

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**



**Vliv mléčných proteinů na expresi mucinů u  
epitheliálních buněk**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Eva Hermannová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv mléčných proteinů na expresi mucinů u epitheliálních buněk" 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 autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2015

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí mnoha cenných rad. Dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Tereze Volšátové za trpělivost, ochotu a čas, který mi při zpracování této bakalářské práce věnovala. Poděkování patří také mé rodině za podporu při mém studiu.

# Vliv mléčných proteinů na expresi mucinů u epitheliálních buněk

## Souhrn

Muciny tvoří hlavní složku sliznice epitelu reprodukční, dýchací a trávicí soustavy. Vytváří zde vrstvu hlenu, která má pro organismus řadu nepostradatelných funkcí. V trávicím traktu například poskytuje vazebná místa pro komensální a symbiotickou mikroflóru, napomáhá absorpci látek, chrání střevní epitel nebo tvoří signální látky. Změna v syntéze nebo expresi mucinu pohárkovými buňkami tak může v lidském organismu vést k závažným následkům. Složení a míra exprese mucinů je do značné míry ovlivnitelná výživou, zejména pak mlékem.

Mléko je díky svému složení nepostradatelnou součástí lidské výživy. Na organismus může mít celou řadu jak pozitivních, tak negativních účinků. V lidovém povědomí je konzumace mléka a mléčných výrobků často dávána do souvislosti se zahleňováním.

Cílem práce bylo zjistit, jestli a do jaké míry zvyšuje kravské mléko produkci a expresi mucinů u epitheliálních buněk v *in vitro* buněčném modelu založeném na buněčných liniích Caco-2 a HT29-MTX, které měly za úkol simulovat absorpční a pohárkové buňky gastrointestinálního traktu. Po přidání mléčného hydrolyzátu o koncentraci 1,5 µg/ml do buněčného modelu výsledky ukázaly, že exprese MUC2 vzrostla oproti původní hodnotě 0,09 pg/ml na 0,11 pg/ml. Z experimentu tedy vyplývá, že mléko a mléčné výrobky mohou mít schopnost iniciovat zvýšení exprese a syntézy mucinu, a tím podporovat vstřebávání živin, motilitu lumenu střeva a obranyschopnost gastrointestinálního traktu.

**Klíčová slova:** mléko, proteiny, muciny, hlen, exprese

# Effect of milk protein on mucine expression in epithelial cells

## Summary

Mucins are the main component of mucosal epithelium of reproductive, respiratory and digestive system. They form a mucus layer, which has many biological functions, such as providing binding sites for commensal and symbiotic microbiota in digestive tract, protecting epithelial cells or cell signalling. Change in synthesis or expression of mucin by goblet cells may cause serious consequences for human organism. The composition and level of expression of mucine is significantly influenced by diet, especially by milk.

Milk is due to its composition essential part of the human diet. It may have a wide range of positive and negative effects on the human body. Consumption of milk is often believed to increase production of mucus.

The aim of the study was to determine how can the presence of cows milk increase the mucin production and expression in *in vitro* cellular model of the intestinal epithelium based on the colorectal cells of adenocarcinoma Caco-2 and HT29-MTX, which simulating absorptive and goblet cells. After adding the milk hydrolyzate in concentration of 1.5 µg/ml the results showed that expression of mucin MUC2 was increased to 0.11 pg/ml compared to control 0.09 pg/ml. The experiment shows, that milk and dairy products may have the ability to initiate and increase the expression and synthesis of mucin, which may lead to improvement of nutrient absorption, motility of intestinal lumen and immunity in gastrointestinal tract.

**Keywords:** milk, proteins, mucins, mucus, expression

# Obsah

1	Úvod .....	3
2	Cíl práce.....	4
2.1	Hypotéza.....	4
3	Literární přehled .....	5
3.1	Mléko ve výživě člověka .....	5
3.1.1	Historie.....	5
3.1.1.1	Pravěk, Středověk .....	5
3.1.1.2	Novověk .....	6
3.1.1.3	Moderní dějiny .....	6
3.1.2	Vývoj příjmu.....	7
3.1.2.1	Vývoj příjmu mléka v České republice.....	7
3.1.2.2	Vývoj příjmu mléka ve světě .....	8
3.1.2.3	Vývoj příjmu mléka v rozvojových zemích.....	8
3.1.3	Výživová doporučení .....	9
3.2	Složení mléka.....	10
3.2.1	Sacharidy.....	10
3.2.2	Mléčný tuk .....	10
3.2.3	Bílkoviny.....	11
3.2.3.1	Kasein.....	11
3.2.3.2	Syrovátkové proteiny .....	13
3.2.4	Ovlivnění složení mléka tepelnou úpravou.....	16
3.2.4.1	Změny indukované teplem v mléčných proteinech .....	17
3.2.4.2	Změny v mléčných tucích indukované teplem.....	19
3.2.4.3	Změny laktózy indukované teplem .....	19
3.2.5	Vliv výživy zvířat .....	20
3.2.6	Proces trávení mléka a vznik bioaktivních peptidů .....	21
3.3	Vliv konzumace mléka na zdraví .....	23
3.3.1	Kosti.....	23
3.3.2	Inzulin .....	24
3.3.3	Nádorová onemocnění .....	25
3.3.4	Sarkopenie a doplnění bílkovin .....	26
3.3.5	Mléčná alergie a intolerance .....	27
3.3.5.1	Mléčná alergie.....	27
3.3.5.2	Laktózová intolerance .....	28

3.3.6	Mléko a exprese mucinu .....	29
3.4	Buněčný model tenkého střeva .....	30
3.5	<i>In vitro</i> model trávení .....	31
4	Materiál a metody .....	33
4.1	Příprava mléčného hydrolyzátu .....	33
4.2	Buněčné kultury .....	33
4.3	Stanovení 50% inhibiční koncentrace (MTT test) .....	34
4.4	Exprese mucinu .....	34
4.5	ELISA test .....	34
5	Výsledky .....	36
6	Diskuze .....	39
7	Závěr .....	42
8	Použitá literatura .....	43
9	Seznam použitých zkratk .....	55

# 1 Úvod

Mléko a mléčné výrobky mají v lidské stravě již několik tisíc let nezastupitelnou roli. Z nutričního hlediska se pro lidský organismus jedná o velmi přínosnou potravinu. Díky vysokému obsahu vitaminů, bílkovin a vápníku pomáhá mléko v prevenci osteoporózy, rakoviny, sarkopenie a dalších onemocnění. I přes velké množství nesporných pozitiv, které konzumace mléka a mléčných výrobků přináší, je zároveň spojována s celou řadou rizik. U řady jedinců může vyvolat mléčnou alergii, nebo způsobit zdravotní problémy zapříčiněné laktózovou intolerancí. Mléko je také často dáváno do souvislosti se zahleňováním.

Hlen je hustá tělní tekutina sekretovaná pohárkovými buňkami umístěnými v epitelální výstelce orgánů, jako jsou dýchací cesty nebo trávicí soustava. Jeho hlavní složku tvoří směs glykoproteinů mucinů. Mucin má v organismu velké množství funkcí, tvoří přirozenou bariéru chránící gastrointestinální trakt, usnadňuje průchod tráveniny, napomáhá vstřebávání živin a mnoho dalších. Z tohoto důvodu může vést změna v jeho expresi nebo syntéze k zásadním fyziologickým a patologickým změnám.

V poslední době je věnován zájem faktorům, které mohou složení a míru exprese mucinů a s tím souvisejícím obsah hlenu ovlivnit. Zásadní roli hraje především výživa. Mléko a zejména v něm obsažené proteiny se jeví být složkou stravy, která má schopnost expresi a syntézu mucinu ovlivňovat zásadním způsobem.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce je zjistit, zda-li přídavek mléka může zvýšit produkci a expresi mucinů glykokalyxu v modelu lidského tenkého střeva založeného na směsné kultuře buněčných nádorových linií Caco-2 a HT29-MTX.

### **2.1 Hypotéza**

Testovanou hypotézou je, že mléko zvyšuje produkci mucinu.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Mléko ve výživě člověka

Mléko je základním zdrojem výživy hlavně pro mláďata, která z něj získávají potřebné protilátky a vitaminy pro upevnění své imunity. Celosvětově se nejvíce využívá mléko kravské. Zvířata konzumují mléko až do doby, dokud nejsou schopna trávit pevnou stravu. Naproti tomu, člověk je jediným živočichem, který konzumuje mléko i v dospělosti a uchovává si schopnost trávit mléčné bílkoviny i ve stáří. Avšak ne všichni lidé disponují touto schopností, u podstatné části z nich je postupem času omezena nebo zaniká.

#### 3.1.1 Historie

##### 3.1.1.1 Pravěk, Středověk

Začlenění mléka do lidské výživy úzce souvisí s rozvojem zemědělství a s domestikací zvířat. Nejstarší doložená domestikace skotu, ovcí a koz, která je datována do roku 9000–7000 před naším letopočtem, proběhla na Blízkém Východě (Bellwood, 2005). Kolem roku 7000 před naším letopočtem se domestikace začala šířit také do střední a východní Evropy, o něco později byla rozšířena ve Skandinávii a Velké Británii (Price et al., 2000).

Zvířata byla nejprve chována pouze jako zdroj masa. V 6. tisíciletí před naším letopočtem se mléko stalo jedním z hlavních produktů domácích zvířat a bylo zařazeno do lidské výživy (Evershed et al., 2008). Prvním zvířetem, u kterého proběhla domestikace za účelem produkce mléka, byla koza a v Evropě tak bylo konzumováno především mléko kozí a také ovčí (Rollinger, 2007). Hlavním důvodem chovu hovězího dobytka stále zůstávalo maso a využití jako tažného zvířete. Jedinou výjimkou byla Afrika, kde byl hovězí dobytek uctíván, a tudíž bylo mléko považováno za důležitou a nenahraditelnou složku stravy (Abdelgadir et al., 1998). Naopak v Austrálii a Americe v tomto období byli lidé lovci a sběrači, a proto zvířata produkující mléko nechovali. Z tohoto důvodu zde k rozšíření konzumace mléka došlo až díky kolonizaci evropskými státy v posledních 500 letech (Evershed et al., 2008).

V dobách středověku lidé stále čelili problému, jak mléko uchovávat. Bez potřebné tepelné úpravy zůstávalo čerstvé jen krátkou dobu a z tohoto důvodu měli k mléku přístup pouze v období laktace zvířete. Postupně se začala upřednostňovat

konzumace mléka kravského před mlékem kozím a ovčím a dojivost a kvalita mléka hrály stále důležitější roli při stanovování ceny zvířat (Valenze, 2011).

### 3.1.1.2 Novověk

Nejzásadnější změny v mlékárenství, které byly zapříčiněny především rozvojem vědy a techniky, se udály v 19. století. Složení mléka nebylo dosud přesně známo, ale jednotlivé složky byly intenzivně zkoumány, a tak byly koncem 19. století objeveny bílkoviny laktalbumin a laktoglobulin. Rozvoj mlékárenství v 18. a 19. století také výrazně urychlily vynálezy parostroje, odstředivky a pasterizátoru (Atkins, 1978).

Co se týče technologického zpracování mléka, největší zásluhy na pokroku jsou připisovány francouzskému chemikovi a biologovi Louisi Pasteurovi, který díky svému výzkumu došel k závěru, že kvašení mléka způsobují mikroorganismy. Na základě tohoto poznatku roku 1863 zavedl postup zvaný pasterizace, při kterém lze pomocí tepelného záhřevu usmrtit patogenní zárodky v daném živném médiu (Lederberg, 2000). Jeho pokus následně s mlékem zopakoval lékař Joseph Lister, který při svém výzkumu mimo jiné objevil mléčnou bakterii *Lactococcus lactis*, a proto je v dnešní době považován za zakladatele bakteriologie mléka (Cogan, 2011). Díky uvedeným poznatkům se v 80. letech 19. století začaly v Německu průmyslově vyrábět první stroje pro pasterizaci, které byly produkovány do celého světa (Atkins, 1978).

Průmyslová revoluce znamenala také revoluci v konzumaci lidského mléka. Po vzniku železniční sítě mohlo být mléko snadno a rychle dopravováno z venkova do měst a transport ani uchovávání už tedy nebyl problém (Atkins, 1978). Množství průmyslově zpracovávaného mléka také vzrostlo kvůli přebytku mléka pro potřeby zemědělců, který vznikl zvyšováním mléčné produkce. Jako reakce na výrazný rozvoj mlékárenství byla v roce 1903 založena Mezinárodní mlékařská federace – IDF, která má v dnešní době 45 členských zemí a slouží ke komunikaci v rámci mlékařského sektoru (Cogan, 2011).

### 3.1.1.3 Moderní dějiny

Co se České republiky a obecně Evropy týče, významnou krizi do mlékárenství přinesla 1. světová válka. V tomto období byly počty dojnic výrazně zmenšeny, což také vedlo ke snížení produkce mléka a k následnému zavírání mlékáren. Konkrétně v České republice bylo nuceno svou činnost ukončit 51 mlékáren, na Moravě a ve Slezsku jich bylo 88. Tato situace přetrvávala i po válce a změna přišla až ve 30. letech, kdy byly

stavěny nové provozy nejen za účelem výroby a zpracování mléka, ale také sýrů a ostatních mléčných produktů (Broncová, 1998).

Rok 1934 znamenal další významný mezník v mlékárenské historii, kterým bylo uzákonění povinné pasterace mléka, což znamenalo výrazné omezení činnosti malých soukromých dodavatelů mléka (Likler et Augusta, 2001).

Další krizi pro mlékárenství znamenala 2. světová válka. Česká republika opět přišla o několik desítek mlékáren, a když se po osvobození v květnu 1945 opět situace stabilizovala, následovalo znárodnování mlékárenských závodů (Broncová, 1998). Listopad 1989 přinesl pro české mlékárenství výrazné změny. Došlo ke zvyšování kapacity velkých mlékárenských podniků a také se objevily nové moderní technologie ve zpracování mléka a mléčných produktů. Změny byly ještě výraznější v roce 2004 po vstupu České republiky do Evropské unie. Pro mlékárny to znamenalo povinnost podřídit se novým přísným hygienickým a technickým normám Evropského společenství (Peterka, 2008).

### 3.1.2 Vývoj příjmu

Význam mléka a mléčných výrobků má v lidské stravě nezastupitelnou roli, a proto se v poslední době objevuje trend udávající požadavek na zvýšení konzumace mléka. Podle statistických údajů o spotřebě mléka jeho konzumace všeobecně stagnuje a v některých rozvinutých zemích v posledních dvaceti letech dokonce klesá (Delgado, 2003). Z těchto důvodů jsou ve světě organizovány různorodé projekty podporující zvyšování spotřeby mléka, jako například podpora prodeje mléka ve školách, přímý prodej mléka pomocí mléčných automatů a v Evropské unii také pravidelně probíhá kampaň propagující pití mléka.

#### 3.1.2.1 Vývoj příjmu mléka v České republice

Česká republika zaznamenala od roku 1989 výrazný pokles v konzumaci mléka, který trval až do roku 1995, kdy dosáhla spotřeba minima. Od té doby nedošlo k výraznějšímu poklesu ani nárůstu a hodnoty spotřeby mléka a mléčných výrobků se pohybují kolem 200 kg na obyvatele za rok. V současné době je v porovnání s rokem 1989 v České republice konzumace mléka a mléčných výrobků nižší o více než 60 kg na obyvatele za rok. Podle statistických dat Česká republika v množství zkonsumovaného mléka za rok výrazně zaostává za ostatními průmyslově rozvinutými zeměmi v EU i ve světě. Výsledkem nízké spotřeby je nedostatečné plnění výživových

doporučených dávek důležitých živin obsažených v mléce, jako je například vápník nebo vitamin A. U některých skupin populace, zejména u dětí, je procento plnění výživových doporučených dávek naprosto nedostačující. Děti je vápník přijímán v množství 567-760 mg za den, což představuje pouze 50 % doporučené denní dávky (Macháčková, 2001).

Česká republika podniká proti nedostatečné konzumaci mléka četná opatření, mezi které patří například projekt školní mléko, který si klade za cíl vytvořit u dětí návyk na mléko a mléčné výrobky nebo umístování automatů na mléko na veřejná prostranství (Burdych et al., 1999).

### 3.1.2.2 Vývoj příjmu mléka ve světě

Světovou populaci činí kolem sedmi miliard lidí, přičemž mléko a mléčné výrobky jsou pravidelně konzumovány více než šesti miliardami z nich. Za poslední tři dekády se světová produkce mléka zvětšila o více než 50 % ze 482 milionů tun v roce 1982 na 755 milionů tun v roce 2012. Zvýšení poptávky a produkce mléka v posledních letech je následek nárůstu celkové světové populace. Od 70. let minulého století byl nejvýznamnější nárůst konzumace mléka zaznamenán v jižní Asii (Gerosa and Skoet, 2012).

Největším světovým producentem mléka je Indie, tvořící 16 % celosvětové produkce, následovaná USA, Čínou, Pákistánem a Brazílií. Jen malé množství států, mezi které patří Austrálie, Nový Zéland, státy EU a USA dokáže svou produkcí mléka pokrýt poptávku dané země. Naopak Rusko, Mexiko, Japonsko a Čína se řadí mezi státy, kde je produkce mléka nedostatečná a musí ho importovat z jiných zemí. Vysoká spotřeba mléka, tedy více než 150 l na obyvatele za rok je v Arménii, Austrálii, Kostarice, zemích EU, severní Americe a Pákistánu. Naopak velmi nízká spotřeba mléka, což znamená méně než 30 l za rok je ve Vietnamu, většině afrických zemí a jižní a jihovýchodní Asii (FAO, 2012).

### 3.1.2.3 Vývoj příjmu mléka v rozvojových zemích

Ve vyspělých zemích se množství zkonsumovaného mléka na osobu za rok v poslední době nijak zásadně nezměnilo, ve většině států je pozorován pouze mírný nárůst. Velmi výrazně ale v posledních letech vzrostla spotřeba mléka v rozvojových zemích, kde je v současnosti v porovnání s bohatšími zeměmi stále konzumována pouze asi jedna čtvrtina mléka, ale každý rok toto číslo významně roste. Tento trend se

projevuje hlavně v jižní a jihovýchodní Asii, zejména v hustě osídlených zemích jako je Čína, Indonésie a Vietnam. Od roku 1960 sice vzrostla konzumace mléka v rozvojových zemích téměř dvojnásobně, pořád ale zaostává oproti nárůstu spotřeby jiných živočišných produktů jako je maso nebo vejce, jejichž konzumace se v těchto zemích minimálně ztrojnásobila (FAO, 2009).

Podle statistik zkonzumují rozvojové země v roce 2020 o 177 miliónů tun mléka a mléčných výrobků více než v roce 1998. Důvodem pro takto markantní nárůst jsou zejména zvyšující se finanční příjmy obyvatelstva, dále také růst populace, urbanizace a některé kulturní důvody (Delgado, 2003).

Zajímavým příkladem je Čína, kde se konzumace mléka rapidně zvýšila zejména v oblastech velkých aglomerací. Na mléko je zde nahlíženo jako na vhodnou a důležitou část stravy zejména pro děti, protože Číňané věří, že pravidelné pití mléka výrazně podporuje růst kostí, statnější atletické postavy a vyšší vzrůst obecně. Se stavbou těla úzce souvisí sportovní úspěchy atletů západního světa, které jsou často přisuzovány právě dostatečné konzumaci mléka a mléčných výrobků v období růstu a vývoje (Wiley, 2015).

### 3.1.3 Výživová doporučení

Mléko, které je důležitým zdrojem bílkovin, minerálů a stopových prvků, patří mezi základní potraviny nezbytné pro kvalitní výživu člověka v každém věku. Experimentálně zjištěná průměrná potřeba vysoce kvalitních bílkovin se stravitelností  $\geq 95\%$ , které člověk přijímá především z mléka a ostatních živočišných produktů, činí pro dospělé 0,6 g bílkovin/kg tělesné hmotnosti na den (WHO, 1985). S ohledem na individuální výkyvy a sníženou stravitelnost smíšené stravy je doporučený příjem 0,8 g bílkovin/kg/den, přičemž 100 g kravského mléka průměrně obsahuje 3,3 g bílkovin (McCance and Widdowson, 2004).

Pro lidský organismus mléko představuje nejdůležitější zdroj vápníku, jednoho z nejvýznamnějších minerálů v lidské výživě. V mléku je ho průměrně obsaženo 118 mg/100g. Vápník je důležitý především pro zdravý růst kostí, který je nejintenzivnější v dětském období a dospívání (Peacock, 1991). Z tohoto důvodu Výživová doporučení pro obyvatelstvo ČR z roku 2012 uvádějí, že by strava dítěte ve věku od 1 do 3 let měla obsahovat aspoň 500 ml mléka nebo mléčných výrobků. Doporučená denní dávka vápníku je relativně nejvyšší mezi 13. a 18. rokem, kdy činí 1200 mg/den. Tuto potřebu kryje vypití jednoho litru mléka, nebo tři jednotkové porce

mléčných výrobků denně. Jednotkové porci odpovídá 250 ml mléka nebo 200 ml kelímek jogurtu. V dospělosti je uváděn jako doporučený denní příjem vápníku 1000 mg. Podle výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR je v druhé polovině těhotenství potřeba vápníku vyšší, a proto je vhodné denně konzumovat navíc 250 ml mléka nebo 2 jogurty (Společnost pro výživu, 2012).

Ludwig and Willett (2013) ve své studii podporují teorii, že dosavadní doporučené dávky mléka a mléčných výrobků jsou přemrštěné, pro lidský organismus mohou být škodlivé a výživová doporučení týkající se mléka by se měla upravit.

## 3.2 Složení mléka

Mléko je z fyzikálně-chemického hlediska řazeno mezi polydisperzní systémy, kde disperzní prostředí představuje voda, která tvoří hlavní mléčnou složku. Ve vodě jsou dispergovány malé částice, zastoupeny především tukem, bílkovinami a laktózou. Mléčný tuk se ve vodě nachází ve formě mléčné emulze, bílkoviny tvoří koloidní fázi a laktóza, chloridy a fosforečnany pak tvoří fázi molekulární (Kadlec et al., 2009).

Procentuální zastoupení jednotlivých prvků a složek mléka je ovlivněno celou řadou faktorů, mezi které se řadí genetické predispozice dojnice, dále zdravotní stav a plemeno a v neposlední řadě také krmení (Fox et al., 2015).

### 3.2.1 Sacharidy

Hlavním sacharidem mléka je opticky aktivní laktóza, chemickým názvem 4-0- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-glukopyranosa, která je v mléku obsažena v množství 4,6 %. Jelikož je laktóza syntetizována pouze epiteliálními buňkami mléčné žlázy, přirozeně se vyskytuje pouze v mléce nebo mléčných výrobcích. Jedná se o redukující disacharid, složený ze dvou monosacharidů D-glukózy a D-galaktózy spojených  $\beta$ -glykosidickou vazbou, který po tepelném ošetření podléhá Maillardovým reakcím. Produkty těchto reakcí mají vliv na barvu, vůni a další vlastnosti tepelně upravených mléčných výrobků (Fox, 2009).

### 3.2.2 Mléčný tuk

Tuk se v mléce nachází ve formě mikroskopických tukových kuliček. V jádře se nacházejí nepochopitelně triacylglyceroly, které jsou obaleny polární fosfolipidovou membránou. Tato membrána slouží především k ochraně lipidů před enzymatickou degradací, oxidací a zajišťuje fyzikální stabilitu mléčného tuku. Množství tuku v mléce

výrazně ovlivňuje jeho jakost i smyslové vlastnosti a standardně se pohybuje v rozmezí 3,5 až 4,7 % (Ye et al., 2002).

Mléčný tuk je tvořen směsí lipidů, z nichž největší část (98 %) zaujímají triacylglyceroly. Dále se v mléce vyskytují diacylglyceroly, cholesterol a volné mastné kyseliny. Mléko se od ostatních potravin liší vysokým obsahem těkavých mastných kyselin, tedy kyselin s nízkým počtem uhlíků, mezi které patří například kyselina máselná nebo kapronová. Důležitá je přítomnost vitaminů rozpustných v tucích a také lipofilních organických látek karotenoidů, které zodpovídají za nažloutlé zbarvení mléka (MacGibbon and Taylor, 2006).

### 3.2.3 Bílkoviny

Standardní obsah bílkovin v kravském mléce je 3,2 %, ale tato hodnota se výrazně mění v průběhu laktace. Základní funkce proteinů v mléčné výživě savčích mláďat je přísun dostatku esenciálních aminokyselin potřebných pro růst a vývoj svalů a také zajištění dostatečné imunity. Proteiny jsou v mléce přítomny v heterogenní směsi s vysokou tendencí k tvorbě proteinových komplexů, a proto je poměrně složité je od sebe separovat. Dříve se k izolaci mléčných proteinů používala metoda, která využívala kyselé srážení kaseinů, v dnešní době jsou používány moderní metody fungující především na principu chromatografie (Varnam and Sutherland, 2001).

Mléčné bílkoviny je možno rozdělit do dvou základních skupin a to na kasein a na syrovátkové bílkoviny. Pro kasein, který zaujímá asi 80 % mléčných bílkovin, je charakteristické, že při okyselení mléka na hodnotu pH 4,6 při teplotě 30°C se z mléka vysráží. V roztoku tak zůstanou za těchto podmínek rozpuštěny pouze syrovátkové neboli sérové proteiny (Jauhiainen and Korpela, 2007).

#### 3.2.3.1 Kasein

Kaseiny jsou hlavními proteiny mléka, které se nikde jinde v přírodě nenacházejí. Svoji chemickou strukturou jsou řazeny mezi fosfoproteiny, které mají na některou z přítomných aminokyselin, většinou na serin, který disponuje volnou hydroxylovou skupinou a kde může probíhat esterifikace, navázán fosfor (Fox et al., 2015).

Charakteristickou vlastností kaseinů je termostabilita, díky které může být mléko zahříváno při vysokých teplotách, aniž by došlo k jeho sražení (Singh et al., 2014). K syntéze kaseinů dochází za účasti laktogenních hormonů v mléčné žláze, odkud je



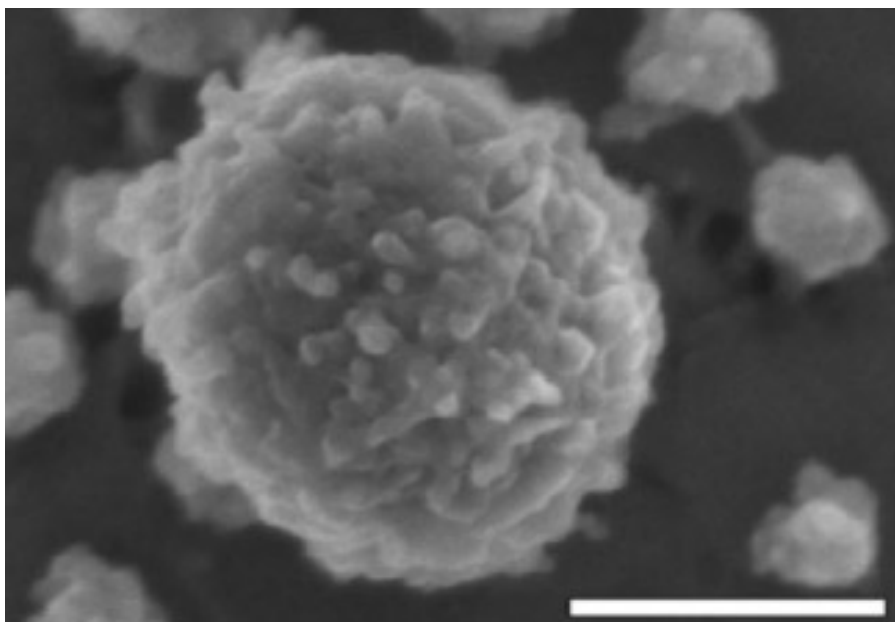
následně kasein vylučován ve formě velkých koloidních částic neboli micel. Kaseinové micely se skládají asi z dvaceti podjednotek nazývaných submicely (Obr. 1). Jedná se o koloidní agregáty, složené z deseti různých druhů proteinů, které jsou do micel sdružovány hydrofobními interakcemi, van der Waalsovými silami a vodíkovými můstky. Micely jsou navíc stabilizovány intra- a intermolekulárními disulfidickými můstky (Turhan et al., 2003). Je důležité, aby zaviněním vápníkových můstků nedošlo k další agregaci micel do větších molekul, a proto je na jejich povrchu přítomen  $\kappa$ -kasein, který díky své rezistenci vůči vápenatým iontům slučování micel brání. Kromě kaseinů, které zaujímají 93 %, jsou v micelách dále obsaženy vápenaté ionty, anorganický a organický fosfát, citrát a sodné, draselné nebo hořečnaté soli. Kaseinové micely mají schopnost rozptylovat světlo, a tak nesou výrazný podíl na specifické bílé barvě mléka, která při porušení micel zaniká (Huppertz, 2013).

#### Frakce kaseinu

Kaseiny jsou velmi heterogenní skupina proteinů. Jejich základní druhy jsou  $\alpha$ -kasein,  $\beta$ -kasein a  $\kappa$ -kasein.

- $\alpha$ -kaseiny - Zaujímají největší podíl v celkovém komplexu. Jejich primární struktura je tvořena 199-207 aminokyselinami a podle aminokyselinové sekvence se dále dělí na  $\alpha_{s1}$ -kaseiny a na  $\alpha_{s2}$ -kaseiny. Neobsahují cystein, slouží jako bohatý zdroj fosforu a v přítomnosti vápníku vytváří vápenaté soli, které jsou nerozpustné.
- $\beta$ -kasein - Jedná se o poměrně hydrofobní druh kaseinu, jehož struktura obsahuje 109 aminokyselin. V přirozeném prostředí mléka, tedy při teplotě 39°C a pH 6,6-6,7 je obsažen v jádru micel. V některých extrémních podmínkách, například klesne-li teplota mléka pod 10°C, ale dochází k jeho přemístění do obalu micel nebo dokonce mezi proteiny mléčného séra (Considine et al., 2006).
- $\gamma$ -kasein - Jeho zastoupení v mléce je minimální, k zvyšování koncentrace dochází až po hydrolýze  $\beta$ -kaseinu.
- $\kappa$ -kasein - Jako jediný kasein je schopen tvořit rozpustné soli s vápenatými ionty. Struktura je tvořena 169 aminokyselinami a jeho primární funkce je stabilizace kaseinových micel (Turhan et al., 2003).

U bílkovin získávaných z frakcí kaseinu byly vědecky dokázány příznivé účinky pro lidský organismus. Fosfopeptidy izolované z  $\alpha$ -kaseinu podporují vstřebávání vápníku v tenkém střevě, snižují hladinu krevního tlaku a snižují riziko vzniku hypertenze (Groziak and Miller, 2000). Peptidy získané z  $\alpha$ -kaseinu,  $\beta$ -kaseinu a  $\kappa$ -kaseinu podporují tvorbu protilátek a obecně zlepšují funkci imunitního systému (Migliore-Samour et al., 1989).



**Obr. 1:** Kaseinová micela pod elektronovým rastrovým mikroskopem (měřítko 200 nm)

### 3.2.3.2 Syrovátkové proteiny

Syrovátkové proteiny neboli proteiny mléčného séra tvoří asi 20 % celkového množství mléčných bílkovin a rozdělují se na dvě základní skupiny, laktalbuminy a laktoglobuliny. Laktoglobuliny jsou složeny především z imunoglobulinů, nejvíce IgG<sub>1</sub>, méně IgG<sub>2</sub>, IgA a IgM, zatímco laktalbuminy obsahují dvě základní složky,  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin a několik dalších minoritních proteinů, zahrnující albumin krevního séra a laktoferin (Singh et al., 2014). Díky své globulární struktuře mají syrovátkové proteiny hydrofilní vlastnosti, a protože v roztoku hůře disociují, jsou odolné vůči změnám pH. Jejich termostabilita je oproti kaseinu velmi nízká (Phillips and Williams, 2009).

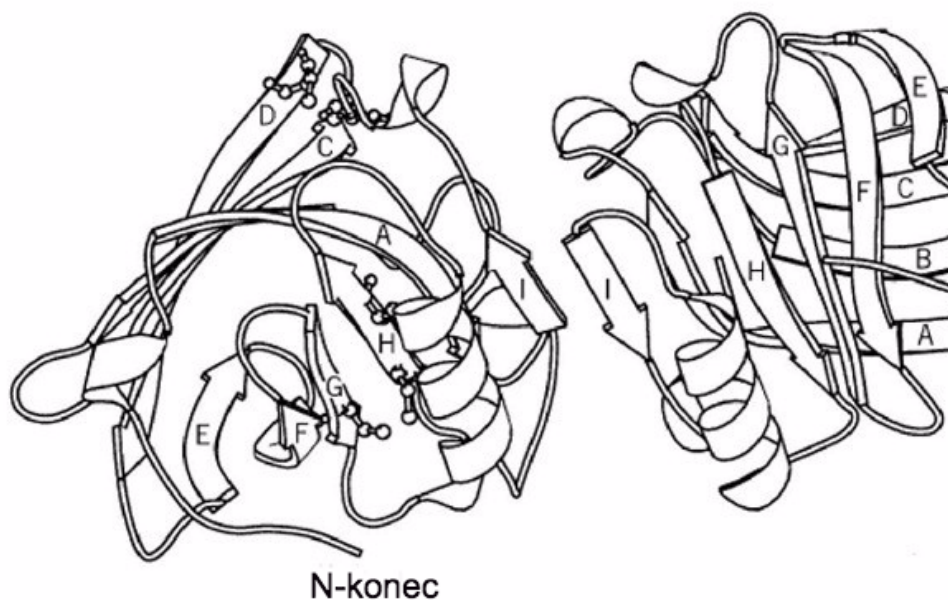
V poslední době je velký zájem o produkci majoritních i minoritních proteinů krevního séra na komerční bázi, za účelem využití ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Byly vyvinuty nové metody, které slouží k průmyslové produkci syrovátkových proteinů a v současné době se pracuje na jejich zdokonalování.

Koncentráty sérových proteinů jsou využívány zejména pro zvláštní výživu sportovců (Fox et al., 2015).

### $\beta$ -laktoglobuliny

Zaujímají 50 % sérových bílkovin a zároveň 12 % obsahu všech bílkovin mléka. Jedná se o typického zástupce globulárních proteinů a jejich struktura je velmi dobře prozkoumána. Beta-laktoglobuliny se nevyskytují v lidském mléce ani v žádném jiném z albuminových mlék. Jeden monomer  $\beta$ -Lg je složen ze 162 aminokyselin, obsahuje dva intramolekulární disulfidické můstky a 1 volný cystein (Considine et al., 2006). Přítomnost cysteinu je velmi významná, protože po tepelné denaturaci reaguje s intramolekulárními disulfidy  $\kappa$ -kaseinu a ovlivňuje tak srážení syřidla a tepelnou stabilitu mléka. Beta-laktoglobuliny jsou také zodpovědné za vařivou příchut' mléka po jeho tepelné úpravě. Hodnota jejich izoelektrického bodu je 5,2 (Sawyer, 2013).

Nativní forma  $\beta$ -Lg je složena z 9 řetězců, které jsou uspořádány do dvou beta-skládaných listů, kde první beta list obsahuje řetězce B, C, D a část řetězce A (A1) a druhý beta list je složen z řetězců D, E, F, G, H a zbytku řetězce A (A2) (Obr. 2). Jeden konec prvního beta listu je hydrofobní a druhý pak hydrofilní, u druhého beta listu jsou oba konce hydrofobní a ve spoji hydrofobních konců obou beta listů tak vzniká extrémně hydrofobní místo, kam se za žádných podmínek nedostane voda (Considine et al., 2006).



**Obr. 2** Dimér  $\beta$ -laktoglobulinu

Jeho primární funkce není nutriční, ale v organismu má pravděpodobně dvě základní biologické role. První z nich je vazba a transport retinolu v těle. Retinol neboli vitamin A je navázán na jeho hydrofobní část a následně transportován z žaludku do tenkého střeva, kde je retinol dále navázán na retinol-vázací protein, který má podobnou strukturu jako  $\beta$ -Lg. Princip transportu retinolu z tukových mléčných kapének, kde se vyskytuje a jeho navázání na  $\beta$ -Lg není přesně objasněn (Akerstrom et al., 2000). Další z funkcí  $\beta$ -Lg je stimulace lipázové aktivity a tedy lipolýzy obecně, což je pravděpodobně také jeho nejdůležitější fyziologická funkce. Beta-laktoglobulin je největší alergen mléka, a proto se v současné době hledají nové metody, které by vedly k odstranění  $\beta$ -Lg z mléčného séra (Singh et al., 2014).

#### $\alpha$ -laktalbumin

Alfa-laktalbumin zaujímá 20 % syrovátkových bílkovin, což je asi 3,5 % celkových mléčných proteinů. Jedná se také o hlavní protein lidského mléka, jehož syntéza probíhá v prsní žláze.  $\alpha$ -La je malý kompaktní globulární protein o velikosti 14 kDa, složený ze 123 aminokyselin, jehož izoelektrický bod je 4,8 (Nitta and Sugai, 1989). Molekula  $\alpha$ -laktalbuminu je stabilizována čtyřmi disulfidickými můstky a neobsahuje žádnou volnou thiolovou skupinu. Protein se vyskytuje ve více konformacích, které jsou závislé na okolním prostředí (Kuwajima et al., 1990).

Obsahuje velké množství síry, která je zde přítomna v cysteinu a metioninu. Jedná se o metaloprotein, obsahující ve své molekule dva vápenaté ionty, které jsou navázané přes zbytek kyseliny asparagové (Singh et al., 2014). Alfa-laktalbumin funguje jako jeden z komponentů laktózy-syntetázy, enzymu který katalyzuje konečný krok v biosyntéze laktózy, což je jeho nejdůležitější funkcí. Mezi koncentrací  $\alpha$ -La a laktózy v mléce tak platí přímá úměrnost a mléka mořských savců, která neobsahují  $\alpha$ -La tedy neobsahují ani laktózu (Brew, 2013). Terciální struktura  $\alpha$ -La je shodná se strukturou lysozymu, a proto je pravděpodobné, že se z něj vyvinul procesem genetické duplikace (Nitta and Sugai, 1989).

#### Imunoglobuliny

Jedná se o významnou skupinu protilátek, které patří svou chemickou strukturou mezi glykoproteiny a mají původ v krevním séru. V mléce se vyskytují především

imunoglobuliny IgG, IgM, IgA. Obsah imunoglobulinů je výrazně vyšší v kolostru (100 g/l), než ve zralém mléce (1 g/l), ale toto množství se po porodu rychle snižuje. Zajišťují přirozený antibakteriální systém zpomalující růst mikroflóry, která kontaminuje čerstvě nadojené mléko (Hurley and Theil, 2013).

V dnešní době produkce kolostra krávy výrazně překračuje potřeby telat a proto je možné přebytečné kolostrum izolovat a získávat z něj imunoglobuliny a další látky, které jsou následně využívány pro medicínské účely (Pakkanen and Aalto, 1997). Hlavní imunoglobulin kravského mléka je imunoglobulin G (IgG). Mláďata ho mohou z tenkého střeva vstřebávat ještě několik dní po narození a využívat tak pasivní imunitu, dokud nejsou sami schopni imunoglobuliny syntetizovat (Fox and Kelly, 2012).

#### Albumin krevního séra (BSA)

BSA tvoří asi 1-2 % celkových mléčných proteinů, které se do mléka dostávají z krve mezerami inter-buněčných spojů. Jsou charakterizovány celkovým zploštělým tvarem a skládají se ze tří základních domén, z nichž každá je stabilizována disulfidickými vazbami. Primární struktura obsahuje 17 disulfidických můstků, které udržují tvar molekuly (Carter and Ho, 1994). Biologická funkce albuminů krevního séra v mléce není dosud známá a vzhledem k nízké koncentraci zřejmě ani nijak významná (Fox and Kelly, 2012).

#### 3.2.4 Ovlivnění složení mléka tepelnou úpravou

Aby byly mlékárenské výrobky v souladu s evropskými i celosvětovými normami a byly zdravotně nezávadné, musí mléko projít vhodnou tepelnou úpravou (Walstra et al., 2005). Postup a volba typu tepelného ošetření mléka se liší v závislosti na finálním produktu, který má být po úpravě mléka získán. Termizace se využívá především k zahubení psychrotrofních organismů a k redukci mléčné mikroflóry za účelem možnosti skladování mléka při nízkých teplotách. Pasterizace, sloužící k standardizaci mléka jako čerstvé ingredience pro následnou produkci mléčných výrobků, vede k usmrcení patogenů, ale také ke snížení počtu nepatogenních mikroorganismů, které by mohly způsobit následné kažení mléka. Inaktivace velkého množství mléčných enzymů, jako je například lipáza, během tepelného ošetření také přispívá ke zlepšení stability mléka. Prvotní záhřev, který je často zařazen před sterilací, znatelným způsobem přispívá k zvýšení termostability mléka. Sterilizace významně prodlužuje trvanlivost, ale obzvláště po ošetření mléka UHT (Ultra-high temperature

processing) dochází po určité době skladování k změnám jeho konzistence i chuti (Brennan and Grandison, 2011)

Přestože mléko je velmi složitý biologický roztok, který ve svém složení zahrnuje množství rozmanitých látek, nacházejících se v rozpuštěné, koloidní i emulgované fázi, jedná se o velmi termostabilní systém. V porovnání s ostatními potravinami, které by byly vystaveny stejným teplotním podmínkám jako mléko při některých z tepelných úprav, je změna složení a struktury mléka minimální (Fox et al., 2015). Tepelné ošetření mléka může způsobovat také nežádoucí změny, mezi které patří hnědnutí mléka, rozvoj vařivé příchuti, ztráta nutričně významných látek nebo inaktivace inhibitorů bakterií (Walstra et al., 2005). V tabulce 1 jsou shrnuty druhy tepelného ošetření mléka společně s jejich podmínkami.

**Tab. 1** Tepelné ošetření mléka (Fox and Kelly, 2012)

Tepelná úprava	Teplota	Čas	Výsledek
Termizace	63°C	15 sekund	Redukce počtu psychrotrofních bakterií, Pozitivní fosfatázový test
Pasterace	72-74°C	15-30 sekund	Usmrcení vegetativních forem mikroorganismů, Pozitivní laktoperoxidázový test
UHT	135-140°C	3-5 sekund	Trvanlivé mléko
Sterilace	118°C	12 minut	Trvanlivé mléko

#### 3.2.4.1 Změny indukované teplem v mléčných proteinech

Mléčné proteiny jsou složkou, jejíž složení je tepelnými úpravami ovlivněno nejvíce. Změna v jejich struktuře je závislá na čase, teplotě a míře tepelné úpravy. Tepelným záhřevem může být ovlivněna srážlivost mléčné syrovátky, narušeny funkční vlastnosti syrovátkových bílkovin, nebo zvýšena náchylnost mléčných proteinů k proteolýze (Manzo et al., 2015). Obecně mohou tepelnou úpravou v mléce probíhat reakce spojené s aminokyselinovými zbytky, konkrétně například navázání laktózy

na aminoskupinu lysinu, defosforylace fosfoserinu nebo deaminace asparaginu (Dalsgaard et al., 2007).

Studie Manza et al. (2015) dokazuje, že nejdůležitější funkci v tvorbě bílkovinných agregátů, charakteristických pro tepelně upravené mléko, kterých se účastní kaseiny i syrovátkové bílkoviny, mají disulfidické můstky, tvořící hlavní intermolekulární interakce

## Kaseiny

Kaseiny jsou velmi odolné vůči teplotám používaným v mlékárenství a nepodléhají výrazným chemicko-fyzikálním změnám ani při působení teploty kolem 140°C, trvající déle než hodinu (Fox and Kelly, 2012). Některé extrémní teploty vyšší než 140°C však mohou způsobit defosforylaci, štěpení peptidových vazeb, agregaci nebo disociaci kaseinových micel a v ojedinělých případech i jejich koagulaci (Fox et al., 2015). Prokazatelně vysoká termostabilita kaseinů dovoluje používat v mlékárenských technologiích velmi vysoké teploty bez výrazné změny fyzikálních vlastností mléka (Singh et al., 2014).

Během záhřevu mléka dochází ke změnám velikosti kaseinových micel. Rozsah těchto změn je závislý na teplotě, délce působení záhřevu a hodnotě pH. Pokud je teplota záhřevu kolem 100°C, změna velikosti micelových částic je výrazně závislá na hodnotě pH. Při pH 6,5 bylo zaznamenáno podstatné zvětšení kaseinových micel o asi 35 nm. Při nárůstu pH bylo ale zvětšení micel podstatně menší. Při hodnotě pH 6,7 došlo ke zvětšení kaseinových částic pouze o 5 nm a při pH větším než 6,7 se dokonce micely během mírné tepelné úpravy zmenšovaly (Anema and Li, 2003).

## Proteiny mléčné syrovátky

Sérové proteiny jsou zástupci typických globulárních proteinů a ke změnám indukovanými tepelnou úpravou mléka jsou poměrně náchylné. Beta-laktoglobuliny jsou vůči tepelné denaturaci nejcitlivější ze všech proteinů (Sawyer, 2009). Záhřev  $\beta$ -laktoglobulinů za neutrálního pH způsobuje disociaci těchto dimerních proteinů, částečný rozklad, denaturaci a následnou agregaci. Přesný postup těchto tepelně indukovaných změn je závislý na koncentraci proteinů, pH a teplotě. Dva nejdůležitější mechanismy agregace  $\beta$ -laktoglobulinů jsou úzce spojeny s procesem, při kterém reagují jejich hydrofobní vazby a disulfidické můstky (Havea et al., 2004). Denaturací

$\beta$ -laktoglobulinů je odhalena silně reaktivní sulfhydrylová skupina, která může dále reagovat s ostatními sérovými proteiny nebo  $\kappa$ -kaseinem, tvořící obal micel, což vede k tvorbě kasein-sérových komplexů proteinů v mléce a k podstatným změnám v důležitých technologických vlastnostech mléka. Tyto komplexy, které jsou vázány nekovalentními interakcemi a disulfidickými můstky vzniklými thiol-disulfidovou výměnnou reakcí, se mohou vyskytovat buď na povrchu micel nebo v mléčném séru (Considine et. al, 2006).

Alfa-laktalbumin je unikátní v tom, že se po tepelné úpravě vyskytuje ve formě roztavené globule (molten globule, MG). Do této struktury se po záhřevu formuje mnoho globulárních proteinů, avšak pouze  $\alpha$ -Lg má schopnost za určitého pH a teploty vytvořit dostatečně stabilní molekulu MG, kterou je možno zkoumat a dále s ní pracovat (Ohgushi and Wada, 1983).

#### 3.2.4.2 Změny v mléčných tucích indukované teplem

Lipidy jsou tepelnou úpravou ovlivněny ze všech složek mléka nejméně a nastávají u nich pouze minimální fyzikální změny. Během záhřevu mléka u nich dochází k přerušení některých chemických vazeb a díky rozdílným hustotám vody a tuku k migraci tukových kapének a k vyvstávání tukové vrstvy na povrchu mléka (Kelly and Fox, 2012). Následkem tepelné úpravy také dochází k výrazným změnám ve velikosti tukových kapének, které výrazně ovlivňují vzhled, chuť a stabilitu mléka a mléčných produktů (Li et al., 2012).

#### 3.2.4.3 Změny laktózy indukované teplem

Záhřev laktózy způsobuje v mléce mnoho chemických změn, které zahrnují její degradaci na organické kyseliny (doprovázenou poklesem pH), izomeraci a protože je laktóza redukující cukr, dochází také k Maillardově reakci. V tomto procesu reaguje laktóza s aminoskupinou, nejčastěji se jedná o volnou aminoskupinu lyzinových zbytků, ve složité sérii reakcí za vzniku nežádoucích změn organoleptických vlastností mléka, jako je atypická (vařivá) chuť a vůně, vznik toxických látek a pokles nutriční hodnoty. Maillardova reakce vede také k hnědnutí mléka, což je následek tvorby pigmentů nazývaných melanoidiny (Kelly and Fox, 2012). Méně intenzivní záhřev mléka způsobuje izomerickou změnu laktózy na laktulózu. Laktulóza je v přírodě nevyskytující se disacharid složený z galaktózy a z fruktózy, který je využíván jako projímadlo a má schopnost stimulovat růst bifidogenní mikroflóry. V sterilizovaném



mléce se vyskytuje ve velkém množství od 300 do více než 1000 miligramů na litr (Walstra et al., 2005).

### 3.2.5 Vliv výživy zvířat

Během posledních let bylo realizováno mnoho výzkumných projektů, zabývajících se změnou struktury mléka prostřednictvím výživových faktorů dojníc. Hlavním důvodem intenzivního výzkumu je snaha o zlepšení nutričních hodnot mléka tak, aby odpovídalo současným výživovým trendům a doporučením (Jenkins and McGuire, 2006; Ortman and Pehrson, 1999). Výživa dojníc se společně s dalšími faktory zásadně podílí na změnách ve složení mléka, na jeho technologických a sensorických vlastnostech a v neposlední řadě na jeho biologické hodnotě. Svůj význam má kromě obsahu jednotlivých živin v krmné dávce také druh krmiva a technika krmení. Zvyšování krmné dávky vede k nárůstu obsahu tuku v mléce, ale zároveň také ke snížení obsahu proteinů a k poklesu dojivosti (Hullar and Brand, 1993).

Strava dojníc má minimální vliv na koncentraci proteinů a laktózy v mléce, naopak může ale zásadně pozměnit množství a složení obsažených tuků (Clark and Davis, 1980). Obsah a poměr mastných kyselin v mléce se výrazně mění s ročním obdobím. Mléko pasoucích se krav obsahuje dvakrát větší množství konjugované kyseliny olejové (CLA), než mléko ustájených dojníc přijímajících standardní krmné směsi. CLA je ve větším množství zastoupena pouze v mase a mléce přežvýkavců a pro lidský organismus má celou řadu příznivých účinků. Mimo jiné podporuje odbourávání tuků, působí antikarcinogenně, snižuje hladinu cholesterolu a z nutričního hlediska je tedy nezastupitelná (Ip et al., 1999; Ledoux et al., 2005). Další pozitivum, které mléku přináší výživa krav pasoucích se venku, je vyšší příjem kyseliny alfa-linolenové patřící mezi omega-3 matné kyseliny než příjem omega-6 kyseliny linolové, což vede k vyrovnání poměru mezi omega-3 a omega-6 mastnými kyselinami. Mléčný tuk krav přijímajících průmyslová krmiva a seno má průměrný poměr mezi mastnými kyselinami omega-3 a omega-6 asi 4:1, ale v létě po konzumaci čerstvé trávy dochází k redukci tohoto poměru až na 2:1 (Chilliard and Ferlay, 2004). Tyto pozitivní účinky pastvy na složení mastných kyselin v mléce jsou přisuzovány především vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny alfa-linolenové, obsažených v čerstvě zralé trávě (Ward et al., 2003).

Vhodně zvolená strava dojníc má také významný vliv na obsah minerálů, kterých kravské mléko obsahuje širokou škálu. Koncentrace mléčného vápníku je

poměrně konstantní, protože jeho přítomnost v mléce je spojená s kaseinem, jehož obsah se se změnou výživy dojnic nemění. Konstantní je také obsah hořčíku a zinku. (Insel et al., 2004). Koncentrace selenu v kravském mléce, která se celosvětově velmi liší, odpovídá množství selenu v krmivu. V Jižní Dakotě je uváděn obsah selenu v mléce mezi 160 a 1300  $\mu\text{g/l}$ , ale ve Skandinávii a severní Evropě se tato hodnota pohybuje mezi 5 až 30  $\mu\text{g/l}$  (Casey et al., 1995). Švédská studie dokázala, že průměrná koncentrace selenu v mléce byla 14  $\mu\text{g/l}$ , ale když byly dojnicím denně podávány kvasnice obohacené o 3 mg selenu, množství selenu v mléce stoupl téměř dvojnásobně (Ortman and Pehrson, 1999). Asi 25 % stravou přijatého jodu je vyloučeno do mléka, proto je jeho obsah variabilní a závislý na stravě. Množství jodu v mléce se liší v závislosti na ročním období. Dahl et al. (2003) prokázali, že obsah jodu v mléce v letním období je 88  $\mu\text{g/l}$  a v zimě tato koncentrace vzroste na 232  $\mu\text{g/l}$ . Je to zřejmě následek používání doplňkových krmiv, výrazně obohacených o jod, v zimním období.

### 3.2.6 Proces trávení mléka a vznik bioaktivních peptidů

Trávení mléčných proteinů je komplexní proces, který zahrnuje dynamické reakce bílkovin, peptidů, aminokyselin, močoviny a amoniaku mezi lumenem střeva a ostatními tkáněmi. Požití proteiny jsou v trávicím traktu smíchány s obdobným množstvím zde přítomných endogenních proteinů (Boutrou et al., 2013). Samotné trávení začíná v žaludku působením endopeptidázy pepsinu. Pepsin je buňkami žaludku sekretován ve formě neaktivních proenzymů jako prekurzor pepsinogen, který je kyselinou chlorovodíkovou přeměněn na pepsin. Jeho činnost ustává po smíchání žaludečního obsahu a kyselá žaludeční šťáva s alkalickou pankreatickou šťávou. V kartáčovém lemu střevního epitelu následuje trávení trypsinem, chymotrypsinem a elastázou, které štěpí vnitřní peptidové vazby. Pomocí karboxy- a aminopeptidáz, které odštěpují jednotlivé aminokyseliny, dochází k rozkladu proteinů na komplexní směs oligopeptidů, dipeptidů, tripeptidů a volných aminokyselin, které jsou dále vstřebávány tenkým střechem (Choi et al., 2012). Přesný proces degradace mléčných bílkovin a jejich vstřebávání do krevního séra není doposud známý. Bylo provedeno pouze omezené množství *in vivo* simulací pro identifikaci produktů proteinové degradace. Inglingstad et al. (2010) dokázali, že syrovátkové proteiny se do jejuny dostávají rychleji a ve větším množství než kaseiny. V jejunu bylo detekováno velké množství neporušených syrovátkových proteinů, ale nerozložený kasein zde byl naopak detekován jen v malých koncentracích. Bylo zjištěno, že kaseiny zůstávají jako

sraženiny v kyselém prostředí žaludku, zatímco rozpustné syrovátkové bílkoviny putují dále do dvanáctníku. Tím se prodlužuje doba, za kterou dorazí kaseiny do tenkého střeva. Tyto výsledky vedou k představě o konceptu pomalé stravitelnosti kaseinů a naopak rychlé stravitelnosti syrovátkových bílkovin (Dangin et al., 2003).

Během posledních let bylo zjištěno, že proteiny nacházející se v potravinách, jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních peptidů. V současné době jsou za nejdůležitější zdroj těchto proteinů považovány mléčné bílkoviny. Bioaktivní peptidy jsou hydrolyzáty se specifickými aminokyselinovými sekvencemi, které mají příznivý fyziologický vliv na organismus (Udenigwe and Aluko, 2012). Mohou mít pozitivní účinky, které jsou závislé na jejich aminokyselinové struktuře, na nejdůležitější orgánové soustavě v lidském organismu a to kardiovaskulární, trávicí, imunitní a nervový systém (Korhonen and Pihlanto, 2006). Pro svoji potencionální schopnost snižovat krevní tlak, hladinu cholesterolu, zvyšovat přirozenou imunitu, antitrombotické nebo antioxidační účinky jsou bioaktivní peptidy předmětem intenzivního vědeckého zájmu. Několik druhů funkčních potravin, založených na bioaktivitě těchto peptidů již bylo uvedeno na trh anebo jsou v procesu vývoje potravinářských společností (Bhat et al., 2015).

Bioaktivní peptidy jsou ve struktuře původních mateřských proteinů neaktivní a k jejich odštěpení a následné aktivaci je nutná hydrolýza peptidových vazeb. Bioaktivní vlastnosti těchto proteinů závisí na několika faktorech, jako jsou enzymy použité pro jejich hydrolýzu, výrobní podmínky a velikost výsledných peptidů, která významně ovlivňuje jejich absorpci v enterocytech a biologickou dostupnost v cílových tkáních (Udenigwe and Aluko, 2012). Fyziologicky aktivní peptidy jsou produkovány z proteinů obsažených v potravinách buď *in vivo* hydrolýzou trávicími enzymy během gastrointestinálního trávení, nebo *in vitro* bakteriemi mléčného kvašení během fermentace mléčných výrobků, či zpracováním potravin a enzymaticky katalyzovanou proteolýzou enzymy získanými z mikroorganismů nebo z rostlin. Podle mnoha studií je za nejefektivnější produkci bioaktivních peptidů považována kombinace těchto metod (Korhonen and Pihlanto, 2006). Většina známých bioaktivních peptidů je produkována *in vitro* enzymatickou hydrolýzou nebo fermentací (FitzGerald et al., 2004). Některé tripeptidy získané z mléka fermentovaného kmenem *Lactobacillus helveticus*, byly označeny jako peptidy s nejúčinnějšími antihypertenzivními účinky (Nakamura et al., 1995). Velké množství známých bioaktivních peptidů je produkováno gastrointestinálními enzymy, nejčastěji pepsinem a trypsinem. Například ACE

inhibitory neboli inhibitory enzymu angiotenzin-konvertázy snižující hypertenzi, jsou nejčastěji produkovány trypsinem. Schopnost produkovat bioaktivní peptidy mají ale i jiné trávicí enzymy a různé enzymatické kombinace proteináz, jako jsou alkaláza, chymotrypsin a pankreatin (FitzGerald et al., 2004).

### 3.3 Vliv konzumace mléka na zdraví

#### 3.3.1 Kostí

V mléce je obsaženo všech 20 základních minerálů a vápník, nezbytný pro správný růst a vývoj kostí, je hlavním z nich. Mléko je bohatý zdroj nejen vápníku ale také složek potřebných pro jeho vstřebávání ve střevě, jako jsou laktáza a fosfopeptidy. V západních zemích jsou hlavním zdrojem vápníku právě mléko a mléčné výrobky (Goulding et al., 2004). Dospělé lidské tělo obsahuje asi 1200 g vápníku, což činí asi 1-2 % tělesné hmotnosti. Z toho se 99 % vápníku nachází v mineralizovaných tkáních, kde je přítomen ve formě fosfátů a poskytuje jim pevnost a strukturu (Nordin, 1997). Je prokázáno, že zvýšený příjem vápníku má přínos pro vývin a udržování kostní tkáně a může fungovat jako prevence osteoporózy v pokročilejším věku (Flynn et al., 1999).

Osteoporóza je následek snížení denzity kostních minerálů a je charakterizována zvýšenou křehkostí kostí vedoucí k zvýšenému riziku zlomeniny. Kvůli nárůstu průměrné délky života má osteoporóza rostoucí význam a je řazena mezi globální zdravotní problémy (European Commission, 1998; Kin et al., 1991).

Kromě množství vápníku obsaženého v potravě je důležitým faktorem pro kosti také jeho biologická dostupnost, která je z mléka a mléčných produktů výrazně vyšší, než dostupnost z potravin rostlinného původu. Množství jednotlivých složek mléka jako je laktóza nebo laktulóza má pravděpodobně potencionál zvyšovat absorpci vápníku v lidském organismu. Byly také uveřejněny studie dokazující, že vstřebávání vápníku může pozitivním způsobem ovlivnit mléčný tuk a v něm obsažená kyselina linolová (Cashman, 2006; Kerstetter, 1995).

Möller et al. (2008) prokázali, že proteiny mléčného séra stimulují proliferaci a diferenciaci osteoblastů, které se podílejí na tvorbě kolagenu a kostí. Aktivní látky stimulující osteoblasty byly objeveny v takzvaném MBP (milk basic protein), což je frakce mléčných syrovátkových proteinů složená z laktoferrinu, laktoperoxidázy a dalších aktivních proteinů (Kruger et al., 2007). Bylo zjištěno, že MBP snižují tvorbu

osteoklastů, které působí na rozklad kosti a uvolňují minerální látky do plasmy. Při denní suplementaci 40 mg MBP po dobu 6 měsíců byl prokázáno, že tato látka zvyšuje denzitu kostních minerálů a tlumí osteoresorpci (Möller et al., 2008). Milk basic protein tak hraje významnou roli v prevenci a léčbě osteoporózy. Byly objeveny i další v mléku přítomné látky jako vitamin K2 a isoflavon, které ovlivňují metabolismus (tvorbu a vstřebávání) kostí (Toba et al., 2014).

### 3.3.2 Inzulin

Inzulin je hormon snižující hladinu cukru v krvi, který je produkován beta buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (Leney and Tavare, 2009). Mléko je významným zdrojem leucinu, esenciální aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, který má důležitou funkci pro metabolismus insulínu. Na zvýšenou koncentraci leucinu v krvi reaguje signální dráha insulínu a spouští tak kaskádu reakcí iniciující fosforylaci a následnou translaci (Layman, 2003). Mléčné proteiny tak mají u zdravých lidí a u pacientů trpících diabetem druhého typu prokazatelné inzulinotropní účinky (Nilsson et al., 2007).

Kombinace mléka s pokrmem s vysokým glykemickým indexem, může vyvolat stimulaci insulínu a snížit koncentraci krevní glukózy (Frid et al., 2005). Snížení hladiny glukózy v krvi je pro lidský organismus velmi přínosné a představuje důkaz toho, že konzumace mléka může zmenšit rizika onemocnění souvisejících se syndromem inzulinové rezistence. Důsledky projevu syndromu inzulinové rezistence, známého také jako metabolický syndrom, jsou další vážná onemocnění jako obezita, intolerance glukózy, hypertenze a zvýšené riziko pro diabetes typu 2 (Reaven, 1993). Podrobným výzkumem souvislosti konzumace mléka a syndromem inzulinové rezistence se zabývali Pereira et al. (2002). Došli k závěru, že konzumace mléka a mléčných výrobků úzce souvisí s rozvojem syndromu inzulinové rezistence především u obézních jedinců s body mass indexem vyšším než 25 kg/m<sup>2</sup>. U pacientů, kteří konzumovali mléčné výrobky minimálně 35krát do týdne, byly projevy daného syndromu o 72 % menší než u těch, kteří mléčných výrobků konzumovali pouze deset za jeden týden. Epidemiologická studie, která se zabývá možnými příznivými účinky mléka a mléčných výrobků na obezitu dětí a dospělých, poukazuje také na možnou souvislost mezi poklesem množství konzumovaného mléka za poslední tři dekády a současný nárůst obezity a diabetu typu 2 v populaci za toto období (Carruth and Skinner, 2001).

Další složka přítomná v mléce, která ovlivňuje hladinu glukózy v krvi, je glutathion. Jedná se o tripeptid, který má důležitou roli antioxidantu. V organismu odstraňuje reaktivní kyslíkové částice (ROS) vzniklé oxidačním stresem, které inhibují expresi genu pro insulin (Cai et al., 2003).

Konzumace kravského mléka může také podle studie Karjalainen et al. (1992) vézt k iniciaci autoimunitní odpovědi, která ničí pankreatické beta buňky, čímž způsobuje diabetes mellitus. Iniciátorem této autoimunitní odpovědi jsou proteiny krevního séra BSA.

### 3.3.3 Nádorová onemocnění

Rakovina, která je celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí, má ročně na svědomí přibližně 7,6 milionů lidí (Davoodi et al., 2013). Skutečnost, že pouze 5-10 % výskytu této nemoci má genetický původ a zbývajících 95 % je způsobeno životním stylem, potvrzuje, že strava má na rozvoj rakoviny bezesporu významný vliv (World Cancer Research Fund, 1997). Sledování nemocných jedinců ukázalo, že přibližně 30 až 40 % případů rakoviny je možné předcházet prostřednictvím modifikace skladby stravy (Marmot et al., 2007).

Zkoumáním vlivu příjmu mléka na rozvoj rakoviny se zabývalo velké množství studií, ale výsledné údaje jsou ve většině případů sporné a nejednoznačné (Gallus et al., 2006; Qin et al., 2009; Tsuda et al., 2000). Podle Světového fondu pro výzkum rakoviny World Cancer Research Found (WCRF) existuje možnost, že konzumace mléka a mléčných produktů zvyšuje riziko nádorového onemocnění prostaty a ledvin (World Cancer Research Found, 1997).

Rakovina prostaty je jedním z nejčastějších zhoubných onemocnění u starších mužů a nadměrná konzumace mléka je často spojována se zvýšeným rizikem tohoto onemocnění. Příčinou je pravděpodobně nadbytek vápníku, který v organismu snižuje množství vitamínu D. Tento vitamin má v průběhu rakoviny prostaty významnou schopnost inhibovat růst a vývoj nádorových buněk (Davoodi et al., 2013). Další složka mléka, která by mohla mít vliv na rakovinu prostaty je hormon IGF-1 (Insulin Growth Factor), zajišťující v organismu růst a dělení buněk. Muži, kteří mají zvýšenou hladinu IGF-1 v krvi, mají oproti mužům s nižším obsahem IGF-1 vyšší riziko nádorového onemocnění prostaty (Qin et al., 2009).

Naopak pozitivně ovlivňuje konzumace mléka karcinom tlustého střeva a konečníku, které se řadí mezi třetí nejčastější nádorové onemocnění. Zvýšená

konzumace mléka a mléčných výrobků působí prokazatelně jako prevence této nemoci (Gallus et al., 2006). Studie Cho et al. (2004) zkoumala 4992 jedinců, kterým byla tato nemoc diagnostikována, a bylo prokázáno, že u pacientů konzumujících více než jednu sklenici mléka denně bylo riziko rozvoje rakoviny sníženo o 15 % v porovnání s pacienty, kteří mléko nekonzumovali vůbec nebo jen v omezeném množství. Holick (2008) ve své studii dokázal, že zvýšená konzumace vápníku obsaženého v mléce snižuje riziko rakoviny tlustého střeva. Příjem vápníku v množství 1200 až 1500 mg/den nebo 4 porce mléka a mléčných výrobků denně je podle něj nejúčinnější prevencí této nemoci.

#### 3.3.4 Sarkopenie a doplnění bílkovin

Sarkopenie je definována jako fyziologický proces, postihující zejména starší jedince, při kterém dochází k progresivní redukci svalové síly a hmoty. Často přichází společně s úbytkem kostní hmoty a osteoporózou a v pokročilém věku zapříčiňuje značné procento disability (Janssen et al., 2004). V současné době se stále zkoumají mechanismy, které k sarkopenii vedou. Přestože syntézu proteinů v organismu ovlivňuje celá řada faktorů, nejdůležitějším předpokladem pro dostatečnou syntézu proteinů kosterní svalové hmoty jsou aminokyseliny získané ze stravy (Paddon-Jones and Rasmussen, 2009).

Zvýšená konzumace bílkovin obsažených v potravinách, je u jedinců v pokročilém věku pravděpodobně jeden z důležitých mechanismů pro zlepšení zdraví svalů. Zároveň je tato cesta přirozenější a levnější, než konzumace výživových doplňků obsahujících leucin a další esenciální aminokyseliny. Výzkum se v poslední době zaměřuje na proteiny obsažené v mléce, které jsou potencionálně efektivním zdrojem aminokyslein pro stimulaci syntézy svalových proteinů a podporu růstu svalové hmoty (Cooper et al., 2016). Mléčné proteiny obsahují poměrně velké množství leucinu, který je pro syntézu svalových proteinů klíčový (Phillips et al., 2005). Konzumaci mléka a mléčných výrobků je pro zpomalení průběhu sarkopenie nejefektivnější kombinovat s pohybovou aktivitou a cvičením, které je u starších jedinců prokázáným stimulem anabolismu (Hartman et al., 2007).

Další složkou přítomnou v mléce, která může hrát důležitou roli v prevenci a zmírnění příznaků sarkopenie je vitamin D. Množství tohoto vitamínu obsaženého v organismu obecně s věkem klesá. Epidemiologická studie dokázala, že nízká hladina vitamínu D má negativní vliv na nárůst svalové hmoty a naopak dostatek tohoto

vitaminu svalovou hmotu podporuje. Přesné mechanismy, proč tomu tak je, jsou doposud neznámé, ale pravděpodobně souvisí s receptory pro vitamin D přítomnými ve svalech (Robinson et al., 2012).

### 3.3.5 Mléčná alergie a intolerance

#### 3.3.5.1 Mléčná alergie

Potravinová alergie je abnormální imunitní odpověď organismu v důsledku přecitlivělosti na potravinu nebo její složku (Helm and Burks, 2000). Mléčná alergie je nepříznivá reakce organismu na bílkoviny obsažené v mléce, která může vyvolat kožní (atopická dermatitida, kopřivka), respirační (rýma, astma, kašel) či gastrointestinální (zvracení, průjem, kolika) potíže a v extrémních případech dokonce anafylaxi (Monaci et al., 2006).

Kravske mléko je v dětství jedním z nejrozšířenějších alergenů. Ve většině případů tato přecitlivělost po prvním roce života vymizí, ale 15 % dětí zůstává na mléko alergických. Alergie na mléko může mít dva základní typy průběhu a to s pomalým, nebo akutním nástupem reakce. Jedná-li se o akutní alergickou reakci, je zprostředkována protilátkami. V případě pomalého typu se alergická reakce projeví až po několika hodinách případně dnech od požití mléka a to příznaky jako je průjem nebo úbytek hmotnosti. Tato reakce je zprostředkována T-lymfocyty. Kvůli nespecifickým symptomům je v tomto případě náročné mléčnou alergii diagnostikovat (Haug et al., 2007).

Kravske mléko obsahuje velké množství proteinů, považovaných za antigeny a schopné indukovat imunitní odpověď. Studie prováděné na velké populaci alergických pacientů ukázaly, že proteiny které mají v mléku největší zastoupení, tedy kaseiny,  $\beta$ -laktoglobuliny a  $\alpha$ -laktalbuminy, jsou také hlavními alergeny. Nejčastější je alergie na  $\alpha$ -s<sub>1</sub>kaseiny. Zároveň se ale v procesu alergie ukázaly být důležitými minoritní proteiny mléka, jako například BSA, laktoferin a imunoglobuliny (Wal, 2001). Antigenní vlastnosti mléčných proteinů lze tepelnou úpravou zmírnit. V nedávné studii bylo prokázáno, že imunitní systém u téměř 70 % pacientů trpících mléčnou alergií konkrétně na  $\beta$ -Lg, produkoval po konzumaci mléka zahřátého na 75°C výrazně menší množství imunoglobulinu E (IgE) než po konzumaci mléka syrového (Taheri-Kafrani et al., 2009). Příznivý vliv tepelné úpravy mléka na alergii potvrzuje i studie, která



dokázala, že přibližně 75 % dětí trpících mléčnou alergií toleruje mléčné výrobky, které prošly procesem pečení (170°C, 30 min) (Nowak-Wegrzyn et al., 2008).

### 3.3.5.2 Laktózová intolerance

Pojem laktózová intolerance je často chybně zaměňován za mléčnou alergii. Intolerance kravského mléka je definována jako neimunologická reakce, která se projevuje poruchami trávení a metabolismu laktózy a je způsobena nedostatkem enzymu  $\beta$ -galaktosidáza, často označovaným jako laktáza. Tento enzym, který je produkován v tenkém střevě, je zodpovědný za hydrolýzu laktózy na glukózu a galaktózu. Mléčná intolerance je oproti mléčné alergii méně závažným a častějším onemocněním (Haug et al., 2007).

Rozsah příznaků, které mohou být způsobeny laktózovou intolerancí, je velmi podobný symptomům mléčné alergie, což komplikuje rozpoznání těchto dvou diagnóz. Onemocnění se nejčastěji projevuje ekzémem, zvracením, průjmy nebo křečí žaludku. Průjem je zapříčiněn osmotickým gradientem, který vzniká ve střevě, což vede k průniku vody. Tyto příznaky mohou být zmírněny omezením příjmu mléka a mléčných výrobků (Rusnyk and Still, 2001).

Poruchami trávení laktózy trpí asi 75 % celosvětové populace, ale ne všichni z nich mají poruchu mléčné intolerance, protože k té je zapotřebí řada genetických a nutričních faktorů (Insel et al., 2004). Intolerance laktózy se může projevit v jakémkoliv věku, ale ve většině případů má plně donošené dítě schopnost produkovat laktázu, aby mohlo trávit mateřské mléko, a projevy laktózové intolerance jsou tak u novorozenců neobvyklé (Lomer et al., 2008). Nejčastěji se začne projevovat až po pátém roce věku a především u dospělých v důsledku postupného poklesu produkce laktázy. Laktózová intolerance se však také může projevit u předčasně narozených dětí, kdy dočasný nedostatek laktázy může být následkem virové nebo bakteriální enteritidy. Navíc je tato intolerance často geneticky přenášena z rodiče na dítě (Rusnyk and Still, 2001).

Bylo prokázáno, že laktózová intolerance je významným způsobem závislá na lidské rase. Nejvíce tímto onemocněním trpí populace s tmavou pletí, naopak nejméně jsou postiženi obyvatelé severní Evropy (Bahna, 2002). Je zde pravděpodobně souvislost s historickou skutečností, že do oblasti severní Evropy je datován začátek chovu dojnic zhruba už před 10 000 lety. Nedávné analýzy DNA dokázaly, že před začátkem chovu krav a konzumace kravského mléka obyvatelé těchto oblastí schopnost trávit laktózu neměli. Tato vlastnost se pravděpodobně vyvinula jako

následek zařazení savčího mléka do jídelníčku, a to zejména v období chudé sklizně (Beja-Pereira et al., 2003). Je zajímavé, že u jedinců smíšeného etnického původu se laktózová intolerance projevuje jen minimálně (Johnson, 1981).

### 3.3.6 Mléko a exprese mucinu

Mukózní povrch, jehož hlavní složkou je mucin, slouží jako přirozená bariéra gastrointestinálního traktu (GIT). Mucin je složitý glykoprotein podporující motilitu lumenu střeva (Taira et al., 2015), obsahuje také vazebná místa pro rezidentní mikroflóru a zajišťuje vysoké koncentrace imunoglobulinů, čímž zajišťuje ochranu organismu před napadením a kolonizací patogenních mikroorganismů. V gastrointestinálním traktu vytváří mucin vrstvu hlenu o výšce 30-300  $\mu\text{m}$ , která se směrem od tenkého střeva ke konečníku zvětšuje (Van Tassell and Miller, 2011). Mucin je sekretován pohárkovými buňkami intestinálního epitelu a proti proteolýze trávicími enzymy je chráněn specifickými oligosacharidy, které pokrývají 80 % hlavního řetězce (Montagne et al., 2004). Z rozšířených částí pohárkových buněk, kde jsou obsažena mucigenní zrna tvořena glykoproteinem, je dále sekretován do lumenu střeva, kde vytváří hydrofilní membránu. Doposud bylo objeveno přibližně 20 typů mucinu. Jejich přesné množství a složení v trávicí soustavě je ve vyváženém stavu díky bakteriální degradaci a současné syntéze pohárkovými buňkami (Sharma et al., 1997). V GIT se na tvorbě mukózního hlenu podílejí především MUC2, MUC5AC, MUC5B a MUC6. Během posledních let byla objevena ještě druhá třída mucinů, mezi které patří MUC1, MUC3 a MUC4. Tyto takzvané membránově asociované muciny jsou aktivními komponenty buněčných membrán a tvoří důležitou bariéru proti patogenům (Desseyn et al., 2000).

V poslední době se řada studií zaměřuje na vliv, který má přijímaná strava na pohárkové buňky a sekreci mucinu. Ukázalo se, že konzumace potravin obsahující threonin, mléčné peptidy, vlákninu a rezistentní škrob je spojena se zvýšenou sekrecí mucinů ve střevech krys (Hino et al., 2012). Výživa tedy dokáže výrazným způsobem ovlivnit jak syntézu, tak sekreci mucinu z pohárkových buněk, což může dále vést ke změnám ve složení a v jiných vlastnostech hlenu, včetně jeho tloušťky. Mucin má společně se symbiotickými bakteriemi a lymfatickým systémem klíčovou úlohu při udržování optimálního fyziologického stavu gastrointestinálního traktu (Tailford et al., 2015). Pro potvrzení či vyvrácení teorie, zda je ovlivněním exprese a syntézy mucinu pomocí výživy možné zabránit nebo podpořit onemocnění GIT, je však nutné

provést více studií. S velkou pravděpodobností by tento další výzkum mohl vést k objevení nových možností pro zlepšení funkce GIT. Cílem dalších výzkumů je najít výživový plán, který by maximalizoval ochranný účinek hlenu a zároveň minimalizoval metabolické ztráty spojené s produkcí mucinu (Montagne et al., 2004). Jakákoli složka potravy, která zvyšuje proteolickou enzymatickou aktivitu (například proteiny, endogenní enzymy) může potenciálně podporovat syntézu mucinu ve střevech (Moughan et al., 2013).

Mléko, jako jedna z nejdůležitějších složek lidské stravy, která může expresi a syntézu mucinu ovlivňovat zásadním způsobem. Touto problematikou se zabývá řada studií, většina z nich však byla doposud prováděna pouze na zvířatech nebo modelech *in vitro* (Haug et al., 2007; Plaisancié et al., 2013; Ushida et al., 2013; Zoghbi et al., 2006).

Kromě GIT pokrývá mucin také sliznice dalších orgánových soustav a je důležitou složkou slin v dutině ústní. V poslední době je častým předmětem spekulací, zda konzumace mléka a mléčných výrobků způsobuje zahleňování a nadměrnou sekreci mucinu v horních a dolních dýchacích cestách. Vznik této teorie nebyl dosud objasněn a převážná většina nejnovějších vědeckých studií tuto skutečnost vyvrací (Wüthrich et al., 2005). Mléko je však emulze, která po smíchání se slinami zvyšuje viskozitu hlenu, což může v ústní dutině způsobit pocit nadměrného zahleňování (Vingerhoeds et al., 2005).

### 3.4 Buněčný model tenkého střeva

Nejčastěji používaným modelem tenkého střeva je buněčná linie Caco-2, původně izolovaná z lidského tlustého střeva. Tato linie byla vyvinuta z buněčné linie epiteliálních buněk kolorektálního karcinomu při výzkumu rakoviny prováděným Jorgenem Foghem (Fossati et al., 2008). I přes původ Caco-2 buněk z karcinomu jsou za normálních kultivačních podmínek v přítomnosti séra a glukózy schopny po dosažení konfluence iniciovat spontánní diferenciaci. Pokud jsou tyto buňky pěstovány v kultuře, vykazují mnoho vlastností střevního epitelu, protože tvoří polarizovanou monovrstvu dobře diferencovaných cylindrických absorpčních buněk, které na svém apikálním povrchu vytváří část plazmatické membrány určenou pro absorpci, takzvaný kartáčový lem. Zde jsou přítomny přenašeče a zástupci enzymů tenkého střeva (Hilgendorf et al., 2000). Caco-2 buňky jsou nejčastěji pěstovány v kultivačních nádobách s kultivačním

médiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Zajímavostí těchto buněk je jejich schopnost silně přilnout k plastu kultivační nádoby (Ungell and Karlsson, 2003).

Caco-2 buněčný model je oproti střevnímu epitelu, který navíc obsahuje pohárkové buňky, endokrinní buňky a M-buňky, tvořen pouze buňkami absorpčními. Pohárkové buňky, které mají funkci vylučování hlenu, představují druhý nejčastější typ buněk tenkého střeva (Hilgendorf et al., 2000). Z tohoto důvodu byly k doplnění Caco-2 buněk vyvinuty z lidských střevních HT-29 buněk sublinie pohárkových buněk produkujících hlen (HT29-H) nebo mucin (HT29-MTX) (Ingels and Augustijns, 2003). Buněčná linie HT29-MTX vznikla z izolace HT-29 buněk sekretujících mucin, které byly adaptovány na methotrexát (MTX).

V intestinálním epitelu tvoří dva základní typy buněk enterocyty a pohárkové buňky. Aby byly *in vitro* studie co nejpřesnější, používají se modely se zastoupením ko-kultur obou typů těchto buněk. Enterocyty jsou zde reprezentovány Caco-2 buňkami a pohárkové buňky pak HT29-MTX buněčnými liniemi, v odpovídajícím poměru přirozeným podmínkám střeva 90:10 (Pontier et al., 2001). Předchozí studie dokázaly, že pokud jsou oba typy buněk vypěstovány ve společné kultuře, tvoří monovrstvy se spoji tzv. tight junctions (Walter et al., 1996).

### 3.5 *In vitro* model trávení

Simulace trávení *in vitro* jsou často používány pro zkoumání chování potravin a léčiv v gastrointestinálním traktu. Oproti pokusům prováděným *in vivo* mají tyto modely trávení výhodu větší rychlosti, nižší ceny a jsou bez etických omezení. To umožňuje paralelní zkoumání velkého množství vzorků sloužících pro účely screeningu. Reprokovatelnost a snadný odběr vzorků v konkrétních místech činí *in vitro* modely trávení vhodnými pro studie a tvorbu nových hypotéz. Tyto metody se snaží o napodobení fyziologických podmínek *in vivo* a kromě jiných faktorů přihlíží k přítomnosti trávicích enzymů a jejich koncentraci, pH, době trávení a koncentraci solí. Používání různých *in vitro* modelů trávení napříč výzkumnými týmy však často brání možnosti porovnat dosažené výsledky experimentů. Například velké množství enzymů získaných z rozdílných zdrojů, jako z původu prasečího, králíčího nebo lidského může značným způsobem pozměnit výsledky prováděných experimentů (Minekus et al., 2014).

V literatuře jsou nejčastěji popisovány statické modely, které obsahují v každém kroku trávení konstantní množství jídla v poměru s enzymy, solemi a žlučovými

kyselinami. Existují nicméně i gastrointestinální modely umožňující dynamickou simulaci trávení tedy fyziologické a fyzikálně-chemické procesy GIT, při kterých dochází v závislosti na čase ke změnám v pH, koncentraci enzymů a dalších faktorů (Hur et al., 2011). Výsledky z těchto *in vitro* testů ukázaly dobrou korelaci s daty získanými ve studiích s lidskými dobrovolníky (Alander et al., 1999).

Z důvodu výše uvedených poznatků došlo k vývoji vědeckého modelu SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem), tedy simulátoru střevního mikrobiálního ekosystému. Tento model byl vyvinut pro studium fyziologicko-chemických, enzymatických a mikrobiálních parametrů v simulovaném prostředí *in vitro* a je složen z pěti reaktorů, které simulují kyselé prostředí a trávení pepsinu v žaludku, trávicí procesy v tenkém střevě a mikrobiální procesy ve všech oddílech tlustého střeva. Pečlivá kontrola podmínek vnitřního prostředí v těchto reaktorech umožňuje získat komplexní a stabilní mikrobiální společenstva, které jsou strukturou i funkcí velmi podobné společenstvu přítomnému v tlustém střevu. Tento model trávení může být použit pro studium metabolického rozkladu potravin a léčiv po dobu až několika týdnů (Molly et al., 1994; Van de Wiele et al., 2004).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Příprava mléčného hydrolyzátu

Vzorky mléčného hydrolyzátu byly připraveny z hovězího mléka (syrové kravské mléko, Farma Hole, Oldřich Poláček, CZ) podle protokolu *in vitro* simulovaného gastrointestinálního trávení (Minekus et al., 2014). Byly připraveny simulované žaludeční (simulated gastric, SGF) a simulované duodenální šťávy (simulated duodenal, SDF) podle Kopf-Bolanž et al. (2012) a Versantvoort et al. (2005). Vzorek mléka (5 ml) byl smíchán s 5 ml SGF doplněného o prasečí pepsin (2000 U/ml SGF). Fáze žaludečního trávení byla provedena při teplotě 37°C po dobu 2 hodin při pH 3.0 (upraveno pomocí 1M HCl) a ukončena neutralizací přídatkem 0,5M hydrogenuhličitanu sodného (Merci, Brno, CZ). Následně bylo do tráveniny přidáno 10 ml SDF a žlučové soli (10 mM). Střevní fáze trávení byla provedena při teplotě 37°C po dobu 2 hodin při pH 7 (upraveno pomocí 1M NaOH). Enzymy (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) použité pro intestinální trávení byly: prasečí trypsin (100 U/ml SDF), hovězí chymotrypsin (50 U/ml SDF), prasečí lipáza (2000 U/ml SDF) a kolipáza (molární poměr lipáza/kolipáza : 1/2). Trávenina byla zamrazena na teplotu -80°C. Zásobní roztok mléčného hydrolyzátu byl naředěn v DNEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiu na konečnou koncentraci 1,5 µg/ml.

### 4.2 Buněčné kultury

Caco-2 buněčná linie byla získána z ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) a buněčná linie HT29-MTX byla zakoupena ze Sigma-Aldrich (Praha, CZ). Obě buněčné linie (pasáže v pořadí P37 a P74) byly kultivovány v médiu DMEM s přídatkem 20% fetálního hovězího séra (FBS), 1% neesenciálních aminokyselin, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Všechna média a činidla byla získána ze Sigma-Aldrich (Praha, CZ). Inkubace byla prováděna při teplotě 37°C a 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Médium bylo měněno každé dva dny. Buněčné linie byly zaočkovány do dvou NUNC 24jamkových kultivačních destiček s koncentrací  $3.6 \times 10^4$  Caco-2 buněk a  $0.4 \times 10^4$  HT29-MTX buněk v 1 ml DMEM pro stanovení exprese mucinu pomocí ELISA kitu. Destičky byly kultivovány po dobu čtrnácti dnů až do vytvoření 80% konfluentní buněčné monovrstvy. Plastik pro buněčné kultury byl zakoupen z Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

### 4.3 Stanovení 50% inhibiční koncentrace (MTT test)

Před testem exprese mucinu byla na základě stanovení cytotoxicity vybrána vhodná netoxická koncentrace mléčného hydrolyzátu. Použitím MTT testu byla změřena životaschopnost buněk (Caco-2, HT29-MTX a jejich ko-kultury). Buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX o koncentraci  $2.5 \times 10^3$  buněk na jamku a ko-kultura o koncentraci  $3,6 \times 10^3$  Caco-2 a  $0,4 \times 10^3$  HT29-MTX byly zaočkovány v NUNC 96jamkových destičkách a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37°C a atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Poté byl k buňkám přidán hydrolyzát mléka v dvojkovém sériovém ředění (0,008 - 16,5 µg/ml) po dobu 72 hodin. Následně bylo do každé jamky přidáno MTT činidlo (1 mg/ml) v DMEM médiu a destičky byly inkubovány další 2 hodiny při teplotě 37°C. PO inkubační době byly odsáty supernatanty a do každé jamky přidáno 100 µl DMSO. Byla změřena absorbance při vlnové délce 555 nm za použití přístroje Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, AT). Procento úmrtnosti pro každou koncentraci mléčného hydrolyzátu bylo zaneseno do grafu a použito ke stanovení 50% inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>).

### 4.4 Exprese mucinu

Z plně narostlé diferenciované 24jamkové destičky s ko-kulturou buněčných linií byl odsát supernatant a ke každé jamce byl přidán 1 ml média s mléčným hydrolyzátem (1.5 µg/ml) a destička byla následně inkubována po dobu 48 hodin. Jako kontrola bylo přidáno DNEM médium. Pro stanovení exprese mucinu použitím enzymatického imunotestu (ELISA) byly monovrstvy v jednotlivých jamkách rozrušeny pomocí pipety. Poté byl celkový obsah jamek přenesen do 15 ml polypropylenových zkumavek a zcentrifugován (2,000 x g, 10 min.). Získané supernatanty byly uchovány pro pozdější analýzu při teplotě -18°C.

### 4.5 ELISA test

Za použití kitu Human Muc2 získaného z Antibody Research (St. Charles, USA) byla u získaných supernatantů po 48 hodinách změřena sekrece MUC2 podle návodu výrobce. Před vlastním měřením byl obsah zakoncentrován na 20 % původního objemu v odstředivce Scanvac (Labogene, DK). Poté byla destička v testu ELISA změřena při vlnové délce 450 nm za použití přístroje Tecan Infinite M200. Profil mucinu vzorku

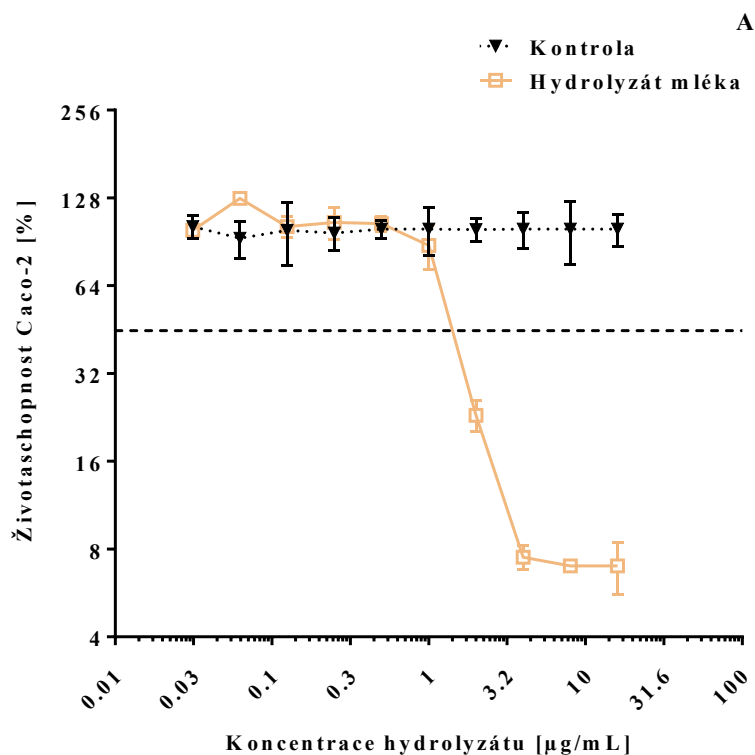
byl hodnocen ve dvou replikách. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako pg/ml proteinu v supernatantu buněk.

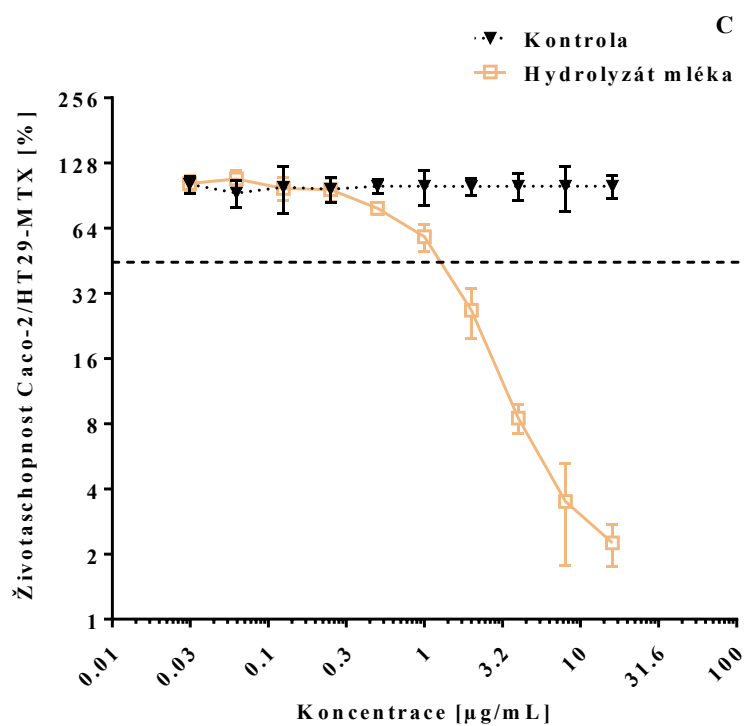
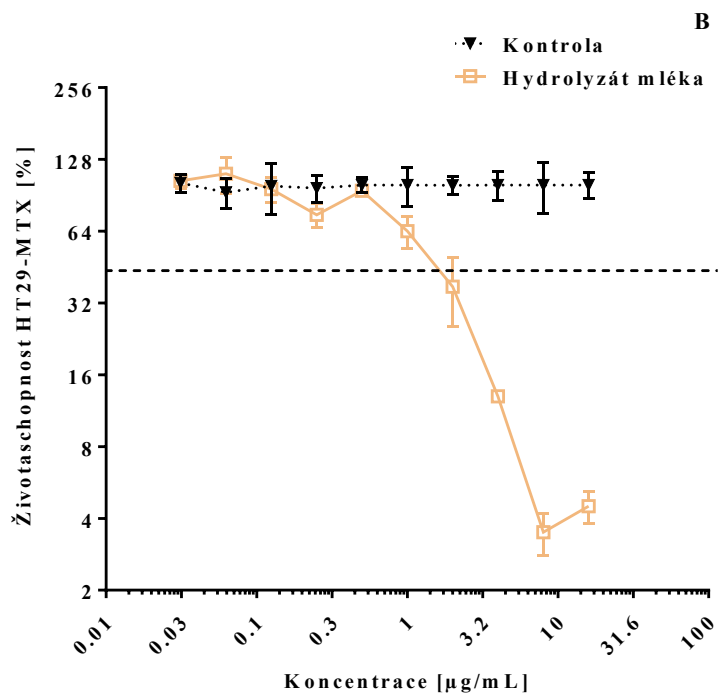


## 5 Výsledky

Náplní práce bylo stanovit, jakým způsobem ovlivňuje mléčný hydrolyzát připravený z hovězího mléka expresi mucinu MUC2 v *in vitro* buněčném modelu na ko-kultuře Caco-2 a HT29-MTX buněčných linií.

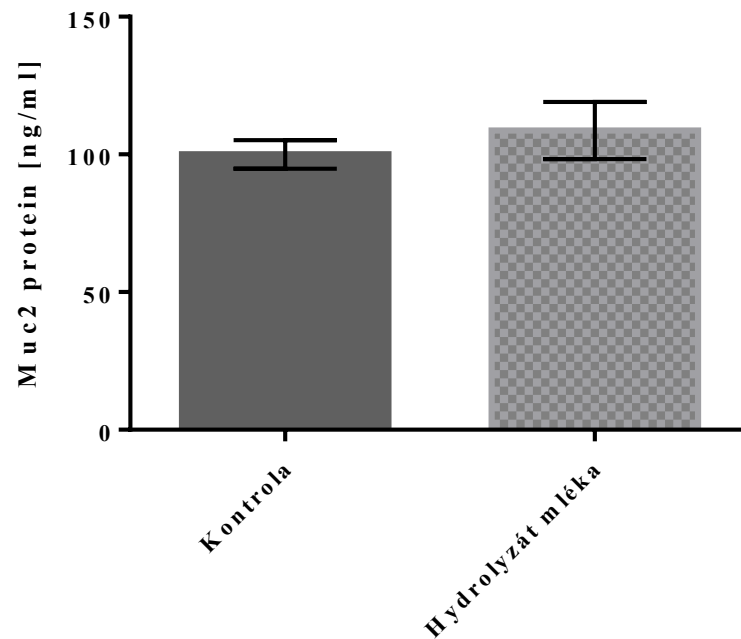
Před samotným testem exprese mucinu jsme vybrali vhodné netoxické koncentrace mléčného hydrolyzátu pomocí stanovení inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  použitím MTT testu. Pro daný test byl hydrolyzát mléka dvojkově naředěn v rozmezí koncentrací 0,008 - 16,5  $\mu\text{g/ml}$  a přidán k buněčným liniím. Hodnota  $IC_{50}$  pro Caco-2 buněčnou linii byla stanovena na 1,57  $\mu\text{g/ml}$ , pro HT29-MTX 1,56  $\mu\text{g/ml}$  a pro směsnou ko-kulturu Caco-2/HT29-MTX 1,51  $\mu\text{g/ml}$ . Všechna naměřená data cytotoxicity jsou uvedena v grafu 1 A, B, C. Ze získaných výsledků stanovení cytotoxicity byla určena koncentrace 1,5  $\mu\text{g/ml}$  mléčného hydrolyzátu, který byl přidáván ke směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX v následném experimentu exprese mucinu MUC2.





**Graf 1** Životaschopnost Caco-2 (A), HT29-MTX (B) a Caco-2/HT29-MTX (C) po přidavku hydrolyzátu mléka. Jednotlivé hodnoty vyjádřeny jako procento životaschopnosti buněk porovnáním s kontrolou ± standardní odchylka (SD).

Po zjištění netoxické koncentrace hydrolyzátu mléka k jednotlivým buňkám jsme provedli expresi mucinu MUC2 použitím ELISA testu. Ke směsné ko-kultuře byl přidán mléčný hydrolyzát o koncentraci 1,5  $\mu\text{g/ml}$  a výsledná hodnota pro expresi mucinu MUC2 po přidání hydrolyzátu byla stanovena na  $0,11 \pm 0,02$   $\text{pg/ml}$  proteinů v supernatantu buněk. Hodnota kontrolního vzorku bez přidání mléčného hydrolyzátu byla  $0,09 \pm 0,01$   $\text{pg/ml}$ . Výsledky experimentu jsou zobrazeny na grafu 2.



**Graf 2** Vyhodnocení exprese MUC2 pomocí kitu Human Muc2 na směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX po přidavku hydrolyzátu mléka v koncentraci 1,5  $\mu\text{g/ml}$ .

## 6 Diskuze

Muciny jsou vysokomolekulární glykoproteiny, které tvoří hlavní složku sliznice epitelu gastrointestinálního traktu. Jsou sekretovány cylindrickými pohárkovými buňkami rozmístěnými mezi buňkami epitelu. Rozlišují se dva typy mucinů, a to membránové a sekreční. V reprodukční, tracheobronchiální a gastrointestinální soustavě se nachází mucin sekreční, tvořící zde hlen obsahující proteiny, které jsou součástí trávení a transportu živin do organismu (Grajek and Olejnik, 2004).

Nejdůležitější funkce mucinu je tvorba mukózního povrchu, sloužícího jako přirozená bariéra, která chrání gastrointestinální trakt před patogenními organismy. Mezi další úlohy se řadí lubrikace lumenu střeva usnadňující průchod tráveniny, zachování hydratační vrstvy epitelu, ochrana epitelu před natrávením kyselými žaludečními šťávami a tvorba propustné gelové vrstvy pro výměnu plynů a živin s intestinálním epitelem. Muciny jsou také spojovány s proliferací a diferenciací buněk a mají vliv na invazi a vývoj nádorů (Leteutre et al., 2004). Díky všem těmto zmíněným funkcím a vlastnostem, hraje mucin pro lidský organismus důležitou roli a jeho exprese a sekrece se tedy stala předmětem mnoha studií.

Cílem této práce bylo ověřit, zda a do jaké míry ovlivňuje konzumace mléka a v něm přítomných proteinů expresi mucinů u epiteliálních buněk *in vitro* na statickém modelu trávení. Jako vzorek mléka byl použit mléčný hydrolyzát, získaný z kravského mléka, obohacený o trávicí šťávy a enzymy. Aby se výzkum co nejvíce přiblížil přirozeným podmínkám ve střevě, byla studie prováděna na směsné kultuře Caco-2 a HT29-MTX buněčných linií. Caco-2 buňky se samovolně diferenciují do monovrstev polarizovaných buněk, což je typické pro enterocyty a HT29-MTX mají schopnost produkovat mucin a reprezentují tak v tomto modelu pohárkové buňky (Pontier et al., 2001).

Byla zkoumána exprese mucinů MUC2, který je v trávicím traktu, především v tlustém střevě, zastoupen nejvýznamněji. Výsledky naší studie ukázaly, že mléko zvyšuje expresi mucinů MUC2 v epiteliálních buňkách. Tento typ mucinu je složený ze dvou vrstev s rozdílnou funkcí a vlastnostmi. Vnitřní vrstva, přiléhající k epitelu střeva, neobsahuje žádné bakterie a je složena z drobných pórů, které zabraňují přímému kontaktu s epiteliálními buňkami. Vrstva vnější naopak obsahuje vysoký počet bakterií a vytváří pro ně ideální prostředí (Allen et al., 2002). Studie dle Plaisancié et al. (2013) se zabývala expresí MUC2, kdy byl zkoumán vliv bioaktivních peptidů

obsažených ve fermentovaném mléce na indukci exprese mucinu v *in vivo* testech na mláďatech potkanů. Bylo prokázáno, že bioaktivní peptidy stimulují genovou expresi mucinů MUC2 a MUC4 a že  $\beta$ -kaseiny obsažené v jogurtech mají schopnost udržovat nebo obnovovat střevní homeostázu a mohou tak hrát zásadní roli v ochraně střevního lumenu.

Vzhledem k umístění mucinů mezi citlivou sliznicí a lumenem střev, mají veškeré kvalitativní i kvantitativní modifikace jejich sekrece a exprese významný vliv na jejich funkci ochranné bariéry a mohou vést k podstatným fyziologickým a patologickým změnám. Mnoho studií tak podporuje hypotézu, že změny v syntéze, sekreci a degradaci mucinu mohou mít vliv na průběh a vznik střevních onemocnění. Je uváděn příklad ulcerózní kolitidy, během které dochází k redukci počtu pohárkových buněk a k omezení sekrece mucinu, což vede ke ztrátě mukózního hleny na povrchu epitelu střeva (Einerhand et al., 2002). Z tohoto důvodu je v posledních letech zkoumán vliv různých faktorů na mucin a s ním související mukózní hlen, obsažený v gastrointestinálním traktu. Strava ovlivňuje syntézu mucinu a množství pohárkových buněk významným způsobem. Předchozí experimenty, prováděny *in vitro* i *in vivo* ukázaly, že vláknina a některé mastné kyseliny s krátkým řetězcem mohou modifikovat sekreci a expresi mucinů a zároveň také množství pohárkových buněk (Shimotoyodome et al., 2000).

Vliv složek mléka na expresi mucinu není v současné době ještě detailně objasněn. Ushida et al. (2013) se zabýval vlivem mléčného  $\alpha$ -laktalbuminu na žaludeční hlen krysy, kdy bylo prokázáno, že  $\alpha$ -laktalbumin stimuluje sekreci a syntézu mucinu v žaludeční sliznici. Další studie zkoumající dva modely (lidský a krysí) pohárkových buněk střeva došla k závěru, že peptidy s opioidní aktivitou nazývané  $\beta$ -kasomorfíny ( $\beta$ -casomorphins,  $\beta$ -CM), které byly derivovány z mléčného kaseinu, vykazovaly zvýšenou sekreci mucinu a nadměrnou expresi mucinových genů, zprostředkovanou  $\mu$ -opioidními receptory. Beta-kasomorfíny jsou bioaktivní peptidy, uvolňované z kravského mléka během gastrointestinálního trávení nebo při zpracování mléka (Zoghbi et al., 2006).

Z výše zmíněných experimentů lze předpokládat, že mléko a mléčné výrobky mají schopnost iniciovat či zvyšovat expresi a syntézu mucinů. Ačkoliv většina prováděných studií prokázala, že složky mléka mucin v epitelálních buňkách GIT ovlivňují, je žádoucí provést více experimentů, které by tyto účinky potvrdily také za podmínek

*in vivo*. V prostředí gastrointestinálního traktu je totiž obsažena řada dynamických faktorů, které by mohly výsledky studií znatelně ovlivnit.

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda a do jaké míry ovlivňuje konzumace kravského mléka a zde přítomných proteinů expresi mucinů u epiteliálních buněk gastrointestinálního traktu. Ke stanovení daného úkolu byl použit statický *in vitro* buněčný model založený na buněčných liniích Caco-2 a HT29-MTX. Experiment prokázal, že kravské mléko zvyšuje expresi mucinu MUC2. Po přidání mléčného hydrolyzátu o koncentraci 1,5 µg/ml do buněčného modelu vzrostla exprese MUC2 oproti původní hodnotě 0,09 pg/ml na 0,11 pg/ml.

Změny v syntéze a sekreci mucinu mohou mít významný vliv na jejich funkci ochranné bariéry a mohou vést k podstatným fyziologickým a patologickým změnám, tudíž další výzkum zabývající se touto problematikou by mohl vést k objevení nových možností pro zlepšení funkce gastrointestinálního traktu. Do budoucna by bylo zajímavé provést tento experiment v podmínkách *in vivo*, anebo zjistit vliv konkrétních složek mléka na expresi mucinu.

## 8 Použitá literatura

Abdelgadir, W., Ahmed, T., Dirar, H. 1998. The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal Of Food Microbiology*. 44 (1-2). 1-13.

Akerstrom, B., Flower, D. R., Salier, J. P. 2000. Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482 (1-2). 1-8.

Alander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T. 1999. The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *International Journal Of Food Microbiology*. 46 (1). 71-79.

Allen, A. 2010. Gastrointestinal Mucus. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, John Wiley & Sons. NJ, USA. 359-382.

Anema, S. G., Li, Y. 2003. Effect of pH on the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 51 (6). 1640-1646.

Atkins, P. J. 1978. The Growth of London's Railway Milk Trade. *Journal Of Transport History*. 4. 208-226.

Bahna, S. L. 2002. Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Annals Of Allergy, Asthma & Immunology*. 89 (6). 56-60.

Beja-Pereira, A., Luikart, G., England, P. R., Bradley, D. G., Jann, O. C., Bertorelle, G., Chamberlain, A. T. 2003. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genetics*. 35 (4). 311-3.

Bellwood, P. S. 2005. *The first farmers: the origins of agricultural societies* (1st pub.). Blackwell Pub. Malden, MA. ISBN: 9780631205661.

Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H. F. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal Of Food Science And Technology*. 52 (9). 5377-5392.

Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Marsset-Baglieri, A. 2013. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *American Journal Of Clinical Nutrition*. 97 (6). 1314-1323.

Brennan, J.G., Grandison, A.S. 2011. *Food processing handbook*. Wiley-VCH. Weinheim. ISBN: 9783527324682.

Brew, K. 2013.  $\alpha$ -laktalbumin. In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). *Advanced dairy chemistry. Volume 1A: Proteins, Basic Aspects*. Springer. New York, N.Y. 261-275. ISBN: 9781461447139.



- Broncová, D. 1998. Historie mlékárenství v Čechách a na Moravě. MILPO. Praha. ISBN: 8086098079.
- Burdych, J. 1999. Spotřeba mléka a mléčných výrobků. Odbor Evropské integrace Ministerstva zemědělství České republiky.
- Cai, J., Chen, Y., Seth, S., Furukawa, S., Compans, R. W., Jones, D. P. 2003. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radical Biology And Medicine*. 34 (7). 928-936.
- Carruth, B. R., Skinner, J. D. 2001. The role of dietary calcium and other nutrients in moderating body fat in preschool children. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 25 (4). 559-66.
- Carter, D. C., Ho, J. X. 1994. Structure of serum albumin. *Advances In Protein Chemistry*. 45. 153-203.
- Casey, C.E., Smith, A., Zhang, P. 1995. In: Jensen, R.G. (ed). *Microminerals in human and animal milk. Handbook of milk composition*. Academic Press. San Diego. 543-575.
- Cashman, K. D. 2006. Milk minerals (including trace elements) and bone health. *International Dairy Journal*. 16 (11). 1389-1398.
- Clark, J. H., Davis, C. L. 1980. Some Aspects of Feeding High Producing Dairy Cows. *Journal Of Dairy Science*. 63 (6). 873-885.
- Cogan, T. M. 2011. Introduction – History of dairy microbiology. In: Fuquay, J. W., Fox, P.F., McSweeney, P. L. H. (eds.). *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press. 87-92.
- Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., Creamer, L. K. 2006. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8 (1). 1-23.
- Cooper, L. A. M., Brown, S. L., Hocking, E., Mullen, A. C. 2016. The role of exercise, milk, dairy foods and constituent proteins on the prevention and management of sarcopenia. *International Journal Of Dairy Technology*. 69 (1). 13-21.
- Dahl, L., Opsahl, J. A., Meltzer, H. M., Julshamn, K. 2003. Iodine concentration in Norwegian milk and dairy products. *British Journal of Nutrition*. 90. 679-685.
- Dalsgaard, T.K., Nielsen, J.H., Larsen, L.B. 2007. Proteolysis of milk proteins lactosylated in model systems. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51 (4). 404-414.
- Dangin, M., Boirie, Y., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Fauquant, C. 2003. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 280 (2). 340-348.

Davoodi, H., Esmaeili, S., Mortazavian, A. M. 2013. Effects of Milk and Milk Products Consumption on Cancer: A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 12 (3). 249-264.

Delgado, C. 2003. Rising Consumption of Meat and Milk in Developing Countries Has Created a New Food Revolution. *Journal of Nutrition*. 133 (11). 3907-3910.

Desseyn, J. L., Aubert, J. P., Porchet, N., Laine, A. 2000. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Molecular Biology and Evolution*. (17). 1175–1184.

Einerhand, A. W. C., Renes, I. B., Makkink, M. K., van der Sluis, M., Büller, H. A., Dekker, J. 2002. Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. *European Journal Of Gastroenterology and Hepatology*. 14 (7). 757-765.

European Commission. 1998. Report on osteoporosis in the European Community: Action for prevention. Luxembourg: Office for Official Publications for the European Commission.

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D. 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature*. 455 (7212). 528-531.

FitzGerald, R. J., Murray, B., Walsh, D. 2004. Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Nutrition*. 134 (4). 980-988.

Flynn, A., Cashman, K., Hurrell R. 1999. Calcium fortification of foods. *Mineral Fortification Of Foods*. 18-53. ISBN: 0905748328.

Fossati, L., Dechaume, R., Hardillier, E., Chevillon, D., Prevost, C., Bolze, S., Maubon, N. 2008. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal Of Pharmaceutics*. 360 (1-2). 148-155.

Food and Agriculture Organization. 2009. *The State of Food and Agriculture 2009: Livestock in the Balance*. Rome.

Food and Agriculture Organization. 2012. *Dairy production and products: Milk production*. Food And Agriculture Organization Of The United Nation.

Fox, P., 2009. Lactose: Chemistry and Properties. In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). *Advanced dairy chemistry. Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer. New York, N.Y. ISBN: 9780387848648.

Fox, P., Kelly, A. 2012. Chemistry and Biochemistry of Milk Constituents. In: Simpson, B. K., Nollet, L., Toldra, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y. (eds.). *Food biochemistry and food processing (2nd ed.)*. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. ISBN:9780813808741.

Fox, P., McSweeney, P., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J. 2015. *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic & Professional. New York. ISBN: 9783319148915.

- Frid, A. H., Nilsson, M., Holst, J. J., Bjorck, I. M. 2005. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. (82). 69-75.
- Gallus, S., Bravi, F., Talamini, R., Negri, E., Montella, M., Ramazzotti, V. 2006. Milk, Dairy Products and Cancer Risk (Italy). *Cancer Causes & Control*. 17 (4). 429-437.
- Gerosa, S., Skoet, J. 2012. Milk availability: Trends in production and demand and medium-term outlook. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Goulding, A., Rockell, J. E. P., Black, R. E., Grant, A. M., Jones, I. E., Williams, S. M. 2004. Children who avoid drinking cow's milk are at increased risk for prepubertal bone fractures. *Journal Of The American Dietetic Association*. 104 (2). 250-253.
- Grajek, W., Olejnik, A. 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutritional Science*. 13 (54). 5-24.
- Groziak, S. M., Miller, G. D. 2000. Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. *British Journal of Nutrition*. 84 (1). 119-125.
- Hartman, J. W., Tang, J. E., Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Lawrence, R. L., Fullerton, A. V., Phillips, S. M. 2007. Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *American Journal of Clinical Nutrition*. 86 (2). 373-381.
- Haug, A., Høstmark, A. T., Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids In Health And Disease*. 6 (1). 6-25.
- Havea, P., Carr, A. J., Creamer, L. K. 2004. The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *Journal Of Dairy Research*. 71 (3). 330-339.
- Helm, R. M., Burks, A. W. 2000. Mechanisms of food allergy. *Current Opinion In Immunology*. 12 (6). 647-653.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C., Lipka, E. 2000. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *Journal of Pharmaceutical Science*. 89 (1). 63-75.
- Hino, S., Sonoyama, K., Bito, H., Kawagishi, H., Aoe, S., Morita, T. 2012. Low-Methoxyl Pectin Stimulates Small Intestinal Mucin Secretion Irrespective of Goblet Cell Proliferation and Is Characterized by Jejunum Muc2 Upregulation in Rats. *Journal Of Nutrition*. 143 (1). 34-40.

- Holick, M. F. 2008. Vitamin D and Sunlight: Strategies for Cancer Prevention and Other Health Benefits. *Clinical Journal Of The American Society Of Nephrology*. 3 (5). 1548-1554.
- Hullar, I., Brand, A. 1993. Nutritional factors affecting milk quality, with special regard to milk protein – A review. *Acta Veterinaca Hungarica*. 41 (1-2). 11-32.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 125 (1). 1-12.
- Hurley, W.L., Theil, P.K. 2013. Immunoglobulines in Mammary Secretions In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). *Advanced dairy chemistry. Volume 1A: Proteins, Basic Aspects*. Springer. New York, N.Y. 275-295. ISBN: 9781461447139.
- Huppertz, T. 2013, Chemistry of Caseins. In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). *Advanced dairy chemistry. Volume 1A: Proteins, Basic Aspects*. Springer. New York, N.Y. 135-161. ISBN: 9781461447139.
- Chilliard, Y., Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*. 44. 467-492.
- Cho, E., Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Beeson, W. L., van den Brandt, P. A., Colditz, G. A. 2004. Dairy Foods, Calcium, and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 10 Cohort Studies. *Jnci Journal Of The National Cancer Institute*. 96 (13). 1015-1022.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal Of Dairy Technology*. 65 (1). 1-12.
- Ingels, F. M., Augustijns, P. F. 2003. Biological, Pharmaceutical, and Analytical Considerations with Respect to the Transport Media Used in the Absorption Screening System, Caco-2. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 92 (8). 1545-1558.
- Inglingstad, R. A., Devold, T., Eriksen, E., Holm, H., Jacobsen, M. 2010. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science & Technology*. 90 (5). 549-563.
- Insel, P., Turner, R. E., Ross, D. 2004. *Nutrition*. American dietetic association. Jones and Bartlett. Sudbury, MA.
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H. 1999. Conjugated Linoleic Acid-Enriched Butter Fat Alters Mammary Gland Morphogenesis and Reduces Cancer Risk in Rats. *Journal of Nutrition*. 129 (12). 2135-2142.
- Janssen, I., Shepard, D. S., Katzmarzyk, P. T., Roubenoff, R. 2004. The Healthcare Costs of Sarcopenia in the United States. *Journal of American Geriatric Society*. 52 (1). 80-85.

- Jauhiainen, T., Korpela, R. 2007. Milk peptides and blood pressure. *Journal of Nutrition*. 137 (3). 825-829.
- Jenkins, T. C., McGuire, M. A. 2006. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal Of Dairy Science*. 89 (4). 1302-1310.
- Johnson, J. D. 1981. The regional and ethnic distribution of lactose malabsorption. Adaptive and genetic hypotheses. *Lactose Digestion. Clinical And Nutritional Implications*. 11–22.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. 2009. Co by jste měli vědět o výrobě potravin? *Technologie potravin*. Key publishing Ostrava. ISBN:9788074180514.
- Karjalainen, J., Martin, J. M., Knip, M., Ilonen, J., Robinson, B. H., Savilahti, E. 1992. A Bovine Albumin Peptide as a Possible Trigger of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England Journal Of Medicine*. 327 (5). 302-307.
- Kelly, A., Fox, P. 2012. *Biochemistry of Milk Processing*. In: Simpson, B. K., Nollet, L., Toldra, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y. (eds.). *Food biochemistry and food processing* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. ISBN:9780813808741.
- Kerstetter, K. 1995. Do dairy products improve bone density in adolescent girls? *Nutrition Reviews*. 53 (11). 328-332.
- Kin, K., Kushida, K., Yamazaki, K., Okamoto, S., Inoue, T. 1991. Bone mineral density of the spine in normal Japanese subjects using dual-energy X-ray absorptiometry: Effect of obesity and menopausal status. *Calcified Tissue International*. 49 (2). 101-106.
- Kopf-Bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergeres, G., Portmann, R., Egger, L. 2012. Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans *The Journal of Nutrition*. 142 (2). 245–250.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16 (9). 945-960.
- Kruger, C. L., Marano, K. M., Morita, Y., Takada, Y., Kawakami, H., Kobayashi, T. 2007. Safety evaluation of a milk basic protein fraction. *Food And Chemical Toxicology*. 45 (7). 1301-1307.
- Kuwajima, K., Ikeguchi, M., Sugawara, T., Hiraoka, Y., Sugai, S. 1990. Kinetics of disulfide bond reduction in .alpha.-lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys6-Cys120 disulfide bond. *Biochemistry*. 29 (36). 8240-8249.
- Layman, D. K. 2003. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *The Journal Of Nutrition*. 133 (1). 261-267.
- Lederberg, J. 2000. Infectious history. *Science*. 288 (5464). 287-293.

- Ledoux, M., Chardigny, J. M., Darbois, M., Soustre, Y., Sébédio, J.L., Laloux, L. 2005. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal Of Food Composition And Analysis*. 18 (5). 409-425.
- Leney, S. E., Tavaré, J. M. 2009. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *Journal Of Endocrinology*. 203 (1). 1-18.
- Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D. 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology Of The Cell*. 96 (2). 145-151.
- Li, Y. H., Zhang, L. W., Wang, W. J., Li, H. B., Xue, C. H. 2012. Changes in Protein Components and Size Distribution of Bovine Milk Fat Globules Caused by Heat Treatment. *Advanced Materials Research*. 1281-1284.
- Likler, L., Augusta P. 2001. *Historie mlékárenství v Čechách, na Moravě a ve Slezsku (Vyd. 1.)*. Milpo Media. Praha. ISBN: 8086098192.
- Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., Sandersson, J. D. 2008. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 27 (2). 93-103.
- Ludwig, D. S., Willett, W. C. 2013. Three Daily Servings of Reduced-Fat Milk. *Jama Pediatrics*. 167 (9). 788-789.
- MacGibbon, A.K.H., Taylor, M.W. 2009. Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). *Advanced dairy chemistry. Volume 2: Lipids*. Springer. New York. ISBN: 0387288139.
- Macháčková, M. 2001. Vývoj spotřeby mléka a příjmu živin v České republice. *Výživa a potraviny*. 1. 14-15.
- Manzo, C., Nicolai, M. A., Pizzano, R. 2015. Thermal markers arising from changes in the protein component of milk. *Food Control*. 51. 251-255.
- Marmot, M., Atinmo, T., Chen, J., Hirohata, T., Jakson, A. 2007. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective : a project of World Cancer Research Fund International. American Institute for Cancer Research. Washington, D.C.
- McCance, R., Widdowson, E. M. 2004. *The composition of foods (6th summary ed)*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. ISBN: 0854044280.
- Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Jollès, P. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal Of Dairy Research*. 56 (3). 357-362.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*. 5 (6). 1113-1124.

- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal Of Nutrition*. 47 (4). 171-182.
- Molly, K., Woestyne, M. V., Smet, I. D., Verstraete, W. 1994. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microbial Ecology In Health And Disease*. 7 (4). 191-200.
- Monaci, L., Tregoeat, V., van Hengel, A. J., Anklam, E. 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research And Technology*. 223 (2). 149-179.
- Montagne, L., Piel, C., Lallès, J. P. 2004. Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications. *Nutrition Reviews*. 62 (3). 105-114.
- Moughan, P. J., Rutherford, S. M., Balan, P. 2013 Kiwifruit, Mucins, and the Gut Barrier. *Advances in Food and Nutrition Research*. 68. 169-185.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. 1995. Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk *Journal Of Dairy Science*. 78 (4). 777-783.
- Nilsson, M., Holst, J. J., Björck, I. 2007. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *American Journal of Clinical Nutrition*. 85 (4). 996-1004.
- Nitta, K., Sugai, S. 1989. The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin. *European Journal Of Biochemistry*. 182 (1). 111-118.
- Nordin, B. E. 1997. Calcium in health and disease. *Food, Nutrition And Agriculture*. 20. 13-26.
- Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., Wanich, N., Sampson, H. A. 2008. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 122 (2). 342-347.
- Ohgushi, M., Wada, A. 1983. 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *Febs Letters*. 164 (1). 21-24.
- Ortman, K., Pehrson, B. 1999. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *Journal of Animal Science*. 77 (12). 3365-3370.
- Paddon-Jones, D., Rasmussen, B. B. 2009. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care*. 12 (1). 86-90

- Pakkanen, R., Aalto, J. 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*. 7 (5). 285-297.
- Peacock, M. 1991. Calcium absorption efficiency and calcium requirements in children and adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54. 261-265.
- Pereira, M. A., Jacobs, Jr, D. R., Van Horn, L., Slattery, M. L., Kartashov, A. I., Ludwig, D. S. 2002. Dairy Consumption, Obesity, and the Insulin Resistance Syndrome in Young Adults. *Jama*. 287 (16). 2081-2089.
- Peterka, R. Mléčné výrobky dobývají Česko. 2008. Mléčné výrobky dobývají Česko. Svět obchodu.
- Phillips, G., Williams P. 2009. *Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition)*. Woodhead Publishing. ISBN: 9781845694142.
- Phillips, S. M., Hartman, J. W., Wilkinson, S. B. 2005. Dietary Protein to Support Anabolism with Resistance Exercise in Young Men. *Journal Of The American College Of Nutrition*. 24 (2). 134-139.
- Plaisancié, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., Boutrou, R., Paquet, A., Léonil, J. 2013. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*. 24 (1). 213-221.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 90 (10). 1608–1619.
- Price, T., Tringham, R., Barnett, W., Binder, D., Zilhao, J., Jochim, M. 2000. *Europe's first farmers*. Cambridge University press. New York. 1-19. ISBN: 0521662036.
- Qin, L. Q., He, K., Xu, J. Y. 2009. Milk consumption and circulating insulin-like growth factor-I level: a systematic literature review. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*. 60 (7). 330-340.
- Reaven, G. M. 1993. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*. 44. 121-131.
- Robinson, S., Cooper, C., Aihie Sayer, A. 2012. Nutrition and Sarcopenia: A Review of the Evidence and Implications for Preventive Strategies. *Journal Of Aging Research*. 1-6.
- Rollinger, M. 2007. *Milch besser nicht: ein kritisches Lesebuch*. Jou-Verl. ISBN: 3940236004
- Rusnyk, E. A., Still, C. D. 2001. Lactose intolerance. *Journal of American Osteopathic Association*. 101 (4).



Sawyer, L. 2013.  $\beta$ - lactoglobulin. In: Fox, P., McSweeney, P. (eds.). Advanced dairy chemistry. Volume 1A: Proteins, Basic Aspects. Springer. New York, N.Y. 211-261. ISBN: 9781461447139.

Sharma, R., Fernandez, F., Hinton, M., Schumacher, U. 1997. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. Cellular And Molecular Life Sciences. 53 (12). 935-942.

Shimotoyodome, A., Meguro, S., Hase, T., Tokimitsu, I., Sakata, T. 2000. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 125 (4). 525-531.

Singh, H., Boland, M., Thompson, A. 2014. Milk proteins: from expression to food (2nd edition). Amsterdam: Academic Press. ISBN: 9780124051713.

Společnost pro výživu. 2012. Výživové doporučení pro obyvatelstvo ČR. Praha.

Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J. C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M. 2009. Effects of Heating and Glycation of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Recognition by IgE of Sera from Cow Milk Allergy Patients. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 57 (11). 4974-4982.

Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., Juge, N. 2015. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. Frontiers In Genetics. 6 (81).

Taira, T., Yamaguchi, S., Takahashi, A., Okazaki, Y., Yamaguchi, A., Sakaguchi, H., Chiji, H. 2015. Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition. 57 (3). 212.

Toba, Y., Takada, Y., Matsuoka, Y., Morita, Y., Motouri, M., Hirai, T. 2014. Milk Basic Protein Promotes Bone Formation and Suppresses Bone Resorption in Healthy Adult Men. Bioscience, Biotechnology And Biochemistry. 65 (6). 1353-1357.

Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M. 2000. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. Mutation Research/reviews In Mutation Research. 462 (2-3). 227-233.

Turhan, K. N., Barbano, D. M., Etzel, M. R. 2003. Fractionation of Caseins by Anion-exchange Chromatography Using Food-grade Buffers. Journal Of Food Science. 68 (5). 1578-1583.

Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. Journal Of Food Science. 77 (1). 11-24.

- Ungell, A., Karlsson, J. 2003. Cell cultures in drug discovery. In: Waterbeemd H., Lennernars H., Artursson P. 2003. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption, and bioavailability. Weinheim. 90-131. ISBN: 9783527601479.
- Ushida, Y., Shimokawa, Y., Matsumoto, H., Toida, T., Hayasawa, H. 2013. Effects of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin on Gastric Defense Mechanisms in Naive Rats *Bioscience, Biotechnology And Biochemistry*. 67 (3). 577-583.
- Valenze, D. M. 2011. Milk: a local and global history. Yale University Press. New Haven. ISBN: 9780300188127.
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W. 2004. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Fems Microbiology Ecology*. 51 (1). 143-153.
- Van Tassel, M., Miller, M. 2011. Lactobacillus Adhesion to Mucus. *Nutrients*. 3 (5). 613-636.
- Varnam, A.H., Sutherland, J.P. 2001. Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology. Gaithersburg. Aspen Publishers. ISBN: 0834219557.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food And Chemical Toxicology*. 43 (1). 31-40.
- Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., van Aken, G. A. 2005. Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*. 19 (5). 915-922.
- Wal, J. M. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy*. 56 (67). 35-38.
- Walstra, P., Wouters, J. T., Geurts, T. 2005. Dairy science and technology (2nd ed.). Boca Raton: CRC/Taylor & Francis. ISBN: 1420028014.
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B. J., Hilfinger, J. M. 1996. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (10). 1070-1076.
- Ward, A. T., Wittenberg, K. M., Froebe, H. M., Przybylski, R., Malcolmson, L. 2003. Fresh Forage and Solin Supplementation on Conjugated Linoleic Acid Levels in Plasma and Milk. *Journal Of Dairy Science*. 86 (5). 1742-1750.
- WHO. World Health Organization. 1985. Energy and protein requirements. Geneva: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation.
- Wiley, A. 2015. Re-imagining Milk: Cultural and Biological Perspectives. Routledge. ISBN: 0415806577.

World Cancer Research Found (WCRF): Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. 1997. American Institute for Cancer Research. Washington DC, USA.

Wüthrich, B., Schmid, A., Walther, B., Sieber, R. 2005. Milk Consumption Does Not Lead to Mucus Production or Occurrence of Asthma. *Journal Of The American College Of Nutrition*. 24 (6). 547-555.

Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W., Anema, S. 2002. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*. 12 (4). 393-402.

Zoghbi, S., Trompette, A., Claustre, J., El Homsy, M. 2006. Beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a  $\mu$ -opioid pathway. *Gastrointestinal And Liver Physiology*. 290 (6). 1105-1113.

## 9 Seznam použitých zkratek

$\alpha$ -La	$\alpha$ -laktalbumin
$\beta$ -Lg	$\beta$ -laktoglobulin
$\beta$ -CM	$\beta$ -casomorphins, $\beta$ -kasomorfíny
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine serum albumine, Albumin krevního séra
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EU	Europien Union, Evropská Unie
FAO	Food and Agriculture Organization
FBS	Fetal Bovine Serum, Fetální hovězí sérum
GIT	Gastrointestinální trakt
IC	Inhibiční koncentrace
IgA	Imunoglobulin A
IDF	International Dairy Federation, Mezinárodní mlékařská federace
IGF-1	Insulin Growth Factor
MBP	Milk basic protein
MG	Molten globule
MTX	Methotrexát
MUC	Geny kódující membránové proteiny u řady mucinů
ROS	Reactive oxygen species, reaktivní kyslíkové částice
SDF	Simulated duodenal fluid, Simulovaná duodenální šťáva
SGF	Simulated gastric fluid, Simulovaná žaludeční šťáva
SHIME	Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem
UHT	Ultra-high Temperature Processing
WCRF	World Cancer Research Fund, Světového fondu pro výzkum rakoviny
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace