

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Analýza oligosacharidů mléka savců**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Hana Jiroušková**

**Obor studia: ATZD**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Analýza oligosacharidů mléka savců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi CSc. za odborné vedení a Ing. Romanu Švejstilovi za pomoc v laboratoři a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Poděkování patří také mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

# Analýza oligosacharidů mléka savců

## Souhrn

Mateřské mléko obsahuje všechny živiny, které jsou nezbytné pro růst a správný vývoj novorozence v průběhu prvních 4 – 6 měsíců života. Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) jsou třetí největší složkou mateřského mléka. Jedná se o velmi těžko stravitelné nebo nestravitelné látky, které zastávají mnoho důležitých funkcí, například prebiotickou, imunomodulační, či zabraňují adhezi patogenů na buňky střevního epitelu.

Mléko ostatních savců se od mateřského mléka v mnohých znacích odlišuje. Různá mléka obsahují odlišný poměr živin, který je uzpůsoben živinovým potřebám mláděte daného druhu. Mléka mohou mít také odlišnou chuť, barvu či vůni.

Obsah oligosacharidů v mléce ostatních savců je znatelně nižší než v mléce mateřském. Kozí mléko obsahuje největší množství oligosacharidů ze všech přežvýkavců a tyto oligosacharidy jsou OMM nejpodobnější. Obsah oligosacharidů v kravském mléce je velmi malý a fukosylované oligosacharidy se objevují ve velice nízkých koncentracích v porovnání s mlékem mateřským, kde fukosylované oligosacharidy tvoří až 70 %.

Cílem této práce bylo vyizolovat oligosacharidy z kozí a kravské syrovátky pomocí gelové permeační chromatografie, porovnat je s oligosacharidy mateřského mléka a následně otestovat schopnost růstu vybraných lidských a kravských bifidobakterií a laktobacilů na těchto oligosacharidech.

Žádný z kmenů bifidobakterií ani laktobacilů nebyl schopen kravské oligosacharidy využívat jako zdroj energie, což naznačuje, že oligosacharidy kravského mléka mají pravděpodobně rozdílnou strukturu i funkci než oligosacharidy mateřského mléka.

**Klíčová slova:** oligosacharidy, mléko, savci, prebiotika, střevní mikrobiota

# Analysis of Animal Milk Oligosaccharides

## Summary

Human milk contains all nutrients necessary for proper development and growth of the newborn during the first 4 – 6 months of life. Human milk oligosaccharides (HMOs) are the third largest component of breast milk. HMOs are hardly digestible or indigestible substances and they can act as prebiotics, or provide immunomodulatory and anti-pathogenic effect.

There is a big difference between human milk and milk of other mammals. Various milks contain different levels of nutrients according to the nutritional requirements of the offspring and also the color, smell or taste of the milk may be different between mammalian species.

Oligosaccharide content in milk of other mammals is significantly lower than in human milk. Caprine milk contains the greatest amount of oligosaccharides in comparison with other ruminants and these are the most similar to HMO. Oligosaccharide content in cow's milk is very low and fucosylated oligosaccharides occur in very low concentrations whereas human milk contains up to 70 % of fucosylated oligosaccharides.

The aim of this study is to isolate oligosaccharides from goat and cow whey by gel permeation chromatography, compare obtained oligosaccharides with HMOs and then test the ability of the growth of selected human and animal bifidobacteria and lactobacilli on these oligosaccharides.

None of the strains of bifidobacteria or lactobacilli were able to utilize cow oligosaccharides, which means cow's milk oligosaccharides have probably different structure and function than breast milk oligosaccharides.

**Keywords:** oligosaccharides, milk, mammals, prebiotics, intestinal microbiota

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
2.1	HYPOTÉZA .....	9
<b>3</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>10</b>
3.1	MATEŘSKÉ MLÉKO.....	10
3.1.1	Složení mateřského mléka .....	10
3.1.1.1	Proteiny .....	11
3.1.1.2	Nebílkovinný dusík.....	12
3.1.1.3	Lipidy.....	12
3.1.1.4	Sacharidy .....	13
3.2	MLÉKO DALŠÍCH SAVCŮ .....	14
3.2.1	Kravske mléko .....	14
3.2.1.1	Proteiny .....	14
3.2.1.2	Lipidy.....	14
3.2.1.3	Sacharidy .....	15
3.2.2	Kozí mléko.....	15
3.2.2.1	Proteiny .....	15
3.2.2.2	Lipidy.....	15
3.2.2.3	Sacharidy .....	16
3.2.3	Ovčí mléko.....	16
3.2.3.1	Proteiny .....	17
3.2.3.2	Lipidy.....	17
3.2.3.3	Sacharidy .....	17
3.3	OLIGOSACHARIDY MATEŘSKÉHO MLÉKA .....	17
3.3.1	Struktura.....	18
3.3.2	OMM a střevní mikroflóra.....	19
3.3.3	Trávení a vstřebávání OMM v gastrointestinálním traktu.....	20
3.3.4	Prebiotická funkce .....	20
3.3.5	OMM a antiadhezní ochrana.....	21
3.3.6	Imunomodulační účinky OMM .....	21

3.3.7	Vliv OMM na epitelové buňky .....	22
3.3.8	Role OMM při vývoji mozku .....	22
3.3.9	Způsoby izolace OMM .....	22
3.4	OLIGOSACHARIDY MLÉKA DALŠÍCH SAVCŮ .....	23
3.4.1	Oligosacharidy kravského mléka .....	23
3.4.2	Oligosacharidy koziho mléka .....	24
3.4.3	Obsah oligosacharidů v dalších savčích mlécích .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>26</b>
4.1	IZOLACE OLIGOSACHARIDŮ Z MLÉKA .....	26
4.1.1	Příprava vzorků .....	26
4.1.2	Aplikace vzorku na kolonu gelové permeační chromatografie .....	26
4.1.3	Tenkvrstvá chromatografie (TLC) .....	27
4.1.4	Test na přítomnost proteinů podle Bradforda .....	27
4.2	KULTIVACE BAKTERIÍ NA OLIGOSACHARIDECH .....	28
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
5.1	IZOLACE OLIGOSACHARIDŮ Z KRAVSKÉ A KOZÍ SYROVÁTKY .....	30
5.2	KULTIVACE STŘEVNÍCH BAKTERIÍ NA OLIGOSACHARIDECH .....	31
5.2.1	Bifidobakterie .....	31
5.2.2	Laktobacily .....	36
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
6.1	IZOLACE OLIGOSACHARIDŮ ZE SYROVÁTKY .....	40
6.2	KULTIVACE STŘEVNÍCH BAKTERIÍ NA OLIGOSACHARIDECH .....	40
6.2.1	Bifidobakterie .....	40
6.2.2	Laktobacily .....	41
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>44</b>

# 1 Úvod

Mateřské mléko je nejvhodnější a nejpřirozenější stravou pro novorozence. Obsahuje mnoho důležitých živin, které zajišťují správný vývin a růst dítěte. V závislosti na fázi laktace se mění i složení mléka. Kolostrum, tedy mléko produkované asi pět dní po porodu, je bohaté na proteiny a jeho funkcí je zajistit rozvoj imunity kojence. Nejvýznamnějšími složkami zralého mateřského mléka jsou proteiny, lipidy a sacharidy, které vykonávají v těle dítěte rozličné funkce.

Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) jsou komplexní nestravitelné sacharidy, jejichž stavebními jednotkami je pět monosacharidů. Oligosacharidy můžeme rozdělit na fukosylované, které tvoří až 70 %, zbytek je tvořen oligosacharidy sialovanými. Většina oligosacharidů je schopna odolat trávicím enzymům a dostává se tak do tlustého střeva, kde slouží jakožto zdroj uhlíku pro některé bakteriální kmeny. Oligosacharidy také hrají významnou roli při ochraně hostitele před patogeny, napomáhají formování imunity a díky obsahu kyseliny sialové zajišťují správný vývoj mozku.

Mléko ostatních savců se liší v zastoupení jednotlivých živin, což je způsobeno rozdílnými živinovými potřebami mláďátek daného druhu. Obsah proteinů je v mléce přežvýkavců výrazně vyšší než v mléce mateřském a to pravděpodobně z důvodu rychlejšího růstu zvířecích mláďat. Lidské mléko zase disponuje vyšším obsahem laktosy.

Množství oligosacharidů v mlécích ostatních savců je několikanásobně nižší než v mléce mateřském a odlišují se v mnoha dalších vlastnostech. Mléko přežvýkavců na rozdíl od mateřského mléka obsahuje jen velmi malé množství fukosylovaných oligosacharidů, takže převládají oligosacharidy sialované. Kozí oligosacharidy jsou OMM podobnější než oligosacharidy ovčí a kravské.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce je analyzovat složení oligosacharidů mléka vybraných savců a porovnat je s oligosacharidy mateřského mléka a otestovat jejich vliv na střevní mikrobiotu.

### **2.1 Hypotéza**

Oligosacharidy mléka savců se budou ve složení lišit od oligosacharidů mateřského mléka a budou rovněž podporovat růst jiných druhů bakterií.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko produkované zdravými a dobře živěnými matkami je schopno pokrýt všechny živinové potřeby nemluvněte v průběhu prvního půlroku života (Kunz et al., 1999). Všeobecně je kojení doporučováno jakožto nejlepší metoda výživy dětí v kojeneckém věku. Tato doporučení jsou založena na skutečnosti, že děti kojené dobře se stravujícími matkami přijímají dostatek energie a živin, jež zajistí správný růst a vývoj v průběhu prvních 4 – 6 měsíců života (Picciano, 2001).

#### 3.1.1 Složení mateřského mléka

Laktace je rozdělena do tří období v závislosti na složení mléka: kolostrum produkované 5 dní po porodu, přechodné mateřské mléko produkované dalších pět dní po porodu a mléko zralé (Kulski et Hartmann, 1981). Vzhled, objem a složení kolostra se může odlišovat. Kolostrum je bohaté na imunitní složky, jako je například sekreční imunoglobulin IgA, laktoferin, leukocyty a růstové faktory, například epidermální růstový faktor (EGF). Koncentrace laktosy je poměrně nízká především proto, že kolostrum má spíše funkci imunostimulační, než vyživovací (Ballard, 2013).

Mateřské mléko je tvořeno směsí výživných komponentů a dalších bioaktivních faktorů s významnými fyziologickými účinky na novorozené dítě (Kunz et al., 1999). Andreas et al. (2015) předpokládají, že složení mateřského mléka je tvořeno každou matkou tak, aby se odrážely živinové požadavky kojence. Hambraeus (1984) uvádí, že díky odlišným potřebám různých druhů savců se množství živin obsažených v jejich mléčích nápadně odlišuje. Z tabulky 1 je zřejmé, že surové mateřské mléko má v porovnání s mlékou ostatních savců velmi vysoký obsah laktosy a relativně nízký obsah proteinů. Tabulka 2 se zaměřuje na kvalitativní rozdíly složení proteinů kravského a mateřského mléka.

**Tabulka 1: Složení mlék získaných od různých druhů savců (Hambraeus, 1984)**

	<b>Proteiny (g/100 g mléka)</b>	<b>Tuky (g/100 g mléka)</b>	<b>Laktosa (g/100 g mléka)</b>
Mateřské mléko	0,9	3,8	7
Kravské mléko	3,4	3,7	4,8
Ovčí mléko	5,5	7,4	4,8
Buvolí mléko	3,8	7,4	4,8
Kozí mléko	2,9	4,5	4,1

**Tabulka 2: Složení proteinů mateřského a kravského mléka (Hambraeus, 1984)**

	Mateřské mléko %	Kravské mléko %
<b>Celkový protein</b>	100	100
Kaseiny	35	79
Syrovátkové bílkoviny	65	21
$\alpha$ -Laktalbumin	17	3,5
$\alpha$ -Laktoglobulin	-	9
Laktoferin	17	-
Sérové albuminy	6	1
Lysozym	6	-
Imunoglobuliny	11	3
Ostatní	8	4,5

### 3.1.1.1 Proteiny

Mateřské mléko obsahuje přes 400 různých druhů proteinů, které vykonávají rozličné funkce; zajišťují živiny, působí antimikrobiálně a imunostimulačně a taktéž stimulují absorpci živin (Andreas et al., 2015). Obsah proteinů v mateřském mléce prudce klesá v průběhu prvního měsíce laktace. Většina proteinů je syntetizována v mléčné žláze, až na pár výjimek, jako je například sérový albumin, který vstupuje z krevního oběhu matky (Lønnerdal, 2003). Koncentrace proteinů vylučovaných mléčnou žlázou matky v průběhu laktace klesá, zatímco obsah proteinů z krve matky zůstává poměrně konstantní (Sousa et al., 2014). Mléčné bílkoviny jsou rozděleny do tří skupin: muciny, kasein a syrovátkové bílkoviny. Muciny, známé jako membránové proteiny globulí mléčného tuku, obklopují tukové kapénky a tvoří malé procento celkového obsahu mléčných proteinů (Lønnerdal, 2003). Syrovátkové bílkoviny a kasein jsou rozděleny na základě jejich rozpustnosti; syrovátkové bílkoviny jsou rozpustné, zatímco kasein je přítomen v kaseinových micelách v roztoku. Kaseinové micely obsahují vápník a anorganický fosfát, čímž se řadí mezi pár přirozeně se vyskytujících fosfoproteinů (Hambraeus, 1984). V lidském mléce jsou přítomny tři druhy kaseinu:  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kasein.  $\kappa$ -kasein stabilizuje nerozpustnost a  $\alpha$ - a  $\beta$ -kaseiny tvoří koloidní suspenzi. Kaseiny netvoří disulfidické můstky, což způsobuje, že se micely formují do spletité síťovité struktury (Andreas et al., 2015). Primární funkcí kaseinu je výživa novorozence, je totiž zdrojem aminokyselin, vápníku a anorganického fosforu. Srážení kaseinu je rovněž důležité pro funkci zažívacího traktu a pro umožnění trávení proteinů žaludečními enzymy novorozence (Hambraeus, 1984). Lønnerdal a Forsum (1985) stanovili přibližný poměr mezi syrovátkovými bílkovinami a kaseinem na 80 ku 20. Andreas et al. (2015) uvádějí, že lidské mléko má nejnižší koncentraci kaseinu ze všech studovaných živočišných druhů, což odpovídá pomalému tempu růstu lidských kojenců.

Mezi nejhojněji zastoupené syrovátkové bílkoviny patří  $\alpha$ -laktalbumin, laktoferin a imunoglobuliny (Sousa et al., 2014).  $\alpha$ -Laktalbumin se účastní syntézy laktosy, což pravděpodobně souvisí s vysokým obsahem těchto dvou látek v lidském mléce (Welsh et May, 1979). Laktoferin je glykoprotein vázající železo specifický pro mléko (Forsum et Lönnnerdal, 1980). Hambraeus (1984) předpokládá, že laktoferin hraje důležitou roli při vstřebávání železa ve střevech. Nejhojněji zastoupeným imunoglobulinem v mateřském mléce je sekreční imunoglobulin IgA. Imunoglobuliny zajišťují ochranu novorozence, zatímco jeho vlastní imunitní systém se teprve vyvíjí (Andreas et al., 2015).

### **3.1.1.2 Nebílkovinný dusík**

Mateřské mléko má v porovnání s mléky ostatních savců relativně vysoký obsah nebílkovinného dusíku (NPN). NPN tvoří přibližně 20 – 25 % celkového dusíku a jeho funkcí je zajistit dostatečný přísun dusíku kojenci (Rudloff et Kunz, 1997). NPN vstupuje do mléka z krve matky, proto se jeho obsah nemění v závislosti na fázi laktace (Sousa et al., 2014). Hlavními složkami nebílkovinného dusíku je močovina, kreatinin, nukleotidy, volné aminokyseliny a peptidy (Andreas et al., 2015).

### **3.1.1.3 Lipidy**

Tuk lidského mléka je hlavním zdrojem energie kojence, představuje okolo 40 – 55 % z celkového energetického příjmu (Koletzko et al., 2001). Obsah tuku ve zralém mateřském mléce je 3,8 %, v kolostru je obsah o něco nižší, přibližně 1,9 % (Hambraeus, 1984). Lipidy se v mléce vyskytují ve formě globulí, které tvoří emulzi s vodní fází mléka. V jejich jádře jsou obsaženy především nepolární triacylglyceroly, zatímco povrch je krytý bipolárními látkami, jako jsou například fosfolipidy, proteiny, cholesterol, enzymy a další. Tato vrstva zabraňuje koagulaci globulí a působí jako stabilizátor mléčné emulze. Povrch globulí tvoří plochu pro lipolytické enzymy při průchodu zažívacím traktem, kde usnadňují lipolýzu triacylglycerolů a absorpci produktů štěpení. (Jensen, 1995)

Hlavní složkou mléčného tuku jsou mastné kyseliny. Tyto kyseliny jsou esterifikovány hlavně ve formě triacylglycerolů, menší část mastných kyselin je esterifikována ve formě fosfolipidů (Sala-Vila et al., 2005). V lidském mléce je obsaženo více než 200 různých mastných kyselin, nicméně mnoho z nich je přítomno ve velmi nízkých koncentracích (Andreas et al., 2015). Složení triacylglycerolů je určeno druhem, množstvím a terciální strukturou přítomných mastných kyselin. Často jsou označovány zkráceným vzorcem, který udává počet přítomných atomů uhlíku ku počtu dvojných vazeb a jejich umístění vzhledem ke koncovému atomu uhlíku

(omega) (Koletzko et al., 2001). Mateřské mléko obsahuje značné množství nenasycených mastných kyselin, jako jsou například kyselina olejová nebo kyselina linolenová a obsah nasyčených mastných kyselin je nižší (Hambraeus, 1984). Fosfolipidy slouží jako dodavatelé dalších mastných kyselin, a to konkrétně polyenových mastných kyselin s dlouhým řetězcem (PUFA). Mezi nejvýznamnější PUFA řadíme kyselinu arachidonovou C20:4  $\omega$ -6 a kyselinu dokosaehaenovou C22:6  $\omega$ -3, které se začleňují do fosfolipidových membrán a mozku během třetího trimestru těhotenství a dále se zde hromadí během prvních dvou let života (Sala-Vila et al., 2005).

Nejvýznamnějším mléčným sterolem je cholesterol, tvořící přibližně 90,1 % z celkového obsahu sterolů, následovaný desmosterolem, jehož obsah je podstatně nižší, asi 8,6%. Dále jsou přítomny ještě fytosteroly, jejichž množství obsažené v lidském mléce je zanedbatelné (Koletzko et al., 2001). Většina cholesterolu se nachází v membráně tukových globulí a jeho množství není ovlivněno dietou či hladinou cholesterolu v plasmě matky (Jensen, 1996).

#### **3.1.1.4 Sacharidy**

Sacharidy mateřského mléka zahrnují monosacharidy glukosu a galaktosu, disacharidy laktosu a laktulosu, oligosacharidy, komplexní uhlovodíky a glykoproteiny. Sacharidy tvoří asi 40 % celkového energetického obsahu mateřského mléka (Hambraeus, 1984). Koncentrace sacharidů je přibližně stejná v mlezivu, přechodném i zralém mléce (Sousa et al., 2014).

Nejhojněji zastoupeným uhlovodíkem v lidském mléce je laktosa skládající se z glukosy a galaktosy (Andreas et al., 2015). Ačkoliv je koncentrace laktosy v lidském mléce relativně stabilní, mírně vyšší koncentrace se nacházejí v mléce matek, které produkují zvýšené množství mléka (Ballard, 2013). Laktosa není považována za nezbytnou živinu, nicméně bylo dokázáno, že má příznivý účinek na opětovné vstřebávání minerálů, především vápníku, v důsledku přeměny střevní mikrobiotou na kyselinu mléčnou, která zvyšuje rozpustnost vápenatých solí snižováním hodnoty pH (Hambraeus, 1984). U novorozenců laktosa není zcela hydrolyzována v tenkém střevě a malé množství se dostává až do tlustého střeva, kde je rozloženo bakteriemi. To má za následek preferenční růst například bifidobakterií a laktobacilů (Coppa et al., 2006). Dalšími významnými sacharidy mateřského mléka jsou oligosacharidy, jejichž koncentrace je asi 10 g/l mléka (Ballard, 2013). Oligosacharidy jsou tvořeny 3 – 22 sacharidovými jednotkami a skládají se z pěti různých cukrů poskládaných v různé posloupnosti a orientaci. Základními stavebními prvky těchto oligosacharidů jsou L-fukosa, D-glukosa, D-galaktosa, N-acetylglukosamin a N-acetylsialová kyselina (German et al., 2008). Oligosacharidy snižují přilnavost bakterií k povrchu epitelů, a proto hrají důležitou roli při prevenci infekčních

onemocnění u novorozeného dítěte. Oligosacharidy rovněž podporují rozvoj takzvaného bifidus faktoru (Kunz et al., 1999). Podrobněji je o těchto látkách pojednáno v samostatné kapitole 3.3.

## **3.2 Mléko dalších savců**

### **3.2.1 Kravské mléko**

Kravské mléko tvoří asi 83 % celosvětové produkce mléka (FAO, 2013). Ve srovnání s mateřským mlékem je mléko kravské bohatší na bílkoviny a minerální látky, především vápník a fosfor, a to z důvodu rychlejšího růstu telat a tedy i vyšších výživových nároků (Walker, 1990). Kravské mléko má také významnou roli ve výživě člověka. Poměr fosforu a snadno vstřebatelného vápníku v mléce je ideální pro tvorbu kostí (Chawre et al., 2014).

#### **3.2.1.1 Proteiny**

Kravské mléko obsahuje přibližně 34 g/l bílkovin. Proteiny kravského a mateřského mléka se nápadně odlišují v poměru mezi kaseiny a syrovátkovými bílkoviny. Bílkoviny kravského mléka jsou přibližně z 80 % tvořeny kaseinem a 20 % zaujímají syrovátkové bílkoviny (Potočník et al., 2011), zatímco v lidském mléce klesá obsah kaseinů až pod 40 % (El-Agamy, 2007). Další rozdíly existují ve složení syrovátkových bílkovin, jejichž dominantní složkou je u kravského mléka  $\beta$ -laktoglobulin, který v mateřském mléce není přítomen vůbec (Iyengar, 1982).

#### **3.2.1.2 Lipidy**

Lipidy tvoří 3 – 5 % kravského mléka (Jensen et Newberg, 1995). Většina tukových kapének v kravském mléce má velikost 1 – 4  $\mu$ m (Jensen, 2002). El-Zeini (2006) se domnívá, že velikost tukových kapének je přímo úměrná tučnosti mléka. Tedy čím je mléko tučnější, tím větší jsou tukové kapénky v něm obsažené. Triacylglyceroly v kravském mléce tvoří 97 – 98 % mléčného tuku, podobně jako u mléka lidského, koziho i ovčího. Tento podíl je nižší u kobyliho a oslího mléka, a to přibližně 80 – 85 % (Claeys et al., 2014). Kravské mléko obsahuje vyšší podíl nasycených mastných kyselin, než mléko mateřské. Mezi nejvíce zastoupené mastné kyseliny v kravském mléce patří kyselina laurová, palmitová, stearová a monoenoová kyselina olejová (Elgersma et al., 2006).

### 3.2.1.3 Sacharidy

Obsah laktosy v kravském mléce je výrazně nižší než v mléce mateřském, a to zhruba 45 – 52 g/l mléka (Guetouache et al., 2014). Laktosa také slouží jako substrát během fermentace mléka bakteriemi mléčného kvašení při výrobě jogurtů a sýrů (Filion, 2006).

Také obsah oligosacharidů bývá u přežvýkavců zpravidla nižší než u mateřského mléka nebo mléka primátů (Oliveira et al., 2015).

### 3.2.2 Kozí mléko

Kozí mléko se odlišuje od kravského nebo lidského mléka lepší stravitelností, zásaditostí nebo pufrační schopností (Park, 2007). Kozí mléko má křídově bílou barvu v porovnání s mlékem kravským, které je nažloutlé v důsledku přítomnosti karotenů (Saini et Gill, 1991). Kozí mléko má výraznější chuť, což může být způsobeno uvolněním mastných kyselin s krátkým řetězcem při nešetrném zacházení, které dává vzniknout specifickému „kozímu“ zápachu (Haenlein, 1993). Na rozdíl od kravského mléka je kozí mléko zásadité, zřejmě díky vyššímu obsahu bílkovin a jinému uspořádání fosfátů (Saini et Gill, 1991).

#### 3.2.2.1 Proteiny

Obsah celkového proteinu v kozím mléce je asi 28 – 32 g/l (Greppi, 2008). Ceballos et al. (2009) vyzkoumali, že kozí mléko obsahuje o něco nižší množství kaseinu než mléko ovčí nebo kravské. V porovnání s kravským mlékem jsou kaseinové micely kozího mléka menší, obsahují více vápníku, anorganického fosforu a jsou méně tepelně stabilní (Haenlein, 2004). Díky vysokému obsahu vápníku a nízké solvataci micel vykazuje kozí mléko nízkou stabilitu při zahřevu (Remeuf, 1992). V kozím mléce je velmi malá nebo nulová koncentrace  $\alpha$ -s1-kaseinu, který je významný při tvorbě sýřeniny. Namísto něj je přítomen  $\alpha$ -s2-kasein, a proto má kozí mléko nižší výtěžnost tvarohu, delší dobu srážení syřidlem a menší pevnost tvarohu, díky čemuž je lépe stravitelný v zažívacím traktu (Ambrosoli et al., 1988). Rutherford et al. (2008) uvádí, že kozí mléko obsahuje podobné spektrum aminokyselin jako mléko kravské nebo mateřské. Jedinou výjimkou je cystein, jehož koncentrace je v kozím mléce nižší.

#### 3.2.2.2 Lipidy

Lipidy jsou přítomny ve formě tukových kapének o velikosti přibližně 3,5  $\mu$ m nebo méně, tedy menší než tukové kapénky v kravském mléku, ale větší než kapénky ovčího mléka (Mens, 1985). Složení lipidů kozího mléka je velmi podobné ovčím lipidům. Největším rozdílem je přítomnost mastných kyselin s krátkým řetězcem v kozím mléce. Mezi tyto kyseliny řadíme

například kyselinu kapronovou, kaprylovou nebo kaprinovou (Jandal, 1996). Tyto kyseliny mají pozitivní vliv na řadu klinických chorob, jako je například malabsorpční syndrom, cystická fibrosa nebo tvorba žlučových kamenů. Další unikátní schopností těchto kyselin je poskytování přímé energie namísto ukládání se v tukové tkáni, díky čemuž dochází k potlačení a omezení ukládání cholesterolu (Haenlein, 2004). Ve srovnání s kravským mlékem má kozí mléko vyšší obsah monoenových i polyenových mastných kyselin a triglyceridů se středním řetězcem, což jsou látky velmi prospěšné pro lidské zdraví, zejména pro kardiovaskulární systém (Posati et Orr, 1976). Tyto nenasycené mastné kyseliny jsou totiž schopny snižovat hladinu krevního LDL (low density lipoprotein) cholesterolu a tím zamezit vzniku a rozvoji aterosklerosy (Adámková, 2010). Na rozdíl od kravského mléka se v kozím mléce nenachází imunoglobulin aglutinin, který způsobuje shlukování tukových kuliček v mléce a rychlejší oddělení smetany (Jennes et Parkash, 1971). Scolozzi et al. (2003) uvádějí, že struktura i složení membrány tukových kuliček je u ovcí, koz i krav téměř stejná a tvoří asi 1 % celkového tuku. Podobně je to i se složením fosfolipidů, které zaujímají pouze 0,8 % tukové složky.

### **3.2.2.3 Sacharidy**

Stejně jako u mléka mateřského, ovčího i kravského je v kozím mléce nejhojněji zastoupeným sacharidem laktosa (Larson et Smith, 1974), jejíž obsah je lehce nižší než v kravském mléce (Jandal, 1996). Další sacharidy, které jsou k nalezení v kozím mléce, jsou oligosacharidy, glykopeptidy, glykoproteiny a nukleotidové cukry (Larson et Smith, 1974). Nukleotidy působí jako prekurzory glykoproteinů, glykolipidů a oligosacharidů při biosyntéze mléka a jejich obsah v kozím mléce je znatelně vyšší, než například v mléce kravském nebo ovčím (Johke, 1978). Kozí mléko má nižší koncentraci oligosacharidů než mléko lidské, ale jejich struktura je velmi podobná. V porovnání s mléky ovcí a krav je kozí mléko na oligosacharidy bohatší (Zenebe et al., 2014).

### **3.2.3 Ovčí mléko**

Na rozdíl od kravského či kozího mléka se ovčí mléko, díky svému specifickému složení, používá téměř výhradně na výrobu sýrů (Calvo, 2002). Ovčí mléko má vyšší viskozitu, vyšší titrační kyselost a nižší bod mrazu než kravské mléko (Park, 2007) a obsahuje větší množství tuku, bílkovin, vápníku a draslíku (Kanwal et al., 2004). Vzhledem k vyššímu obsahu kaseinu má ovčí mléko kratší dobu srážení syřidlem a ovčí tvaroh má pevnější strukturu (Grandison, 1986).



### **3.2.3.1 Proteiny**

Průměrný obsah bílkovin v ovčím mléce se pohybuje kolem 5,8 %, tedy více než u mléka kravského nebo kozího. Proteiny zauímají 95 % z celkového obsahu dusíku a zbylých 5 % tvoří nebílkovinný dusík (Park, 2007). Ovčí mléko patří mezi mléka kaseinová, stejně jako mléka ostatních přežvýkavců, což znamená, že největší podíl z celkového dusíku je tvořen právě kaseinem. Mléko ovcí je bohaté na  $\kappa$  – kasein, jehož obsah je přibližně 20 % (Molik et al., 2012). V porovnání s kravským mlékem jsou syrovátkové bílkoviny ovčího mléka mnohem citlivější na teplo. Při pasteraci ovčího mléka po dobu 30 minut při teplotě 65 °C zdenaturuje asi 15 % proteinů, zatímco u kravského mléka zdenaturuje za stejných podmínek pouze 2,3 % (Recio et Visser, 2000).

### **3.2.3.2 Lipidy**

Tuková složka ovčího mléka zauímá přes 6,4 g/l mléka, podobně je tomu u mléka buvolího, u ostatních savců využívaných v mléčné produkci je obsah tuku nižší (Park, 2007). Stejně jako v kozím mléce, ani v mléce ovcí se nevyskytuje imunoglobulin aglutinin (Jandal, 1996). Podle Mense (1985) jsou tukové kapénky ovčího mléka menší než u mléka kravského nebo kozího a nabývají velikosti okolo 3,30  $\mu\text{m}$ . Profil mastných kyselin v ovčím mléce je velmi podobný jako u mléka kozího. Až 75 % mléčného tuku je tvořeno kyselinami palmitovou, stearovou, olejovou, myristovou a kaprinovou (Kalyankar et al., 2016).

### **3.2.3.3 Sacharidy**

Laktosa tvoří asi 49 % uhlovodíkové složky ovčího mléka (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Obsah laktosy je tedy téměř stejný jako u mléka kravského (Ramos et Juarez, 2003). Koncentrace oligosacharidů u ovčího mléka jsou 100 – 1000krát nižší než v mateřském mléce (Oliveira et al., 2015).

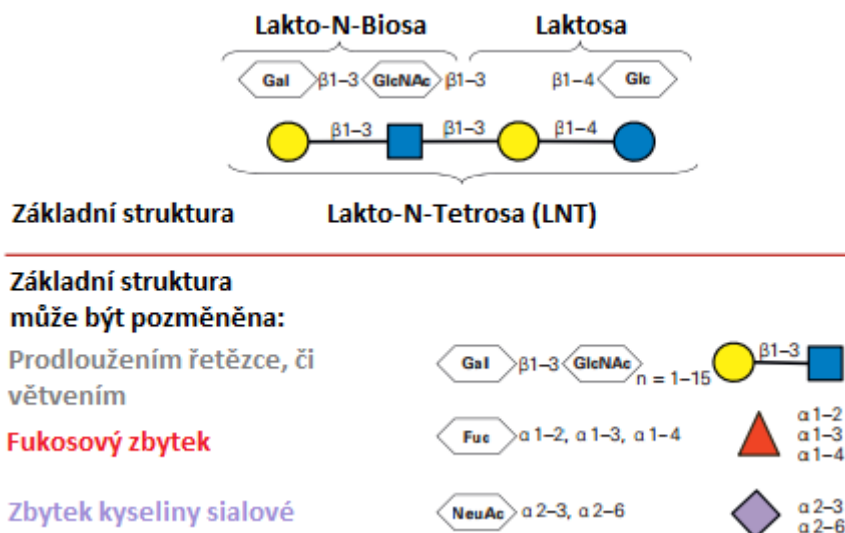
## **3.3 Oligosacharidy mateřského mléka**

Oligosacharidy jsou po vodě a proteinech třetí nejvíce zastoupenou složkou mateřského mléka. Tyto komplexní sacharidy mohou tvořit rozličné struktury, které se liší u každé matky a jsou to látky velmi těžko stravitelné či úplně nestravitelné lidskými trávicími enzymy. (Zivkovic et al., 2011). Oligosacharidy mají několik funkcí. Jednou z nich je regulace střevní mikrobioty kojence pomocí komenzálních bakterií (Coppa et al., 2011; Sela et Mills, 2010). U kojenečtí jsou dominantními střevními bakteriemi bifidobakterie a Bacteroidetes, a to díky jejich

schopnosti štěpit a využívat oligosacharidy prostřednictvím specifických glykosidáz, zatímco většina patogenních enterobakterií tyto enzymy postrádá, tudíž nemůže využívat oligosacharidy jakožto zdroj uhlíku (Yu et al., 2013). Některé oligosacharidy jsou absorbovány do vaskulatury a poté vylučovány do moči (De Leoz et al., 2013; Ruhaak et al., 2014), kde se mohou vázat na invazivní bakterie způsobující sepsi nebo infekci močových cest, a tím snižovat jejich výskyt (Lin et al., 2013). Další výhodou některých oligosacharidů je přítomnost kyseliny sialové, která je důležitá pro vývoj nervové soustavy kojence (Wang, 2012).

### 3.3.1 Struktura

Mateřské mléko obsahuje větší množství oligosacharidů se složitějšími strukturami než mléka jakýchkoliv jiných savců (Smilowitz et al., 2014). Oligosacharidy jsou obsaženy v koncentraci 5 – 14 g/l mléka a jsou definovány jakožto sacharidy, které obsahují 3 až 10 monosacharidů kovalentně spojených glykosidickými vazbami (Coppa et al., 1999; Mehra et Kelly, 2006). Stavebními jednotkami mléčných oligosacharidů je pět monosacharidů: D-glukosa, D-galaktosa, L-fukosa, N-acetylglukosamin a kyselina sialová. Laktosa tvoří redukující konec, který může být prodloužen až patnácti opakujícími se N-acetyllaktosaminovými jednotkami. Oligosacharidy vznikají výhradně v prsních žlázách a jejich základní strukturu tvoří laktosa pozměněná přidáním N-acetylglukosaminu a galaktosy, fukosy či kyseliny sialové (Kunz et al., 2000). Laktosa může být fukosylována buďto na terminálním konci galaktosou v  $\alpha$ 1-2 vazbě za vzniku 2'-fukosyllaktosy, nebo na redukujícím konci glukosou v místě  $\alpha$ 1-3 vazby, čímž dochází ke vzniku 3-fukosyllaktosy. V dalším případě může být laktosa sialována na terminálním konci galaktosou v místě  $\alpha$ 2-3 nebo  $\alpha$ 2-6 vazby, v důsledku čehož vzniká 3'-sialyllaktosa, či 6'-sialyllaktosa (obr. 1) (Bode et Jantscher-Krenn, 2012). Ve zralém mateřském mléce je až 70 % oligosacharidů fukosylovaných (neutrálních), zbytek tvoří oligosacharidy, na které jsou napojeny zbytky kyseliny sialové (Jeong et al., 2012).



Obr. 1.: Stavba OMM a možné strukturální modifikace (Kunz, 1958; upraveno)

### 3.3.2 OMM a střevní mikroflóra

Oligosacharidy mateřského mléka jsou schopny odolat nízkému pH ve střevě a jsou rezistentní vůči degradaci enzymy slinivky a kartáčového lemu (Engfer et al., 2000; Gnoth et al., 2000). Studie provedené v minulém desetiletí prokázaly, že konkrétní druhy rodů *Bacteroides* a *Bifidobacterium*, které jsou běžnou součástí střevní mikrobioty kojených dětí, jsou schopny efektivně využívat oligosacharidy jakožto zdroj uhlíku. To platí především pro *B. longum* subsp. *infantis*, která převládá ve střevní mikrobiotě většiny kojených dětí (Underwood et al., 2014).

Oligosacharidy poskytují kojeným dětem ochranu před potenciálními patogeny. Významnou ochranu pro kojence představují zejména  $\alpha$ 1-2-fukosylované oligosacharidy (Morrow et al., 2005). Tyto oligosacharidy chrání kojence především proti průjmovým onemocněním způsobeným bakteriemi rodu *Campylobacter*, kalciviry a toxiny bakterie *Escherichia coli* (Morrow et al., 2005). Některé patogeny využívají lektiny (proteiny vázající cukry) k vazbě na specifické sacharidy na povrchu střevního epitelu a tím vyvolávají infekci. OMM se podobají některým z těchto sacharidů, slouží jako návnada a blokuje připojení patogenu, čímž snižují riziko infekce (Bode et Jantscher-Krenn, 2012). Příkladem je inhibice vazby bakterie *C. jejuni* na lidskou střevní stěnu za pomoci fukosylovaných OMM. Výskyt bakterií rodu *Campylobacter* je nepřímo úměrný množství 2'-fukosyllaktosy v mateřském mléce (Morrow et al., 2004; Ruiz-Palacios et al., 2003).

### 3.3.3 Trávení a vstřebávání OMM v gastrointestinálním traktu

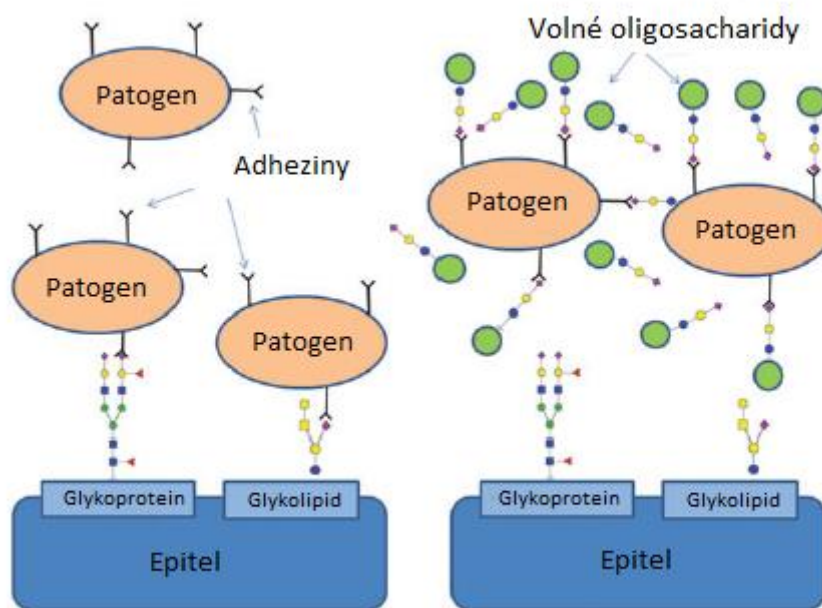
Oligosacharidy nepodléhají enzymatické hydrolyze střevní laktázou (Engfer et al., 2000). Tenké střevo neobsahuje sialidasu, fukosidasu, ani N-acetylhexosaminidasu, tudíž nemohou být odstraněny zbytky kyseliny sialové, fukosy nebo N-acetylglukosaminů z laktosového jádra. Malá část OMM je absorbována neporušená endocytosou prostřednictvím receptorů (Gnoth et al., 2001). Většina oligosacharidů tedy prochází tenkým střevem aniž by byla degradována a vstupuje do tlustého střeva, kde je fermentována střevními bakteriemi (Brand-Miller et al., 1998; Newburg, 2000). V tlustém střevě se oligosacharidy stávají hlavním zdrojem uhlíku pro střevní mikrobiotu a oligosacharidy obsahující N-acetylglukosamin, které nazýváme „bifidus faktor“, jsou nezbytné pro růst *B. bifidum* (Yoshioka et al., 1983).

### 3.3.4 Prebiotická funkce

„Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které příznivě působí na hostitele tím, že selektivně stimulují růst, a/nebo aktivitu jedné nebo určitého počtu bakterií v tlustém střevě, tudíž zlepšují zdraví hostitele“ (Gibson et Roberfroid, 1995). Palframan et al. (2003) definovali prebiotika jako sacharidy, které vedou ke změnám v počtu klíčových bakteriálních rodů v tlustém střevě, například bifidobakterií. Výsledky *in vitro* studií prokázaly, že prebiotika mohou regulovat gastrointestinální mikrobiotu zvýšením počtu bifidobakterií a laktobacilů, díky čemuž dochází ke zlepšení zdravotního stavu střeva a posílení nespecifické imunity (Rhoades et al., 2008; Wang et Gibson, 1993). Nejčastěji se vyskytujícím druhem bifidobakterií v zažívacím traktu kojených dětí je *Bifidobacterium longum* a *B. breve*. Mezi méně časté druhy pak patří *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. catenulatum* (Turroni et al., 2011). György et al. (1954) poprvé dokázali, že *B. bifidum* (tehdy *Lactobacillus bifidus*) je schopna růstu na oligosacharidových frakcích mateřského mléka. Ward et al. (2006) poprvé demonstrovali selektivní růst bifidobakterií na intaktních OMM *in vitro*. Díky následným studiím bylo zjištěno, že pouze některé druhy bifidobakterií jsou schopny intenzivně konzumovat OMM, například *B. longum* subsp. *infantis* a *B. breve*, které upřednostňují menší fukosylované a sialované OMM (Smilowitz et al., 2014). *B. infantis* spotřebovává OMM úplně, včetně produktů degradace mono- a disacharidů, zatímco například *B. bifidum* roste na OMM pomaleji a zanechává některé z degradačních produktů nespotebované (Asakuma et al., 2011). Oligosacharidy mateřského mléka rovněž zvyšují perzistenci bifidobakterií ve střevech tím, že podporují jejich vazbu na střevní buňky a zároveň zlepšují celistvost střevní bariéry (Chichlowski et al., 2012).

### 3.3.5 OMM a antiadhezní ochrana

Aby některé bakteriální, virové nebo protozoální patogeny mohly kolonizovat hostitele a vyvolat onemocnění, potřebují přilnout ke slizničním povrchům (Bode et Jantscher-Krenn, 2012). Nejčastěji dochází k připevnění patogenů na glykany přítomné na povrchu epitelu, které nazýváme glykokalyx. OMM jsou podobné některým z těchto glykanů a slouží jako rozpustné falešné receptory, které patogen blokuje (obr. 2) (Bode, 2015). Mléčné glykany váží viry, jako je HIV (Hong et al., 2009) či rotaviry (Huang et al., 2012), patogeny jako například *Vibrio cholerae*, *Salmonella fytis*, enteropatogenní i enterotoxigenní *Escherichia coli* (Coppa et al., 2006) a *Streptococcus pneumoniae* (Andersson et al., 1986). Bylo prokázáno, že různé frakce OMM mají odlišné funkce. Například fukosylované OMM blokuje vazbu *Campylobacter jejuni* na střevní buňky, zatímco sialované OMM zabraňuje adhezi *E. coli* na lidské erythrocyty (Smilowitz et al., 2014).



Obr.2.: Oligosacharidy působící jako rozpustné receptory zabraňující adhezi patogenů (Newburg, 1999; upraveno)

### 3.3.6 Imunomodulační účinky OMM

Jak již bylo řečeno, OMM jsou zodpovědné za změny ve složení střevní mikrobioty novorozence, což může mít vliv na imunitní systém kojence. Výsledky některých in vitro studií naznačují, že OMM jsou schopné přímo ovlivňovat imunitní odpovědi (Gnoth et al., 2001; Rudloff et al., 1996). OMM mohou působit lokálně jakožto součást takzvaného slizničního imunitního systému a přibližně 1 % oligosacharidů je absorbováno do oběhového systému, kde

mohou mít potenciální systémové účinky (Obermeier et al., 1999; Rudloff et al., 2012). Kunz et al. (1999) uvádí, že mnohé sialované a fukosylované OMM mohou mít významný vliv na progresi zánětlivé odpovědi. Sialované OMM také snižují produkci interleukinu 4 (IL-4) v leukocytech dospělých pacientů s alergií na arašídny, což poukazuje na skutečnost, že některé sialované OMM mohou pomáhat při prevenci alergií (Eiwegger et al., 2010).

### **3.3.7 Vliv OMM na epitelové buňky**

Angeloni et al. (2005) potvrdili, že OMM jsou schopné přímo modulovat buněčné imunitní odpovědi epiteliálních buněk střev, snižují růst buněk a indukují diferenciaci a apoptózu v kultivovaných buňkách střevního epitelu skrze pozměňování genů spojených s růstovým cyklem buňky. Další studie uvádějí, že OMM mohou působit na buňky střevního epitelu novorozence, ovlivňovat genovou expresi a pozměňovat průběh buněčného cyklu, stejně tak jako glykosylaci na povrchu buněk (Kuntz et al., 2008). OMM jsou absorbovány a následně vylučovány močí. Bylo zjištěno, že OMM snižují invazi uropatogenní *E. coli*, a to prostřednictvím interakce s buňkami močových cest a zvýšením jejich odolnosti proti napadení touto bakterií. Tyto účinky mají pouze některé oligosacharidy, například 3'-sialyllaktosa (Lin et al., 2014).

### **3.3.8 Role OMM při vývoji mozku**

Studie na zvířatech potvrdily, že kyselina sialová je důležitou živinou v pre- i postnatální fázi vývoje mozku (Carlson, 1985; Wang, 2012). Lidské mléko je důležitým zdrojem kyseliny sialové a posmrtné výzkumy na lidských novorozencích ukázaly, že koncentrace kyseliny sialové vázané na gangliosidy či proteiny jsou výrazně vyšší v mozcích kojených dětí ve srovnání s dětmi krmenými umělou výživou (Wang et al., 2003). Vedle sialovaných OMM obsahují kyselinu sialovanou i glykoproteiny a glykolipidy, ale ty představují pouze 1 % z celkového množství této kyseliny v lidském mléce (Wang et al., 2001).

### **3.3.9 Způsoby izolace OMM**

Pro analýzu struktury oligosacharidů mateřského mléka může být využito vícero technik. Mezi ně patří například vysoce účinná kapalínová chromatografie (HPLC), aniontová chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD), kapilární elektroforéza (CE) užívaná pro separaci vzorku a nukleární magnetická rezonance (NMR) či hmotnostní spektrometrie (MS) pro charakterizaci struktury (Wu et al., 2010). Metodu aniontové chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí popsali Kunz et al. (1996). Frakce neutrálních a kyselých

oligosacharidů byly odděleny pomocí chromatografie s iontovou výměnou a tyto frakce byly následně identifikovány za použití rozměrově vylučovací chromatografie. Kapilární elektroforéza byla speciálně vyvinuta pro studium kolísání počtu kyselých oligosacharidů u různých jedinců v průběhu laktace (Shen et al., 2000).

### 3.4 Oligosacharidy mléka dalších savců

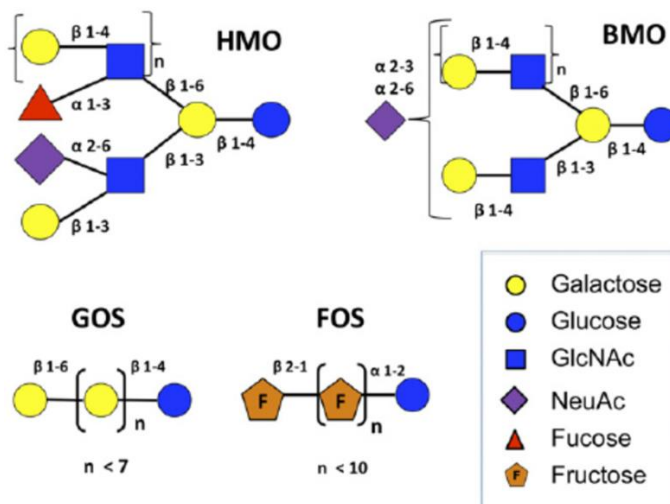
#### 3.4.1 Oligosacharidy kravského mléka

Množství oligosacharidů přítomných v kravském mléce je výrazně nižší než v mléce mateřském (Zivkovic et Barile, 2011), což je znázorněno v tabulce 3.

**Tabulka 3: Průměrný obsah oligosacharidů v lidském, kravském, kozím a ovčím mléce (Diana L Oliveira et al., 2015)**

	Lidské	Kravské	Ovčí	Kozí
Oligosacharidy (g/l)	8	0,03-0,06	0,02-0,04	0,25-0,30

Koncentrace oligosacharidů v kravském mléce se v průběhu laktace značně snižuje, zatímco u mateřského mléka je množství produkovaných oligosacharidů poměrně stabilní. Mateřské mléko obsahuje značné množství fukosylovaných oligosacharidů, kdežto kravské mléko tyto oligosacharidy obsahuje velmi zřídka. (Aldredge et al., 2013). Stavba mateřských a kravských oligosacharidů je znázorněna na obr. 3. Při analýze, kterou provedli Barile et al. (2009), bylo zjištěno, že z patnácti kyselých oligosacharidových struktur identifikovaných v kravském syrovátkovém permeátu jsou tři oligosacharidy shodné s OMM a z osmi neutrálních oligosacharidů jsou 4 rovněž přítomné v mateřském mléce.



Obr. 3.: Stavba oligosacharidů mateřského (HMO) a kravského (BMO) mléka (Zivkovic et Barile, 2011)

Zatímco lidské OMM obsahují přibližně 20% podíl sialovaných oligosacharidů, u mléka kravského sialované oligosacharidy zaujímají více než 50 % celkového množství oligosacharidů (Aldredge et al., 2013). Některé ze sialovaných oligosacharidů kravského mléka obsahují galaktosyllaktosu, která se nevyskytuje v žádných oligosacharidech mateřského mléka (Urashima et al., 2011). Funkce OMM a kravských oligosacharidů může být podobná, co se týče ochrany před patogeny. Volný trisacharid Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, který se nachází v kravském kolostru, inhibuje vazbu patogenních organismů, například *Clostridium difficile*, na střevní stěnu novorozenečků (Urashima et al., 1991).

Nedávné studie ukázaly, že oligosacharidy kravského mléka by mohly modulovat střevní mikrobioty vzhledem k tomu, že mohou disponovat schopností napodobovat složitější oligosacharidy mateřského mléka (Hakkarainen et al., 2005; Zivkovic et Barile, 2011).

### 3.4.2 Oligosacharidy kozího mléka

Kozí mléko obsahuje široké spektrum sialovaných a neutrálních oligosacharidů, které se podobají OMM více než oligosacharidy skotu či ovcí (Martinez-Ferez et al., 2006). Obsah fukosylovaných oligosacharidů je v mateřském mléce poměrně vysoký, zatímco u mléka kozího se vyskytují ve velmi malém množství (Albrecht et al., 2014). Dvě hlavní neutrální sacharidové struktury přítomné v kozím mléce jsou 3-galaktosyllaktosa, podobně jako u lidského či sloního mléka a N-acetylglukosaminyllaktosa, přičemž obě tyto struktury jsou v kozím mléce zastoupeny hojněji než v mléce kravském a ovčím (Martinez-Ferez et al., 2006). Sialované OMM obsahují pouze kyselinu N-acetylsialovou (Neu5Ac), kdežto kozí oligosacharidy obsahují jak kyselinu N-acetylsialovou, tak kyselinu N-glycolysialovou (Neu5Gc), a to v poměru 36 ku 64 (Thum et al., 2016). Celkový obsah oligosacharidů v kozím mléce se pohybuje v rozmezí 0,25 – 0,3 g/l, což je zhruba pětkrát více než v mléce ovcí a desetkrát více než v mléce skotu (Martinez-Ferez et al., 2006). Martinez-Ferez et al. (2004) zkoumali protizánětlivý účinek oligosacharidů kozího mléka. Jejich výzkum byl zaměřený na inhibici adheze monocytů v lidské pupečníkové žíle a výsledky ukázaly, že oligosacharidy kozího mléka skutečně mohou působit protizánětlivě u novorozenců stejně jako OMM. Daddaoua et al. (2006) provedli studii, která dokázala, že oligosacharidy kozího mléka slouží jako účinná prebiotika a působí protizánětlivě při zánětlivém onemocnění střev, a to především skrze inhibici adheze bakterií na epitelové membráně, snížením translokace bakterií v buněčných modelech a podporou selektivního růstu laktobacilů a bifidobakterií. Díky těmto skutečnostem jsou kozí oligosacharidy relativně vhodnou náhradou za mateřské oligosacharidy například v umělé kojenecké výživě (Oliveira et al., 2012).



### **3.4.3 Obsah oligosacharidů v dalších savčích mlécích**

Dokonce ani mléko primátů neobsahuje vyšší koncentrace oligosacharidů než mléko lidské. Urashima et al. (1999) stanovili obsah oligosacharidů v kolostru malpy hnědé 4 g/l, přičemž oligosacharidy mateřského kolostra zaujímají přibližně 20 g/l. Pět oligosacharidů z kolostra malpy bylo strukturně podobných oligosacharidům mateřského mléka.

Překvapivě vysoký obsah oligosacharidů byl nalezen ve sloním mléce, a to v rozmezí 11,8 – 15,2 g/l (Uemura et al., 2006), a v porovnání s OMM jsou některé oligosacharidy sloního mléka dokonce více sialované či fukosylované (Kunz et al., 1999)

Prasečí mléko obsahuje, stejně jako mléko kravské, především oligosacharidy sialované a obsah fukosylovaných oligosacharidů je velmi nízký či nulový (Tao et al., 2010)

## **4 Materiál a metody**

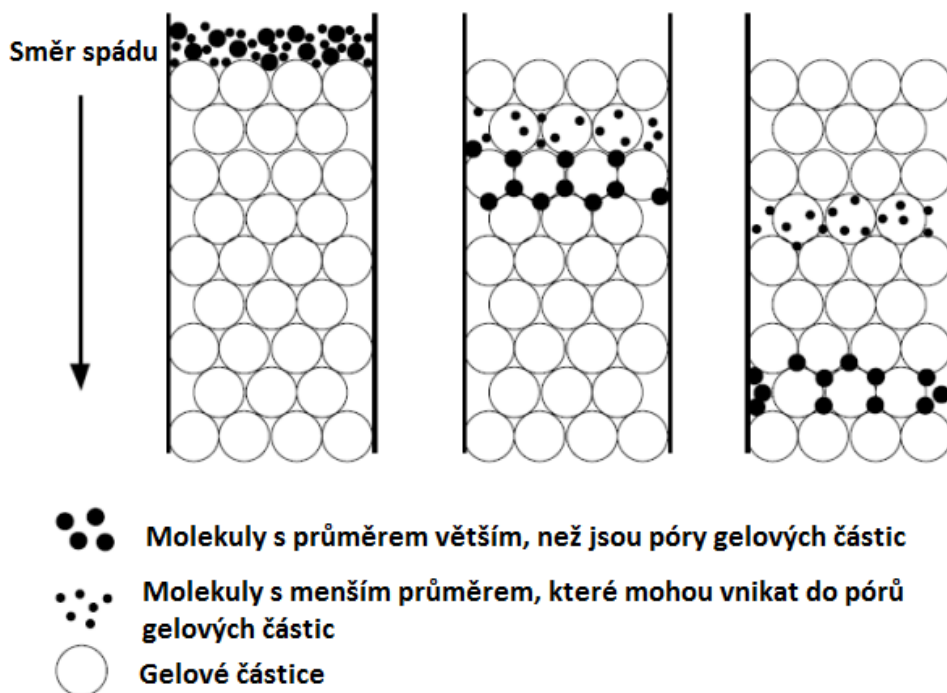
### **4.1 Izolace oligosacharidů z mléka**

#### **4.1.1 Příprava vzorků**

Oligosacharidy byly izolovány z kravské a kozí syrovátky za použití metody podle Warda et al. (2006), upraveno podle Ročkové a kol. (2011). Vzorek syrovátky byl centrifugován 1800 g při teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Odloučená svrchní vrstva tuku byla ihned po centrifugaci odebrána. Následně byl ke vzorku přidán čistý 96% etanol v poměru 2:1 (v/v) za účelem precipitace proteinů. Směs byla ponechána po dobu 24 hodin při 4 °C, následně znovu stočena 1800 g po dobu 30 minut při 4 °C a poté odpařena pod vakuem na objem zhruba 10 ml. Následovalo přidání 96 % etanolu v poměru 2:1 (v/v) a celý precipitační proces byl zopakován. Směs byla nadále vysrážena za použití etanolu, dichlormethanu a destilované vody v poměru 7 : 14 : 10 ml a 15 minut ponechána v mrazáku. Posledním krokem bylo odebrání zbylého proteinu, odpaření vzorku na vakuové odparce do sucha a následné rozpuštění v destilované vodě. Takto připravený vzorek byl aplikován na kolonu gelové permeační chromatografie.

#### **4.1.2 Aplikace vzorku na kolonu gelové permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie je separační metoda, která umožňuje rozdělit molekuly na základě jejich velikosti při průchodu porézní strukturou stacionární fáze v koloně (Holding, 2000). Molekuly s průměrem menším než je velikost pórů, difundují do vnitřní struktury gelu a jsou zde zadržovány déle než molekuly s větším průměrem, které jsou z kolony vymývány rychleji (Hagel, 1993)



Obr. 4.: Schéma průchodu molekul různé velikosti kolonou  
(<https://drgp.institute.wordpress.com/tag/chromatography/>; upraveno).

Vzorek byl aplikován na skleněnou kolonu o rozměrech 1,6 x 180 cm s průtokem 0,1 ml/min a stacionární fází Toyopearl HW-40F (Tosoh Bioscience, GmbH). Mobilní fází byla 1% kyselina octová. Frakce byly jímány sběračem frakcí Gilson FC 204 Fraction Collector (Gilson, Inc.) do 10 ml zkumavek po padesáti kapkách.

#### 4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Jednotlivé frakce a standardy glukosy a laktosy byly naneseny na hliníkovou destičku potaženou silikagelem (stacionární fáze) Alugram SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherley-Nagel GmbH & Co. KG). Jako mobilní fáze posloužil roztok isopropanolu, amoniaku a vody v poměru 5 : 1 : 2 (v/v). Následně byly destičky ponořeny do 15% (v/v) směsi koncentrované kyseliny sírové a 96% etanolu a poté zahřáty pomocí horkovzdušné pistole, čímž došlo k vizualizaci frakcí.

#### 4.1.4 Test na přítomnost proteinů podle Bradforda

Na základě tenkovrstvé chromatografie byly vybrány frakce obsahující oligosacharidy a následovalo stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda (Bradford, 1976). Byly použity standardy lidského sérového albuminu. Tato metoda je založena na interakci proteinů s brilantní modří G-250 v kyselém prostředí, čímž dochází ke změně barvy roztoku z červené na modrou. Čím je obsah proteinů vyšší, tím intenzivnější je modré zbarvení. Absorbance jednotlivých

vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru Tecan (Tecan Group Ltd.) při 595 nm a frakce s potvrzeným obsahem čistých oligosacharidů byly následně smíseny a lyofilizovány.

## 4.2 Kultivace bakterií na oligosacharidech

Byly použity vybrané kmeny bifidobakterií a laktobacilů, které jsou uvedeny v následujících tabulkách 3 a 4. Všechny kmeny pocházejí ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

**Tabulka 3: Použité kmeny bifidobakterií**

<b>Kmen</b>	<b>Původ</b>
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium breve</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	dospělec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium breve</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	dospělec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium breve</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i>	kojenec, stolice
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	tele, výkal
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	tele, výkal
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	kysaný mléčný výrobek
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	tele, výkal
<i>Bifidobacterium longum</i>	tele, výkal

**Tabulka 4: Použité kmeny laktobacilů**

<b>Kmen</b>	<b>Původ</b>
<i>Lactobacillus casei</i>	člověk, stolice
<i>Lactobacillus gasseri</i>	člověk, stolice
<i>Lactobacillus gasseri</i>	člověk, stolice
<i>Lactobacillus fermentum</i>	člověk, stolice
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	kysaný mléčný výrobek
<i>Lactobacillus ruminis</i>	skot, bachor
<i>Lactobacillus brevis</i>	člověk, stolice

Jako nosné médium pro bakterie bylo použito médium se složením uvedeným v tabulce 5, do kterého byly oligosacharidy přidány v 1% (w/v) množství. Dále bylo jako kontrolní použito médium Wilkins-Chalgren broth obsahující glukosu jako zdroj uhlíku. Bakterie i médium byly naočkovány do mikrotitrační destičky a inkubovány v anaerostatu při 37 °C po dobu 24 hodin v anaerobní atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Následně byly kultivačně stanoveny počty bakterií na začátku pokusu (inokulum) a po 24 hodinách. Dále byl pomocí přístroje Reflectoquant (Merck) změřen obsah laktátu a hodnota pH. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny statistickým programem Statgraphics Centurion Plus v. 5.1. za použití jednorozměrné analýzy rozptylu s pomocí Duncanova testu.

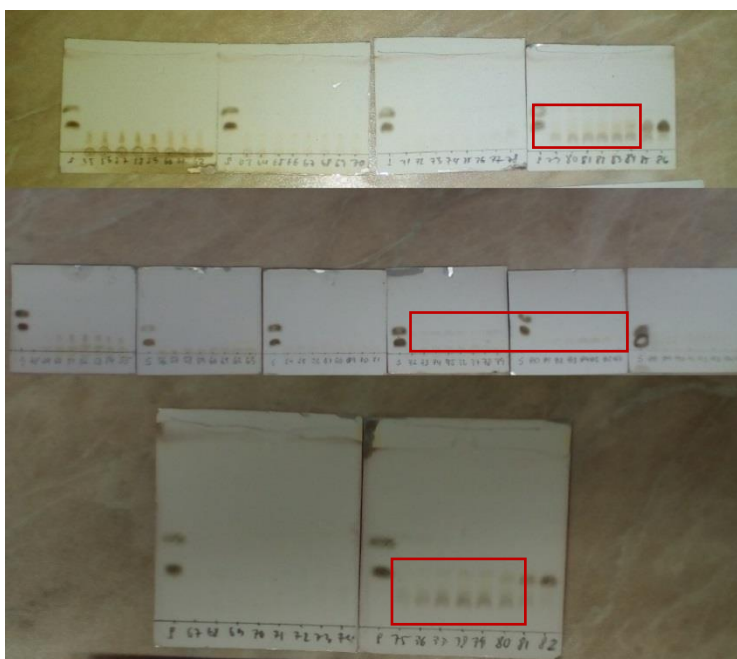
**Tabulka 5: Složení média pro oligosacharidy**

<b>Množství g/l</b>	<b>Složka</b>
10	trypton
5	kvasničný extrakt
1	pyruvát sodný
1	Tween 80
0,5	cystein

## 5 Výsledky

### 5.1 Izolace oligosacharidů z kravské a kozí syrovátky

Izolace oligosacharidů byla provedena na koloně gelové permeační chromatografie a potvrzena pomocí tenkovrstvé chromatografie (obr. 5.). Vybrané frakce s oligosacharidy byly podrobeny Bradfordovu testu na přítomnost proteinů (obr. 6.). Detekčním limitem tohoto testu je obsah proteinu menší než 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Frakce splňující toto kritérium byly uznány jako obsahující výlučně oligosacharidy, byly smíseny a následně zlyofilizovány.



Obr. 5.: Ukázka TLC oligosacharidů získaných z kravské syrovátky. Červeně označené frakce pravděpodobně obsahují oligosacharidy (foto autor, 2016).



Obr. 6.: Výsledek Bradfordova testu na přítomnost proteinů. V prvním řádku jsou umístěny standardy. Čím je modré zbarvení intenzivnější, tím vyšší je obsah proteinů (foto autor, 2016).

## 5.2 Kultivace střevních bakterií na oligosacharidech

### 5.2.1 Bifidobakterie

V tabulce 6 jsou uvedeny kmeny testovaných bifidobakterií. Dále jsou zde uvedeny počty bakterií na začátku pokusu a po 24 h kultivace na kravských oligosacharidech (kráva A, kráva B, kráva C), neselektivním médiu s glukosou (kontrola) a na vzorku, který oligosacharidy neobsahoval vůbec (bez sacharidů). Kravské bifidobakterie jsou vyznačeny šedou barvou, zbývající jsou původu lidského. V tabulce 7 jsou pak stejným způsobem zaneseny hodnoty pro kultivaci lidského kmene *Bifidobacterium breve* na kozích oligosacharidech (koza A,B).

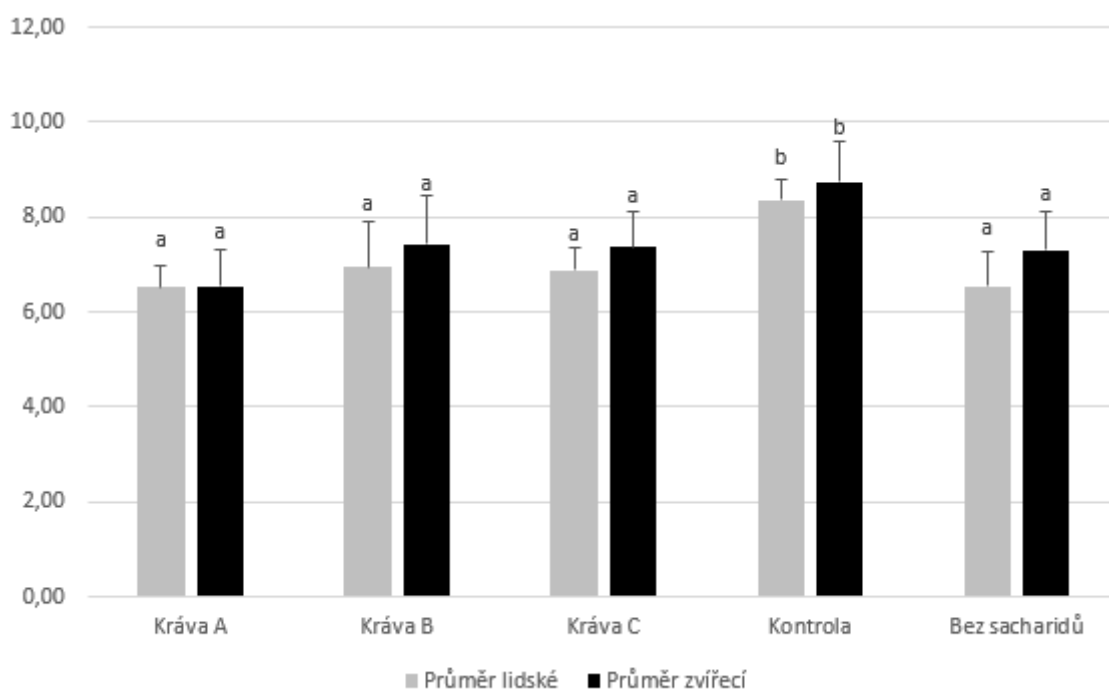
**Tabulka 6: Růst bifidobakterií na kravských oligosacharidech**

Kmen	Log CFU					
	0 h	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kon- trola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium longum</i>	4,52	7,10	7,31	7,11	8,59	7,08
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	5,49	4,86	5,81	5,81	7,72	5,58
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,14	5,81	7,01	7,31	8,19	7,19
<i>Bifidobacterium longum</i>	5,84	7,27	7,41	7,40	8,52	7,01
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,63	6,72	6,69	6,68	8,28	6,49
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,50	6,25	6,70	6,56	7,85	6,41
<i>Bifidobacterium breve</i>	6,20	6,78	6,65	6,30	8,29	5,59
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,54	6,95	6,80	6,58	7,34	5,36
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	6,31	6,70	6,86	6,78	6,60	6,26
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,12	6,68	6,82	6,80	8,76	6,59
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,07	6,72	6,88	6,97	9,47	6,39
<i>Bifidobacterium breve</i>	5,68	7,79	7,41	7,41	9,19	7,12
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	5,12	4,80	6,35	6,42	7,41	6,31
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	6,20	4,41	6,88	7,14	8,39	7,10
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,08	6,90	7,30	7,04	9,01	6,66
<i>Bifidobacterium breve</i>	5,45	7,58	7,86	7,53	8,89	7,00
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	5,89	7,21	7,35	7,21	8,85	6,82
<i>Bifidobacterium longum</i>	5,46	7,00	7,11	6,99	9,23	6,65
<i>Bifidobacterium longum</i>	5,75	7,36	8,63	8,79	9,45	8,87
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	5,54	6,06	6,56	6,65	7,38	6,53
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	6,18	4,98	7,29	7,30	9,24	7,04
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	4,53	7,01	7,36	6,93	8,82	7,02
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	4,48	7,35	7,31	7,15	8,83	7,10

**Tabulka 7: Růst *Bifidobacterium breve* na kozích oligosacharidech**

Kmen	Log CFU				
	0h	Koza A	Koza B	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium breve</i>	5,57	6,53	6,91	8,76	6,38

Žádný z kmenů bifidobakterií nebyl schopen využívat kravské oligosacharidy jako zdroj energie. Podle statistického vyhodnocení v programu Statgraphics Plus v. 5. 1. se významně lišil nárůst pouze v kontrolním médiu s glukosou ( $P < 0,01$  pro bifidobakterie lidského původu;  $P < 0,05$  pro bifidobakterie zvířecího původu), což je znázorněno v grafu 1. Bakterie *Bifidobacterium breve* rovněž nebyla schopna kozí oligosacharidy využívat.



Graf 1.: Porovnání růstu lidských a kravských bifidobakterií na neselektivním médiu s glukosou (kontrola), substrátu s kravskými oligosacharidy (kráva A, B, C) a bez oligosacharidů (bez sacharidů) včetně údajů ze statistického vyhodnocení (a, b). Na ose Y jsou zaneseny hodnoty log CFU.

V následujících tabulkách jsou přehledy naměřeného množství kyseliny mléčné produkované bifidobakteriemi po 24 hodinách kultivace na kravských (tabulka 8) a kozích (tabulka 9) oligosacharidech, neselektivním médiu s glukosou (kontrola) a na substrátu bez oligosacharidů (bez sacharidů). Kyselina mléčná vzniká jako vedlejší produkt při fermentaci oligosacharidů. Šedě vyznačené bakterie jsou kravského původu, ostatní jsou původu lidského.

V tabulce 10 (kravské oligosacharidy) a 11 (kozí oligosacharidy) jsou naměřené hodnoty pH po 24 hodinách kultivace. Snížené pH značí aktivitu bakterií. V grafech 2 a 3 jsou zaneseny



výsledky statistického vyhodnocení pro produkci laktátu bakteriemi a hodnotu pH na konci kultivace.

**Tabulka 8: Produkce laktátu bifidobakteriemi na kravských oligosacharidech**

Kmen	Laktát (mg/l)				
	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,8	5,0	3,3	600,0	13,0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	12,1	6,4	15,7	730,0	9,2
<i>Bifidobacterium breve</i>	5,7	8,1	4,5	2990,0	8,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	7,5	6,9	5,3	2080,0	7,7
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	12,4	10,5	9,5	1910,0	16,5
<i>Bifidobacterium longum</i>	11,4	10,0	6,5	1670,0	9,8
<i>Bifidobacterium longum</i>	7,2	13,1	9,1	1620,0	8,0
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	8,9	21,4	21,2	1460,0	15,0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	22,8	18,3	17,0	910,0	16,2
<i>Bifidobacterium longum</i>	13,1	9,3	11,4	1730,0	8,5
<i>Bifidobacterium breve</i>	14,2	5,0	7,6	970,0	8,8
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	5,0	13,9	13,8	840,0	12,6
<i>Bifidobacterium longum</i>	5,9	7,7	7,8	480,0	9,9
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	14,7	10,6	8,9	750,0	13,6
<i>Bifidobacterium longum</i>	12,8	326,0	417,0	1650,0	135,0
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	8,9	10,9	9,9	356,0	7,5
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	10,6	8,3	10,8	870,0	8,6
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	8,3	9,0	8,1	663,0	6,5

**Tabulka 9: Produkce laktátu bifidobakteriemi na kozích oligosacharidech**

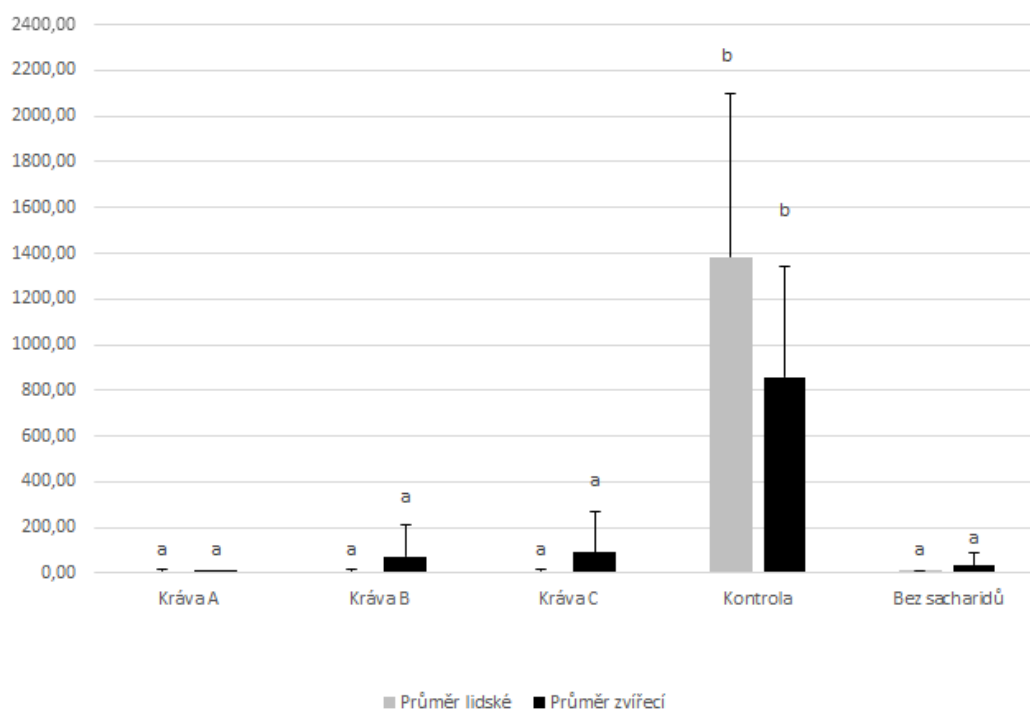
Kmen	Laktát (mg/l)			
	Koza A	Koza B	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium breve</i>	58,0	57,0	1280,0	66,0

**Tabulka 10: Naměřené hodnoty pH po 24 h kultivace na kravských oligosacharidech**

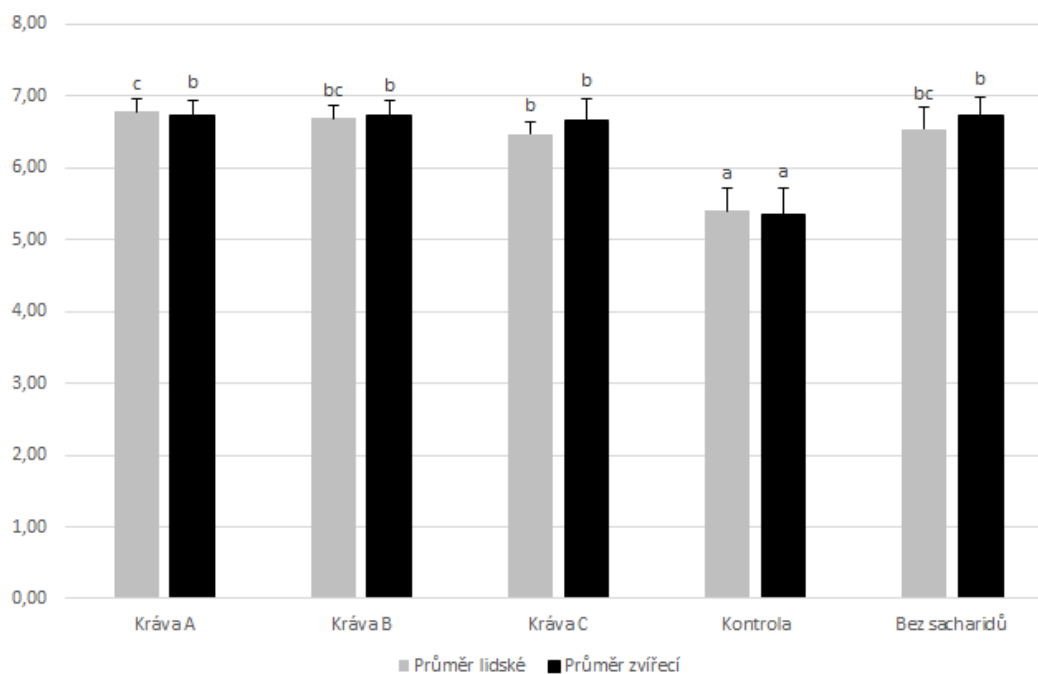
Kmen	Hodnota pH				
	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6,6	6,7	6,6	5,7	6,5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6,8	6,9	6,6	5,6	7,0
<i>Bifidobacterium breve</i>	6,7	6,6	6,8	6,1	7,0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6,6	6,5	6,6	5,6	6,8
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	7,0	6,6	6,5	5,2	6,4
<i>Bifidobacterium longum</i>	7,1	6,9	6,4	5,4	6,4
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,8	6,6	6,4	5,1	6,3
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	6,9	6,7	6,6	5,6	7,0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	6,6	6,8	6,4	5,0	6,5
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,6	6,9	6,4	5,3	6,5
<i>Bifidobacterium breve</i>	6,9	6,4	6,3	5,2	6,2
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	6,9	6,5	6,4	5,1	6,1
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,6	6,9	6,2	5,3	6,3
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	7,1	6,8	6,9	6,0	6,8
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,6	7,0	7,2	5,0	7,2
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	6,9	7,1	6,6	5,5	6,7
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	6,7	6,6	6,4	5,3	6,5
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	6,4	6,2	6,2	4,9	6,4

**Tabulka 11: Naměřené hodnoty pH po kultivaci na kozích oligosacharidech**

Kmen	Hodnota pH			
	Koza A	Koza B	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Bifidobacterium breve</i>	7,0	6,9	5,0	6,5



Graf 2.: Produkce kyseliny mléčné bifidobakteriemi na kravských oligosacharidech (kráva A, B, C), kontrolním médiu s glukosou (kontrola) a substrátu bez sacharidů. Dále jsou zde zanesené údaje ze statistického vyhodnocení (a, b). Na ose Y je obsah kyseliny mléčné v g/l.



Graf 3.: Hodnota pH na konci kultivace bifidobakterií na kravských oligosacharidech (kráva A, B, C), kontrolním médiu s glukosou (kontrola) a substrátu bez sacharidů včetně hodnot ze statistického vyhodnocení (a, b, bc, c). Na ose Y jsou zaneseny hodnoty pH.

Žádný z bakteriálních kmenů nesnižoval v médiu s oligosacharidy pH ani neprodukoval vysoké množství kyseliny mléčné, což potvrzuje, že tyto bakterie nebyly schopné kravské, ani kozí oligosacharidy využívat, což bylo také potvrzeno statistickým vyhodnocením, které prokázalo, že jak bifidobakterie lidského, tak bifidobakterie zvířecího pH v médiu s oligosacharidy nesnižovaly ( $P < 0,01$ ), tedy že oligosacharidy nerozkládaly.

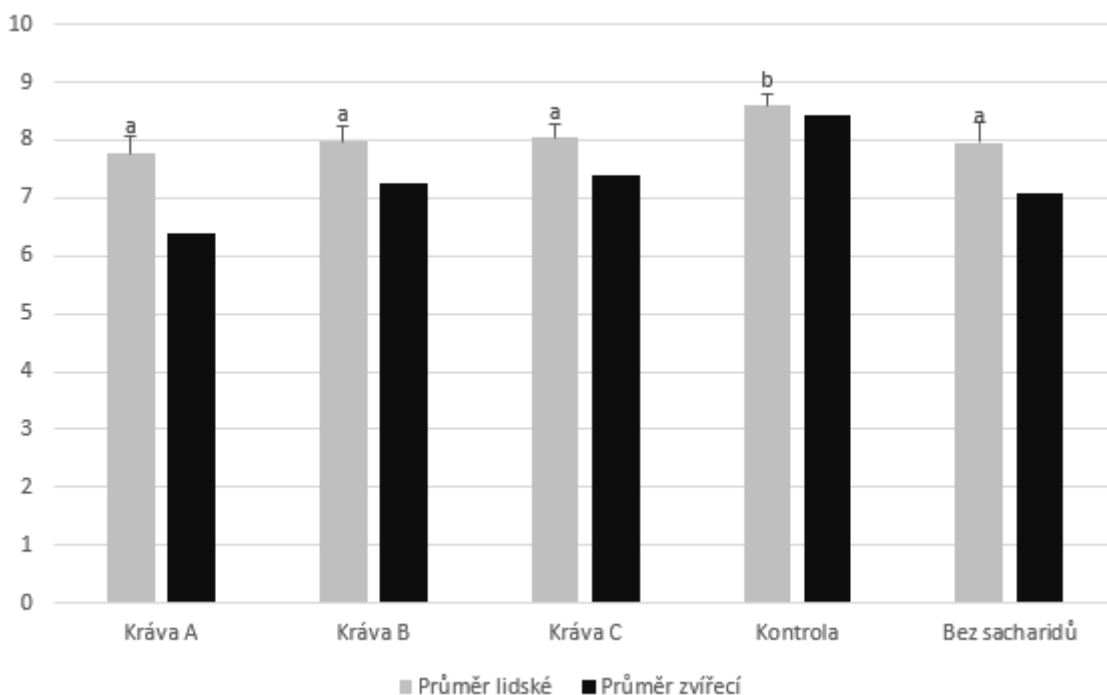
### 5.2.2 Laktobacily

V tabulce 12 jsou uvedeny kmeny testovaných laktobacilů. Dále jsou zde uvedeny počty bakterií při 0 h a po 24 h kultivace na kravských oligosacharidech (kráva A, kráva B, kráva C), neselektivním médiu s glukosou (kontrola) a na vzorku, který oligosacharidy neobsahoval vůbec (bez sacharidů). Šedě jsou opět označeny laktobacily kravského původu, ostatní laktobacily jsou původu lidského.

**Tabulka 12: Růst laktobacilů na kravských oligosacharidech**

Kmen	Log CFU					
	0 h	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Lactobacillus casei</i>	6,29	7,81	8,24	8,20	8,89	8,97
<i>Lactobacillus gasseri</i>	6,23	7,72	7,87	7,90	8,89	7,72
<i>Lactobacillus gasseri</i>	6,65	7,92	8,02	8,14	8,18	7,77
<i>Lactobacillus fermentum</i>	6,90	7,36	7,63	7,76	8,78	7,53
<i>Lactobacillus brevis</i>	6,20	8,04	8,14	8,19	8,23	7,76
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	4,97	7,62	8,18	8,25	8,96	8,18
<i>Lactobacillus ruminis</i>	5,92	5,18	6,34	6,55	7,90	5,98

Ani kmeny laktobacilů nebyly schopné růst na kravských oligosacharidech. Ze statistického vyhodnocení provedeného u lidských laktobacilů vyplývá, že odlišné hodnoty byly naměřeny pouze u kontrolního média s glukosou ( $P < 0,05$ ; graf 4). Pro statistické vyhodnocení růstu kravských laktobacilů nebyl nasbírán dostatečný počet dat.



Graf 4.: Porovnání růstu laktobacilů lidského a zvířecího původu na kravských oligosacharidech (kráva A, B, C), médiu bez oligosacharidů (bez sacharidů) a neselektivním médiu s glukosou (kontrola). Dále jsou v grafu zaneseny výsledky statistického šetření pro lidské laktobacily (a, b). Na ose Y jsou zaneseny hodnoty log CFU

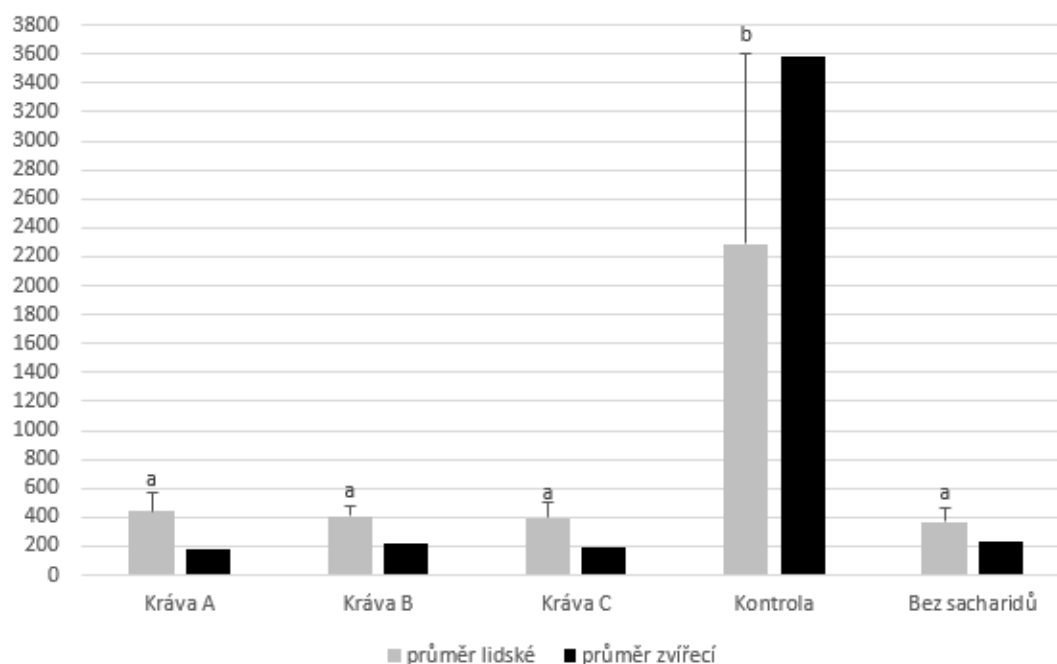
V tabulce 13 je přehled naměřeného obsahu kyseliny mléčné produkované laktobacily po 24 hodinách kultivace na kravských oligosacharidech. Z tabulky je zřejmé, že bakterie neprodukovaly vysoké množství laktátu v porovnání s kontrolním médiem, což značí, že nebyly schopné kravské oligosacharidy využívat s přihlédnutím na skutečnost, že množství laktátu bylo statisticky srovnatelné i v médiu bez sacharidů (graf 5). V tabulce 14 jsou pak zaneseny hodnoty pH naměřené po 24 hodinách kultivace na kravských oligosacharidech. Vysoké hodnoty pH potvrzují, že laktobacily nebyly schopné pH snižovat, tedy využívat kravské oligosacharidy jako zdroj energie. Statistické vyhodnocení pH na konci kultivace je znázorněno v grafu 6.

**Tabulka 13: Produkce laktátu laktobacily na kravských oligosacharidech**

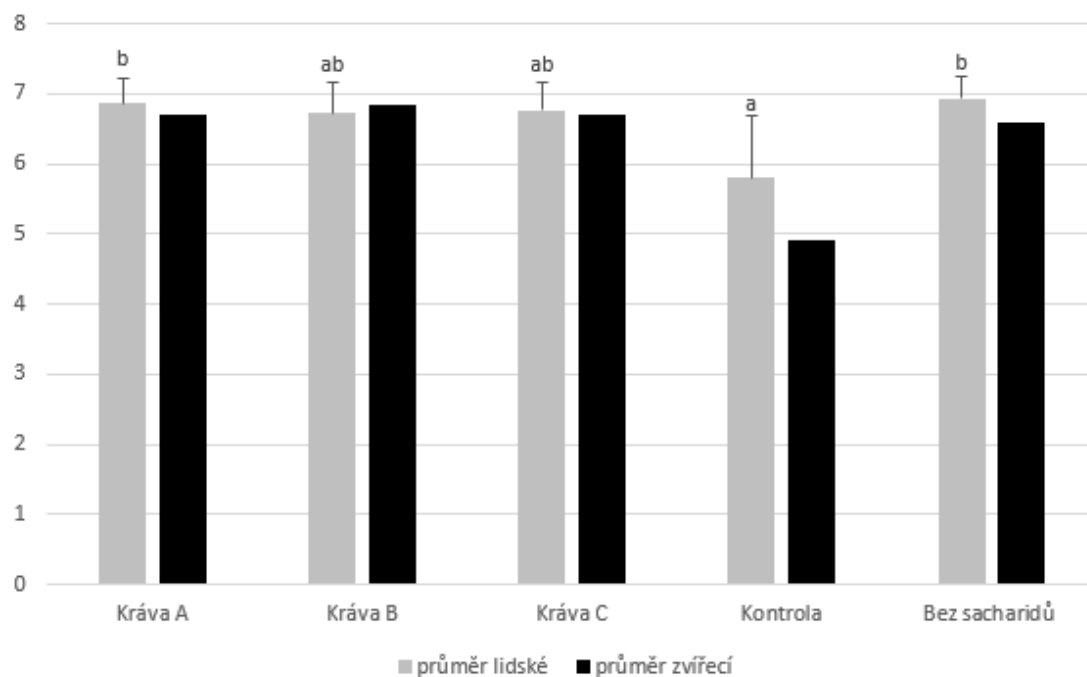
Kmen	Laktát (mg/l)				
	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Lactobacillus brevis</i>	600,0	492,0	570,0	2960,0	492,0
<i>Lactobacillus casei</i>	518,0	446,0	393,0	600,0	391,0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	374,0	381,0	317,0	2870,0	303,0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	449,0	422,0	397,0	3760,0	419,0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	258,0	307,0	293,0	1250,0	245,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	344,0	425,0	354,0	4640,0	443,0
<i>Lactobacillus ruminis</i>	21,2	19,7	27,9	2540,0	18,7

**Tabulka 14: Naměřené hodnoty pH po 24 h kultivace na kravských oligosacharidech**

Kmen	Hodnota pH				
	Kráva A	Kráva B	Kráva C	Kontrola	Bez sacharidů
<i>Lactobacillus brevis</i>	7,2	7,2	7,2	6,6	7,1
<i>Lactobacillus casei</i>	6,9	6,6	6,5	6,1	7,2
<i>Lactobacillus gasseri</i>	6,5	6,3	6,3	4,8	6,5
<i>Lactobacillus gasseri</i>	6,5	6,3	6,6	4,9	6,7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	7,2	7,2	7,2	6,6	7,2
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	6,5	6,7	6,4	5,1	6,3
<i>Lactobacillus ruminis</i>	6,9	7,0	7,0	4,7	6,9



Graf 5.: Produkce kyseliny mléčné laktobacily na kravských oligosacharidech (kráva A, B, C), substrátu bez oligosacharidů (bez sacharidů) a kontrolním médiu s glukosou (kontrola). Dále jsou v grafu zaneseny výsledky statistického vyhodnocení pro produkci laktátu lidskými laktobacily (a, b). Na ose Y je obsah kyseliny mléčné v g/l.



Graf 6.: Hodnota pH na konci kultivace laktobacilů na kravských oligosacharidech (kráva A, B, C), kontrolním médiu s glukosou (kontrola) a substrátu bez sacharidů včetně výsledků statistického vyhodnocení pH pro lidské laktobacily (a, ab, b). Na ose Y jsou zaneseny hodnoty pH.

Statistická vyhodnocení pro hodnoty pH a laktát znovu prokázaly, že se významně liší pouze hodnoty pro růst lidských laktobacilů na neselektivním médiu s glukosou ( $P < 0,01$ ). Statistické šetření pro laktobacily kozího původu nebylo provedeno z důvodu nedostatečného počtu dat.

## 6 Diskuse

### 6.1 Izolace oligosacharidů ze syrovátky

Oligosacharidy byly, ač v malém množství, úspěšně vyizolovány z kravské a kozí syrovátky. Z Bradfordova testu na proteiny (Bradford, 1976) je zřejmé, že téměř všechny frakce byly proteinů zbaveny poměrně dobře. Frakcí obsahujících oligosacharidy bylo však v porovnání s mateřským mlékem velmi málo, což koresponduje s poznatky odborné literatury (Oliveira et al., 2015; Zivkovic et Barile, 2011), že obsah oligosacharidů v kravském i kozím mléce je výrazně nižší než v mléce mateřském.

### 6.2 Kultivace střevních bakterií na oligosacharidech

#### 6.2.1 Bifidobakterie

Použité kmeny bifidobakterií lidského i kravského původu neprokázaly růstovou aktivitu na oligosacharidech kravského mléka. Hodnoty log CFU pro růst na kravských oligosacharidech jsou téměř totožné s hodnotami pro růst bakterií na substrátu, který neobsahoval žádné sacharidy, což potvrzuje neschopnost bifidobakterií kravské oligosacharidy využívat jako zdroj energie. Navíc bakterie takřka neprodukovaly ani kyselinu mléčnou a nedocházelo ani k poklesu pH, který by byl právě důsledkem tvorby laktátu. Kmen *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* kravského původu narostl průměrně o více než 3 log CFU, tedy na 7,1 log CFU. Podobná hodnota však byla naměřena i pro růst na substrátu bez oligosacharidů, což naznačuje, že daný kmen oligosacharidy nevyužíval. Velmi podobně je tomu i u ostatních kmenů kravských bifidobakterií *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium longum*, které sice za 24 hodin mírně zvýšily své počty, ale hodnoty růstu na samotném médiu bez sacharidů jsou dokonce vyšší než pro průměrný růst na kravských oligosacharidech.

*Bifidobacterium longum* lidského původu narostl z počátečních 5,7 log CFU na 7 log CFU, nicméně hodnota pro růst na substrátu, ve kterém oligosacharidy nejsou, 6,8 log CFU značí, že ani tento kmen nebyl schopen kravské oligosacharidy využít. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* nezvýšil své počty vůbec. Kmen *Bifidobacterium bifidum* lidského původu své počty za 24 hodin navýšil o přibližně 1 log CFU, ale podle naměřených hodnot růstu na médiu bez oligosacharidů taktéž nebyl schopen oligosacharidy kravského původu využít. Růstová aktivita na médiu s oligosacharidy nebyla zaznamenána ani u kmenů *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium breve*, jelikož jejich počty jsou v médiu s oligosacharidy i bez



nich téměř stejné. U bakteriálního kmene *Bifidobacterium pseudolongum* je sice průměrná hodnota pro růst na substrátu s oligosacharidy o 0,5 log CFU vyšší, než pro růst na médiu bez oligosacharidů, nicméně statistická nevýznamnost, vysoké pH a nízké množství naměřeného laktátu naznačují, že tento kmen taktéž kravské oligosacharidy nevyužíval.

Ani kozí oligosacharidy nebyly využity bakterií *Bifidobacterium breve*, která je lidského původu, jelikož hodnoty log CFU pro růst na kozích oligosacharidech a médiu bez oligosacharidů jsou téměř stejné. *Bifidobacterium breve* ani neprodukovala velké množství laktátu a nesnižovala hodnotu pH. Nicméně potřebujeme získat více výsledků z kultivací na oligosacharidech kozího mléka, abychom komplexně ověřili jejich případný prebiotický efekt.

### 6.2.2 Laktobacily

Ani laktobacily nebyly schopné využívat kravské oligosacharidy jakožto zdroj uhlíku. *Lactobacillus ruminis* kravského původu nikterak nezvýšil hodnotu log CFU po 24 hodinách na kravských oligosacharidech a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* sice narostl v průměru o 3 řády, ale mezi log CFU na kravských oligosacharidech a na médiu bez oligosacharidů není žádný znatelný rozdíl.

U lidských kmenů *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus fermentum* je, stejně jako u laktobacilů zvířecího původu, průměrná hodnota log CFU pro růst na substrátu bez oligosacharidů a substrátu s kravskými oligosacharidy téměř stejná. *Lactobacillus brevis* sice vyrostl na kravských oligosacharidech o několik desetin log CFU více než na médiu, které oligosacharidy neobsahovalo, ale naměřené pH 7,2 a nepříliš vysoký obsah kyseliny mléčné napovídají, že tento kmen taktéž nebyl schopný využívat oligosacharidy kravského mléka. Posledním testovaným bakteriálním kmenem byl *Lactobacillus casei*, který rovněž nebyl schopný kravské oligosacharidy využít.

Skutečnost, že žádný kmen bifidobakterií ani laktobacilů nebyl schopný využít oligosacharidy, je v souladu s výzkumem, který provedl György (1953) a zjistil, že takzvaný „bifidus faktor“, který slouží jako substrát pro probiotické bakterie, se v mléce přežvýkavců nachází velmi zřídka či vůbec. Dalším aspektem ovlivňujícím využívání oligosacharidů bifidobakteriemi a laktobacily může být samotná struktura oligosacharidů, k jejímuž rozštěpení je potřeba velmi specifických metabolických drah a která se v mateřském a kravském mléce výrazně liší (Albrecht et al., 2014; Grönberg et al., 1992;). Sialované oligosacharidy v kravském mléce například obsahují galaktosyllaktosu, která se v mateřském mléce nevyskytuje (McGuire et al., 2017). Je tedy pravděpodobné, že střevní bakterie tyto kravské oligosacharidy využívat neumí. Vzhledem k tomu, že bakterie zvířecího, ani lidského původu nevyužívaly

oligosacharidy kravského mléka by se dalo předpokládat, že tyto oligosacharidy nemají prebiotický účinek a tudíž nelze doporučit jejich přidávání do kojeneckých výživ.

## **7 Závěr**

Oligosacharidy byly vyizolovány z kravské i kozí syrovátky na koloně gelové permeační chromatografie.

Po kultivaci bylo zjištěno, že bifidobakteie ani laktobacily jak lidského, tak kravského původu nebyly schopné využívat oligosacharidy kravského mléka jako zdroj uhlíku.

Předem stanovená hypotéza byla z části potvrzena, jelikož zvířecí oligosacharidy nepodporovaly růst stejných bakterií jako oligosacharidy mateřského mléka. Zároveň ale nebyla nalezena žádná bakterie, která by byla schopná kravské oligosacharidy využít.

Ze získaných výsledků usuzuji, že oligosacharidy kravského mléka nemají prebiotický účinek ani pro lidské, ani pro kravské střevní bakterie a jejich funkce tak musí být podrobena dalšímu výzkumu.

## 8 Seznam literatury

- Adámková, V. 2010. Tuky a jejich vliv na kardiovaskulární aparát. *Interní medicína pro praxi*. 12 (2). 63–66.
- Albrecht, S., Lane, J. A., Marino, K., Al Busadah, K. A., Carrington, S. D., Hickey, R. M., Rudd, P. M. 2014. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *British Journal of Nutrition*. 111 (7). 1313–1328.
- Aldredge, D. L., Geronimo, M. R., Hua, S., Nwosu, C. C., Lebrilla, C. B., Barile, D. 2013. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology*. 23 (6). 664–676.
- Ambrosoli, R., di Stasio, L., Mazzocco, P. 1988. Content of  $\alpha$ s1-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 71 (1). 24–28.
- Andersson, B., Porras, O., Hanson, L. Å., Lagergård, T., Svanborg-Edén, C. 1986. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *Journal of Infectious Diseases*. 153 (2). 232–237.
- Andreas, N. J., Kampmann, B., Le-Doare, K. M. 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 91 (11). 629–635.
- Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., Sprenger, N. 2005. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology*. 15 (1). 31–41.
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., Kitaoka, M. 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (40). 34583–34592.
- Ballard, O. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60 (1). 49–74.
- Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C. B., Coisson, J.-D., Arlorio, M., German, J. B. 2009. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 19 (9). 524–530.
- Bode, L. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*. 91 (11). 619–622.
- Bode, L., Jantscher-Krenn, E. 2012. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 3 (3). 383–391.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2). 248–254.
- Brand-Miller, J. C., McVeagh, P., McNeil, Y., Messer, M. 1998. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *The Journal of Pediatrics*. 133 (1). 95–98.

- Calvo, M. M. 2002. Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropeptide formation. *European Food Research and Technology*. 214 (3). 182–185.
- Carlson, S. E. 1985. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 41 (4). 720–726.
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., Sampelayo, M. R. S. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22 (4). 322–329.
- 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.
- Coppa, G. V, Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Ficcadenti, A., Padella, L., Santoro, L., Soldi, S., Carlucci, A., Bertino, E. 2011. Oligosaccharides in 4 different milk groups, Bifidobacteria, and Ruminococcus obeum. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 53 (1). 80–87.
- Coppa, G. V, Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., Gabrielli, O. 1999. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica*. 88 (430). 89–94.
- Coppa, G. V, Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti, R., Orazio, G. 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: Escherichia coli, Vibrio cholerae, and Salmonella fyris. *Pediatric Research*. 59 (3). 377–382.
- Coppa, G. V, Zampini, L., Galeazzi, T., Gabrielli, O. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*. 38 . 291–294.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., de Medina, F. S., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Boza, J. J., Martínez-Augustin, O. 2006. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of Nutrition*. 136 (3). 672–676.
- De Leoz, M. L. A., Wu, S., Strum, J. S., Niñonuevo, M. R., Gaerlan, S. C., Mirmiran, M., German, J. B., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., Underwood, M. A. 2013. A quantitative and comprehensive method to analyze human milk oligosaccharide structures in the urine and feces of infants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405 (12). 4089–4105.
- Eiwegger, T., Stahl, B., Haidl, P., Schmitt, J., Boehm, G., Dehlink, E., Urbanek, R., Szépfalusi, Z. 2010. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric Allergy and Immunology*. 21 (8). 1179–1188.
- El-Agamy, E. I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*. 68 (1). 64–72.

- El-Zeini, H. M. 2006. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 15 (2). 147.
- Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*. 131 (3). 207–225.
- Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., Daniel, H. 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71 (6). 1589–1596.
- FAO 2013. Milk and dairy products in human nutrition. *Milk and Dairy Products in Human nutrition*. p. 404. ISBN: 9789251078631. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>
- Filion, M. M. 2006. Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. PhD Thesis. Université Laval.
- Forsum, E., Lönnerdal, B. 1980. Effect of protein intake on protein and nitrogen composition of breast milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33 (8). 1809–1813.
- German, J., Freeman, S., Lebrilla, C., Mills, D. 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. In: *Personalized Nutrition for the Diverse Needs of Infants and Children*. 62. 205–222. Karger Publishers. ISBN: 3805585543.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125 (6). 1401.
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of Nutrition*. 130 (12). 3014–3020.
- Gnoth, M. J., Rudloff, S., Kunz, C., Kinne, R. K. H. 2001. Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (37). 34363–34370.
- Grandison, A. 1986. Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheesemaking. *Dairy Industries International*. 51. 21.
- Greppi, G. F. 2008. Protein Components of Goat's Milk. *Dairy goats feeding and nutrition*. 2. 71–94.
- Grönberg, G., Lipniunas, P., Lundgren, T., Lindh, F., Nilsson, B. 1992. Structural analysis of five new monosialylated oligosaccharides from human milk. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 296 (2). 597–610.
- Guetouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2 (10). 115–122.
- György, P. 1953. A hitherto unrecognized biochemical difference between human milk and cow's milk. *Pediatrics*. 11 (2). 98–108.

- György, P., Norris, R. F., Rose, C. S. 1954. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 48 (1). 193–201.
- Haenlein, G. F. W. 1993. Producing quality goat milk. *International Journal of Animal Sciences*. 8 . 85.
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51 (2). 155–163.
- Hagel, L. 1993. Size-exclusion chromatography in an analytical perspective. *Journal of Chromatography A*. 648 (1). 19–25.
- Hakkarainen, J., Toivanen, M., Leinonen, A., Frängsmyr, L., Strömberg, N., Lapinjoki, S., Nassif, X., Tikkanen-Kaukanen, C. 2005. Human and bovine milk oligosaccharides inhibit *Neisseria meningitidis* pili attachment in vitro. *The Journal of Nutrition*. 135 (10). 2445–2448.
- Hambraeus, L. 1984. Human milk composition. In: *Nutr Abstr Rev*. 54. 219–236.
- Holding, S. 2000. Mechanisms: Size Exclusion Chromatography. Academic Press. 718–726. Dostupné z: <http://cnqzu.com/library/Anarchy Folder/Chemistry/Crystalization, Purification, Separation/Encyclopedia of Separation Science/Level II - Methods and Instrumentation/CHROMATOGRAPHY - LIQUID/Mechanisms- Size Exclusion Chromatography.pdf>
- Hong, P., Ninonuevo, M. R., Lee, B., Lebrilla, C., Bode, L. 2009. Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *British Journal of Nutrition*. 101 (4). 482–486.
- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., Jiang, X. 2012. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *Journal of Virology*. 86 (9). 4833–4843.
- Chawre, S. V., Shinde, V. S., Kabra, P. R., Raut, D., Bhivgade, H. S. 2014. Therapeutic and Nutritional Significance of Dugdha (Milk) With Reference To Cow's Milk. *International Research Journal of Pharmacy*. 5 (6). 449–453.
- Chichlowski, M., Guillaume De Lartigue, J., Raybould, H. E., Mills, D. A. 2012. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 55 (3). 321.
- Iyengar, G. V 1982. Elemental composition of human and animal milk. Vienna, International Atomic Energy Agency.
- Jandal, J. M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22 (2). 177–185.
- Jennes, R., Parkash, S. 1971. Lack of a Globule Clustering Agent in Goat's Milk. *Journal of Dairy Science*. 54 (1). 123–126.
- Jensen, R. G. 1996. The lipids in human milk. *Progress in Lipid Research*. 35 (1). 53–92.

- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85 (2). 295–350.
- Jensen, R. G., Newberg, D. S. 1995. Bovine milk lipids. *Handbook of Milk Composition*. 543–575
- Jeong, K.-H., Nguyen, V., Kim, J.-H. 2012. Human milk oligosaccharides: the novel modulator of intestinal microbiota. *BMB Reports*. 45 (8). 433–441.
- Johke, T. 1978. Nucleotides of mammary secretions. *Lactation: A Comprehensive Treatise*. 4 . 513.
- Kalyankar, S. D., Sarode, A. R., Khedkar, C. D., Deosarkar, S. S., Pawshe, R. D. 2016. *Sheep: Milk Encyclopedia of Food and Health*. 1st ed. Elsevier Ltd. 758-763. ISBN: 9780123849472.
- Kanwal, R., Ahmed, T., Mirza, B. 2004. Comparative analysis of quality of milk collected from buffalo, cow, goat and sheep of Rawalpindi/Islamabad region in Pakistan. *Asian Journal of Plant Sciences*. 3 (3). 300–305.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R., Sauerwald, T. 2001. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*. 65. 3–18.
- Kulski, J. K., Hartmann, P. E. 1981. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med*. 59 (1). 101–114. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1981.6>
- Kuntz, S., Kunz, C., Rudloff, S. 2008. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *British Journal of Nutrition*. 101 (9). 1306–1315.
- Kunz, C. 1958. Human Milk Oligosaccharides–Background and Metabolism. *Bull Soc Chim Biol*. 40 . 297–314.
- Kunz, C., Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., Jensen, R. 1999. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clinics in Perinatology*. 26 (2). 307—333. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/10394490>
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*. 20 (1). 699–722.
- Kunz, C., Rudloff, S., Hintelmann, A., Pohlentz, G., Egge, H. 1996. High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 685 (2). 211–221.
- Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W., Braun, D. 1999. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *British Journal of Nutrition*. 82 (5). 391–399.
- Larson, B. L., Smith, V. R. 1974. *Lactation*, vol. 4. . Academic Press, New York.



- Lin, A., Autran, C., Espanola, S., Lewis, A., Bode, L., Nizet, V. 2014. Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *E. coli* and *Streptococcus agalactiae* infections. *The FASEB Journal*. 28 (1). 35–38.
- Lin, A. E., Autran, C. A., Espanola, S. D., Bode, L., Nizet, V. 2013. Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion and cytotoxicity. *Journal of Infectious Diseases*. 209 (3). 389-398.
- Lönnerdal, B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77 (6). 1537–1543.
- Lönnerdal, B., Forsum, E. 1985. Casein content of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 41 (1). 113.
- Martinez-Ferez, A., Bode, L., Rudloff, S., Kunz, C. 2004. Goat's milk oligosaccharides inhibit monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells under flow conditions. *Angiogenesis*. 7 . 182.
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. A., Pohlentz, G., Boza, J. J., Guadix, E. M., Kunz, C. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal*. 16 (2). 173–181.
- Mcguire, M. K., McGuire, M. A., Bode, L., Smith, D. F., Cummings, R. D. 2017. *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. 141-168. ISBN: 9780128027257.
- Mehra, R., Kelly, P. 2006. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. *International Dairy Journal*. 16 (11). 1334–1340.
- Mens, P. L. 1985. Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques (physico-chemical properties). 349–367.
- Molik, E., Bonczar, G., Misztal, T., Zebrowska, A., Zieba, D. 2012. The effect of the photoperiod and exogenous melatonin on the protein content in sheep milk. *Milk Protein*. (1). Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/milk-protein/the-effect-of-the-photoperiod-and-exogenous-melatonin-on-the-protein-content-in-sheep-milk>
- Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. L., Meinzen-Derr, J. K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K., Newburg, D. S. 2004. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of Pediatrics*. 145 (3). 297–303.
- Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Jiang, X., Newburg, D. S. 2005. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of Nutrition*. 135 (5). 1304–1307.
- Newburg, D. S. 1999. Human milk oligosaccharides and glycoconjugates protect the newborn against infection. *Pediatric Research*. 45 . 742.
- Newburg, D. S. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 30 . 8–17.

- Obermeier, S., Rudloff, S., Pohlentz, G., Lentze, M. J., Kunz, C. 1999. Secretion of <sup>13</sup>C-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral <sup>13</sup>C-galactose load. *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 35 (1–2). 119–125.
- Oliveira, D. L., Wilbey, R. A., Grandison, A. S., Duarte, L. C., Roseiro, L. B. 2012. Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. *International Dairy Journal*. 24 (2). 102–106.
- Oliveira, D. L., Wilbey, R. A., Grandison, A. S., Roseiro, L. B. 2015. Milk oligosaccharides: a review. *International Journal of Dairy Technology*. 68 (3). 305–321.
- Palframan, R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*. 37 (4). 281–284.
- Park, Y. W. 2007. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68 (1–2). 73–87.
- Picciano, M. F. 2001. Nutrient Composition of Human Milk. *Pediatric Clinics of North America*. 48 (1). 53–67.
- Posati, L. P., Orr, M. L. 1976. Composition of foods: dairy and egg products--raw, processed, prepared. *Agriculture Handbook-US Dept. of Agriculture (USA)*. 8(1).
- Potočnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini, A. 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*. 61 (2). 107.
- Ramos, M., Juarez, M. 2003. Sheep milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 4 . 2539–2545.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. 79 (1). 57–72.
- Recio, I., Visser, S. 2000. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. *International Dairy Journal*. 10 (9). 597–605.
- Remeuf, F. 1992. Physico-chemical properties of goat milk in relation to processing characteristics. *Proceedings of the National Symposium on Dairy Goat Production and Marketing Oklahoma City OK*. 98–110.
- Rhoades, J., Manderson, K., Wells, A., Hotchkiss Jr, A. T., Gibson, G. R., Formentin, K., Beer, M., Rastall, R. A. 2008. Oligosaccharide-mediated inhibition of the adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human gut epithelial cells in vitro. *Journal of Food Protection*. 71 (11). 2272–2277.
- Rockova, S., Nevoral, J., Rada, V., Marsik, P., Sklenar, J., Hinkova, A., Vlkova, E., Marounek, M. 2011. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal*. 21 (7). 504–508.

- Rudloff, S., Kunz, C. 1997. Protein and Nonprotein Nitrogen Components in Human Milk, Bovine Milk, and Infant Formula: Quantitative and Qualitative Aspects in Infant Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 24 (3). Dostuné z: [http://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/1997/03000/Protein\\_and\\_Nonprotein\\_Nitrogen\\_Components\\_in.17.aspx](http://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/1997/03000/Protein_and_Nonprotein_Nitrogen_Components_in.17.aspx)
- Rudloff, S., Pohlentz, G., Borsch, C., Lentze, M. J., Kunz, C. 2012. Urinary excretion of in vivo <sup>13</sup>C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *British Journal of Nutrition*. 107 (7). 957–963.
- Rudloff, S., Pohlentz, G., Diekmann, L., Egge, H., Kunz, C. 1996. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatrica*. 85 (5). 598–603.
- Ruhaak, L. R., Stroble, C., Underwood, M. A., Lebrilla, C. B. 2014. Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406 (24). 5775–5784.
- Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., Newburg, D. S. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H (O) antigen (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (16). 14112–14120.
- Rutherford, S. M., Moughan, P. J., Lowry, D., Prosser, C. G. 2008. Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 59 (7–8). 679–690.
- Saini, A. L., Gill, R. S. 1991. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*. 42 . 562–564.
- Sala-Vila, A., Castellote, A. I., Rodriguez-Palmero, M., Campoy, C., López-Sabater, M. C. 2005. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition*. 21 (4). 467–473.
- Scolozzi, C., Martini, M., Abramo, F. 2003. A method for identification and characterization of ewe's milk fat globules. *Milchwissenschaft*. 58 (9–10). 490–493.
- Sela, D. A., Mills, D. A. 2010. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology*. 18 (7). 298–307.
- Shen, Z., Warren, C. D., Newburg, D. S. 2000. High-performance capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides of human milk. *Analytical Biochemistry*. 279 (1). 37–45.
- Smilowitz, J. T., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., German, B. J., Freeman, S. L. 2014. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual Review of Nutrition*. 34. 143–69.
- Sousa, S. G., Delgadillo, I., Saraiva, J. a 2014. Human Milk Composition and Preservation: Evaluation of High-Pressure Processing as a Non-Thermal Pasteurisation Technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8398. 37–41.

- Tao, N., Ochonicky, K. L., German, J. B., Donovan, S. M., Lebrilla, C. B. 2010. Structural determination and daily variations of porcine milk oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (8). 4653.
- Thum, C., McNabb, W. C., Young, W., Cookson, A. L., Roy, N. C. 2016. Prenatal caprine milk oligosaccharide consumption affects the development of mice offspring. *Molecular Nutrition & Food Research*. 60 (9). 2076–2085.
- Turroni, F., Van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 37–44.
- Uemura, Y., Asakuma, S., Yon, L., Saito, T., Fukuda, K., Arai, I., Urashima, T. 2006. Structural determination of the oligosaccharides in the milk of an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 145 (4). 468–478.
- Underwood, M. A., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. 2014. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric Research*. 77 (1–2). 229–235.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M., Oftedal, O. T. 2012. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 3 (3). 473–482.
- Urashima, T., Kawai, Y., Nakamura, T., Arai, I., Saito, T., Namiki, M., Yamaoka, K., Kawahawa, K., Messer, M. 1999. Chemical characterisation of six oligosaccharides in a sample of colostrum of the brown capuchin, *Cebus apella* (Cebidae: Primates). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 124 (3). 295–300.
- Urashima, T., Kitaoka, M., Terabayashi, T., Fukuda, K., Ohnishi, M., Kobata, A. 2011. *Oligosaccharides: Sources, Properties and Applications*. Gordon NS, Nova Science, New York. 1–58. ISBN: 1611221935
- Urashima, T., Saito, T., Ohmisy, K., Shimazaki, K. 1991. Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide; GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc. *BBA - General Subjects*. 1073 (1). 225–229.
- Walker, A. F. 1990. *Applied human nutrition for food scientists and home economics*. ISBN: 074760049X.
- Wang, B. 2012. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 3 (3). 465–472.
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., Petocz, P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74 (4). 510–515.
- Wang, B., McVeagh, P., Petocz, P., Brand-Miller, J. 2003. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78 (5). 1024–1029.

- Wang, X., Gibson, G. R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75 (4). 373–380.
- Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B. 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6). 4497–4499.
- Welsh, J. K., May, J. T. 1979. Anti-infective properties of breast milk. *The Journal of Pediatrics*. 94 (1). 1–9.
- Wu, S., Tao, N., German, J. B., Grimm, R., Lebrilla, C. B. 2010. The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *Journal of Proteome Research*. 9 (8). 4138–4151.
- Yoshioka, H., Iseki, K., Fujita, K. 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*. 72 (3). 317–321.
- Yu, Z.-T., Chen, C., Newburg, D. S. 2013. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*. 23 (11). 1281–1292
- Zenebe, T., Ahmed, N., Kabeta, T., Kebede, G. 2014. Review on Medicinal and Nutritional Values of Goat Milk. *Academic Journal of Nutrition*. 3 (3). 30–39.
- Zivkovic, A. M., Barile, D. 2011. Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2 (3). 284–289.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. 2011. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (Supplement 1). 4653–4658.