

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Analýza oligosacharidů mateřského mléka

Bakalářská práce

Autor práce: Klára Sochorová

Obor studia: Výživa a potraviny

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

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 20.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Romanu Švejstilovi za cenné rady, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři.

Analýza oligosacharidů mateřského mléka

Souhrn

Mateřské mléko je unikátní díky vysoké koncentraci a rozmanitosti oligosacharidů. Oligosacharidy tvoří jeho třetí největší složku a mají vícero funkcí. Jednou z nejvíce uznávaných výhod oligosacharidů mateřského mléka je prebiotický efekt. Díky této funkci dokážou příznivě pozměňovat střevní mikrobiotu hostitele. Podílí se ale i na rozvoji mozku, imunitě hostitele, antimikrobiálním a antiadhezivním účinku.

Cílem této práce bylo analyzovat oligosacharidy mateřského mléka a dalších savčích mlék, porovnat jejich struktury a otestovat jejich vliv na střevní mikrobiotu. Oligosacharidy byly úspěšně vyizolovány pomocí gelové chromatografie z mateřského mléka a dalších savčích mlék a analyzovány na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii. Dále byla ověřena schopnost různých druhů bifidobakterií využívat odlišné frakce oligosacharidů mateřského mléka jako zdroj energie.

Kmeny *Bifidobacterium bifidum*, které jsou lidského původu, dokázaly plně využívat oligosacharidy mateřského mléka. Částečně byly schopné oligosacharidy mateřského mléka využívat i lidské kmeny *Bifidobacterium breve*. Nulová růstová aktivita byla naopak prokázána u kmenů bifidobakterií zvířecího původu.

Klíčová slova: oligosacharidy mateřského mléka, prebiotika, střevní mikrobiota, bifidobakterie

Analysis of Human Milk Oligosaccharides

Summary

Breast milk is unique because of high concentration and diversity of oligosaccharides. Human milk oligosaccharides are its third largest component. Their importance is due to various beneficial biological activities. One of the most recognized benefits of human milk oligosaccharides is prebiotic effect. Due to this feature they can favourably modify the host's intestinal microbiota. They are also involved in brain development, host's microbial immunity and anti-adhesive effect.

The aim of this thesis was analyze human milk oligosaccharides and oligosaccharides of other mammalian milks, compare their structures and test their effects on intestinal microbiota. Oligosaccharides were successfully isolated from human milk and milk of others mammals using gel chromatography and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Furthermore, the ability of bifidobacteria to utilize several different fractions of human milk oligosaccharides was evaluated.

Human-origin strains of *Bifidobacterium bifidum* were fully able to utilize the fractions of human milk oligosaccharides, while human-origin strains of *Bifidobacterium breve* were only partially able to utilize the human milk oligosaccharide fractions. No growth on human milk oligosaccharides was shown by bifidobacteria of animal origin.

Keywords: human milk oligosaccharides, prebiotics, intestinal microbiota, bifidobacteria

Obsah

1 ÚVOD.....	1
2 CÍL PRÁCE.....	1
2.1 Hypotéza.....	1
3 PŘEHLED LITERATURY.....	2
3.1 Mateřské mléko	2
3.1.1 Složení mateřského mléka	2
3.1.1.1 Sacharidy.....	3
3.1.1.2 Proteiny	3
3.1.1.3 Protilátky	4
3.1.1.4 Lipidy	4
3.1.1.5 Vitaminy, minerální látky a enzymy	5
3.1.2 Dělení mateřského mléka.....	6
3.1.3 Vlastnosti mateřského mléka	6
3.1.3.1 Sacharidy.....	6
3.1.3.2 Proteiny	6
3.1.3.3 Lipidy	7
3.1.3.4 Vitaminy.....	8
3.1.4 Rozdíl mezi mateřským a kravským mlékem.....	8
3.2 Oligosacharidy.....	9
3.2.1 Počátky ve výzkumu oligosacharidů mateřského mléka	9
3.2.2 Oligosacharidy mateřského mléka.....	12
3.2.3 Složení oligosacharidů mateřského mléka.....	12
3.2.4 Metabolismus oligosacharidů mateřského mléka	13
3.2.5 Vlastnosti oligosacharidů mateřského mléka	14
3.2.5.1 Prebiotický efekt	15
3.2.5.2 Antimikrobiální efekt.....	16
3.2.5.3 Rozvoj imunitního systému.....	17
3.2.5.4 Rozvoj mozku	18
3.2.6 Oligosacharidy v ostatních mlécích.....	19
3.2.7 Alternativy oligosacharidů mateřského mléka	19
3.2.7.1 Využití kravských oligosacharidů.....	20
3.2.8 Izolace oligosacharidů	21
3.3 Bifidobakterie	21
4 MATERIÁL A METODIKA	23
4.1 Izolace oligosacharidů z mléka	23

4.1.1	Příprava vzorků.....	23
4.1.2	Gelová permeační chromatografie.....	23
4.1.3	Tenkovrstvá chromatografie	24
4.1.4	Bradfordův test	24
4.2	Analýza oligosacharidů.....	25
4.3	Kultivace bakterií na oligosacharidech	25
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Izolace oligosacharidů z mléka	27
5.2	Analýza oligosacharidů.....	29
5.3	Kultivace bakterií na oligosacharidech.....	34
6	DISKUZE	36
6.1	Izolace oligosacharidů z mateřského mléka	36
6.2	Kultivace bakterií na oligosacharidech	36
6.2.1	Skupina Bifidobacterium longum	36
6.2.2	Skupina Bifidobacterium bifidum	37
6.2.3	Skupina Bifidobacterium breve	37
6.2.4	Skupina animálních bifidobakterií.....	38
7	ZÁVĚR	38
8	SEZNAM LITERATURY.....	39

1 ÚVOD

Mateřské mléko je jediným zdrojem potravy novorozenců v jejich počátečním období života a je považováno za zlatý nutriční standard. Tato pozoruhodná tekutina se vyvíjela více než 150 milionů let a obsahuje všechny potřebné živiny, které jsou pro růst dětí nezbytné, ale také složky, které mohou poskytovat zdravotní výhody nad rámec tradičních živin.

Jako hlavní makronutrienty jsou v mateřském mléce obsaženy lipidy, proteiny a sacharidy, z nichž nejvíce je zastoupena laktóza. Mléko dále obsahuje vitaminy, enzymy a minerální látky i širokou škálu biologicky aktivních sloučenin, včetně imunoglobulinů, nukleotidů a oligosacharidů. Tyto komponenty jsou obsaženy na úrovni vhodné pro optimální růst, ochranu a podporu vývoje dítěte.

Třetí nejvíce obsaženou složku mateřského mléka představují oligosacharidy. Jejich množství je ovlivněno fází laktace a pohybuje se v rozmezí od 7 g/L do 20 g/L. Struktury a složení oligosacharidů mateřského mléka jsou mnohem složitější než v mlécích jakýchkoli jiných zkoumaných druhů. Lze říci, že se jedná o velmi strukturálně rozdílné sloučeniny s mnoha izomery. Obsahují téměř 200 dosud známých struktur a jejich výzkum stále pokračuje.

Oligosacharidy mateřského mléka jsou mimo jiné zdrojem energie pro růst zdravých prospěšných střevních bakterií. Snižují úmrtnost předčasně narozených dětí a chrání je proti nekrotizující enterokolitidě, kandidóze nebo Zároveň pozitivně působí na vývoj centrální nervové soustavy, podílí se na rozvoji imunitního systému a chrání kojence před vznikem infekcí díky jejich schopnosti inhibovat vaznost patogenů na povrchové receptory buněk, čímž zvyšují odolnost kojených dětí.

2 CÍL PRÁCE

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

2.1 Hypotéza

Hypotézou bylo, že se oligosacharidy mateřského mléka budou ve složení lišit od oligosacharidů z mléka dalších savců a budou rovněž podporovat jiné druhy bakterií.

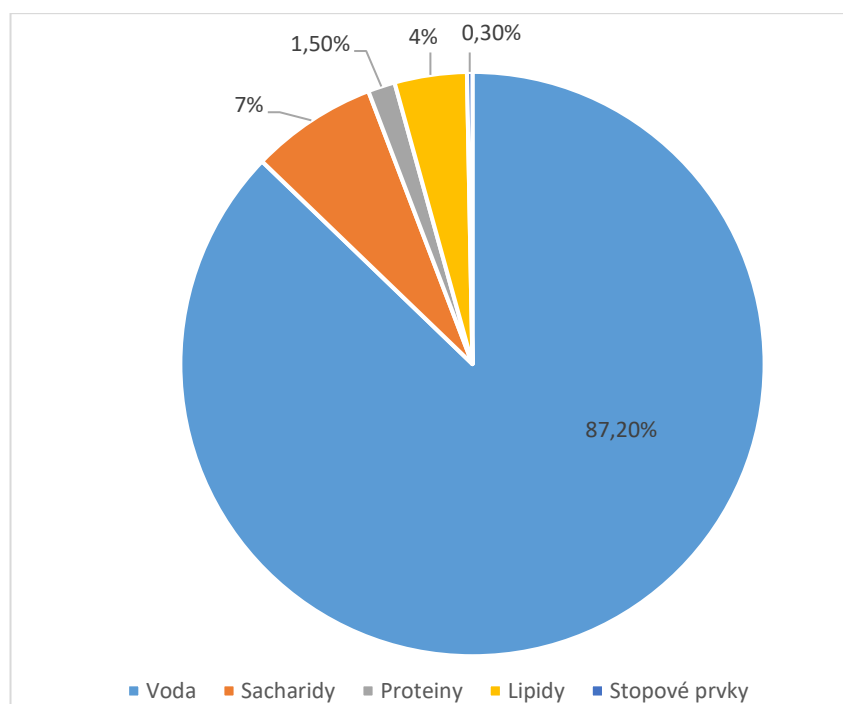
3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je nejvhodnější stravou pro novorozence. Plně zajistí dodávku všech potřebných živin (Vincentová, 2006). Díky svému jedinečnému složení a biologickým vlastnostem je pro člověka nenahraditelné. Poskytuje řadu výhod jak pro kojence, tak i pro kojící matku (Bronský et Mitrová, 2013). Kojené děti mají snížené riziko vzniku infekce dýchacích cest, atopické dermatitidy, astmatu, obezity, diabetu 1. a 2. typu, nekrotizující enterokolitidy, gastroenteritidy a syndromu náhlého úmrtí kojence (Fitzstevens et al., 2016). Existují navíc důkazy, že kojení má pozitivní vliv na zdraví jedince i v dospělosti (Bronský et Mitrová, 2013).

3.1.1 Složení mateřského mléka

Mateřské mléko (MM) obsahuje komplex biologicky-aktivních látek (Graf 1), jako jsou sacharidy (zejména oligosacharidy), mastné kyseliny, aminokyseliny, minerální látky, vitaminy a další esenciální živiny (Musilová et Rada, 2015).



Graf 1 Složení mateřského mléka (Hennet, Weiss, & Borsig, 2014).

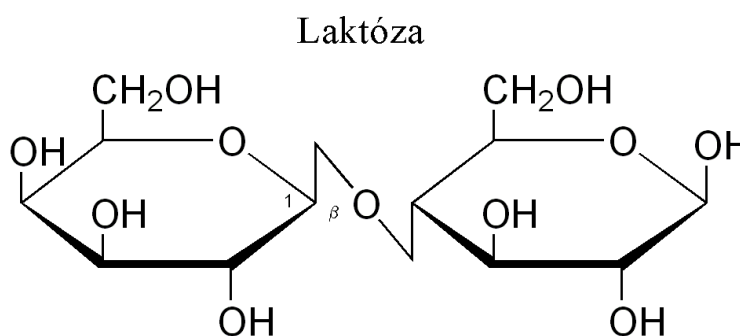
Složení makronutrientů závisí na fázi laktace, ale je pozoruhodně zachováno u všech žen napříč všemi skupinami obyvatel i přes jejich odlišný nutriční stav. Nicméně složení mikronutrientů

v MM závisí na stravě matky a jejích tělesných zásobách, včetně vitaminů A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, D a jódu (Ballard et Morrow, 2013).

3.1.1.1 Sacharidy

Sacharidy jsou především zastoupeny laktosou, dále je v MM přítomna galaktosa, fruktosa a malé množství jiných sacharidů (Nevoral, 2003).

Laktosa je disacharid, který sestává z glukosy kovalentně vázané na galaktosu (Obrázek 1). MM obsahuje nejvyšší koncentraci laktosy ve srovnání s ostatními zkoumanými druhy mlék. Je to dáno vysokou energetickou náročností lidského mozku (Andreas et al., 2017). Koncentrace laktosy je nejnižší v kolostru (19 g/L) a při její sekreční aktivaci a zvyšuje až na 54 g/L (Geddes et al., 2017).



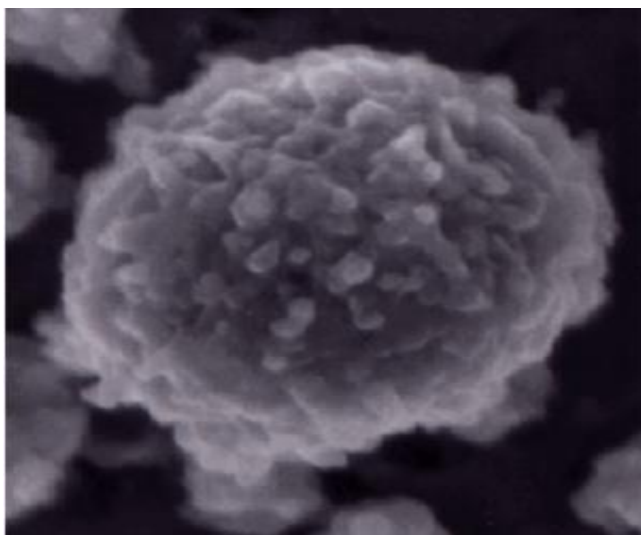
Obrázek 1 Laktosa (Haworthův vzorec). Zdroj: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Lactose\(lac\).png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Lactose(lac).png)

Další významnou částí mateřského mléka tvoří oligosacharidy, které jsou nestravitelné pro kojence (Andreas et al., 2017). Podrobněji je o mléčných oligosacharidech pojednáno v další části práce (3.2).

3.1.1.2 Proteiny

Zastoupení dusíku v MM se skládá z nebílkovinné a bílkovinné části. Obsah bílkovin se pohybuje v průběhu kojení s vysokými hladinami na začátku laktace (4,2 - 15,8 g/L), které se postupně sníží na relativně stabilní úroveň ve zralém mléce (1,2 – 6,9 g/L) (Geddes et al., 2017).

V MM je obsaženo více než 400 různých proteinů, které vykonávají různé funkce. Mohou být rozděleny do tří skupin – kaseinové, syrovátkové a mucinózní proteiny (Andreas et al., 2017). Muciny jsou přítomny v membráně mikroglobul mléčného tuku. Syrovátka a kasein jsou klasifikovány podle jejich rozpustnosti. Kasein je přítomen ve formě nerozpustných micel (Obrázek 2), zatímco syrovátkové proteiny jsou rozpustné.



Obrázek 2 Struktura kaseinové mycely (Andreas et al., 2017).

Mezi rozpustné syrovátkové frakce, které jsou přítomné ve významném množství, patří α -laktalbumin, imunoglobulin, sérový albumin, lysozym a laktoferin (Andreas et al., 2017). Laktoferin je hlavním proteinem v MM, zatímco například kravské mléko obsahuje jen jeho stopové množství (Coppa et al., 2006). Kasein je složen z α -kaseinu, β -kaseinu a κ -kaseinu. κ -Kasein stabilizuje nerozpustný α -kasein a β -kasein a společně tvoří koloidní suspenzi. Z celkového obsahu proteinů mateřského mléka je kasein zastoupen pouze ze 13 %. To je nejmenší zastoupení kaseinu ze všech zkoumaných druhů mlék, což odpovídá pomalému růstu dětí (Andreas et al., 2017).

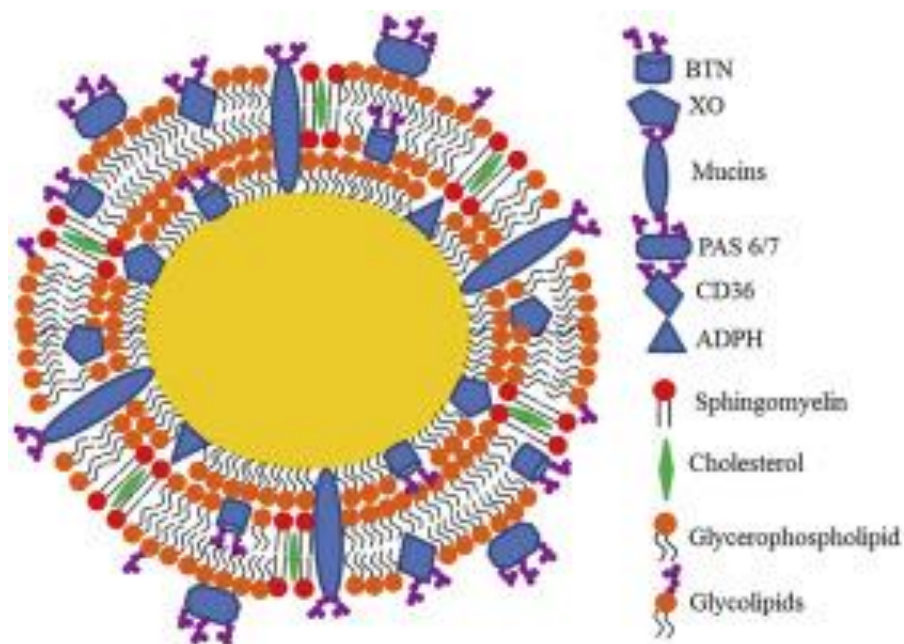
3.1.1.3 Protilátky

Imunoglobuliny, přítomné v počátku laktace ve zvláště vysokých koncentracích, se nacházejí v MM jako sekreční imunoglobuliny A. Tato forma nejvíce převládá a je následována formou sekrečních imunoglobulinů G. Tyto imunoglobuliny poskytují imunologickou ochranu dítěte, jehož vlastní imunitní systém se teprve vyvíjí (Andreas et al., 2017).

3.1.1.4 Lipidy

Lipidy jsou největším zdrojem energie v MM, přispívají 40 – 50 % k jeho energetické hodnotě a jejich průměrný obsah je 41 g/L (Andreas et al., 2017; Geddes et al., 2017). Mezi faktory ovlivňující obsah tuku patří věk matky, fáze kojení, strava a nutriční stav (Geddes et al., 2017).

V MM se nachází ve formě lehce stravitelných mikroglobul triacylglycerolů (Obrázek 3), které jsou obaleny fosfolipidy a cholesterolem. MM obsahuje více než 200 druhů mastných kyselin, ovšem mnoho z nich je přítomno ve velmi nízkých koncentracích. Z toho 42 % jsou nasycené, sloužící jako zdroj energie. Nenasycené mastné kyseliny tvoří 57 %, jsou esenciální pro růst, vývoj mozku a sítnice. Například obsah olejové kyseliny je 30 – 40 g/ 100g tuku. Přibližně 30–40 % vstřebaných tuků je trávených lipázou obsaženou v MM (Andreas et al., 2017; Kopřiva, 2010).



Obrázek 3 Struktura mikroglobule triacylglycerolu. Zdroj: <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0268005X16305410-fx1.jpg>.

3.1.1.5 Vitaminy, minerální látky a enzymy

Mateřské mléko poskytuje kojenci jak vitaminy, tak enzymy a minerální látky včetně stopových prvků (Geddes et al., 2017).

Obsah vitaminů tvoří vitaminy rozpustné v tucích (A, E, D, K) a vitaminy rozpustné ve vodě, hlavně C, B₆ a kyselina listová. Nedostatkový bývá většinou vitamin B₁₂. Z celkového množství minerálních látek je největší koncentrace sodíku, vápníku, železa, hořčíku, fosforu, mědi, chloru a fluoru (Nevoral, 2003).

MM obsahuje, stejně jako mléka jiných druhů, mnoho enzymů. Objeveno jich bylo více než 30, např. amylasa, lipasa, katalasa, proteasa nebo transaminasa. Význam všech enzymů však ještě není zcela pochopen (Hambraeus, 1984).

3.1.2 Dělení mateřského mléka

Prvotní tekutina, produkováána matkami po porodu, se nazývá kolostrum (mlezivo). Liší se objemem, vzhledem a složením. Kolostrum, které je produkovááno v malých množstvích prvních pár dnů po porodu, je bohaté na imunologické komponenty, jako jsou imunoglobulin A, laktoferin, leukocyty a vývojové faktory jako je epidermální růstový faktor (Ballard et Morrow, 2013).

V období mezi 5 až 14 dnem po porodu se tvoří tzv. přechodné mateřské mléko (Hrstková, 2003), které sdílí některé vlastnosti z kolostra a podporuje nutriční a rozvojové potřeby rostoucího dítěte (Ballard et Morrow, 2013). Toto mléko po 4 - 6 týdnů po porodu přechází na zralé. Přední zralé mateřské mléko obsahuje více vody a laktosu a zadní obsahuje více tuku (Hrstková, 2003).

3.1.3 Vlastnosti mateřského mléka

MM, s nutričními ale i funkčními prvky, je skutečný biologický systém (Verduci et al., 2014). Jednotlivé složky významným způsobem ovlivňují růst a vývoj dítěte a hrají významnou roli v regulaci postnatálního zrání a vývoje tkání a orgánových systémů. Nejvýznamnější, vědecky prokázané benefity kojení se týkají prevence vzniku alergií, infekčních či gastrointestinálních onemocnění, stejně tak jako i jeho vlivu na růst a kognitivní funkce dítěte či spojitost s pozdějším výskytem civilizačních onemocnění (Bronský et Mitrová, 2013).

3.1.3.1 Sacharidy

Laktosa je zdrojem energie, kromě jiného je důležitá pro rozvoj CNS, je součástí galaktolipidů a substrátem pro detoxifikaci v játrech a tvorbu kyselého prostředí (Coppa et al., 2006; Kopřiva, 2010). Laktosa je štěpena laktasou na monosacharidy – glukosu a galaktosu. Glukosa slouží jako primární palivo živých buněk (Geddes et al., 2017).

Funkce oligosacharidů spočívá v podpoře rozvoje střevní mikrobioty a účastní se rovněž dalších dějů (Andreas et al., 2017). Této problematice bude věnována samostatná kapitola.

3.1.3.2 Proteiny

Kvalita a kvantita příjmu bílkovin v prvních dvou letech života má vliv na růst kojence a vývoj nervové soustavy. Podle nedávných důkazů má jejich vysoký příjem během tohoto období negativní dopad na dlouhodobé zdraví (Geddes et al., 2017). Relativně nízký obsah bílkovin je

dostatečný pro optimální růst kojenců a zároveň představuje nízkou zátěž nezralých ledvin (Nevoral, 2003).

Většina bílkovin se v MM vyskytuje ve formě syrovátkových bílkovin (Geddes et al., 2017). Podílí se na imunitní a neimunitní ochraně novorozence před infekcí - imunoglobuliny, lysozym, laktoferin a α -laktalbumin (Kopřiva, 2010).

Předpokládá se, že laktoferin může vychytávat železité ionty a zabráňovat tak bakteriím v jejich růstu (Coppa et al., 2006). Má silné antimikrobiální účinky, slabou antivirovou a protinádorovou aktivitu (Geddes et al., 2017).

α -Laktalbumin váže Ca^{2+} a Zn^{2+} , podílí se na syntéze laktosy a má antimikrobiální účinky proti *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans* (Geddes et al., 2017).

Hlavním proteinem mlék přežvýkavců je kasein. Nicméně jeho zastoupení v MM je nižší, což dodává rozlišovací bledě modrý vzhled. Funkce kaseinu je vyživovací, poskytuje esenciální aminokyseliny a minerální látky. Kaseinové micely jsou hlavním zdrojem vápníku a fosforu, které jsou nezbytné pro mineralizaci kostí (Geddes et al., 2017).

MM obsahuje i volné aminokyseliny. Důležitý je vysoký obsah taurinu, neurotransmiteru v CNS, který je rovněž důležitý při vstřebávání tuků (Kopřiva, 2010).

3.1.3.3 Lipidy

Bylo prokázáno, že lipidy MM inaktivují řadu patogenů *in vitro*, včetně streptokoků skupiny B. To naznačuje, že poskytují dodatečnou ochranu před infekcemi, zejména monoglyceridy se středně dlouhým řetězcem (Andreas et al., 2017).

Poměr ω -3 a ω -6 mastných kyselin je důležitý ve vztahu k rozvoji alergických onemocnění (Frühauf, 2013). Předpokládá se, že mastné kyseliny zvyšují IQ kojených dětí ve srovnání s dětmi krmenými umělou výživou (Geddes et al., 2017). Kromě toho je esenciálním mastným kyselinám připisován vliv na zánětlivou odpověď, neurologický a senzorický vývoj, ochranu a reparaci při hypoxii, vliv na chronické choroby spojené s výživou (hypertenze, diabetes, dyslipidemie, metabolický syndrom) (Frühauf, 2013). Nedávná studie potvrdila, že díky vyššímu příjmu tuků netrpí lidé v dospělosti nadváhou. Poskytuje také přenos vitaminů rozpustných v tucích (Geddes et al., 2017).

3.1.3.4 Vitaminy

Vitamin D je důležitý při regulaci vápníku a absorpci fosforu a díky tomu je nezbytný pro zdravé kosti. Hraje roli ve vrozeném a adaptivním imunitním systému. Nízký obsah v MM může zapříčinit křivici. Proto je nutná jeho suplementace (Geddes et al., 2017).

3.1.4 Rozdíl mezi mateřským a kravským mlékem

Složení MM bylo rozsáhle zkoumáno, čímž se odhalily obrovské strukturní složitosti. Vzhledem k obsahu hlavních molekul, jsou si mateřské a kravské mléko podobné. Při důkladnějším výzkumu se ale ukázalo, že tomu tak úplně není. Rozdíly obou tekutin tkví v odlišných živacích a ochranných vlastnostech (Hennet et al., 2014).

Komponent	Obsah	
	Mateřské zralé mléko	Kravské zralé mléko
Nebílkovinné látky (g/L)	0,46	-
Bílkoviny (g/L)	9	36
Kasein (g/L)	3,5	58
α -Laktalbumin (g/L)	2,7	0,7
Sekreční Imunoglobulin A (g/L)	1	0,03
Laktoferin (g/L)	2	Stopy
Lysozym (g/L)	0,4	0,4 (mg/L)
Imunoglobulin G (g/L)	0,05	0,6
Albumin (g/L)	1	-
Laktosa (mmol/L)	185	48
Glukosa (mmol/L)	1,5	0,22
Lipidy (g/L)	40	43
Zinek (μ g/L)	2	4
Hořčík (mmol/L)	1,8	5,1
Vápník (mmol/L)	7,5	29,4
Energetická hodnota (kcal/100g)	53-79	62-72

Tabulka 1 Srovnání zastoupení jednotlivých živin mateřského a kravského mléka (Geddes et al., 2017).

Například kasein představuje 80% zastoupení proteinu v kravském mléce, je nerozpustný v kyselině a je obtížně zpracován trávicí soustavou kojence (Hennet et al., 2014). Nízké hladiny kaseinu v mateřském mléce vytváří při trávení v žaludku dítěte měkké sýřeniny, které jsou lépe stravitelné (Geddes et al., 2017). Naproti tomu je MM bohaté na proteiny, jako je ochranný imunoglobulin A a antimikrobiální proteiny, jako lysozym a laktoferin (Hennet et al., 2014).

Frakce sacharidů se také výrazně liší. Kravské mléko obsahuje asi 40 g/L laktosy a pouze stopy některých oligosacharidů. Zatímco mateřské obsahuje až 20 g/L oligosacharidů v kolostru a 50-70 g/L laktózy (Hennet et al., 2014).

V Tabulce 1 jsou porovnány obsahy jednotlivých složek živin v mateřském a kravském mléce.

3.2 Oligosacharidy

Mezi oligosacharidy se řadí takové oligomery monosacharidů, u nichž jsou na sebe vázány dvě a až deset molekul monosacharidů glykosidickou vazbou. Oligosacharidy jsou tedy glykosidy, v nichž je aglykonem molekula jiného sacharidu. Nazývají se proto také heteroglykosidy. Podle počtu monosových jednotek se oligosacharidy dělí na di-, tri-, tetra-, penta-, až dekasacharidy. V oligosacharidech se monosacharidy mohou vyskytovat ve formě pyranosy nebo furanosy. Nejčastěji se v oligosacharidech vyskytují hexosy (Velíšek et Hajšlová, 2009).

3.2.1 Počátky ve výzkumu oligosacharidů mateřského mléka

Výzkum oligosacharidů mateřského mléka (OMM) byl vědci a lékaři veden ze dvou velmi odlišných pohledů a zájmů. Pediatri a mikrobiologové se pokoušeli pochopit zdravotní přínosy související s výživou mateřským mlékem, chemici se zase snažili charakterizovat tyto unikátní sacharidy (Bode, 2012).

Již na konci 19. století, kdy byla celková úmrtnost kojenců v prvním roce života až 30%, byla zaznamenána vyšší šance na přežití a nižší výskyt infekčních průjmů u kojených dětí než u dětí nekojených. Toho času rakouský pediatr a mikrobiolog Escherich (1886) objevil vztah mezi střevními bakteriemi a fyziologií trávení u kojenců. Na to bývalý Escherichův student Moro a Tissier, postgraduální student v Paříži, objevili rozdíly ve výkalech kojených a nekojených dětí. Které komponenty v mateřském mléce určují bakteriální složení střev zůstalo neznámé po více jak půl století (Bode, 2012).

Souběžně s pozorováním pediatri a mikrobiologů se vyvinul zájem o oligosacharidy v mateřském mléce ze strany lékárníků, když bylo v roce 1888 uvedeno, že mateřské mléko obsahuje jiný typ laktosy než mléko kravské. Krátce poté bylo zjištěno, že obsah laktosy v mateřském i kravském mléce je přibližně stejný, ale mateřské obsahuje další neznámé frakce sacharidů (Montreuil, 1992).

Už od roku 1900 bylo známo, že výkaly kojených dětí byly kyselejší než děti živěných umělou výživou. Tyto vědecké poznámky široce popisovaly prohlášení od Gruleeho et al., že kojení je silně spjato s nižším výskytem průjmu, zánětu středního ucha a respiračních chorob kojenců

(Grulee et al., 1935; Kobata, 2010). Paul György, který byl profesorem pediatrie na Pennsylvánské univerzitě, se domníval, že je to díky *Lactobacillus bifidus*, která převládala ve střevní mikroflóře dětí krmených mateřským mlékem. Tyto bakterie tráví sacharidy a produkují velké množství mléčné kyseliny a octové kyseliny. Kyselé prostředí ve střevech potlačuje růst mnoha jiných, především hnilobných mikroorganismů a chrání tak děti před škodlivými střevními infekcemi (Kobata, 2010). Schönfeld (1929) prohlásil, že syrovátkové frakce mateřského mléka obsahují růstový faktor pro *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanica* a pojmenoval ho Bifidus faktor (Schönfeld, 1929).

V roce 1933 našli Polonovsky a Lespagnol nový oligosacharid mateřského mléka obsahující dusík a označili jej jako gynolaktosu. Tento oligosacharid byl slabě rozpustný v methanolu a skládal se z různých komponentů. O více než dvě desetiletí později Polonovski a Montreuil zjistili, že je ve skutečnosti gynolaktosa směsí více než deseti oligosacharidů a dusík je zahrnut jen v její malé části. Nezávisle na jejich výzkumu skupina pod vedením Kühna z Max Planckova institutu v Heidelbergu ve spolupráci s Györgyem dosáhla ke stejnému závěru, když odstartovala sérii systematických šetření, které má objasnit chemickou entitu Bifidus faktor (Bode, 2012; Kobata, 2010).

V roce 1954 Polonowski a Montreuil představili dvourozměrnou papírovou chromatografii k oddělení „gynolaktosy“ od jednotlivých oligosacharidů. Přesné struktury těchto oligosacharidů však byly neznámé (Bode, 2012; Kobata, 2010).

Až od roku 1965 bylo stanoveno čtrnáct struktur oligosacharidů (Obrázek 4) (Kobata, 2010). Všechny tyto oligosacharidy obsahovaly na svém redukujícím konci laktosu. Některé z nich vykazovaly činnost determinantů krevních skupin. Tyto struktury přispěly k charakteristice krevního systému na základě antigenu H a Lewisových antigenů. Na oplátku zájem o glykany krevních skupin vedl k vývoji nových metod a nástrojů, které podporují objev a charakterizaci nových oligosacharidů mateřského mléka Victorem Ginsburgem a Akirou Kobatem, nejvlivnějších výzkumníků této problematiky. Heinz Egge, jeden z bývalých Kühnových studentů v Německu, byl jedním z prvních, co použil k charakterizaci dalších OMM hmotnostní spektrometrii ostřelováním rychlými atomy. Jeho bývalý student Clemens Kunz, nutriční vědec, pokračuje ve výzkumu nutričních a biologických vlastností OMM dodnes (Bode, 2012).

Names of oligosaccharides	Structures
2' -Fucosyllactose (2' -FL)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 2 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
3-Fucosyllactose (3-FL)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 3 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
Lactodifucotetraose (LD)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \quad \\ 2 \quad 3 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \quad \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
Lacto- <i>N</i> -tetraose (LNT)	$\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$
Lacto- <i>N</i> -neotetraose (LNnT)	$\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I (LNF-I)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 2 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II (LNF-II)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 4 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I (LND-I)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \quad \\ 2 \quad 4 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \quad \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose II (LND-II)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \quad \\ 4 \quad 3 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \quad \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
3' -Sialyllactose (3' -SL)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 3 \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
6' -Sialyllactose (6' -SL)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 6 \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
LST-a	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 3 \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
LST-b	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 6 \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
LST-c	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \\ \\ 6 \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$

Obrázek 4 Prvních čtrnáct struktur OMM objeveno od roku 1965 (Kobata, 2010).

3.2.2 Oligosacharidy mateřského mléka

MM je unikátní zásobárnou oligosacharidů (Erney et al, 2001). Po laktose a lipidech představují hned třetí nejhojnější složku MM a jejich koncentrace je vyšší, než koncentrace proteinů (Marx et al., 2014; McGuire et al., 2017). Každá žena má unikátní složení OMM. Obsah oligosacharidů se v průběhu laktace mění, nejvyšší koncentraci obsahuje kolostrum 20 - 25 g/L, poté obsah klesá a pohybuje se v rozmezí 5 – 20 g/L (Musilová et Rada, 2015).

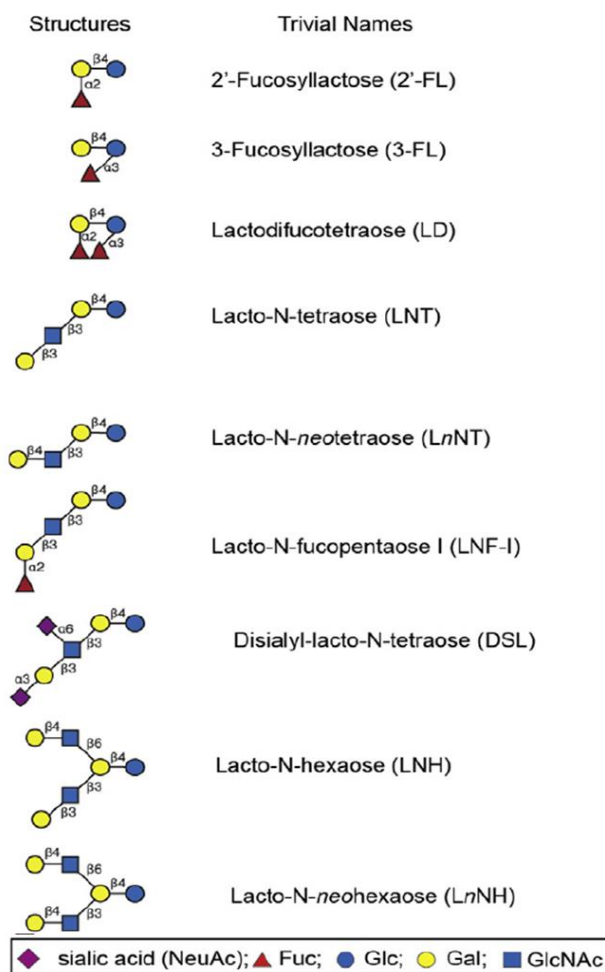
Množství OMM je též ovlivněno tělesnou hmotností a je prokázáno, že ženy s BMI (body mass index) v rozmezí 14 až 18 mají nižší koncentraci OMM než ženy s BMI v rozmezí 24 až 28 (Bode, 2012).

3.2.3 Složení oligosacharidů mateřského mléka

Složení OMM je velmi rozmanité. Molekuly jsou syntetizovány v mléčné žláze matky. Všechny obsahují na redukujícím konci laktosu a jsou dále složeny z pěti základních monomerů: N-acetylglukosaminu, L-fukosy (FUC), kyseliny sialové (SIA), D-glukosy a D-galaktosy (Boehm et Stahl, 2007; Musilová et Rada, 2015).

Biologické funkce OMM úzce souvisí s jejich konformací (Kunz et al., 2000). Bylo zjištěno, že je možné je rozdělit podle složení do dvou skupin na neutrální a kyselé. Neutrální OMM neobsahují kyselinu sialovou a tyto frakce oligosacharidů jsou považovány za významné pro rozvoj střevní mikrobioty kojených dětí. Složení neutrálních OMM je podobné jako složení galaktooligosacharidů (GOS), ale na rozdíl od GOS obsahují navíc N-acetyl-glukosamin a fukosu. Kyselé OMM obsahují navíc kyselinu sialovou (N-acetyl-neuraminovou) připojenou na galaktosu nebo na zbytek N-acetyl-glukosaminu (Musilová et Rada, 2015). Hrají významnou roli v prevenci proti adhezivnímu účinku patogenních bakterií na střevním epitelu a jsou zapojeny do reakcí imunitního systému (Boehm et Stahl, 2007).

Složení OMM není závislé na výživě matky, ale na sekreторickém a Lewisově krevním systému matky, které ovlivňují expresi fukosyltransferázy (Hennet et al., 2014; Musilová et Rada, 2015). „Na základě těchto systémů je možné rozdělit mateřské mléko do čtyř skupin: Se + Le, Se-Le +, Se + Le +, Se-Le-. Nejsložitější struktury OMM obsahují mléka matek, která mají Se+Le+ a díky tomu jejich mléko obsahuje fukosylované OMM, které je mohou chránit před zánětem mléčné žlázy vyvázáním patogenů“ (Musilová et Rada, 2015).



Obrázek 5 Struktury některých nejvíce se vyskytujících OMM (Mcguire et al., 2017).

3.2.4 Metabolismus oligosacharidů mateřského mléka

Oligosacharidy mají schopnost odolávat nízkému pH v žaludku kojence, stejně tak jako hydrolytickým enzymům pankreatu a kartáčového lemu. Data získaná v letech 1980 a 1990 ukazují, že některé OMM jsou s výkaly novorozence vylučovány v neporušené podobě (Bode, 2012; Musilová et Rada, 2015). Děje se tak v důsledku nedostatku enzymu ve střevě schopného hydrolyzovat galaktózu vázanou β -glykosidickou vazbou (Boehm et Stahl, 2007; Hennet et al., 2014).

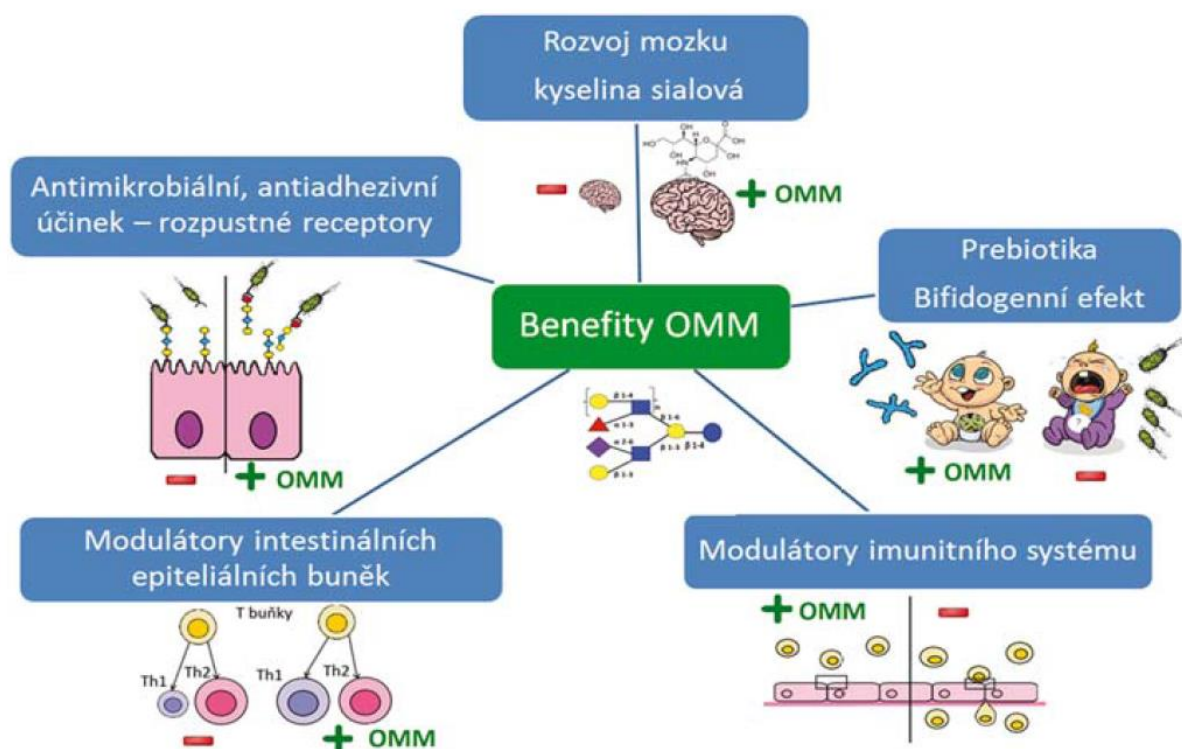
Novější studie však potvrzují, že existuje víceúrovňové zpracování a degradace OMM, které závisí na věku kojence, jeho krevní skupině a jak často je dítě krmeno. V první fázi mezi narozením a dvou měsících života jsou ve výkalech kojenců obsaženy sialylované a nesialylované oligosacharidy. Jsou podobné, ale nejsou totožné jako OMM ze standardního vzorku mléka. V následné druhé fázi jsou ve stolici obsaženy zejména degradované OMM, které se od OMM ze standardního vzorku mléka velmi liší. V poslední etapě už OMM ze stolice

kojenice zcela zmizí. Je to dáno tím, že je dítě krmeno i jinou stravou než jen mlékem (Bode, 2012).

Rudloff et al. (1996) jako první vyzkoumali, že se OMM objevují v neporušené formě v moči kojených dětí. U dětí krmených umělou výživou však tomu tak není. Tyto výsledky naznačují, že část OMM je absorbována v tenkém střevě novorozence a dostává se tak do jeho oběhového systému (Bode, 2012). To znamená, že biologické funkce OMM nemusí být lokalizovány jen ve střevech, ale díky tomu mají pravděpodobně vliv i na jiné orgány včetně jater a mozku nebo dýchacího a močového ústrojí (Bode, 2015).

3.2.5 Vlastnosti oligosacharidů mateřského mléka

Po dlouhou dobu nebyla oligosacharidům v mateřském mléce věnována žádná pozornost (Nevoral, 2012). Původně byly OMM objeveny jako probiotika, tzv. „bifidus faktor“, které slouží jako metabolický substrát pro žádoucí bakterie a vytváří stabilní střevní mikrobiotu pro novorozence. V současné době už víme, že jsou více než jen potrava pro bakterie (Bode, 2012). Biologická aktivita OMM je závislá na jejich strukturální charakteristice, proto je nezbytná znalost podrobného složení oligosacharidů (Albrecht et al., 2014).



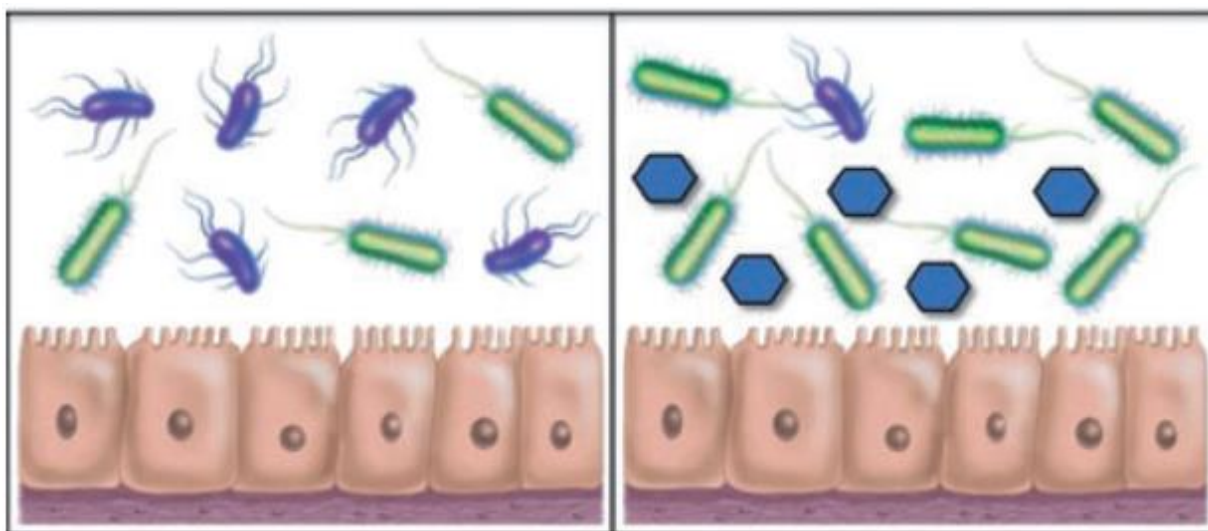
Obrázek 6 Vlastnosti oligosacharidů mateřského mléka (Musilová & Rada, 2015).

3.2.5.1 Prebiotický efekt

Jeden z nejvíce uznávaných benefitů OMM je ovlivnění střevní mikrobioty (Mcguire et al., 2017).

Prebiotika jsou nestravitelné látky obsažené v potravinách, které selektivně podporují růst a/nebo aktivitu jednoho nebo více druhů střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevního mikrobiomu (Nevoral, 2012).

V praxi slouží prebiotika jako substrát pro specifické, především probiotické bakterie (Obrázek 7), zejména rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Bacteriodes*. Kojené děti tak mají v prvním roce života zpravidla převahu těchto bakterií ve střevě (Bode, 2015; Musilová et Rada, 2015). Díky prebiotické funkci mohou OMM pozměňovat střevní mikrobiotu nebo imunitu hostitele, což může mít příznivý vliv na metabolismus a střevní motilitu (Kopřiva, 2010).



Obrázek 7 Prebiotický efekt OMM. Toto velmi zjednodušené schéma popisuje různé schopnosti žádoucích (zelených) a nežádoucích (fialových) bakterií metabolizovat OMM. Za přítomnosti OMM (vpravo) se žádoucím bakteriím daří, protože je umí využívat jako zdroj energie, oproti nežádoucím, které je využívat neumí (Bode, 2009).

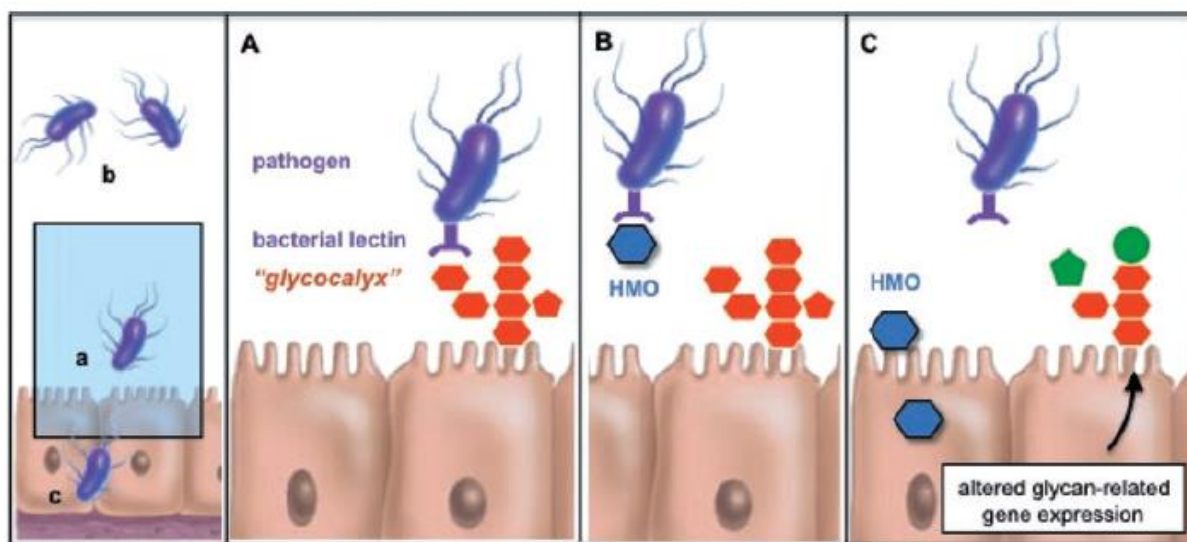
Bifidobakterie jsou nejúčinnější mikroby, které dokáží nejvíce využívat OMM, účinnost využití však závisí na určitém druhu v závislosti na konkrétním bakteriálním genomu (Mcguire et al., 2017). Schopnost bakterií využívat OMM vyžaduje celou řadu enzymů, přenašečů a dalších molekul. Některé bakterie jsou schopny díky fukosidase využít FUC, ale ne SIA. Jiné bakterie mohou využívat OMM pouze tehdy, pokud jsou odstraněny ostatními bakteriemi monomery FUC nebo SIA (Bode, 2015).

Vzhledem k tomu, že se obsah a složení OMM mezi ženami liší, lze předpokládat, že mateřské mléko různých žen ovlivňuje střevní mikrobiotu dítěte odlišně (Bode, 2015)

Nicméně asi 90 % všech OMM není metabolizováno a nachází se beze změny ve stolici kojence. To naznačuje, že mají i jiné účinky (Bode, 2009).

3.2.5.2 Antimikrobiální efekt

Existují důkazy, že volné oligosacharidy, stejně jako glykoproteiny, jsou účinnými inhibitory ulpívání bakterií na povrchu epitelu, což je počátečním stádiem infekce (Kunz et al., 2000). Ačkoliv přesný patofyziologický mechanismus vzniku průjmu není ještě zcela znám (Kunz et al., 2000), virulence některých patogenních mikroorganismů jako jsou např. *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* nebo *Salmonella* spp. závisí na schopnosti přichycení na receptory slizničního povrchu hostitele. Chemická struktura oligosacharidů je podobná struktuře buněčných povrchových glykanů, jako jsou glykolipidy a mucin, které slouží právě jako receptory pro vazbu virů a bakterií. OMM mají funkci tzv. rozpustných receptorů, které zabraňují uchycení patogenů na epiteliální buňky, a tím chrání hostitele proti kolonizaci patogenními mikroorganismy a v rozvoji onemocnění. Kyselé OMM slouží tedy jako vazebná místa pro enteropatogeny a brání tak k jejich přichycení na receptory slizničního povrchu (Obrázek 8) (Bode, 2009; Musilová et Rada, 2015).



Obrázek 8 Antiadhezivní efekt (Bode, 2009).

„V prvních dnech a týdnech kojení je tato ochrana před infekcí velmi důležitá, protože nedostatečně kyselé pH žaludku není zatím dostatečnou přirozenou ochranou a imunitní systém dítěte teprve vzniká“ (Musilová et Rada, 2015).

Asi 70 % případů zánětu středního ucha u novorozenců je způsobeno díky pneumokokům a bakterii *Haemophilus influenzae*. Andersson et al. (1986) byli schopni dokázat, že přilnavost těchto mikroorganismů na specifickou sacharidovou strukturu epitelových buněk hltnu nebo dutiny ústní byla inhibována díky OMM. Podobným způsobem by mohly neutrální OMM chránit střevní trakt novorozence před infekcí *Vibrio cholerae* (Kunz et al., 2000).

Studie prokazují schopnost OMM při léčbě amébozy, infekčního průjemového onemocnění způsobeném prvokem *Entamoeba histolytica*. Tento parazit se přichytí na střevní epitel a následně fagocytuje. OMM jsou schopny oddělit až 80 % *E. histolytica* od střevního epitelu a obnovit jeho poškozené buňky (Mcguire et al., 2017).

„Nově byly také popsány extraintestinální antimikrobiální účinky OMM. V moči kojených dětí byly nalezeny frakce OMM, jejichž přítomnost by mohla vysvětlit nižší výskyt zánětů močových cest, způsobený uropatogenní *Escherichia coli* nebo *Streptococcus agalacticae*, v porovnání s dětmi krmenými umělou výživou. Toto tvrzení částečně dokládá i studie provedená na myších, při které byly epiteliální buňky močového měchýře přítomností OMM rezistentnější vůči působení těchto patogenů“ (Musilová et Rada, 2015).

Existují studie, kdy byly zaznamenány antiadhezivní vlastnosti OMM vůči houbovým patogenům. Je známo, že fukosylované OMM inhibují vazbu patogenů *Candida* na střevní epitel a bylo zjištěno, že snižují invazi *Candida albicans* v závislosti na jejich dávce. V této studii inhibovaly OMM růst hyf a morfologický vývoj kvasinkové buňky. K dispozici je však omezené množství provedených výzkumů, které tyto antiadhezivní účinky charakterizují (Mcguire et al., 2017).

3.2.5.3 Rozvoj imunitního systému

Oligosacharidy hrají důležitou roli při imunitní odpovědi jedince. Imunitní systém novorozence je funkčně nevyzrálý a je kvalitativně a kvantitativně odlišný od dospělého. Tento stav byl popsán jako „fyziologická imunodeficiencí“, což se odráží na zvýšeném riziku pro běžné infekce, jako je zánět středního ucha, infekce horních dýchacích cest, gastroenteritida, sepse nebo meningitida (Morrow et Yu, 2017).

Některé výzkumy poukazují na obousměrnou komunikaci mezi střevní mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. Střevní mikrobiota stimuluje zrání a specifičnost imunitního systému jedince, naopak imunitní systém zajistí toleranci komenzálních střevních mikrobů (Mcguire et al., 2017). „Dále byl prokázán vliv OMM na funkci integrinů, selektinu a Toll-like receptorů, produkci cytokinů a aktivaci pupečnickové krve odvozené od T-buněk. U kyselých

OMM bylo zjištěno, že mohou ovlivnit zrání lymfocytů a modulovat specifické imunitní odpovědi postnatálního alergenu potlačením Th2 typu reakcí u atopických dětí“ (Musilová et Rada, 2015).

Podle nedávných údajů snižují OMM přenos viru HIV-1 z matky na dítě. Program OSN pro HIV/AIDS odhaduje, že je nakaženo 2,3 milionu dětí virem HIV-1 po celém světě. Z toho 40 % dětí je nakaženo právě tímto přenosem. Kojené děti matek nakažených HIV-1 neustále přichází do styku s tímto virem po dobu několika měsíců. Drtivá většina těchto dětí se však nenakazí a v současnosti není známo proč. Některé výsledky však naznačují, že by OMM mohly být součástí ochranného mechanismu (Bode, 2009).

Díky OMM může být dokonce snížena citlivost kojence na respirační syncytiální virus (Mcguire et al., 2017).

3.2.5.4 Rozvoj mozku

Oligosacharidy společně s laktózou hrají důležitou roli v postnatálním vývoji mozku (Kunz et al., 2000). Sialylované OMM mohou být využity jako zdroj kyseliny sialové pro syntézu gangliosidů a glykoproteinů. Ty jsou důležité pro vývoj mozku a rozvoje dítěte (Chen, 2015). „Množství této kyseliny je v mateřském mléce zčásti řízeno geneticky, a zčásti je ovlivněno výživou. Dieta obohacená kyselinou sialovou může tedy významně přispět k větší sialylaci mozkových gangliosidů, glykoproteinů, tělních tekutin a tkání, a může poskytovat výhody kojeným dětem ve srovnání s dětmi krmenými umělou výživou. Nejvyšší množství této kyseliny obsahuje kolostrum (3,72 mmol/L). Toto množství během laktace klesá až na 1,48 mmol/L“ (Musilová et Rada, 2015).

Výzkumy ukazují, že struktury oligosacharidů v mléce slonů jsou daleko složitější než u OMM. Je zajímavé, že tyto dva druhy vykazují podobnost v postnatální ontogenezi – rostou pomalu, mají poměrně velký a vysoce vyvinutý centrální nervový systém, jsou vysoce inteligentní a vykazují vysoký stupeň naučeného chování. Stupeň encefalizace mozku je u lidí a slonů podstatně vyšší než u primátů a to díky rozdílným koncentracím oligosacharidů (Kunz et al., 2000). Domníváme se, že OMM hrají i tímto důležitou roli při rozvoji mozku kojených dětí, buněčných interakcích, nervovém růstu, synaptických spojení a tvorbě paměti (Kunz et al., 2000; Musilová et Rada, 2015).

3.2.6 Oligosacharidy v ostatních mlécích

Mléka/kolostra ostatních savců rovněž obsahují oligosacharidy jako mléko mateřské (Urashima et al., 2017). Tyto oligosacharidy byly studovány mnoho let, víme o nich však daleko méně, neboť jejich koncentrace je velice nízká (Albrecht et al., 2014; Bode, 2012). Jejich chemické struktury se liší mezi jednotlivými druhy savců (Urashima et al., 2017). Žádné jiné mléko však neobsahuje takovou strukturální rozmanitost OMM jako mateřské, které je bohatým zdrojem oligosacharidů a dosud bylo identifikováno více než 200 struktur (Albrecht et al., 2014; Bode, 2012).

Dvě různé skupiny vědců analyzovaly oligosacharidy v mléce opic a lidoopů ze Starého a Nového světa. Obecně platí, že oligosacharidy v mléce lidoopů, včetně lidí, jsou složitější a více rozmanité ve srovnání s ostatními savci. Mléka většiny hospodářských zvířat vykazují 100 – 1000 krát nižší koncentraci a nižší rozmanitost oligosacharidů než je v mléce mateřském (Bode, 2012). Většina savců ze skupiny placentálů má v mléce vyšší obsah laktózy než mléčných oligosacharidů. Nicméně v mléce medvěda hnědého, medvěda ledního, medvěda černého a pandy velké je tomu naopak (Mcguire et al., 2017).

Některé mléčné oligosacharidy ptakopyska velkého z řádu ptakořitných nebo živočichů rozmanité skupiny placentálů včetně lidí, ostatních primátů, medvědů a některých dalších masožravců, přežvýkavců, koní, prasat a slonů obsahují základní jednotky lakto-N-neotetraosu a lakto-N-neohexaosu. Tyto výsledky naznačují, že výše uvedené jednotky oligosacharidů, společně s laktosou jsou nejuniverzálnější struktury OMM (Urashima et al., 2017)

3.2.7 Alternativy oligosacharidů mateřského mléka

Existuje několik nutričních strategií, které racionálně napodobují vlivy OMM na střevní mikrobiotu kojenců (Mcguire et al., 2017). Oligosacharidy mateřského mléka však ve srovnání s komerčně využívanými prebiotiky jako jsou polydextrosa, inulin, fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS), působí mnohem specifičtěji a jsou schopny selektivně stimulovat bifidogenní populaci v novorozeneckém střevě (Musilová et Rada, 2015).

V umělé výživě kojenců je dnes nejčastěji používána směs oligosacharidů rostlinného původu FOS (fruktooligosacharidů) a syntetických GOS (galaktooligosacharidů) v poměru 1:9, která není plně selektivní a může podporovat růst i některých potenciálně škodlivých bakterií (Bunešová et al., 2012). Nicméně tyto oligosacharidy postrádají složitost, strukturální organizaci a rozmanitost, kterou mají oligosacharidy mateřského mléka. Tyto alternativy však

přestavují rozšiřující oblast vědeckého zájmu a jsou komerčně distribuovány, protože je jejich výroba v současné době výhodnější než syntéza OMM (Mcguire et al., 2017).

„Regulace syntézy OMM není dostatečně objasněna a je třeba vyvinout nové metody detekce OMM a strukturální analýzy, které by mohly pomoci pochopit jejich syntézy a možnosti vyvinutí podobných prebiotik se stejně pozitivními účinky. V současné době nejsou bohužel na trhu prebiotika, která by byla schopna nahradit všechny funkce OMM“ (Musilová et Rada, 2015).

3.2.7.1 Využití kravských oligosacharidů

Jako směs oligosacharidů živočišného původu se do umělé kojenecké výživy mohou přidávat oligosacharidy ze zralého kravského mléka. Toto využití však vyžaduje znalost rozdílů těchto struktur a struktur mateřských oligosacharidů (Mcguire et al., 2017). Nicméně obsah oligosacharidů v kravském kolostru ihned po porodu je pouze 1 g/L a tato koncentrace po 48 hodinách prudce klesá (Nakamura et al., 2003). V mateřském mléce převažují neutrální oligosacharidy nad kyselými a poměr neutrálních ku celkovým OMM je poměrně vysoký, zatímco v kravském mléce/kolostru převažují kyselé nad neutrálními oligosacharidy a koncentrace neutrálních oligosacharidů je velice nízká (Mcguire et al., 2017). Tabulka 2 popisuje porovnání mezi obsahem oligosacharidů mateřského a kravského mléka.

Komponent	Obsah (g/L)	
	Mateřské mléko	Kravské mléko
Laktosa	55-70	40-50
Oligosacharidy		
Lakto-N-tetraosa	0,5–1,5	Stopové množství
Lakto-N-fukopentaosa I	1,2-1,7	—
Lakto-N-fukopentaosa II	0,3-1,0	—
Lakto-N-fukopentaosa III	0,01-0,2	—
Lakto-N-difukohexaosa I	0,1-0,2	—
NeuAc(α 2-6)laktosa	0,3-0,5	0,03–0,06
NeuAc(α 2-3)laktosa	0,1-0,3	
NeuAc-lakto-N-tetraosa a	0,03-0,2	Stopové množství
NeuAc-lakto-N-tetraosa c	0,1-0,6	Stopové množství
NeuAc2-lakto-N-tetraosa	0,2-0,6	Stopové množství
Oligosacharidy (celkem)	5,0-8,0	Stopové množství

Tabulka 2 Obsah oligosacharidů mateřského a kravského mléka (Kunz et al., 2000).

Byl proveden výzkum, kdy byli krmeni 14 dní staří kojenci směsí ze syrovátkového permeátu, který dále obsahoval galakto-oligosacharidy a některé kravské oligosacharidy. Děti krmené touto směsí měly daleko menší váhový přírůstek oproti kojeným dětem. Jejich stolice byla častější a řidší avšak obsahovala méně klostridií (Mcguire et al., 2017).

Jak již bylo uvedeno, koncentrace mléčných oligosacharidů je u skotu mnohem nižší než v mateřském mléce. Využití kravských oligosacharidů jako potravinové přísady v průmyslu je tedy omezeno. V opačném případě je možné, že bude využíváno oligosacharidů z kolostra kravského mléka, které jich obsahuje mnohem více (Mcguire et al., 2017).

3.2.8 Izolace oligosacharidů

Oligosacharidy mateřského mléka je zvláště obtížné analyzovat, a to kvůli komplexní struktuře složené z několika stavebních jednotek monosacharidů a existenci několika izomerů. Vzhledem tomu je jejich oddělení a detailní strukturní charakterizace obtížná (Oursel et al., 2017; Ruhak et Lebrilla, 2012). Proto je nezbytné použití komplexních strategií pro jejich detailní analýzu (Ruhak et Lebrilla, 2012).

Bylo vyvinuto mnoho technik s cílem pochopit specifické oligosacharidové struktury a jejich funkce (Oursel et al., 2017). Tradičně je k separaci oligosacharidů používána metoda iontovýměnné chromatografie, dále pak separace s reverzní fází HPLC nebo hydrofilní integrační chromatografie. Byly také použity techniky na bázi elektromigrační separace, ale pro svou nákladnost nejsou pro analýzu oligosacharidů využívány (Ruhak et Lebrilla, 2012).

Spojením těchto separačních metod a metody hmotnostní spektrometrie se ukázalo jako účinné pro získání strukturní charakterizaci a identifikaci OMM (Oursel et al., 2017).

3.3 Bifidobakterie

Rod *Bifidobacterium* patří do kmene Aktinobakterií, jednoho v největších kmenů v doméně bakterií. Zástupci tohoto kmene jsou až na pár výjimek gram-pozitivní. Bifidobakterie jsou anaerobní, nepohyblivé a netvoří spory. Jsou důležitými členy komenzální bakteriální populace v gastrointestinálním traktu, pochvě a dutině ústní. Vzhledem k jejich citlivosti na kyslík a anaerobnímu metabolismu se vyskytují převážně v tlustém střevě (Quigley, 2017).

K dnešnímu datu bylo identifikováno 31 druhů bifidobakterií, z nich 9 (*B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum*) bylo získáno z ústní dutiny nebo výkalů člověka (Quigley, 2017). Druhy rodu *Bifidobacterium* jsou jedny z hlavních probiotik v lidské výživě. Probiotika jsou

definována jako živé mikroorganismy, které mají při podání v přiměřeném množství pozitivně ovlivňují zdraví hostitele (Sanz, 2016).

Vysoký obsah nestravitelných oligosacharidů, přítomný v mateřském mléce, podporuje fermentaci v tlustém střevě, zejména bifidobakteriemi (Sanz, 2016). Homeostatické a prospěšné účinky bifidobakterií zahrnují ochranu proti patogenům, zesílení střevní bariéry, syntézu vitaminů rozpustných ve vodě, potlačení produkce potenciálně toxických a karcinogenních metabolitů a podílení na vytváření protizánětlivého prostředí (Quigley, 2017).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Izolace oligosacharidů z mléka

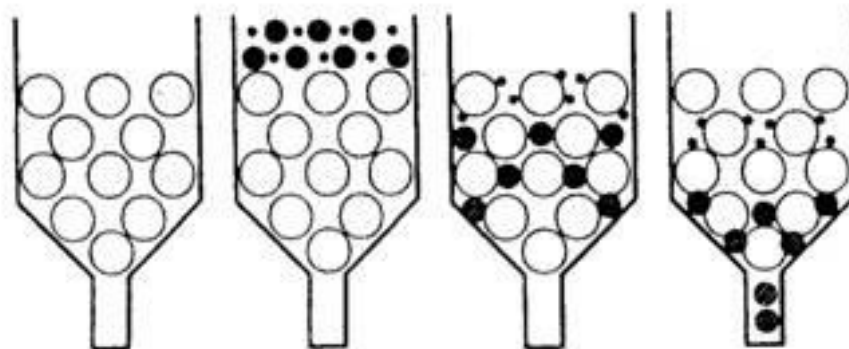
4.1.1 Příprava vzorků

Oligosacharidy byly izolovány metodou podle Warda et al. (2006), která byla upravena dle Ročkové et al. (2011). 100 mL získaného vzorku mléka bylo centrifugováno 1800 g při 4 °C po dobu 30 minut a poté byl ihned odstraněn tuk z horní vrstvy. Následně byl přidán čistý etanol v poměru 2:1 (v/v) a roztok byl ponechán 24 hodin při teplotě 4 °C. Tímto došlo k vysrážení bílkovin. Sraženina byla odstraněna následnou centrifugací při 1800 g po dobu 30 minut a při 4 °C. Tekutý podíl byl zahuštěn ve vakuové odparce do medové konzistence. Tento zbytek byl rozpuštěn v destilované vodě a proces vysrážení bílkovin byl zopakován. Dalším krokem byla precipitace za použití směsi 96 % etanolu, dichlormethanu a destilované vody v poměru 7 : 14 : 10 (v/v). Po následné centrifugaci 1800 g při 4 °C po dobu 30 minut, odstranění horní vrstvy zbylého proteinu a dichlormethanu byl surový oligosacharidový extrakt odpařen ve vakuové odparce do sucha. Vzorek byl rozpuštěn ve vodě a následně byl aplikován na kolonu gelové permeační chromatografii (Rockova et al., 2011; Ward et al., 2006)

4.1.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je metoda využívána k oddělení biomolekul na základě různých molekulárních velikostí (O'Shaughnessy et Doyle, 2011). Ve chromatografické koloně se nachází gelové médium, které se skládá z porézních částic, které mají přesně danou velikost a řídí prostup biomolekul (Stanton, 2004). Po aplikaci vzorku pronikají malé molekuly do pórů a jejich průchod přes kolonu je zpomalen, zatímco velké molekuly, které jsou větší než póry matrice, jsou vyloučeny dříve (Obrázek 9) (O'Shaughnessy et Doyle, 2011; Stanton, 2004).

Pro separaci byla použita kolona o rozměrech 1,6 x 180 cm naplněná stacionární fází Toyopearl HW40F (Tosoh Bioscience, GmbH). Jako mobilní fáze byla použita 1% (v/v) kyselina octová (Rockova et al., 2011). Frakce byly shromažďovány po 50 kapkách sběračem frakcí Gilson FC 204 Fraction Collector (Gilson, Inc.).



Obrázek 9 Princip separace pomocí gelové filtrační chromatografie. Zdroj: http://course1.winona.edu/kbates/Bio241/images/clip_image002.jpg.

4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie

Identita jednotlivých frakcí byla ověřena za pomoci tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byl použit silikagel hliníkových destičkách (Alugram SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel). Mobilní fází byla směs isopropanolu, amoniaku a vody v poměru 5 : 1 : 2 (v/v). Vizualizace byla vyvolána 15% (v/v) směsí koncentrované H₂SO₄ v 96% etanolu a následným zahřátím horkovzdušnou pistolí (Rockova et al., 2011).

4.1.4 Bradfordův test

Tento test je rychlá a přesná metoda pro stanovení koncentrace proteinů popsána původně podle Bradforda (1976). Principem této kolorimetrické metody je navázání barviva brilantní modři G-250 do proteinu (Kruger, 2002). Intenzita modrého zbarvení udává obsah proteinů ve vzorku. Množství navázaného barviva je následně kvantifikováno měřením absorbance roztoku při 595 nm (Kruger, 2002), námi za pomoci spektrofotometru Tecan (Tecan group Ltd.).

Frakce, které podle metody TLC obsahovaly oligosacharidy, byly následně testovány na přítomnost proteinů podle Bradforda. Ty, které neobsahovaly proteiny byly následně smíchány a zlyofilizovány.

4.2 Analýza oligosacharidů

Vybrané zlyofilizované vzorky oligosacharidů byly dále analyzovány na MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight) hmotnostní spektrometrii. Tato ionizační technika využívá energii laseru k ionizaci vzorku smíchaného s odpovídající maticí. Při ionizaci jsou molekuly urychleny a zachyceny na hmotnostním spektrometru a díky detektoru doby letu (TOF) umožní změřit dobu průletu, což umožňuje vypočítat rychlost částice (Hillenkamp et al., 1991).

4.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech

Na vybraných vzorcích oligosacharidů byly testovány vybrané kmeny bifidobakterií. Vybrané kmeny jsou shrnuty v následující Tabulce 3.

Kmen	Původ	Zkratka	0h (log KTJ/mL)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Zvířecí	BB 12	5,93
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Výkal krysy	CCM 4988	6,11
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Stolice kojence	CCM 4990	4,97
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Stolice dospělé	ATCC 15707	4,54
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Stolice dospělé	DSM 20082	5,48
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Stolice kojence	JKM	4,74
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Stolice kojence	JOV	5,58
<i>Bifidobacterium breve</i>	Stolice kojence	MJ	6,63
<i>Bifidobacterium breve</i>	Stolice kojence	AB	6,06
<i>Bifidobacterium breve</i>	Stolice kojence	KLÁRA	6,02

Tabulka 3 Použité kmeny bakterií ke kultivaci ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Složení komplexního média bylo použito podle Ročkové et al. (2011), je uvedeno v Tabulce 3 a sloužilo jako jediný zdroj uhlíku. Do tohoto média byly přidány oligosacharidy v 1 % (w/v) množství. Médium bylo společně s testovanými kmeny bakterií inokulováno do mikrotitrační destičky a tyto bakterie byly následně inkubovány v anaerostatu po dobu 24 hod při teplotě 37 °C v anaerobní atmosféře s 5% koncentrací CO₂. Po inkubaci byly spočteny počty kolonií po 0 a 24 hod. Poté bylo změřeno pH a provedeno vyhodnocení pomocí statistického programu

Statgraphics Centurion Plus v. 5.1. za použití jednorozměrné analýzy rozptylu s pomocí Duncanova testu.

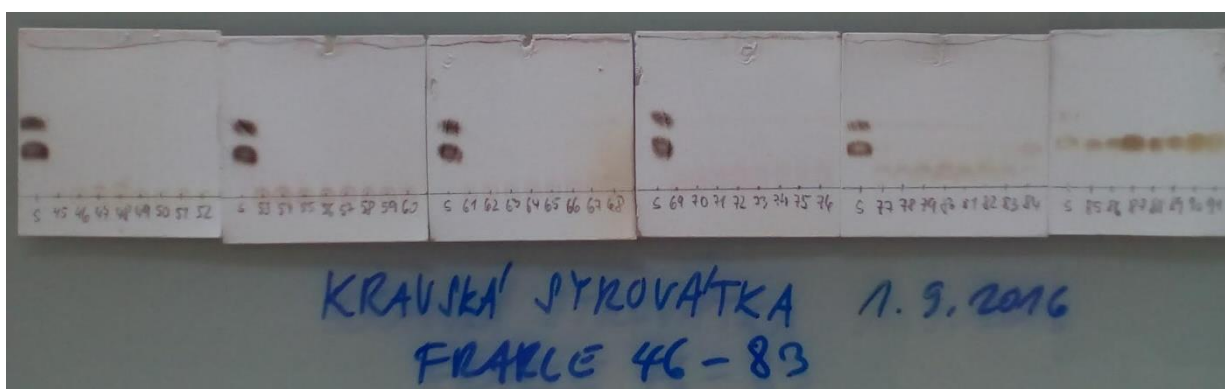
Složka	Množství (g/L)
Trypton	10
Kvasničný extrakt	5
Pyruvát sodný	1
Tween 80	1
Cystein	0,5

Tabulka 4 Složení komplexního média (Ročková et al., 2011).

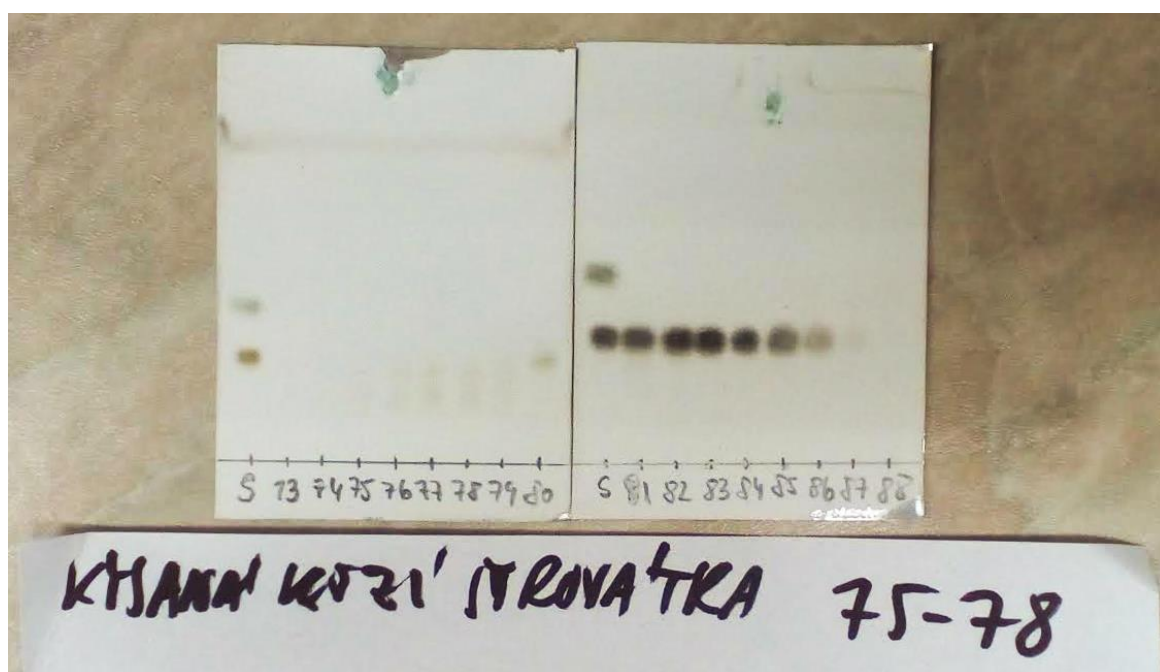
5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace oligosacharidů z mléka

Oligosacharidy byly vyizolovány podle uvedené metodiky z celkem patnácti vzorků mateřského mléka, kravské syrovátky, kozí syrovátky a nosorožčího mleziva. První separace zbavila oligosacharidy části proteinů a především laktosy. Opětovná separace na GPC zajistila lepší rozdělení OMM podle velikosti molekul. Ty byly dále testovány na tenkovrstvé chromatografii. Pomocí této metody byl potvrzený výskyt jednotlivých frakcí (ač ne u všech stejný). U těchto frakcí byl proveden Bradfordův test na možnou přítomnost proteinů. Frakce, které obsahovaly méně než 1 µg/ml proteinu (tj. detekční limit Bradfordova testu), byly následně smíseny a zlyofilizovány.



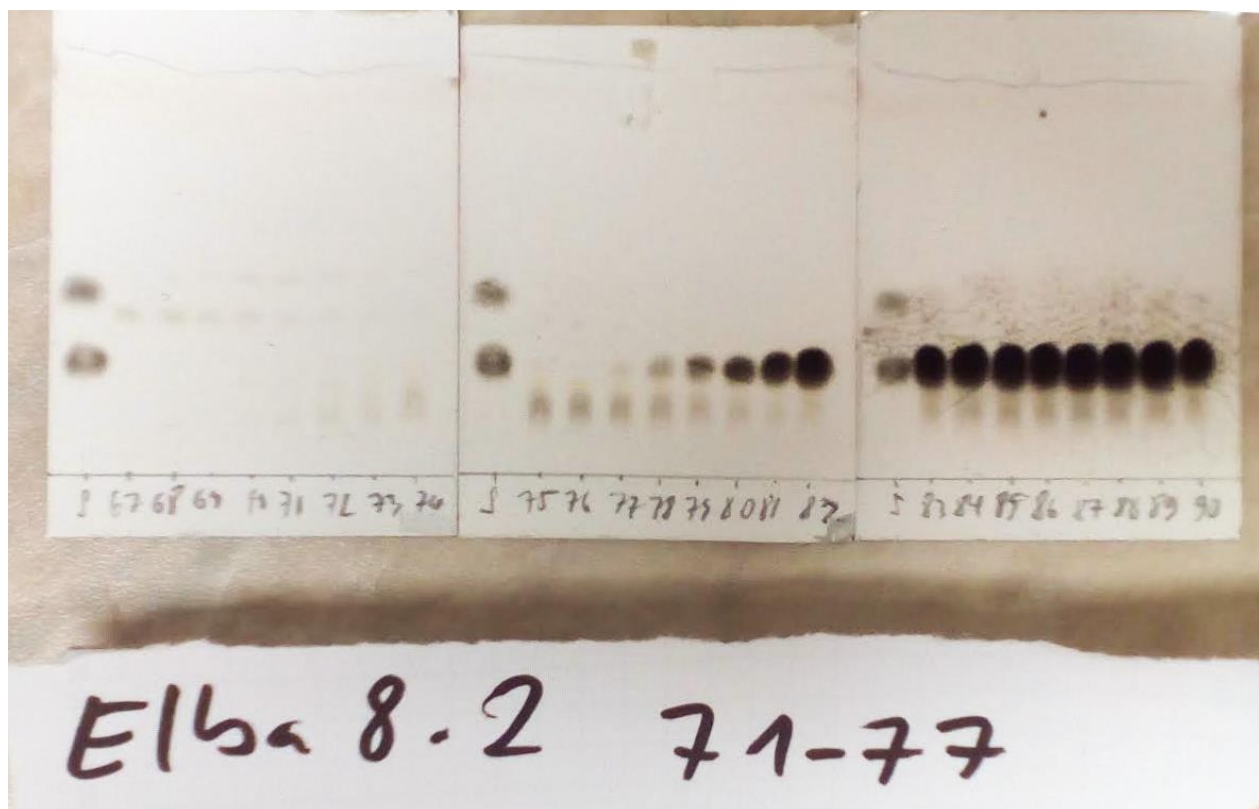
Obrázek 10 Frakce oligosacharidů kravské syrovátky testované na TLC.



Obrázek 11 Frakce oligosacharidů kozí syrovátky testované na TLC.



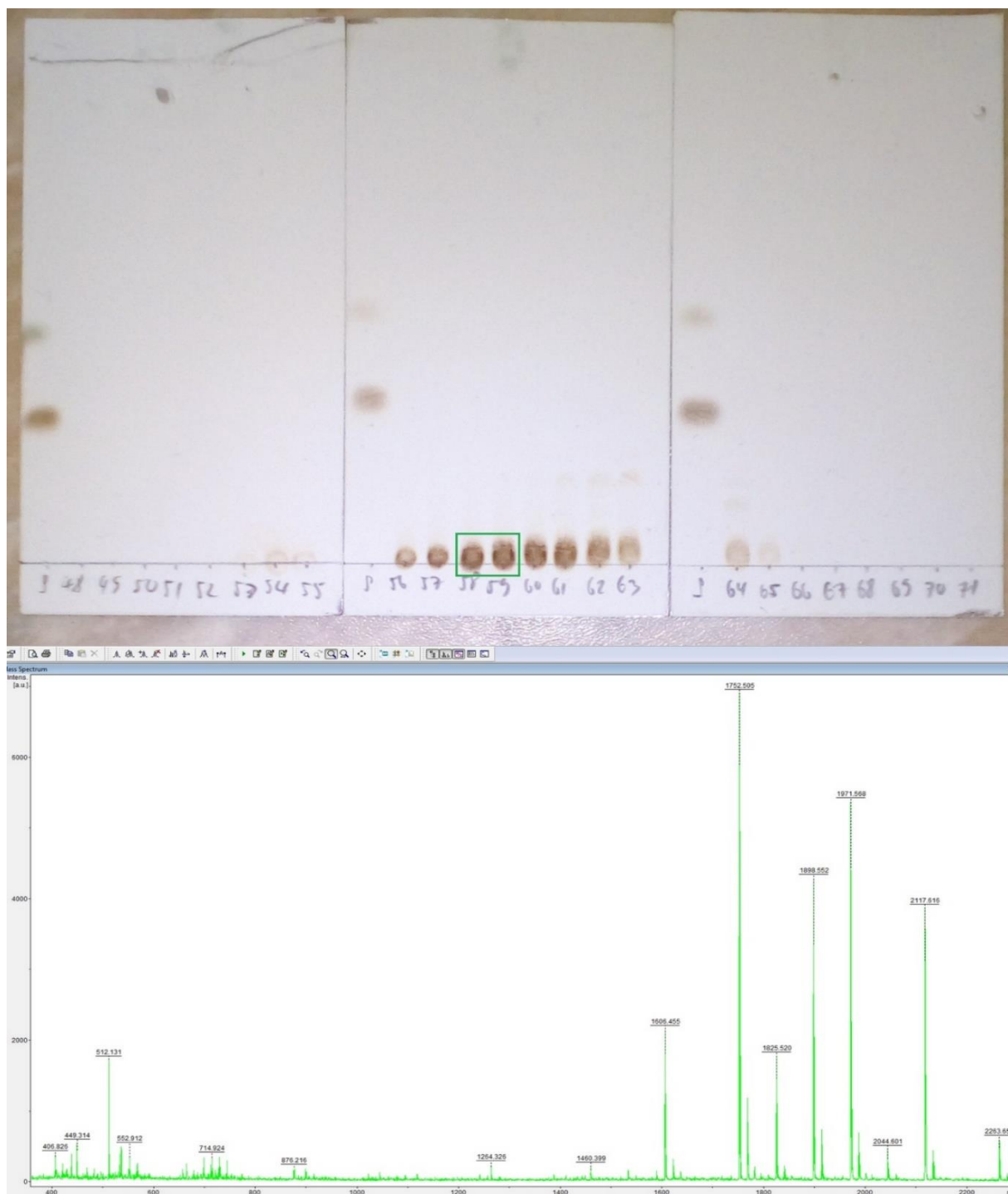
Obrázek 12 Vybrané příklady testovaných frakcí oligosacharidů mateřského mléka na TLC. Jako standardy („S“, levý kraj každé destičky) byly použity laktosa (nižší skvrna) a glukosa. Zeleně označené frakce obsahují výlučně oligosacharidy.



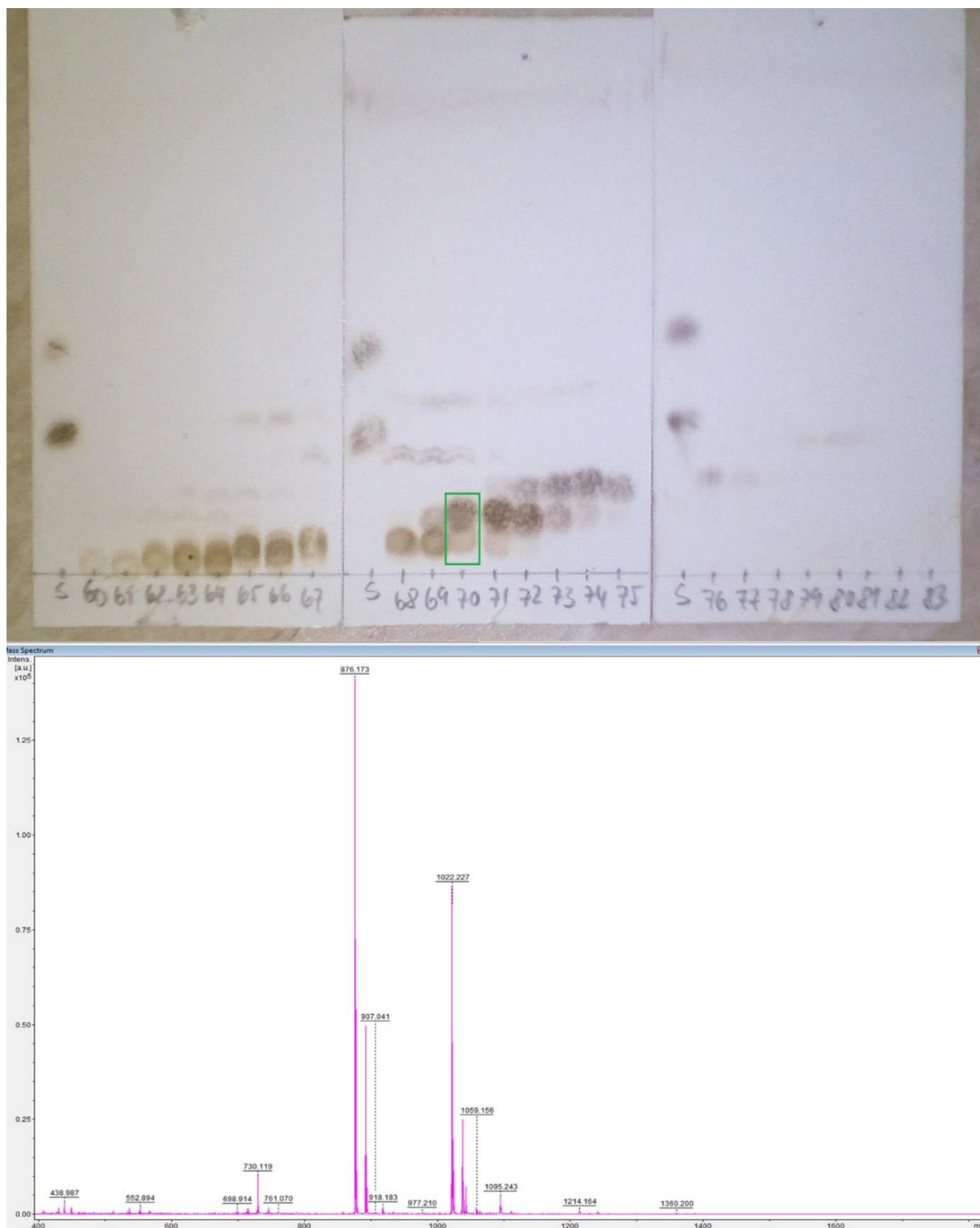
Obrázek 13 Frakce oligosacharidů nosorožčího mléka testované na TLC.

5.2 Analýza oligosacharidů

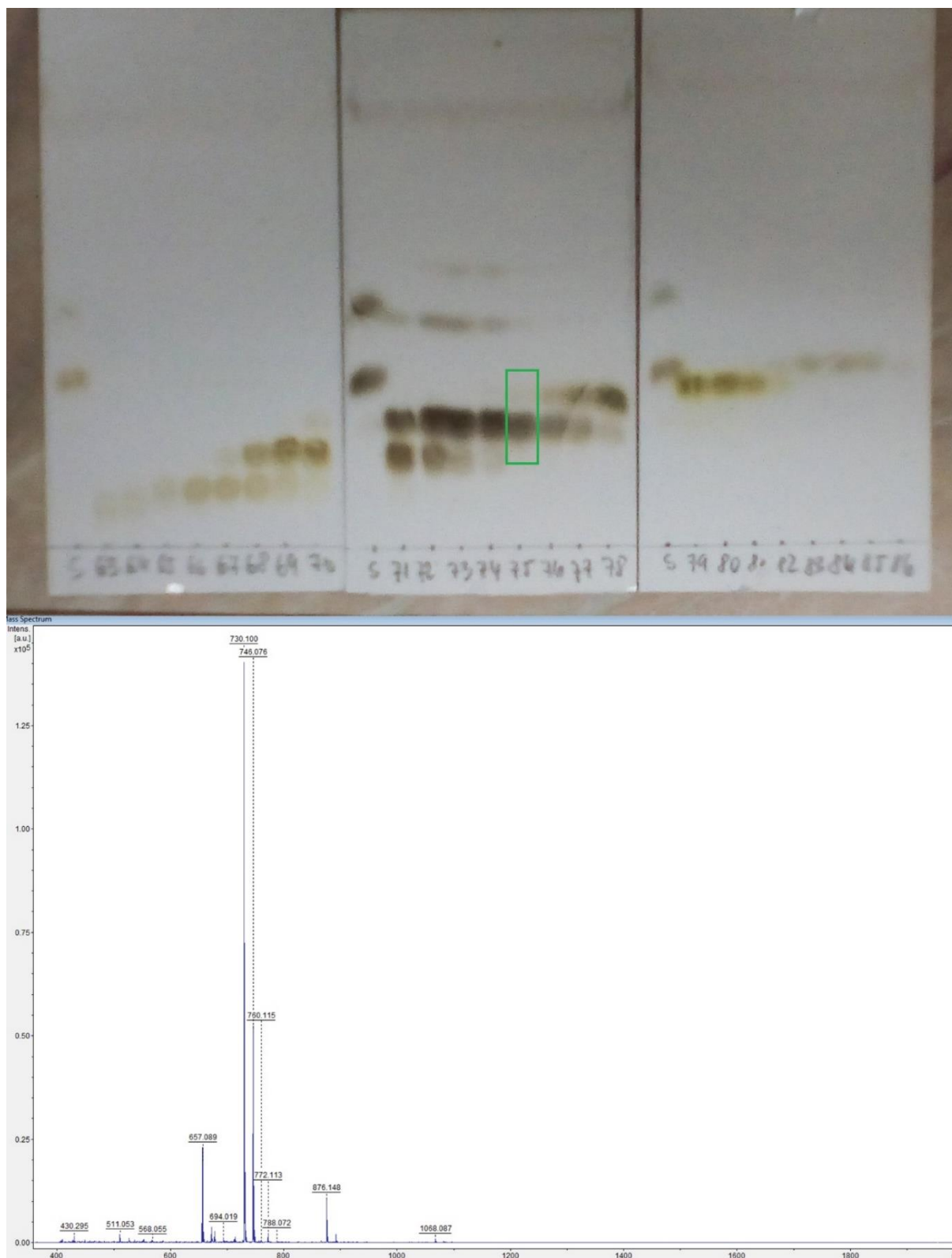
Vybrané zlyofilizované vzorky oligosacharidů (celkem devět) byly podrobeny testování na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii. Díky této technologii byly vybrány čtyři vzorky frakcí oligosacharidů, každá obsahující různé píky.



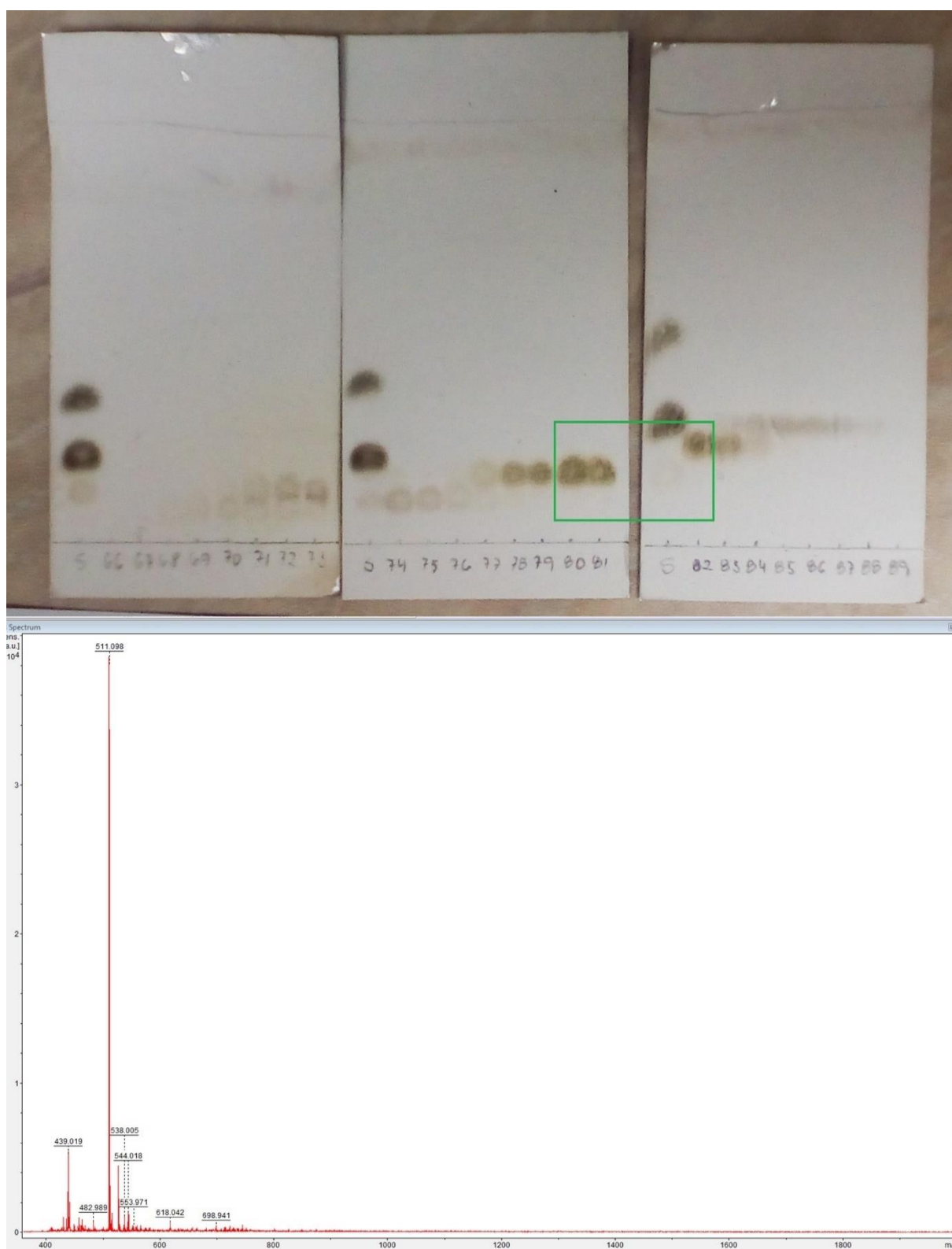
Obrázek 14 Vybraná frakce oligosacharidů mateřského mléka (OMM A) ke kultivaci. Na horní části obrázku je zeleně znázorněná vybraná frakce z TLC, která byla následně testovaná na MALDI-TOF. Na spodní části obrázku je graf z analýzy MALDI-TOF, kde je znázorněné hmotnostní spektrum tohoto oligosacharidu. Na ose x je poměr m/z a na ose y intenzita odezvy.



Obrázek 15 Vybraná frakce oligosacharidů mateřského mléka (OMM B) ke kultivaci. Na horní části obrázku je zeleně znázorněná vybraná frakce z TLC, která byla následně testovaná na MALDI-TOF. Na spodní části obrázku je graf z analýzy MALDI-TOF, kde je znázorněné hmotnostní spektrum tohoto oligosacharidu. Na ose x je poměr m/z a na ose y intenzita odezvy.



Obrázek 16 Vybraná frakce oligosacharidů mateřského mléka (OMM C) ke kultivaci. Na horní části obrázku je zeleně znázorněná vybraná frakce z TLC, která byla následně testovaná na MALDI-TOF. Na spodní části obrázku je graf z analýzy MALDI-TOF, kde je znázorněné hmotnostní spektrum tohoto oligosacharidu. Na ose x je poměr m/z a na ose y intenzita odezvy.



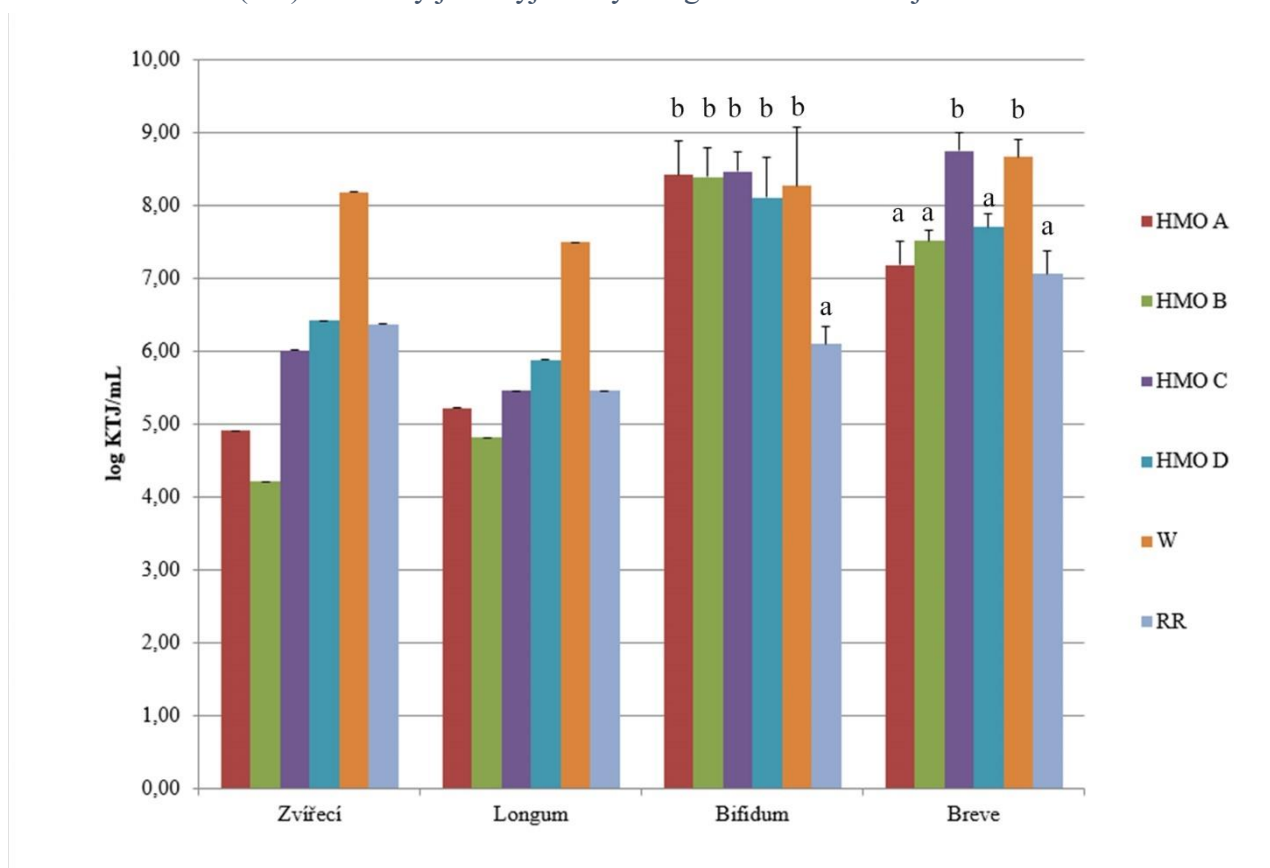
Obrázek 17 Vybraná frakce oligosacharidů mateřského mléka (OMM D) ke kultivaci. Na horní části obrázku je zeleně znázorněná vybraná frakce z TLC, která byla následně testovaná na MALDI-TOF. Na spodní části obrázku je graf z analýzy MALDI-TOF, kde je znázorněné hmotnostní spektrum tohoto oligosacharidu. Na ose x je poměr m/z a na ose y intenzita odezvy.

5.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech

Celkem bylo testováno deset kmenů bakterií. Jejich původ je uveden v Tabulce 3.

Kmen	log KTJ/mL					
	OMM A	OMM B	OMM C	OMM D	W	RR
BB 12	4,3	3,6	6,23	6,92	9,06	6,91
CCM 4988	5,52	4,82	5,78	5,91	7,3	5,83
CCM 4990	4,75	4,26	5,36	5,82	6,51	5,68
ATCC 15707	5,68	5,37	5,54	5,94	8,46	5,23
DSM 20082	8,88	8,82	8,68	8,5	9,18	5,82
JKM	7,97	8,03	8,17	7,47	8,02	6,26
JOV	8,4	8,3	8,53	8,33	7,6	6,2
MJ	7,56	7,68	9,02	7,91	8,78	7,42
AB	6,95	7,4	8,57	7,59	8,81	6,95
KLÁRA	7,03	7,45	8,65	7,6	8,38	6,81

Tabulka 5 Růst bakterií na vybraných oligosacharidech mateřského mléka. V tabulce jsou uvedeny počty bakterií na konci kultivace (po 24 hod při 37 °C) na vybraných oligosacharidech mateřského mléka (OMM A, B, C, D), neselektivním médiu obsahující glukosu (W) a médiu bez sacharidů (RR). Hodnoty jsou vyjádřeny v logaritmu tvořících jednotek.



Graf 2 Srovnání růstu bifidobakterií na oligosacharidech mateřského mléka, na neselektivním médiu s glukosou (W) a médiem bez sacharidů (RR) po 24 hod při 37 °C. Osa y znázorňuje log KTJ/mL. Písmena (a, b) naznačují statistický rozdíl mezi jednotlivými substráty ($P > 0,01$).

U všech tří kmenů *B. bifidum* byl zaznamenán růst na oligosacharidech mateřského mléka. Kmeny DSM 20082, JOV a JKM narostly na OMM nejvíce, a to v průměru o více než tři řády a jejich nárůst byl srovnatelný s nárůstem v neselektivním médiu s glukosou a zároveň statisticky významně vyšší než v kontrolním médiu bez sacharidů. Nejslabší nárůst bifidobakterií lidského původu byl u skupiny *B. longum*. Ve srovnání s počáteční a konečnou koncentrací nebyl významně vysoký (v průměru byl nárůst o jeden řád).

Kmeny zvířecího původu na oligosacharidech mateřského mléka nerostly. Při porovnání nárůstu v 0 hod a 24 hod byl dokonce zaznamenán jejich mírný úbytek.

U *B. breve* zaznamenáváme dle statického vyhodnocení významný nárůst pouze u OMM C ve srovnání s neselektivním médiem. Na ostatních frakcích *B. breve* nerostlo. U ostatních skupin (*B. longum* a zvířecích bifidobakterií) nebylo statistické vyhodnocení provedeno z důvodu nedostatečně velkého souboru dat.

Naměřené hodnoty pH (Tabulka 6) potvrzují nejvyšší nárůst u kmene DSM 20082, JKM a JOV, což jsou kmeny ze skupiny *B. bifidum*, kde byly hodnoty pH nejnižší. Neměřené vysoké hodnoty pH stvrzují nejnižší, respektive nulový nárůst u bifidobakterií zvířecího původu. U skupiny *B. longum* se pH rovněž příliš významně nesnížilo, což souvisí s jejich nevýznamným nárůstem.

Kmen	pH					
	OMM A	OMM B	OMM C	OMM D	W	RR
BB 12	7,2	7,2	7,2	7,2	6,5	7,2
CCM 4988	7,2	7,2	7,2	7,2	5,3	7,2
CCM 4990	7,2	7,2	7,2	7,2	6,3	7,2
ATCC 15707	6,9	7,0	7,2	7,2	5,4	7,2
DSM 20082	5,3	5,3	5,3	5,7	4,6	6,9
JKM	6,3	6,0	5,7	6,6	6,0	7,2
JOV	6,0	6,0	6,0	5,8	6,1	7,2
MJ	7,2	7,2	5,7	6,9	5,0	7,2
AB	7,2	6,6	5,7	6,9	5,0	7,2
KLÁRA	7,2	7,2	6,6	5,4	3,6	7,2

Tabulka 6 Hodnoty pH po 24 hod kultivace při 37 °C na vybraných oligosacharidech mateřského mléka (OMM A, B, C, D), neselektivním médiu obsahujícím glukosu (W) a médiu bez sacharidů (RR).

6 DISKUZE

6.1 Izolace oligosacharidů z mateřského mléka

Oligosacharidy byly i přes velkou časovou náročnost vyizolovány z mateřského mléka, kravské syrovátky, kozí syrovátky a nosorožčího mléka. Ve všech vzorcích byly obsaženy podle TLC oligosacharidy (ač v jiné míře). Z uvedených vzorků TLC je zřejmé, že se frakce oligosacharidů mateřského mléka, kravské syrovátky, kozí syrovátky a nosorožčího mléka od sebe liší. Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že se složení oligosacharidů mateřského mléka a ostatních savců od sebe liší, což současně prokazují data z odborné literatury, které o lišící se struktuře mateřských a ostatních savčích oligosacharidů pojednávají (Albrecht et al., 2014; Barile et Rastall, 2013; Urashima et al., 2017).

Nicméně i přes striktní dodržování postupů nebyly všechny vzorky úspěšně zbaveny nežádoucích látek jako např. proteinů (což potvrdil Bradfordův test na proteiny). Protože molekuly proteinů vycházely z GCP jako první, došlo občas ke kontaminaci prvních frakcí OMM. V důsledku toho bylo na analýzu MALDI-TOF vybráno devět vzorků, a to pouze oligosacharidů mateřského mléka. Opakovaná separace na GPC umožnila kvalitnější rozdělení OMM podle velikosti molekul.

6.2 Kultivace bakterií na oligosacharidech

U kmenů bifidobakterií (*B. bifidum* a *B. breve*) lidského původu byl zaznamenán nárůst na oligosacharidech mateřského mléka, zatímco u kmenů animálního původu tomu bylo naopak, což koreluje s poznatky z odborné literatury (Rockova et al., 2011). Kmen *B. longum* na OMM nerostl, což se s odbornou literaturou neshoduje. Zároveň tyto výsledky potvrzují poznatky od McGuire et al. (2017), kteří tvrdí, že rod bifidobakterií dokáže nejvíce využívat OMM, ale záleží na určitém druhu a konkrétním bakteriálním genomu. Hypotéza, definovaná na začátku mé práce, že oligosacharidy mateřského mléka podporují růst jiných druhů bakterií se tímto rovněž potvrzuje.

6.2.1 Skupina *Bifidobacterium longum*

Sela a Bode (2017) tvrdí, že *B. longum* subsp. *infantis* je typickým kolonizátorem GIT kojence a zároveň dokáže s kmeny *B. bifidum* a *B. breve* významně využívat OMM, což se neshoduje s výsledky mé práce. U kmene *B. longum* subsp. *infantis* CCM 4990, který je izolátem

z kojence, nebyl nárůst významně zaznamenán a podobně tomu bylo i u kmene *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707, kde byl nárůst sice o něco málo vyšší, ale významně se nelišil. Tento izolát je navíc z dospělce, a tak u něj růstová aktivita na OMM ani nebyla předpokládána. Kmeny *B. longum* tudíž neprokázaly schopnost využívat OMM jako zdroj energie. Možnou příčinou nevyužití testovaných OMM kmenem *B. longum* subsp. *infantis* by mohla být ta, že narozdíl od *B. bifidum*, které exprimuje extracelulární glykosidázy, exprimuje internální glykosidázy a spoléhá na vlastní glykanové ABC transportéry pro přenos odpovídajících OMM. Extracelulární glykosidázy některých bakterií, jako třeba *B. bifidum* mohou být použity k uvolnění částí OMM, které pak mohou být využity *B. longum* subsp. *infantis* nebo i dalšími bakteriemi jako zdroj energie (Chen, 2015).

6.2.2 Skupina *Bifidobacterium bifidum*

Mcguire et al. (2017) tvrdí, že kmeny *B. bifidum* jsou nejúčinnější mikroby, kteří dokáží nejvíce využívat oligosacharidů mateřského mléka, což koresponduje s výsledky mé práce. Tyto bifidobakterie zvýšily v médiu s OMM své počty během 24 hod o tři řády (log KTJ/ml) a dokázaly produkci těkavých mastných kyselin s krátkým řetězcem snížit hodnotu pH. Nejlépe na tom byl kmen DSM 20082 (původem ze stolice dospělce), který snížil hodnotu pH v průměru u všech oligosacharidů na 5,4 a JKM (stolice kojence) u kterého byla naměřena hodnota pH 6,2. Tyto kmeny dokázaly nejvíce využívat OMM A, B, C, u kterých naměřená hodnota log KTJ/ml převýšila nárůst na neselektivním médiu obsahující glukózu.

6.2.3 Skupina *Bifidobacterium breve*

Nejvíce dokázaly bakterie *B. breve* využívat oligosacharidy OMM C, to dokonce v takové míře, že mírně převýšily nárůst na neselektivním médiu s glukózou. Nárůst bakterií této skupiny na ostatních oligosacharidech (OMM A, B, D) byl vyšší než u kmenů *B. longum*, ale nepřevýšil nárůst kmenů *B. bifidum* a byl především statisticky nevýznamný, tedy v podstatě stejný v porovnání s kontrolním médiem bez sacharidů. I přesto dokázala tato skupina využívat alespoň část oligosacharidů mateřského mléka. Důvod, proč tento kmen nedokázal plně využít OMM, může být ten, že ve srovnání s kmeny *B. bifidum* a *B. longum* nedokáže *B. breve* výhodně využívat fukosylovaných OMM včetně 2'-fukosyllaktosy, laktodifukotetraosy, lakto-N-fukopentaosy nebo lakto-N-difuko-hexaosy (Chen, 2015). Testované oligosacharidy mohly obsahovat ve svém složení některou z těchto složek a v důsledku toho nedošlo k jejich využití.

6.2.4 Skupina animálních bifidobakterií

U kmenů *B. animalis* subsp. *lactis* BB 12 a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CCM 4988 bylo zaznamenáno snížení kolonií mezi počáteční a konečnou kultivací v průměru o 0,6 log KTJ/ml a vysoké naměřené hodnoty pH, což naznačuje neschopnost využívat OMM bifidobakteriemi zvířecího původu a zároveň možné mírné inhibiční účinky oligosacharidů mateřského mléka a shoduje se s výsledky z odborné literatury (Ročková et al., 2013). Boehm & Stahl (2007) uvádí, že struktura oligosacharidů v mléce ostatních savců je mnohem méně složitá. Z tohoto důvodu nemusí zvířecí bifidobakterie umět využívat strukturně složitější OMM díky jejich nedostatečně bohatému enzymatickému aparátu.

7 ZÁVĚR

Oligosacharidy mateřského mléka a ostatních savčích mlécích byly úspěšně vyizolovány pomocí gelové permeační chromatografie. Následně byly úspěšně analyzovány za pomoci tenkovrstvé chromatografie a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Kmeny bakterií lidského původu *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium breve* dokázaly úspěšně využívat oligosacharidy mateřského mléka. Zatímco kmeny animálních bifidobakterií neuměly využívat tyto oligosacharidy.

Hypotéza, že se oligosacharidy mateřského mléka budou lišit od oligosacharidů ostatních savců a zároveň budou využívat jiné druhy bakterií, se potvrdila.

8 SEZNAM LITERATURY

- Albrecht, S., Lane, J. a, Mariño, K., Al Busadah, K. a, Carrington, S. D., Hickey, R. M., Rudd, P. M. 2014. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *The British journal of nutrition*. 111 (7). 1313–28.
- Andreas, N. J., Kampmann, B., Mehring Le-Doare, K. 2017. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 91 (11). 629–635.
- Ballard, O., Morrow, A. L. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60 (1). 49–74.
- Barile, D., Rastall, R. A. 2013. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*. 24 (2). 214–219.
- Bode, L. 2009. Human milk oligosaccharides: Prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*. 67 (SUPPL. 2). 183–191.
- Bode, L. 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 22 (9). 1147–1162.
- Bode, L. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*. 91 (11). 619–622.
- Boehm, G., Stahl, B. 2007. Oligosaccharides from milk. *Journal of Nutrition*. 137 (3). 847–849.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248-254.
- Bronský, J., Mitrová, K. 2013. Nové regulační hormony mateřského mléka. *Klinická biochemie a metabolismus*. 21 (1). 31–38.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Kňazovická, V., Ročková, Š., Geigerová, M., Božik, M. 2012. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica*. 57 (4). 273–275.
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., Gabrielli, O. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*. 38 (SUPPL. 2). 291–294.
- Fitzstevens, J. L., Smith, K. C., Hagadorn, J. I., Caimano, M. J., Matson, A. P., Brownell, E. A. 2016. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in clinical practice : Official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 20.
- Frühauf, M. P. 2013. Mateřské mléko a jeho biologické aktivity. *Pediatric pro praxi*. 14 (2). 63–64.
- Geddes, D., Hassiotou, F., Wise, M., Hartmann, P. 2017. Human Milk Composition and Function in the Infant. In: R. A. Polin, S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz, W. W. Fox

- (Ed.). *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. Fifth Edit. s. 273–280. Elsevier. ISBN: 978-0-323-35214-7.
- Grulee, C. G., Sanford, H. N., Schwarz, H. 1935. Breast and artificially fed infants: A study of the age incidence in the morbidity and mortality in twenty thousand cases. *Journal of the American Medical Association*. 104 (22). 1986–1988.
- Hambraeus, L. 1984. Human milk composition. *Commonwealth agricultural bureaux*. 54 . 219–236.
- Hennet, T., Weiss, A., Borsig, L. 2014. Decoding breast milk oligosaccharides. *Swiss Medical Weekly*. 144 (February). 1–9.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., Chait, B. T. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*. 63 (24). 1193–1203.
- Hrstková, H. *Výživa kojenců a mladších batolat*. 1.vyd. Brno: NCO-NZO, 2003. 77s. ISBN 80-7013-385-6.
- Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, et al. 2011. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*; 11: 365 – 372.
- Chen, X. 2015. *Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis* *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. 1. vyd. Roč. 72. Elsevier Inc. 113-190. ISBN: 9780128021415.
- Kobata, A. 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 86 (7). 731–747.
- Kopřiva, F. 2010. Slizniční imunitní systém, mateřské mléko a pre(o)biotika. *Praktické lékařství*. 6 . 38–42.
- Kruger, N. J. 2002. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. 32 . 15–21.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S. 2000. OLIGOSACCHARIDES IN HUMAN MILK : Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annual Review of Nutrition*. 20 (1). 699–722.
- Marx, C., Bridge, R., Wolf, A. K., Rich, W., Kim, J. H., Bode, L. 2014. Human Milk Oligosaccharide Composition Differs between Donor Milk and Mother's Own Milk in the NICU. *Journal of Human Lactation*. 30 (1). 54–61.
- McGuire, M. K., McGuire, M. A., Bode, L., Smith, D. F., Cummings, R. D. 2017. Prebiotics and Probiotics in Human Milk. *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. p. 141-168. ISBN: 9780128027257.

- Morrow, A. L., Yu, Y. 2017. Potential Public Health Impact of Human Milk Oligosaccharides. In: M. K. McGuire, M. A. McGuire, L. Bode (Ed.). *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. s. 207–222. San Diego. Academic Press. ISBN: 978-0-12-802725-7.
- Musilová, Š., Rada, V. 2015. Vliv oligosacharidů mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojenců. *Pediatric pro praxi*. 16 (10). 17–19.
- Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., Watanabe, Y., Ohtani, M., Arai, I., Urashima, T., 2003. Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation. *Journal of Dairy Science* 86, 1315–1320.
- Nevoral, J. a kolektiv. *Výživa v dětském věku*. 1. vyd. Jihlava: H&H, 2003. 434s. ISBN 80-86-022-93-5.
- Nevoral, J. 2012. Prebiotika a probiotika v pediatrii. *Pediatric pro praxi*. 13 (3). 167–173.
- O'Shaughnessy, L., Doyle, S. 2011. Purification of proteins from baculovirus-infected insect cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). Roč. 681. p. 295-309. ISBN: 9788578110796.
- Oursel, S., Cholet, S., Junot, C., Fenaille, F. 2017. Comparative analysis of native and permethylated human milk oligosaccharides by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*.
- Quigley, E. M. M. 2017. Chapter 12 - Bifidobacteria as Probiotic Organisms: An Introduction. In: M. H. Floch, Y. Ringel, W. A. Walker (Ed.). *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. s. 125–126. Boston. Academic Press. ISBN: 978-0-12-804024-9.
- Rockova, S., Nevoral, J., Rada, V., Marsik, P., Sklenar, J., Hinkova, A., Vlkova, E., Marounek, M. 2011. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal*. 21 (7). 504–508.
- Ruhak, L. R., Lebrilla, C. B. 2012. Advances in analysis of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 3 (3). 406–414.
- Sanz, Y. 2016. Bifidobacteria in Foods: Health Effects. In: B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá (Ed.). *Encyclopedia of Food and Health*. s. 388–394. Oxford. Academic Press. ISBN: 978-0-12-384953-3.
- Sela, D. A., Bode, L. 2017. Chapter 6 - The Role of Human Milk Oligosaccharides in Host–Microbial Interactions. In: M. K. McGuire, M. A. McGuire, L. Bode (Ed.). *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. s. 185–206. San Diego. Academic Press. ISBN: 978-0-12-802725-7.
- Schönfeld, H. 1929. Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrbuch Kinderheilkd.* 113 . 19–69.

- Stanton, P. 2004. Gel filtration chromatography. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 251 . 55–74.
- Urashima, T., Messer, M., Oftedal, O. T. 2017. Oligosaccharides in the Milk of Other Mammals. In: M. K. McGuire, M. A. McGuire, L. Bode (Ed.). *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. s. 45–139. San Diego. Academic Press. ISBN: 978-0-12-802725-7.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin: 1. 3. Tábor. OSSIS*. p. 602. ISBN: 978-80-86659-15-2.
- Verduci, E., Banderali, G., Barberi, S., Radaelli, G., Lops, A., Betti, F., Riva, E., Giovannini, M. 2014. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*. 6 (4). 1711–1724.
- Vincentová, D. 2006. Výživa novorozence, kojence a batolete. *Pediatric pro praxi*. 4 . 224–226.
- Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B. 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6). 4497–4499.