cm)	96,3 \pm 3,9	101,8 \pm 4,5	0,032
Biodra (cm)	107,3 \pm 4,8	107,3 \pm 3,6	0,967
Udo (cm)	59,1 \pm 2,6	58,4 \pm 1,5	0,563
Zawartość tkanki tłuszczowej (%)	37,3 \pm 2,0	28,5 \pm 2,3	0,001
BMI (kg/m ²)	29,4 \pm 1,5	29,5 \pm 1,5	0,901
WHtR	58,5 \pm 2,3	58,7 \pm 2,2	0,869
HbA1c (%)	5,8 \pm 0,4	5,8 \pm 4,4	0,710

Wpływ konsumpcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną na masę ciała

Wyniki z redukcji masy ciała uczestników badania zamieszczono na Wykresie 9. Po 21 dniach interwencji żywieniowej zaobserwowano redukcję masy ciała w obu układach badania, tj. 7d/21d i 21d/7d. W układzie badania 7d/21d masa ciała uległa redukcji o 1,15 kg u kobiet i 1,26 kg u mężczyzn. W grupie kontrolnej odnotowano ubytek masy ciała wynoszący jedynie 0,07 kg u kobiet i 0,06 kg u mężczyzn. Wielkość redukcji masy ciała między grupą kobiet i mężczyzn była statystycznie nieistotna ($p > 0,05$). Istotna ($p = 0,000$) była natomiast wielkość redukcji masy ciała między grupą kontrolną, a grupą badaną. Bardzo przybliżone wyniki otrzymano w układzie badania 21d/7d. W grupie przyjmującej jogurt fortyfikowany LF zarejestrowano ubytek masy ciała u kobiet wynoszący 1,10 kg i 1,07 kg u mężczyzn. Grupa kontrolna zredukowała masę ciała jedynie o 0,07 kg – kobiety i 0,18 kg – mężczyźni. Nie zanotowano istotnych różnic ($p > 0,05$) między układem badania 21d/7d, a 7d/21d. Otrzymane wyniki sugerują, że spożycie jogurtów kontrolnych nie miało wpływu na masę ciała uczestników eksperymentu.



^{A, B} – różnice pomiędzy grupami badanymi w obrębie płci, istotne przy $p \leq 0,01$.

Wykres 9. Średnia redukcja masy ciała analizowanej populacji w układzie badania 21/7 dni i 7/21 dni

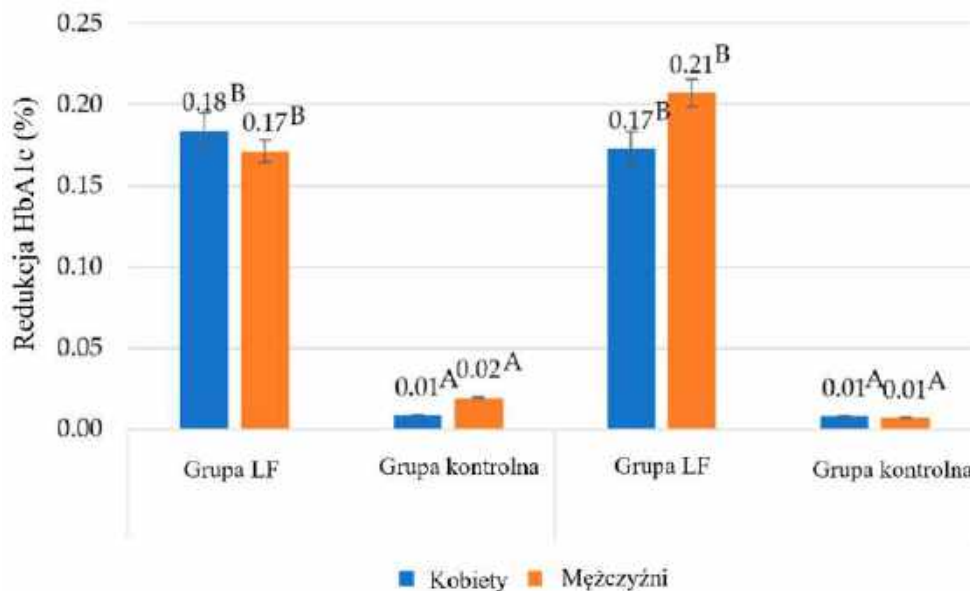
Obserwacje własne dotyczące redukcji masy ciała pokrywają się z doniesieniami innych autorów. Hassan i in. (2022) udokumentowali na modelu zwierzęcym, że konsumpcja jogurtu fortyfikowanego LF przez 45 dni w dawkach 50 i 100 mg/kg masy ciała, ograniczyła przyrost masy ciała u myszy. Również Ono i in. (2010) w badaniach na modelu ludzkim wykazali, że konsumpcja bLF może wpłynąć na redukcję masy ciała bez konieczności wprowadzania restrykcji kalorycznych. Efekty suplementacji LF na redukcję masy zostały potwierdzone przez innych autorów, choć nieliczne badania dotyczyły jogurtu jako wektora LF. W większości przypadków LF była podawana jako roztwór wodny lub suplement doustny (Li i in., 2022; Morishita i in., 2013; Xiong i in., 2018). Przykładowo, Li i in. (2022) stosowali 2% roztwór LF w wodzie pitnej u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową, co skutkowało redukcją poziomu tłuszczu trzewnego ($p < 0,05$). W badaniu przeprowadzonym przez Xiong i in. (2018) u myszy, również karmionych dietą wysokotłuszczową, podawano 100 mg bLF/kg masy ciała przez 15 tygodni. Po tym okresie odnotowano obniżenie przyrostu masy ciała i redukcję tłuszczu trzewnego. Morishita i in. (2013), w eksperymencie trwającym 28 dni, stwierdzili, że suplementacja 100 mg bLF u myszy redukuje krezkową tkankę tłuszczową ($p < 0,05$). Na uzyskane w badaniu własnym wyniki mógł również mieć wpływ wektor, w którym LF była podawana. Sam jogurt może ograniczać spożycie kalorii z dietą

i kontrolować glikemię (Panahi i Tremblay, 2016). Madjd i in. (2016) zarejestrowali utratę masy ciała wynoszącą 5,03 kg i redukcję obwodu talii o 4,8 cm podczas dodatku do diety 400 g/dziennie niskotłuszczowego jogurtu u kobiet z otyłością I (BMI 30,0-34,9 kg/m²) oraz II (BMI 35,0-39,9 kg/m²) stopnia. Okres badania wynosił 12 tygodni.

Wpływ konsumpcji jogurtu fortyfikowanego laktoferyną na poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c)

HbA1c jest czynnikiem, który pozwala monitorować kontrolę glikemii. Ze względu na ciągły proces prowadzący do powstawania HbA1c odzwierciedla głównie długoterminowe poziomy glukozy we krwi, a nie krótkotrwałe wahania, które mogą być spowodowane, np. spożyciem glukozy czy podaniem insuliny (Kilpatrick i in., 2007; Sikaris, 2009). Na Wykresie 10 zaprezentowano procentowe zmiany poziomu HbA1c w trakcie trwania badania. W układzie eksperymentalnym 21/7d odnotowano redukcję poziomu HbA1c o 0,17% wśród mężczyzn i o 0,18% u kobiet. U grupy kontrolnej odnotowano redukcję na poziomie 0,02% u mężczyzn i 0,01% u kobiet. Różnice pomiędzy protokołami eksperymentu 7/21d i 21/7d były statystycznie nieistotne. W układzie 7/21d zaobserwowano redukcję HbA1c o 0,21% u mężczyzn i 0,17% u kobiet. W grupie kontrolnej wartość ta wynosiła 0,01%, zarówno dla mężczyzn, jak i kobiet. Trudno jest odnieść otrzymane wyniki do prac innych autorów, ponieważ w pracach, gdzie analizowano jogurt fortyfikowany LF, do obserwacji gospodarki węglowodanowej wykorzystywane były inne parametry niż HbA1c, a dokładnie poziom glukozy w osoczu. W badaniu Hassan i in. (2022) suplementacja trwająca 45 dni u szczurów otrzymujących jogurt fortyfikowany w 50 mg lub 100 mg LF/kg m.c. wykazała korzystniejsze wyniki w redukcji poziomu glukozy, w porównaniu do grupy kontrolnej karmionej dietą wysokotłuszczową. Takie same tendencje odnotowano również w badaniach Sun i in. (2016). Podawanie 100 mg/kg m.c. LF przez okres 12-stu tygodni spowodowało redukcję poziomu glukozy do wartości kontrolnych u myszy traktowanych dietą wysokotłuszczową. W innych doniesieniach naukowych, gdzie nośnikiem LF nie był jogurt, również stwierdzono pozytywny wpływ suplementacji na gospodarkę węglowodanową. W badaniach Li i in. (2022) pojenie myszy 2% wodnym roztworem LF przez okres 12-stu tygodni obniżyło poziom glukozy we krwi ($p < 0,05$). Xiong i in. (2018) również stwierdzili, że wprowadzenie do diety 100 mg bLF obniżyło poziom glukozy. Wydaje się zasadne twierdzić, że jogurt naturalny, który był nośnikiem LF, mógł wpłynąć na uzyskane wyniki w redukcji poziomu HbA1c. Z pracy Madjd

i in. (2016) wynika, że wprowadzenie do diety jogurtu o niskiej zawartości tłuszczu obniżyło poziom HbA1c średnio o 0,28%. Dodatkowo autorzy odnotowali inne korzyści, tj. redukcję wskaźnika HOMA-IR o 0,42, spadek stężenia glukozy w osoczu o 0,24 mmol/l i insuliny o 1,32 mU/ml.



^{A, B} – różnice pomiędzy grupami badanymi w obrębie płci, istotne przy $p \leq 0,01$.

Wykres 10. Średnia redukcja HbA1c (%) w analizowanej populacji w układzie badania 21/7 dni i 7/21 dni

7.2.3. Analiza korelacji (badania własne) – Etap VI

W ramach niniejszej dysertacji przeprowadzono analizę korelacji rang Spearmana, która nie została włączona do **PIII**. Wybrane wyniki dla grupy badawczej bez podziału na płeć zostały przedstawione w Tabeli 23, dla kobiet – Tabela 24 i mężczyzn – Tabela 25. Otrzymane korelacje w wielu przypadkach były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Zauważono, że BMI wysoko dodatnio korelowało z początkową masą ciała ($r = 0,621$). Korelacja ta była silniejsza w przypadku kobiet ($r = 0,718$), niż w przypadku mężczyzn ($r = 0,619$). Dodatkowo, z początkową masą ciała bardzo wysoko dodatnio skorelowany był również obwód talii uczestników badania ($r = 0,851$). Zaobserwowano jednak dużą różnicę w tej korelacji pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn, dla których wartość współczynnika r wynosiła,

odpowiednio: 0,828 i 0,590. Co więcej, w przypadku kobiet uzyskano bardzo wysoką dodatnią korelację początkowej masy ciała z obwodem bioder, wynoszącą aż $r = 0,872$.

Natomiast wskaźnik WHtR wykazał wysoką dodatnią korelację z początkowym obwodem uda w grupie badanej, wynoszącą $r = 0,611$. Warto zwrócić uwagę na tę zależność, ponieważ wskaźnik WHtR zazwyczaj używany jest do opisywania otyłości centralnej oraz ryzyka chorób kardiologicznych (Wakabayashi, 2013). Wyższe wartości obwodu uda związane są z występowaniem otyłości pośladowko-udowej (gynoidalnej), dlatego ciekawy wydaje się fakt powiązania tego parametru z otyłością androidalną. WHtR wykazał także wysoką dodatnią korelację z obwodem talii ($r = 0,657$), która była tylko niewiele wyższa, niż z obwodem uda. Sam obwód talii stanowi jednak składową wzoru do obliczenia WHtR, co wpływa na wartość korelacji.

Zmiana masy ciała wykazywała prawie pełną – bliską wartości „1” dodatnią korelację ze zmianą poziomu HbA1c ($r = 0,958$). Uzyskane zależności znalazły potwierdzenie w innych doniesieniach naukowych, które co prawda nie korzystały z analizy korelacji rang Spearmana, i opierały się na analizie masy ciała i BMI. W badaniach Babikr i in. (2016) współczynnik korelacji Pearsona dla HbA1c i BMI u chorych na cukrzycę wykazał dodatnią korelację ($r = 0,240$, $p < 0,0001$). Ponadto, w badaniach Boye i in. (2021) stwierdzono, że wyższa klasyfikacja BMI jest powiązana z wyższymi wartościami HbA1c. Dodatkowo, Sisodia i Chouhan (2019) również wykazali istotną dodatnią korelację między BMI, a złą kontrolą glikemii (wyższy poziom HbA1c).

Zaobserwowano również istotne statystycznie ($p < 0,05$) korelacje między oznaczanymi SNP, a parametrami antropometrycznymi. Początkowa masa ciała w grupie kobiet i mężczyzn była ujemnie skorelowana z wariantem TT w rs7903146, odpowiednio $r = 0,581$ i $0,577$. Według doniesień Valeeva i in. (2022), nosiciele allelu T w rs7903146 cechowali się większymi spadkami masy tkanki tłuszczowej, w porównaniu z tymi, którzy cechowali się wariantem homozygotycznym CC. W przypadku mężczyzn wartość BMI była wysoko dodatnio skorelowana z SNP rs10830963 – wariant GG ($r = 0,694$) i rs7903146 – wariant TT ($r = 0,577$). Ponadto, w grupie mężczyzn zaobserwowano wysoką dodatnią korelację procentowej zawartości tkanki tłuszczowej z SNP rs7903146 – wariant TT, wynoszącą 0,581.

W badaniach uzyskano również wysoką dodatnią korelację ($r = 0,513$) między obwodem talii u mężczyzn, a SNP rs9939609 – wariant AA. W grupie mężczyzn obwód uda wysoko dodatnio korelował ($r = 0,553$) z obecnością wariantu GG w rs10830963. W żeńskiej części grupy badawczej obwód bioder był przeciętnie dodatnio skorelowany z występowaniem

wariantu TT w rs1121980 ($r = 0,451$). Jedynym parametrem antropometrycznym bezpośrednio związanym z % zawartością tkanki tłuszczowej w grupie kobiet i mężczyzn z genetyczną predyspozycją do otyłości jest obwód talii, którego współczynnik korelacji wynosi odpowiednio 0,814 i 0,685. Uzyskane wyniki wskazują, że parametr ten może być wykorzystany do oceny wielkości otyłości, podobnie jak powszechnie stosowany BMI czy WHtR. Najlepszym parametrem do oceny zawartości tkanki tłuszczowej w grupie kobiet okazał się obwód uda, którego współczynnik korelacji z zawartością tkanki tłuszczowej wynosi 0,883. Wartość tego współczynnika była wyższą od wartości współczynnika dla BMI i WHtR odpowiednio 0,065 i 0,220.

Tabela 23. Wybrane korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy analizowanymi parametrami, bez podziału na płeć uczestników (współczynnik korelacji, r)

Parametr	Wzrost	Początkowa masa ciała	BMI	WHtR	FMI	% tkanka tłuszczowa	Obwód talii	Obwód uda	Obwód bioder	Obwód ramienia	Zmiana masy ciała	Zmiana poziomu HbA1c
Wzrost	1,000	0,739	0,031	0,008	-0,573	-0,604	0,623	-0,128	0,080	0,228	0,112	0,115
Początkowa masa ciała	0,739	1,000	0,621	0,349	-0,132	-0,275	0,851	0,271	0,238	0,385	0,111	0,113
BMI	0,031	0,621	1,000	0,308	0,516	0,304	0,475	0,513	0,331	0,113	0,007	0,018
WHtR	0,008	0,349	0,308	1,000	0,161	0,176	0,657	0,611	0,275	0,498	0,020	0,095
FMI	-0,573	-0,132	0,516	0,161	1,000	0,948	-0,085	0,438	0,199	-0,208	-0,062	-0,044
% tkanka tłuszczowa	-0,604	-0,275	0,304	0,176	0,948	1,000	-0,118	0,477	0,269	-0,138	-0,061	-0,035
Obwód talii	0,623	0,851	0,475	0,657	-0,085	-0,118	1,000	0,498	0,340	0,464	0,141	0,190
Obwód uda	-0,128	0,271	0,513	0,611	0,438	0,477	0,498	1,000	0,726	0,337	0,021	0,089
Obwód bioder	0,080	0,238	0,331	0,275	0,199	0,269	0,340	0,726	1,000	0,201	0,076	0,075
Obwód ramienia	0,228	0,385	0,113	0,498	-0,208	-0,138	0,464	0,337	0,201	1,000	-0,008	-0,016
Zmiana masy ciała	0,112	0,111	0,007	0,020	-0,062	-0,061	0,141	0,021	0,076	-0,008	1,000	0,958
Zmiana poziomu HbA1c	0,115	0,113	0,018	0,095	-0,044	-0,035	0,190	0,089	0,075	-0,016	0,958	1,000

Oznaczone na czerwono współczynniki korelacji (r) są istotne przy $p < 0,05$.

Tabela 24. Wybrane korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy analizowanymi parametrami, w grupie kobiet (współczynnik korelacji, r)

Parametr	Wzrost	Początkowa masa ciała	BMI	WHtR	FMI	% tkanka tłuszczowa	Obwód talii	Obwód uda	Obwód bioder	Obwód ramienia	Zmiana masy ciała	Zmiana poziomu HbA1c
Wzrost	1,000	0,648	0,027	-0,014	0,041	0,014	0,303	0,159	0,424	-0,205	0,010	0,037
Początkowa masa ciała	0,648	1,000	0,718	0,482	0,736	0,691	0,828	0,741	0,872	0,395	0,097	0,119
BMI	0,027	0,718	1,000	0,564	0,945	0,818	0,731	0,769	0,716	0,599	0,023	0,037
WHtR	-0,014	0,482	0,564	1,000	0,682	0,664	0,823	0,709	0,413	0,371	0,066	0,186
FMI	0,041	0,736	0,945	0,682	1,000	0,945	0,823	0,883	0,743	0,705	0,022	0,066
% tkanka tłuszczowa	0,014	0,691	0,818	0,664	0,945	1,000	0,814	0,883	0,752	0,729	0,042	0,090
Obwód talii	0,303	0,828	0,731	0,823	0,823	0,814	1,000	0,928	0,798	0,439	0,127	0,186
Obwód uda	0,159	0,741	0,769	0,709	0,883	0,883	0,928	1,000	0,748	0,582	0,097	0,156
Obwód bioder	0,424	0,872	0,716	0,413	0,743	0,752	0,798	0,748	1,000	0,511	0,128	0,093
Obwód ramienia	-0,205	0,395	0,599	0,371	0,705	0,729	0,439	0,582	0,511	1,000	0,023	0,012
Zmiana masy ciała	0,010	0,097	0,023	0,066	0,022	0,042	0,127	0,097	0,128	0,023	1,000	0,941
Zmiana poziomu HbA1c	0,037	0,119	0,037	0,186	0,066	0,090	0,186	0,156	0,093	0,012	0,941	1,000

Oznaczone na czerwono współczynniki korelacji (r) są istotne przy $p < 0,05$.

Tabela 25. Wybrane korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy analizowanymi parametrami, w grupie mężczyzn (współczynnik korelacji, r)

Parametr	Wzrost	Początkowa masa ciała	BMI	WHtR	FMI	% tkanka tłuszczowa	Obwód talii	Obwód uda	Obwód bioder	Obwód ramienia	Zmiana masy ciała	Zmiana poziomu HbA1c
Wzrost	1,000	0,619	0,048	-0,024	0,476	0,826	0,759	-0,220	-0,434	-0,216	0,139	0,154
Początkowa masa ciała	0,619	1,000	0,619	0,119	0,905	0,563	0,590	-0,220	-0,699	-0,216	0,080	0,024
BMI	0,048	0,619	1,000	-0,167	0,810	0,323	0,012	0,171	-0,169	-0,359	0,021	0,000
WHtR	-0,024	0,119	-0,167	1,000	-0,143	0,000	0,590	0,439	0,060	0,575	-0,030	-0,053
FMI	0,476	0,905	0,810	-0,143	1,000	0,575	0,301	-0,146	-0,627	-0,275	0,044	0,000
% tkanka tłuszczowa	0,826	0,563	0,323	0,000	0,575	1,000	0,685	0,270	-0,139	0,036	0,097	0,146
Obwód talii	0,759	0,590	0,012	0,590	0,301	0,685	1,000	0,198	-0,195	0,194	0,103	0,108
Obwód uda	-0,220	-0,220	0,171	0,439	-0,146	0,270	0,198	1,000	0,728	0,577	-0,049	0,018
Obwód bioder	-0,434	-0,699	-0,169	0,060	-0,627	-0,139	-0,195	0,728	1,000	0,248	-0,030	0,054
Obwód ramienia	-0,216	-0,216	-0,359	0,575	-0,275	0,036	0,194	0,577	0,248	1,000	-0,113	-0,104
Zmiana masy ciała	0,139	0,080	0,021	-0,030	0,044	0,097	0,103	-0,049	-0,030	-0,113	1,000	0,982
Zmiana poziomu HbA1c	0,154	0,024	0,000	-0,053	0,000	0,146	0,108	0,018	0,054	-0,104	0,982	1,000

Oznaczone na czerwono współczynniki korelacji (r) są istotne przy $p < 0,05$.

Podsumowanie – Etap III, V i VI

Przeprowadzone badania wskazują na wyższą częstotliwość występowania wariantów ryzyka w czterech analizowanych polimorfizmach pojedynczego nukleotydu – SNP (rs9939609, rs1121980, rs7903146 i rs10830963) w badanej populacji polskiej w porównaniu do populacji europejskiej. Zastosowanie jogurtu fortyfikowanego 80 mg/100 g bLF w 21-dniowej dietoterapii populacji o określonym profilu genetycznym w dawce 250 g dziennie wykazało istotny wpływ na redukcję masy ciała oraz na redukcję poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Zaobserwowano wysoką, bliską wartości „1”, dodatnią korelację między zmianą masy ciała, a zmianą poziomu HbA1c ($r = 0,958$). Otrzymane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania jogurtu z LF jako składnika w dietoterapii osób o określonym profilu genetycznym. Konieczne są jednak dalsze badania w celu ustalenia protokołów oceny skuteczności działania tego produktu spożywczego lub składnika funkcjonalnego.

8. Wnioski

Osiągnięcie naukowe, stanowiące zbiór trzech publikacji oraz nieopublikowanych wyników badań i opracowań własnych, dotyczy możliwości zastosowania laktoferyny jako składnika o szczególnych właściwościach prozdrowotnych w żywieniu osób o określonym profilu genetycznym, z określoną predyspozycją genetyczną do nadwagi i otyłości. Uzyskane wyniki umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Badania literaturowe wykazały możliwość zastosowania laktoferyny we wspomaganium leczenia chorób cywilizacyjnych, w tym równowagi węglowodanowej oraz nadwagi i otyłości. Zastosowanie laktoferyny w jogurtach jest prawnie uregulowane i zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem Komisji (UE) 2018/1023 z dnia 23 lipca 2018 roku, białko to zostało dozwolone do stosowania w napojach na bazie fermentowanego mleka czy produktach na bazie jogurtu w ilości 80 mg/100 g produktu.
2. Odpowiednio prowadzony proces wytwarzania jogurtu fortyfikowanego laktoferyną w ilości 80 mg/100 g produktu gotowego nie wpłynął niekorzystnie na badane właściwości fizyko-chemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne jogurtu.
3. Wpływ dodatku laktoferyny do jogurtu przyczynił się do istotnych zmian w zawartości suchej masy, w tym białka ogólnego i laktoferyny, ogólnej liczbie bakterii, jak również w wartościach parametrów barwy ocenianych instrumentalnie (koordynat: L*, a* i b*). Jednakże, zmiany te nie wpłynęły negatywnie na ogólną jakość i akceptowalność jogurtów fortyfikowanych laktoferyną.
4. Okres przechowywania chłodniczego jogurtów istotnie wpłynął na zawartość suchej masy, w tym białka ogólnego i laktoferyny, kwasowość – wartość pH i zawartość kwasu mlekowego, parametry tekstury (jędrność, zwięzłość i lepkość dynamiczną), aktywność wody, zdolność zatrzymywania wody, spontaniczną synerezę serwatki oraz wartości parametrów barwy ocenianych instrumentalnie. Zmiany te wynikają z procesów naturalnie zachodzących w czasie przechowywania fermentowanych produktów mlecznych. Uzyskane wyniki są satysfakcjonujące i wskazują na dużą stabilność wytworzonych jogurtów.
5. Cztery wytypowane i analizowane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu – SNP: rs9939609, rs1121980, rs7903146, rs10830963 charakteryzowały się wyższą częstością występowania w badanej populacji polskiej niż w populacji europejskiej. Największe

różnice zanotowano w rozkładzie wariantów ryzyka nadwagi i otyłości w polimorfizmie: rs9939609 AA i rs1121980 AA, odpowiednio: 11,1% i 10,7% wyższe w populacji badanej.

6. Jogurty, fortyfikowane laktoferyną w ilości 80 mg/100 g produktu, wytworzone w warunkach laboratoryjnych i na skalę przemysłową charakteryzowały się porównywalnymi właściwościami fizykochemicznymi, mikrobiologicznymi i organoleptycznymi.
7. Jogurt fortyfikowany laktoferyną może być stosowany w dietoterapii nadwagi i otyłości. Zastosowanie opracowanej diety prawidłowej, w której uwzględniono dwukrotne wprowadzenie w ciągu dnia jogurtu fortyfikowanego laktoferyną, utrzymywanej przez 21 dni w grupie badanej posiadającej warianty ryzyka w wybranych polimorfizmach pojedynczego nukleotydu, przyczynia się do wyższej redukcji masy ciała o około 1 kg w porównaniu do grupy kontrolnej.
8. Jogurt fortyfikowany laktoferyną może być stosowany w zaburzeniach przemiany węglowodanów, objawiających się wzrostem stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Zastosowanie opracowanej diety prawidłowej, w której uwzględniono dwukrotne wprowadzenie w ciągu dnia jogurtu fortyfikowanego laktoferyną, utrzymywanej przez 21 dni w grupie badanej posiadającej warianty ryzyka w wybranych polimorfizmach pojedynczego nukleotydu, przyczynia się do redukcji poziomu hemoglobiny glikowanej o około 0,2 p.p. w porównaniu do grupy kontrolnej.
9. Parametr antropometryczny, jakim jest obwód talii, może być wykorzystany do oceny zawartości tkanki tłuszczowej u kobiet i mężczyzn, podobnie jak powszechnie stosowane wskaźniki takie, jak BMI i WHtR. Najlepszym parametrem antropometrycznym do oceny zawartości tkanki tłuszczowej w grupie otyłych kobiet jest obwód uda, czego nie stwierdzono dla mężczyzn. Redukcja masy ciała wykazywała prawie pełną – bliską wartości „1”, dodatnią korelację ze zmianą poziomu hemoglobiny glikowanej – HbA1c ($r = 0,958$).
10. Zastosowanie jogurtu fortyfikowanego laktoferyną jest dobrym postępowaniem profilaktycznym w żywieniu osób z określoną predyspozycją genetyczną do nadwagi i otyłości. Jednakże ocena skuteczności profilaktycznej dietoterapii wymaga dalszych badań w tym ustanowienia protokołów oceny skuteczności działania profilaktycznego.

9. Literatura

- Akal, H.C., Ozturkoglu-Budak, S., Bereli, N., Cimen, D., Akgonullu, S. (2022). Effect of donkey milk lactoferrin and lysozyme on yoghurt properties. *Mljekarstvo*, 72(2), 77-87. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2022.0202>
- Akalın, A. S., Unal, G., Dinkci, N., Hayaloglu, A. A. (2012). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3617-3628. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5297>
- Arslaner, A., Salik, M. A., Bakirci, İ. (2021). The effects of adding Hibiscus sabdariffa L. flowers marmalade on some quality properties, mineral content and antioxidant activities of yogurt. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 223-233. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04533-z>
- Ayar, A., Sicramaz, H., Cetin, I. (2016). The effect of bovine colostrum on the lactic flora of yoghurt and kefir. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 3, 1063-1074.
- Babikr, W. G., Alshahrani, A. S. A., Hamid, H. G. M., Abdelraheem, A. H. M. K., Shalayel, M. The correlation of HbA1c with body mass index and HDL-cholesterol in type 2 diabetic patients. 27(4), 1280-1283.
- Baryłko-Pikielna, N., Matuszewska, I. (2014). *Sensoryczne badania żywności: Podstawy, metody, zastosowania (Wyd. 2)*. Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, Kraków.
- Bhatt, S. P., Misra, A., Pandey, R. M. (2020). Rs7903146 (C/T) polymorphism of Transcription factor 7 like 2 (TCF7L-2) gene is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease in Asian Indians. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(3), 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.02.011>
- Bierzuńska, P., Cais-Sokolińska, D., Yiğit, A. (2019). Storage Stability of Texture and Sensory Properties of Yogurt with the Addition of Polymerized Whey Proteins. *Foods*, 8(11), 548. <https://doi.org/10.3390/foods8110548>
- Bong, D. D., Moraru, C. I. (2014). Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: Effects on processing and product properties. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1259-1269. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7488>

- Boye, K. S., Lage, M. J., Shinde, S., Thieu, V., Bae, J. P. (2021). Trends in HbA1c and Body Mass Index Among Individuals with Type 2 Diabetes: Evidence from a U.S. Database 2012-2019. 117335 Bytes. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.14610426>
- Brodziak, A., Barłowska, J., Król, J., Litwińczuk, Z. (2012). Effect of Breed and Feeding System on Content of Selected Whey Proteins in Cow's Milk in Spring-Summer and Autumn-Winter Seasons. *Annals of Animal Science*, 12(2), 261-269. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0022-6>
- Brodziak, A., Król, J., Barłowska, J., Teter, A., Florek, M. (2020). Changes in the Physicochemical Parameters of Yoghurts with Added Whey Protein in Relation to the Starter Bacteria Strains and Storage Time. *Animals*, 10(8), 1350. <https://doi.org/10.3390/ani10081350>
- Brodziak, A., Król, J., Litwińczuk, Z. (2014). Ocena zawartości składników frakcji białkowej w różnych rodzajach mleka spożywczego. W: *Właściwości produktów i surowców żywnościowych : wybrane zagadnienia / red. Tomasz Tarko (i in.)*. Kraków, Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, 4-14, 978-83-937001-2-7.
- Cais-Sokolińska, D., Pikul, J. (2006). Use of colour measurement to evaluate yoghurt quality during storage. *Italian Journal of Food Science*, 18, 63-71.
- Cais-Sokolińska, D., Walkowiak-Tomczak, D. (2021). Consumer-perception, nutritional, and functional studies of a yogurt with restructured elderberry juice. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1318-1335. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18770>
- Candráková, K., Trakovická, A., Candrák, J., Gábor, M., Miluchová, M. (2016). Effect of FTO rs1121980 to Body Mass Index. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 19(Special issue), 114-122. <https://doi.org/10.15414/afz.2016.19.si.114-122>
- CIE. (2004). *Colorimetry*, 3rd ed.; Commission International de l'Eclairage: Vienna, Austria, 16-20. <https://cielab.xyz/pdf/cie.15.2004%20colorimetry.pdf> (dostęp online 17.09.2022)
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>

Codex Stan 243-2003. (2003). Codex Standard for Fermented Milks. Adopted in 2003. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&iurl=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf (dostęp online 03.06.2023).

Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. (2018). Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2018/1023 z dnia 23 lipca 2018 r. w sprawie sprostowania rozporządzenia wykonawczego (UE) 2017/2470 ustanawiającego unijny wykaz nowej żywności. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1023/oj?locale=pl (dostęp online 27.06.2023)

Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. (2005). Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073> (dostęp online 20.05.2023).

Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. (2018). Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2018/1023 z dnia 23 lipca 2018 r. w sprawie sprostowania rozporządzenia wykonawczego (UE) 2017/2470 ustanawiającego unijny wykaz nowej żywności. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1023> (dostęp online 23.10.2022).

Conesa, C., Sánchez, L., Rota, C., Pérez, M.-D., Calvo, M., Farnaud, S., Evans, R. W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.005>

Cropano, C., Santoro, N., Groop, L., Dalla Man, C., Cobelli, C., Galderisi, A., Kursawe, R., Pierpont, B., Goffredo, M., Caprio, S. (2017). The rs7903146 Variant in the TCF7L2 Gene Increases the Risk of Prediabetes/Type 2 Diabetes in Obese Adolescents by Impairing β -Cell Function and Hepatic Insulin Sensitivity. *Diabetes Care*, 40(8), 1082-1089. <https://doi.org/10.2337/dc17-0290>

Darmawan, K. K., Karagiannis, T. C., Hughes, J. G., Small, D. M., Hung, A. (2020). High temperature induced structural changes of apo-lactoferrin and interactions with β -lactoglobulin

and α -lactalbumin for potential encapsulation strategies. *Food Hydrocolloids*, 105, 105817. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105817>

Das, A., Seth, R. (2017). Chemical compositional analysis and physical attributes of curd fortified with bovine colostrum whey powder. 5, 334-338.

De Brabandere, A. G., De Baerdemaeker, J. G. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*, 41(3-4), 221-227. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00096-5)

De Luis, D. A., Izaola, O., Primo, D., Aller, R. (2020). A circadian rhythm-related MTNR1B genetic variant (rs10830963) modulate body weight change and insulin resistance after 9 months of a high protein/low carbohydrate vs a standard hypocaloric diet. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 34(4), 107534. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107534>

Denisova, D. V., Gurazheva, A. A., Maximov, V. N. (2022). Associations of polymorphisms of some genes with excessive weight in a population sample of young citizens of Novosibirsk. *Atherosclerosis*, 17(4), 35-42. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-4-35-42>

Di Renzo, L., Cioccoloni, G., Falco, S., Abenavoli, L., Moia, A., Sinibaldi Salimei, P., De Lorenzo, A. (2018). Influence of FTO rs9939609 and Mediterranean diet on body composition and weight loss: A randomized clinical trial. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1680-7>

Dimitrellou, D., Solomakou, N., Kokkinomagoulos, E., Kandyliis, P. (2020). Yogurts Supplemented with Juices from Grapes and Berries. *Foods*, 9(9), 1158. <https://doi.org/10.3390/foods9091158>

Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A. Y., Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.003>

Fairley, S., Lowy-Gallego, E., Perry, E., Flicek, P. (2020). The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz836>

Franco, I., Castillo, E., Pérez, M. D., Calvo, M., Sánchez, L. (2010). Effect of bovine lactoferrin addition to milk in yogurt manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4480-4489. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3006>

Franco, I., Pérez, M. D., Conesa, C., Calvo, M., Sánchez, L. (2018). Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. *Food Research International*, 106, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.016>

Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A. R., Ebrahim, S., McCarthy, M. I. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, 316(5826), 889-894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>

Fujishima, H., Okada, N., Matsumoto, K., Shimizu, E., Fukuda, S., Tomita, M. (2020). Conjunctival Injection Reduction in Patients with Atopic Keratoconjunctivitis Due to Synergic Effect of Bovine Enteric-Coated Lactoferrin in 0.1% Tacrolimus Ophthalmic Suspension. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), 3093. <https://doi.org/10.3390/jcm9103093>

Glibowski, P., Rybak, P. (2016). Rheological and sensory properties of stirred yoghurt with inulin-type fructans. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 122-128. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12231>

Godlewska, K. (2012). Additives: How to determine the best-before date for milk and milk products. *Forum Mlecz Biznes*, 15, 1-3.

Goni, L., Cuervo, M., Milagro, F. I., Martínez, J. A. (2014). Gene-Gene Interplay and Gene-Diet Interactions Involving the MTNR1B rs10830963 Variant with Body Weight Loss. *Lifestyle Genomics*, 7(4-6), 232-242. <https://doi.org/10.1159/000380951>

Gürbüz, Z., Erkaya-Kotan, T., Şengül, M. (2021). Evaluation of physicochemical, microbiological, texture and microstructure characteristics of set-style yoghurt supplemented with quince seed mucilage powder as a novel natural stabiliser. *International Dairy Journal*, 114, 104938. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104938>

Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., Qvist, K. B. (2003). Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides.

Journal of Dairy Science, 86(5), 1632-1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73748-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73748-5)

Hassan, M. A., Abdelmaksoud, T. G., Abd El-Maksoud, A. A. (2022). Effects of Lactoferrin Supplemented with Fermented Milk on Obesity-Associated Pancreatic Damage in Rats. *Life*, 12(12), 2019. <https://doi.org/10.3390/life12122019>

Huang, B., Wang, Y., Qin, L., Wei, Q., Liu, N., Jiang, M., Yu, H., Yu, X. (2019). A functional polymorphism rs10830963 in melatonin receptor 1B associated with the risk of gestational diabetes mellitus. *Bioscience Reports*, 39(12), BSR20190744. <https://doi.org/10.1042/BSR20190744>

IDF/ISO Standard. (1991). *Yogurt. Determination of Titratable Acidity*. No. 150. ISO: Bruksela, Belgia.

ISO 4121:2003. (2003). *Sensory Analysis – Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales*. ISO: Genewa, Szwajcaria.

ISO 6810:1995. (1955), *Składniki mieszanek gumowych – Popiół – Oznaczanie powierzchni – Metody adsorpcji CTAB*. ISO: Genewa, Szwajcaria.

Jamka, M. (2017). Historical overview on knowledge about lactoferrin. *Acta Medicorum Polonorum*, 7(2), 44-53.

Kar, K., Munim, Md. A., Fariha, A., Roy, A. S., Rahman, Md. I., Akter, S., Tonmoy, M. I. Q., Alam, M. R., Raunak, A. I. B., Selim, S., Hossain, Md. M., Al Reza, H., Bahadur, N. M., Hossain, M. S. (2023). Association of an intronic SNP rs9939609 in FTO gene with type 2 diabetes mellitus among Bangladeshi population: A case–control study combined with updated meta-analysis. *Human Gene*, 35, 201133. <https://doi.org/10.1016/j.humgen.2022.201133>

Karam-Allah, A. A., Abo-Zaid, E. M., Refay, M. M. M., Shaanan, H. A., Abdella, A. S., Hassanin, A. M., EL Waseif, M. A. (2022). Functional stirred Yoghurt fortified with buffalo, bovine, mix colostrum and lactoferrin, effect of lactoferrin on pathogenic bacteria and amino acids of buffalo, bovine colostrum and lactoferrin. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(7), 583-594. <https://dx.doi.org/10.21608/ejchem.2021.106920.4907>

- Ke, C., Lan, Z., Hua, L., Ying, Z., Humina, X., Jia, S., Weizheng, T., Ping, Y., Lingying, C., Meng, M. (2015). Iron metabolism in infants: Influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition*, 31(2), 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.07.006>
- Khalil, O. S. F., Ismail, H. A., Elkot, W. F. (2022). Physicochemical, functional and sensory properties of probiotic yoghurt flavored with white sapote fruit (*Casimiroa edulis*). *Journal of Food Science and Technology*, 59(9), 3700-3710. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05393-5>
- Kilpatrick, E. S., Rigby, A. S., Atkin, S. L. (2007). Variability in the Relationship between Mean Plasma Glucose and HbA1c: Implications for the Assessment of Glycemic Control. *Clinical Chemistry*, 53(5), 897-901. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.079756>
- Kim, W.S., Ohashi, M., Tanaka, T., Kumura, H., Kim, G.Y., Kwon, I.K., Goh, J.S., Shimazaki, K. (2004). Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *BioMetals*, 17(3), 279-283. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027705.57430.f1>
- Kozioł, J., Gustaw, W., Waśko, A., Skrzypczak, K., Sławińska, A., Sołowiej, B. (2014). Wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost i przeżywalność *Lactobacillus acidophilus* oraz właściwości reologiczne mlecznych napojów fermentowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(94),41-55. <https://doi.org/10.15193/zntj/2014/94/041-055>
- Król, J., Brodziak, A., Litwińczuk, Z., Litwińczuk, A. (2013). Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(2), 395-397. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0055>
- Lee, W. J., Lucey, J. A. (2010). Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.05>
- Li, L., Ma, C., Hurilebagen, Yuan, H., Hu, R., Wang, W., Weilisi. (2022). Effects of lactoferrin on intestinal flora of metabolic disorder mice. *BMC Microbiology*, 22(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02588-w>
- Liu, H., Boggs, I., Weeks, M., Li, Q., Wu, H., Harris, P., Ma, Y., Day, L. (2020). Kinetic modelling of the heat stability of bovine lactoferrin in raw whole milk. *Journal of Food Engineering*, 280, 109977. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109977>

- Maciel, K. S., Santos, L. S., Bonomo, R. C. F., Verissimo, L. A. A., Minim, V. P. R., Minim, L. A. (2020). Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. *Separation and Purification Technology*, 251, 117324. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117324>
- Madjd, A., Taylor, M. A., Mousavi, N., Delavari, A., Malekzadeh, R., Macdonald, I. A., Farshchi, H. R. (2016). Comparison of the effect of daily consumption of probiotic compared with low-fat conventional yogurt on weight loss in healthy obese women following an energy-restricted diet: A randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2), 323-329. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120170>
- Matijašić, B. B., Oberčkal, J., Mohar Lorbeg, P., Paveljšek, D., Skale, N., Kolenc, B., Gruden, Š., Poklar Ulrih, N., Kete, M., Zupančič Justin, M. (2020). Characterisation of Lactoferrin Isolated from Acid Whey Using Pilot-Scale Monolithic Ion-Exchange Chromatography. *Processes*, 8(7), 804. <https://doi.org/10.3390/pr8070804>
- Morishita, S., Ono, T., Fujisaki, C., Ishihara, Y., Murakoshi, M., Kato, H., Hosokawa, M., Miyashita, K., Sugiyama, K., Nishino, H. (2013). Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice. *Journal of Oleo Science*, 62(2), 97-103. <https://doi.org/10.5650/jos.62.97>
- Moschopoulou, E., Sakkas, L., Zoidou, E., Theodorou, G., Sgouridou, E., Kalathaki, C., Liarakou, A., Chatzigeorgiou, A., Politis, I., Moatsou, G. (2018). Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 77, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.008>
- Mudgil, P., Jumah, B., Ahmad, M., Hamed, F., Maqsood, S. (2018). Rheological, micro-structural and sensorial properties of camel milk yogurt as influenced by gelatin. *LWT*, 98, 646-653. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.008>
- Narayana, N. M. N. K., Gupta, V. K. (2015). Quality of cow milk plain set yogurt as affected by ultrafiltration process. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 16(3), 74. <https://doi.org/10.4038/tare.v16i3.5279>
- Nguyen, P. T.; Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental

stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6, 451–469. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>

Nottagh, S., Hesari, J., Peighamardoust, S. H., Rezaei-Mokarram, R., Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia*, 75(4), 605-611. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00378-w>

Ono, T., Murakoshi, M., Suzuki, N., Iida, N., Ohdera, M., Iigo, M., Yoshida, T., Sugiyama, K., Nishino, H. (2010). Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: Decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. *British Journal of Nutrition*, 104(11), 1688-1695. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002734>

Paesano, R., Berlutti, F., Pietropaoli, M., Pantanella, F., Pacifici, E., Goolsbee, W., Valenti, P. (2010). Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency anemia in pregnant women. *BioMetals*, 23(3), 411-417. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9335-z>

Paesano, R., Pacifici, E., Benedetti, S., Berlutti, F., Frioni, A., Polimeni, A., Valenti, P. (2014). 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*, 27(5), 999-1006. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9723-x>

Panahi, S., Tremblay, A. (2016). The Potential Role of Yogurt in Weight Management and Prevention of Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(8), 717-731. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1102103>

Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Barreira, J. C. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2018). Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts. *LWT*, 97, 668-675. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.013>

PN-A-86061:2006 (2006), Milk and Milk Products. Fermented Milk. NCBI: Bethesda, USA.

PN-EN ISO 4833-1:2013-12 (2017). Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – Część 1: Oznaczenie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 stopni C. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-EN ISO 6579-1:2017-04/A1:2020-09 (2020). Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella* – Część 1: Wykrywanie *Salmonella* spp. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-EN ISO 6887-5:2020-10 (2020). Food Chain Microbiology – Preparation of Samples, Stock Suspension and Tenfold Dilutions for Microbiological Analysis – Part 5: Specific Guidelines for the Preparation of Milk and Milk Products. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 (2004). Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków) – Część 1: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-EN ISO 7218:2008/A1:2013-10 (2013). Food and Feed Microbiology – General Requirements and Principles of Microbiological Testing. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-EN ISO 8968-1:2014-03 (2014). Mleko i przetwory mleczne – Oznaczanie zawartości azotu – Część 1: Zasada Kjeldahla i obliczanie białka surowego. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 10272-2:2017 (2017). Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection Method. Part 2: Colony – Count Technique. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 15213:2005 (2005). Food and Feed Microbiology – Horizontal Method for the Enumeration of Sulphate (IV) Reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 20128:2012 (2012). Dairy Products – Enumeration of Putative *Lactobacillus acidophilus* on a Selective Medium – Colony Count Technique at 37°C. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 4832:2007 (2007). Food and Feed Microbiology – Horizontal Method for the Enumeration of Coliform Bacteria – Plate Method. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 5546:2012 (2012). Kazeiny i kazeiniany – Oznaczanie pH (Metoda odniesienia). ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 5550:2010 (2010). Kazeiny i kazeiniany – Oznaczanie zawartości wody (Metoda odniesienia). ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-A-86122:1968 (1968). Mleko – Metody badań. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 6611: 2007 (2007). Mleko i przetwory mleczne -- Oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie drożdży i/lub pleśni - Metoda płytkowa w temperaturze 25°C. ISO: Genewa, Szwajcaria.

PN-ISO 7889:2007 (2007). Jogurt - Oznaczanie liczby charakterystycznych drobnoustrojów - - Metoda liczenia kolonii w temperaturze 37°C. ISO: Genewa, Szwajcaria.

Potì, F. (2020). Treatments for COVID-19: Emerging drugs against the coronavirus - reply. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*, 91(3). <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10108>

Reinehr, T., Friedel, S., Mueller, T. D., Toschke, A. M., Hebebrand, J., Hinney, A. (2008). Evidence for an influence of TCF7L2 polymorphism rs7903146 on insulin resistance and sensitivity indices in overweight children and adolescents during a lifestyle intervention. *International Journal of Obesity*, 32(10), 1521-1524. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.146>

Rosa, L., Lepanto, M. S., Cutone, A., Siciliano, R. A., Paesano, R., Costi, R., Musci, G., Valenti, P. (2020). Influence of oral administration mode on the efficacy of commercial bovine Lactoferrin against iron and inflammatory homeostasis disorders. *BioMetals*, 33(2-3), 159-168. <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00236-2>

Routray, W., Mishra, H. N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 208-220. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x>

Rozporządzenie (WE) 853/2004. (2004). Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dziennik Urzędowy L 139*, 30/04/2004 P. 0055 – 0205

Saad, M., Ombarak, R., Rabou, H. (2019). Effect of nisin and lysozyme on bacteriological and sensorial quality of pasteurized milk. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 403. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f360>

Saldaña-Alvarez, Y., Salas-Martínez, M. G., García-Ortiz, H., Luckie-Duque, A., García-Cárdenas, G., Vicenteño-Ayala, H., Cordova, E. J., Esparza-Aguilar, M., Contreras-Cubas, C., Carnevale, A., Chávez-Saldaña, M., Orozco, L. (2016). Gender-Dependent Association of FTO

Polymorphisms with Body Mass Index in Mexicans. PLOS ONE, 11(1), e0145984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145984>

Sikaris, K. (2009). The Correlation of Hemoglobin A1c to Blood Glucose. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(3), 429-438. <https://doi.org/10.1177/193229680900300305>

Sisodia, R. K., Chouhan, M. (2019). The study of correlation between Body Mass Index and glycemic control-HbA1c in diabetes type 2 patients. *International Journal of Advances in Medicine*, 6(6), 1788. <https://doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20195228>

Sørensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., Freeland, B. (2022). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients*, 14(14), 2938. <https://doi.org/10.3390/nu14142938>

Steijns, J. M., Van Hooijdonk, A. C. M. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 11-17. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002191>

Sun, J., Ren, F., Xiong, L., Zhao, L., & Guo, H. (2016). Bovine lactoferrin suppresses high-fat diet induced obesity and modulates gut microbiota in C57BL/6J mice. *Journal of Functional Foods*, 22, 189-200. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.022>

Tavakoli, M., Habibi Najafi, M. B., Mohebbi, M. (2019). Effect of the milk fat content and starter culture selection on proteolysis and antioxidant activity of probiotic yogurt. *Heliyon*, 5(2), e01204. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01204>

Valeeva, F. V., Medvedeva, M. S., Kiseleva, T. A., Khasanova, K. B., Gabidinova, G. F. (2022). Association of rs7903146 TCF7L2, rs1042714 ADRB2 with the changes in body fat mass in different types of therapy of early carbohydrate metabolism disorders. *Obesity and Metabolism*, 19(1), 7-18. <https://doi.org/10.14341/omet12807>

Wajs, J., Król, K., Brodziak, A. (2021). Milk and dairy products as a source of antiviral compounds. W: *Zdrowie i style życia. Ekonomiczne, społeczne i zdrowotne skutki pandemii*. Pod redakcją / Wioletty Nowak i Katarzyny Szalonki. Wrocław, Uniwersytet Wrocławski, 413-425, 978-83-66601-61-1. <https://doi.org/10.34616/142111>

Wakabayashi, I. (2013). Necessity of Both Waist Circumference and Waist-to-Height Ratio for Better Evaluation of Central Obesity. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 11(3), 189-194. <https://doi.org/10.1089/met.2012.0131>

World Health Organization. (2023). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (dostęp online 24.10.2022).

Wrzosek, M., Sawicka, A., Wrzosek, M., Piątkiewicz, P., Tałałaj, M., Nowicka, G. (2019). Age at onset of obesity, transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) rs7903146 polymorphism, adiponectin levels and the risk of type 2 diabetes in obese patients. *Archives of Medical Science*, 15(2), 321-329. <https://doi.org/10.5114/aoms.2017.69638>

Xiong, L., Ren, F., Lv, J., Zhang, H., Guo, H. (2018). Lactoferrin attenuates high-fat diet-induced hepatic steatosis and lipid metabolic dysfunctions by suppressing hepatic lipogenesis and down-regulating inflammation in C57BL/6J mice. *Food & Function*, 9(8), 4328-4339. <https://doi.org/10.1039/C8FO00317C>

Zakaria, A. M., Zakaria, H. M., Abdelhiee, E. Y., Fadl, S. E., Ombarak, R. (2020). The Impact of Lactoferrin Fortification on the Health Benefits and Sensory Properties of Yogurt. *Journal of Current Veterinary Research*, 2(2), 105-112. <https://doi.org/10.21608/jcivr.2020.121536>

Zielińska, D., Marciniak-Lukasiak, K., Karbowski, M., Lukasiak, P. (2021). Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel *Lactobacillus* Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products. *Molecules*, 26(19), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules26195730>

Zimecki, M., Artym, J., Kocięba, M., Kaleta-Kuratewicz, K., Kruzel, M. L. (2012). Lactoferrin restrains allergen-induced pleurisy in mice. *Inflammation Research*, 61(11), 1247-1255. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0522-y>

Znamirowska, A., Buniowska, M., Rożek, P., Kalicka, D., Pawlos, M. (2018). Evaluation of the quality of thermostatic yoghurts with spelt fibre and inulin. *Nauka. Przyroda. Technologie*, 12(1), 103-112.

10. Załączniki

- Plan żywieniowy
- Publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej
- Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Indywidualny Program Odżywiania



Plan żywieniowy dla kobiet

Podsumowanie jadłospisu

Poniedziałek	Wtorek	Środa	Czwartek	Piątek	Sobota	Niedziela
<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Gotowane jajko na miękko z warzywami i chlebem żytnim Zielona herbata (napar bez cukru)</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Kanapki z humusem i pomidorami i kokajłowymi Herbata czarna, napar z cukrem</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Zielona herbata (napar bez cukru) Jogurt z brzoskwinia, winogronem i płatkami owsianymi</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata czarna, napar bez cukru Owsianka na wodzie z malinami i bananem</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata ziołowa (napar) Jogurt z borówkami, malinami i płatkami owsianymi</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>"Szakszuka" z ciecierzycą Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata ziołowa (napar) Jogurt z warzywami i pieczywem</p>
<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Jogurt z borówkami, bananem i płatkami owsianymi Woda Muszynianka</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Koktajl truskawkowy Herbata ziołowa (napar)</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Kanapki z awokado i pomidorem</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Koktajl bananowo-jałgodowy na jogurcie Herbata ziołowa (napar)</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Kanapki z humusem i pomidorkami koktajłowymi</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Jogurt naturalnym z brzoskwinia i musli</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Kanapki z naturalnym serkiem do smarowania i szczypiorkiem</p>
<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Salata z rzodkiewkami, szczypiorkiem i olejem Pstrąg gotowany na parze z ryżem Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Kurczak duszony w sosie pomidorowym z kaszą jęczmienną Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Makaron pełnoziarnisty ze szpinakiem Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Łosoś grillowany z kaszą bulgur i sałata Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Sos pomidorowy z cieciorą i warzywami Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Salatka z brokułem Zielona herbata (napar bez cukru)</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Spaghetti pomidorowe z makaronem pełnoziarnistym Woda Muszynianka</p>

Podsumowanie jadłospisu

<p>20:00 Kolacja</p> <p>Bananowo-czekoladowa owsianka Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Ryż z jabłkami i jogurtem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Salatka z kaszą bulgur i burakiem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Kasza gryczana z owocami leśnymi i jogurtem Woda Muszynianka</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Kasza bulgur z jogurtem i musem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Woda Muszynianka Kasza manna z truskawkami</p>	<p>20:00 Kolacja</p> <p>Kanapki z humusem i pomidory z jogurtem Zielona herbata (napar bez cukru)</p>
<p>K: 1663,5 / B: 55,3 T: 42,7 / WP: 235,5 F: 35,4 / WW: 23,7</p>	<p>K: 1588,2 / B: 55,6 T: 42,0 / WP: 218,2 F: 37,6 / WW: 21,9</p>	<p>K: 1642,3 / B: 57,0 T: 42,5 / WP: 219,6 F: 41,5 / WW: 21,9</p>	<p>K: 1606,2 / B: 61,2 T: 36,4 / WP: 219,7 F: 40,5 / WW: 22,1</p>	<p>K: 1641,8 / B: 53,0 T: 41,5 / WP: 228,3 F: 37,1 / WW: 23,0</p>	<p>K: 1683,2 / B: 57,8 T: 47,4 / WP: 219,3 F: 40,7 / WW: 22,0</p>	<p>K: 1578,0 / B: 65,0 T: 40,3 / WP: 201,0 F: 45,5 / WW: 20,4</p>

Komentarz dietetyka

1. Dietę stosuj przez 7 dni,
2. Potrawy można doprawiać ulubionymi ziołami.
3. Staraj się wypijać minimum 2 litry wody dziennie.
4. Do diety możesz włączyć również niesłodzoną herbatę i kawę.

PONIEDZIAŁEK

Śniadanie 08:00

K:304.4 / B:13.7 / T:11.0 / Wp:33.6 / F:8.5 / WW:3.4

GOTOWANE JAJKO NA MIĘKKO Z WARZYWAMI I CHLEBEM ŻYTNIM

Pomidor - 240 g (2 x Sztuka)
Chleb żytni razowy - 60 g (2 x Kromka)
Jaja kurze całe - 56 g (1 x Sztuka)
Szcypiorek - 10 g (2 x Łyżeczka)
Masło roślinne - 5 g (1 x Łyżeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Wodę doprowadź do wrzenia.
2. Gotuj jajko przez 6 minut kolejno ostudź w zimnej wodzie.
2. Pokrój pomidora.
3. Podaj jajko z chlebem posmarowanym masłem i pomidorem.

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) - 250 g (1 x Szklanka)

Komentarz - Im bardziej zielone banany tym niższy indeks glikemiczny.

Drugie śniadanie 12:00

K:366.2 / B:9.6 / T:7.0 / Wp:57.0 / F:6.5 / WW:5.7

JOGURT Z BORÓWKAMI, BANANEM I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Borówki amerykańskie - 100 g (2 x Garść)
Płatki owsiane - 30 g (3 x Łyżka)

1. Płatki wymieszaj z jogurtem i odstaw do nasiąknięcia.
2. Wymieszaj z owocami.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Obiad 16:00

K:498.9 / B:18.7 / T:12.3 / Wp:72.4 / F:13.1 / WW:7.3

SAŁATA Z RZODKIEWKAMI, SZCZYPIORKIEM I OLEJEM

Rzodkiewka - 75 g (5 x Sztuka)
Sałata - 25 g (5 x Liść)
Szcypiorek - 10 g (2 x Łyżeczka)
Olej rzepakowy - 5 g (0.5 x Łyżka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Warzywa pokrój i wymieszaj z przyprawami i olejem.

PSTRĄG GOTOWANY NA PARZE Z RYŻEM

Ryż brązowy - 100 g (6.7 x Łyżka)
Pstrąg tęczy, świeży - 50 g (0.5 x Kawalek)
Koper ogrodowy - 8 g (1 x Łyżka)
Sok cytrynowy - 6 g (1 x Łyżka)
Tymianek - 2 g (0.5 x Łyżeczka)
Pieprz czarny mielony - 2 g (2 x Szczypta)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Dopraw filet sokiem z cytryny, tymiankiem, pieprzem i solą.
2. Smaż na oleju rzepakowym.
3. Ryż gotuj w lekko osolonej wodzie.
4. Ugotowane posyp koperkiem.
5. Danie zjedz z sałatką.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:494.0 / B:13.3 / T:12.4 / Wp:72.5 / F:7.3 / WW:7.3

BANANOWO-CZEKOLADOWA OWSIANKA

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 50 g (5 x Łyżka)
Czekolada gorzka - 12 g (2 x Kostka)

1. Płatki ugotuj na wodzie.
2. Pod koniec gotowania dodaj 2 kostki gorzkiej czekolady.
3. Owsiankę przelej do miski i dodaj pokrojonego banana i brzoskwinie.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1663.5 B: 55.3 T: 42.7 WP: 235.5 F: 35.4 WW: 23.7

WTOREK

Śniadanie 08:00

K:292.5 / B:7.1 / T:7.3 / Wp:45.8 / F:8.8 / WW:4.7

KANAPKI Z HUMUSEM I POMIDORAMI KOKTAJLOWYMI

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)

Chleb żytni razowy - 60 g (2 x Kromka)

Hummus z suszonymi pomidorami - 20 g (2 x Łyżeczka)

Szcypiorek - 10 g (2 x Łyżeczka)

1. Chleb posmaruj humusem i posyp szczypiorkiem.
2. Zjedz z pomidorkami koktajlowymi.

HERBATA CZARNA, NAPAR Z CUKREM

Herbata czarna, napar z cukrem - 250 g (1 x Szklanka)

Drugie śniadanie 12:00

K:368.2 / B:10.4 / T:8.3 / Wp:51.8 / F:8.2 / WW:5.2

KOKTAJL TRUSKAWKOWY

Truskawki - 210 g (3 x Garść)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Banan - 120 g (1 x Sztuka)

Płatki owsiane - 20 g (2 x Łyżka)

Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

Mięta (świeża) - 1 g (1 x Łyżka)

1. Wszystkie składniki zmiksuj na koktajl.
2. Jeżeli koktajl będzie za gęsty dodaj wody.

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

Obiad 16:00**K:477.3 / B:27.3 / T:20.2 / Wp:44.7 / F:9.5 / WW:4.4**

**KURCZAK DUSZONY W SOSIE
POMIDOROWYM Z KASZĄ
JĘCZMIENNĄ**

Pomidory z puszki (krojone) - 200 g (2 x Porcja)

Mięso z ud kurczaka, ze skórą - 80 g (0.7 x Sztuka)

Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)

Kasza jęczmienna, pęczak - 50 g (3.3 x Łyżka)

Ser, parmezan - 16 g (2 x Łyżka)

Olej rzepakowy - 5 g (0.5 x Łyżka)

Bazylija (suszona) - 2 g (0.5 x Łyżeczka)

Tymianek - 1 g (0.2 x Łyżeczka)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

Oregano (suszone) - 1.5 g (0.5 x Łyżeczka)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Cebulę pokrój drobno i podsmaż na oleju z tymiankiem. Dodaj pomidory pokrojone z puszki.

2. Mięso pokrój w kostkę, dopraw solą i pieprzem i włóż do sosu pomidorowego.

3. Gotuj około 20 - 25 minut.

4. Pod koniec gotowania dopraw przyprawami.

5. Podawaj z ugotowaną kaszą.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00**K:450.2 / B:10.8 / T:6.2 / Wp:75.9 / F:11.1 / WW:7.6**

RYŻ Z JABŁKAMI I JOGURTEM

Jabłko - 150 g (1 x Sztuka)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Ryż brązowy - 80 g (5.3 x Łyżka)

Miód pszczeleli - 7 g (0.3 x Łyżka)

Cynamon - 2 g (0.4 x Łyżeczka)

1. Ugotuj ryż.

2. Jabłko zetrzyj na tarce.

3. Połącz z ryżem i cynamonem.

4. Całość zapiecz lub włóż na chwilę do mikrofalówki.

5. Podawaj danie polane jogurtem.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1588.2 B: 55.6 T: 42.0 WP: 218.2 F: 37.6 WW: 21.9

ŚRODA

Śniadanie 08:00

K:462.0 / B:15.4 / T:11.0 / Wp:64.4 / F:8.4 / WW:6.4

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z BRZOSKWINIĄ, WINOGRONEM I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 70 g (7 x Łyżka)
Winogrona - 70 g (1 x Garść)
Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

1. Płatki owsiane zalej wcześniej gorącą wodą żeby zmiękły.
2. Pokrój owoce.
3. Wymieszaj wszystkie składniki z jogurtem.

Drugie śniadanie 12:00

K:289.6 / B:6.7 / T:12.7 / Wp:34.8 / F:4.7 / WW:3.6

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z AWOKADO MI POMIDOREM

Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)
Awokado - 70 g (0.5 x Sztuka)
Kajzerki - 50 g (1 x Sztuka)

Obiad 16:00

K:530.0 / B:19.3 / T:13.6 / Wp:73.0 / F:15.8
/ WW:7.3

MAKARON PEŁNOZIARNISTY ZE SZPINAKIEM

Szpinak - 125 g (5 x Garść)
Pomidory koktajlowe - 100 g (5 x Sztuka)
Makaron pełnoziarnisty - 100 g (1.4 x Szklanka)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Pietruszka, liście - 12 g (2 x łyżeczka)
Olej rzepakowy - 10 g (1 x łyżka)
Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Cebulę pokrój w kostkę i podsmaż na oleju.
2. Dodaj szpinak i jak zmięknie dopraw wyciśniętym przez praskę czosnkiem.
3. Wymieszaj ugotowany makaron ze szpinakiem.
4. Pokrój pomidorki koktajlowe na pół i podaj do potrawy na talerzu.
5. Potrawę posyp pietruszką.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:360.7 / B:15.6 / T:5.2 / Wp:47.4 / F:12.6 / WW:4.6

SAŁATKA Z KASZĄ BULGUR I BURAKIEM

Buraki, gotowane w wodzie - 240 g (2 x Sztuka)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Pomidory koktajlowe - 100 g (5 x Sztuka)
Kasza bulgur - 50 g (3.8 x łyżka)
Pietruszka, liście - 6 g (1 x łyżeczka)

1. Ugotuj kaszę.
2. Wszystko drobno pokrój, wymieszaj i dopraw oliwą z oliwek oraz ulubionymi przyprawami.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1642.3 B: 57.0 T: 42.5 WP: 219.6 F: 41.5 WW: 21.9

CZWARTEK

Śniadanie 08:00

K:280.8 / B:6.7 / T:3.0 / Wp:51.3 / F:12.1 /
WW:5.1

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250
g (1 x Szklanka)

OWSIANKA NA WODZIE Z MALINAMI I BANANEM

Woda - 250 g (1 x Szklanka)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Maliny - 120 g (2 x Garść)
Płatki owsiane - 30 g (3 x Łyżka)

1. Owsiankę ugotuj na wodzie.
2. Dodaj pokrojonego banana i maliny.

Drugie śniadanie 12:00

K:398.5 / B:9.2 / T:6.8 / Wp:65.8 / F:4.7 /
WW:6.6

KOKTAJL BANANOWO-JAGODOWY NA JOGURCIE

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 30 g (3 x Łyżka)
Miód pszczelej - 24 g (1 x Łyżka)
Czarne jagody, mrożone - 20 g (0.2 x
Opakowanie)

1. Wszystkie składniki zmiksuj razem.
2. Jeżeli koktajl będzie za gęsty dodaj wody.

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x
Szklanka)

Obiad 16:00

K:619.5 / B:33.7 / T:20.2 / Wp:62.2 / F:14.4
/ WW:6.3

**ŁOSOŚ GRILLOWANY Z KASZĄ
BULGUR I SAŁATĄ**

Łosoś, świeży - 100 g (1 x Kawalek)
Kasza bulgur - 100 g (7.7 x Łyżka)
Sałata - 50 g (10 x Liść)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Sok cytrynowy - 12 g (2 x Łyżka)
Oliwa z oliwek - 5 g (0.5 x Łyżka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x
Szczypta)

1. Skrop sokiem z cytryny rybę i przypraw dowolnymi przyprawami.
2. Grilluj na grillu elektrycznym lub na patelni z rusztem po około 3 - 4 minuty .
3. Jeżeli nie posiadasz powyższych sprzętów kuchennych możesz upiec łososa w papierze do pieczenia.
4. Cebulę pokrój i wymieszaj z poszarpaną sałatą. Przypraw oliwą z oliwek, sokeim z cytryny oraz solą i pieprzem.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szlanka)

Kolacja 20:00

K:307.4 / B:11.6 / T:6.4 / Wp:40.4 / F:9.3 /
WW:4.1

**KASZA GRYCZANA Z OWOCAMI
LEŚNYMI I JOGURTEM**

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Czarne jagody, mrożone - 100 g (1 x
Opakowanie)
Kasza gryczana niepalona (biała) - 50 g
(3.8 x Łyżka)
Cynamon - 2 g (0.4 x Łyzeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Kaszę gryczaną ugotuj w lekko osolonej wodzie.
2. Owoce podgrzej w garnuszku lub mikrofal.
3. Wymieszaj kaszę z jogurtem i owocami.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szlanka)

SUMA:

K: 1606.2 B: 61.2 T: 36.4 WP: 219.7 F: 40.5 WW:
22.1

PIĄTEK

Śniadanie 08:00

K:416.2 / B:12.1 / T:9.7 / Wp:60.1 / F:6.0 /
WW:6.0

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z BORÓWKAMI, MALINAMI I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)

Kiwi - 75 g (1 x Sztuka)

Płatki owsiane - 50 g (5 x łyżka)

Miód pszczeli - 24 g (1 x łyżka)

Len, nasiona - 5 g (1 x łyżeczka)

1. Płatki owsiane wymieszaj wcześniej z jogurtem aby zmiękły.
2. Dodaj do całości owoce, miód i nasiona lnu.

Drugie śniadanie 12:00

K:251.3 / B:7.1 / T:8.0 / Wp:35.8 / F:4.5 /
WW:3.7

WODA

Woda - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z HUMMUSEM I POMIDORKAMI KOKTAJLOWYMI

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)

Kajzerki - 50 g (1 x Sztuka)

Hummus z suszonymi pomidorami - 20 g (2 x łyżeczka)

Obiad 16:00

K:592.0 / B:20.9 / T:14.0 / Wp:85.5 / F:17.5
/ WW:8.6

**SOS POMIDOROWY Z CIECIORKĄ I
WARZYWAMI**

Passata pomidorowa (przecier) - 200 g
(2 x Porcja)

Warzywa na patelnię włoskie - 100 g
(1 x Porcja)

Makaron penne - 70 g (1 x Szklanka)

Ciecierzycza (w zalewie) - 60 g (3 x
łyżka)

Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)

Olej rzepakowy - 10 g (1 x łyżka)

Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)

Bazyliia (suszona) - 4 g (1 x łyżeczka)

Oregano (suszone) - 3 g (1 x łyżeczka)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x

Szczypta)

1. Cebule pokrój i podsmaż na oleju.
2. Dodaj rozmrożone wcześniej warzywa.
3. Gdy warzywa będą miękkie dodaj odsączoną i przepłukaną cieciorkę.
4. Wymieszaj z przecierem i dopraw.
5. Gotuj jeszcze 5 minut na wolnym ogniu.
6. Podawa z ugotowanym makaronem.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szklanka)

Kolacja 20:00

K:382.3 / B:12.9 / T:9.8 / Wp:46.9 / F:9.1 /
WW:4.7

**KASZA BULGUR Z JOGURTEM I
MUSEM**

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)

Truskawki - 70 g (1 x Garść)

Banan - 60 g (0.5 x Sztuka)

Kasza bulgur - 50 g (3.8 x łyżka)

Orzechy włoskie - 7.5 g (0.5 x łyżka)

1. Kaszę ugotuj na miękko.
2. Z owoców zrób mus.
3. Kaszę zjedz z musem i jogurtem.

**HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ
CUKRU**

Herbata czarna, napar bez cukru - 250
g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1641.8 B: 53.0 T: 41.5 WP: 228.3 F: 37.1 WW:
23.0

SOBOTA

Śniadanie 08:00

K:423.5 / B:15.5 / T:12.3 / Wp:54.1 / F:13.8
/ WW:5.5

"SZAKSZUKA" Z CIECIERZYCĄ

Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)
Papryka czerwona - 98 g (0.7 x Sztuka)
Ciecierzycza (w zalewie) - 80 g (4 x
łyżka)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Kajzerki - 50 g (1 x Sztuka)
Pietruszka, liście - 24 g (4 x łyżeczka)
Oliwa z oliwek - 5 g (0.5 x łyżka)
Siemię lniane (świeżo mielone) - 5 g (1
x łyżeczka)
Mielona słodka papryka - 1 g (0.2 x
łyżeczka)
Mielona papryka chili - 1 g (1 x
Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x
Szczypta)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Kurkuma - 0.5 g (0.1 x łyżeczka)

1. Cebulę, paprykę i pomidora posiekaj.
2. Wrzuć warzywa na patelnię z rozgrzaną oliwą i podduś, aż zmiękną.
3. Podczas smażenia dopraw papryką słodką i szczyptą kurkumy i papryki ostrej.
4. Gdyby warzywa przywierały do patelni, dodaj trochę wody, żeby uniknąć dodatku większej ilości tłuszczu.
5. Ciecierzycę odsącz z zalewy i przepłucz, jeżeli używasz takiej z puszki lub stoika.
6. Dodaj do warzyw.
7. Pod koniec duszenia dopraw całość solą i świeżo zmielonym pieprzem.
8. Na talerzu posyp zmielonym siemieniem i natką pietruszki lub kolendrą, szczypiorkiem.
9. Zjedz z pieczywem.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250
g (1 x Szklanka)

Drugie śniadanie 12:00

K:240.4 / B:8.5 / T:8.1 / Wp:24.5 / F:4.5 /
WW:2.5

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szklanka)

JOGURT NATURALNYM Z BRZOSKWINIĄ I MUSLI

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)
Musli z rodzynkami i orzechami - 30 g
(3 x łyżka)

1. Jogurt wymieszaj z pokrojoną brzoskwinia i musli.

Obiad 16:00

K:646.5 / B:27.2 / T:18.1 / Wp:76.0 / F:17.8 / WW:7.5

SAŁATKA Z BROKUŁEM

Brokuły, mrożone - 225 g (0.5 x Opakowanie)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)
Makaron pełnoziarnisty - 100 g (1.4 x Szklanka)
Majonez domowy z olejem rzepakowym - 10 g (1 x Łyżeczka)
Koper ogrodowy - 8 g (1 x Łyżka)
Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)
Dyń, pestki, łuskane - 5 g (0.5 x Łyżka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Brokuła i makaron ugotuj.
2. Pokrój wszystkie składniki i połącz razem.
3. Z jogurtu, majonezu, czosnku i koperku zrób sos. Dopraw wedle uznania.

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:372.8 / B:6.6 / T:8.9 / Wp:64.7 / F:4.6 / WW:6.5

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KASZA MANNA Z TRUSKAWKAMI

Woda - 250 g (1 x Szklanka)
Truskawki - 140 g (2 x Garść)
Kasza manna - 36 g (3 x Łyżka)
Miód pszczele - 24 g (1 x Łyżka)
Czekolada gorzka - 18 g (3 x Kostka)
Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

1. Zagotuj wodę, dodaj kaszę i gotuj aż zgęstnieje.
2. Dodaj czekoladę.
3. Wylej kaszę na talerz, posyp pokrojonymi w plastry truskawkami i nasionami lnu.
4. Dodaj miód.

SUMA:

K: 1683.2 B: 57.8 T: 47.4 WP: 219.3 F: 40.7 WW: 22.0

NIEDZIELA

Śniadanie 08:00

K:359.3 / B:13.2 / T:6.4 / Wp:47.8 / F:11.7 /
WW:4.9

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z WARZYWAMI I PIECZYWEM

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)

Ogórek zielony (długi) - 180 g (1 x Sztuka)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Chleb żytni razowy - 90 g (3 x Kromka)

Szczypiorek - 20 g (4 x łyżeczka)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Jogurt wymieszaj z pokrojonymi warzywami.

3. Dopraw do smaku.

4. Zjedz z pieczywem.

Drugie śniadanie 12:00

K:215.5 / B:8.9 / T:6.2 / Wp:30.6 / F:1.3 /
WW:3.1

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z NATURALNYM SERKIEM DO SMAROWANIA I SZCZYPIORKIEM

Serek naturalny do smarowania - 50 g (2 x łyżka)

Kajzerki - 50 g (1 x Sztuka)

Szczypiorek - 10 g (2 x łyżeczka)

Obiad 16:00

K:592.6 / B:29.1 / T:15.7 / Wp:73.3 / F:19.9
/ WW:7.4

**SPAGHETTI POMIDOROWE Z
MAKARONEM
PERŁNOZIARNISTYM**

Pomidory z puszki (krojone) - 200 g (2 x Porcja)
Makaron spaghetti pełnoziarnisty - 100 g (2 x Porcja)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Wieprzowina, schab surowy bez kości - 50 g (0.5 x Kawalek)
Pietruszka, liście - 18 g (3 x Łyżeczka)
Olej rzepakowy - 10 g (1 x Łyżka)
Bazylija (suszona) - 4 g (1 x Łyżeczka)
Oregano (suszone) - 3 g (1 x Łyżeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Ugouj makaron
2. Pokrój mięso i cebulę. Podsmaż na tłuszczu.
3. Dodaj pomidory. Dopraw wg. uznania. Gotuj do czasu aż sos zgęstnieje. Konsystencję dobierz do własnych preferencji.
4. Makaron wymieszaj z sosem pomidorowym i wyłóż na talerz.
5. Posiekaj pietruszkę i nałóż na potrawę.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:410.6 / B:13.8 / T:12.0 / Wp:49.3 / F:12.6
/ WW:5.0

**KANAPKI Z HUMUSEM I
POMIDORY Z JOGURTEM**

Pomidor - 240 g (2 x Sztuka)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Chleb żytni razowy - 90 g (3 x Kromka)
Cebula dymka - 20 g (1 x Sztuka)
Hummus z suszonymi pomidorami - 20 g (2 x Łyżeczka)
Pieprz czarny mielony - 2 g (2 x Szczypta)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Chleb posmaruj humusem.
2. Pomidory pokrój w kosteczkę, dodaj posiekaną cebulę i wymieszaj z jogurtem. Dopraw.
3. Zjedz kanapki z pomidorami.

**ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ
CUKRU)**

Zielona herbata (napar bez cukru) -
250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1578.0 B: 65.0 T: 40.3 WP: 201.0 F: 45.5 WW:
20.4

Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
---------	-----------	------------------

Pieczyno

Chleb żytni razowy	300 g	10 x Kromka
Kajzerki	200 g	4 x Sztuka

Ryby i owoce morza

Łosoś, świeży	100 g	1 x Kawatek
Pstrąg tęczowy, świeży	50 g	0.5 x Kawatek

Mięso i wyroby mięsne

Mięso z ud kurczaka, ze skórą	80 g	0.7 x Sztuka
Wieprzowina, schab surowy bez kości	50 g	0.5 x Kawatek

Tłuszcze

Olej rzepakowy	40 g	4 x Łyżka
Oliwa z oliwek	10 g	1 x Łyżka
Masło roślinne	5 g	1 x Łyżeczka

Nabiał

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji)	1750 g	14 x Porcja
Jaja kurze całe	56 g	1 x Sztuka
Serek naturalny do smarowania	50 g	2 x Łyżka
Ser, parmezan	16 g	2 x Łyżka

Orzechy i ziarna

Len, nasiona	20 g	4 x Łyżeczka
Orzechy włoskie	7.5 g	0.5 x Łyżka
Dynia, pestki, łuskane	5 g	0.5 x Łyżka
Siemię lniane (świeżo mielone)	5 g	1 x Łyżeczka

Inne

Passata pomidorowa (przecier)	200 g	2 x Porcja
Miód pszczeli	79 g	3.3 x Łyżka
Hummus z suszonymi pomidorami	60 g	6 x Łyżeczka
Czekolada gorzka	30 g	5 x Kostka
Majonez domowy z olejem rzepakowym	10 g	1 x Łyżeczka

Napoje

Woda Muszynianka	3000 g	12 x Szklanka
Herbata czarna, napar bez cukru	1500 g	6 x Szklanka

Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
Herbata ziołowa (napar)	1000 g	4 x Szklanka
Zielona herbata (napar bez cukru)	1000 g	4 x Szklanka
Woda	750 g	3 x Szklanka
Herbata czarna, napar z cukrem	250 g	1 x Szklanka
Sok cytrynowy	18 g	3 x Łyżka

Przyprawy i zioła

Pieprz czarny mielony	14 g	14 x Szczypta
Sól biała	13 g	13 x Szczypta
Bazylia (suszona)	10 g	2.5 x Łyżeczka
Oregano (suszone)	7.5 g	2.5 x Łyżeczka
Cynamon	4 g	0.8 x Łyżeczka
Tymianek	3 g	0.8 x Łyżeczka
Mielona papryka chili	1 g	1 x Szczypta
Mielona słodka papryka	1 g	0.2 x Łyżeczka
Kurkuma	0.5 g	0.1 x Łyżeczka

Zbożowe

Płatki owsiane	280 g	28 x Łyżka
Kasza bulgur	200 g	15.4 x Łyżka
Makaron pełnoziarnisty	200 g	2.9 x Szklanka
Ryż brązowy	180 g	12 x Łyżka
Makaron spaghetti pełnoziarnisty	100 g	2 x Porcja
Makaron penne	70 g	1 x Szklanka
Kasza gryczana niepalona (biała)	50 g	3.8 x Łyżka
Kasza jęczmienna, pęczak	50 g	3.3 x Łyżka
Kasza manna	36 g	3 x Łyżka
Musli z rodzynkami i orzechami	30 g	3 x Łyżka


Owoce i Warzywa

Pomidor	840 g	7 x Sztuka
Pomidory koktajlowe	800 g	40 x Sztuka
Banan	660 g	5.5 x Sztuka
Truskawki	420 g	6 x Garść
Pomidory z puszki (krojone)	400 g	4 x Porcja
Cebula	300 g	3 x Sztuka
Brzoskwinia	255 g	3 x Sztuka
Buraki, gotowane w wodzie	240 g	2 x Sztuka
Brokuły, mrożone	225 g	0.5 x Opakowanie
Ogórek zielony (długi)	180 g	1 x Sztuka

Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
Jabłko	150 g.....	1 x Sztuka
Ciecierzycza (w zalewie).....	140 g.....	7 x Łyżka
Szpinak	125 g.....	5 x Garść
Czarne jagody, mrożone.....	120 g.....	1.2 x Opakowanie
Maliny	120 g.....	2 x Garść
Borówki amerykańskie	100 g.....	2 x Garść
Warzywa na patelnię włoskie	100 g.....	1 x Porcja
Papryka czerwona	98 g.....	0.7 x Sztuka
Kiwi	75 g.....	1 x Sztuka
Rzodkiewka	75 g.....	5 x Sztuka
Sałata	75 g.....	15 x Liść
Awokado.....	70 g.....	0.5 x Sztuka
Winogrona	70 g.....	1 x Garść
Pietruszka, liście	60 g.....	10 x Łyżeczka
Szczypiorek	60 g.....	12 x Łyżeczka
Cebula dymka	20 g.....	1 x Sztuka
Koper ogrodowy.....	16 g.....	2 x Łyżka
Czosnek.....	15 g.....	3 x Ząbek
Mięta (świeża)	1 g.....	1 x Łyżka

LEGENDA

K: kalorie B: białko T: tłuszcze W: węglowodany F: błonnik WW: wymienniki węglowodanowe
Wartości odżywcze oraz waga produktów dotyczy części jadalnych.  potrawa porcjowana

Przy opracowaniu jadłospisu korzystano m.in. z Bazy Danych Produktów i Potraw Instytutu Żywności i Żywienia 

Indywidualny Program Odżywiania



Plan żywieniowy dla mężczyzn

Podsumowanie jadłospisu

Poniedziałek	Wtorek	Środa	Czwartek	Piątek	Sobota	Niedziela
<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Gotowane jajko na miękko z warzywami i chlebem żytnim Zielona herbata (napar bez cukru)</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Kanapki z humusem i pomidorami kokajlowymi Herbata czarna, napar z cukrem</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Zielona herbata (napar bez cukru) Jogurt z brzoskwinią, winogronem i płatkami owsianymi</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata czarna, napar bez cukru Owsianka na wodzie z malinami i bananem</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata ziołowa (napar) Jogurt z borówkami, malinami i płatkami owsianymi</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>"Szakszuka" z ciecierzycą Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>08:00 <u>Śniadanie</u></p> <p>Herbata ziołowa (napar) Jogurt z warzywami i pieczywem</p>
<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Jogurt z borówkami, bananem i płatkami owsianymi Woda Muszynianka</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Koktajl truskawkowy Herbata ziołowa (napar)</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Kanapki z awokado mi pomidorem</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Koktajl bananowo-ja godowy na jogurcie Herbata ziołowa (napar)</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Kanapki z serkiem kanapkowym i pomidorkami koktajlowymi</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Jogurt naturalnym z brzoskwinią i musli</p>	<p>12:00 <u>Drugie śniadanie</u></p> <p>Woda Muszynianka Kanapki z naturalnym serkiem do smarowania i szczypiorkiem</p>
<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Salata z rzodkiewkami, szczypiorkiem i olejem Pstrąg gotowany na parze z ryżem Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Kurczak duszony w sosie pomidorowym z kaszą jęczmienną Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Makaron ze szpinakiem Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Łosoś grillowany z kaszą bulgur i sałatą Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Sos pomidorowy z cieciorką i warzywami Woda Muszynianka</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Salatka z brokułem Zielona herbata (napar bez cukru)</p>	<p>16:00 <u>Obiad</u></p> <p>Spaghetti pomidorowe z makaronem pełnoziarnistym Woda Muszynianka</p>

Podsumowanie jadłospisu

<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Bananowo-czekolad owa owsianka Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Ryż z jabłkami i jogurtem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Salatka z kaszą bulgur i burakiem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Ryż z owocami leśnymi i jogurtem Woda Muszynianka</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Kasza jaglana z jogurtem i musem Herbata czarna, napar bez cukru</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Woda Muszynianka Kasza manna z truskawkami</p>	<p>20:00 <u>Kolacja</u></p> <p>Kanapki z humusem i pomidory z jogurtem Zielona herbata (napar bez cukru)</p>
<p>K: 1923.0 / B: 68.7 T: 53.4 / WP: 260.9 F: 39.3 / WW: 26.2</p>	<p>K: 2028.2 / B: 64.1 T: 52.6 / WP: 288.6 F: 38.7 / WW: 29.1</p>	<p>K: 2033.6 / B: 68.6 T: 54.8 / WP: 272.6 F: 42.9 / WW: 27.3</p>	<p>K: 1993.1 / B: 63.7 T: 47.6 / WP: 286.2 F: 37.5 / WW: 28.7</p>	<p>K: 1978.7 / B: 68.7 T: 48.4 / WP: 284.1 F: 35.4 / WW: 28.5</p>	<p>K: 1968.8 / B: 67.4 T: 55.0 / WP: 260.1 F: 47.0 / WW: 25.9</p>	<p>K: 2007.8 / B: 78.2 T: 54.2 / WP: 265.4 F: 44.0 / WW: 26.8</p>

Komentarz dietetyka

1. Dietę stosuj przez 7 dni,
2. Potrawy można doprawiać ulubionymi ziołami.
3. Staraj się wypijać minimum 2 litry wody dziennie.
4. Do diety możesz włączyć również niesłodzoną herbatę i kawę.

PONIEDZIAŁEK

Śniadanie 08:00

K:408.2 / B:15.5 / T:15.5 / Wp:46.5 / F:11.1
/ WW:4.7

GOTOWANE JAJKO NA MIĘKKO Z WARZYWAMI I CHLEBEM ŻYTNIM

Pomidor - 240 g (2 x Sztuka)
Chleb żytni razowy - 90 g (3 x Kromka)
Jaja kurze całe - 56 g (1 x Sztuka)
Szcypiorek - 10 g (2 x Łyżeczka)
Masło roślinne - 10 g (2 x Łyżeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x
Szczypta)

1. Wodę doprowadź do wrzenia.
2. Gotuj jajko przez 6 minut kolejno ostudź w zimnej wodzie.
2. Pokrój pomidora.
3. Podaj jajko z chlebem posmarowanym masłem i pomidorem.

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) -
250 g (1 x Szklanka)

Komentarz - Im bardziej zielone banany tym niższy indeks glikemiczny.

Drugie śniadanie 12:00

K:403.8 / B:10.8 / T:7.7 / Wp:63.3 / F:7.2 /
WW:6.3

JOGURT Z BORÓWKAMI, BANANEM I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Borówki amerykańskie - 100 g (2 x
Garść)
Płatki owsiane - 40 g (4 x Łyżka)

1. Płatki wymieszaj z jogurtem i odstaw do nasiąknięcia.
2. Wymieszaj z owocami.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Obiad 16:00

K:579.4 / B:28.0 / T:17.1 / Wp:72.4 / F:13.1 / WW:7.3

SAŁATA Z RZODKIEWKAMI, SZCZYPIORKIEM I OLEJEM

Rzodkiewka - 75 g (5 x Sztuka)
Sałata - 25 g (5 x Liść)
Szczypiorek - 10 g (2 x Łyzeczka)
Olej rzepakowy - 5 g (0.5 x Łyżka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Warzywa pokrój i wymieszaj z przyprawami i olejem.

PSTRĄG GOTOWANY NA PARZE Z RYŻEM

Pstrąg tęczy, świeży - 100 g (1 x Kawalek)
Ryż brązowy - 100 g (6.7 x Łyżka)
Koper ogrodowy - 8 g (1 x Łyżka)
Sok cytrynowy - 6 g (1 x Łyżka)
Tymianek - 2 g (0.5 x Łyzeczka)
Pieprz czarny mielony - 2 g (2 x Szczypta)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Dopraw filet sokiem z cytryny, tymiankiem, pieprzem i solą.
2. Smaż na oleju rzepakowym.
3. Ryż gotuj w lekko osolonej wodzie.
4. Ugotowane posyp koperkiem.
5. Danie zjedz z sałatką.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:531.6 / B:14.4 / T:13.1 / Wp:78.7 / F:7.9 / WW:7.9

BANANOWO-CZEKOLADOWA OWSIANKA

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 60 g (6 x Łyżka)
Czekolada gorzka - 12 g (2 x Kostka)

1. Płatki ugotuj na wodzie.
2. Pod koniec gotowania dodaj 2 kostki gorzkiej czekolady.
3. Owsiankę przelej do miski i dodaj pokrojonego banana i brzoskwinie.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1923.0 B: 68.7 T: 53.4 WP: 260.9 F: 39.3 WW: 26.2

WTOREK

Śniadanie 08:00

K:362.4 / B:9.1 / T:7.8 / Wp:58.7 / F:11.5 / WW:6.0

KANAPKI Z HUMUSEM I POMIDORAMI KOKTAJLOWYMI

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)

Chleb żytni razowy - 90 g (3 x Kromka)

Hummus z suszonymi pomidorami - 20 g (2 x Łyżeczka)

Szcypiorek - 15 g (3 x Łyżeczka)

1. Chleb posmaruj humusem i posyp szczypiorkiem.

2. Zjedz z pomidorkami koktajlowymi.

HERBATA CZARNA, NAPAR Z CUKREM

Herbata czarna, napar z cukrem - 250 g (1 x Szklanka)

Drugie śniadanie 12:00

K:392.2 / B:11.7 / T:9.8 / Wp:52.6 / F:9.1 / WW:5.3

KOKTAJL TRUSKAWKOWY

Truskawki - 210 g (3 x Garść)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Banan - 120 g (1 x Sztuka)

Płatki owsiane - 20 g (2 x Łyżka)

Len, nasiona - 10 g (2 x Łyżeczka)

Mięta (świeża) - 1 g (1 x Łyżka)

1. Wszystkie składniki zmiksuj na koktajl.

2. Jeżeli koktajl będzie za gęsty dodaj wody.

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

Obiad 16:00

K:676.4 / B:29.9 / T:25.1 / Wp:79.4 / F:12.2 / WW:7.9

**KURCZAK DUSZONY W SOSIE
POMIDOROWYM Z KASZĄ
JĘCZMIENNĄ**

Pomidory z puszki (krojone) - 200 g (2 x Porcja)
Kasza jęczmienna, pęczak - 100 g (6.7 x łyżka)
Mięso z ud kurczaka, ze skórą - 70 g (0.6 x Sztuka)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Ser, parmezan - 16 g (2 x łyżka)
Olej rzepakowy - 10 g (1 x łyżka)
Bazyliia (suszona) - 2 g (0.5 x łyżeczka)
Tymianek - 1 g (0.2 x łyżeczka)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)
Oregano (suszone) - 1.5 g (0.5 x łyżeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Cebulę pokrój drobno i podsmaż na oleju z tymiankiem. Dodaj pomidory pokrojone z puszki.
2. Mięso pokrój w kostkę, dopraw solą i pieprzem i włóż do sosu pomidorowego.
3. Gotuj około 20 - 25 minut.
4. Pod koniec gotowania dopraw przyprawami.
5. Podawaj z ugotowaną kaszą.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:597.2 / B:13.4 / T:9.9 / Wp:97.9 / F:5.9 / WW:9.9

RYŻ Z JABŁKAMI I JOGURTEM

Jabłko - 150 g (1 x Sztuka)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Ryż basmati - 100 g (6.7 x łyżka)
Miód pszczeleli - 7 g (0.3 x łyżka)
Orzechy włoskie - 7.5 g (0.5 x łyżka)
Cynamon - 2 g (0.4 x łyżeczka)

1. Ugotuj ryż.
2. Jabłko zetrzyj na tarce.
3. Połącz z ryżem i cynamonem.
4. Całość zapiecz lub włóż na chwilę do mikrofalówki.
5. Podawaj danie polane jogurtem i posypane orzechami.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 2028.2 B: 64.1 T: 52.6 WP: 288.6 F: 38.7 WW: 29.1

ŚRODA

Śniadanie 08:00

K:551.7 / B:18.7 / T:18.7 / Wp:66.1 / F:9.2 / WW:6.6

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z BRZOSKWINIA, WINOGRONEM I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)

Płatki owsiane - 70 g (7 x Łyżka)

Winogrona - 70 g (1 x Garść)

Masło orzechowe - 15 g (1 x Łyżeczka)

Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

1. Płatki owsiane zalej wcześniej gorącą wodą żeby zmiękły.

2. Pokrój owoce.

3. Wymieszaj wszystkie składniki z jogurtem.

Drugie śniadanie 12:00

K:411.2 / B:9.4 / T:17.9 / Wp:50.0 / F:6.0 / WW:5.1

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z AWOKADO MI POMIDOREM

Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)

Awokado - 98 g (0.7 x Sztuka)

Kajzerki - 75 g (1.5 x Sztuka)

Komentarz - Makaron ugotuj al dente wtedy będzie miał niższy indeks glikemiczny.

Obiad 16:00**K:539.0 / B:18.8 / T:12.4 / Wp:80.3 / F:8.9 / WW:8.1****MAKARON ZE SZPINAKIEM**

Szpinak - 125 g (5 x Garść)
Pomidory koktajlowe - 100 g (5 x Sztuka)
Makaron penne - 100 g (1.4 x Szklanka)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Pietruszka, liście - 12 g (2 x Łyżeczka)
Olej rzepakowy - 10 g (1 x Łyżka)
Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Cebulę pokrój w kostkę i podsmaż na oleju.
2. Dodaj szpinak i jak zmięknie dopraw wyciśniętym przez prasę czosnkiem.
3. Wymieszaj ugotowany makaron ze szpinakiem.
4. Pokrój pomidorki koktajlowe na pół i podaj do potrawy na talerzu.
5. Potrawę posyp pietruszką.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00**K:531.7 / B:21.7 / T:5.8 / Wp:76.2 / F:18.8 / WW:7.5****SAŁATKA Z KASZĄ BULGUR I BURAKIEM**

Buraki, gotowane w wodzie - 240 g (2 x Sztuka)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Kasza bulgur - 100 g (7.7 x Łyżka)
Pomidory koktajlowe - 100 g (5 x Sztuka)
Pietruszka, liście - 6 g (1 x Łyżeczka)

1. Ugotuj kaszę.
2. Wszystko drobno pokrój, wymieszaj i dopraw oliwą z oliwek oraz ulubionymi przyprawami.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

SUMA:**K: 2033.6 B: 68.6 T: 54.8 WP: 272.6 F: 42.9 WW: 27.3**

CZWARTEK

Śniadanie 08:00

K:450.4 / B:9.1 / T:10.2 / Wp:72.1 / F:11.7 /
WW:7.2

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250
g (1 x Szklanka)

OWSIANKA NA WODZIE Z MALINAMI I BANANEM

Woda - 250 g (1 x Szklanka)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Maliny - 120 g (2 x Garść)
Ryż basmati - 50 g (3.3 x Łyżka)
Orzechy włoskie - 15 g (1 x Łyżka)

1. Owsiankę ugotuj na wodzie.
2. Dodaj pokrojonego banana i maliny.

Drugie śniadanie 12:00

K:398.5 / B:9.2 / T:6.8 / Wp:65.8 / F:4.7 /
WW:6.6

KOKTAJL BANANOWO-JAGODOWY NA JOGURCIE

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Banan - 120 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 30 g (3 x Łyżka)
Miód pszczeleli - 24 g (1 x Łyżka)
Czarne jagody, mrożone - 20 g (0.2 x
Opakowanie)
Płatki jaglane - 0 g (0 x Łyżka)

1. Wszystkie składniki zmiksuj razem.
2. Jeżeli koktajl będzie za gęsty dodaj wody.

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x
Szklanka)

Obiad 16:00

K:664.3 / B:33.7 / T:25.2 / Wp:62.2 / F:14.4
/ WW:6.3

**ŁOSOŚ GRILLOWANY Z KASZĄ
BULGUR I SAŁATĄ**

Łosoś, świeży - 100 g (1 x Kawątek)
Kasza bulgur - 100 g (7.7 x Łyżka)
Sałata - 50 g (10 x Liść)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Sok cytrynowy - 12 g (2 x Łyżka)
Oliwa z oliwek - 10 g (1 x Łyżka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x
Szczypta)

1. Skrop sokiem z cytryny rybę i przypraw dowolnymi przyprawami.
2. Grilluj na grillu elektrycznym lub na patelni z rusztem po około 3 - 4 minuty .
3. Jeżeli nie posiadasz powyższych sprzętów kuchennych możesz upiec łososa w papierze do pieczenia.
4. Cebulę pokrój i wymieszaj z poszarpaną sałatą. Przypraw oliwą z oliwek, sokeim z cytryny oraz solą i pieprzem.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szkłanka)

Kolacja 20:00

K:479.9 / B:11.7 / T:5.4 / Wp:86.1 / F:6.7 /
WW:8.6

**RYŻ Z OWOCAMI LEŚNYMI I
JOGURTEM**

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Czarne jagody, mrożone - 100 g (1 x
Opakowanie)
Ryż biały - 100 g (6.7 x Łyżka)
Cynamon - 2 g (0.4 x Łyżeczka)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Ryż ugotuj w lekko osolonej wodzie.
2. Owoce podgrzej w garnuszku lub mikrofal.
3. Wymieszaj ryż jogurtem i owocami.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szkłanka)

SUMA:

K: 1993.1 B: 63.7 T: 47.6 WP: 286.2 F: 37.5 WW:
28.7

PIĄTEK

Śniadanie 08:00

K:416.2 / B:12.1 / T:9.7 / Wp:60.1 / F:6.0 /
WW:6.0

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z BORÓWKAMI, MALINAMI I PŁATKAMI OWSIANYMI

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)
Kiwi - 75 g (1 x Sztuka)
Płatki owsiane - 50 g (5 x Łyżka)
Miód pszczeleli - 24 g (1 x Łyżka)
Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

1. Płatki owsiane wymieszaj wcześniej z jogurtem aby zmiękły.
2. Dodaj do całości owoce, miód i nasiona lnu.

Drugie śniadanie 12:00

K:460.0 / B:18.8 / T:12.5 / Wp:66.1 / F:4.3 /
WW:6.7

WODA

Woda - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z SERKIEM KANAPKOWYM I POMIDORKAMI KOKTAJLOWYMI

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)
Kajzerki - 100 g (2 x Sztuka)
Serek naturalny do smarowania - 100 g (4 x Łyżka)

Obiad 16:00

K:647.6 / B:23.7 / T:15.1 / Wp:91.9 / F:20.1
/ WW:9.2

**SOS POMIDOROWY Z CIECIORKĄ I
WARZYWAMI**

Passata pomidorowa (przecier) - 200 g
(2 x Porcja)

Warzywa na patelnię włoskie - 100 g
(1 x Porcja)

Ciecierzycyca (w zalewie) - 100 g (5 x
łyżka)

Makaron penne - 70 g (1 x Szklanka)

Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)

Olej rzepakowy - 10 g (1 x łyżka)

Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)

Bazylija (suszona) - 4 g (1 x łyżeczka)

Oregano (suszone) - 3 g (1 x łyżeczka)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x
Szczypta)

1. Cebule pokrój i podsmaż na oleju.
2. Dodaj rozmrożone wcześniej warzywa.
3. Gdy warzywa będą miękkie dodaj odsączoną i przepłukaną cieciorke.
4. Wymieszaj z przecierem i dopraw.
5. Gotuj jeszcze 5 minut na wolnym ogniu.
6. Podawa z ugotowanym makaronem.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x
Szklanka)

Kolacja 20:00

K:454.9 / B:14.1 / T:11.1 / Wp:66.0 / F:5.0 /
WW:6.6

**KASZA JAGLANA Z JOGURTEM I
MUSEM**

Jogurt naturalny z dodatkiem
laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g
(1 x Porcja)

Truskawki - 70 g (1 x Garść)

Kasza jaglana - 70 g (5.4 x łyżka)

Banan - 60 g (0.5 x Sztuka)

Orzechy włoskie - 7.5 g (0.5 x łyżka)

1. Kaszę ugotuj na miękko.
2. Z owoców zrób mus.
3. Kaszę zjedz z musem, jogurtem i orzechami.

**HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ
CUKRU**

Herbata czarna, napar bez cukru - 250
g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 1978.7 B: 68.7 T: 48.4 WP: 284.1 F: 35.4 WW:
28.5

SOBOTA

Śniadanie 08:00

K:479.1 / B:18.3 / T:13.5 / Wp:60.5 / F:16.4
/ WW:6.1

"SZAKSZUKA" Z CIECIERZYCĄ

Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)
Ciecierzycyca (w zalewie) - 120 g (6 x łyżka)
Papryka czerwona - 98 g (0.7 x Sztuka)
Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)
Kajzerki - 50 g (1 x Sztuka)
Pietruszka, liście - 24 g (4 x łyżeczka)
Oliwa z oliwek - 5 g (0.5 x łyżka)
Siemię lniane (świeżo mielone) - 5 g (1 x łyżeczka)
Mielona słodka papryka - 1 g (0.2 x łyżeczka)
Mielona papryka chili - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Kurkuma - 0.5 g (0.1 x łyżeczka)

1. Cebulę, paprykę i pomidora posiekaj.
2. Wrzuć warzywa na patelnię z rozgrzaną oliwą i podduś, aż zmiękną.
3. Podczas smażenia dopraw papryką słodką i szczyptą kurkumy i papryki ostrej.
4. Gdyby warzywa przywierały do patelni, dodaj trochę wody, żeby uniknąć dodatku większej ilości tłuszczu.
5. Ciecierzycę odsącz z zalewy i przepłucz, jeżeli używasz takiej z puszki lub słoika.
6. Dodaj do warzyw.
7. Pod koniec duszenia dopraw całość solą i świeżo zmielonym pieprzem.
8. Na talerzu posyp zmielonym siemieniem i natką pietruszki lub kolendrą, szczypiorkiem.
9. Zjedz z pieczywem.

HERBATA CZARNA, NAPAR BEZ CUKRU

Herbata czarna, napar bez cukru - 250 g (1 x Szklanka)

Drugie śniadanie 12:00

K:358.3 / B:11.9 / T:11.9 / Wp:40.4 / F:7.4 / WW:4.1

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT NATURALNYM Z BRZOSKWINIĄ I MUSLI

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Brzoskwinia - 85 g (1 x Sztuka)
Musli z rodzynkami i orzechami - 60 g (6 x łyżka)

1. Jogurt wymieszaj z pokrojoną brzoskwinią i musli.

Obiad 16:00

K:675.1 / B:28.5 / T:20.4 / Wp:76.7 / F:18.0 / WW:7.5

SAŁATKA Z BROKUŁEM

Brokuły, mrożone - 225 g (0.5 x Opakowanie)
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)
Pomidor - 120 g (1 x Sztuka)
Makaron pełnoziarnisty - 100 g (1.4 x Szklanka)
Dyń, pestki, łuskane - 10 g (1 x Łyżka)
Majonez domowy z olejem rzepakowym - 10 g (1 x Łyżeczka)
Koper ogrodowy - 8 g (1 x Łyżka)
Czosnek - 5 g (1 x Ząbek)
Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)
Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Brokuła i makaron ugotuj.
2. Pokrój wszystkie składniki i połącz razem.
3. Z jogurtu, majonezu, czosnku i koperku zrób sos. Dopraw wedle uznania.

ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ CUKRU)

Zielona herbata (napar bez cukru) - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:456.3 / B:8.7 / T:9.2 / Wp:82.5 / F:5.2 / WW:8.2

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KASZA MANNA Z TRUSKAWKAMI

Woda - 375 g (1.5 x Szklanka)
Truskawki - 140 g (2 x Garść)
Kasza manna - 60 g (5 x Łyżka)
Miód pszczeni - 24 g (1 x Łyżka)
Czekolada gorzka - 18 g (3 x Kostka)
Len, nasiona - 5 g (1 x Łyżeczka)

1. Zagotuj wodę, dodaj kaszę i gotuj aż zgęstnieje.
2. Dodaj czekoladę.
3. Wylej kaszę na talerz, posyp pokrojonymi w plastry truskawkami i nasionami lnu.
4. Dodaj miód.

SUMA:

K: 1968.8 B: 67.4 T: 55.0 WP: 260.1 F: 47.0 WW: 25.9

NIEDZIELA

Śniadanie 08:00

K:359.3 / B:13.2 / T:6.4 / Wp:47.8 / F:11.7 /
WW:4.9

HERBATA ZIOŁOWA (NAPAR)

Herbata ziołowa (napar) - 250 g (1 x Szklanka)

JOGURT Z WARZYWAMI I PIECZYWEM

Pomidory koktajlowe - 200 g (10 x Sztuka)

Ogórek zielony (długi) - 180 g (1 x Sztuka)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Chleb żytni razowy - 90 g (3 x Kromka)

Szcypiorek - 20 g (4 x Łyżeczka)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Jogurt wymieszaj z pokrojonymi warzywami.

3. Dopraw do smaku.

4. Zjedz z pieczywem.

Drugie śniadanie 12:00

K:447.0 / B:15.8 / T:14.6 / Wp:63.4 / F:2.7 /
WW:6.4

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

KANAPKI Z NATURALNYM SERKIEM DO SMAROWANIA I SZCZYPIORKIEM

Kajzerki - 100 g (2 x Sztuka)

Serek naturalny do smarowania - 50 g (2 x Łyżka)

Orzechy nerkowca (bez soli) - 15 g (1 x Łyżka)

Szcypiorek - 10 g (2 x Łyżeczka)

Obiad 16:00

K:664.8 / B:31.7 / T:16.2 / Wp:85.7 / F:22.2 / WW:8.6

SPAGHETTI POMIDOROWE Z MAKARONEM PERŁNOZIARNISTYM

Pomidory z puszki (krojone) - 200 g (2 x Porcja)

Makaron spaghetti pełnoziarnisty - 120 g (2.4 x Porcja)

Cebula - 50 g (0.5 x Sztuka)

Wieprzowina, schab surowy bez kości - 50 g (0.5 x Kawalek)

Pietruszka, liście - 18 g (3 x Łyżeczka)

Olej rzepakowy - 10 g (1 x Łyżka)

Bazylija (suszona) - 4 g (1 x Łyżeczka)

Oregano (suszone) - 3 g (1 x Łyżeczka)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

Pieprz czarny mielony - 1 g (1 x Szczypta)

1. Ugotuj makaron
2. Pokrój mięso i cebulę. Podsmaż na tłuszczu.
3. Dodaj pomidory. Dopraw wg. uznania. Gotuj do czasu aż sos zgęstnieje. Konsystencję dobierz do własnych preferencji.
4. Makaron wymieszaj z sosem pomidorowym i wyłóż na talerz.
5. Posiekaj pietruszkę i nałóż na potrawę.

WODA MUSZYNIANKA

Woda Muszynianka - 250 g (1 x Szklanka)

Kolacja 20:00

K:536.7 / B:17.5 / T:17.0 / Wp:68.5 / F:7.4 / WW:6.9

KANAPKI Z HUMUSEM I POMIDORY Z JOGURTEM

Pomidor - 240 g (2 x Sztuka)

Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji) - 125 g (1 x Porcja)

Kajzerki - 100 g (2 x Sztuka)

Hummus z suszonymi pomidorami - 30 g (3 x Łyżeczka)

Cebula dymka - 20 g (1 x Sztuka)

Pieprz czarny mielony - 2 g (2 x Szczypta)

Sól biała - 1 g (1 x Szczypta)

1. Pieczywo posmaruj humusem.
2. Pomidory pokrój w kosteczkę, dodaj posiekaną cebulę i wymieszaj z jogurtem. Dopraw.
3. Zjedz kanapki z pomidorami.

**ZIELONA HERBATA (NAPAR BEZ
CUKRU)**

Zielona herbata (napar bez cukru) -
250 g (1 x Szklanka)

SUMA:

K: 2007.8 B: 78.2 T: 54.2 WP: 265.4 F: 44.0 WW:
26.8

Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
Pieczywo		
Kajzerki	425 g	8.5 x Sztuka
Chleb żytni razowy	270 g	9 x Kromka
Ryby i owoce morza		
Łosoś, świeży	100 g	1 x Kawalek
Pstrąg tęczowy, świeży	100 g	1 x Kawalek
Mięso i wyroby mięsne		
Mięso z ud kurczaka, ze skórą	70 g	0.6 x Sztuka
Wieprzowina, schab surowy bez kości	50 g	0.5 x Kawalek
Tłuszcze		
Olej rzepakowy	45 g	4.5 x Łyżka
Oliwa z oliwek	15 g	1.5 x Łyżka
Masło roślinne	10 g	2 x Łyżeczka
Nabiał		
Jogurt naturalny z dodatkiem laktoferyny (100 mg w porcji)	1750 g	14 x Porcja
Serek naturalny do smarowania	150 g	6 x Łyżka
Jaja kurze całe	56 g	1 x Sztuka
Ser, parmezan	16 g	2 x Łyżka
Inne		
Passata pomidorowa (przecier)	200 g	2 x Porcja
Miód pszczelej	79 g	3.3 x Łyżka
Hummus z suszonymi pomidorami	50 g	5 x Łyżeczka
Czekolada gorzka	30 g	5 x Kostka
Majonez domowy z olejem rzepakowym	10 g	1 x Łyżeczka
Orzechy i ziarna		
Orzechy włoskie	30 g	2 x Łyżka
Len, nasiona	25 g	5 x Łyżeczka
Masło orzechowe	15 g	1 x Łyżeczka
Orzechy nerkowca (bez soli)	15 g	1 x Łyżka
Dynia, pestki, łuskane	10 g	1 x Łyżka
Siemię lniane (świeżo mielone)	5 g	1 x Łyżeczka


Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
Napoje		
Woda Muszynianka.....	3000 g.....	12 x Szklanka
Herbata czarna, napar bez cukru.....	1500 g.....	6 x Szklanka
Herbata ziołowa (napar).....	1000 g.....	4 x Szklanka
Zielona herbata (napar bez cukru).....	1000 g.....	4 x Szklanka
Woda.....	875 g.....	3.5 x Szklanka
Herbata czarna, napar z cukrem.....	250 g.....	1 x Szklanka
Sok cytrynowy.....	18 g.....	3 x Łyżka
Przyprawy i zioła		
Pieprz czarny mielony.....	14 g.....	14 x Szczypta
Sól biała.....	13 g.....	13 x Szczypta
Bazylija (suszona).....	10 g.....	2.5 x Łyżeczka
Oregano (suszone).....	7.5 g.....	2.5 x Łyżeczka
Cynamon.....	4 g.....	0.8 x Łyżeczka
Tymianek.....	3 g.....	0.8 x Łyżeczka
Mielona papryka chili.....	1 g.....	1 x Szczypta
Mielona słodka papryka.....	1 g.....	0.2 x Łyżeczka
Kurkuma.....	0.5 g.....	0.1 x Łyżeczka
Zbożowe		
Płatki owsiane.....	270 g.....	27 x Łyżka
Kasza bulgur.....	200 g.....	15.4 x Łyżka
Makaron penne.....	170 g.....	2.4 x Szklanka
Ryż basmati.....	150 g.....	10 x Łyżka
Makaron spaghetti pełnoziarnisty.....	120 g.....	2.4 x Porcja
Kasza jęczmienna, pęczak.....	100 g.....	6.7 x Łyżka
Makaron pełnoziarnisty.....	100 g.....	1.4 x Szklanka
Ryż biały.....	100 g.....	6.7 x Łyżka
Ryż brązowy.....	100 g.....	6.7 x Łyżka
Kasza jaglana.....	70 g.....	5.4 x Łyżka
Kasza manna.....	60 g.....	5 x Łyżka
Musli z rodzynkami i orzechami.....	60 g.....	6 x Łyżka
Płatki jaglane.....	0 g.....	0 x Łyżka
Owoce i Warzywa		
Pomidor.....	840 g.....	7 x Sztuka
Pomidory koktajlowe.....	800 g.....	40 x Sztuka
Banan.....	660 g.....	5.5 x Sztuka
Truskawki.....	420 g.....	6 x Garść

Lista zakupów

Produkt	Gramatura	Ilość szacunkowa
Pomidory z puszki (krojone)	400 g	4 x Porcja
Cebula	300 g	3 x Sztuka
Brzoskwinia	255 g	3 x Sztuka
Buraki, gotowane w wodzie	240 g	2 x Sztuka
Brokuły, mrożone	225 g	0.5 x Opakowanie
Ciecierzycza (w zalewie)	220 g	11 x Łyżka
Ogórek zielony (długi)	180 g	1 x Sztuka
Jabłko	150 g	1 x Sztuka
Szpinak	125 g	5 x Garść
Czarne jagody, mrożone	120 g	1.2 x Opakowanie
Maliny	120 g	2 x Garść
Borówki amerykańskie	100 g	2 x Garść
Warzywa na patelnię włoskie	100 g	1 x Porcja
Awokado	98 g	0.7 x Sztuka
Papryka czerwona	98 g	0.7 x Sztuka
Kiwi	75 g	1 x Sztuka
Rzodkiewka	75 g	5 x Sztuka
Salata	75 g	15 x Liść
Winogrona	70 g	1 x Garść
Szczypiorek	65 g	13 x Łyżeczka
Pietruszka, liście	60 g	10 x Łyżeczka
Cebula dymka	20 g	1 x Sztuka
Koper ogrodowy	16 g	2 x Łyżka
Czosnek	15 g	3 x Ząbek
Mięta (świeża)	1 g	1 x Łyżka

LEGENDA

K: kalorie B: białko T: tłuszcze W: węglowodany F: błonnik WW: wymienniki węglowodanowe
Wartości odżywcze oraz waga produktów dotyczy części jadalnych.  potrawa porcjowana

Przy opracowaniu jadłospisu korzystano m.in. z Bazy Danych Produktów i Potraw Instytutu Żywności i Żywienia 

Review

Lactoferrin—The Health-Promoting Properties and Contemporary Application with Genetic Aspects

Anna Jańczuk¹, Aneta Brodziak^{1,*} , Tomasz Czernecki² and Jolanta Król¹ 

¹ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Dietitian Service, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

* Correspondence: aneta.brodziak@up.lublin.pl; Tel.: +48-8-1445-6836

Abstract: The aim of the study is to present a review of literature data on lactoferrin's characteristics, applications, and multiple health-promoting properties, with special regard to nutrigenomics and nutrigenetics. The article presents a new approach to food ingredients. Nowadays, lactoferrin is used as an ingredient in food but mainly in pharmaceuticals and cosmetics. In the European Union, bovine lactoferrin has been legally approved for use as a food ingredient since 2012. However, as our research shows, it is not widely used in food production. The major producers of lactoferrin and the few available food products containing it are listed in the article. Due to anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, immunomodulatory, antioxidant, and anti-tumour activity, the possibility of lactoferrin use in disease prevention (as a supportive treatment in obesity, diabetes, as well as cardiovascular diseases, including iron deficiency and anaemia) is reported. The possibility of targeted use of lactoferrin is also presented. The use of nutrition genomics, based on the identification of single nucleotide polymorphisms in genes, for example, FTO, PLIN1, TRAP2B, BDNF, SOD2, SLC23A1, LPL, and MTHFR, allows for the effective stratification of people and the selection of the most optimal bioactive nutrients, including lactoferrin, whose bioactive potential cannot be considered without taking into account the group to which they will be given.

Keywords: lactoferrin; bioactive potential; nutrigenomics; nutrigenetics; obesity; type 2 diabetes; cardiovascular diseases; personalized nutrition; food industry



Citation: Jańczuk, A.; Brodziak, A.; Czernecki, T.; Król, J.

Lactoferrin—The Health-Promoting Properties and Contemporary Application with Genetic Aspects. *Foods* 2023, 12, 70. <https://doi.org/10.3390/foods12010070>

Academic Editors: Arun K. Bhunia, Theodoros Varzakas, Joana S. Amaral, Benu P. Adhikari, Derek V. Byrne and Esther Sandra

Received: 10 November 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 19 December 2022

Published: 23 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The growing interest among consumers in recent years in food products that have a positive effect on the human body proves conscious concern for health and well-being. However, this imposes the introduction of changes in the food industry related to the implementation of innovative technologies in food production. One such industry is the dairy industry. Milk proteins, including lactoferrin, have gained particular importance in recent years. Nowadays, it is beginning to move towards profiling products and adjusting their properties and compositions to the requirements of specific consumer groups, also taking into account profiling for genetic predisposition.

The aim of the study is to present a review of literature data on lactoferrin's characteristics, applications, and multiple health-promoting properties, with special regard to nutrigenomics and nutrigenetics. This has not yet been the subject of any review devoted to lactoferrin. Generally, nowadays, the combination of food production with diet therapy or nutritional prophylaxis is a niche, especially with the use of advanced nutrigenomic and nutrigenetic tools. In the future, it will be a standard procedure due to the increasing demands of consumers, as well as the decreasing prices of genetic tests, the increased availability of these tests, and also an increase in the knowledge of specialists in the field of human nutrition and dietetics.

2. Materials and Methods

A comprehensive search for scientific articles on the reviewed topic devoted to lactoferrin was carried out using databases such as Scopus, Science Direct, Springer, PubMed, Medline, and Web of Science. When searching for information, the following keywords were used: "lactoferrin", "activity", "production", "pharmaceutical products", "cosmetics", "obesity", "type 2 diabetes", "cardiovascular diseases", "anti-inflammatory effect", "immune system", "nutrigenomics", "nutrigenetics", and "personalized nutrition". This study includes only those articles in which the data from the obtained research were related to bovine lactoferrin. The search was mainly limited to reports in the English language. Based on the criteria and keywords listed, 106 reports (including 85 studies) were selected for their findings. The review included works published in the years 2002–2023.

3. Occurrence and Structure of Lactoferrin

Lactoferrin (LF) is a protein belonging to the transferrin family, discovered for the first time in cow milk in 1939. It is produced by the epithelial mucosa. It is present in milk and colostrum, but can also be found in tears, saliva, gastric mucosa, the spleen, lymph nodes, skin, and even white blood cells [1–3]. LF accounts for about 1% of whey proteins [1,3]. Its concentration is highest in colostrum, but the level is not constant and decreases over the course of lactation, reaching its lowest values in mature milk [4]. The LF concentration is lower in cow milk than in human milk. In bovine colostrum, it is 2–5 mg/mL but decreases sharply during lactation to a level of 0.1–0.3 mg/mL in mature milk. The LF concentration in milk depends on genetic factors such as species or breed, as well as non-genetic factors, including parity and stage of lactation, daily milk production, and udder health [5–7]. The LF concentration in human serum is usually lower (about 1000 ng/mL) but increases with the degranulation of neutrophils during infection [8,9].

LF consists of about 700 amino acid residues, with a molecular weight of about 78 kDa [1]. Bovine lactoferrin (bLF) consists of 696 amino acids, while human lactoferrin has 691. Its isoelectric point is fairly high ($pI \approx 8.7$). The saturation of LF with iron (as one of the transferrins) significantly influences its structure. Each lactoferrin molecule contains two N- and C-terminal lobes joined by a helix. Each lobe consists of parts N1 and N2 or C1 and C2. Both lobes possess sites for attaching sugar residues and binding iron. Each of these homologous lobes can attach one iron atom. The forms of LF are classified according to the number of bound iron atoms. LF which attaches iron at each of the two lobes is called holo-LF, whereas the form that has no iron at all is known as apo-LF. There are also intermediate forms which have iron attached at only one lobe. The number of attached iron atoms influences the structure of LF, as the more iron atoms are present, the more cohesive it is, and thus the more resistant to proteolysis and high temperature [3]. Figure 1 shows the form of holo-LF and apo-LF with the marking of the iron-binding site.

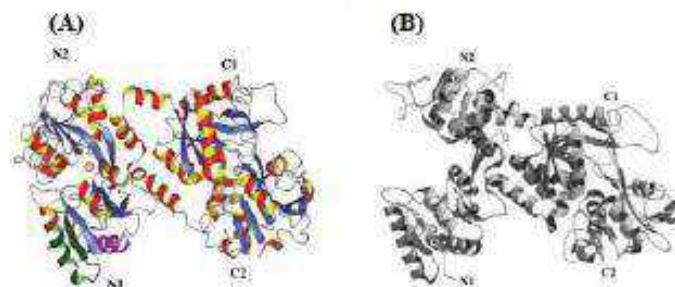


Figure 1. (A) Structure of holo-LF (pink spheres represent the iron binding site). (B) Structure of apo-LF [3].

Iron binding in hLF leads to conformational changes in the protein structure. The key amino acid to stabilize the Fe(III) ion in the N-lobe of hLF is Arg121. Using the small-angle neutron scattering method, structural differences between the open and closed hLF conformations can be detected. The radius of gyration of apo-LF appears to be smaller than that of holo-LF [10]. The effect of LF iron saturation on its stability under high temperatures was reported by Liu et al. [11]. They showed that the bLF denaturation index in Chinese milk was at least twice as high as in New Zealand milk in the temperature range of 65–80 °C. The authors suggested that this was related to the higher iron content in New Zealand milk (21.9% iron saturation versus 11.6% for Chinese milk). Another study confirmed that LF was more resistant to denaturation when saturated with iron. Binding to iron increases the stability of the protein structure [12]. Regardless of the iron content, LF is stable in the pH range from 4 to 11 [13].

4. Acquisition of Lactoferrin

Isolated LF takes the form of a pale pink, odourless powder—Figure 2.



Figure 2. LF isolated from milk [phot. A. Jańczuk].

Unfortunately, the isolation of LF is costly, due to the need to process a large volume of whey using chromatographic techniques and ultrafiltration. This is because LF accounts for only 1% of all whey proteins. LF is most often purified using ion-exchange chromatography, which is the greatest expense. This problem was the subject of research by Maciel et al. [1], aimed at reducing the cost of obtaining LF and increasing its recovery from sweet whey. To this end, they used a complex process based on ultrafiltration and expanded bed chromatography. The use of ultrafiltration in the diafiltration mode resulted in a 10-fold decrease in the volume of whey, which was then subjected to chromatography. This increased the degree of its recovery. However, reducing the volume also increases viscosity, which negatively affects the dynamic binding capacity of the bed. Thus, there is a need to establish a concentration limit which cannot be exceeded [1].

Figure 3 presents the LF production process used by the company Morinaga—one of the world leaders in its production. Morinaga LF is produced by a safe method restricting the use of additional chemicals. Only sodium chloride is used, with no buffering salts such as phosphate or acetate. Heat treatment during pasteurization and the freeze-drying of the whey is minimized. In the production process, skim milk or whey is subjected to cation exchange chromatography, followed by elution with sodium chloride. The LF eluate is desalinated and concentrated by ultrafiltration and pasteurized using minimal heat treatment (75 °C, 15 s). After it is freeze-dried and crushed, LF is ready for use in the food or pharmaceutical industries [14,15].

It should be reported that LF is mainly obtained from cow's milk. However, there is evidence that it differs from hLF in several aspects. Therefore, scientists became interested in the production of recombinant human lactoferrin (rhLF). Currently, it is produced on an industrial scale from *Aspergillus awamori* (Agennix Inc., Houston, TX, USA), rice (Ventria Bioscience, Denver, CO, USA), and transgenic cows (Pharming Group N.V., Leiden, The Netherlands) [16]. On a smaller scale, rhLF can be obtained from plant materials, i.e., yeast, filamentous fungi, tobacco, potatoes, sweet potatoes, tomatoes, ginseng, pears, barley, or wheat [17]. In the animal model, rhLF is produced using, i.e., embryonated chicken eggs, transgenic cows, and goats [18–20]. The production of rhLF using transgenic cows is very efficient, as up to 3 g/L can be produced. Moreover, the produced rhLF exhibits the same effect as hLF in terms of the two most important biological activities, i.e., iron binding and iron release [18]. Transgenic goats are able to produce 0.765 mg/mL rhLF with a purity of 97% [21]. Tutykhina et al. [19] attempted to produce rhLF in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs. In total, 0.8 mg of protein per embryo was obtained (85% rhLF). The antioxidant and antimicrobial activity of the resulting rhLF was equivalent to that of the hLF [19].



Figure 3. LF production process.

5. Effect of Temperature on Lactoferrin Content

Native LF can be supplied to the human body through the consumption of milk and dairy products. However, the origin and heat treatment of milk have been shown to have an enormous impact on the retention of LF in processed dairy products. According to Liu et al. [11], raw milk from New Zealand exhibited 21.9% iron saturation, while milk from China was only 11.6% saturated with iron. This means that the two materials differ significantly in their rate of thermal denaturation of LF. That study assessed thermal processes in the range of 65–121°C in time periods from 2 to 300 s. The selection of these values was deliberate, aimed at representing the thermal processes currently used in milk processing. In the 65–80 °C temperature range, the degree of denaturation of Chinese

milk was more than twice the level obtained for New Zealand milk. Interestingly, the denaturation of LF at 85 °C was the same in both materials, but at 65 °C, it was 80 times faster in Chinese milk. At 95 °C, the pattern was reversed, and the denaturation was twice as fast in New Zealand milk as in Chinese milk. The higher stability of LF in New Zealand milk was probably due to its higher iron content. On this basis, the authors developed an Arrhenius model and a kinetic model that can be used to calculate the amount of native LF remaining in the product after heat treatment. In the future, this could be used to design technological processes that will maximize the amount of this valuable protein remaining intact in the product [11].

The denaturation of LF and other proteins also takes place when the protein is exposed to a strong acid, base, or concentrated organic or inorganic salt. The denaturation of the protein changes its structure, which determines its properties such as iron-binding capacity or antibacterial activity. The biological functions of LF can also be influenced by factors such as high pressure, the presence of other proteins and polysaccharides, ionic strength, pH, or temperature. Due to the valuable properties of LF, it is important to retain as much as possible of its native form in the final product. This requires the continual monitoring of the processes and an appropriate selection of processing parameters [3].

6. Biological Properties of Lactoferrin

LF has a number of properties positively affecting the human body, mainly anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, immunomodulatory, antioxidant, and antitumour properties [1,7,22]. Research by the New Zealand pharmaceutical producer Quantec showed that a protein complex containing LF and lactoperoxidase, obtained from fresh pasteurized cow milk, can protect human cells against COVID-19. The patented defence protein IDP exerts anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial effects [23]. LF has also found its application in tissue engineering [24].

In addition, LF has an anti-allergic effect. The administration of LF reduces allergic skin reactions [25], atopic keratoconjunctivitis [26], and pleuritis caused by hen's egg albumin [27]. Only one of the studies published so far [28] indicates a potential allergenic effect of LF.

Changes in the lactoferrin gene may also be important in susceptibility to iron deficiency, obesity, or resistance to noroviruses. The human lactoferrin (LTF) gene is located on chromosome 3q [29]. It was confirmed that the expression of the LTF gene in the subcutaneous adipose tissue in people with type 2 diabetes and elevated triglyceride levels is lower than in thin people. This difference is particularly evident in adipocytes [30]. The knockdown of the LTF gene has an effect on the differentiation of human adipocytes, mostly through the modulation of iron homeostasis [31]. In addition, polymorphism in the lactoferrin gene at the position of the 632 T/T genotype is associated with susceptibility to diarrhoea, i.e., in North Americans travelling to Mexico [32].

6.1. LF and Obesity

LF exhibits protective activity in obesity. LF supplementation improves body mass index (BMI), waist-hip ratio (WHR), and fasting glucose concentration, as well as insulin sensitivity. LF reduces the accumulation of visceral fat and suppresses appetite, which is particularly important for fighting obesity, a growing problem all over the world. The global incidence of diabetes nearly tripled from 1975 to 2016. In 2016, as many as 39% of adults (over the age of 18) were overweight, and 13% of the global adult population was obese [33].

Table 1 presents the studies showing the potential benefits of introducing LF supplementation in the course or prevention of obesity.

Table 1. Use of LF supplementation in obesity (own work).

LF Form	Dosage	Research Assumptions	Effect of LF	References
BLF	300 mg	Effects of BLF on systemic lipid metabolism and visceral fat reduction	A significant reduction in visceral fat area (VFA) was observed (-14.6 cm^2), as well as a decrease in body weight (-1.5 kg), BMI (-0.6 kg/m^2) and waist circumference (-4.4 cm)	[34]
Enteric-coated LF (eLF)	No data	Effect of LF supplementation on weight reduction (excluding subjects with BMI ≥ 30 and/or hyper-LDL cholesterolemia)	eLF caused a significant decrease in adipose tissue (-10.2 cm^2 , $p < 0.01$) and reduction in the average visceral fat content (-16.2 cm^2 , $p < 0.01$) and a significant decrease in BMI (-0.38 kg/m^2 , $p < 0.05$)	[35]
LF	200 mg/day	Effect of LF on weight loss and appetite in obese school-age children	LF was shown to reduce appetite in obese school-aged children. It did not cause weight loss	[36]
BLF	100 mg/kg BW	Effect of LF supplementation on the development of obesity on a high-fat diet (HF) in mice	BLF reduced the increase in body weight gain by 50%, decreased the total cholesterol concentration in the blood serum, and positively influenced the blood glucose level. No differences were noted in triacylglycerol content	[37]
LF	15% of total protein source	LF prevents obesity and diet-induced development formation of hepatic steatosis in C57Bl/6j mice	LF supplementation was shown to improve weight loss and limit its subsequent regain, mitigated fatty liver, improved glucose tolerance, and reduced the inflammation of adipose tissue	[38]

Apart from diet, physical activity and lifestyle, the complex pathogenesis of obesity is significantly influenced by genetic factors [39]. Obesity is a polygenic disease whose pathogenesis involves the FTO, PLIN1, TRAP2B, and BDNF genes [40,41]. The FTO gene encoding the enzyme alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase regulates thermogenesis, energy homeostasis, and the metabolism rate, increases food intake, and takes part in the differentiation of adipocytes, thereby playing an important role in the accumulation of adipose tissue [39,42]. A number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in this gene, such as rs9939609, rs6499640, rs8050136, and rs1558902, which are positively correlated with the incidence of obesity.

For example, the rs9939609 AA genotype is strongly correlated with the accumulation of adipose tissue. It is associated with the demethylation of ghrelin mRNA N6-methyladenosine, which is linked to the total level of ghrelin and acyl ghrelin. This change results in a weakening of satiety, leading to overconsumption and a preference for high-energy foods [41,42]. Appetite suppression induced by LF intake may prove particularly useful for obese people with the rs9939609 AA genotype. However, this must be confirmed by research in a group selected according to genotype.

Another mechanism of the development of obesity is observed in the case of SNPs located in the perilipin-1 gene (PLIN1). Perilipin is the main protein surrounding the lipid droplet in adipocytes. It modulates interactions between lipids and triacylglycerol reserves [32,33]. Polymorphisms in this gene are associated with the excessive accumulation of adipose tissue and disturbances of cardiometabolic markers [43]. In the case of the rs894160 polymorphism located in the PLIN1 gene, there is a slow but greater reduction in body weight on a diet with a negative energy balance in individuals with the AA variant. In addition, the weight loss lasts longer in people with the AA genotype compared to GG [40]. Holzbach et al. [43] described an interaction of the rs89416 SNP with carbohydrates in the diet, of importance for the dietary treatment of obesity and nutrigenomics. Carbohydrate

consumption in people with the PLIN11482 G > A polymorphism modulated waist circumference and the homeostatic model assessment of insulin resistance [43]. The waist circumference increased in carriers of the PLIN 11482G > A GA/AA variant when the intake of complex carbohydrates was <144 g/day. The reverse pattern was observed in carriers of the PLIN 11482 G > A GG variant, in whom a low intake of complex carbohydrates resulted in a more efficient reduction in waist and hip circumference [44]. In terms of nutrigenomics, and thus taking into account the mechanism of action of lactoferrin on the human body as well as biochemical dysfunctions resulting from genotype, lactoferrin can be proposed as a possible nutraceutical of importance not only in the treatment of overweight and obesity but also in their prevention in people with strong predispositions.

A review of the research reveals that LF is an effective component of diet supplements for people with excess body weight, including those with a predisposition for obesity. It is worth noting that overweight or obese individuals often consume dairy products, as they are convenient and do not require preparation. Yoghurt fortified with LF is already being produced, e.g., by the Japanese company Morinaga. In addition, diet supplements containing LF meant for people with excess body weight have already appeared on the market. One example is the Japanese supplement Nice rim essence Lactoferrin® by Lion Corp, recommended in the amount of 3 tablets a day (300 mg lactoferrin) [45].

6.2. LF and Type 2 Diabetes and Anti-Inflammatory Effects

Long-term excess body weight and obesity may result in the development of type 2 diabetes. The number of cases of this disease is continually rising. In 2019, diabetes was the ninth most common cause of death. In 2000–2016, there was a 5% increase in premature death due to diabetes [46].

Type 2 diabetes mainly affects adults, but levels of obesity, which is associated with type II diabetes, are rising among children. Mohamed and Schaalan [47] assessed the effect of diet supplementation with LF in a group of 60 children with type 2 diabetes. The children were divided into two groups matched for age and gender. The study participants continued their standard diabetes treatment, but one of the groups additionally received one capsule with 250 mg of camel LF (cLF) every day for three months. The antidiabetic effect of cLF was confirmed by improvements in BMI, lipid profile, and glycated haemoglobin (HbA1c) in the experimental group. There was also a significant decrease in the levels of IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , and lipocalin-2, which indicates that LF has an anti-inflammatory effect. An antioxidant effect was confirmed by an increase in the level of superoxide dismutase (SOD) and the expression of Nrf2. This effect is especially important because obesity is often described as a mild inflammatory disease in which levels of C-reactive protein (CRP), tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), and IL-6 increase. The body's defences are based on an enzymatic antioxidant system as well as less effective endogenous and exogenous antioxidant substances such as vitamin C or uric acid.

Superoxide dismutase (SOD) is an important element of anti-radical defence. The rs4880 polymorphism of the SOD2 gene coding for the important mitochondrial dismutase causes an alanine-to-valine substitution (Ala16Val) [37]. The conformational changes resulting from this mutation lead to a reduction in SOD2 activity. The risk of obesity in people with the Val/Val genotype of rs4880 was shown to be twice as high as in those with the Ala/Ala or Ala/Val genotype [48]. Results obtained by Lewandowski et al. [49] showed that rs4880 variation together with an additional factor such as age causes a 6.19-fold increase in the risk of obesity in individuals with the C/T genotype in comparison with people with the C/C or T/T genotype. In addition, with each year of life, the risk of obesity increased by 5.0%. Interestingly, according to the results of that study, in the model taking into account genotypic variation and BMI, subjects with the C/T genotype had a 5.49-fold lower risk of type 2 diabetes [49]. Thus, it seems that LF intake may be an effective preventive factor and may mitigate the harmful consequences of the rs4880 polymorphism in the SOD2 gene.

The status of antioxidants such as vitamin C in the body is also dependent on genetic predisposition. It should be noted, however, that the role of vitamin C in the body is not limited to its antioxidant properties. The concentration of vitamin C is inversely correlated with insulin resistance and obesity [50]. In addition, vitamin C inhibits lipolysis and the formation and growth of mature adipocytes [51]. Vitamin C is essential for the biosynthesis of carnitine, which is responsible for the transport of long-chain fatty acids through the mitochondrial membrane for the purpose of β -oxidation and the subsequent oxidation of fat. A vitamin C deficiency in the plasma increases the carnitine concentration and thereby limits β -oxidation. People with serum vitamin C deficiencies can thus be resistant to losses of excessive body weight. This situation can be aggravated by dietary behaviour, which can additionally contribute to vitamin C deficiencies. People with excess body weight much less often consume products rich in vitamin C, such as fruits and vegetables [52].

Vitamin C homeostasis in the body can be disturbed by the rs33972313 polymorphism in the SLC23A1 gene, which causes a valine-to-methionine substitution in transporters, leading to a decrease in its concentration in the plasma and halving the rate of accumulation in cells [53]. People with the AA genotype have a 25% lower serum concentration of ascorbic acid, and AG heterozygotes have a 19% lower concentration of ascorbic acid than GG homozygotes [54]. Given the interactions taking place between vitamin C and LF in the human body, their combined supplementation may offer greater health benefits arising from their synergistic activity. This is particularly important in the case of people with polymorphisms limiting the status and bioavailability of vitamin C.

A daily intake of 250 mg of cLF per day confirmed that it exerts anti-inflammatory, immunomodulatory, and hypoglycaemic effects and improves insulin sensitivity. cLF supplementation can thus ensure better control of glycaemia than the use of conventional antidiabetic drugs alone [47]. The possibility of long-term, preventive LF supplementation in people with a genetic predisposition to type 2 diabetes, which is a polygenic disease, should be considered. A number of SNPs associated with diabetes have been identified in various genes. One of the strongly correlated polymorphisms is rs8192678 in the PGC-1 α gene. This gene is involved in the homeostasis of energy, lipids, and glucose. As a crucial gene regulating metabolic processes, it is extremely important in the development of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. Therefore, carriers of the A allele in rs8192678, especially AA homozygotes in the Caucasian and Indian populations, have a significantly higher risk of type 2 diabetes [55]. Long-term hyperglycaemia leads to serious disorders, such as diabetic nephropathy or cardiomyopathy. Hanan et al. [56] conducted a study on an animal model aimed at investigating the effect of quercetin and/or bLF reducing the concentration of advanced glycation end products, connective tissue growth factor, and the expression of inflammatory cytokines in rats with induced diabetic nephropathy and cardiomyopathy. The administration of bLF to rats, especially in combination with quercetin, was effective at controlling kidney and cardiac dysfunction induced by hyperglycaemia [48].

6.3. LF and Cardiovascular Diseases

bLF is also used to prevent cardiovascular disease. It exerts a beneficial effect on lipid metabolism and reduces the concentration of total and LDL cholesterol. The positive correlation between a higher serum concentration of bLF and a lower BMI suggests that LF can be used to prevent cardiovascular disease [57].

Dietary intervention based on LF can be one of the corrective measures for patients with the rs268 polymorphism in the lipoprotein lipase gene (LPL). This polymorphism is associated with the content of triglycerides, HDL cholesterol, and total cholesterol in the blood. The GG and AG genotypes are associated with an increased serum triglyceride concentration, which is also positively correlated with age and body weight. In addition, they are associated with an increase in fasting glycaemia and a higher risk of type 2 diabetes and coronary disease [58,59].

It is also worth noting the genetic link between obesity and cardiovascular disease. This association has been noted in studies of polymorphisms of the MTHFR gene. The two most commonly described MTHFR polymorphisms in the literature, C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131), significantly increase the risk of hyperhomocysteinaemia and cardiovascular disease [60]. At the same time, the rs1801133 (C677T) polymorphism is associated with a higher risk of obesity. Studies in animals have confirmed that the administration of LF can reduce the level of homocysteine, thereby lowering the risk of cardiovascular disease [61,62]. Thus, the use of LF is a promising preventive method, especially in people with the TT rs1801133 genotype, in whom the homocysteine concentration is usually 2.91 mmol/L higher than in people with the CC variant. It should be noted that the odds ratio (OR) for obesity was 1.23 for a 5 μ mol/L increase in the homocysteine concentration [62].

The concentration of circulating LF in the blood is also inversely proportional to the level of free fatty acids following the use of a high-fat diet. In addition, LF exhibits strong antihypertensive activity, as it blocks angiotensin receptor AT1 and inhibits the renin-angiotensin-aldosterone system [63]. Ling et al. [57] conducted a study to test the effect of bLF supplementation on the development of atherosclerosis in mice. The mice were divided into three groups, one of which received distilled water (HFCD), whereas the other two received a solution of bLF at a concentration of 2 mg/mL (MLF) or 10 mg/mL (HLF). In comparison with group HFCD, the mice in groups MLF and HLF had much lower total cholesterol levels in the blood serum (MLF by 40%, HLF by 27.7%). In addition, there was a significant increase in the excretion of cholesterol in the faeces, by 53.4% in group MLF and by 40.8% in group HLF. bLF mitigated fatty liver and lesions in the aorta in the MLF and HLF mice. There was also a reduction in the expression of the protein HMG-CoA reductase, which reduces cholesterol synthesis, and an increase in the activity of cholesterol 7- α hydroxylase, an enzyme which slows down the synthesis of bile acids from cholesterol.

LF is able to bind iron, and for this reason, it has been used to treat anaemia or iron deficiency. One of the predisposing factors for a low iron concentration in the body is genetic variation. A number of polymorphisms associated with serum levels of iron have been identified. One of these is the single nucleotide polymorphism rs855791, located in the gene encoding the enzyme transmembrane serine protease 6 (TMPRSS6). This enzyme is associated with the absorption and resorption of iron in the body. The presence of the T allele reduces the iron concentration in the serum, the saturation of transferrin with iron, haemoglobin content in the erythrocytes, and mean corpuscular volume [64]. Bovine LF has been shown to be very similar to human LF in its structure and function. Therefore, it can be effective at regulating inflammation (it reduces levels of IL-6) and increasing iron levels in the body, as well as restoring its physiological transport to cells [65]. In addition, LF supplementation, compared to ferrous sulphate, does not cause side effects. The absence of side effects from bLF is most likely linked to the lack of free iron available in the gastrointestinal tract. The presence of free iron disturbs intestinal peristalsis and irritates the mucosa, causing adverse gastrointestinal effects. During supplementation with free iron salts, only 20–30% of the dose is absorbed, and the remainder causes gastrointestinal dysfunction [66].

Table 2 presents the studies showing the effect of LF supplementation on haematological parameters.

Table 2. The effect of LF supplementation on iron balance in the body (own work).

LF Form	Dosage	Research Assumptions	Effect of LF	References
bLF	200 mg/day	Effectiveness of bLF and ferrous sulphate in treating iron deficiency and iron-deficiency anaemia in pregnant women	Administration of 30%-iron-saturated bLF to pregnant women increased haemoglobin levels, erythrocyte counts, and levels of ferritin and total iron. bLF caused a decrease in the IL-6 level and an increase in the hepcidin concentration	[67]
bLF	200 mg/day	Safety and efficacy of LF versus ferrous sulphate in pregnant women	Supplementation LF decreased the IL-6 level by 26% but increased by 21% in the group that received ferrous sulphate. No side effects were noted in the LF group, whereas in the ferrous sulphate group, they were reported by 16.5% of women	[65]
bLF	38 mg bLF/100 g infant formula	Efficacy of lactoferrin-enriched infant formula in improving hematologic indices and iron status	The body weight of the infants receiving bLF was significantly higher than that in the group that received iron. Milk enriched with bLF significantly increased the concentration of haemoglobin (Hb) by 12%, ferritin by 76%, and total iron by 29%, significantly decreasing the detection rate of anaemia from 12% to 5% and of iron-deficiency anaemia from 35% to 16%	[68]
bLF	200 mg/day	Evaluation of the effectiveness of LF administration before and after a meal. The possible influence of digestive protease on LF lactoferrin degradation	An increase in serum haematological parameters, i.e., haemoglobin, erythrocytes, ferritin and iron, was observed only in the group in which the bLF supplement was administered before meals	[69]

6.4. LF and Immune System

Human LF, hLF, also exerts a positive effect on the immune system, as it modulates both specific and nonspecific immune mechanisms. hLF promotes the maturation, differentiation, and activation of T and B lymphocytes. The introduction of lactoferrin to the body in the diet can influence the systemic immune response by modulating the activity of cytokines (IL-4, IL-2, and IL-12) and their expression in the blood and lymph [70]. Because it is present in body fluids, i.e., saliva, tears, mucous, and gastrointestinal fluids, it is the first line of defence against infections [71–73]. This includes bacterial infections (*Escherichia coli* [74,75], *Helicobacter pylori* [76], and *Staphylococcus aureus*) [75], viral infections (herpes virus (HSV) [77], human immunodeficiency virus (HIV) [78], hepatitis type B and C [79] virus (HBV and HCV), or rotaviruses), and fungal infections (*Candida albicans*) [73]. LF reduces inflammation and has beneficial effects in cancer patients, exhibiting cytotoxic activity through damage to cell membranes and cell lysis, which reduces tumours [80]. hLF is utilized by immune cells and supplied locally in the case of inflammation by neutrophils, which store it in their secondary granules. Following the activation of neutrophils, hLF is released into the blood, where its concentration can increase from about 1 mg/mL (level in normal conditions) to even 200 mg/L. Due to its high affinity for iron, hLF is able to capture iron from the surface of microorganisms, thereby limiting their growth and protecting the target host cells. In addition, hLF forms complexes with proteins taking part in the immune response, such as osteopontin. These are thought to be able to modulate the antibacterial and immunostimulatory effects of hLF [70].

Anti-inflammatory, anti-infective, and immunoregulatory agents have been shown to be useful in treating infections with SARS-CoV-2. Lactoferrin exhibits all of these effects and can be included in the treatment of SARS-CoV-2 infection. LF has been shown to exhibit activity against a wide range of viruses, including SARS-CoV, which is closely related to SARS-CoV-2 [81,82]. LF can inhibit the binding of SARS-CoV-2 to host cells.

LF may therefore be beneficial in preventing the occurrence of SARS-CoV-2 [83]. The administration of LF preparations to patients with COVID-19 may be effective at controlling gastrointestinal symptoms and may limit the spread of the virus from the faeces and intestines. LF can be used as a primary or supplementary treatment in both symptomatic and asymptomatic patients [84]. Quantec noted that the use of a complex of milk proteins yielded better results against COVID-19 than pure LF or lactoperoxidase. The company patented the protective milk-derived protein IDF. This complex strengthens the immune system and therefore is effective against influenza and herpes and may be helpful in the fight against SARS-CoV-2 [85].

Another valuable function of LF is its capacity to reduce oxidative stress. During inflammation, phagocytes release reactive oxygen species, which neutralize microorganisms. Unfortunately, reactive oxygen species also negatively affect live tissue, leading to necrosis. Tissues then release iron, which takes part in the Haber-Weiss reaction, leading to the generation of more free radicals. LF, owing to its iron-binding capacity, helps to alleviate oxidative stress [70,86].

The composition of the gut microbiota is an important element of the immune system. Bifidobacteria, which are naturally present in the human gastrointestinal tract, exert a positive influence on the immune response and prevent infection. Bifidobacteria are more often present in the gastrointestinal tract of breastfed infants than in those receiving formula because human milk, and especially colostrum, is naturally rich in LF. The LF concentration in human colostrum is 5.9 mg/L. Over the course of lactation, it falls to 2.9 mg/L in transitional milk and to 2.5 mg/mL in mature milk [57,58].

Table 3 presents the studies on the effect of LF supplementation on the immune system.

Table 3. Effect of LF supplementation on the immune system (own work).

LF Form	Dosage	Research Assumptions	Effect of LF	References
bLF	Placebo—first week 100 mg—second week 200 mg—third week	Potential immune-modulating properties and antioxidant activity of oral supplementation of bovine lactoferrin in humans.	After two weeks of bLF supplementation, the total T cell count had significantly increased by 29%, helper T cells by 22%, and cytotoxic T cells by 25%. The number of NK cells was not affected by the supplementation. An important finding was the significant increase in antioxidant capacity after two weeks of LF supplementation.	[87]
Liposomal bovine LF (LLF)	128–192 mg/day	LLF as potential prevention and cure for COVID-19.	Administration of LLF led to 100% recovery in 75 SARS-CoV-2-positive patients within 4–5 days.	[88]
LLF	1 g/day	Evaluation of the antiviral effect of oral and nasal LLF in asymptomatic and mild to moderate COVID-19 patients.	Faster recovery from COVID-19 in patients taking LLF.	[89]
bLF	0.6 g/L	Comparison of the gut microbiome profile and its metabolites in infants up to 12 months of age who received formula containing bLF and MMGF (milk fat globules) or regular formula without these additives.	Infants fed the formula with bLF and MMGF showed an increase in numbers of <i>Bacteroides uniformis</i> and <i>Bacteroides plebeus</i> and of bifidobacteria in the faeces, accompanied by a decrease in numbers of <i>E. coli</i> , in comparison to infants receiving the standard formula up to 4 months of age.	[90]

7. Scale of Lactoferrin Production

Due to its unique properties, interest in LF is continually growing. The demand for the protein nearly doubled in the years 2014–2020. A key producer in Europe—Friesland Campina Ingredients—is planning to increase production to 70 tonnes this year in response to the growing market demand [91]. Similar steps are being taken by other world producers, including Morinaga, whose German factory declared an increase in production capacity to 170 tonnes [92]. The global bLF market in 2021 was valued at 235.9 million USD, and this value is projected to increase to 411.8 million USD in 2028 [93]. The European lactoferrin market was worth 15.37 million USD in 2021 and is expected to increase to 23.53 million USD by 2026 [94]. Key LF producers have their factories mainly in Europe, New Zealand, Australia, and California. The exportation of LF to other parts of the world, e.g., South America, is one of the factors affecting the high price of LF [95].

Table 4 presents a list of key lactoferrin producers around the world.

Table 4. Key lactoferrin producers around the world (own work based on [96]).

Producer	Country
MILEI GmbH	Leutkirch im Allgäu, Germany
FrieslandCampina DOMO	Amersfoort, The Netherlands
Synlait Ltd.	Dunsandel, New Zealand
Glanbia Plc.	Kilkenny, Ireland
Bega Bionutrients	Port Melbourne, VIC, Australia
Saputo Dairy Australia Pty Ltd.	Allansford, VIC, Australia
Fonterra Co-operative Group	Auckland, New Zealand
Armor Protéines SAS	Loudéac, France
Hilmar Cheese Co.	Hilmar, CA, USA
Murray Goulburn Co-operative Co. Ltd.	Southbank, VIC, Australia
Ingredia	Arras, France

8. Applications in Industry

LF is used in the food sector, pharmaceutical industry, and cosmetics industry. It is used in infant formulas, nutraceuticals, fermented milk products, processed meats, and dietary supplements [16,97]. In the pharmaceutical and cosmetics industries, it appears as an ingredient in preparations supporting the treatment of herpes or skin lesions, strengthening immunity, raising iron levels, supporting the intestinal microbiota, or limiting bacterial growth [73].

Table 5 presents selected pharmaceutical and cosmetic products manufactured using LF.

In the European Union, bLF has been approved for use as a food ingredient since 2012, following the registration of the protein as a novel food by Friesland Campina. In the application for infants aged 0–6 months, the bLF intake is set at 200 mg per kg bodyweight and 1.2 g per day. The recommendation for adults is at the level of 1.4–3.4 g per day. Friesland Campina presented a mouse study that showed no adverse effects at 2000 mg/kg of body weight. LF can be used in various categories of food. The amounts that have been approved for use are presented in Table 6. Foods to which LF has been added must have ‘lactoferrin from cows’ milk’ written on the label [14,98].

Products containing LF are already available in the food sector. The widest assortment is available for powdered milk for infants, but other products have appeared as well, such as chewing gum, jelly sweets, non-alcoholic beverages, and yoghurt (Table 7).

Table 5. Use of LF in pharmaceutical products and cosmetics (own work).

Product Type	Product Name	Lactoferrin Content	Use	Web Page Link
Cream	Endvir Simplex (Vitis Pharma)	6%	- treatment of herpes - treatment of mucosal lesions	http://vitispharma.pl/katalog/produkt/produkty/endvir/endvir-simplex (accessed on 16 May 2022)
Cream	Acnes (Farmim Ltd.)	No data	- treatment of acne	https://farmim.pl/product/acnes-krem/ (accessed on 16 May 2022)
Capsules	Lactoferrin (Pharmabest)	100 mg/capsule	- enhancing immunity - supporting treatment of colds and infections - supporting intestinal microbiota - mitigating symptoms of lactose intolerance	https://pharmabest.pl/sklep/produkt/laktoferyna-kapsulki/ (accessed on 16 May 2022)
Capsules	Lactoferrin (Jarrow Formulas)	250 mg/capsule	- treatment of <i>Helicobacter pylori</i> - stimulation of the immune system - improvement of iron absorption	https://jarrow.com/products/lactoferrin-250-mg-60-capsules (accessed on 16 May 2022)
Capsules	IronSorb + Lactoferrin (Jarrow Formulas)	200 mg/capsule	- correction of iron deficiency	https://jarrow.com/products/ironsorb-lactoferrin-83-capsules (accessed on 16 May 2022)
Capsules	Lactoferrin LFS-90 100 mg (Almese—Medicaline)	100 mg/capsule	- supporting immunity	https://almese.pl/pl/p/Lactoferrin-LFS-90-100-mg-w-30-kapsulek/228 (accessed on 16 May 2022)
Oral drops	Lactoferrin (Pharmabest)	100 mg/12 drops	- supporting treatment of infections - correcting iron imbalances - regeneration of intestinal epithelium (bifidogenic activity) - support in immunodeficiency - support in iron deficiency	https://pharmabest.pl/laktoferyna-kropki-doustne/ (accessed on 16 May 2022)
Sachets	Lactoferrin (Pharmabest)	100 mg/sachet	- reducing the risk of sepsis in premature infants with very low birth weight - stimulation of the growth of beneficial gut microbiota - antioxidant activity	https://pharmabest.pl/sklep/produkt/laktoferyna-saszetki/ (accessed on 16 May 2022)
Sachets	Fibroxine (Atlasigma)	50 mg/sachet	- supporting physiological intestinal function	https://www.atlasigma.com/ (accessed on 16 May 2022)
Dragées	Florida Junior (PhytoPharm)	6 mg/dragée	- treatment of irritation of the throat and larynx - tooth regeneration	http://phytopharm.pl/en/florida (accessed on 16 May 2022)
Toothpaste	Lactoferrin Toothpaste (DENTE91)	No data	- inhibition of growth of bacteria inducing gingivitis - prevention and treatment of caries - maintaining oral hygiene	https://dente91.com/dente91 (accessed on 16 May 2022)
Mouthwash	Lactoferrin Mouthwash (DENTE91)	No data	- protection against gingivitis, periodontitis, oral mycosis, and bacterial infections - prevention of tartar and plaque formation	https://dente91.com/dente-91 (accessed on 16 May 2022)

Table 6. Use of bLF in food products [99].

Food Category	Maximum Level of bLF
Infant formulae and follow-on formulae within the meaning of Regulation (EU) No 609/2013 (ready to drink)	100 mg/100 mL
Dairy-based foods for small children (ready-to-eat)	200 mg/100 g
Processed cereal products (solid)	670 mg/100 g
Food for special medical purposes within the meaning of Regulation (EU) No 609/2013	Up to 3 g/day
Milk-based beverages	200 mg/100 g
Powdered milk-based drink mixes (ready-to-drink)	330 mg/100 g
Beverages based on fermented milk (including yoghurt drinks)	50 mg/100 g
Non-alcoholic drinks	120 mg/100 g
Yoghurt-based products	80 mg/100 g
Cheese-based products	2000 mg/100 g
Ice cream	130 mg/100 g
Cakes and pastries	1000 mg/100 g
Candies	750 mg/100 g
Chewing gum	3000 mg/100 g

The use of LF in infant formulas has many beneficial health-promoting effects, increasing immunity and positively influencing the skeletal and digestive systems [97]. Such formulas are mainly found in Spain, Indonesia, and South Korea [16]. Li et al. [100] assessed the effect of modified milk enriched with bLF in the amount of 0.6 g/L and bovine milk fat globule membrane (MFGM) on infant development. The results of the study show that children receiving this mixture had a higher neurodevelopmental profile at 365 days of age and higher language abilities at 545 days. Moreover, diarrhoea, vomiting, fungal infections, and respiratory problems were less common in these children.

The use of LF is also of technological importance. LF digested with pepsin–lactoferricin is a strong antimicrobial peptide that can be used in food preservation due to its high resistance to high temperatures [101]. LF in yoghurt production positively affects the physicochemical structure of the product. In this case, however, the form of lactoferrin is significant, as apo-LF has been shown to inhibit the growth of lactic acid bacteria, while holo-LF had the opposite effect. The use of LF had no negative effect on the shelf life of yoghurt [97]. It is especially beneficial to add this protein to yoghurt, and to a lesser extent to other dairy products as well. The use of bLF in yoghurt affects not only its physicochemical properties but also the health of its consumers. Tsukahara et al. [102] conducted a study in a group of 578 nursery school children, who were given yoghurt containing 100 mg LF for 15 weeks. The control group comprised 584 children who received fruit jelly instead of yoghurt. The children receiving yoghurt with LF \geq 3 days a week were much less often absent from school due to vomiting (4.3%) than children from the control group (8.4%).

LF is used in the meat industry for its antibacterial properties. An LF suspension not exceeding 0.20 mL/kg can be sprayed onto the surface of meat. This technique can be used just before packaging the meat to increase its shelf life. This discovery has raised interest in LF as a component of food packaging [97]. Barbiroli et al. [103] assessed the effect of LF on meat storage by adding it to cellulose packaging, which was tested on thin cuts of meat. The paper was produced with LF in the amount of 10% of the total fibre content. The addition of LF to paper packaging inhibited the growth of harmful bacteria, which in the future could be exploited in absorbent pads or films for wrapping meat [80]. Another study evaluating the impact of LF on the length of storage of raw meat was conducted by Soyer et al. [104]. The results confirmed the antibacterial effect of active lactoferrin on *L. monocytogenes* and *E. coli*. Padrão et al. [105] used cellulose film to which LF was added. The film was considered edible packaging and exhibited antimicrobial properties. It could be used to store perishable food, such as fresh sausage. The films with LF inhibited *E. coli* and *S. aureus* bacteria. However, it can be difficult to add lactoferrin to edible packaging, because too much of it can negatively affect the structure of the material. The addition of LF to pullulan films at low concentrations, i.e., <0.03%, did not significantly affect their tensile strength or elongation at break, but higher concentrations negatively affected these parameters. It is important to preserve the durability of the material while also using a concentration sufficient to exploit its ability to inhibit microbial growth [106].

Table 7. Use of LF in food products (own work).

Product Type	Product Name	Lactoferrin Content	Country of Manufacture	Use	Web Page Link
Modified powdered milk (up to 1 year of age)	Morinaga Hagakumi (Morinaga Milk Industry Co., Ltd)	80 mg/100 g powder	Tokio, Japan	- feeding new-borns and infants - improves resistance - supports gut microbiota	https://www.morinagamilk.co.jp/english/products/jp/infantformula.php (accessed on 17 May 2022)
Modified powdered milk (up to 1 year of age)	Enfamil Enspire Infant Formula (Mead Johnson & Company)	<2%	Chicago, IL, USA	- feeding new-borns and infants - reduces the risk of gastrointestinal and respiratory disease	https://www.enfamil.com/products/enfamil-enspire-infant-formula/ (accessed on 17 May 2022)
Mleko Modified powdered milk (from 12 months to 3 years of age)	Morinaga Chil-mil (Morinaga Milk Industry Co., Ltd)	55 mg/100 g powder	Tokio, Japan	- supplementary nutrition for small children - raises iron level in the body - supports immunity	https://www.morinagamilk.co.jp/english/products/jp/infantformula.php (accessed on 17 May 2022)
Yoghurt	Lactoferrin Yoghurt (Morinaga Milk Industry Co., Ltd)	100 mg	Tokio, Japan	- no data	https://www.morinagamilk.co.jp/english/products/jp/yogurt.php (accessed on 17 May 2022)
Chewing gum with lactoferrin and manuka honey	Blue [®] m dental chewing gum (Blue [®] m)	No data	VH Wijbe, Netherlands	- protection against fungi, bacteria, and viruses - supplements daily oral hygiene	https://bluems.com/product/dental-chewing-gum/ (accessed on 17 May 2022)
Carbonated drink with lactoferrin	Immune + (Boston Global Foods)	No data	Adelaide, SA, Australia	- supports immunity	https://immuneplus.com.au/ (accessed on 17 May 2022)
Fruit gums for children	C + Zinc Jelly (NANA and TAKA)	No data	Taiwan	- supports immunity	https://www.hktyr.com/hktyr/en/trade/Hong-Kong-Chien-Cao-Tong-Medical-Limited/s/H644902/Personal-Care-326-Health/Personal-Care-326-Health/Health/Immunity/CZinc-Jelly/p/H644902_5_CUT1085?scrollTo=recommendationTab (accessed on 17 May 2022)

9. Conclusions

LF is a protein with multiple health-promoting properties. It exhibits anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, immunomodulatory, antioxidant, and anti-tumour activity. The LF consumption from dairy products is insufficient to observe additional health benefits. Therefore, the supplementation or fortification of food products with LF is recommended. Supplementation with LF has a protective effect in obesity, positively influencing BMI and WHR and suppressing appetite. Moreover, LF can be used as a supportive treatment in diabetes by improving glycaemia and reducing inflammation. In addition, in cardiovascular diseases, LF has an antihypertensive effect and improves lipid parameters. Due to its ability to bind iron, it has also been used to treat iron deficiency and anaemia. All of these properties have led to the increasingly common use of LF as an ingredient in pharmaceuticals and cosmetics. It is also added to food products, such as modified milk, yoghurt, chewing gum, and even jelly sweets. Thanks to its properties, lactoferrin is used not only as a bioactive component of the diet. There are also many studies showing its use as a functional ingredient, e.g., as a packaging ingredient, which exhibits natural antiseptic properties.

The properties of LF also allow it to be widely used in diet therapy based on evidence-based medicine (EBM) and nutrition genomics. The use of nutrigenomics and nutrigenetics tools allows to identify a number of single nucleotide polymorphisms in such genes as, for example, FTO, PLIN1, TRAP2B, BDNF, SOD2, SLC23A1, LPL, and MTHFR. The knowledge of a person's genetic suit allows for personalized nutritional prophylaxis, the task of which is to reduce the identified risk of diseases, particularly in the case of already existing diseases associated with a specific genetic predisposition to conduct targeted diet therapy. The use of nutrition genomics allows for the effective stratification of people and the selection of the most optimal bioactive nutrients, including LF, whose bioactive potential cannot be considered without taking into account the group to which they will be given.

Author Contributions: Conceptualization, A.J. and A.B.; methodology, A.J., A.B., T.C. and J.K.; validation, A.J. and T.C.; resources, A.J., A.B. and T.C.; writing—original draft preparation, A.J.; writing—review and editing, A.J., A.B., T.C. and J.K.; visualization, A.J. and T.C.; supervision, A.B. and T.C.; final approval of the version to be published, A.B., T.C. and J.K.; project administration, A.B.; funding acquisition, A.J. and A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number 0029/DW/2018 “Implementation Doctorate”).

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Maciela, K.; Santos, L.S.; Ferreira Bonomo, R.C.; Alcántara Verissimoc, L.A.; Rodrigues Minim, V.P.; Minim, L.A. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *251*, 117324. [[CrossRef](#)]
2. Jamka, M. Historical overview on knowledge about lactoferrin. *Acta Med. Pol.* **2017**, *7*, 44–52. [[CrossRef](#)]
3. Francoa, I.; Pérezb, M.D.; Conesab, C.; Calvob, M.; Sánchezb, L. Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. *Food Res.* **2018**, *106*, 173–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tomita, M.; Wakabayashi, H.; Shin, K.; Yamauchi, K.; Yaeshima, Y.; Iwatsuki, K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* **2009**, *91*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. O’Riordan, N.; Kave, M.; Joshi, L.; Hickey, R.M. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* **2014**, *24*, 220–236. [[CrossRef](#)]
6. Litwińczuk, Z.; Król, J.; Brodziak, A.; Barłowska, J. Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 684–691. [[CrossRef](#)]
7. Król, J.; Brodziak, A.; Litwińczuk, Z.; Litwińczuk, A. Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Pol. J. Vet. Sci.* **2013**, *16*, 395–397. [[CrossRef](#)]
8. Garcia-Montoya, I.A.; Siqueiros-Cendon, Y.; Arévalo-Gallegos, S.; Rascon-Cruz, Q. Lactoferrin multiple bioactive protein: An overview. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 226–236. [[CrossRef](#)]

9. Cichosz, G.; Czeczot, H. *The Nutritional Phenomenon of Milk*; KZSM ZR Publishing: Olsztyn/Warszawa, Poland, 2013; pp. 50–75.
10. Anghel, L.; Radulescu, A.; Erhan, R.V. Structural aspects of human lactoferrin in the iron-binding process studied by molecular dynamics and small-angle neutron scattering. *EPJ* **2018**, *41*, 9. [CrossRef]
11. Liu, H.; Boggs, I.; Weeks, M.; Li, Q.; Wu, H.; Harris, P.; Ma, Y.; Day, L. Kinetic modelling of the heat stability of bovine lactoferrin in raw whole milk. *J. Food Eng.* **2020**, *280*, 109977. [CrossRef]
12. Conesa, C.; Sánchez, L.; Rota, C.; Pérez, M.D.; Calvo, M.; Farnaud, S.; Evans, R.W. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *150*, 131–139. [CrossRef] [PubMed]
13. Matijašič, B.B.; Oberčkal, J.; Mohar Lorbec, P.; Paveljšek, D.; Skale, N.; Kolenc, B.; Zupančič, J.M. Characterisation of lactoferrin isolated from acid whey using pilot-scale monolithic ion-exchange chromatography. *Processes* **2020**, *8*, 804. [CrossRef]
14. Commission Implementing Decision of 22 November 2012 Authorising the Placing on the Market of Bovine Lactoferrin as a Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Friesland Campina) (Notified under Document C(2012) 8404). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012D0727&from=PL> (accessed on 16 May 2022).
15. Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Abe, F. Quality control of commercial bovine lactoferrin. *BioMetals* **2018**, *31*, 313–319. [CrossRef] [PubMed]
16. Conesa, C.; Calvo, M.; Sánchez, L. Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 831–838. [CrossRef] [PubMed]
17. Yemets, A.I.; Tanasienko, I.V.; Krasylenko, Y.A.; Blume, Y.B. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* **2014**, *38*, 989–1002. [CrossRef]
18. Berkel, P.H.C.; Welling, M.M.; Geerts, M.; Veen, H.A.; Ravensbergen, B.; Salaheddine, M.; Pauwels, E.K.J.; Piéper, F.; Nuijens, J.H.; Nibbering, P.H. Large scale production of recombinant human. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 484–487. [CrossRef]
19. Tutykhina, I.L.; Bezborodova, O.A.; Shmarov, M.M.; Logunov, D.Y.; Neugodova, G.L.; Nemtsova, E.R.; Grintsburg, A.I. Production of recombinant human lactoferrin in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs and its characteristics. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *65*, 100–107. [CrossRef]
20. Semak, I.; Budzевич, A.; Maliushkova, E. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin. *Transgenic Res.* **2019**, *28*, 465–478. [CrossRef]
21. Zhang, J.; Li, L.; Cai, Y.; Xu, X.; Chen, J.; Wu, Y.; Cheng, G. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expr. Purif.* **2008**, *57*, 127–135. [CrossRef]
22. Wajs, J.; Król, K.; Brodziak, A. Milk and dairy products as a source of antiviral compound. In *Health and Life Style Economic, Social and Health Effects of a Pandemic*; Nowak, W., Szalonna, K., Eds.; Wrocław University Publishing: Wrocław, Poland, 2021; pp. 413–425.
23. Połi, F.; Pozzoli, C.; Adami, M.; Poli, E.; Costa, L.G. Treatments for COVID-19: Emerging drugs against the coronavirus. *Acta Biomed.* **2020**, *91*, 118–136.
24. Gopinathan, J.; Hao, T.N.; Cha, E.; Lee, C.; Das, D.; Noh, I. 3D printable and injectable lactoferrin-loaded carboxymethyl cellulose-glycol chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng.* **2020**, *113*, 1111008.
25. Zimecki, M.; Artym, J.; Kocięba, M.; Kruzel, M.L. Effects of lactoferrin on elicitation of the antigen-specific cellular and humoral cutaneous response in mice. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **2012**, *66*, 16–22. [CrossRef] [PubMed]
26. Fujishima, H.; Okada, N.; Matsumoto, K.; Shimizu, E.; Fukuda, S.; Tomita, M. Conjunctival injection reduction in patients with atopic keratoconjunctivitis due to synergic effect of bovine enteric-coated lactoferrin in 0.1% tacrolimus ophthalmic suspension. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3093. [CrossRef] [PubMed]
27. Zimecki, M.; Artym, J.; Kocięba, M. Lactoferrin restrains allergen-induced pleurisy in mice. *Inflamm. Res.* **2012**, *61*, 1247–1255. [CrossRef]
28. Negaoui, H.; El Mecherfi, K.E.; Tadjer, S.A.; Gar, H.; Kheroua, O.; Saidi, D. Bovine lactoferrin allergenicity as studied in murine model of allergy. *Food Agric. Immunol.* **2016**, *27*, 711–723. [CrossRef]
29. Teng, C.T.; Gladwell, W. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 381–384. [CrossRef]
30. Moreno-Navarrete, J.M.; Serrano, M.; Sabater, M.; Ortega, F.; Serino, M.; Pueyo, N.; Fernández-Real, J.M. Study of lactoferrin gene expression in human and mouse adipose tissue, human preadipocytes and mouse 3T3-L1 fibroblasts. Association with adipogenic and inflammatory markers. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1266–1275. [CrossRef]
31. Moreno-Navarrete, J.M.; Ortega, F.; Moreno, M.; Serrano, M.; Ricart, W.; Fernández-Real, J.M. Lactoferrin gene knockdown leads to similar effects to iron chelation in human adipocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 391–395. [CrossRef]
32. Mohamed, J.A.; DuPont, H.L.; Jiang, Z.D.; Belkind-Gerson, J.; Figueroa, J.F.; Armitage, L.Y.; Okhuysen, P.C. A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *44*, 945–952. [CrossRef]
33. WHO 2021. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 21 September 2021).
34. Ono, T.; Morishita, S.; Murakoshi, M. Novel function of bovine lactoferrin in lipid metabolism: Visceral fat reduction by enteric-coated lactoferrin. *Pharma Nutr.* **2013**, *1*, 32–34. [CrossRef]

35. Ono, T.; Murakoshi, M.; Uchiyama, A. Anti-obesity effect of lactoferrin; subgroup analysis excluding subjects with obese and/or hyper-LDL cholesterol. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **2018**, *18*, 105–109. [CrossRef]
36. ElSayed, H.L.; Abdelsayed, M.G.R.; Emara, I.S.A. Effect of lactoferrin supplementation on appetite and weight loss in obese school age children. *QJM Int. J. Med.* **2021**, *114*, hcab113.029. [CrossRef]
37. Sun, J.; Ren, F.; Xiong, L.; Zhao, L.; Guo, H. Bovine lactoferrin suppresses high-fat diet induced obesity and modulates gut microbiota in C57BL/6J mice. *J. Funct. Foods* **2016**, *22*, 189–200. [CrossRef]
38. Shi, J.; Finckenberg, P.; Martonen, E.; Ahlroos-Lehmuus, A.; Pilvi, T.K.; Korpela, R.; Mervaala, E.M. Metabolic effects of lactoferrin during energy restriction and weight regain in diet-induced obese mice. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 66–78. [CrossRef]
39. Di Renzo, L.; Cioccoloni, G.; Falco, S.; Abenavoli, L.; Moia, A.; Sinibaldi Salimei, P.; De Lorenzo, A. Influence of FTO rs9939609 and Mediterranean diet on body composition and weight loss: A randomized clinical trial. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 308. [CrossRef] [PubMed]
40. Ilowicka, K.; Glibowski, P.; Skrzypek, M.; Styk, W. The long-term dietitian and psychological support of obese patients who have reduced their weight allows them to maintain the effects. *Nutrients* **2021**, *13*, 2020. [CrossRef]
41. Zhao, N.N.; Dong, G.; Wu, W.; Wang, J.L.; Ullah, R.; Fu, J.F. FTO gene polymorphisms and obesity risk in Chinese population: A meta-analysis. *World J. Pediatr.* **2019**, *15*, 382–389. [CrossRef]
42. Aoun, C.; Hajj, A.; Hajj, F.; Papazian, T.; Rabbaa Khabbaz, L. The interaction between genetic polymorphisms in FTO, MC4R and MTHFR genes and adherence to the Mediterranean Diet in relation to obesity. *Gene* **2021**, *809*, 146037. [CrossRef]
43. Holzbach, L.; Silveira, A.; Franco, L.; Horst, M.; Cominetti, C. Polymorphism PLIN1 11482 G>A interacts with dietary intake to modulate anthropometric measures and lipid profile in adults with normal-weight obesity syndrome. *Br. J. Nutr.* **2021**, *128*, 1004–1012. [CrossRef]
44. Smith, C.E.; Tucker, K.L.; Yannakouris, N.; Garcia-Bailo, B.; Mattei, J.; Lai, C.Q.; Ordovaas, J.M. Peridipin polymorphism interacts with dietary carbohydrates to modulate anthropometric traits in hispanics of Caribbean origin. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1852–1858. [CrossRef]
45. Yasueda, A.; Ito, Y.; Maeda, K. Review: Evidence-based clinical research of anti-obesity supplements in Japan. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 185–195. [CrossRef] [PubMed]
46. WHO 2021. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed on 20 May 2022).
47. Mohamed, W.A.; Schaalan, M.F. Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic peditrics; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
48. Lewandowski, I.; Kepinska, M.; Milnerowicz, H. Alterations in concentration/activity of superoxide dismutases in context of obesity and selected single nucleotide polymorphisms in genes: SOD1, SOD2, SOD3. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5069. [CrossRef] [PubMed]
49. Lewandowski, I.; Urbanowicz, I.; Kepinska, M.; Milnerowicz, H. Concentration/activity of superoxide dismutase isozymes and the pro-/antioxidative status, in context of type 2 diabetes and selected single nucleotide polymorphisms (genes: INS, SOD1, SOD2, SOD3)—Preliminary findings. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *137*, 111396. [CrossRef]
50. Guo, H.; Ding, J.; Liu, Q.; Li, Y.; Liang, J.; Zhang, Y. Vitamin C and metabolic syndrome: A meta-analysis of observational studies. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 728880. [CrossRef] [PubMed]
51. Totan, B.; Baygut, H.; Karadağ, M.G. Vitamin C physiology: The known and the unknown in obesity. *J. Food Nutr. Res.* **2019**, *7*, 613–618. [CrossRef]
52. Thomas-Valdés, S.; Tostes, M.D.G.V.; Anunciação, P.C.; da Silva, B.P.; Sant’Ana, H.M.P. Association between vitamin deficiency and metabolic disorders related to obesity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *57*, 3332–3343. [CrossRef]
53. Michels, A.J.; Hagen, T.M.; Frei, B. Human genetic variation influences vitamin C homeostasis by altering vitamin C transport and antioxidant enzyme function. *Ann. Rev. Nutr.* **2013**, *33*, 45–70. [CrossRef]
54. Eck, P. Nutrigenomics of vitamin C absorption and transport. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *20*, 100–104. [CrossRef]
55. Xia, W.; Chen, N.; Peng, W.; Jia, X.; Yu, Y.; Wu, X.; Gao, H. Systematic meta-analysis revealed an association of PGC-1 α rs8192678 polymorphism in type 2 diabetes mellitus. *Dis. Markers* **2019**, *3*, 2970401. [CrossRef]
56. Hanan, S.A.; Najla, O.A.; Azza, M.M.; Iman, A.S.; Nouf, M.A. Modulating impacts of quercetin and/or lactoferrin on diabetic nephropathy and cardiomyopathy induced rats. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* **2017**, *6*, 128–137.
57. Ling, C.J.; Min, Q.Q.; Yang, J.R.; Zhang, Z.; Yang, H.H.; Xu, J.Y.; Qin, L.Q. Lactoferrin alleviates the progression of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice fed with high-fat/cholesterol diet through cholesterol homeostasis. *J. Med. Food* **2019**, *22*, 1000–1008. [CrossRef] [PubMed]
58. Zee, R.Y.; Cook, N.R.; Cheng, S.; Erlich, H.A.; Lindpaintner, K.; Ridker, P.M. Polymorphism in the beta2-adrenergic receptor and lipoprotein lipase genes as risk determinants for idiopathic venous thromboembolism: A multilocus, population-based, prospective genetic analysis. *Circulation* **2006**, *113*, 2193–2200. [CrossRef] [PubMed]
59. Kvaloy, K.; Holmen, J.; Hveem, K.; Holmen, T.L. Genetic effects on longitudinal changes from healthy to adverse weight and metabolic status—The HUNT study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139632. [CrossRef] [PubMed]
60. Shivkar, R.R.; Gawade, G.C.; Padwal, M.K.; Diwan, A.G.; Mahajan, S.A.; Kadam, C.Y. Association of MTHFR C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) polymorphisms with serum homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with young coronary artery disease. *Indian J. Clin. Biochem.* **2022**, *37*, 224–231. [CrossRef] [PubMed]

61. Nozari, S.; Fathi Maroufi, N.; Nouri, M.; Paytakhti Oskouei, M.; Shiralizade, J.; Yekani, F.; Mamipour, M.; Faridvand, Y. Decreasing serum homocysteine and hypocholesterolemic effects of bovine lactoferrin in male rat fed with high-cholesterol diet. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* **2018**, *10*, 203–208.
62. Fu, L.; Li, Y.N.; Luo, D.; Deng, S.; Wu, B.; Hu, Y.Q. Evidence on the causal link between homocysteine and hypertension from a meta-analysis of 40 173 individuals implementing Mendelian randomization. *J. Clin. Hypertens.* **2019**, *21*, 1879–1894. [CrossRef]
63. Mayeur, S.; Spahis, S.; Poullet, Y.; Levy, E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *24*, 813–836. [CrossRef]
64. Gkouskou, K.K.; Grammatikopoulou, M.G.; Vlastos, I.; Sanoudou, D.; Eliopoulos, A.G. Genotype-guided dietary supplementation in precision nutrition. *Nutr. Rev.* **2021**, *79*, 1225–1235. [CrossRef]
65. 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**, *27*, 999–1006. [CrossRef]
66. Hashim, H.A.; Foda, O.; Ghayaty, E. Lactoferrin or ferrous salts for iron deficiency anemia in pregnancy: A meta-analysis of randomized trials. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2017**, *219*, 45–52. [CrossRef] [PubMed]
67. Paesano, R.; Berlutti, F.; Pietropaoli, M.; Pantanella, F.; Pacifici, E.; Goolsbee, W.; Valenti, P. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency anemia in pregnant women. *Biol. Met.* **2010**, *23*, 411–417. [CrossRef] [PubMed]
68. Ke, C.; Meng, M.; Lan, Z.; Hua, L.; Ying, Z.; Humina, X.; Jia, S.; Weizheng, T.; Ping, Y.; Lingying, C.; et al. Iron metabolism in infants: Influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition* **2015**, *31*, 304–309. [CrossRef] [PubMed]
69. Rosa, L.; Lepanto, M.L.; Cutore, A.; Siciliano, R.A.; Paesano, R.; Costi, R.; Musci, G.; Valenti, P. Influence of oral administration mode on the efficacy of commercial bovine Lactoferrin against iron and inflammatory homeostasis disorders. *BioMetals* **2020**, *33*, 159–168. [CrossRef]
70. Legrand, D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *J. Pediatr.* **2016**, *173S*, S10–S15. [CrossRef]
71. Mulder, A.M.; Morris, C.A. Lactoferrin in immune function, cancer and disease resistance. In *Dietary Components and Immune Function. Nutrition and Health*; Watson, R.R., Zibadi, S., Preedy, V.R., Eds.; Springer: Totowa, NJ, USA, 2010; p. 297316.
72. Oda, H.; Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Abe, F. Lactoferrin and bifidobacterial. *BioMetals* **2014**, *27*, 915–922. [CrossRef]
73. Król, J.; Brodziak, A. Milk proteins with antibacterial properties. *Probl. Higieny Epidemiol.* **2015**, *96*, 399–405.
74. Sekse, C.; Bohlin, J.; Skjerve, E.; Vegarud, G.E. Growth comparison of several *Escherichia coli* strains exposed to various concentrations of lactoferrin using linear spline regression. *Microb. Inform. Exp.* **2012**, *2*, 5. [CrossRef]
75. Flores-Villaseñor, H.; Canizalez-Román, A.; Reyes-Lopez, M.; Zazueta-Beltrán, J.; León-Sicairos, N.; Bolscher, J.G. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFCin, LFCampin and LFCchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *BioMetals* **2010**, *23*, 569–578. [CrossRef]
76. Ciccaglione, A.F.; Di Giulio, M.; Di Lodovico, S.; Di Campi, E.; Cellini, L.; Marzio, L. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: An in vitro and in vivo study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1069–1077. [CrossRef]
77. Valimaa, H.; Tenovuori, J.; Waris, M.; Hukkanen, V. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. *Viral. J.* **2009**, *6*, 53. [CrossRef] [PubMed]
78. Zuccotti, G.; Salvini, F.; Riva, E.; Agostoni, C. Oral lactoferrin in HIV-1 vertically infected children: An observational follow-up of plasma viral load and immune parameters. *J. Brit. Med. Res.* **2006**, *34*, 88–94. [CrossRef] [PubMed]
79. El-Fakharany, E.M.; Sánchez, L.; Al-Mehdar, H.A.; Redwan, E.M. Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: Comparison study. *Viral. J.* **2013**, *10*, 199. [CrossRef] [PubMed]
80. Dzik, S.; Miciński, B.; Miciński, J.; Mituniewicz, T.; Kowalski, P.M. Therapeutic properties of lactoferrin. *Pol. Ann. Med.* **2018**, *25*, 158–161. [CrossRef]
81. Wang, Y.; Wang, P.; Wang, H.; Luo, Y.; Wan, L.; Jiang, M.; Chu, Y. Lactoferrin for the treatment of COVID-19 (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *20*, 272. [CrossRef]
82. Chang, R.; Ng, T.; Sun, W. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *56*, 106118. [CrossRef]
83. Hussain, F.; Rahim, K.; Rehman, S.U.; Shafiqat, F.; Siddique, A.; Ahsan, M.; Shuaib, M.; Khan, L.U.; Shanyuan, C. Application of natural products in SARS-CoV-2. *AP* **2023**, *15*, 339–351.
84. Mattar, E.H.; Elrashdy, F.; Al-mehdar, H.A.; Uversky, V.N.; Redwan, E.M. Natural resources to control COVID-19: Could lactoferrin amend SARS-CoV-2 infectivity? *PeerJ* **2021**, *9*, e11305. [CrossRef]
85. Quantec 2021. Available online: <https://www.quantec.co.nz/> (accessed on 19 June 2021).
86. Stobiecka, M.; Król, J.; Brodziak, A. Antioxidant activity of milk and dairy products. *Animals* **2022**, *12*, 245. [CrossRef]
87. Mulder, A.M.; Connellan, P.A.; Oliver, C.J.; Morris, C.A.; Stevenson, L.M. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutr. Rev.* **2008**, *28*, 583–589. [CrossRef]
88. Serrano, G.; Kochergina, L.; Albors, A.; Eva Diaz, E.; Oroval, M.; Hueso, G.; Serrano, J.M. Liposomal lactoferrin as potential prevention and cure for COVID-19. *Int. J. Res. Health Sci.* **2020**, *8*, 8–15.
89. Campione, E.; Lanna, C.; Cosio, T.; Rosa, L.; Conte, M.P.; Iacovelli, F.; Romeo, A.; Falcioni, M.; Del Vecchio, C.; Franchin, E.; et al. Pleiotropic effect of lactoferrin in the prevention and treatment of COVID-19 infection: Randomized clinical trial, in vitro and in silico preliminary evidences. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]

90. Chichlowski, M.; Bokulich, N.; Harris, C.L.; Wampler, J.L.; Li, F.; Berseth, C.L.; Rudolph, C.; Wu, S.S. Effect of bovine milk fat globule membrane and lactoferrin in infant formula on gut microbiome and metabolome at 4 months of age. *Curr. Dev. Nutr.* **2021**, *5*, nzab027. [CrossRef] [PubMed]
91. Friesland Campina 2021. Available online: <https://www.frieslandcampina.com/news/frieslandcampina-ingredients-significantly-expands-its-lactoferrin-production-capacity/> (accessed on 19 October 2022).
92. Dairy Reporter 2020. Available online: <https://www.dairyreporter.com/Article/2020/10/29/Mornaga-Milk-expanding-lactoferrin-production-capacity-through-German-subsidiary> (accessed on 19 June 2021).
93. Grand View Research 2021. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactoferrin-market> (accessed on 19 October 2022).
94. Market Data Forecast 2021a. Available online: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/europe-lactoferrin-market> (accessed on 19 October 2022).
95. Market Data Forecast 2021b. Available online: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/latin-america-lactoferrin-market> (accessed on 30 November 2022).
96. Market Research Report 2020. Available online: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/bovine-lactoferrin-market-101656> (accessed on 19 October 2022).
97. Bourbon, A.I.; Martins, J.T.; Pinheiro, A.C.; Madalena, D.A.; Marques, A.; Nunes, R.; Vicente, A.A. Nanoparticles of lactoferrin for encapsulation of food ingredients. In *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*; Jafari, S., Ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 147–168.
98. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on bovine lactoferrin. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2701–2727. [CrossRef]
99. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1023 of 23 July 2018 correcting Implementing Regulation (EU) 2017/2470 establishing the Union list of novel foods (L 187). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018R1023&from=EN> (accessed on 10 May 2022).
100. Li, F.; Wu, S.S.; Berseth, C.L.; Harris, C.L.; Richards, J.D.; Wampler, J.L.; Colombo, J. Improved neurodevelopmental outcomes associated with bovine milk fat globule membrane and lactoferrin in infant formula: A randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* **2019**, *215*, 24–31.e8. [CrossRef]
101. Büyükkiraz, M.E.; Kesmen, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 1573–1596. [CrossRef]
102. Tsukahara, T.; Fujimori, A.; Misawa, Y.; Oda, H.; Yamauchi, K.; Abe, E.; Nomiyama, T. The Preventive effect of lactoferrin-containing yogurt on gastroenteritis in nursery school children—Intervention study for 15 weeks. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2534. [CrossRef]
103. Barbiroli, A.; Bonomi, F.; Capretti, G.; Iametti, S.; Marzoni, M.; Piergiovanni, L.; Rollini, M. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control* **2012**, *26*, 387–392. [CrossRef]
104. Soyer, F.; Keman, D.; Eroglu, E.; Türe, H. Synergistic antimicrobial effects of activated lactoferrin and rosemary extract in vitro and potential application in meat storage. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 4395–4403. [CrossRef]
105. Padrão, J.; Gonçalves, S.; Silva, J.P.; Sencadas, V.; Lanceros-Méndez, S.; Pinheiro, A.C.; Dourado, F. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 126–140. [CrossRef]
106. Zhao, Z.; Xiong, X.; Zhou, H.; Xiao, Q. Effect of lactoferrin on physicochemical properties and microstructure of pullulan-based edible films. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4150–4157. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Properties of Yoghurt Fortified in Lactoferrin with Effect of Storage Time

Anna Jańczuk ^{1,*}, Aneta Brodziak ^{1,*} , Jolanta Król ¹  and Tomasz Czernecki ²

¹ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; jolanta.krol@up.lublin.pl

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Dietitian Service, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; tomasz.czernecki@up.lublin.pl

* Correspondence: annajanczuk44@gmail.com (A.J.); aneta.brodziak@up.lublin.pl (A.B.); Tel.: +48-814-456-836 (A.B.)

Simple Summary: Lactoferrin is a whey protein with a high health-promoting potential, also in the context of civilization diseases such as obesity and type 2 diabetes. It is perfectly suitable as an addition to fermented milk drinks—yoghurts, which are easily acceptable in the diet. As a natural milk protein, it is perfect for increasing the health-promoting value of yoghurts. The results obtained from the physicochemical, microbiological, and organoleptic assessment of yoghurts indicated that the use of yoghurt fortification with lactoferrin in the amount of 80 mg/100 g in most cases did not statistically significantly affect the analysed parameters. Yoghurt with the addition of lactoferrin was fully acceptable by the testers.

Abstract The stability of fortified yoghurts during refrigerated storage is important for industry and the consumer. The aim of the study was to evaluate the nutritional value, microbiological quality, organoleptic properties, and structure of natural yoghurts made with the addition of lactoferrin during refrigerated storage. In this study, we produced natural yoghurts fortified in lactoferrin, using YC-X11 yoghurt starter culture based on *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Physicochemical (acidity, nutritional value and structure) as well as microbiological and organoleptic changes occurring during 28-days refrigerated storage were determined. Storage research made it possible to determine the direction of changes taking place in the products. The analysed parameters did not differ statistically significantly between the control yoghurts and those with the addition of lactoferrin. Textural and rheological studies also shown that the addition of lactoferrin did not significantly change the structure of the yoghurt. The yoghurts were characterized by high sanitary and hygienic quality during the whole refrigerated storage. Lactoferrin has a positive effect on the durability of the product.

Keywords: milk proteins; fermented products; quality; physical-chemical properties; organoleptic characteristics; texture; water activity; innovative product



Citation: Jańczuk, A.; Brodziak, A.; Król, J.; Czernecki, T. Properties of Yoghurt Fortified in Lactoferrin with Effect of Storage Time. *Animals* 2023, 13, 1610. <https://doi.org/10.3390/ani13101610>

Academic Editor: Bianca Castiglioni

Received: 16 March 2023

Revised: 4 May 2023

Accepted: 8 May 2023

Published: 11 May 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

According to the recommendations of the Food and Agriculture Organization (FAO) in cooperation with the World Health Organization (WHO), European citizens should consume daily milk and dairy products (kefir, sour milk, yoghurt, cheese) due to its high nutritional value and beneficial health effects on the human body [1]. Milk proteins are considered the richest source of nutritional and functional ingredients in the diet. Nutritionally, they are a building material and a source of essential amino acids for normal growth and development of the body. The functional properties of proteins, including water binding capacity, gelling, emulsifying or foaming properties, affect the physicochemical

and organoleptic properties of the food produced [2,3]. Milk proteins also have important biological functions. One of the biologically active milk proteins is lactoferrin (LF), classified as a whey protein. Its presence in the highest amount was found in milk, but also in many organs (liver, kidneys, pancreas, lungs, gallbladder, prostate, seminal vesicles, intestines), serous membranes and their secretions [4]. The lactoferrin content in cow milk ranges from 50 to 120 mg/L. Human milk contains the highest content of LF, but it should be noted that it has a significantly lower biological activity than milk-derived LF from other mammalian species [4–6]. To date, a number of its biological properties have been demonstrated, including binding of iron, calcium, copper, aluminium or manganese ions, bactericidal, bacteriostatic, antifungal, antiviral, antiparasitic, antioxidant and anticancer activity, as well as being an organ non-specific immunity component, cell growth regulator, and precursor of bioactive peptides [4–7]. Studies in recent years have shown that LF exerts a protective effect in the course of obesity and improves insulin sensitivity, making it an effective component of dietary supplements for people struggling with excessive body weight, including those with a predisposition to obesity [8,9]. Its use in the prevention of cardiovascular diseases [10,11], treatment of iron deficiency anaemia or iron deficiency [12], oxidative stress reduction [13] or modulation of intestinal microflora composition [14] has also been indicated. Research by the New Zealand pharmaceutical manufacturer Quantec demonstrated that a protein complex containing LF and lactoperoxidase could protect human cells against COVID-19. The patented IDP defence protein showed anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial properties [15].

Due to these unique properties of LF, techniques for its separation and purification from cow milk or whey have been developed for years. This is facilitated by advances in milk protein separation techniques [16,17]. Despite the high cost of its isolation, LF is in high demand on the market. LF preparations are used to enrich the nutritional or health value of food, mainly fermented dairy products. In 1997, yoghurts fortified with bovine LF appeared on the Japanese market. Importantly, on 22 November 2012, the European Commission authorized the marketing in the EU of bovine LF (bLF) as a novel food ingredient [18]. Moreover, in accordance with the European Food Safety Authority (EFSA), LF derived from cow milk is safe under appropriate conditions of use, standards and levels. Since then, in addition to yoghurts and infant formulas originally available on the Japanese market, many new products fortified with LF have appeared on the European shelves, including juices, water and chewing gum. Products containing LF can be used virtually without restrictions, although undesirable side effects of consuming this protein have been observed, but after taking significant doses exceeding 2000 mg/kg body weight. For this reason, EU regulates [19] the maximum level of bLF applied in food. The maximum addition of bLF in milk-based beverages is 200 mg per 100 g, and fermented milk-based drinks (including yoghurt drinks) can contain up to 50 mg of LF in 100 g, yoghurt-based products—up to 80 mg in 100 g, cheese-based products—up to 2000 mg per 100 g, and ice cream—up to 130 mg per 100 g. In turn, food for special medical purposes can provide up to 3 g of LF per day, depending on the individual patient's needs. It should also be noted that due to its antimicrobial properties, it can serve as a natural preservative for dairy products, thereby reducing the use of additives, especially preservatives. This is an additional premise for enriching dairy products with this compound. Importantly, experimental studies have demonstrated that LF does not exhibit antimicrobial activity against probiotic bacteria, nor does it affect the viability of lactobacilli, as these bacteria do not require iron for growth. In the case of bacteria of the genus *Bifidobacterium*, lactoferrin stimulating effect on the bacterial cell population is based on supplying them with iron ions.

Currently, there are cosmetics and pet food available in the world that contain this protein, but primarily it is supplemented to pharmaceuticals, including dietary supplements. It should be emphasized that dietary supplements containing LF are available on the Polish market. However, it is not currently used as a food ingredient, despite being approved for marketing.

The available knowledge enables the rapid development of the food market. Increasingly, food manufacturers offer products that not only meet the basic nutrient requirements, but also have programmed health-promoting properties. Bioactive ingredients can be incorporated into the product, taking into account population health risks, as well as individual characteristics of consumers. The aforementioned documented properties of LF enable its conscious use in food products dedicated to consumers with health problems resulting from genetic predispositions and/or environmental influences. This provided the rationale for conducting research and proposing a food product fortified with LF. Only a few papers have been published so far on the possibility of using LF in dairy products, including one on cheese [20] and three on yoghurts, one of which [21] is focused on the effect of LF of different iron saturation on yoghurt acidity and growth of lactic acid bacteria during fermentation and storage; the second [22] concerns the effect of LF on pathogenic bacteria and amino acids in yoghurt fortified with buffalo, bovine, mix colostrum and LF colostrum; the third [23] is devoted to the effect of donkey milk LF and lysozyme on selected yoghurt properties. The aim of the research was, therefore, to produce the yoghurt based on cow milk fortified with an acceptable amount of lactoferrin in order to comprehensively determine its physicochemical, microbiological and organoleptic characteristics with regard to storage time. The authors intend to propose a specific product to the market and ascertain whether LF will integrate with yoghurt and whether its addition at the maximum permissible level will change the properties, and acceptability during its shelf life, usually defined in dairy practice as 28 days. Yoghurts are widely known and eagerly consumed by consumers, which makes them a good carrier of beneficial bacteria or bioactive compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Research Material

The pasteurized bulk cow milk for yoghurt production was obtained from the dairy located in Lublin Voivodeship, Poland. Raw material was normalized (3.2% fat content) and pasteurized (very high temperature (VHT) pasteurization: 85 °C for 20–25 s). It was transported to the laboratory under refrigeration, and immediately used for yoghurt production. Milk was collected from the dairy three times.

2.2. Yoghurt Production

The milk was heated to 43 °C and inoculated with 0.15 g/L of FD-DVS YC-X11 Yo-Flex, containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*—thermophilic yoghurt cultures from Chr. Hansen (Graasten, Denmark) [24], Figure 1. Certified lactoferrin (Biolive Innovation, Lublin, Poland) in the amount of 80 mg/100 g [19] was used to enrich the yoghurt. Unfortified yoghurt served as the control group. The inoculated milk was incubated in polypropylene (PP) plastic 100 mL containers at 43 °C (according to the manufacturer's instructions) until pH = 4.6 was attained (approx. 5 h). The products were then immediately cooled to 20 °C to discontinue the incubation. The yoghurts were stored at 4 °C until the next day (approx. 16 h) for analysis. The analyses were performed every 7 days, i.e., on day 0, 7, 14, 21 and 28, during refrigerated storage at 4–6 °C. A total of 210 yoghurt samples were prepared, i.e., three times per 70 samples each when milk was collected. In total there were 105 plain, natural yoghurts and 105 yoghurts with LF addition. In each yoghurt type, 21 samples were analysed at each day of storage, of which 3 for basic chemical composition and LF content, 3—microbiological evaluation, 3—texture and colour parameters, 3—water activity and water-holding capacity, 3—syneresis and acidity, and 6—organoleptic quality. In each day of storage new, unopened samples were analysed.

2.3. Yoghurt Analysis

2.3.1. Basic Composition and Acidity

The yoghurts were analysed for the content of protein (Kjeldahl method according to PN-EN ISO 8968-1:2014 [25] using the mineralizer Tecator Digester Auto 20 (FOSS Analytics, Hillerød, Denmark) and the automatic analyser KjelROC (OPSIS LiquidLINE, Furulund,

Sweden); fat (the weight method using the Soxtec Avanti[®] extraction unit (Tecator, FOSS Analytics, Hillerød, Denmark) and the PS 750/X analytical scale (Radwag, Radom, Poland)); and dry matter (oven-drying at 102 °C using the laboratory dryer (Memmert, Schwabach, Germany) [26]. The measurements were taken in triplicate. The energy was calculated on the basis of the individual basic components.

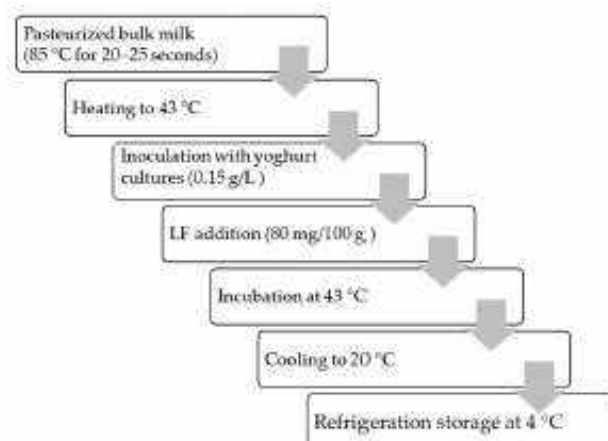


Figure 1. The yoghurt manufacturing method.

2.3.2. Lactoferrin

In order to evaluate the content of lactoferrin, RP-HPLC method was used. All samples were prepared according to Brodziak et al. [27] with a modification (5 mL of yoghurt instead of milk). Protein analysis was performed on liquid chromatograph ProStar 210 model and UV-VIS ProStar 325 detector (Varian, Palo Alto, CA, USA). The measurements were carried out using the water/acetonitrile mobile phase at gradient elution and column Nucleosil 300-5 C18 (Varian, Palo Alto, CA, USA) of 250 mm length and 4.6 mm diameter. The mobile phase was solvent A (90% water, 10% acetonitrile) and solvent B (90% acetonitrile, 10% water), purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The analysis time for a single sample was 15 min at 205 nm wavelength with column temperature of 37 °C. The analysis of reference substance—commercially available lactoferrin (purity—90%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)), was conducted under the same conditions. On the grounds of the obtained chromatograms, the qualitative and quantitative identification of LF was performed.

2.3.3. Acidity

The active acidity (pH value) was measured before, during and after fermentation using a CP-401 pH-meter (Elmetron, Zabrze, Poland). The measurements were taken in triplicate. The potential acidity was determined by the titration method [28] and expressed as lactic acid content in %.

2.3.4. Microbiological Evaluation

Prior to the microbiological evaluation, 10 g of each yoghurt sample was placed in sterile bottles containing 90 mL of Ringer's solution [29,30]. Next, it was shaken for 5 min and allowed to sediment for 15 min. Then, a series of ten-fold dilutions of the samples were prepared in Ringer's solution and spread onto previously prepared Petri dishes with an appropriate microbiological medium. The following was determined in each material: total number of mesophilic aerobic bacteria—on fortified agar medium for 48 h at 30 °C (BTL Ltd., Warsaw, Poland) according to PN-ISO 7889:2007 [31]; total number of fungi—on Sabouraud medium for 5–7 days at 30 °C (BTL Ltd., Warsaw, Poland) [32]; total number of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* sp.—on MRS medium for 3–5 days at 30 °C (BTL Ltd., Warsaw, Poland) [33]; total number of *Clostridium perfringens*—sulfate

reducing bacteria (IV) growing in anaerobic conditions on Iron sulfide agar (TSC) for 48 h at 37 °C (Biomerieux Poland Ltd., Warsaw, Poland) [34]; total number of coliform bacteria on Endo les medium for 24 h at 37 °C (BTL Ltd., Warsaw, Poland) [35]; total number of fecal *Escherichia coli*—on mFC medium, for 18–24 h at 44 °C (BTL Ltd., Warsaw, Poland) [35]; *Campylobacter* bacilli [36]; presence of *Salmonella* bacilli—on SS medium (*Salmonella*-*Shigella* and XLD) after prior sample multiplication in buffered peptone water and Rappaport-Vassiliadis medium (BTL Ltd., Warsaw, Poland) for 24 h at 37 °C [37]. Final identification was performed using the available API tests (BioMerieux Poland Ltd., Warsaw, Poland) and polyvalent sera (Biomed S.A., San Antonio, TX, USA). Each previously prepared sample was plated in triplicate. After incubation, the colonies were counted using an automatic Scan 300 counter (Interscience Laboratories, Saint-Nom-la-Bretèche, France) and the number of individual morphological types was counted as the number of colony forming units in 1 g of the yoghurt (cfu/g).

2.3.5. Texture

The texture parameters of the yoghurt curds (firmness, consistency and cohesive strength) were measured using a BDO-FB0.5TS universal testing machine (Zwick GmbH and Co., Ulm, Germany). The yoghurt curds were prepared in a dedicated beaker (50 mm in diameter and 150 mm high). For each yoghurt curd, two yoghurt samples were prepared and tested after approximately 20 h of storage at 4–6 °C. A beaker with the sample was centrally placed under the plunger of the apparatus with a cylindrical die 45 mm in diameter and 5 mm in height, and then compressed to a depth of 25 mm at a speed of 1 mm/s. On the basis of the force-time curves obtained, the following texture characteristics were determined for the curds: firmness—the maximum positive force (N), consistency—the positive area of the curve up to the maximum point (mJ) and cohesive strength—the maximum negative force (N). The measurements were taken in duplicate. The results of the measurements were processed using TestXpert®II software (2011, Zwick GmbH and Co, Ulm, Germany). Rheological measurements—dynamic viscosity (mPa·s) were conducted using the HAAKE Viscotester iQ rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with an cylindrical rotor. The measurements were taken in duplicate, at 10 °C.

2.3.6. Water Activity

The water activity (w_a) in the yoghurts was measured using a HygroLab CI water activity meter (Rotronic, Bassersdorf, Switzerland). Measurements were conducted using the AWQ mode and stabilization for 15 min after the yoghurts had reached room temperature. The determinations were made in triplicate.

2.3.7. Water-Holding Capacity and Syneresis

The water-holding capacity—WHC was determined [38]. 10 g of yoghurt were weighed into a test tube and then centrifuged in a laboratory centrifuge (UNIVERSAL 320; Hettich, Tuttlingen, Germany) at 5 °C for 10 min at 1250× g . After the indicated time, the precipitated whey was weighed. The tests were carried out in triplicate. WHC was calculated based on the formula:

$$\text{WHC (\%)} = (10 - W) / 10 \times 100\%,$$

where: W—mass of the separated whey (g).

Spontaneous whey syneresis—SWS was also measured according to Narayana and Gupta [39] and Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40]. A plastic container with 100 mL of yoghurt was stored at 4–6 °C and immediately after removal from the refrigerator, it was tilted at an angle of 45° to collect the surface whey using the syringe. It was performed within 10 s to avoid a whey forced leakage from the gel. SWS was expressed directly as the volume of whey expelled by 100 mL of yoghurt, in %.

2.3.8. Colour Measured Instrumentally

The colour of the yoghurt was measured by a Minolta CR-310 Chroma Meter (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan), using D65 as the standard light source. The measurements were carried out directly in the plastic containers in which the yoghurt was stored. The reflectance of the yoghurt surface was measured using a measuring head (50 mm aperture diameter, geometry 0°). The CIE colour parameters were the following: L* (lightness), a* (redness/greenness) and b* (yellowness/blueness). The colour tests were performed in four replications [41].

2.3.9. Organoleptic Assessment

An organoleptic assessment of the yoghurts was performed by a suitably prepared 10-person panel. The panel consisted of 7 women and 3 men in the age 25–45 years, who specialize in this type of assessment. People had been trained in the assessment methodology according to ISO 4121 [42]. Prior to the evaluation, the samples were coded and left to stand for 1 h at room temperature to reach a suitable temperature for eating, and then they were presented to the testers together with a questionnaire. Each person occupied a separate place in the room to prevent a mutual communication. A five-point scale was used to evaluate the following: colour, consistency, flavour, aroma and general acceptance of the products, in which 1 designated disqualifying quality (unsuitable) and 5 indicated very good quality (completely acceptable, characteristic for the product) [43].

2.4. Statistical Analysis

A statistical analysis of the results was performed using two-way analyses of variance—ANOVA (StatSoft Inc. Statistica ver. 13.1; Dell, Round Rock, TX, USA). The significance of the differences between the means for the groups was determined by Kruskal-Wallis's test at a level of p (alpha) = 0.05 and 0.01. The results are presented as the means \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Nutritional Value

The nutritional value of a food product, which is of increasing interest to consumers, is determined by the presence of essential nutrients for the functioning of the human body, whose quantity or bioavailability may be reduced by complex technological processes and other factors. Table 1 presents the results pertaining to the basic nutritional value of the yoghurts, i.e., the content of crude protein, fat, and dry matter.

Table 1. Results of basic chemical composition analysis of yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (mean \pm SD).

Yoghurt Type	Day of Storage	Number of Samples *	Energy (kJ/100 g)	Total Protein (%)	Fat (%)	Dry Matter (%)
Plain, natural yoghurt	0	3	63 \pm 3	3.14 ^{bc} \pm 0.05	3.26 \pm 0.06	12.27 ^{Bc} \pm 0.26
	7	3	63 \pm 4	3.12 ^{bc} \pm 0.08	3.22 \pm 0.08	12.18 ^{Bc} \pm 0.20
	14	3	62 \pm 3	3.07 ^{abc} \pm 0.11	3.16 \pm 0.12	11.99 ^{Bc} \pm 0.31
	21	3	63 \pm 4	2.98 ^{ac} \pm 0.09	3.12 \pm 0.10	11.34 ^{Ax} \pm 0.25
	28	3	62 \pm 5	2.88 ^{ac} \pm 0.12	3.10 \pm 0.15	10.95 ^{Ax} \pm 0.43
Yoghurt with lactoferrin	0	3	64 \pm 2	3.33 ^{by} \pm 0.04	3.25 \pm 0.07	12.36 ^{Cy} \pm 0.30
	7	3	64 \pm 3	3.22 ^{by} \pm 0.07	3.23 \pm 0.11	12.29 ^{BCy} \pm 0.37
	14	3	64 \pm 4	3.16 ^{by} \pm 0.13	3.18 \pm 0.14	12.12 ^{By} \pm 0.40
	21	3	63 \pm 4	3.08 ^{by} \pm 0.11	3.15 \pm 0.12	11.49 ^{Ay} \pm 0.33
	28	3	63 \pm 6	3.00 ^{ay} \pm 0.10	3.11 \pm 0.16	11.10 ^{Ay} \pm 0.52

*—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. ^{a, b, A, B, C}—differences between the basic chemical composition within a yoghurt type; ^{x, y}—significant differences at $p \leq 0.05$; ^{A, B, C}—significant differences at $p \leq 0.01$. ^{x, y}—differences between the basic chemical composition between a yoghurt type within a day of storage; ^{x, y}—significant differences at $p \leq 0.05$.

The use of the maximum permissible level of LF did not significantly ($p > 0.05$) influence the parameters analysed. Yoghurt with the addition of LF contained 12.36% dry matter, including 3.22% crude protein and 3.25% fat. These levels were comparable to those in the control yoghurt, without the addition of this protein. The 28-day storage period in refrigeration conditions did not significantly ($p > 0.05$) influence the content of fat. In the case of crude protein and dry matter, the differences in this type of yoghurt depending on the day of storage were statistically significant ($p \leq 0.05$). In general, the content of all nutrients decreased with the passage of storage time, possibly due to the type of starter cultures used (their activity) and enzymatic processes [44]. A study using donkey milk lactoferrin and lysozyme in yoghurt production [23] also showed a decrease (of 0.1%) in the content of fat and dry matter during 30-day storage of the control yoghurt and three experimental yoghurts (yoghurt treated with lactoferrin, yoghurt treated with lysozyme, and yoghurt treated with natamycin), although the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). In yoghurt treated with LF, the crude protein content increased during storage (from 4.05% to 4.36%, $p > 0.05$). It should be noted, however, that for the control yoghurt, yoghurt treated with lysozyme, and yoghurt treated with natamycin, the direction of changes was the same as in the present study, i.e., the amount of protein decreased during storage (by 0.58, 0.15 and 0.25 p.p., respectively). However, the authors did not explain the cause of these changes. Another study, analysing the addition of whey protein concentrate to yoghurt [45], found comparable levels of protein and fat on the first (day 0) and last (day 28) days of refrigerated storage. However, the content of non-fat dry matter and total dry matter decreased.

The energy value of the yoghurts was comparable, irrespective of the type and storage time, at 62–64 kJ/100 g of product. This value is comparable to that of commercially available natural yoghurt.

3.2. Lactoferrin

Since the yoghurt was fortified, i.e., the content of a component naturally occurring in milk was increased by adding 80 mg of LF, in compliance with the regulation [19], the lactoferrin level was assessed as well. It was 47.69 mg/100 g in the control yoghurt and 131.15 mg/100 g in the fortified yoghurt (Table 2). LF is naturally present in raw cow milk in the amount of 0.1–0.3 mg/mL, but during heat processing this level decreases. In other studies [46] it was noticed that the type of heat treatment significantly influenced the content of non-denatured whey proteins in drinking milk. The most valuable source of whey proteins, particularly lactoferrin and lysozyme, was the micro-filtered milk. Claeys et al. [47] reported that only heating at 85 °C for 30 min leads to total inactivation of LF. Moreover, according to Darmawan et al. [48], high temperature induced structural changes of apo-lactoferrin and interactions with β -lactoglobulin and α -lactalbumin. Another study confirmed that LF is more resistant to denaturation when saturated with iron. Binding to iron increases the stability of the protein structure [49]. The effect of LF iron saturation on its stability under high temperatures was reported by Liu et al. [50]. Regardless of the iron content, LF is stable in the pH range from 4 to 11 [51].

The storage period was shown to influence the content of this protein. Irrespective of the type of yoghurt, the content of LF decreased statistically significantly ($p \leq 0.05$), on average by 14%, during 28-day storage (Table 2). An influence of the storage period on LF content was also reported in the studies devoted to the changes in the content of bioactive compounds in drinking milk [52].

Table 2. Lactoferrin content in yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (mean \pm SD).

Yoghurt Type	Number of Samples ^a	Day of Storage	Lactoferrin (mg/100 g)
Plain, natural yoghurt	3	0	47.69 ^{bX} \pm 2.95
	3	7	47.12 ^{bX} \pm 2.51
	3	14	45.24 ^{abX} \pm 4.25
	3	21	44.01 ^{abX} \pm 4.90
	3	28	41.17 ^{aX} \pm 4.86
Yoghurt with lactoferrin	3	0	131.15 ^{bY} \pm 9.17
	3	7	130.37 ^{bY} \pm 12.01
	3	14	129.20 ^{bY} \pm 11.38
	3	21	126.64 ^{abY} \pm 14.10
	3	28	123.55 ^{aY} \pm 14.84

^a—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. ^{a,b}—differences between a day of storage within a yoghurt type; ^{a,b}—significant differences at $p < 0.05$. ^{X,Y}—differences between a yoghurt type within a day of storage; ^{X,Y}—significant differences at $p < 0.01$.

3.3. Acidity (pH Value and Lactic Acid)

Incubation of the yoghurt was stopped when the pH of the control yoghurt reached approx. 4.60. The variations in pH value (Figure 2) and % lactic acid (Figure 3) were measured throughout the storage period. In Figure 2, the '0' point represents the pH measurement taken on the first day of storage at 4 °C. At the end of the storage period ('28'), the pH values were 4.41 in the control yoghurt and 4.10 in the yoghurts supplemented with LF. The pH of the yoghurts generally varied within an acceptable range during storage. As expected, the value of this parameter decreased over storage time, and the decrease was statistically significant ($p < 0.05$). Changes in pH are associated with the type of bacterial culture used and the storage temperature. At temperatures above 4 °C the number of fermenting bacteria increases, which reduces the active acidity value [53]. Franco et al. [21] reported that the decrease the authors observed in pH was directly linked to the concentration of LF, because a higher LF concentration caused higher pH values than in the control yoghurts. Assessment of titratable acidity in the present study revealed an increase in the content of lactic acid of about 0.28 p.p. (Figure 3). On the last day of storage, both yoghurts contained just over 1% lactic acid. This parameter was shown to be statistically significantly influenced by the storage time ($p < 0.05$), but not by the addition of LF ($p > 0.05$). Amadarshanie et al. [54] reported a decrease in pH from 4.92 to 3.58 and a twofold increase in the content of lactic acid (to 1.24%) during 21-day storage of control natural yoghurt based on the same strains used in the present study. This is because the content of lactic acid changes in the reverse direction to the change in pH, due to fermentation of lactose by the lactic acid bacteria used to make the yoghurt, which produce lactic acid. The high metabolic activity of the bacteria used to produce yoghurt decreases immediately after incubation due to cooling, but the enzymatic activity of the bacteria continues during the storage period. For this reason changes in acidity are observed even after the incubation period [55]. Arslaner et al. [56] reported smaller differences, with a reduction in the pH of the control yoghurts amounting to 0.15 (from 4.31 to 4.16, $p < 0.01$) and an increase in the content of lactic acid of 0.08 p.p. (from 1.00% to 1.08%, $p < 0.01$) over three weeks. In another study [40], the change in the acidity of natural yoghurts over a three-week period was not significant. Brodziak et al. [45] added WPC to yoghurts and observed an increase in active acidity (a reduction in pH) accompanied by an increase in the content of lactic acid in the fortified yoghurts compared to the controls. The addition of whey proteins increases the buffering properties of milk, which affects potential acidity—lactic acid content. These changes were confirmed statistically during one month of storage. The same tendencies were obtained by Karam-Allah et al. [22] during 10-day storage of yoghurt enriched with buffalo and cow colostrum and lactoferrin, but also by Akal et al. [23] in yoghurt made from donkey milk with the addition of lysozyme,

lactoferrin and natamycin. Karam-Allah et al. [22] reported that stirred yoghurts with colostrum had slightly reduced titratable acidity when fresh and during storage, possibly due to the presence of bioactive components (antimicrobial agents) in colostrum and lactoferrin, which decreases the chances of fermentation. Zakaria et al. [57] reported a reduction in active acidity (pH) and an increase in titratable acidity in yoghurt with added whey protein compared to control yoghurt during 7-day storage, which in the case of pH was also confirmed by Karam-Allah et al. [22]. This may be due to partial inhibition of lactic acid by lactoferrin. In the present study, these changes over time were comparable with the control yoghurt.

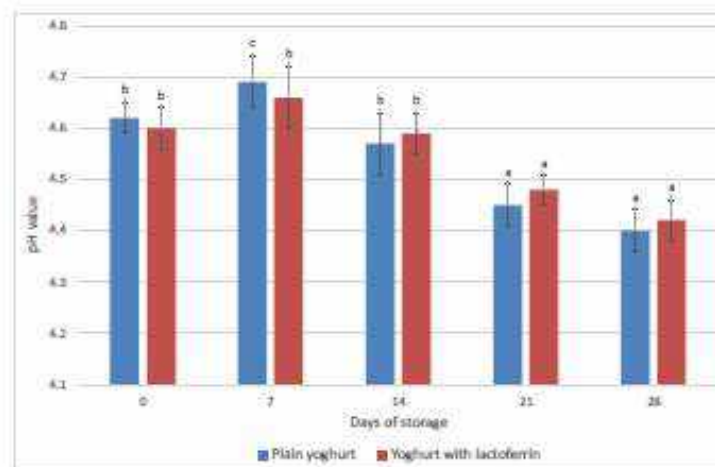


Figure 2. Changes of pH value in the analysed yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions. *a, b, c*—differences between the pH value within a yoghurt type, significant at $p \leq 0.05$.

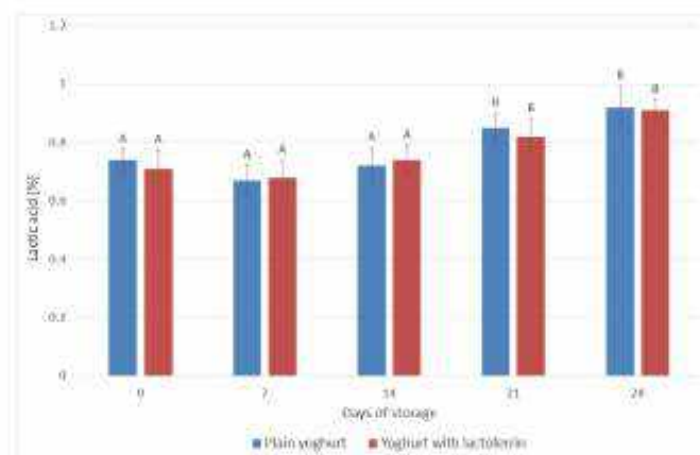


Figure 3. Changes of lactic acid content (%) in the analysed yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions. *A, B*—differences between the pH value within a yoghurt type, significant at $p \leq 0.01$.

3.4. Microbiological Evaluation

Consumers reaching for new products with proven health-promoting properties must be guaranteed high microbiological quality, which translates into health safety. Research on determining the level of microbiological contamination informs not only about the quality of the product, but also the hygiene of the process and the quality of the additives. Analysing the total bacteria count, it was found that the fresh control and experimental yoghurts did

not contain any contaminants (Table 3). However, the changes occurred during the storage of yoghurts without the addition of LF. Bacteria (in total) were detected on day 14 of the study and their count remained at the same level until the end of the storage period. These differences were statistically confirmed ($p \leq 0.01$). The study also assessed the total number of bacteria of the genus *Clostridium* sp., *Coli* bacteria (Endo), faecal coliforms (mFC), as well as the presence of *Salmonella* bacilli and *Campylobacter* bacilli. They were absent in both the control and experimental yoghurts (Table 3). The microorganisms also did not appear in the products during refrigerated storage. In addition, no fungal growth was observed in the control and experimental yoghurts at any of the analysed time periods. Yoghurts are a source of lactic acid bacteria. In the yoghurts produced, their total number was at the level of $6.9\text{--}7.1 \times 10^7$ cfu/mL. No statistically significant differences in the number of these microorganisms were recorded throughout the storage period. It should be noted that the yoghurts met the requirements of Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 [58] on microbiological criteria for foodstuffs. One of the factors determining the therapeutic, prophylactic and dietary values of yoghurts is the presence of live cultures of starter bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) throughout their declared shelf life [59]. According to the requirements of the FAO/WHO *Codex Alimentarius* standard [60], the number of characteristic microflora of yoghurt must be at least 10^7 cfu in 1 g of the product during its shelf life, which is taken into account in the Polish standard [26], wherein at least 10^6 should be living lactic acid bacteria. In the study by Franco et al. [21], bacterial counts were virtually constant throughout the entire period (including 28 days), regardless of the form of lactoferrin applied. The mean value for *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* was 6.37 log cfu/mL, and 8.87 log cfu/mL for *S. thermophilus*. LF has been indicated to be highly stable during food storage, including yoghurts. However, Franco et al. [27], in a more detailed study, taking into account the form of LF (different iron saturation), showed some variations in the concentration of bovine apo-lactoferrin during the storage period. According to the authors, this should also be linked to different pH values of the yoghurts, since yoghurt containing apo-lactoferrin had the highest pH value during storage (apo-lactoferrin yoghurt pH > control yoghurt pH > holo-lactoferrin yoghurt pH). Similar studies were also carried out by Kim et al. [61], who found that bovine holo-lactoferrin stimulated the growth of *Lactobacillus acidophilus*. However, in the present study, the forms of LF were not determined, also due to its lack of availability on the market. In assessing the microbiological quality of donkey milk-based yoghurts, Akal et al. [23] considered only the counts of total aerobic mesophilic bacteria and yeasts/moulds. The total number of aerobic mesophilic bacteria was lower in the lactoferrin-treated fresh yoghurt than in the fresh control yoghurt (1.07 vs. 2.54 log cfu/g). In both cases, no yeasts and moulds were found in the fresh product. There was an increase in the total aerobic mesophilic bacteria count during storage, both in the control and experimental yoghurts. The storage period also affected the development of yeasts and moulds in the control yoghurt, which was not observed for the experimental yoghurt (with lactoferrin and lysozyme). Steijns and Hooijdonk [62] indicated that the antimicrobial effect of LF against yeasts and moulds also relied on iron binding, as in the case of bacteria. It should be noted that lysozyme in this study [23] was found to be generally more effective in its antimicrobial activity than LF.

In general, yoghurts with LF addition, due to their antimicrobial properties, will show higher microbiological stability during storage. However, the use of LF of high microbiological purity should be ensured.

3.5. Texture

Texture is a very important determinant of the quality and acceptability of yoghurt. The final texture of fermented dairy drinks is determined by their structural arrangement and protein microstructure network [63]. The texture results can be explained by many factors, such as their composition (content of dry matter including protein and fat), the production method, incubation conditions, cooling, the use of added ingredients, and storage conditions. It should be noted that in the water bath method, once the fermented

drink is obtained it is no longer possible to interfere with the contents of the package. For this reason it is usually used to produce natural (plain) yoghurt, without added flavourings.

Assessment of texture in the present study took into account firmness, consistency, cohesive strength, and dynamic viscosity. Strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* bacteria were used to produce the yoghurts. In the starter mixture *S. thermophilus* is responsible for releasing the aroma, while *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* is responsible for acidification, which promotes casein coagulation [64]. Both strains synthesize exopolysaccharides (EPS). EPS are secreted out of the cell in the form of slime or bound to the cell surface [65,66]. Research [67] indicates that yoghurt produced using strains capable of EPS synthesis exhibit better rheological properties, viscosity, and consistency than those made with strains that cannot synthesize these polymers.

Table 3. Microbiological evaluation of the analysed yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (cfu/g, mean).

Yoghurt Type	Day of Storage	Number of Samples*	Total Bacteria Count	Total Number of Fungi	Total Number of Lactic Acid Bacteria	Total Number of Bacteria of the Genus <i>Clostridium</i> sp.	Total Number of Coli Bacteria (Total)	Total Number of Faecal Coliforms (mpc)	Presence of Substratic BactiII	Presence of Campylobacter BactiII
Plain, natural yoghurt	0	3	0	0	6.9×10^7	0	0	0	0	0
	7	3	0	0	7.6×10^7	0	0	0	0	0
	14	3	$<0.5 \times 10^2$ Y	0	4.4×10^7	0	0	0	0	0
	21	3	$<0.5 \times 10^2$ Y	0	5.9×10^7	0	0	0	0	0
	28	3	$<0.5 \times 10^2$ Y	0	5.2×10^7	0	0	0	0	0
Yoghurt with lactoferrin	0	3	0	0	7.3×10^7	0	0	0	0	0
	7	3	0	0	7.4×10^7	0	0	0	0	0
	14	3	0 ^X	0	6.5×10^7	0	0	0	0	0
	21	3	0 ^X	0	5.8×10^7	0	0	0	0	0
	28	3	0 ^X	0	5.0×10^7	0	0	0	0	0

*—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. “0”—means “not detected”. ^{X,Y}—differences between a yoghurt type within a day of storage, ^{X,Y}—significant differences at $p \leq 0.01$.

The presence of proteins in yoghurts is very important because they improve viscosity, bind water, act as stabilizers, and limit syneresis during storage at low temperatures. In the dairy industry proteins in the form of powdered milk or whey proteins are added to modify the product’s consistency. Thus, the addition of proteins to yoghurt is beneficial for technological purposes. The texture of yoghurt is also positively influenced by the addition of polysaccharides [68] and inulin [24].

In the present study, due to legal limits [19] on the addition of lactoferrin (as well as its high cost), the level of added lactoferrin could not have been higher, as the main purpose of the study was to assess a product intended for the market. Therefore, the addition of lactoferrin caused no significant changes in texture parameters (Table 4). The texture parameters of fresh natural yoghurts supplemented with LF were as follows: firmness—3.35 N, consistency—2.01 mJ, cohesive strength—1.20 N, and dynamic viscosity—850 mPa·s. The values for the control yoghurts were similar ($p > 0.05$, Table 4).

The parameters were significantly influenced by the storage period. There was an increase in firmness ($p \leq 0.01$), consistency ($p \leq 0.01$) and dynamic viscosity ($p \leq 0.01$), and a decrease in cohesive strength for both the yoghurt with added LF and the control yoghurt (Table 4).

Many authors report changes in the texture parameters of natural yoghurt. Similar tendencies during storage of natural yoghurt were observed by Moschopoulou et al. [69] and Domagała et al. [70], while Pawlos [71] and Bierzńska et al. [72] reported slightly different relationships, with higher values obtained for the texture parameters. According to Das and Seth [73], the rheological characteristics of yoghurt enriched with colostrum may have been improved by the increased content of whey proteins in colostrum, as protein content is directly associated with the forces involved in the internal bonds of the product. The texture parameters of yoghurt increase with the share of dry matter, including protein, but also fat [74]. They are also associated with the capacity of the inoculant to produce slime [67]. The tendency of the viscosity of the yoghurts to increase with storage time in the present study is confirmed by Karam-Allah et al. [22], who evaluated stirred

yoghurts fortified with lactoferrin colostrum and found lower viscosity in the control and experimental yoghurts than in the present study (by about 30%). The addition of lysozyme and lactoferrin to donkey milk also had no significant effect on the texture of yoghurt produced by Akal et al. [23]. Compared to the control yoghurt, the addition of the proteins caused a non-significant increase in firmness and the index of viscosity and a decrease in consistency and cohesiveness. Storage for 30 days increased most of the parameters of donkey yoghurt treated with LF, i.e., firmness by 4%, consistency by 25% and cohesiveness by 12%, while the index of viscosity decreased by 18%. Many authors [21,75] confirm an increase in firmness during storage, which results from shrinkage of the protein gel due to changes in pH. Therefore, the firmness of yoghurts depends mainly on the activity of lactic acid bacteria.

Table 4. Results of texture analysis of yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (mean ± SD).

Yoghurt Type	Day of Storage	Number of Samples *	Firmness (N)	Consistency (mJ)	Cohesive Strength (N)	Dynamic Viscosity (mPa·s)
Plain, natural yoghurt	0	3	3.89 ^A ± 2.17	2.38 ^A ± 0.40	1.18 ± 0.12	812 ± 86
	7	3	4.43 ^B ± 1.51	2.82 ^A ± 0.14	1.16 ± 0.10	950 ± 102
	14	3	4.73 ^{A,B} ± 1.34	3.09 ^B ± 0.23	1.13 ± 0.10	1130 ± 76
	21	3	6.23 ^C ± 1.02	3.85 ^C ± 0.29	1.10 ± 0.14	1292 ± 100
	28	3	6.45 ^C ± 1.10	3.73 ^C ± 0.42	1.07 ± 0.15	1975 ± 143
Yoghurt with lactoferrin	0	3	3.35 ^A ± 2.09	2.01 ^B ± 0.28	1.20 ± 0.09	850 ± 62
	7	3	4.21 ^B ± 1.38	2.47 ^A ± 0.60	1.17 ± 0.15	910 ± 57
	14	3	4.08 ^{A,B} ± 1.21	2.26 ^B ± 0.35	1.13 ± 0.12	1090 ± 91
	21	3	6.09 ^C ± 1.42	4.06 ^C ± 0.55	1.13 ± 0.11	1209 ± 126
	28	3	6.27 ^C ± 1.35	4.08 ^C ± 0.34	1.10 ± 0.16	1370 ± 107

*—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. ^{A, B, C}—differences between the texture parameters within a yoghurt type; ^{A, B, C}—significant differences at $p \leq 0.01$.

3.6. Water Activity

Water activity (a_w) is the availability of the water contained in a product for microbes. The water activity parameter can be used to determine the course of biochemical reactions, the stability of the organoleptic characteristics of food, the development of microorganisms, and above all the storage stability of food products [45]. Olkowski et al. [76] reported that unfavourable reactions affecting food quality are more dependent on the state of the water than on its content in the product. In the present study, water activity generally ranged from 0.937 to 0.978 (Table 5). It was lower in the control yoghurt than in the fortified product: 0.937 vs. 0.948. The values increased during storage, which was confirmed statistically ($p \leq 0.05$). The highest water activity was recorded for the yoghurt fortified with LF on the last day of storage (0.978). Water activity is rarely analysed in studies on yoghurt. Similar values for natural yoghurts have been reported by Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40], who obtained water activity at a level of 0.9776. Similar tendencies were noted in another study that took into account the storage period of products [45]. In general it can be stated that the higher the a_w index, the faster microorganisms can multiply, using the water for their own processes. In the case of dairy products, one means of controlling water activity is to regulate their pH [77].

3.7. Water-Holding Capacity and Syneresis

Separation of whey from yoghurt is a natural phenomenon, although it is negatively perceived by consumers, who generally associate it with adverse changes in quality and as a sign of deterioration [45].

The water-holding capacity (WHC) of yoghurts is an indicator of their ability to retain serum (whey) in the gel structure [78]. The fresh control yoghurt and yoghurt with added LF had comparable WHC values, amounting to 86.25% and 87.00%, respectively

(Table 5). However, a significant ($p < 0.05$) influence of storage time was observed, with WHC deteriorating over storage time. On the last day of storage it was 10% lower than on day 0. This should also be linked to changes taking place in the texture of the yoghurt, e.g., firmness. In the case of WHC, similar tendencies were reported by Brodziak et al. [45], who analysed yoghurts enriched with WPC. As the amount of WPC increased, WHC decreased. It also decreased significantly during refrigerated storage, irrespective of the bacterial culture used. In a study by Bierzuńska et al. [72], the addition of polymerized whey protein (PWP) in the amount of 28% *w/v* significantly ($p < 0.05$) increased WHC (97.70%), while the addition of whey protein concentrate (WPC) in the amount of 5.62% *w/v* reduced it (92.41%, $p < 0.05$) in comparison with the control yoghurt (95.23%). Three weeks of refrigerated storage decreased the ability of WPC yoghurt to retain water by about 20%, while PWP yoghurt showed little difference (3%). The direction of the changes in the case of the use of WPC is also confirmed by Akalin et al. [79], and Koziol et al. [80]. A study by Cais-Sokolinska and Walkowiak-Tomczak [40] also confirmed that the storage time of natural yoghurt significantly affects its WHC, obtaining values of over 90%. Ning et al. [81] reported 96% WHC in fresh natural yoghurt. Yoghurts analysed by Akal et al. [23] had WHC values at about half the level obtained in the present study. Yoghurt made from donkey milk, with and without the addition of proteins (lysozyme, lactoferrin and natamycin), had a very similar capacity, ranging from 38.82% to 39.25%. This parameter was not significantly affected by 30-day storage, although the WHC values increased (to 43%).

Table 5. Water activity, water-holding capacity and syneresis in yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (mean \pm SD).

Yoghurt Type	Day of Storage	Number of Samples *	Water Activity	Water-Holding Capacity—WHC (%)	Spontaneous Whey Syneresis—SWS (%)
Plain, natural yoghurt	0	3	0.937 ^a \pm 0.008	86.25 ^c \pm 0.62	0.1 ^A \pm 0.0
	7	3	0.945 ^a \pm 0.007	82.94 ^b \pm 0.53	0.5 ^B \pm 0.1
	14	3	0.960 ^{ab} \pm 0.013	80.79 ^a \pm 0.94	0.8 ^B \pm 0.2
	21	3	0.964 ^b \pm 0.009	80.05 ^a \pm 1.68	1.0 ^{BC} \pm 0.3
	28	3	0.971 ^b \pm 0.005	78.04 ^a \pm 1.15	1.2 ^C \pm 0.2
Yoghurt fortified in lactoferrin	0	3	0.948 ^a \pm 0.006	87.00 ^c \pm 0.34	0.1 ^A \pm 0.1
	7	3	0.957 ^a \pm 0.014	84.46 ^b \pm 0.60	0.4 ^B \pm 0.1
	14	3	0.952 ^a \pm 0.009	81.63 ^a \pm 0.87	0.5 ^B \pm 0.3
	21	3	0.961 ^a \pm 0.010	80.17 ^a \pm 1.79	0.8 ^{BC} \pm 0.2
	28	3	0.978 ^b \pm 0.007	79.02 ^a \pm 1.52	1.0 ^C \pm 0.3

*—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. ^{a, b, A, B, C}—differences between the texture parameters within a yoghurt type; ^{a, b}—significant differences at $p \leq 0.05$; ^{A, B, C}—significant differences at $p \leq 0.01$.

The present study also determined spontaneous whey syneresis, also called whey separation. This is an important phenomenon taking place during storage and is visible with the naked eye. According to Dimitrellou et al. [82], this defect can affect acceptance of the final product, due to an unfavourable appearance, and limit shelf life. It is caused in yoghurt by the loss of gel capacity to entrap the serum phase due to weakening of the gel network, resulting in separation of the whey [53]. It can be determined by the type of milk, the type of bacterial cultures, the acidity of the yoghurt, total solids, protein content, or hydrocolloid content. The presence of EPS also affects spontaneous whey separation, increasing it during storage [78,83]. This is a common, natural phenomenon in yoghurt, but in order to satisfy consumers, producers try to reduce it using various additives—polysaccharides (e.g., carrageenan, guar gum, xanthan gum, locust bean gum, or mixtures thereof), milk proteins in the form of skimmed milk powder, whey powder, whey protein concentrate (WPC), prebiotics (e.g., inulin), or dietary fibre [84]. In the present study, a comparable level of syneresis was observed in both types of yoghurt (Table 5). The addition of protein was too small to significantly affect syneresis. However, SWS changed significantly ($p \leq 0.01$) during storage. In the control yoghurt it was 12 \times higher on day 28 of storage than on day 0 (1.2 vs. 0.1%), while in the experimental yoghurt it was

10× higher (1.0 vs. 0.1%). Comparable SWS values were obtained by Bierzuńska et al. [72] and by Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40] for natural yoghurt, with a higher WHC. The degree of syneresis increased significantly ($p \leq 0.05$) over storage time in the control yoghurt (from 0.1% on day 0 to 1.5% on day 21) and in yoghurt with whey protein concentrate—WPC (from 0.1% on day 0 to 3.9% on day 21). The addition of polymerized whey protein (PWP) reduced syneresis to the level of the control yoghurt on day 0—the level of 0.0% was maintained over a 21-day period [72]. The degree of syneresis in the study by Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40] was 0.1% in the fresh control yoghurt made using *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Syneresis was not observed also after three weeks of storage. Increasingly proposed and used plant additives also affect the water-holding capacity and syneresis. According to Khalil et al. [85], the syneresis and WHC values of probiotic (*Bifidobacterium longum*) yoghurt flavoured with white sapote fruit (*Casimiroa edulis*) in the form of pulp were influenced by supplementation whether in fresh or stored samples.

3.8. Colour Parameters

The CIELab system ($L^*a^*b^*$) is currently the most popular means of describing the colour of various food products and the basis for modern colour management systems. The L^* (lightness), a^* (change in the green-to-red range) and b^* (change in the blue-to-yellow range) parameters were measured instrumentally. The yoghurt without added LF was lighter (97.75) than those with it (91.06, $p > 0.05$), probably due to the natural pink colour of LF (Table 6). The lightness of the yoghurts decreased over time, which was confirmed statistically ($p \leq 0.01$), and was lowest on the final day of the study, i.e., day 28. The colour of fresh yoghurt with added LF took on values closer to red (parameter a^* ; $p \leq 0.01$) and yellow (b^* ; $p \leq 0.05$) compared to the control yoghurt. During storage time the yoghurts became both redder (change in a^* towards 0, i.e., from -4.43 to -3.16 in the control yoghurt and from -2.04 to -0.85 —in the fortified yoghurt) and yellower (b^* , i.e., from 18.12 to 18.57 in the control yoghurt and from 17.68 to 18.12 in the fortified yoghurt). Previously published studies regarding LF in dairy products have not included instrumental measurement of colour, so it is not possible to compare the results directly with the findings of other authors. Pires et al. [86], in a study using natural yoghurt purchased in a shop, reported an L^* value of 93, a^* -3.5 , and b^* 9.8, with 3.3% fat content and pH 4.3. In the case of the L^* and a^* parameters, these values were similar to the results obtained in the present study for the fortified yoghurt. They also correspond with results obtained by Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40] for natural yoghurts produced by the authors (L^* 89.7, a^* -2.1). During three-week storage, however, the L^* and a^* values proved to be unstable, and that of L^* decreased significantly ($p \leq 0.05$). In another study, Cais-Sokolińska and Pikul [87] reported that as the storage time of yoghurts increased, the L^* , a^* and b^* colour parameters decreased, which was confirmed in the present study only for lightness (L^*). Changes in these parameters are also determined by factors other than additives, such as the course of pasteurization or changes in pH during storage. Bierzuńska et al. [72] reported that control yoghurts and yoghurts with added polymerized whey protein (PWP) became whiter with storage time, while those enriched with whey protein concentrate (WPC) became less white. Therefore it is difficult to draw clear conclusions regarding the direction of changes. Nevertheless, instrumental colour assessment can unquestionably be used to choose and optimize the conditions for the technological process. It should be noted, however, that instrumental colour assessment will not reflect consumers' visual evaluation and acceptance of colour. Minor changes registered by the device will not be registered at all by the human eye.

Table 6. Colour parameters of yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions (mean \pm SD).

Yoghurt Type	Day of Storage	Number of Samples *	L*	a*	b*
Plain, natural yoghurt	0	3	97.75 ^{by} \pm 1.69	-4.43 ^{AX} \pm 0.18	18.12 ^{ay} \pm 0.14
	7	3	96.48 ^{by} \pm 1.37	-4.01 ^{AX} \pm 0.23	18.15 ^{ay} \pm 0.10
	14	3	96.01 ^{by} \pm 1.25	-3.82 ^{AX} \pm 0.27	18.32 ^{ay} \pm 0.08
	21	3	94.62 ^{ABy} \pm 1.90	-3.57 ^{ABX} \pm 0.37	18.45 ^{aby} \pm 0.11
	28	3	93.71 ^{Ay} \pm 1.86	-3.16 ^{BX} \pm 0.38	18.57 ^{by} \pm 0.13
Yoghurt fortified in lactoferrin	0	3	91.06 ^{Bx} \pm 1.71	-2.04 ^{AY} \pm 0.22	17.68 ^{ax} \pm 0.20
	7	3	90.43 ^{Bx} \pm 1.15	-1.75 ^{AY} \pm 0.16	17.73 ^{ax} \pm 0.14
	14	3	90.02 ^{Bx} \pm 1.38	-1.44 ^{AY} \pm 0.29	17.84 ^{ax} \pm 0.15
	21	3	88.31 ^{ABx} \pm 1.20	-1.18 ^{BY} \pm 0.36	17.96 ^{abx} \pm 0.20
	28	3	87.15 ^{AX} \pm 1.42	-0.85 ^{BY} \pm 0.45	18.12 ^{bx} \pm 0.23

L*—lightness; a*—a change in the green to red range; b*—a change in the blue to yellow range (the CIE Lab system). *—new samples were taken in the following days of storage. The total number of samples covered by the research in this field is the sum of all those listed. ^{a, b, A, B}—differences between a day of storage within a yoghurt type; ^{x, y}—significant differences at $p < 0.05$; ^{A, B}—significant differences at $p < 0.01$. ^{x, y, X, Y}—differences between a yoghurt type within a day of storage; ^{AY}—significant differences at $p < 0.05$; ^{AX, Y}—significant differences at $p < 0.01$.

3.9. Organoleptic Assessment

A very important element of the evaluation of a new product is consumer surveys [22,55,88]. The organoleptic assessment of the yoghurts took into account their colour, flavour, consistency, aroma and general acceptance. These characteristics directly depend on the acidity of the yoghurt, including lactic acid content, and its content of free fatty acids and volatile compounds. Based on organoleptic evaluation, the consumer is able to assess the quality of the purchased product, but in the case of yoghurt, this is only possible after the package has been opened. The yoghurts fortified with lactoferrin received high scores, comparable to the scores for the control yoghurt (Figure 4a,b). The fresh experimental yoghurt received the same total score as the control yoghurt, i.e., 4.9 points/5.0 max. The effect of the additive therefore did not prove to be significant, and the comparable, high results obtained can be considered satisfactory. It is important for a new product to have high consumer acceptance. In general, the scores assigned for organoleptic traits decreased during the storage period, reaching an average of 4.68 points/5.00 max. However, the effect proved to be statistically non-significant ($p > 0.05$), i.e., there were no significant, negative changes in perception. The tendencies found for natural yoghurt are confirmed in a study by Arslaner et al. [56]. Cais-Sokolińska and Walkowiak-Tomczak [40] reported full acceptance of natural yoghurt immediately after production, but after three weeks of storage the acceptance level was 14%. ‘Dislike’ responses were given by two of thirteen panellists. According to Karam-Allah et al. [22], stirred yoghurt fortified with lactoferrin colostrum had statistically ($p \leq 0.05$) higher scores for body, texture, and appearance than the control sample, but lower scores for flavour. Thus, the addition of lactoferrin improved the organoleptic traits of the product. This is consistent with results reported by Das and Seth [73], who reported that curd samples fortified with colostrum whey powder had higher scores than the control yoghurt in terms of body and texture, colour, appearance, and overall acceptability. Studies performed using different dairy products also found that the addition of lactoferrin [23], lysozyme [89], and natamycin [90] had no adverse effects on the organoleptic properties of products. Akalin et al. [79] reported no significant differences between yoghurts with different amounts of WPC in terms of appearance, aroma, flavour, and overall acceptability during storage ($p > 0.05$). Zakaria et al. [57] conducted only a seven-day evaluation of yoghurt fortified with lactoferrin, which on the first day after production received lower scores than the control yoghurt. On the seventh day of storage, LF-fortified yoghurt received lower scores than during analysis the day after production, but none of these tendencies was confirmed statistically.

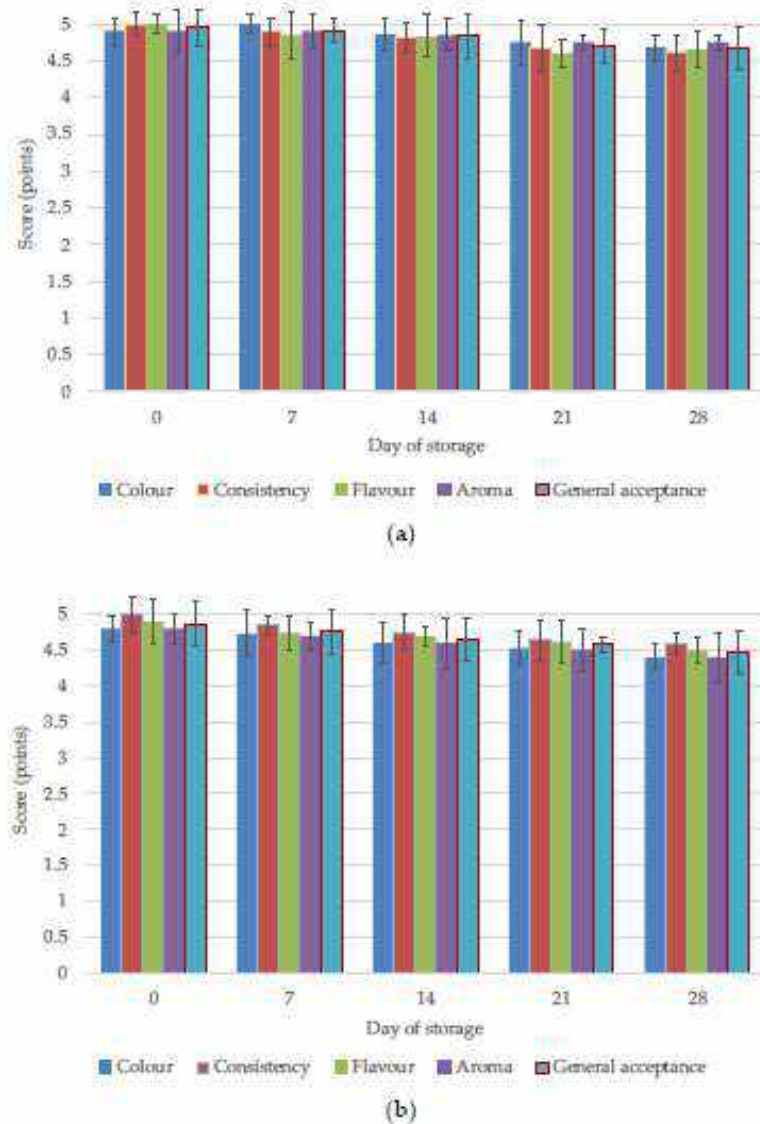


Figure 4. (a) Changes in organoleptic quality (colour, consistency, flavour, aroma and general acceptance) of the plain, natural yoghurts during 28 days of storage in the refrigerated conditions. (b) Changes in organoleptic quality (colour, consistency, flavour, aroma and general acceptance) of the yoghurts fortified in lactoferrin during 28-days of storage in the refrigerated conditions.

4. Conclusions

Enrichment of yoghurt with lactoferrin did not cause significant changes in most of the physicochemical properties analysed (except for total protein, content of dry matter and lactoferrin, and colour parameters) or in its microbiological or organoleptic properties. In the case of content of basic nutrients (total protein and dry matter), the bioactive additive itself (LF content), texture parameters (firmness, consistency, and dynamic viscosity), and physical characteristics (acidity, water activity, water-holding capacity, spontaneous whey syneresis and colour parameters), a significant influence of storage time was observed. The results are satisfactory, and indicate high acceptance and high stability of the yoghurts fortified in LF.

Lactoferrin, as an integral component of milk, is safe, and, moreover, it has proven multi-faceted health-promoting effects on the human body. The proposed product—

yoghurt fortified with LF—may be of interest to health-conscious consumers. An improvement of biological value increases interest in food products. Analysis of previously published studies on whey proteins suggests that further studies should aim to determine the population groups that could derive the greatest health benefits from consuming lactoferrin-fortified yoghurts. Biochemical studies, which usually assess the current state of the body, and genetic studies, which can serve as a prognostic indicator, could be used to identify the target audience for lactoferrin-fortified yoghurts and fully exploit their preventive properties. Next steps for further research could include investigating the effects of different forms of lactoferrin on yoghurt, such as holo and apo, and exploring the potential benefits of encapsulation to improve bioavailability and extend the presence of bioactive substances in the body. Additionally, further research could examine the impact of LF on other dairy products, and investigate the co-effects of other bioactive substances on the physicochemical and organoleptic properties of dairy products. Ultimately, research in this area could help to develop the innovative and appealing dairy products that meet the demands of health-conscious consumers.

Author Contributions: Conceptualization, A.J. and A.B.; methodology, A.J., A.B., J.K. and T.C.; data curation, A.J.; formal analysis, A.J. and A.B.; investigation, A.J., A.B., J.K. and T.C.; literature search, A.J.; writing—original draft preparation, A.J. and A.B.; writing—review and editing, A.J. and A.B.; project administration, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number 0029/DW/2018 “Implementation Doctorate”).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank M. Florek and L. Wlazlo for the technical support of research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food-Based Dietary Guidelines. FAO. 2020. Available online: <http://www.fao.org/nutrition/education/food-dietary-guidelines/home/en/> (accessed on 16 September 2022).
2. Comerford, K.B.; Miller, G.D.; Boileau, A.C.; Masiello Schuette, S.N.; Giddens, J.C.; Brown, K.A. Global review of dairy recommendations in food-based dietary guidelines. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 671999. [CrossRef] [PubMed]
3. Nastaj, M.; Solowiej, B.; Gustaw, W. Physicochemical properties of high protein meringues made from different whey protein preparations. *Zywnosc. Nauk. Technol. Jakosc* **2014**, *93*, 33–47.
4. Kowalczyk, P.; Kaczyńska, K.; Kleczkowska, P.; Bukowska-Oško, I.; Kramkowski, K.; Sulejczak, D. The lactoferrin phenom-enon—A miracle molecule. *Molecules* **2022**, *27*, 2941. [CrossRef]
5. Król, J.; Brodziak, A.; Zaborska, A.; Litwińczuk, Z. Comparison of whey proteins and lipophilic vitamins between four cow breeds maintained in intensive production system. *Mlekarstwo* **2017**, *67*, 17–24.
6. Barłowska, J.; Szwałkowska, M.; Litwińczuk, Z.; Król, J. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 291–302. [CrossRef]
7. Stobiecka, M.; Król, J.; Brodziak, A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals* **2022**, *12*, 245. [CrossRef]
8. Yasueda, A.; Ito, T.; Maeda, K. Review: Evidence-based Clinical Research of Anti-obesity Supplements in Japan. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 185–195. [CrossRef]
9. Mohamed, W.A.; Schaalán, M.F. Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatrics; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 89. [CrossRef]
10. Zee, R.Y.; Cook, N.R.; Cheng, S.; Erlich, H.A.; Lindpaintner, K.; Ridker, P.M. Polymorphism in the beta2-adrenergic receptor and lipoprotein lipase genes as risk determinants for idiopathic venous thromboembolism: A multilocus, population-based, prospective genetic analysis. *Circulation* **2006**, *113*, 2193–2200. [CrossRef]
11. Mayeur, S.; Spahis, S.; Pouliot, Y.; Levy, E. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *24*, 813–836. [CrossRef]

12. Abu Hashim, H.; Foda, O.; Ghayaty, E. Lactoferrin or ferrous salts for iron deficiency anemia in pregnancy: A meta-analysis of randomized trials. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2017**, *219*, 45–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tutykhina, I.L.; Bezborodova, O.A.; Shmarov, M.M.; Logunov, D.Y.; Neugodova, G.L.; Nemtsova, E.R.; Naroditsky, B.S.; Yakubovskaya, R.I.; Gintsburg, A.L. Production of recombinant human lactoferrin in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs and its characteristics. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *65*, 100–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ling, C.J.; Min, Q.Q.; Yang, J.R.; Zhang, Z.; Yang, H.H.; Xu, J.Y.; Qin, L.Q. Lactoferrin alleviates the progression of athero-sclerosis in ApoE^{-/-} mice fed with high-fat/cholesterol diet through cholesterol homeostasis. *J. Med. Food* **2019**, *22*, 1000–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Poli, F.; Pozzoli, C.; Adami, M.; Poli, E.; Costa, L.G. Treatments for COVID-19: Emerging drugs against the coronavirus. *Acta Bio Med. Atenei Parm.* **2020**, *91*, 118–136. [[CrossRef](#)]
16. Maciel, K.S.; Santos, L.S.; Bonomo, R.C.F.; Verissimo, L.A.A.; Minim, V.P.R.; Minim, L.A. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *251*, 117324. [[CrossRef](#)]
17. Wang, Q.; Chen, G.Q.; Kentish, S.E. Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electrodialysis with filtration membrane process. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *233*, 115987. [[CrossRef](#)]
18. Commission Implementing Decision of 22 November 2012 Authorising the Placing on the Market of Bovine Lactoferrin as a Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Friesland Campina) (Notified under Document C(2012) 8404). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012D0727&from=PL> (accessed on 16 May 2022).
19. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1023 of 23 July 2018 Correcting Implementing Regulation (EU) 2017/2470 Establishing the Union List of Novel Foods (L 187). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018R1023&from=EN> (accessed on 10 May 2022).
20. Inay, O.M.; da Silva, A.S.; Honjoia, E.R.; Sugimoto, H.H.; de Souza, C.H.B.; de Santana, E.H.W.; de Oliveira-Aragon, L.A.; Alegro, L.C. Action of lactoferrin on the multiplication of *Lactobacillus casei* in vitro and in Minas fresh cheese. *Semin. Cienc. Agrar.* **2012**, *33*, 3153–3162. [[CrossRef](#)]
21. Franco, I.; Castillo, E.; Pérez, M.; Calvo, M.; Sanchez, L. Effect of bovine lactoferrin addition to milk in yogurt manufacturing. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 4480–4489. [[CrossRef](#)]
22. Shaaban, H.A.-G.; Karam-Allah, A.A.K.; Abo-Zaid, E.M.; Refae, M.M.; Saad, S.A.; Hassanin, A.M.; El-Waseif, M.A.E.-M. Functional stirred Yoghurt fortified with buffalo, bovine, mix colostrum and lactoferrin, effect of lactoferrin on pathogenic bacteria and amino acids of buffalo, bovine colostrum and lactoferrin. *Egypt J. Chem.* **2022**, *65*, 583–594. [[CrossRef](#)]
23. Akal, H.C.; Ozturkoglu-Budak, S.; Bereli, N.; Cimen, D.; Akgonullu, S. Effect of donkey milk lactoferrin and lysozyme on yoghurt properties. *Mljekarstvo* **2022**, *72*, 77–87. [[CrossRef](#)]
24. Glibowski, P.; Rybak, P. Rheological and sensory properties of stirred yoghurt with inulin-type fructans. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *69*, 122–128. [[CrossRef](#)]
25. PN-EN ISO 8968-1:2014; Milk and Milk Products—Determination of Nitrogen Content—Part 1: Kjeldahl Principle and Crude Protein Calculation. ISO: Geneva, Switzerland, 2014.
26. PN-A-86061:2006; Milk and Milk Products. Fermented Milk. NCBI: Bethesda, MA, USA, 2006.
27. Brodziak, A.; Barłowska, J.; Król, J.; Litwińczuk, Z. Effect of breed and feeding system on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Ann. Anim. Sci.* **2012**, *12*, 261–269. [[CrossRef](#)]
28. IDF/ISO Standard; Yogurt. Determination of Titratable Acidity. No. 150. ISO: Brussels, Belgium, 1991.
29. PN-EN ISO 7218:2008/AL:2013-10; Food and Feed Microbiology—General Requirements and Principles of Microbiological Testing. ISO: Geneva, Switzerland, 2013.
30. PN-EN ISO 6887-5:2020-10; Food Chain Microbiology—Preparation of Samples, Stock Suspension and Tentfold Dilutions for Microbiological Analysis—Part 5: Specific Guidelines for the Preparation of Milk and Milk Products. ISO: Geneva, Switzerland, 2020.
31. PN-ISO 7889:2007; Yogurt—Enumeration of Characteristic Microorganisms—Colony Count Technique at 37 °C. ISO: Geneva, Switzerland, 2007.
32. PN-ISO 6611: 2007; Milk and Milk Products—Enumeration of Colony Forming Units of Yeast and/or Mold—Plate Method at 25 °C. ISO: Geneva, Switzerland, 2007.
33. PN-ISO 20128:2012; Dairy Products—Enumeration of Putative *Lactobacillus acidophilus* on a Selective Medium—Colony Count Technique at 37 °C. ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
34. PN-ISO 15213:2005; Food and Feed Microbiology—Horizontal Method for the Enumeration of Sulphate (IV) Reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions. ISO: Geneva, Switzerland, 2005.
35. PN-ISO 4832:2007; Food and Feed Microbiology—Horizontal Method for the Enumeration of Coliform Bacteria—Plate Method. ISO: Geneva, Switzerland, 2007.
36. PN-ISO 10272-2:2017; Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 1: Detection Method. Part 2: Colony—Count Technique. ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
37. PN-EN ISO 6579-1:2017-04; Food Chain Microbiology—Horizontal Detection Method, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*—Part 1: *Salmonella* spp. Detection. ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
38. Bong, D.; Moraru, C. Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: Effects on processing and product properties. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 1259–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Narayana, N.M.N.K.; Gupta, V.K. Quality of cow milk plain set yogurt as affected by ultrafiltration process. *Trop. Agric. Res. Ext.* **2015**, *16*, 74. [CrossRef]
40. Cais-Sokolińska, D.; Walkowiak-Tomczak, D. Consumer-perception, nutritional, and functional studies of a yogurt with restructured elderberry juice. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 1318–1335. [CrossRef]
41. CIE. *Colorimetry*, 3rd ed.; Commission International de l'Éclairage: Vienna, Austria, 2004; pp. 16–20. Available online: <https://cielab.xyz/pdf/cie.15.2004%20colorimetry.pdf> (accessed on 17 September 2022).
42. ISO 4121:2003; Sensory Analysis—Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales. ISO: Geneva, Switzerland, 2003.
43. Baryłko-Pikielna, N.; Matuszewska, I. Sensory food testing. In *Basics Methods Usage*; Polish Society of Food Technologists Scientific Publisher: Kraków, Poland, 2014; pp. 267–275.
44. Tavakoli, M.; Najafi, M.B.H.; Mohebbi, M. Effect of the milk fat content and starter culture selection on proteolysis and antioxidant activity of probiotic yogurt. *Heliyon* **2019**, *5*, e01204. [CrossRef]
45. Brodziak, A.; Król, J.; Barłowska, J.; Teter, A.; Florek, M. Changes in the Physicochemical Parameters of Yoghurts with Added Whey Protein in Relation to the Starter Bacteria Strains and Storage Time. *Animals* **2020**, *10*, 1350. [CrossRef]
46. Brodziak, A.; Król, J.; Litwińczuk, Z. Evaluation of content of protein fraction components in different types of drinking milk. In *Properties of Food Products and Raw Materials; Selected Issues*; Tarko, T., Duda-Chodak, A., Witzak, M., Eds.; Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności Publishing: Kraków, Poland, 2014; pp. 4–14.
47. Claeys, W.; Verraes, C.; Cardoen, S.; De Block, J.; Huyghebaert, A.; Raes, K.; Dewettinck, K.; Herman, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* **2014**, *42*, 188–201. [CrossRef]
48. Darmawan, K.K.; Karagiannis, T.C.; Hughes, J.G.; Small, D.M.; Hung, A. High temperature induced structural changes of apo-lactoferrin and interactions with β -lactoglobulin and α -lactalbumin for potential encapsulation strategies. *Food Hydrocoll.* **2020**, *105*, 105817. [CrossRef]
49. Conesa, C.; Sánchez, L.; Rota, C.; Pérez, M.-D.; Calvo, M.; Farnaud, S.; Evans, R.W. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *150*, 131–139. [CrossRef]
50. Liu, H.; Boggs, L.; Weeks, M.; Li, Q.; Wu, H.; Harris, P.; Ma, Y.; Day, L. Kinetic modelling of the heat stability of bovine lactoferrin in raw whole milk. *J. Food Eng.* **2020**, *280*, 109977. [CrossRef]
51. Matijašić, B.B.; Oberčkal, J.; Mohar Lorbeg, P.; Paveljšek, D.; Skale, N.; Kolenc, B.; Zupančič, J.M. Characterisation of Lactoferrin Isolated from Acid Whey Using Pilot-Scale Monolithic Ion-Exchange Chromatography. *Processes* **2020**, *8*, 804. [CrossRef]
52. Brodziak, A.; Król, J.; Litwińczuk, Z.; Zaborska, A.; Czernecki, T. Effect of storage time under home refrigeration conditions on the quality of opened drinking milk. *Mjekarstvo* **2017**, *67*, 283–296. [CrossRef]
53. De Brabandere, A.G.; De Baerdemaeker, J.G. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *J. Food Eng.* **1999**, *41*, 221–227. [CrossRef]
54. Amadarshanie, D.B.T.; Gunathilaka, T.L.; Silva, R.M.; Navaratne, S.B.; Peiris, L.D.C. Functional and antiglycation properties of cow milk set yogurt enriched with *Nyctanthes arbor-tristis* L. flower extract. *LWT* **2022**, *154*, 112910. [CrossRef]
55. Tamime, A.Y.; Deeth, H.C. Yogurt: Technology and biochemistry. *J. Food Prot.* **1980**, *43*, 939–977. [CrossRef]
56. Arslaner, A.; Salik, M.A.; Bakirci, I. The effects of adding *Hibiscus sabdariffa* L. flowers marmalade on some quality properties, mineral content and antioxidant activities of yogurt. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *58*, 223–233. [CrossRef]
57. Zakaria, A.; Abdelhsee, E.; Fadi, S.; Ombarak, R. The Impact of Lactoferrin Fortification on the Health Benefits and Sensory Properties of Yogurt. *J. Curr. Vet. Res.* **2020**, *2*, 105–112. [CrossRef]
58. European Union Law. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. 2005. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073> (accessed on 7 March 2022).
59. Kycia, K.; Krysiński, C. Microbiological and hygienic quality of commercial goat milk yoghurts in context of their therapeutic properties. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2014**, *95*, 186–191.
60. Codex Stan 243-2003. Codex Standard for Fermented Milks. Adopted in 2003. Revision 2008, 2010. Available online: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf (accessed on 21 September 2022).
61. Kim, W.-S.; Ohashi, M.; Tanaka, T.; Kumura, H.; Kim, G.-Y.; Kwon, I.-K.; Goh, J.-S.; Shimazaki, K.-I. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals* **2004**, *17*, 279–283. [CrossRef]
62. Steijns, J.M.; van Hooijdonk, A.C.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lac-toferrin. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 11–17. [CrossRef] [PubMed]
63. Mudgil, P.; Jumah, B.; Ahmad, M.; Hamed, F.; Maqsood, S. Rheological, micro-structural and sensorial properties of camel milk yogurt as influenced by gelatin. *LWT* **2018**, *98*, 646–653. [CrossRef]
64. Dothańczuk-Śródka, A.; Nabrdalik, M.; Maślak, N.; Wasiewicz, N.; Ziembik, Z. The rheological properties of natural yoghurt. *PECO* **2015**, *9*, 193–200.
65. Nguyen, P.-T.; Nguyen, T.-T.; Bui, D.-C.; Hong, P.-T.; Hoang, Q.-K.; Nguyen, H.-T. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiol.* **2020**, *6*, 451–469. [CrossRef] [PubMed]

66. Sørensen, H.M.; Rochfort, K.D.; Maye, S.; MacLeod, G.; Brabazon, D.; Loscher, C.; Freeland, B. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients* **2022**, *14*, 2938. [\[CrossRef\]](#)
67. Hassan, A.N.; Ipsen, R.; Janzen, T.; Qvist, K.B. Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 1632–1638. [\[CrossRef\]](#)
68. Nishinari, K.; Takemasa, M.; Brenner, T.; Su, L.; Fang, Y.; Hirashima, M.; Yoshimura, M.; Nitta, Y.; Moritaka, H.; Tomczynska-Mleko, M.; et al. The Food Colloid Principle in the Design of Elderly Food. *J. Texture Stud.* **2016**, *47*, 284–312. [\[CrossRef\]](#)
69. Moschopoulou, E.; Sakkas, I.; Zoidou, E.; Theodorou, G.; Sgouridou, E.; Kalathaki, C.; Liarakou, A.; Chatzigeorgiou, A.; Politis, I.; Moatsou, G. Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. *Int. Dairy J.* **2018**, *77*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
70. Domagala, J.; Wszolek, M.; Tamime, A.Y.; Kupiec-Teahan, B. The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Rum. Res.* **2013**, *112*, 154–161. [\[CrossRef\]](#)
71. Pawlos, M.; Znamirowska, A.; Kalicka, D.; Szajnar, K. Effect of storage time and type of vaccine on the texture and sensory quality of yoghurts obtained by the thermostatic method. In *Properties of Products and Food Raw Materials*; Tarko, T., Duda-Chodak, A., Witczak, M., Najgebauer-Lejko, M., Eds.; Małopolska Branch of the Polish Society of Food Technologists: Krakow, Poland, 2014; Volume I, pp. 15–25.
72. Bierzuniska, P.; Cais-Sokolińska, D.; Yigit, A. Storage Stability of Texture and Sensory Properties of Yogurt with the Addition of Polymerized Whey Proteins. *Foods* **2019**, *8*, 548. [\[CrossRef\]](#)
73. Das, A.; Seth, R. Chemical compositional analysis and physical attributes of curd fortified with bovine colostrum whey powder. *Int. J. Chem. Stud.* **2017**, *5*, 334–338.
74. Ayar, A.; Sicramaz, H.; Cetin, I. The effect of bovine colostrum on the lactic flora of yoghurt and kefir. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* **2016**, *3*, 1063–1074.
75. Gürbüz, Z.; Erkaya-Kotan, T.; Sengül, M. Evaluation of physicochemical, microbiological, texture and microstructure characteristics of set-style yoghurt supplemented with quince seed mucilage powder as a novel natural stabiliser. *Int. Dairy J.* **2021**, *114*, 104938. [\[CrossRef\]](#)
76. Olkowski, M.A.; Pluta, A.; Berthold-Pluta, A.; Wiska, J. Water activity of dairy products. Part I. *Food Ind.* **2012**, *66*, 31–34.
77. Godlewska, K. Additives: How to determine the best-before date for milk and milk products. *Forum Mlecz. Biot.* **2012**, *15*, 1–3.
78. Lee, W.J.; Lucey, J.A. Formation and physical properties of yoghurt. *Asian Australas J. Anim. Sci.* **2010**, *23*, 1127–1136. [\[CrossRef\]](#)
79. Akalin, A.S.; Unal, G.; Dinkci, N.; Hayaloglu, A.A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 3617–3628. [\[CrossRef\]](#)
80. Kozioł, J.; Gustaw, W.; Waśko, A.; Skrzypczak, K.; Sławińska, A.; Sołowiej, B. Effect of selected milk protein preparations on growth and survival of *Lactobacillus acidophilus* as well as on rheological properties of fermented milk beverages. *Food Sci. Technol. Qual.* **2014**, *20*, 41–55. [\[CrossRef\]](#)
81. Ning, X.; Luo, Z.; Chen, Z.; Zhou, C.; Xie, C.; Du, W.; Wang, L. Fortification of set yogurt with passion fruit juice: Effects on fermentation kinetics, physicochemical properties, and functionality. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 4084–4093. [\[CrossRef\]](#)
82. Dimitrellou, D.; Solomakou, N.; Kokkinomagoulos, E.; Kandyli, P. Yogurts Supplemented with Juices from Grapes and Berries. *Foods* **2020**, *9*, 1158. [\[CrossRef\]](#)
83. Zielińska, D.; Marciniak-Lukasiak, K.; Karbowski, M.; Lukasiak, P. Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel *Lactobacillus* Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products. *Molecules* **2021**, *26*, 3730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Znamirowska, A.; Buniowska, M.; Rożek, P.; Kalicka, D.; Pawlos, M. Evaluation of the quality of thermostatic yoghurts with spelt fibre and inulin. *Nauka Przyroda Technol.* **2018**, *12*, 103–112.
85. Khalil, O.S.F.; Ismail, H.A.; Elkot, W.E. Physicochemical, functional and sensory properties of probiotic yoghurt flavored with white sapote fruit (*Casimiroa edulis*). *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 3700–3710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Pires, T.C.; Dias, M.I.; Barros, L.; Barreira, J.C.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C. Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts. *LWT* **2018**, *97*, 668–675. [\[CrossRef\]](#)
87. Cais-Sokolińska, D.; Pikul, J. Use of colour measurement to evaluate yoghurt quality during storage. *Ital. J. Food Sci.* **2006**, *18*, 63–71.
88. Routray, W.; Mishra, H.N. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 208–220. [\[CrossRef\]](#)
89. Saad, M.A.; Ombark, R.A.; Abd Rabou, H.S. Effect of nisin and lysozyme on bacteriological and sensorial quality of pasteurized milk. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2019**, *6*, 403–408. [\[CrossRef\]](#)
90. Nottagh, S.; Hesari, J.; Peighambaroust, S.H.; Rezaei-Mokarram, R.; Jafarizadeh-Malmiri, H. Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia* **2020**, *75*, 605–611. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

66. Sørensen, H.M.; Rochfort, K.D.; Maye, S.; MacLeod, G.; Brabazon, D.; Loscher, C.; Freeland, B. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients* **2022**, *14*, 2938. [\[CrossRef\]](#)
67. Hassan, A.N.; Ipsen, R.; Janzen, T.; Qvist, K.B. Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 1632–1638. [\[CrossRef\]](#)
68. Nishinari, K.; Takemasa, M.; Brenner, T.; Su, L.; Fang, Y.; Hirashima, M.; Yoshimura, M.; Nitta, Y.; Moritaka, H.; Tomczynska-Mleko, M.; et al. The Food Colloid Principle in the Design of Elderly Food. *J. Texture Stud.* **2016**, *47*, 284–312. [\[CrossRef\]](#)
69. Moschopoulou, E.; Sakkas, L.; Zoidou, E.; Theodorou, G.; Sgouridou, E.; Kalathaki, C.; Liarakou, A.; Chatzigeorgiou, A.; Politis, I.; Moatsou, G. Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. *Int. Dairy J.* **2018**, *77*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
70. Domagala, J.; Wszolek, M.; Tamime, A.Y.; Kupiec-Teahan, B. The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Rumin. Res.* **2013**, *112*, 154–161. [\[CrossRef\]](#)
71. Pawlos, M.; Znamirowska, A.; Kalicka, D.; Szajnar, K. Effect of storage time and type of vaccine on the texture and sensory quality of yoghurts obtained by the thermostatic method. In *Properties of Products and Food Raw Materials*; Tarko, T., Duda-Chodak, A., Witezak, M., Najgebauer-Lejko, M., Eds.; Matopolska Branch of the Polish Society of Food Technologists: Krakow, Poland, 2014; Volume I, pp. 15–25.
72. Bierzuńska, P.; Cais-Sokolinska, D.; Yiğit, A. Storage Stability of Texture and Sensory Properties of Yogurt with the Addition of Polymerized Whey Proteins. *Foods* **2019**, *8*, 548. [\[CrossRef\]](#)
73. Das, A.; Seth, R. Chemical compositional analysis and physical attributes of curd fortified with bovine colostrum whey powder. *Int. J. Chem. Stud.* **2017**, *5*, 334–338.
74. Ayar, A.; Sicramaz, H.; Cetin, I. The effect of bovine colostrum on the lactic flora of yoghurt and kefir. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* **2016**, *3*, 1063–1074.
75. Gürbüz, Z.; Erkaya-Kotan, T.; Sengül, M. Evaluation of physicochemical, microbiological, texture and microstructure characteristics of set-style yoghurt supplemented with quince seed mucilage powder as a novel natural stabiliser. *Int. Dairy J.* **2021**, *114*, 104938. [\[CrossRef\]](#)
76. Olkowski, M.A.; Pluta, A.; Berthold-Pluta, A.; Wiska, J. Water activity of dairy products. Part I. *Food Ind.* **2012**, *66*, 31–34.
77. Godlewska, K. Additives: How to determine the best-before date for milk and milk products. *Forum Mlecz. Biot.* **2012**, *15*, 1–3.
78. Lee, W.J.; Lucey, J.A. Formation and physical properties of yoghurt. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2010**, *23*, 1127–1136. [\[CrossRef\]](#)
79. Akalin, A.S.; Unal, G.; Dinkci, N.; Hayaloglu, A.A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 3617–3628. [\[CrossRef\]](#)
80. Koziol, J.; Gustaw, W.; Waśko, A.; Skrzypczak, K.; Sławińska, A.; Sotowiej, B. Effect of selected milk protein preparations on growth and survival of *Lactobacillus acidophilus* as well as on rheological properties of fermented milk beverages. *Food Sci. Technol. Qual.* **2014**, *20*, 41–55. [\[CrossRef\]](#)
81. Ning, X.; Luo, Z.; Chen, Z.; Zhou, C.; Xie, C.; Du, W.; Wang, I. Fortification of set yogurt with passion fruit juice: Effects on fermentation kinetics, physicochemical properties, and functionality. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 4084–4093. [\[CrossRef\]](#)
82. Dimitrellou, D.; Solomakou, N.; Kokkinomagoulos, E.; Kandyli, P. Yogurts Supplemented with Juices from Grapes and Berries. *Foods* **2020**, *9*, 1158. [\[CrossRef\]](#)
83. Zielińska, D.; Marciniak-Lukasiak, K.; Karbowski, M.; Lukasiak, P. Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel *Lactobacillus* Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products. *Molecules* **2021**, *26*, 5730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Znamirowska, A.; Buniowska, M.; Rożek, P.; Kalicka, D.; Pawlos, M. Evaluation of the quality of the mostatic yoghurts with spelt fibre and inulin. *Nauka Przyroda Technol.* **2018**, *12*, 103–112.
85. Khafil, O.S.F.; Ismail, H.A.; Elkot, W.E. Physicochemical, functional and sensory properties of probiotic yoghurt flavored with white sapote fruit (*Casimiroa edulis*). *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 3700–3710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Pires, T.C.; Dias, M.L.; Barros, L.; Barreira, J.C.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C. Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts. *LWT* **2018**, *97*, 668–675. [\[CrossRef\]](#)
87. Cais-Sokolinska, D.; Pikul, J. Use of colour measurement to evaluate yoghurt quality during storage. *Ital. J. Food Sci.* **2006**, *18*, 63–71.
88. Routray, W.; Mishra, H.N. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 208–220. [\[CrossRef\]](#)
89. Saad, M.A.; Ombarak, R.A.; Abd Rabou, H.S. Effect of nisin and lysozyme on bacteriological and sensorial quality of pasteurized milk. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2019**, *6*, 403–408. [\[CrossRef\]](#)
90. Nottagh, S.; Hesari, J.; Peighambaroust, S.H.; Rezaei-Mokarram, R.; Jafarizadeh-Malmiri, H. Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia* **2020**, *75*, 605–611. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Gene–Diet Interactions: Viability of Lactoferrin-Fortified Yoghurt as an Element of Diet Therapy in Patients Predisposed to Overweight and Obesity

Anna Jańczuk-Grabowska ¹, Tomasz Czerniecki ^{2,*} and Aneta Brodziak ^{1,*}

- ¹ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; annajanczuk44@gmail.com
- ² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, 20-704 Lublin, Poland
- * Correspondence: tomasz.czerniecki@up.lublin.pl (T.C.); aneta.brodziak@up.lublin.pl (A.B.); Tel.: +48-814-623-365 (T.C.)



Citation: Jańczuk-Grabowska, A.; Czerniecki, T.; Brodziak, A. Gene–Diet Interactions: Viability of Lactoferrin-Fortified Yoghurt as an Element of Diet Therapy in Patients Predisposed to Overweight and Obesity. *Foods* 2023, 12, 2929. <https://doi.org/10.3390/foods12152929>

Academic Editors: Choon Young Kim and Bonggi Lee

Received: 2 July 2023

Revised: 27 July 2023

Accepted: 31 July 2023

Published: 2 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Given the availability of molecular tools, population studies increasingly include the gene–diet interactions in their considerations. The use of these interactions allows for the obtaining of more uniform research groups. In practice, this translates into the possibility of reducing the size of the research group while maintaining the precision of the research. The research results obtained in this way can be used to select certain ingredients and foods in a dietary intervention with a higher degree of personalisation. In both prophylaxis and dietary therapy of overweight and obesity, the proper selection of bioactive ingredients best suited to the given group of consumers is of key importance. Hence, the aim of the presented study was to assess the effectiveness of a dietary intervention with the use of lactoferrin (LF)-fortified yoghurt, in terms of the ability to regulate body weight and carbohydrate metabolism in individuals whose genomes contained single nucleotide polymorphisms that predisposed them to increased accumulation of fatty tissue and consequently overweight or obesity. A group of 137 participants (98 women and 37 men) of Polish origin were screened for the presence of four single nucleotide polymorphisms (*rs993960*—*FTO* gene, *rs7903146*—*TCF7L2* gene, *rs10830963*—*MTNR1B* gene, and *rs1121980*—*FTO* gene). Subsequently, a group of 19 participants diagnosed with the presence of risk factors within said SNPs underwent a 21-day dietary intervention (crossover study) with the use of yoghurt fortified with lactoferrin (200 mg/day). The results of the study revealed a genetic difference between the Polish population and the European average, in terms of the SNPs analysed. The dietary intervention showed a statistically significantly higher efficiency in terms of body mass reduction ($p = 0.000$) and lowering the glycated haemoglobin ratio (HbA1c) ($p = 0.000$) when consuming specially prepared yoghurt containing lactoferrin, as compared to results registered for unfortified yoghurt. Given the above, yoghurt fortified with LF should be considered as a viable element of diet therapy in overweight and obese patients diagnosed with risk factors within the analysed polymorphisms.

Keywords: lactoferrin; bioactive potential; nutrigenomics; nutrigenetics; obesity; overweight; carbohydrate metabolism disorders; personalised nutrition; functional yoghurt

1. Introduction

Currently, obesity has become one of the most common health problems in the world [1]. The incidence of obesity tripled in the period from 1976 to 2016. In 2016, it was estimated that as many as 13% of the adult population were obese and 39% of adults (over the age of 18) were overweight [2].

Obesity is a multi-factorial condition. Its emergence results from a number of factors including excessive calory intake and lack of movement, as well as genetic factors. Some polymorphisms in the *FTO* gene (fat mass- and obesity-associated) have been strongly

associated with elevated BMI [3] and type 2 diabetes [4]. The gene is located in chromosome 16 and encodes the alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme [5]. It plays a major role in the accumulation of adipose tissue as the enzyme it encodes contributes to the mechanisms of thermogenesis, energy homeostasis, adipocyte differentiation, and metabolic rate [6,7]. The A allele single nucleotide polymorphism rs9939609 located in FTO gene is strongly associated with the accumulation of fatty tissue because it participates in the demethylation of N6-methyladenosine ghrelin. The process impacts the levels of ghrelin and acyl-ghrelin by inducing increased food consumption [8]. The risk of obesity in carriers of two risk alleles (AA) is elevated by between 20 and 30% [9]. It has been evidenced that single nucleotide polymorphism (SNP) rs1121980 in the FTO gene is also related to an increased risk of class II (BMI 35.0–39.9 kg/m²) and III (BMI ≥ 40.0 kg/m²) obesity in women in the Mexican population [10]. In the Korean population, individuals with BMI ≥ 25 who were carriers of the T allele were found to have a particular preference for consuming fatty foods, i.e., fish, coffee cream, candy, and snacks [11]. In the Slovak population, the CC variant of the polymorphism rs1121980 has a protective effect against obesity compared to the TT variant. The most common variant of the polymorphism in the Slovak population is the CT variant found in 40.5% of people, and the rarest CC variant is present in 29.1% of people [12].

Another single nucleotide polymorphism associated with overweight and obesity is rs7903146, located in TCF7L2 (gene encoding the TCF7L transcription factor). TCF7L2 influences the expression of the proglucagon gene regulating blood glucose homeostasis. The presence of the T allele is associated with an increased risk of non-alcoholic lipid infiltration, type 2 diabetes, glucose tolerance disorders, and hepatic β-cell dysfunction and can also contribute to insulin resistance [13–16]. Body mass reduction usually improves glucose metabolism in obese children. However, in the 2008 study by Reinehr et al. [14], a negative effect in terms of insulin resistance and insulin sensitivity was observed in children with the T allele in polymorphism rs7903146.

Polymorphism of a single nucleotide (SNP), rs10830963, in the melatonin receptor 1 gene (MTNR1B) may be involved in body mass homeostasis. The G allele is associated with an increased risk of diabetes, gestational diabetes, and obesity [17,18]. Studies indicate that SNP rs10830963 is demonstrably linked to body weight loss as well as secondary insulin-level changes in persons receiving a hypocaloric diet [18,19]. Male participants with CG/GC genotypes in polymorphism rs10830963 showed lesser body weight loss as compared to participants with the CC genotype. In female carriers of the G allele, higher consumption of total protein and animal protein led to lower weight loss [19]. Similarly, in a 2020 study by De Luis et al. [16], individuals with a single G allele receiving a low-calorie, high-protein diet showed worse overall improvement in terms of the analysed parameters, i.e., total cholesterol, LDL cholesterol, insulin, triglycerides, and HOMA IR, as compared to individuals with CC genotype in rs10830963.

The research results cited above confirm that individuals whose genotypes include risk alleles within the single nucleotide polymorphisms rs9939609, rs1121980, rs7903146, and rs10830963 are more susceptible to obesity and carbohydrate metabolism disorders due to specific metabolic pathway biomechanisms. For this reason, it is important to identify the bioactive substances whose inclusion in staple diet, already from a young age, will have confirmed preventive effects in terms of the emergence and exacerbation of negative changes in the organism. At the same time, the effectiveness of said bioactive components ought to be verified in a group of participants diagnosed with the relevant genetic factors to ensure that the bioactive ingredient will indeed be effective in the given group of patients. As follows from the preliminary studies conducted, lactoferrin may prove to be one such ingredient.

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein with anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, and immunity-boosting properties [20]. Lactoferrin supplementation may also be helpful in facilitating the treatment of overweight and obesity. It has been evidenced that lactoferrin has a positive impact on the reduction of visceral fat and triglyc-

erides [21]. Xiong et al. [1] demonstrated that the administration of 100 mg of bovine lactoferrin (bLF)/per day for 15 weeks to mice suffering from obesity induced with a high-fat diet facilitated a reduction in body weight gain and visceral obesity, as well as serum levels of lipids, leptin, and glucose. A similar model was analysed in 2016 by Sun et al. [20] who also administered 100 mg bLF to mice with high-fat diet-induced obesity for 12 weeks. They reported a reduction of inflammation, regulation of glucose levels, and modulation of the intestinal microbiota composition, including an increase in *Bifidobacterium* spp. counts and inhibition of *Enterobacteriales* growth [22]. In mice receiving water containing 2% of lactoferrin, researchers observed a significant decrease in visceral fat levels, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, and glucose. Additionally, certain effects in terms of intestinal microbiota regulation were also reported [20]. The cited reports corroborate the relevance of the undertaken research. As such, the aim of our study was to assess the effectiveness of supplementation with LF-fortified yoghurt in terms of weight regulation and carbohydrate metabolism improvement in participants whose genomes contained single nucleotide polymorphisms that predisposed them to excessive fatty tissue accumulation and consequently overweight or obesity.

2. Materials and Methods

2.1. The Studied Population

The studied population was composed of male and female participants from various regions of Poland. Genotyping screenings were conducted in 135 individuals, 98 women and 37 men. Participants qualified for the subsequent analyses were exclusively individuals with a risk allele in 3 of 4 polymorphisms measured, with preference for individuals with the highest number of risk alleles rs9939609 (AA/AT), rs7903146 (TT/CT), rs10830963 (CC/CG), and rs1121980 (AA/AG), who had a body mass index (BMI) above 25 kg/m² or a weight to height ratio (WHtR) of 49 or more and who consented to taking part in the study. The study involving dietary intervention was designed in a crossover study design (ARBA) in which 19 participants were included, including 11 women and 8 men. Group A (the control group) had a dietary intervention with placebo for 7 days, and group B (the study group with lactoferrin—LF) obtained a dietary intervention with LF for 21 days. Then, in group A, after 7 days, a dietary intervention with lactoferrin was introduced (the study group with LF), and it lasted for 21 days, whereas group B, after 21 days, had a dietary intervention with a placebo (the control group), and it lasted for 7 days. The intervention study lasted 21 days, and the control group with placebo lasted 7 days, after which time the groups were switched. There was no transition period between switching of the groups. The applied research arrangement allows for the verification of the effect of the dietary intervention with placebo, conducted as the first one, on the results obtained in the group with lactoferrin. The dietary intervention lasted 28 days.

The study was positively evaluated the Bioethics Committee at the Medical University of Lublin, Poland, and conducted in accordance with research approval no. KE-0254/276/2017 of 23 November 2017.

2.2. Dietary Intervention

The study participants received individually planned diets composed of 4 meals: breakfast, lunch, dinner, and supper. The calculations of basic metabolism were conducted using Mifflin's formula. The comprehensive metabolism (CPM) was calculated by factoring in the physical activity level (PAL). The protein demand in grams was calculated by multiplying the proper body weight (pbw) calculated from Lorentz's formula by 1.1 g of protein/kg pbw. The fat demand in grams was calculated by dividing 25% of the CPM by 9. The carbohydrate supply in grams was calculated by deducting the caloric value of proteins and fats from the CPM and dividing the result by 4. Each study participant was instructed on how to follow the menu and was obliged to register in their daily consumption journals any departure from the assigned diet. Throughout the period of the dietetic intervention, the participants received yoghurt produced as part of the experiment,

250 g daily, unfortified (placebo, control group) or fortified with lactoferrin dosed at 80 mg per 100 g (experimental group).

2.3. Genotyping

The DNA material was collected from the patients by swabbing from the inside of the cheek. The collected material contained epithelial cells and white blood cells, which are a good source of DNA. DNA samples were isolated using a Gene MATRIX Swab-Extract DNA purification Kit from EurX Polska (Gdańsk, Poland), in accordance with the procedure recommended by the manufacturer. The concentration and purity of the isolated DNA were evaluated with a DS-11 spectrophotometer from DeNovix (Wilmington, DE, USA), based on the absorption levels at the wavelengths of 260 nm and 280 nm. The quality of the isolated DNA was determined by way of electrophoresis in aerated gel (1%) and UV visualisation with a SimplySafe stain from EurX Polska (Gdańsk, Poland). The remaining portion of the DNA isolate was labelled and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further study.

The genotyping focused on four polymorphisms of a single nucleotide: rs9939609, rs7903146, rs10830963, and rs1121980. The polymerase chain reaction (PCR) was done with the use of a Biorad T-100 thermocycler (BioRad, CA, USA). The primer of the PCR reaction was designed with the use of Primer 3 software ver. 4.1.0 for each individual single nucleotide polymorphism. A total of 45 amplification cycles were performed. The amplification of the desired product was confirmed with electrophoresis in aerated gel (1.5%) and product visualisation in UV light using a SimplySafe stain from EurX Polska (Gdańsk, Poland).

Sanger sequencing of the obtained amplicons was conducted with a 3730 Genetic Analyzer capillary sequencer from Applied Biosystems (Waltham, MA, USA), using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit reagents from Applied Biosystems (Waltham, MA, USA).

Blind testing as well as positive and negative controls were used in the laboratory. The result was read independently by 2 people and entered into the laboratory system. If both readings were identical, the system approved the analysis result.

2.4. Yoghurt Fortified with Lactoferrin

The yoghurt was produced from cow milk at one of the small dairy processing plants operating in the Lublin Voivodeship. The exact production process was described by Jańczuk et al. [23]. The yoghurt was distributed to study participants immediately directly from production, using adequate cold-chain methods.

2.5. Anthropometric Measurements

Measurements of body circumference were conducted in the upright position using a Gulick anthropometric tape with 0.1 cm accuracy. During the measurements, the tape remained parallel to the floor, and the participants were instructed to stand with their feet spread out to chest width. Waist measurements were taken at the middle point between the lower edge of the costal arch and the top of the iliac crest, during a regular exhalation. The hip circumference was measured at the widest point and the thigh (maximum circumference) below the gluteal fold, in a balanced posture. Each measurement was repeated twice. If the results varied by more than 0.7 cm, a third measurement was taken.

The participants' height was measured in the upright position, standing straight with feet placed together, shoeless, from the floor to the anatomical top of the head—the vertex—making sure that the ear channel remained aligned with the cheek bone. The measurements were taken with an ADE MZ10038 stadiometer (Hamburg, Germany).

The measurements of body mass and adipose tissue were conducted with a Tanita MC 780 MA body composition monitor. Patients were weighed wearing only light clothes, shoeless, with mass distributed evenly across both feet.

Body mass index (BMI) was calculated as body weight in kg divided by the square of the body height in meters (kg/m^2). The following interpretation criteria were adopted:

18.50–24.99—correct weight, 25.00–29.90—overweight, 30.00–34.99—1st degree obesity, and 35.00–39.99—2nd degree obesity.

The WHR (waist-to-height ratio) was calculated as the ratio of waist circumference to height (both in cm) multiplied by 100. The following interpretation criteria were adopted: to 35.00 malnutrition, 35.01–42.00—underweight, 42.01–46.00—slight underweight, 46.01–54.00—overweight, 54.01–58.00—severe overweight, and above 58.00—obesity.

2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with the use of Statistica ver. 13.1 (StatSoft Inc., Dell, Round Rock, TX, USA). The normal distribution of the results was verified with the Shapiro–Wilk test. As the test indicated lack of normal distribution of the results, which may have been due to the uniformity of the group resulting from the restrictive inclusion criteria, the statistical analysis was conducted using nonparametric tests, e.g., chi-squared, Wilcoxon, and Kruskal–Wallis tests and regression analyses. Results within the confidence interval of 95.0% at $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Screening Genotyping

Figures 1–4 present the results of the genotype screening conducted in the group of 135 participants from Poland, 98 women and 37 men. The data were compared to the distribution of polymorphisms in the European population using the 1000 Genomes database [24]. Figure 1 presents the distribution for SNP rs9939609. In our study, AA homozygotes represented as much as 32.6% of the population, while in the 1000 Genomes database the same was only 19.9%. The results in terms of AT heterozygotes were roughly consistent with the reference data—41.5% in the studied population compared to 42.9% in the database. TT homozygotes not carrying the risk variant represented only 25.9% in our study, as compared to 37.2% in the 1000 Genomes database [24].

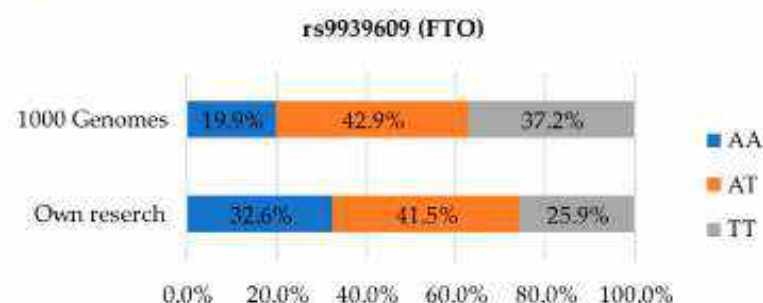


Figure 1. Distribution of genetic variants in SNP rs9939609 in the studied population compared to the European population.

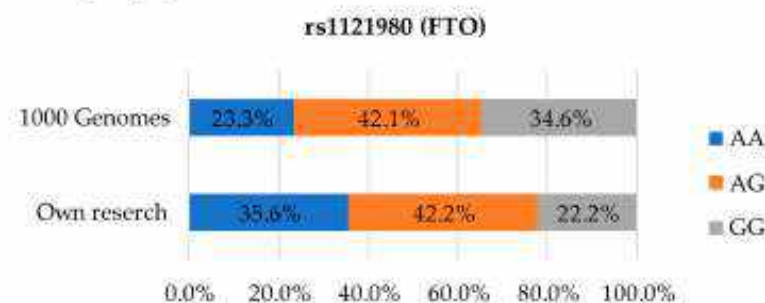


Figure 2. Distribution of genetic variants in SNP rs1121980 in the studied population compared to the European population.

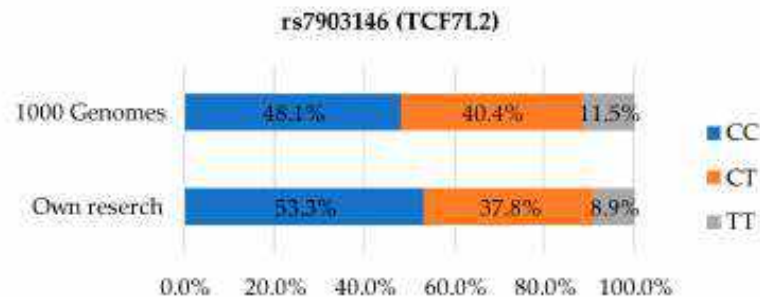


Figure 3. Distribution of genetic variants in SNP rs7903146 in the studied population compared to the European population.



Figure 4. Distribution of genetic variants in SNP rs10830963 in the studied population compared to the European population.

Figure 2 presents the distribution of SNP rs1121980 variants. Differences in terms of the distribution of the highest-risk variant AA were clearly evident: in our study as many as 35.6% of the participants carried the variant while the European average was only 23.3%. The result for AG heterozygotes was 42.2% in our study, as compared to 42.1% in the reference database. Differences were also evidenced in terms of the GG variant distribution which was calculated at 22.2% in the present study, as compared to 34.6% in the 1000 Genomes database [24].

Figure 3 presents the distribution of genetic variants in SNP rs7903146. The most common variant by far, both in our study and the 1000 Genomes database [24], present in 53.3% and 48.1% of the participants, respectively, was the CC variant associated with carbohydrate metabolism disorders. The second most common was the CT heterozygotic variant, identified in 37.8% participants in our study, as compared to 40.4% in the 1000 Genomes database [24]. TT heterozygotes carrying two risk alleles were found in only 8.9% cases in our study relative to 11.5% in the reference data.

The distribution for the last SNP rs9939609, analysed in the screening test, is presented on Figure 4. The CC variant was slightly more common in the analysed population (51.1%) than in the 1000 Genomes database (50.3%) [24]. Greater differences in the distribution of genetic variants could be observed for the CG heterozygotic variant, present in 34.1% of the cases in our study and 41.7% of the cases in the reference data. The highest-risk factor, GG, was the least common in both datasets, corresponding to 14.8% on our study and 8.0% in the 1000 Genomes data [24].

3.2. Phenotypic Characteristics of the Study Participants

The study was conducted in a group of 19 participants, 11 women and 8 men. Table 1 presents the initial parameters measured in the study population. The mean age of the women was 35 years and of the men was 38.8 years. The mean body weight was statistically significantly ($p = 0.009$) lower in women as compared to men (88.7 kg) and averaged

at 79.8 kg. The mean waist circumference was 96.3 cm in women and 101.8 cm in men ($p = 0.032$). The men and the women taking part in the study had very similar hip circumference parameters, respectively, 107.3 cm for women and 107.3 cm for men, as well as a nearly identical WHtR: women—58.5 and men—58.7, initial HbA1c value: women—5.8 and men—5.8, and BMI: women—29.4 kg/m² and men—29.5 kg/m². The mean thigh circumference was higher in women 59.1 cm as compared to men—58.4 cm. A significant ($p = 0.001$) difference between the two groups was observed in terms of fatty tissue %, which was 37.3% in women and 28.5% in men.

Table 1. Characteristics of the study participants ($x \pm SD$).

Parameters	Women	Men	<i>p</i> -Value
Age (years)	35.0 ± 5.2	38.8 ± 7.3	0.536
Height (cm)	164.0 ± 3.9	173.3 ± 4.0	0.001
Weight (kg)	79.8 ± 5.4	88.7 ± 6.8	0.009
Waist (cm)	96.3 ± 3.9	101.8 ± 4.5	0.032
Hips (cm)	107.3 ± 4.8	107.3 ± 3.6	0.967
Thigh (cm)	59.1 ± 2.6	58.4 ± 1.5	0.563
Body fat content (%)	37.3 ± 2.0	28.5 ± 2.3	0.001
BMI (kg/m ²)	29.4 ± 1.5	29.5 ± 1.5	0.901
WHtR	58.5 ± 2.3	58.7 ± 2.2	0.869
HbA1c (%)	5.8 ± 0.4	5.8 ± 4.4	0.710

3.3. Genotypic Characteristics of the Study Participants

Table 2 presents a breakdown of genetic variants identified in the research participants. Four polymorphisms of a single nucleotide closely related to overweight and obesity, rs9939609, rs7903146, rs10830963, and rs1121980, were selected for the analysis. All the participants were characterised by the presence of at least one risk-factor allele—A in rs9939609, which has been linked to the risk of obesity, elevated BMI, and type II diabetes. Homozygotes AA constituted 84.21%, and heterozygotes AT constituted 15.79%. Allele A present in rs1121980 is a risk-factor allele linked to obesity and increased consumption of high-fat foods. All members of the study group showed the presence of at least a single risk-factor allele A, with 68.42% of the same carrying the AA variant and 31.51% carrying the AG variant. In the case of rs7903146, a polymorphism located in the TCF7L2 gene associated with blood glucose homeostasis, as many as 78.95% of the participants were carriers of the high-risk TT variant, while 21.05% carried the CT variant. The lowest percentage of the research participants carried at least a single G risk allele in rs10830963 linked to type I diabetes and obesity—42.11%—with GG homozygotes identified only in 10.53% and CG heterozygotes identified in 31.58%.

3.4. Effect of Consumption of Yoghurt with Lactoferrin on Body Weight

Figure 5 presents the body weight loss in the study participants. After 21 days, a statistically significant improvement in body mass parameters was observed. Under the 7d/21d regimen, the body weight decreased by 1.26 kg in men and 1.15 kg in women, as compared to only 0.06 kg in men and 0.07 kg in women in the control group. The size of the body weight reduction between men and women was statistically insignificant ($p > 0.05$). The size of weight reduction observed between the control group and the study group with LF was significant at the level $p = 0.000$. Under the 21d/7d regimen, the study group revealed very similar results in terms of body weight reduction to those registered for the 7d/21d regimen, men—1.07 kg and women—1.10 kg. The corresponding weight loss observed in the control group was 0.18 kg in men and 0.07 kg in women. No statistically significant ($p > 0.05$) differences were observed between the 21d/7d and 7d/21d experimental regimens. This suggests that the consumption of lactoferrin-free yoghurt had no impact on the participants' body weight.

Table 2. Distribution of the risk variant predisposing to obesity and carbohydrate metabolism disorders in the population (%).

Gene	SNP	Genetic Variant *	Women	Men	Population
FTO	rs9939609	AA	100.00	62.50	84.21
		AT	0.00	37.50	15.79
		TT	0.00	0.00	0.00
FTO	rs1121980	AA	81.82	50.00	68.42
		AG	18.18	50.00	31.58
		GG	0.00	0.00	0.00
TCF7LN	rs7903146	TT	72.73	87.50	78.95
		CT	27.27	12.50	21.05
		CC	0.00	0.00	0.00
MTNR1B	rs10830963	CG	0.00	25.00	10.53
		CG	18.18	50.00	31.58
		CC	81.82	25.00	57.89

* rs9939609—A (risk allele), rs1121980—A (risk allele), rs7903146—T (risk allele), rs10830963—G (risk allele).

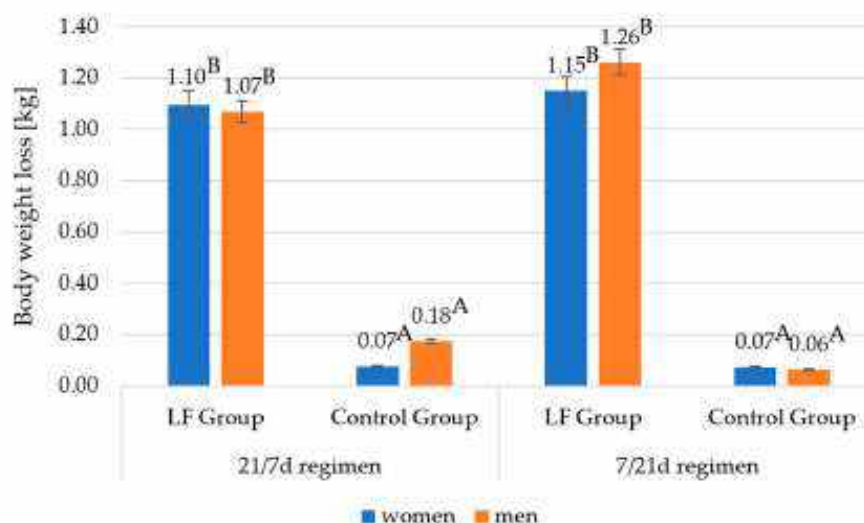


Figure 5. Body weight loss of study participants in the 21/7 day and 7/21 day regimen. A, B—differences between the research groups within the sex; A, B—significant differences at $p \leq 0.01$.

3.5. Effect of Consumption of Yoghurt with Lactoferrin on the Concentration of Glycated Haemoglobin (HbA1c)

Figure 6 illustrates the % changes of HbA1c levels. Under the 21/7 experimental regimen, a reduction of the HbA1c levels was observed—0.17% in men and 0.18% in women. The corresponding values for the control group were 0.02% in men and 0.01% in women. Similar to the results in terms of body mass reduction, the differences in % HbA1c reduction between the 7/21 and 21/7 experimental regimens were negligible and not statistically significant. The % HbA1c reduction observed was 0.21% in men and 0.17% in women. The corresponding value in the control group was 0.01% in both male and female participants.

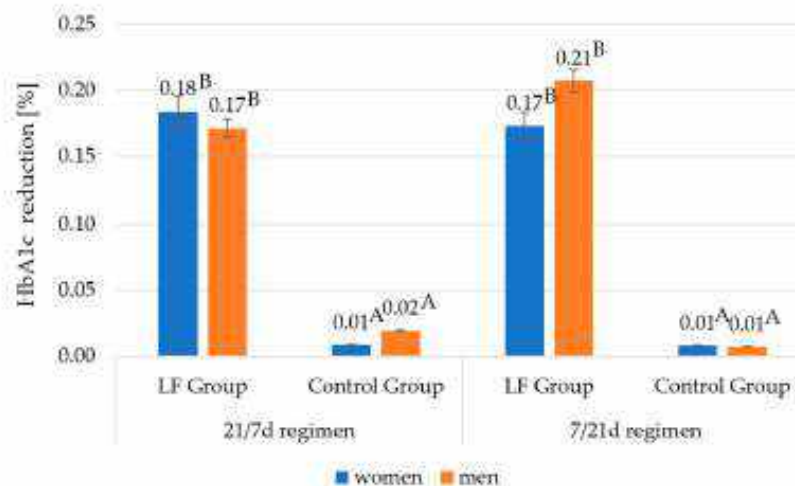


Figure 6. Reduction of the concentration of HbA1c of study participants in the 21/7 day and 7/21 day regimen. A, B—differences between the research groups within the sex; A, B—significant differences at $p < 0.01$.

4. Discussion

The results of the analysis indicate that consumption of yoghurt containing 80 mg/100 g bLF dosed at 250 g daily, in a population characterised by the presence of polymorphisms conducive to obesity and carbohydrate metabolism disorders, may facilitate weight loss and better regulation of the HbA1c level. Over the course of the 3-week experiment, the study participants lost more weight than the control group of participants, specifically 1.03 and 0.89 kg more for women and men, respectively, under the 21/7 regimen, and 1.08 kg and 1.20 kg more for women and men, respectively, under the 7/21 regimen.

The obtained results in terms of body mass reduction are consistent with those reported by other researchers. Hassan et al. [23] evidenced, in an animal model, that the consumption for 45 days of yoghurt containing LF, dosed at 50 and 100 mg per kg of body mass, reduced weight gain in mice. Similarly, in a study by Ono et al. [24] conducted on a human model, it was demonstrated that the consumption of bLF may reduce obesity in overweight participants without reducing the calorie intake. The effects of LF supplementation in terms of body mass reduction have also been corroborated in other scientific reports, but unfortunately, at the moment there are few studies in which the vehicle for LF was yoghurt. In most studies, LF was administered as an aqueous solution or oral supplementation [1,20,21]. For example, in a study by Li and Ma [18], mice on a high-fat diet were watered with drinking water containing 2% LF for 12 weeks. After this period, a reduction in visceral fat levels was noted with $p < 0.05$. In a study by Xiong et al. [1], mice fed a high-fat diet receiving 100 mg bLF/kg b.w. for 15 weeks showed significantly lower weight gain and visceral fat reduction. The positive effects of LF supplementation on fat reduction were also seen in the shorter supplementation period of 4 weeks, which is only one week longer than in our study. Morishita et al. [19] confirmed that administration of 100 mg of bLF to mice for a period of 4 weeks reduces mesenteric adipose tissue $p < 0.05$.

The weight loss results observed in the experimental group may have been influenced by factors other than the LF supplementation itself or the form thereof. Yoghurt is known to have certain unique properties that may be beneficial to health and conducive to reducing calorie intake and regulating glycaemia [25]. The results reported by Madjd et al. [26] suggest that introducing low-fat yoghurt to the diet at 400 g per day for 12 weeks in overweight and obese women of the I (BMI 30.0–34.9 kg/m²) and II (BMI 35.0–39.9 kg/m²) degrees may trigger weight loss of up to 5.03 kg. In addition, a 4.8 cm decrease in waist circumference was noted.

The HbA1c levels registered for the own study participants decreased by between 0.18 and 0.21%, depending on the group experimental regimen, under the 21/7 experimental regimen 0.17% in men and 0.18% in women, and for the 7d/21d regimen 0.21% men and 0.17% women. The positive effect of consuming yoghurt fortified with LF on carbohydrate metabolism was confirmed by Hassan et al. [23], although the specific value measured in that study was not HbA1c level but glucose concentration. Rats receiving 45 days of yoghurt fortified with 50 mg or 100 mg of LF per kg of body mass showed better results in terms of glucose level reduction as compared to the control group receiving a high-fat diet [26]. Similarly, in a study by Sun et al. [20], the administration of 100 mg/kg body mass bLF for 12 weeks significantly reduced blood glucose levels compared to mice that were only on a high-fat diet. Glucose levels were reduced to control values [22]. Other reports in which LF was not administered using yoghurt also noted positive effects on carbohydrate metabolism; e.g., in a study by Li and Ma [18], a 12-week watering of mice on a high-fat diet with 2% LF water resulted in a decrease in blood glucose levels with $p < 0.05$ [20]. In a study by Xiong et al. [1], feeding mice 100 mg of bLF for 15 weeks also reduced blood glucose levels.

The mechanism by which lactoferrin affects weight reduction and HbA1c remains unclear. However, there are scientific reports that describe the effect of lactoferrin on the weakening of adipogenesis in the context of modulation of (p172Thr) AMPK phosphorylation [27]. LF may also promote lipolysis by modulating the cAMP pathway and reducing perilipin expression [28].

The reduction of the HbA1c level after consuming the lactoferrin-fortified yoghurt for 3 weeks may also be due to the medium—yoghurt itself. As follows from the results reported by Madjd et al. [26], the consumption of low-fat yoghurt over a period of 12 weeks reduced the HbA1c level by 0.28% on average. The authors also observed benefits in terms of other parameters associated with carbohydrate metabolism, i.e., a reduction in plasma glucose by 0.24 mmol/L, insulin by 1.32 mU/mL, and HOMA-IR by 0.42.

One should bear in mind that the weight loss and HbA1c reduction results obtained in the present study may be less spectacular than those reported by other researchers cited above due to the specific genetic profile of the research participants, a much shorter study period, and the use of an animal model in the reports cited. Each participant was characterised by the presence of at least one risk allele in three of four SNP measurements (rs9939609, rs7903146, rs10830963, and rs1121980), which indicates a particular predisposition to obesity and carbohydrate metabolism disorders. The A allele at SNP rs9939609 contributes to increased food intake through its effect on the regulation of ghrelin and acyl ghrelin levels [5,9]. It has been proven that homozygotes at SNP rs9939609 have an increased risk of obesity by as much as 20–30% [9]. Carriers of at least one A allele at SNP rs1121980 are more prone to the occurrence of grade II (BMI 35.0–39.9 kg/m²) and III (BMI ≥ 40.0 kg/m²) obesity. Additionally, they are more likely to consume high-fat foods that contribute to excessive energy supply from the diet [10–12]. Also, the presence of the T allele at SNP rs7903146 is associated with the occurrence of carbohydrate disorders, i.e., lack of improvement in insulin sensitivity, and the G allele at SNP rs10830963 is associated with worse results in weight reduction while on a reduction diet [16,19]. Analysing the above reports, it seems reasonable to assume that the genetic profile presented by the study participants influenced not-so-high results in weight reduction and % HbA1c. However, it should be emphasised that the studies cited were mainly carried out with animals, i.e., mice and rats.

5. Conclusions

Due to individual metabolic differences resulting from, e.g., the presence of single nucleotide polymorphisms, the evaluation of nutrient bioactivity ought to be undertaken in as well-characterised consumer group as possible. Parameters such as height, age, or sex are not in themselves sufficient to fully determine metabolic characteristics, particularly in a situation of a prophylactic dietary intervention, i.e., in a case where no apparent

symptoms of disease are present. The results of the conducted study indicate a higher incidence of certain SNP polymorphisms in the Polish population as compared to the European average. The conducted 21-day dietary intervention using lactoferrin-fortified yoghurt administered to individuals with a specific genetic profile with regard to selected SNPs revealed that consumption of the product facilitated reduction of body mass and the levels of glycated haemoglobin (HbA1c). The obtained results suggest that the product may be used as a viable therapeutic component in diet therapy. It can be concluded that the consumption of LF-fortified yoghurt may also prove to have prophylactic benefits in individuals with specific genetic predispositions. However, the assessment of the exact prophylactic viability of specific foods requires further in-depth study, including in terms of establishing a uniform protocol for the evaluation of the prophylactic benefits of a given component or food product. The study showed the therapeutic effect of lactoferrin use in a group of people with excessive body weight with specific genetic predispositions resulting from the possessed risk alleles of single nucleotide polymorphisms (rs9939609, rs1121980, rs7903146, and rs10830963). For this reason, the therapeutic effectiveness of lactoferrin should be confirmed on groups with other genetic variants. In addition, in the future, the interactions and phenotypic effect that may result from other SNP polymorphisms not included in this study should be determined.

Author Contributions: Conceptualisation, A.J.-G., T.C. and A.B.; methodology, A.J.-G. and T.C.; validation, investigation, A.J.-G., T.C. and A.B.; formal analysis, A.J.-G. and T.C.; data curation, A.J.-G. and T.C.; resources, A.J.-G., T.C. and A.B.; writing—original draft preparation, A.J.-G.; writing—review and editing, A.J.-G., T.C. and A.B.; visualisation, A.J.-G.; supervision, T.C. and A.B.; final approval of the version to be published, T.C. and A.B.; project administration, T.C. and A.B.; funding acquisition, T.C. and A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number 0029/DW/2018 “Implementation Doctorate”).

Institutional Review Board Statement: The study was positively evaluated the Bioethics Committee at the Medical University of Lublin, Poland, and conducted in accordance with research approval no. KE-0254/276/2017 of 23 November 2017.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Xiong, L.; Ren, F.; Lv, J.; Zhang, H.; Guo, H. Lactoferrin Attenuates High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Lipid Metabolic Dysfunctions by Suppressing Hepatic Lipogenesis and down-Regulating Inflammation in C57BL/6J Mice. *Food Funct.* **2018**, *9*, 4328–4339. [CrossRef] [PubMed]
2. WHO. Obesity and Overweight. 2023. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 24 June 2023).
3. Denisova, D.V.; Gurazheva, A.A.; Maximov, V.N. Associations of Polymorphisms of Some Genes with Excessive Weight in a Population Sample of Young Citizens of Novosibirsk. *Atherosclerosis* **2022**, *17*, 35–42. [CrossRef]
4. Yajnik, C.S.; Janipalli, C.S.; Bhaskar, S.; Kulkarni, S.R.; Freathy, R.M.; Prakash, S.; Mani, K.R.; Weedon, M.N.; Kale, S.D.; Deshpande, J.; et al. FTO Gene Variants Are Strongly Associated with Type 2 Diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia* **2009**, *52*, 247–252. [CrossRef]
5. Di Renzo, L.; Cioccoloni, G.; Falco, S.; Abenavoli, L.; Moia, A.; Simbaldi Salimei, P.; De Lorenzo, A. Influence of FTO Rs9939609 and Mediterranean Diet on Body Composition and Weight Loss: A Randomized Clinical Trial. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 308. [CrossRef] [PubMed]
6. Gerken, T.; Girard, C.A.; Tung, Y.-C.L.; Webby, C.J.; Saudek, V.; Hewitson, K.S.; Yeo, G.S.H.; McDonough, M.A.; Cunliffe, S.; McNeill, L.A.; et al. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* **2007**, *318*, 1469–1472. [CrossRef]
7. Claussnitzer, M.; Dankel, S.N.; Kim, K.-H.; Quon, G.; Meuleman, W.; Haugen, C.; Glunk, V.; Sousa, I.S.; Beaudry, J.L.; Puvion-Dran, V.; et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 895–907. [CrossRef] [PubMed]

8. Karra, E.; O'Daly, O.G.; Choudhury, A.I.; Yousseif, A.; Millership, S.; Neary, M.T.; Scott, W.R.; Chandarana, K.; Manning, S.; Hess, M.E.; et al. A Link between FTO, Ghrelin, and Impaired Brain Food-Cue Responsivity. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 3539–3551. [\[CrossRef\]](#)
9. Aoun, C.; Hajj, A.; Hajj, F.; Papazian, T.; Rabbah Khabbaz, L. The Interaction between Genetic Polymorphisms in FTO, MC4R and MTHFR Genes and Adherence to the Mediterranean Diet in Relation to Obesity. *Gene* **2022**, *809*, 146037. [\[CrossRef\]](#)
10. Saldaña-Alvarez, Y.; Salas-Martínez, M.G.; García-Ortiz, H.; Luckie-Duque, A.; García-Cárdenas, G.; Vientoño-Ayala, H.; Cordova, E.J.; Esparza-Aguilar, M.; Contreras-Cubas, C.; Carnevale, A.; et al. Gender-Dependent Association of FTO Polymorphisms with Body Mass Index in Mexicans. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145984. [\[CrossRef\]](#)
11. Goh, Y.; Choi, J.-H. Genetic Variation Rs1121980 in the Fat Mass and Obesity-Associated Gene (FTO) Is Associated with Dietary Intake in Koreans. *Food Nutr. Res.* **2022**, *66*, 8059. [\[CrossRef\]](#)
12. Candráková, K.; Trakovická, A.; Candrák, J.; Gábor, M.; Miluchová, M. Effect of FTO Rs1121980 to Body Mass Index. *Acta Fytotech. Zootech.* **2016**, *19*, 114–122. [\[CrossRef\]](#)
13. Bhatt, S.P.; Misra, A.; Pandey, R.M. Rs7903146 (C/T) Polymorphism of Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene Is Independently Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Asian Indians. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2020**, *14*, 175–180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Cropano, C.; Santoro, N.; Groop, L.; Dalla Man, C.; Cobelli, C.; Galderisi, A.; Kutsawa, R.; Pierpont, B.; Goffredo, M.; Caprio, S. The Rs7903146 Variant in the TCF7L2 Gene Increases the Risk of Prediabetes/Type 2 Diabetes in Obese Adolescents by Impairing β -Cell Function and Hepatic Insulin Sensitivity. *Diabetes Care* **2017**, *40*, 1082–1089. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Wrzosek, M.; Sawicka, A.; Wrzosek, M.; Piątkiewicz, P.; Talała, M.; Nowicka, G. Age at Onset of Obesity, Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) Rs7903146 Polymorphism, Adiponectin Levels and the Risk of Type 2 Diabetes in Obese Patients. *Arch. Med. Sci.* **2019**, *15*, 321–329. [\[CrossRef\]](#)
16. Reinehr, T.; Friedel, S.; Mueller, T.D.; Toschke, A.M.; Hebebrand, J.; Hinney, A. Evidence for an Influence of TCF7L2 Polymorphism Rs7903146 on Insulin Resistance and Sensitivity Indices in Overweight Children and Adolescents during a Lifestyle Intervention. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 1521–1524. [\[CrossRef\]](#)
17. Huang, B.; Wang, Y.; Qin, L.; Wei, Q.; Liu, N.; Jiang, M.; Yu, H.; Yu, X. A Functional Polymorphism Rs10830963 in *Melanin Receptor 1B* Associated with the Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20190744. [\[CrossRef\]](#)
18. De Luis, D.A.; Izaola, O.; Primo, D.; Aller, R. A Circadian Rhythm-Related MTNR1B Genetic Variant (Rs10830963) Modulate Body Weight Change and Insulin Resistance after 9 Months of a High Protein/Low Carbohydrate vs a Standard Hypocaloric Diet. *J. Diabetes Complicat.* **2020**, *34*, 107534. [\[CrossRef\]](#)
19. Goni, L.; Cuervo, M.; Milagro, F.I.; Martínez, J.A. Gene–Gene Interplay and Gene–Diet Interactions Involving the MTNR1B Rs10830963 Variant with Body Weight Loss. *Lifestyle Genom.* **2014**, *7*, 232–242. [\[CrossRef\]](#)
20. Li, L.; Ma, C.; Hurlebagen, Yuan, H.; Hu, R.; Wang, W.; Weilisi. Effects of Lactoferrin on Intestinal Flora of Metabolic Disorder Mice. *BMC Microbiol.* **2022**, *22*, 181. [\[CrossRef\]](#)
21. Morishita, S.; Ono, T.; Fujisaki, C.; Ishihara, Y.; Murakoshi, M.; Kato, H.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Sugiyama, K.; Nishino, H. Bovine Lactoferrin Reduces Visceral Fat and Liver Triglycerides in ICR Mice. *J. Oleo Sci.* **2013**, *62*, 97–103. [\[CrossRef\]](#)
22. Sun, J.; Ren, F.; Xiong, L.; Zhao, L.; Guo, H. Bovine Lactoferrin Suppresses High-Fat Diet Induced Obesity and Modulates Gut Microbiota in C57BL/6j Mice. *J. Funct. Foods* **2016**, *22*, 189–200. [\[CrossRef\]](#)
23. Jańczuk, A.; Brodziak, A.; Król, J.; Czernicka, T. Properties of Yoghurt Fortified in Lactoferrin with Effect of Storage Time. *Animals* **2023**, *13*, 1610. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Fairley, S.; Lowy-Gallego, E.; Perry, E.; Flicek, P. The International Genome Sample Resource (IGSR) Collection of Open Human Genomic Variation Resources. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D941–D947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Panahi, S.; Tremblay, A. The Potential Role of Yogurt in Weight Management and Prevention of Type 2 Diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* **2016**, *35*, 717–731. [\[CrossRef\]](#)
26. Hassan, M.A.; Abdelmaksoud, T.G.; Abd El-Maksoud, A.A. Effects of Lactoferrin Supplemented with Fermented Milk on Obesity-Associated Pancreatic Damage in Rats. *Life* **2022**, *12*, 2019. [\[CrossRef\]](#)
27. Moreno-Navarrete, J.M.; Ortega, F.J.; Ricart, W.; Fernandez-Real, J.M. Lactoferrin Increases 172ThrAMPK Phosphorylation and Insulin-Induced P473SerAKT While Impairing Adipocyte Differentiation. *Int. J. Obes.* **2009**, *33*, 991–1000. [\[CrossRef\]](#)
28. Ono, T.; Fujisaki, C.; Ishihara, Y.; Ikoma, K.; Morishita, S.; Murakoshi, M.; Sugiyama, K.; Kato, H.; Miyashita, K.; Yoshida, T.; et al. Potent Lipolytic Activity of Lactoferrin in Mature Adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 566–571. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Lublin, 04.09.2023 r.

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadczają się, że publikacja:

Jańczuk A., Brodziak A., Czerniecki T., Król J. (2023) "Lactoferrin – The Health-Promoting Properties and Contemporary Application with Genetic Aspects". Foods, 12 (1), 70

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

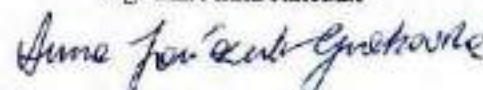
mgr inż. Anna Jańczuk – współtworzenie koncepcji artykułu przeglądowego, przeprowadzenie przeglądu i interpretacja danych literaturowych, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, wizualizacja i przygotowanie wersji finalnej manuskryptu, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków finansowych na publikację pracy;

dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni – opracowanie koncepcji artykułu przeglądowego, udział w przygotowaniu wersji finalnej manuskryptu, nadzór nad właściwą interpretacją opisanych danych literaturowych, zatwierdzenie wersji finalnej manuskryptu, współtworzenie odpowiedzi na recenzje, zarządzanie projektem, pozyskanie środków finansowych na publikację pracy, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

dr inż. Tomasz Czerniecki – udział w gromadzeniu i interpretacji danych literaturowych oraz wizualizacji, przygotowaniu i zatwierdzeniu wersji finalnej manuskryptu;

prof. dr hab. Jolanta Król – udział w gromadzeniu danych literaturowych oraz przygotowaniu i zatwierdzeniu wersji finalnej manuskryptu.

mgr inż. Anna Jańczuk



dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni



dr inż. Tomasz Czerniecki



prof. dr hab. Jolanta Król



Lublin, 04.09.2023 r.

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadczam się, że publikacja:

Jańczuk A., Brodziak A., Król J., Czernecki T. (2023) "Properties of Yoghurt Fortified in Lactoferrin with Effect of Storage Time". Animals, 13 (10), 1610.

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

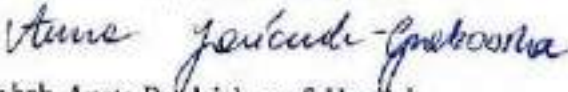
mgr inż. Jańczuk Anna – współtworzenie koncepcji pracy, przeprowadzenie przeglądu i analiza danych literaturowych, udział w opracowaniu metodologii badań, przygotowanie materiału do badań i przeprowadzenie analiz laboratoryjnych, archiwizacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, wizualizacja i przygotowanie wersji finalnej manuskryptu w języku polskim i angielskim, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni – opracowanie koncepcji pracy, udział w opracowaniu metodologii badań i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, walidacja metod badawczych, udział w przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, nadzór nad realizacją badań, udział w przygotowaniu wstępnej wersji roboczej i finalnej manuskryptu, zarządzanie projektem, pozyskanie środków finansowych na publikację pracy, pełnienie roli autora korespondencyjnego;


prof. dr hab. Jolanta Król – udział w opracowaniu metodologii badań oraz przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych;

dr inż. Tomasz Czernecki – udział w opracowaniu metodologii badań oraz przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

mgr inż. Anna Jańczuk


dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni


prof. dr hab. Jolanta Król


dr inż. Tomasz Czernecki

Lublin, 04.09.2023 r.

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadczają się, że publikacja:

Jańczuk-Grabowska A., Czerniecki T., Brodziak A. (2023) "Gene – Diet Interactions: Viability of Lactoferrin-Fortified Yoghurt as an Element of Diet Therapy in Patients Predisposed to Overweight and Obesity". Foods, 12, 2929.

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr inż. Anna Jańczuk-Grabowska – współtworzenie koncepcji pracy, przeprowadzenie przeglądu i analiza danych literaturowych, udział w opracowaniu metodologii badań, udział w zapewnieniu materiału do badań, udział w przeprowadzeniu badań, archiwizacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, wizualizacja i przygotowanie wersji finalnej manuskryptu w języku polskim i angielskim, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje;

dr inż. Tomasz Czerniecki – opracowanie koncepcji i metodologii badań, zapewnienie materiału do badań, udział w przeprowadzeniu badań, nadzór nad realizacją badań, udział w interpretacji uzyskanych wyników, udział w przygotowaniu i zatwierdzenie wersji finalnej manuskryptu, weryfikacja odpowiedzi na recenzje, pozyskanie funduszy na publikację, zarządzanie projektem, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni – współtworzenie koncepcji pracy, udział w opracowaniu metodologii badań, częściowy nadzór nad realizacją badań, udział w przygotowaniu i zatwierdzenie wersji finalnej manuskryptu, pozyskanie funduszy na publikację, zarządzanie projektem, pełnienie roli autora korespondencyjnego.

mgr inż. Anna Jańczuk-Grabowska



dr inż. Tomasz Czerniecki



dr hab. Aneta Brodziak, prof. Uczelni

