

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Izolace, purifikace a analýza oligosacharidů z mateřského mléka

Bakalářská práce

Autor práce: Iva Mrvíková

Vedoucí práce: Ing. Šárka Mušilová, PhD.

Konzultant: Ing. Roman Švejtil

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Izolace, purifikace a analýza oligosacharidů z mateřského mléka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 17. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Šárce Musilové, PhD. za její vstřícnost a odborné vedení při zpracování bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Romanu Švejstilovi za spolupráci a pomoc v laboratoři a při získání potřebných podkladů k mé práci.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a přátelům za materiální i psychickou podporu po celou dobu mého studia.

Izolace, purifikace a analýza oligosacharidů z mateřského mléka

Souhrn

Mateřské mléko je nejpřirozenější kojeneckou stravou. Přináší řadu významných bioaktivních látek, které přispívají ke správnému vývoji kojence. Je také významným zdrojem oligosacharidů s prebiotickými účinky, které slouží jako zdroj energie pro bakterie v trávicím traktu dítěte.

Cílem této práce bylo izolovat a analyzovat oligosacharidy mateřského mléka, zjistit jejich množství v mateřském mléce a zhodnotit jejich celkový význam. Zároveň je v práci rozebrána problematika mléčných náhražek, výživa kojenců dárcovským mateřským mlékem a jejich výhody a nevýhody pro dítě.

Oligosacharidy mateřského mléka byly izolovány pomocí gelové permeační chromatografie a dále podrobeny analýze na tenkovrstvé chromatografii, při které byly rozpoznány separované molekuly. Dále byly frakce podrobeny testu na přítomnost proteinů dle Bradfordové. Frakce, obsahující pouze oligosacharidy a proteiny v množství menší než 1 $\mu\text{g/ml}$ byly odeslány k analýze do Švýcarska. Na základě této analýzy bylo zjištěno jejich složení.

Ze zjištěných údajů o izolovaných oligosacharidech můžeme konstatovat, že prováděná separační metoda je spíše kvalitativní. Množství izolovaných oligosacharidů mateřského mléka se významně lišilo ($P < 0,002$) od množství, které je uváděno v odborné literatuře.

Klíčová slova: mateřské mléko, oligosacharidy mateřského mléka, izolace, purifikace, analýza

Isolation, purification and analysis of oligosaccharides from human milk

Summary

Human milk, which nourishes the early infants, is a source of bioactive components for the infant growth and a development as well. Human milk is a rich source of oligosaccharides, which are prebiotic and develop the immune system of the infant. Human milk oligosaccharides are a good source of energy and nutrients for the bacteria in the intestinal track of the infant.

The objective of this thesis was to isolate oligosaccharides from human milk and analyse their amount in human milk and their importance for the infant. The thesis is also focused on the issue of human milk substitutes and their advantages and disadvantages for infants.

Human milk oligosaccharides were isolated using gel permeation chromatography and thin layer chromatography. The thin layer chromatography is used to recognition and separation of molecules. The purity of each fractions was then confirmed by the Bradford protein assay. Some of the isolated fractions, containing only human milk oligosaccharides and protein in amount less than $1\mu\text{m}/\text{ml}$, were subsequently qualitatively analysed in Switzerland. The result of Bradford protein assay were composition of oligosaccharide fractions has been found out based on this analysis.

The selected separation method is clearly qualitative as the quantity of human milk oligosaccharides were significantly different ($P < 0,002$) from quantity of human milk oligosaccharides started in the scientific articles.

Keywords: human milk, human milk oligosaccharides, isolation, purification, analysis

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
2.1	Hypotéza	9
3	Přehled literatury	10
3.1	Mateřské mléko	10
3.1.1	Složení mateřského mléka	10
3.1.1.1	Kolostrum.....	12
3.1.1.2	Zralé mateřské mléko	12
3.1.2	Vliv mateřského mléka na zdraví kojence	13
3.1.2.1	Mateřské mléko a jeho alternativy	14
3.1.3	Porovnání mateřského mléka s mléky ostatních savců.....	17
3.2	Oligosacharidy mateřského mléka	18
3.2.1	Struktura a složení oligosacharidů mateřského mléka.....	18
3.2.1.1	Kyselé a neutrální oligosacharidy mateřského mléka	20
3.2.2	Porovnání oligosacharidů s dalšími savčími mléky.....	23
3.2.3	Vliv oligosacharidů mateřského mléka na zdraví kojence	23
3.2.4	Metody izolace a analýza oligosacharidů mateřského mléka.....	24
4	Materiál a metody	29
4.1	Izolace oligosacharidů z mateřského mléka	29
4.1.1	Příprava vzorku.....	29
4.1.2	Gelová chromatografie	29
4.1.2.1	Kalibrace a použití kolony	30
4.1.3	Tenkovrstvá chromatografie	30
4.1.4	Stanovení proteinů podle Bradfordové	30
4.2	Analýza oligosacharidů mateřského mléka	31
4.3	Vyhodnocení výsledků	31
5	Výsledky	32
5.1	Izolace oligosacharidů z mateřského mléka	32
5.1.1	Sestrojení kalibrační přímky	32
5.2	Kvalitativní analýza oligosacharidů mateřského mléka	33
6	Diskuse	34
6.1	Izolace oligosacharidů mateřského mléka	34
6.2	Kvalitativní analýza mateřského mléka	34
6.3	Využití analýzy oligosacharidů mateřského mléka v praxi	34
7	Závěr	36

8 Přílohy	37
9 Seznam Literatury	40

1 Úvod

Mateřské mléko je přirozenou a vyváženou stravou pro kojence. Dodává mu správný poměr živin a je lehce stravitelné. Je zdrojem bioaktivních látek, které přispívají ke zdravému růstu a vývoji dítěte. Obsahuje mnoho různých významných látek, jako jsou aminokyseliny, vitaminy a minerály. Jednu z jeho nejdůležitějších složek tvoří sacharidy, zejména tedy oligosacharidy. Ty napomáhají rozvoji střevní mikrobioty a tím podporují rozvoj imunitního systému dítěte. Dále také například napomáhají správnému mentálnímu vývoji.

Oligosacharidy jsou jedinečnou složkou mateřského mléka a svým množstvím a strukturou se významně liší od oligosacharidů jiných savčích mlék. Najdeme však rozdíly i mezi jednotlivými matkami. Tato skutečnost vede ke snaze je blíže poznat a analyzovat. Znalost oligosacharidů mateřského mléka by bylo možné dále využít při výrobě umělých mléčných výživ nebo napomoci správnému výběru mléka z mléčných bank. K tomu je však zapotřebí oligosacharidy izolovat pomocí různých separačních metod a dále kvalitativně analyzovat.

Tato práce se zabývá různými metodami, které lze využít k izolaci těchto oligosacharidů, jejich analýzou a následným popisem. Některé z těchto metod jsou v této práci prakticky využity a podrobně vysvětleny.

Dále je zde zmíněn význam oligosacharidů mateřského mléka pro kojence a jejich možné využití v budoucnosti a to jak ve vývoji umělých kojeneckých výživ, tak ve správném výběru mateřských mlék z mléčných bank na základě specifity bifidogenní populace v trávicím traktu kojence.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo izolovat a analyzovat oligosacharidy z různých vzorků mateřských mlék, zjistit jejich množství v mateřském mléku a celkový vliv na kojence. Dále také zhodnotit význam oligosacharidů mateřského mléka ve vývoji umělé kojenecké výživy a v neposlední řadě jejich důležitost při výběru vhodného dárcovského mléka z mléčných bank.

2.1 Hypotéza

Předpoklad byl, že mateřské mléko obsahuje oligosacharidy, které jsou velmi důležité pro správný vývoj kojence. Množství námi izolovaných oligosacharidů se neshoduje s množstvím, které je uváděno v odborné literatuře. Domníváme se, že množství a složení oligosacharidů mateřského mléka je různé v závislosti na matce.

3 Přehled literatury

3.1 Mateřské mléko

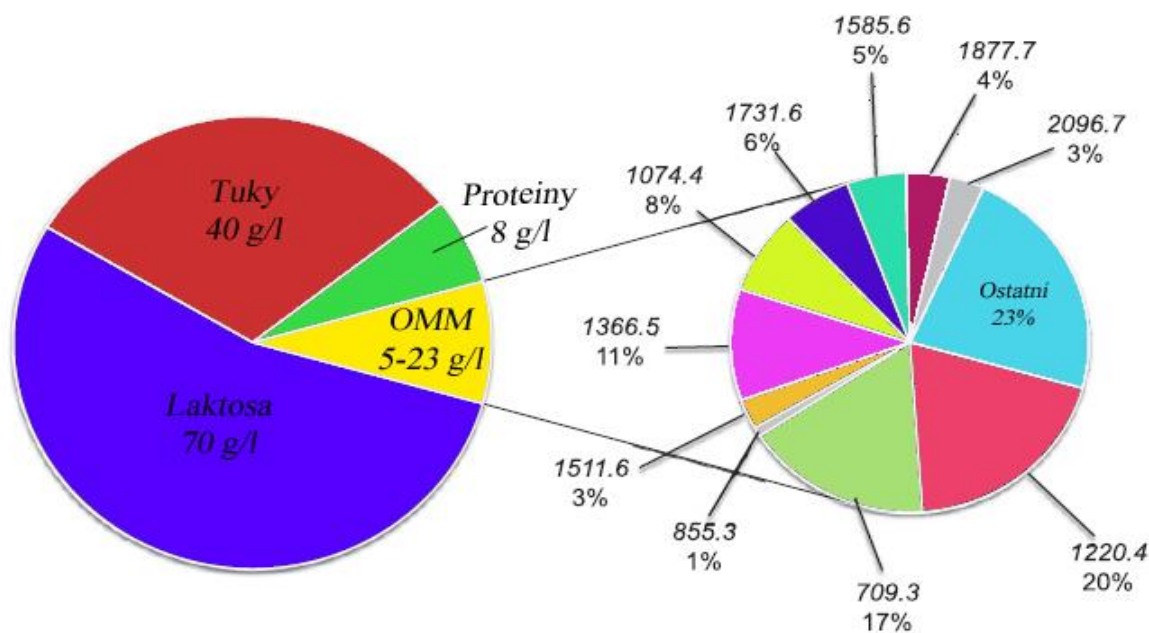
Mateřské mléko je často nazýváno jako „zlatý standard“ pro výživu kojence v prvních měsících jeho života (Bode, 2009). Je zdrojem bioaktivních látek pro zdravý růst a vývoj kojence (Kyunghun et al., 2012), zároveň je také nejpřirozenějším a nejbezpečnějším druhem jeho výživy. Dodává mu správný poměr živin a je lehce stravitelné (Kunz et al 1999).

Mléko je složeno z různorodých látek, jako jsou sacharidy (zejména oligosacharidy), aminokyseliny, vitamíny a minerály, které podporují rozvoj střevní mikrobioty během raného dětství (McVea et al., 2000; Kramer et al., 2008; Reilly et al., 2005). Podle období laktace můžeme mateřské mléko rozdělit na kolostrum, které je produkováno první dny po porodu a na mléko zralé (Kulski and Hartmann, 1981).

3.1.1 Složení mateřského mléka

Mateřské mléko je bohatší, než mléko skotu nebo jiné savčí mléko. Zejména pokud jde o obsah oligosacharidů. Obsah oligosacharidů v mateřském kolostru je 22 – 23 g/l a ve zralém mléce je to 12 – 13 g/l (Davis et al., 1983).

Obr. 1 Složení mateřského mléka



Dané schéma (Obr. 1) nám ukazuje, že nejhojnější složkou mateřského mléka je laktosa, jejíž množství dosahuje až 70 g/l, po ní následují lipidy (40 g/l) a oligosacharidy (5 – 23 g/l). Výsuvný koláčový graf (vlevo) představuje složení nejhojnějších oligosacharidů mateřského mléka, hmotnosti jednotlivých složek a jejich relativní četnost (Ninonuevo at al., 2006).

Makronutrienty

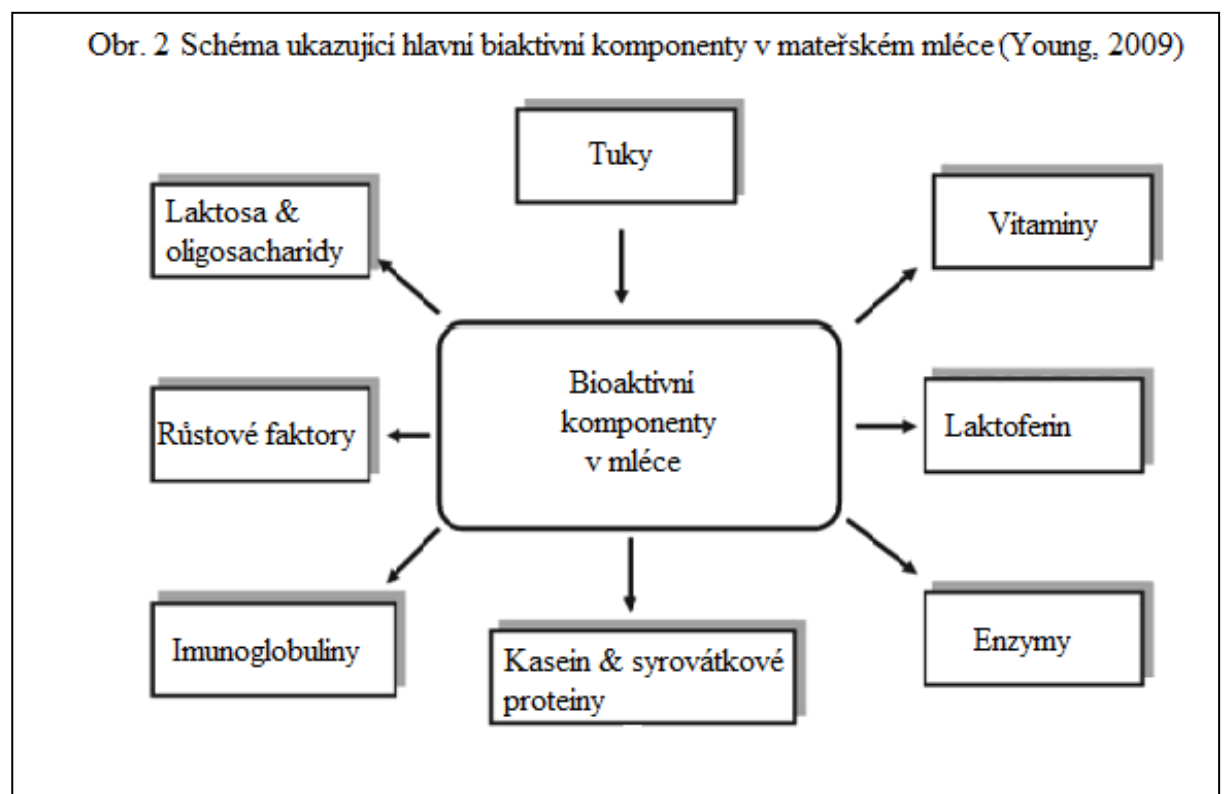
Mateřské mléko je složeno ze 4 hlavních složek: proteinů, tuků, laktosy a oligosacharidů. Jejich zastoupení je patrné v Obr. 1.

Složení makronutrientů se liší v závislosti na období laktace. Je výrazný rozdíl v obsahu živin u kolostra a zralého mléka. Od čtvrtého měsíce po porodu je složení mateřského mléka závislé i na matce a to zejména na její tělesné hmotnosti, příjmu bílkovin, návratu menstruace a frekvenci kojení. Ve studii bylo také prokázáno, že u matek, které produkují více mléka, je koncentrace tuků a bílkovin nižší a koncentrace laktosy vyšší (Nommsen et al., 1991).

Mikronutrienty

Většina stopových prvků mateřského mléka je závislá na stravě matky a její tělesné konstituci. V mateřském mléce je velmi nízká koncentrace vitamínu D a K, u nichž je doporučeno, aby se přidávaly do stravy matky (Greer, 2001; Allen, 2012).

Bioaktivní komponenty



„Bioaktivní komponenty mateřského mléka představují spojení nutričních a imunologických vlastností, které se uplatňují paralelně. To znamená, že kromě energetického zisku jsou významné svou ochrannou funkcí“ (Frühauf, 2009). Bioaktivní komponenty v mateřském mléce pocházejí z různých zdrojů. Některé jsou produkovány a vylučovány z prsního epitelu, jiné zase z mateřského séra (Garofalo, 2010). Příkladem bioaktivních komponentů může být sekreční IgA nebo vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF-A a VEGF-B) (Van de Perre, 2003). Jiné bioaktivní složky mateřského mléka jsou uvedeny v Tab. 1.

3.1.1.1 Kolostrum

Kolostrum je tekutina, která je produkována v prvních dnech po porodu. Je bohaté na imunologické komponenty, jako jsou sekreční IgA, laktoferin, leukocyty a také na vývojové faktory jako je epidermální růstový faktor (Castellote et al., 2011; Pang and Hartmann, 2007; Kulski and Hartmann, 1981). Kolostrum se od zralého mléka liší zejména v množství bílkovin a sacharidů. Obsah bílkovin je výrazně vyšší a obsah sacharidů je výrazně nižší (Janness, 1979). Rozdíly jsou patrné i v odlišném obsahu minerálních látek. Hladiny chloridu sodného a hořčíku jsou vyšší a hladiny draslíku a vápníku nižší než ve zralém mléku (Pang and Hartmann, 2007; Kulski and Hartmann, 1981). Ve chvíli, kdy se začne měnit poměr draslíku a vápníku, tedy dochází k poklesu koncentrace draslíku a zvýšení koncentrace vápníku, dochází k aktivaci a sekreci přechodného mléka. K tomu obvykle dochází během několika prvních dnů. Opožděný nástup je chápán po 72 hodinách po porodu a častěji se vyskytuje u obézních matek nebo u předčasných porodů (Henderson et al., 2008; Nommsen-Rivers et al., 2012).

3.1.1.2 Zralé mateřské mléko

Od 5 dnů do 2 týdnů po porodu je mateřské mléko z velké části zralé a v období 4 až 6 týdnů po porodu je již zcela zralé. Tyto rychlé změny ve složení mléka jsou důležité a kopírují potřeby rychle rostoucího kojence (Kulski and Hartmann, 1981). Zralé lidské mléko obsahuje 3 – 5 % tuku, 0,8 – 0,9 % bílkovin, 6,9 – 7,2 % sacharidů a 0,2 % minerálních látek. Energetická hodnota mateřského mléka je 65 – 75 kcal na 100 ml (Janness, 1979). Jak už jsem zmiňovala výše, rozdíl mezi zralým mlékem a kolostrumem je patrný nejen v období, kdy je mléko produkováno, ale také v obsahu živin.

V průběhu laktace se obsah tuku nijak výrazně nemění, ale vykazuje změny během dne (Janess, 1979).

3.1.2 Vliv mateřského mléka na zdraví kojence

Existuje spojení mezi mateřským mlékem a vývojem, růstem a zdravím kojence. Mateřské mléko prošlo 200 miliony let vývoje až do současné podoby. Jeho složky nesloží pouze pro výživu kojence, poskytují také nesčetné bioaktivní sloučeniny, které ovlivňují růst, stimulaci a modulaci imunitního systému, kognitivní vývoj, ochranu před toxiny a patogenním onemocněním (Daniels and Adair, 2005; German et al., 2002; Harmsen et al., 2000).

Mateřské mléko obsahuje také různé druhy složek, mezi jejichž funkce patří chránit prsní žlázy matky a poskytovat ochranu kojenci v době, kdy jeho imunitní systém je stále ještě nevyvinutý (Brandtzaeg, 2003; Hanson et al., 2003; Lönnerdal, 2003). V tabulce (Tab. 1) jsou vypsané složky s imunologickými vlastnostmi mateřského mléka.

Tab. 1 Složky s imunologickými charakterami mateřského mléka

Antimikrobiální složky	Imunitní vývojové složky
Imunoglobuliny: SIgA, SIgG, SIgM	Makrofágy
Laktoferin, laktoferin B a H	Neutrofilly
Lysozym	Lymfocyty
Laktoperoxidasa	Cytokiny
Nukleotid-hydrolizované protilátky	Růstové faktory
κ -kasein a α -laktalbumin	Hormony
Haptokorin	Mléčné peptidy
Muciny	Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
Laktadherin	Nukleotidy
Volné sekreční komponenty	Adhezivní molekuly
Oligosacharidy a prebiotika	Protizánětlivé složky
Mastné kyseliny	Cytokininy: IL-10 a TGF β
Mateřské leukocyty a cytokininy	IL-1 antagonistický receptor, TNF α a IL-6 receptory
sCD14	sCD14
Komplementy a komplementární receptory	Adhezivní molekuly
β -Defensin-1	Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
Toll-like receptory	Hormony a růstové faktory
Bifidogenní faktor	Osteoprotegerin
Hlavní komponenty	Laktoferin

Cytokininy: IL-10 a TGFβ	Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
Antiidiotypické protilátky	Hormony a růstové faktory

(Field, 2005)

3.1.2.1 Mateřské mléko a jeho alternativy

Náhražky mateřského mléka jsou produkty na bázi kravského mléka nebo mlék jiných savců, které se ukázaly být vhodné pro výživu kojenců. Kojenecká výživa musí podporovat normální růst a vývoj dítěte a její energetická hodnota by měla být v rozmezí 60 – 75 kcal na 100 ml (Life Sciences Research Office 1988; Scientific Committee on Food, 2003).

Předlohou pro výrobu náhražek mateřského mléka je zralé mateřské mléko. Přestože umělá kojenecká výživa se podobá vlastnímu mateřskému mléku, stále existuje mnoho rozdílů v obsahu živin a to zejména v oblasti energetické hodnoty, množství proteinů, lipidů a železa (Wells, 1996).

Některé látky se však synteticky vyrobit nemohou. Jsou to zejména bioaktivní komponenty a mateřské protilátky, které chrání kojence před onemocněním a infekcemi (Cleary, 2004). Umělá kojenecká výživa může mít odlišný účinek na kognitivní vývoj dítěte. Faktory (cholesterol, dlouhé řetězce polynenasycených mastných kyselin, růstové faktory, hormony, vitamíny, minerální látky), které podporují rozvoj centrálního nervového systému, buď chybí, nebo se v těchto náhražkách vyskytují ve výrazně nižším množství než u mateřského mléka (Banapurmath et al., 1996).

Rozdíl mezi mléčnou náhražkou a kojením není pouze ve složení, ale také například v ceně. Pokud se matka rozhodne pro umělou kojeneckou výživu, může ji to měsíčně stát až o více jak 2000 Kč. V ceně není pouze samotná mléčná náhražka, ale také vše potřebné pro její přípravu a uchování (Labusová, 2008).

Tab. 2

Základní vlastnosti mateřského mléka a umělé kojenecké výživy, imunoprotektivní funkce

Mateřské mléko	Náhražka mateřského mléka
Nesterilní, proměnné v obsahu a chuti	Sterilní, neproměnné v obsahu a chuti
Obsahuje neesenciální mastné kyseliny: kyselinu arachidonovou, kyselinu dekosahexaenovou	Až do nedávné doby obsahovala pouze esenciální mastné kyseliny
Vysoký obsah cholesterolu (110 – 140 mg/l)	Nízký obsah cholesterolu (až 3x méně)

Faktory podporující rozvoj nervového systému (hormon štítné žlázy, oligosacharidy, stimulující hormony, růstové faktory, ...)	Žádné hormony nebo růstové faktory
Živé buňky a proteiny s imunoprotektivní funkcí: protilátky, imunoglobuliny, lysozym, laktoferin, peroxidasy	Nevrozené imunoprotektivní vlastnosti
Obsahuje vitaminy a minerály	Obsahuje stejné vitaminy a minerály, často i ve vyšších koncentracích
Obsahuje nečistoty z potravy od matky	Žádné nečistoty, neměnné složení

(Baker et al., 1998; Fuchs et al., 1996; Scariati et al., 1997)

V současné době mezi alternativy mateřského mléka nepatří pouze kojenecká výživa, ale také dárcovské mateřské mléko. Tyto alternativy jsou vhodné pro matky, které nechtějí nebo nemohou kojit.

3.1.2.1.1 Výživa dárcovským mateřským mlékem

Jak již bylo řečeno, mateřské mléko je jedinou fyziologickou potravou pro novorozence a kojence a je doporučeno jako výživa pro všechny děti včetně těch předčasně narozených (McGuire, 2004; Mydlilová, 2006). Jestliže dítě nemůže být z jakýchkoli důvodů kojeno, měla by mu být poskytnuta plnohodnotná náhrada. Z tohoto důvodu začaly po celém světě vznikat banky mateřského mléka (Mydlilová, 2006).

První mléčná banka byla založena ve Vídni již roku 1907 (Mydlilová, 2006). Od té doby se jejich počet rozrostl a tím se zvýšila i možnost nákupu mateřského mléka. Například ve Velké Británii je 17 bank, které dodávají mateřské mléko (Wight, 2001). V České republice se nachází celkem pět bank mateřského mléka a to v Praze, České Lípě, Českých Budějovicích, Hradci Králové a Mostě. Nejstarší bankou v ČR je banka v Hradci Králové, která byla založena roku 1958 (Mydlilová, 2006).

Dárcovské mateřské mléko je alternativní forma mléka, pokud matka nemá svoje mléko k dispozici, nebo ho má nedostatek (Wight, 2001). Názory na výživu dárcovským mateřským mlékem se liší po celém světě. Z řady světových publikací a zkušeností světových bank mateřského mléka (Kanada, USA, Anglie, Francie, Austrálie) vyplývá, že používání mléka z bank hraje důležitou roli v redukci mortality a morbidity u kriticky nemocných a nedonošených dětí (Mydlilová, 2006).

Provoz bank je finančně velmi náročný a to hlavně díky náročnému ošetření mléka a také nezbytnému vyšetření dárcovských matek. Dárkyně musí být zdravá (potvrzení od obvodního či závodního lékaře) a vyšetřena na HIV, HBsAg (proteinový antigen značící probíhající hepatitidu B), BWR (sérologická reakce používaná ke screeningu syfilis), AST, ALT (specifické testy pro stanovení poškození jaterních buněk), výtěry – krk, stolice, vyšetření moče (Rothová, 2012; Mydlilová, 2006).

Výkupní cena mléka je 200 Kč/l a prodejní až 900 Kč/l (Rothová, 2012). Zatímco například ve Francii je činnost mléčné banky dotována státem, VZP produkty mléčných bank ze seznamu hrazeného biologického materiálu v roce 2007 vypustila. Mateřské mléko z banky sice může dítěti předepsat jeho obvodní lékař, ale protože by ho musel hradit ze svého paušálu, tak k tomu v praxi nedochází (Vokurková, 2013).

Prioritu v odběru mléka mají novorozenecká oddělení, ale v případě, že je mléka dostatek je možné prodávat mléko matkám domů (Rothová, 2012). Bohužel poptávka po mateřském mléku značně převyšuje nabídku, a proto se často mléko z banky dostane jen dětem v nemocnici. Pořadník dětí je následující: přednost mají děti nedonošené a nemocné na jednotce resuscitační péče, pak děti na jednotce intenzivní péče, odrůstající nedonošené děti, děti na oddělení fyziologických novorozenců a teprve poté je mléko k dispozici k prodeji matkám. Zájem o koupi mateřského mléka je veliký, dětí je hodně a mléčných bank je pouze pět (Vokurková, 2013).

V důsledku velké poptávky vznikl dokonce i černý trh s mateřským mlékem, v takovémto případě, ženy nabízejí přes internet vlastní mléko, které ale nemusí být ošetřeno a může být zdrojem i potencionálně patogenních bakterií a virů. Neošetřené dárcovské mléko může pro kojence představovat i fatální zdravotní komplikace (Conley, 2010).

Od roku 1987 je v ČR zakázáno dle doporučení WHO (Světová zdravotnická organizace) kojit dítě cizí matkou či krmit dítě cizím neošetřeným mateřským mlékem a prodej mateřského mléka na černém trhu se tak v České Republice stává nelegální (Mydlilová, 2006). Situace s prodejem, popřípadě darováním mateřského mléka ve světě je velmi různá. Například v jiných případech velmi striktní a přísné Spojené státy americké prodej, darování, popřípadě nakupování mateřského mléka nijak neregulují. Mateřské mléko se zde nepovažuje za „tělní tekutinu“ (jako u nás), ale za „potravu“, a proto pro něj platí jiná pravidla než pro krev nebo lidské orgány (Měchurová, 2013). V USA je sdílení mateřského mléka běžnou a dobře zavedenou praxí. V roce 2010 byla v USA založena webová stránka Eats on Feets sloužící právě ke sdílení mateřského mléka mezi matkami (Conley, 2010). V roce 2012

existovalo na sociální síti Facebook více než 170 skupin v 50 státech zabývajících se právě nabídkou a poptávkou po mateřském mléce (Gribble, 2014).

Na prvním celosvětovém kongresu s názvem „Human Milk Banking“ v Hradci králové v roce 1981 byla pasterizační teplota stanovena na 62,5°C po dobu 30 min (Mydlilová, 2006; Orloff et al., 1993; McDougal et al., 1985). Tato teplota bezpečně inaktivuje HIV, CMV. Virus HIV je termolabilní s inaktivací 56°C za 10 min (Eglin and Wilkinson, 1987). To však platí pro virus, který je volně přítomný v extracelulární fázi mléka. Pro virus zabudovaný intracelulárně se doporučuje časový interval prodloužit na 30 min a použít teplotu 62,5°C (Tully et al., 2001). Kromě toho tato teplota ničí i jiné termolabilní viry. Po pasteraci se mléko zchladí na teplotu 4 °C nebo se zmrazí na teplotu – 18 °C. Pokud je mléko pouze zchlazeno, použitelnost je 24 hodin, při zmražení se prodlužuje na 3 měsíce. Tento postup inaktivuje možné viry, ale také ovlivňuje nutriční a imunologické vlastnosti mateřského mléka. Například se odhaduje, že se při tomto procesu zničí 34% imunoglobulinu G (IgG). Nelze předpokládat, že darované mateřské mléko, které je takto upravené, bude mít stejné vlastnosti a hlavně účinek jako vlastní mateřské mléko (Wight, 2001).

Problematika manipulace s kojeneckou výživou a odstříkaným mateřským mlékem je v České Republice právně ukotvena vyhláškou Ministerstva zdravotnictví ČR č. 137/2004 Sb.: Vyhláška o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných, § 46 a 47.

3.1.3 Porovnání mateřského mléka s mléky ostatních savců

Mateřské mléko obsahuje jedinečnou kombinaci složek, která se liší od mlék jiných savců (Tab. 3). Společně s mléky ostatních primátů má nízkou energetickou a výživou hodnotu v porovnání s jinými mléky (Gallagher, 1992).

Mateřské mléko i mléko ostatních savců je bohatým zdrojem bioaktivních oligosacharidů (Hickey, 2012).

Tab. 3 Porovnání složení mateřského mléka s mlékem skotu (Bode, 2013)

	Lidské mléko	Kravné mléko
Proteiny (g/l)	12	35
Tuk (g/l)	35	35
Laktosa (g/l)	65	45
Oligosacharidy (g/l)	5 - 23	0,06
Počet identifikovaných oligosacharidů	100<	<40

% fukosylátů	50 - 80	<1
% sialátů	10 - 20	<70

3.2 Oligosacharidy mateřského mléka

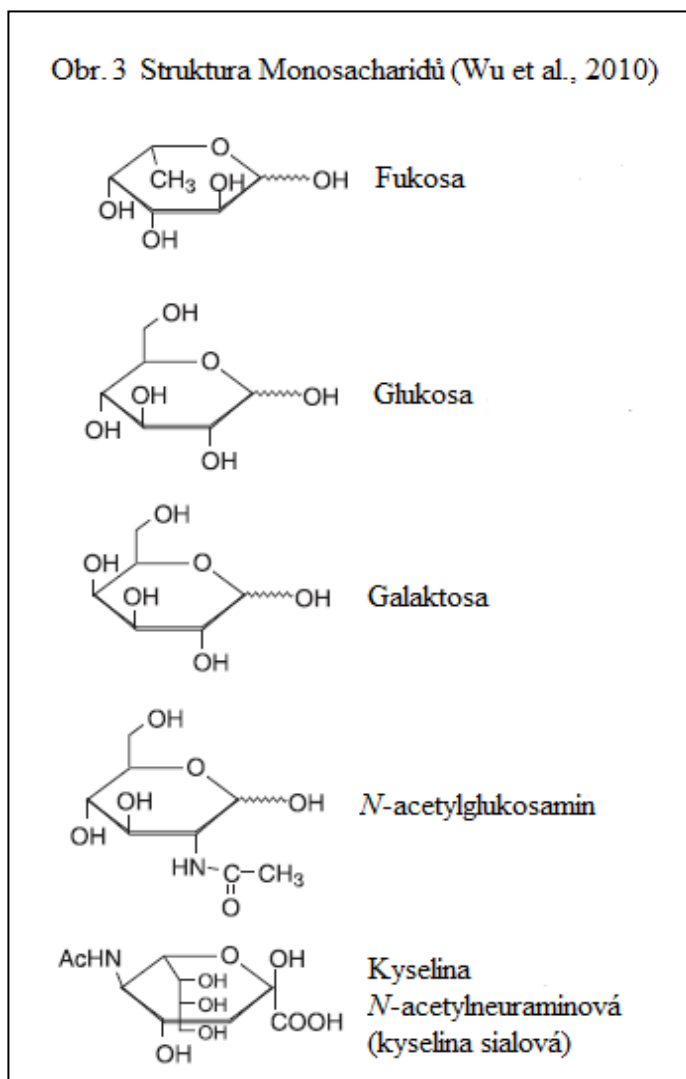
Lidské mléko je velice bohaté na oligosacharidy. V závislosti na období laktace a na jedinci může jejich množství dosáhnout až 23 g/l, toto množství může být totožné nebo i větší, než množství proteinů v mateřském mléce (Coppa et al., 1993; Kuntz et al., 2008). Oligosacharidy mateřského mléka mají velmi odlišnou strukturu od oligosacharidů jiných druhů savců (Kunz et al., 2000; Newburg and Neubauer, 1995).

Jednou z velmi důležitých vlastností oligosacharidů mateřského mléka je jeho prebiotická aktivita, která ovlivňuje střevní mikrobiotu kojence a bifidogenní populaci (Moro, 1900).

3.2.1 Struktura a složení oligosacharidů mateřského mléka

Pojem oligosacharidy mateřského mléka se vztahuje na skupinu různých oligosacharidů v mateřském mléce. Základní stavbu oligosacharidů tvoří D-galaktosa, D-glukosa, L-fukosa, *N*-acetylglukosamin a kyselina *N*-acetylneuraminová (Carlson, 1985; Chaturvedi et al., 1997; Charlwood et al., 1999; Kunz et al., 2000; Kunz et al. 1996). Kombinací kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením bylo identifikováno asi 200 unikátních oligosacharidů s různou strukturou obsahující 3 – 22 mososacharidů. Rozdíl mezi složením oligosacharidů je patrný jak v průběhu laktace, tak i mezi jednotlivými matkami. Mléka náhodně vybraných matek obsahovala 23 až 130 různých oligosacharidů (German et al., 2008).

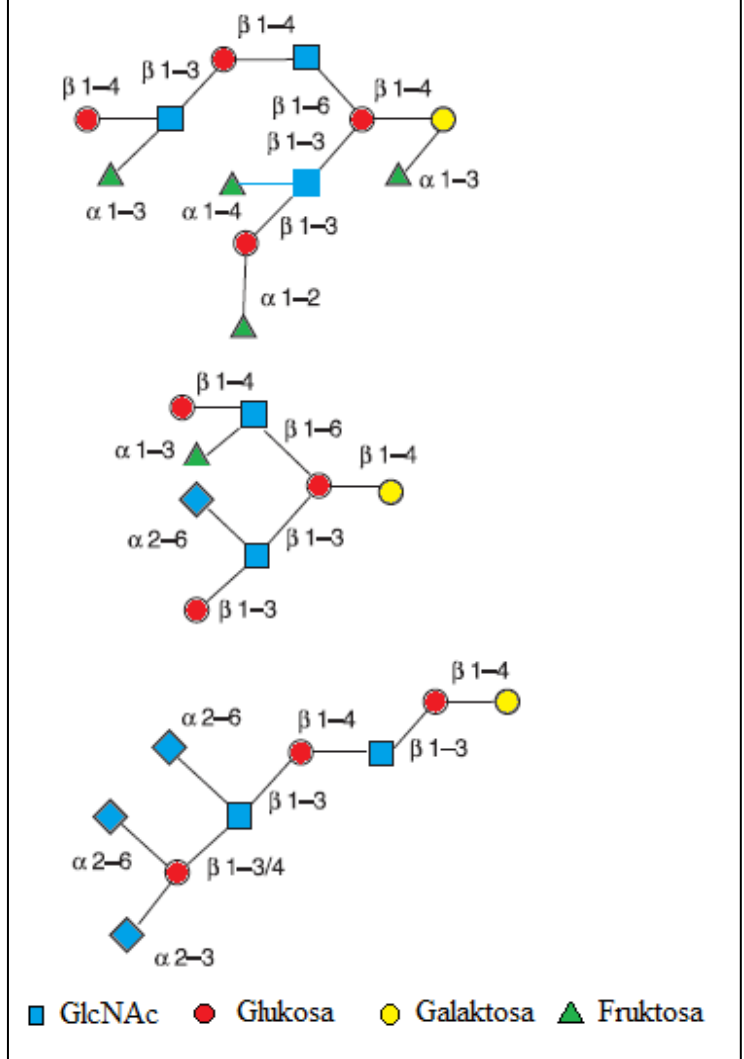
Obr. 3 Struktura Monosacharidů (Wu et al., 2010)



Oligosacharidy mateřského mléka jsou glykany, které se hojně vyskytují v mateřském mléce, ale ne v dětské výživě (Kunz et al., 2000; Kobata, 2010; German et al., 2008; Bode, 2006).

Všechny oligosacharidy mateřského mléka obsahují na svém redukujícím konci disacharid laktosu. *N*-acetyl glukosamin je spojen glukosovým zbytkem vazbou β 1-3, nebo pokud se větví, vazbami β 1-3 a β 1-6. Pokud se vyskytne další galaktosa je navázána glykosidickými vazbami β 1-3 nebo β 1-4 na *N*-acetyl glukosamin. *N*-acetyl glukosamin a galaktosa jsou ve společné formě páteří oligosacharidů mateřského mléka. 70% oligosacharidů mateřského mléka tvoří zbytky fukosy a 20-50% oligosacharidů

Obr. 4 Struktura typických OMM (Wu et al., 2010)



mateřského mléka zbytky kyseliny *N*-acetylneuraminové. Fukosa je spojena s *N*-acetyl glukosaminem nebo galaktosou vazbami α 1-3, α 1-4 nebo výjimečně vazbou α 1-2 na konečné pozici oligosacharidů. Kyselina *N*-acetylneuraminová je spojena vazbami α 2-6 nebo α 2-3 (Coppa et al., 1993; Chaturvedi et al., 2001; Sumiyoshi et al., 2003).

Skladba oligosacharidů mateřského mléka je závislá na sekretorickém a Lewis krevním systému matky (Tab. 4 a 5), které ovlivňují expresi fukosyltransferasy (Egge et al., 1983; Thurl et al., 2010). Na základě těchto systémů je možné rozdělit mateřské mléko do čtyř skupin: Se+Le-, Se-Le+, Se+Le+, Se-Le- (Albrecht et al., 2011; Cappa et al., 2011; Thurl et al., 2010). Tyto rozdíly mohou mít vliv na biologickou funkci mateřského mléka (Newburg et al., 2004). Nejsložitější oligosacharidy obsahují mléka matek se sekrečním komplexem Se+Le+ (Gabielli et al., 2011; Johnson and Watkins, 1992; Kumazaki and Yoshida, 1984).

Fukosylové oligosacharidy mateřského mléka mohou vázat patogeny jako například *Staphylococcus*. Když se tyto sekreční komplexy vyskytují v prsních žlázách, indikují, že i samotné matky s Se+Le+ mohou být svými oligosacharidy mateřského mléka chráněny proti působení patogenů způsobující mastitidy apod. (Lane et al., 2011; Jeurink et al., 2013).

3.2.1.1 Kyselé a neutrální oligosacharidy mateřského mléka

Oligosacharidy mateřského mléka můžeme rozdělit do dvou skupin (Tab. 4 a 5) na neutrální a kyselé oligosacharidy (Boehm et al., 2003; Newburg and Neubauer, 1995).

Kyselé oligosacharidy mateřského mléka

Kyselé oligosacharidy obsahují kyselinu *N*-acetylneuraminovou (kyselinu sialovou) napojenou na galaktosu nebo na zbytek *N*-acetylglukosaminu (Boehm et al., 2004). Sialové oligosacharidy tvoří asi 20% všech oligosacharidů a slouží jako vazebná místa pro specifické patogeny a toxiny (Bode et al., 2004; Varki, 2008). Například *in vitro* studie prokázaly, že kyselé oligosacharidy výrazně snížily vazbu leukocytů na endoteliální buňky, zatím co neutrální oligosacharidy neměly žádný efekt (Bode et al., 2004). Rovněž se předpokládá, že tyto oligosacharidy hrají důležitou roli pro postnatální vývoj mozku (Wang et al., 2003).

Neutrální oligosacharidy mateřského mléka

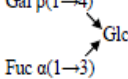
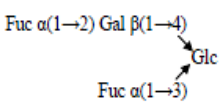
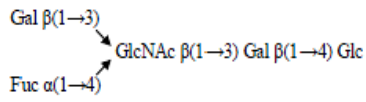
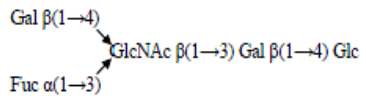
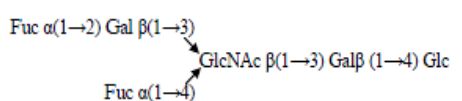
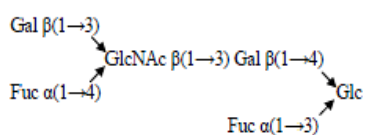
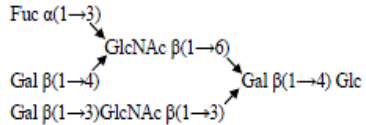
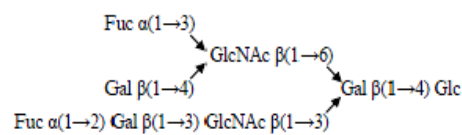
V mateřském mléce je přibližně 80% neutrálních oligosacharidů (Bode et al., 2004). Tyto oligosacharidy obsahují fukosu, která je navázaná na základní molekulu (Boehm et al., 2004). Navázání fukosy vychází ze sekrečního systému matky (Thurl et al., 1997).

Tab. 4 Struktura vybraných kyselých oligosacharidů mateřského mléka

Zkratka	Triviální název	Struktura
3'-SL	3'-sialyllaktosa	Neu5Ac α (2 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc
6'-SL	6'-sialyllaktosa	Neu5Ac α (2 \rightarrow 6) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc
3F3'-SL	Monofukosyl-monosialyllaktosa	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1\rightarrow3) \\ \downarrow \\ \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \end{array}$
3'-SLN	3'-Sialyl- <i>N</i> -acetyllaktosamin	Neu5Ac α (2 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc
6'-SLN	6'-Sialyl- <i>N</i> -acetyllaktosamin	Neu5Ac α (2 \rightarrow 6) Gal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc
LST a	Sialyllakto- <i>N</i> -tetrosa a	Neu5Ac α (2 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 3) GlcNAc β (1 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc
LST b	Sialyllakto- <i>N</i> -tetrosa b	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow6) \\ \downarrow \\ \text{Gal } \beta(1\rightarrow3) \text{ GlcNAc } \beta(1\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \end{array}$
LST c	Sialyllakto- <i>N</i> -tetrosa c	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow6) \\ \downarrow \\ \text{Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ GlcNAc } \beta(1\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \end{array}$
SLNFP-I	Se+ Sialyllakto- <i>N</i> -pentosa I	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow6) \\ \downarrow \\ \text{GlcNAc } \beta(1\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \\ \uparrow \\ \text{Fuc } \alpha(1\rightarrow2) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow3) \end{array}$
SLNFP-II	Le+ Sialyllakto- <i>N</i> -pentosa II	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1\rightarrow4) \\ \downarrow \\ \text{GlcNAc } \beta(1\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \\ \uparrow \\ \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow3) \end{array}$
DSLNT	Disialyllakto- <i>N</i> -tetrosa	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow6) \\ \downarrow \\ \text{Neu5Ac } \alpha(2\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ GlcNAc } \beta(1\rightarrow3) \text{ Gal } \beta(1\rightarrow4) \text{ Glc} \end{array}$

Se+ (sekretor pozitivní), Le+ (Lewis pozitivní), Glc (glukosa), Gal (galaktosa), Fuc (fukosa), GlcNAc (*N*-acetylglukosamin), NeuAc (kyselina *N*-acetylneuraminová) (Musilová et al., 2014)

Tab. 5 Struktury vybraných neutrálních oligosacharidů mateřského mléka

Zkratka	Triviální název	Struktura
Lac	Laktosa	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
2'-FL	Se+ 2'-fukosyllaktosa	Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
3'-FL	3'-fukosyllaktosa	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ 
LDFT	Se+ Laktodifukotetrosa	Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ 
LNT	Lakto-N-tetrosa	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
LN _N T	Lakto-N-neotetrosa	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
LNH	Lakto-N-hexosa	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
	<i>Iso</i> -Lakto-N-oktosa	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
	<i>Iso</i> -Lakto-N-neooktosa	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
	<i>para</i> -Lakto-N-oktosa	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
LNFP-I	Se+ Lakto-N-fukopentosa I	Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc
LNFP-II	Le+ Lakto-N-fukopentosa II	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ 
LNFP-III	Le+ Lakto-N-fukopentosa III	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ 
LNFP-V	Lakto-N-fukopentosa V	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc Fuc $\alpha(1\rightarrow3)$
LDFH-I	Se+Le+ Lakto-N-difukohehexosa I	Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ 
LDFH-II	Le+ Lakto-N-difukohehexosa II	Gal $\beta(1\rightarrow3)$ 
MFLNH-III	Le+ Monofukosyllakto-N-hexosa	Fuc $\alpha(1\rightarrow3)$ 
DFLNHa	Se+Le+ Difukosyllakto-N-hexosa a	Fuc $\alpha(1\rightarrow3)$ 

Se+ (sekretor pozitivní), Le+ (Lewis pozitivní), Glc (glukosa), Gal (galaktosa), Fuc (fukosa), GlcNAc (*N*-acetylglukosamin), NeuAc (kyselina *N*-acetylneuraminová) (Musilová et al., 2014)

3.2.2 Porovnání oligosacharidů s dalšími savčími mléky

Oligosacharidy mateřského mléka hrají pro kojence významnou roli, díky jejich prebiotickým a protizánětlivým vlastnostem jsou pro ně nepostradatelné. Nicméně to neznamená, že mléko farmářských zvířat neobsahuje složky prospěšné pro lidskou výživu (Martinez-Ferez et al., 2006). Mléčné oligosacharidy domestikovaných zvířat mají odlišnou strukturu od oligosacharidů mateřského mléka. Velmi důležité jsou pro kojence fukosylové oligosacharidy, které se ovšem v mléce skotu, ovcí, koz a koní nevyskytují (Finke, 2000).

Nejen že se oligosacharidy liší strukturou, ale také koncentrací. Obsah oligosacharidů v mléku domestikovaných zvířat je výrazně nižší než v mléku mateřském. Například množství oligosacharidů v kolostru skotu je 1 g/l, ve zralém mléku jich je přibližně dvacetkrát méně (Martinez-Ferez et al., 2006; Nakamura et al., 2003). V následující tabulce (Tab. 6) můžeme vidět porovnání množství oligosacharidů u různých druhů savců.

Tab. 6 Oligosacharidy v mléku různých druhů savců

Původ oligosacharidů	Množství oligosacharidů
Člověk	5 – 23 g/l
Skot	0,03 – 0,06 g/l
Koza	0,25 – 0,30 g/l
Ovce	0,02 – 0,04 g/l

(Coppa et al., 1993; Martinez-Ferez et al., 2006)

Obsah fukosylových oligosacharidů domestikovaných zvířat je výrazně nižší než jejich obsah v mateřském mléce. Většinu oligosacharidů v savčím mléku tvoří sialované oligosacharidy, obsahující kyselinu *N*-acetylneuraminovou a kyselinu *N*-glykolylnneuraminovou (Urashima et al., 2001; Urashima et al., 2013).

3.2.3 Vliv oligosacharidů mateřského mléka na zdraví kojence

Lidský gastrointestinální trakt není schopný strávit oligosacharidy mateřského mléka, proto těmto komponentům nemůžeme připisovat žádnou nutriční hodnotu. Nicméně tyto látky jsou třetí nejhojnější složkou mateřského mléka, které dlouhodobě podporuje vývoj, tudíž musí mít důležitou funkci (Zivkovic et al., 2011; German et al., 2008).

Po narození se vyvíjí metabolicky aktivní mikrobiota, která je důležitá pro zdraví kojence a vývoj jeho střevního systému (Kelly et al., 2005; Perez et al., 2007). Oligosacharidy mateřského mléka mají prebiotické účinky a slouží jako zdroj energie a živin pro bakterie ve střevech kojence, avšak kromě jejich prebiotických účinků, je rovněž dokázáno, že působí také jako receptory k potlačení adherence patogenů na povrch epitelu a interagují přímo s imunitními buňkami (Bode et al., 2009).

Oligosacharidy mateřského mléka jsou rezistentní vůči kyselému prostředí žaludku kojence, nepodléhají hydrolýze pankreatu ani enzymům střevního lemu (Gnoth et al., 2000), a proto nedochází k absorbování v gastrointestinálním traktu. Pouze jedno procento oligosacharidů mateřského mléka je absorbováno ve střevě a vyloučeno močí. Zbytek oligosacharidů se dostane do distální části střevního traktu kojence, kde mohou sloužit jako prebiotika. Prebiotická směs selektivně stimuluje růst a aktivitu střevních bakterií, které jsou prospěšné pro zdraví kojence. Nejlépe rostoucí skupina mikroorganismů na oligosacharidech mateřského mléka jsou bifidobakterie (Roberfroid, 2007). Několik *in vitro* studií bylo zaměřeno na vztah oligosacharidů mateřského mléka a bakterií v trávicím traktu kojenců. Zejména na bakterie rodu *Bifidobacterium* (Asakuma et al., 2011; Sela and Mills, 2010; Sela et al., 2008, 2012) a *Lactobacillus* (Schwan et al., 2010; Ward et al., 2006). Za „nejlepšího spotřebitele“ oligosacharidů mezi střevní mikrobiotou je považován *B. longum* subsp. *infantis*. Některé bifidobakterie na oligosacharidech mateřského mléka dobře nerostou, protože nemají dostatečnou enzymatickou výbavu nezbytnou pro utilizaci oligosacharidů (LoCascio et al., 2010).

Oligosacharidy však nepůsobí pouze na trávicí trakt novorozence, ale podílí se i na jeho mentálním vývoji. Studie ukazují, že předčasně narozené děti, které jsou kojeny mateřským mlékem, mají v 18 měsících lepší vývojové skóre a v 7 – 8 letech vyšší IQ. Vývoj mozku je závislý na obsahu gangliosidů a glykoproteinů. Koncentrace těchto látek se v mozku dramaticky zvýší před narozením a pár roků po narození. Postmortální analýza novorozenců ukázala, že koncentrace gangliosidů a glykoproteinů je výrazně vyšší u novorozenců kojených mateřským mlékem (Wang, 2009).

3.2.4 Metody izolace a analýza oligosacharidů mateřského mléka

Mateřské mléko je komplexní směsí biomolekul s překrývajícími se chemickými, fyzikálními a biochemickými vlastnostmi. V současné době ke studiu každé z těchto biomolekul je nutné tyto molekuly izolovat (Ward et al., 2006; Ninonuevo et al., 2005).

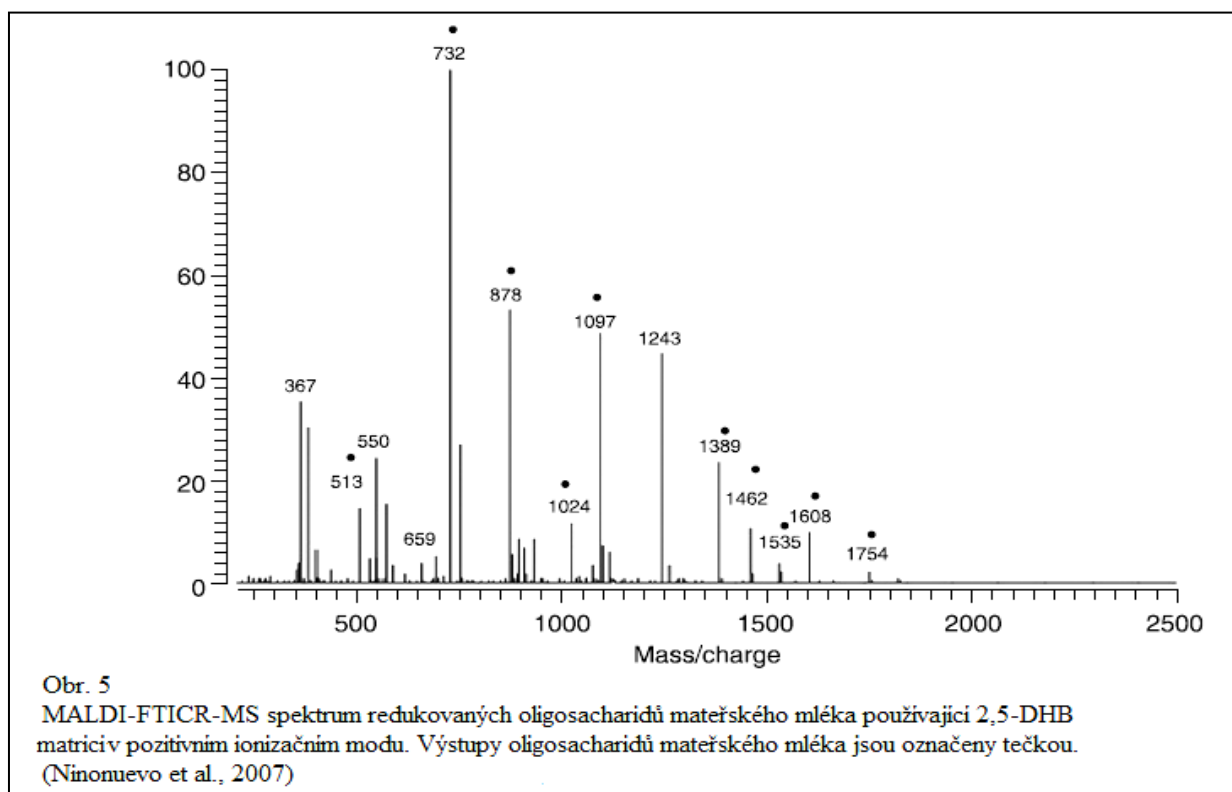
Strukturní rozmanitost oligosacharidů mateřského mléka má původ v odlišnosti umístění a typů vazeb, které jsou formovány stavbou monosacharidů do větších molekul. Tato skutečnost vyžaduje komplexní analytickou strategii pro jejich detailní analýzu. Uvedení spektrometrie umožnilo přesné stanovení složení oligosacharidů mateřského mléka. Spojení separačních technik jako je LC (kapalinová chromatografie) a CE (kapilární elektroforéza) poskytuje ideální analytický nástroj pro přiblížení komplexní směsi oligosacharidů

mateřského mléka. Složení profilů oligosacharidů mateřského mléka dovoluje rychlé stanovení oligosacharidů přítomných ve vzorku (Stahl et al., 1994).

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je poměrně často využívaná fyzikálně chemická metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Je vhodná pro rychlou analýzu oligosacharidů mateřského mléka, ale nemá schopnost rozlišit isometrické struktury. Proto není vhodná pro komplexní analýzu (Ninonuevo et al., 2007).

Principem této metody je vykrystalizování vzorku po smíchání s matricí na MALDI destičce a jeho následné ozáření pulsním laserem. Měření probíhá buď v lineárním nebo v reflekonovém módu (Ninonuevo et al., 2007).



Iontová chromatografie

Iontová chromatografie je analytická metoda vhodná pro rychlé stanovení iontů/kationtů ve směsi. Jejím principem je interakce molekul analytu iontové povahy s povrchem stacionární fáze, která obsahuje iontové funkční skupiny, nesoucí proti analytu opačný náboj. Iontovou chromatografií lze rozdělit do dvou skupin podle náboje analytu na iontovou a kationtovou (Baldrianová, 2011).

Důležitou součástí pro aniontovou analýzu této metody je supresor, který snižuje vodivost pozadí a tím zvyšuje citlivost stanovení. Pro kationtovou analýzu se používají mobilní fáze na

bázi vody a silné minerální kyseliny většinou v kombinaci s organickými kyselinami. V iontové chromatografii je možné použít různé stacionární fáze tvořené organickými a anorganickými materiály. Tyto stacionární fáze nesou funkční skupiny na bázi iontové výměny (Baldrianová, 2011).

Iontová chromatografie byla využita například pro separaci 2'- a 3'-fukosyllaktos, 3'- a 6'-sialyllaktos a lakto-*N*-fukopentos ze vzorků neutrálních a kyselých oligosacharidů mateřského mléka (Tab. 7) (Thurl et al., 1997; Finke et al., 1999; Thurl et al., 2010).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC se řadí mezi nejčastěji používané separační metody a vyniká vysokou účinností. Principem této chromatografie je separace analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná (Ruhaak et al., 2010; Anumula, 2006).

Tato chromatografie je vhodná k úplné nebo částečné separaci různých isomerů z oligosacharidů mateřského mléka (Tab. 7) (Marino et al., 2011).

Chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé vzorky na kolonu. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence. Jako náplň kolon (stacionární fáze) se používají polární nemodifikované adsorbenty, nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se většinou používá voda, organická rozpouštědla a jejich směsi (Anon., 2012; Ruhaak et al., 2010; Anumula, 2006).

Gelová chromatografie

Principem gelové chromatografie je separace molekul na základě molekulové hmotnosti, velikosti a tvaru molekul. Jako stacionární fáze se používá gel v koloně, přes který se velké molekuly eluují dříve než malé molekuly (Barr, 1931). Tato metoda byla prakticky využita v této práci a její princip je rozepsán v metodice práce.

V následující tabulce je přehled separačních metod používaných pro analýzu oligosacharidů mateřského mléka.

Tab. 7 Přehled separačních metod použitých k analýze oligosacharidů mateřského mléka (Ruhaak and Lebrilla, 2013), část 1.

	Separace	Vzorek	Derivatizace	Kolona	Detekce	Separace isomerů	Poznámky
Iontová chromatografie	SCX	Oligo- a monosacharidy z mateřského mléka	-	Aminex HPX 87C	Reflexní index	Separace glukosy a galaktosy	Oligosacharidy nejsou oddělené s výjimkou fukosylaktosy
	HPEAC	OMM, odděleny neutrální a kyselé	-	CarboPac PA-100	Pulzní amperometrická detekce	Separace několika isomerů (2'- a 3'- FL, 3'- a 6'- SL, LNFPs)	Použití soli pro eluci neumožňuje okamžité spojení hmotnostní spektrometrie
	HPEAC	OMM a FOS/GOS směsi	-	CarboPac PA-1	Pulzní amperometrická detekce	Separace několika isomerů (2'- a 3'- FL, 3'- a 6'- SL, LNFPs)	
HPLC	HILIC	BMO, odděleny neutrální a kyselé	Reduktivní aminace použitím 2-AB	TSK-gel amide 80	Fluorescence	Separace několika isomerů	Retenční čas může být srovnán pomocí GU indexu. Strukturální úkol potvrzen pomocí exoglykosidasy a ESI-Q-TOF
	Uhlíková LC	OMM	Redukce	Porézní grafitové úlomky	nESI-TOF	Separace většiny isomerů	Sbíрка založená na hmotnosti a retenčním čase obsahující 74 struktur. Strukturální úkol potvrzen pomocí exoglykosidasy a MALDIFLICR
	RP-LC	Neutrální OMM	Redukce a benzoylace	Rainin C-8	UV (229 nm)	Limitovaná separace isomerů	Eluce většinou na základě zvyšující se molekulární hmotnosti, vazba má menší vliv

část 2.

	RP-LC	Neutrální OMM	PMP deprivatizace a redukce aminace použitím PA	Inertsil ODS-3V a ODS-100Z	UV (245 a 310 nm) pro PMP, jednotlivě	Částečná separace isomerů	Separace byla odlišná pro PMP ve srovnání s PA derivatizací
	RP-LC	Neutrální OMM	Redukce aminace použitím PA	Inertsil ODS-3V	UV (310 nm)	Částečná separace isomerů	
	RP-LC	OMM, odděleny neutrální a kyselá	Redukce aminace použitím 2-AA	TSKgel ODS-100Z	Fluorescence	Separace několika isomerů (2'- a 3'-FL, 3'- a 6'-SL, LNDFHs)	
Elektromigrační separace	MEKC	Sialové OMM	-	-	UV (205 nm)	Separace několika isomerů	Touto mohou být separované pouze sialové OMM
	CE	OMM	Redukce aminace použitím APTS	-	Fluorescence	Separace většiny isomerů	Velmi rychlá separace (10 min). Strukturální úkol potvrzen pomocí ESI-MS-MS

SCX (silná kationtová výměna), MEKC (minerální elektrokinetická chromatografie), FOS (fruktoooligosacharidy), OMM (oligosacharidy mateřského mléka), GOS (galaktoooligosacharidy), BMO (Mléčné oligosacharidy skotu), FL (fukosyllaktosa), GU (glukosové jednotky), LNFP (lacto-N-fukopentosa), SL (sialyllaktosa), LNDFHs (lacto-N-difukohexosa)

4 Materiál a metody

4.1 Izolace oligosacharidů z mateřského mléka

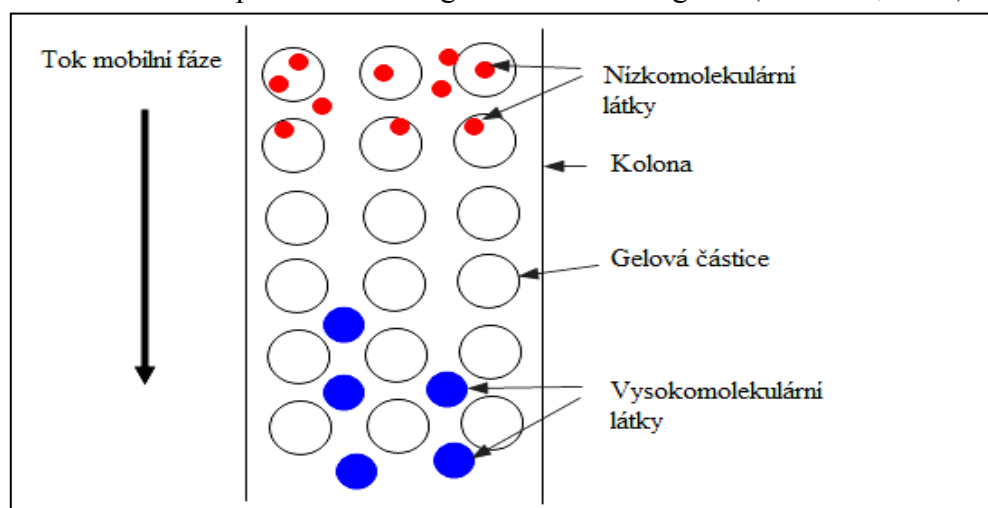
4.1.1 Příprava vzorku

Vzorek mateřského mléka (100 ml) se centrifugoval při 4000 rpm po dobu 30 min a teplotě 4°C. Poté se ihned odstranila horní vrstva tuku a vzorek se nechal lyofilizovat po dobu 24 h do sucha. Po vysušení se do mléka přidalo 75 ml 96% čistého ethanolu a směs se nechala zahustit pod vakuem na objem přibližně 10 ml. Dále se přidal 96% čistý ethanol a destilovaná voda v poměru 2 : 1 (v/v), (60 : 30 ml na 100 ml vzorku mléka) a ponechalo se 12 h při 4°C. Přidáním ethanolu došlo k vysrážení proteinů a po následné centrifugaci k jejich odstranění. Centrifugace probíhala při 4000 rpm po dobu 30 min a teplotě 4°C. Po odstředění se slila směs oligosacharidů, ethanolu a vody do titrační baňky. Zbylé proteiny se zbytky oligosacharidů byly rozpustny v 10 ml destilované vody a opět centrifugovány. Supernatant byl zahuštěn pod vakuem na objem přibližně 8ml. Dále proběhla precipitace směsí 96% čistého ethanolu, dichlormethanu a destilované vody v poměru 7 : 14 : 10 ml (na 100 ml vzorku mléka). Poté opět proběhla centrifugace a po odstranění proteinů a dichlormethanu se směs oligosacharidů odpařila pod vakuem do sucha. Po následném rozpuštění se směs oligosacharidů aplikovala na kolonu (Obr. 10).

4.1.2 Gelová chromatografie

Gelová permeační chromatografie rozděluje molekuly v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. K oddělení molekul se používá stacionární a mobilní fáze, která unáší molekuly a na základě jejich velikostí procházejí stacionární fází (Obr. 6), v tomto případě gelem (Barr, 1931).

Obr. 6 Schéma separace molekul gelovou chromatografií (Tomandl, 2009)



4.1.2.1 Kalibrace a použití kolony

Na separaci frakcí byla použita skleněná kolona o rozměrech 180 x 1,6 cm a objemu 340 ml. Byla naplněna mediem Toyopearl HW-40F (Tosoh Bioscience, Japonsko) (Obr. 12), které slouží jako stacionární fáze. Při plnění kolony je médium vytemperováno na teplotu 60°C a aplikuje se v roztoku 1% (v/v) kyseliny octové, kde se nechá následně usadit. Jako mobilní fáze byla použita 1% (v/v) kyselina octová.

Frakce byly rozdělovány po padesáti kapkách sběračem frakcí Gilson FC 204 Fraction Collector (Gilson, Inc., USA). První frakce vycházejí z kolony po 8 hodinách a poslední přibližně po 20 hodinách.

Pro stanovení času, kdy z kolony vychází první molekuly, se používá VOID. Je to roztok Blue dextranu (Sigma-Aldrich, USA) 5 mg/ml (Obr. 14). Maximální čas průchodu kolonou se stanovuje pomocí 1M NaCl, který je poté stanoven titračně pomocí dusičnanu stříbrného v množství 7 mg/ml.

4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography, TLC) byla využita k následnému rozpoznání separovaných molekul. Frakce byly naneseny v množství 60 µl mikropipetou na TLC destičku Alugram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Německo) (Obr. 10). Jako mobilní fáze byla použita směs isopropanolu, amoniaku a vody v poměru 5 : 1 : 2. Vyvolání proběhlo 15% směsí koncentrované kyseliny sírové v 96% čistém ethanolu a následným zahřátím horkovzdušnou pistolí Steinel HL 2010 E (Steinel Inc., Německo). Frakce byly porovnány se standardy glukosy a laktosy (Obr. 11).

4.1.4 Stanovení proteinů podle Bradfordové

Tato rychlá a přesná metoda pro stanovení proteinů se stala preferovanou v mnoha laboratořích. Principem testu dle Bradfordové je navázání modrého barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na protein, čímž dochází k posunu absorpčního maxima z 464 nm na 595 nm. Vzrůst absorbance při 595 nm může být použit jako měřítko koncentrace bílkovin. K posunu absorpčního maxima dochází velmi rychle (2 - 5 min) a vybarvení je stabilní nejméně jednu hodinu. Aniontová forma barviva, která se váže na protein, se měří při absorbanci 595 nm (Kruger, 1994).

Metoda je vhodná pro všechny proteiny, ačkoliv počet vazeb s barvivem může být proměnlivý v závislosti na obsahu basických aminokyselin v bílkovině. Je proto důležité, aby

standardní roztok bílkoviny měl obdobné složení jako testovaný vzorek. Pro každé stanovení je nutné sestavení kalibrační přímky (Horáková et al., 2003).

Frakce obsahující podle metody TLC oligosacharidy byly podrobeny testu na přítomnost proteinů dle Bradfordové. Množství proteinů ve frakcích udávala intenzita modrého zbarvení. Barevná škála se pohybovala od zelenohnědé až po sytě modrou (Obr. 10). Vzorky byly dále podrobeny měření na spektrofotometru Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko) při absorpční 595 nm a porovnány se standardy lidského sérového albuminu (Sigma-Aldrich, USA). Vybrané frakce, které obsahovaly oligosacharidy a protein v množství menší než 1 µg/ml, byly lyofilizovány a odeslány na analýzu. Část z nich byla následně použita k dalším testům na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky.

4.2 Analýza oligosacharidů mateřského mléka

Izolované směsi oligosacharidů byly poslány k analýze do Curychu, na institut „Food, Nutrition and Health“ ve Švýcarsku. Tato analýza probíhala na přístroji ICS-3000 Ion Chromatography system od výrobce Thermo Scientific Dionex (USA).

4.3 Vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica 12 (StatSoft Inc., ČR).

5 Výsledky

5.1 Izolace oligosacharidů z mateřského mléka

Oligosacharidy mateřského mléka byly izolovány pomocí gelové permeační chromatografie z celkově 3 vzorků mateřského mléka. U všech vzorků rozdělených pomocí gelové chromatografie byly identifikovány frakce, které po provedení tenkovrstvé chromatografie (Obr. 9) a následnému testu na přítomnost proteinů dle Bradfordové (Obr. 10) obsahovaly pouze oligosacharidy a proteiny v množství menším než 1 $\mu\text{g/ml}$, což je detekční limit testu dle Bradfordové. Následně byly frakce lyofilizovány a zváženy.

Tab. 8 Přehled izolovaných vzorků

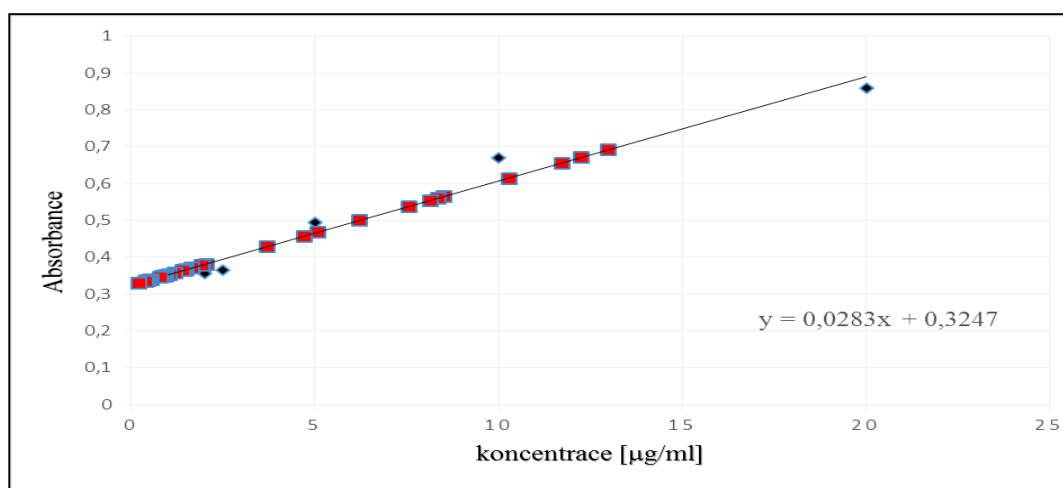
Vzorek	V (ml)	Teoretické množství OMM (mg)	Izolované OMM (mg)
GRD	125	1500	41
KV	85	1020	30
Směs	120	1440	45

Dle dvouvýběrového T-testu jsme zjistili, že na 5% hladině významnosti jsme izolovali z mateřského mléka statisticky významně méně oligosacharidů ($P < 0,002$), než uvádí odborná literatura (12 – 13 g/l).

5.1.1 Sestrojení kalibrační přímky

Na základě známé koncentrace a absorbance standardů lze sestavit kalibrační přímku a zjistit tak, jaká je koncentrace proteinů ve vzorku. Z následujícího grafu jsou patrné koncentrace proteinů ve vzorku GRG.

Obr. 7 Kalibrační křivka pro stanovení proteinů ve vzorku GRG



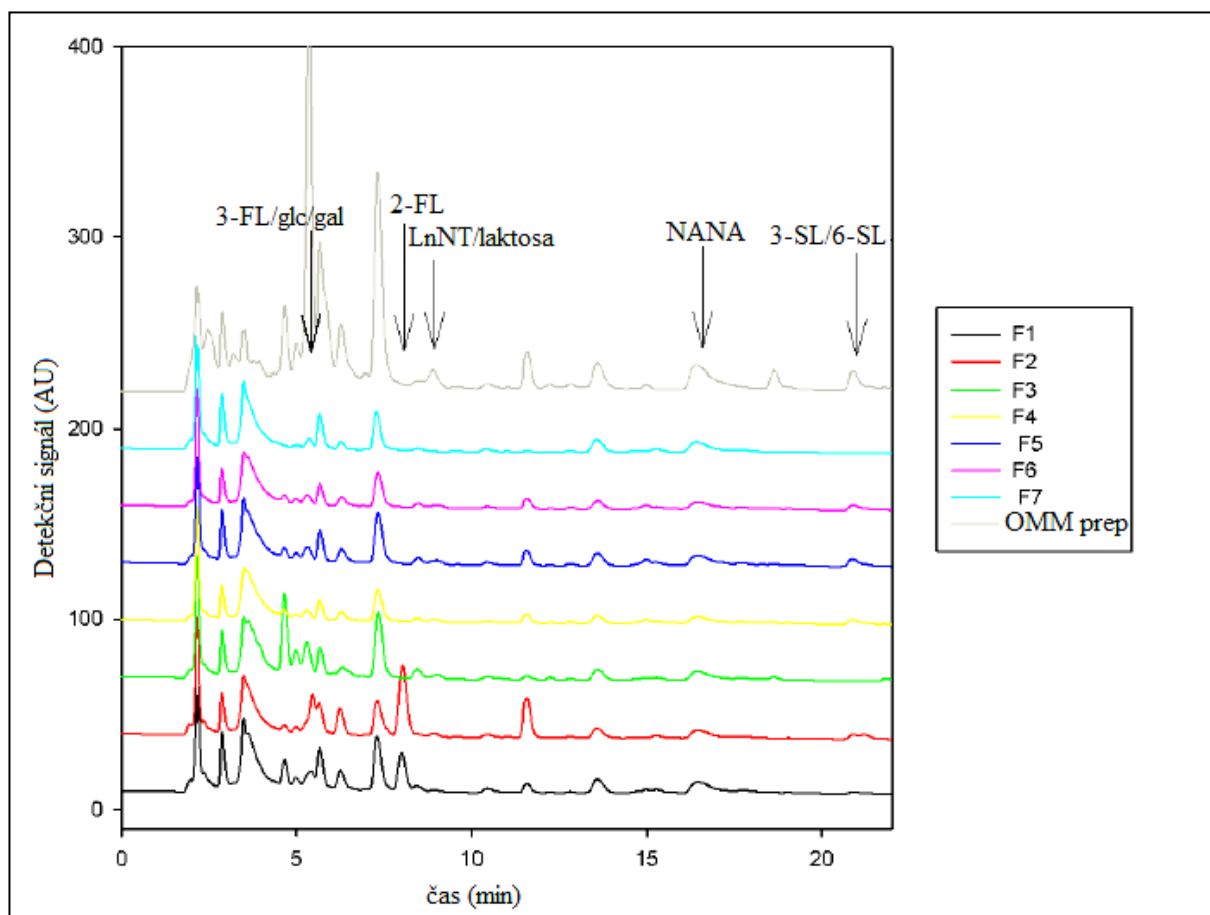
5.2 Kvalitativní analýza oligosacharidů mateřského mléka

Izolované oligosacharidy mateřského mléka byly podrobeny kvalitativní analýze. Díky ní můžeme porovnat frakce (F1 – 7) s médiem a zjistit tak, ze kterých složek se skládají (Obr. 8). Šedá křivka představuje médium o známém složení, podle kterého můžeme určit zvolené frakce. Šípkami jsou znázorněna místa, která představují určitou složku.

V médiu jsou známy tyto složky: 3-FL/glc/gal (3'-fukosyllaktosa/glukosa/galaktosa); LnNT (lakto-*N*-neotetrosa)/laktosa; NANA (kyselina *N*-acetylneuraminová); 3-SL/6-SL (3'-sialyllaktosa/ 6'-sialyllaktosa), které byly při metodě použity jako standardy.

Z analyzovaných složek frakcí byly izolovány a identifikovány 3 druhy oligosacharidů kyselých (NANA, 3-SL, 6-SL) a 2 druhy oligosacharidů neutrálních (3-FL, LnNT), které jsou vyznačené i v Tab. 4 a 5.

Obr. 8 Výsledná analýza oligosacharidů mateřského mléka



6 Diskuse

6.1 Izolace oligosacharidů mateřského mléka

Všechny vzorky, které se využily k separaci oligosacharidů mateřského mléka, oligosacharidy obsahovaly. K separaci se používala metoda gelové chromatografie, která však byla časově velmi náročná a na množství získaných oligosacharidů neefektivní. I přes tyto nedostatky je pracoviště ČZU jediné v České republice, které se zabývá izolací oligosacharidů mateřského mléka. Přestože byly dodrženy všechny postupy, bylo třeba u vzorků opakovat separaci na koloně gelové chromatografie. Vybrané frakce obsahovaly pouze oligosacharidy a nepatrné množství proteinů (méně než 1 µg/ml), tedy množství, které již není schopno detekovat pomocí testu dle Bradfordové. K významným ztrátám oligosacharidů mohlo dojít při jejich separaci, mohly být nechtěně odstraněny spolu s proteiny. Na základě těchto zjištění, lze metodu považovat spíše za kvalitativní, než kvantitativní.

6.2 Kvalitativní analýza mateřského mléka

Díky analýze oligosacharidů mateřského mléka by bylo možné například vybrat co nejvhodnější probiotika na základě specifity bifidogenní mikrobioty kojence. V některých studiích bylo zjištěno, že některé kmeny bifidobakterií dávají přednost fukosylovaným oligosacharidům oproti sialovým a naopak (Locascio et al., 2007).

Lepší znalost oligosacharidů mateřského mléka povede k jejich bližší specifikaci významu pro kojence a usnadní tak další rozvoj ve výrobě umělé počáteční výživy co nejvíce podobné mateřskému mléku (Isailovic et al., 2008).

6.3 Využití analýzy oligosacharidů mateřského mléka v praxi

Oligosacharidy mateřského mléka jsou velmi důležité zejména díky jejich vlivu na kojence a to hlavně na jeho trávicí trakt, imunitní systém a v neposlední řadě na správný mentální vývoj (Wang, 2009; Bode et al., 2009).

Jak již bylo v práci zmíněno, mateřské mléko je nejpřirozenější a nejvhodnější stravou pro kojence (McGuire, 2004). Díky svému složení, dodává kojenci komplexní přísun živin pro jeho správný vývoj a růst. Mateřské mléko je velmi důležité pro kojence v prvních týdnech a měsících života, kdy ještě není zcela vyvinut jeho imunitní systém a to zejména pro děti předčasně narozené (Bode et al., 2009).

Je důležité si uvědomit, že mateřská mléka nejsou všechna stejná. Jejich složení je rozdílné v období laktace a také mezi samotnými matkami. Velmi záleží na jejich životním stylu a

výživě, ale také na faktorech, které nemohou ovlivnit a jsou geneticky podmíněné, jako například sekreční skupina (Coppa et al., 2011). A právě sekreční skupina ovlivňuje složení a výskyt oligosacharidů v mateřském mléce. Mateřské mléko můžeme rozdělit na čtyři skupiny podle sekretorického a Lewis krevního systému matky (Se+Le+, Se-Le-, Se+Le-, Se-Le+), které ovlivňují expresi fukosyltransferasy. Pokud jsou přítomné oba tyto faktory, v mateřském mléce se vyskytují nejsložitější a specifické oligosacharidy. Až u 70% žen se tyto faktory vyskytují, což znamená, že jejich mléko obsahuje charakteristické α 1-2-fukosylové oligosacharidy, jako jsou fukosyllaktosa nebo lakto-*N*-fukopentosa (Tab. 4 a 5). Mléko „nesekrektorické“ neobsahuje tyto specifické oligosacharidy a kojenci krmení tímto mlékem jsou náchylnější k průjmům způsobeným virovými a bakteriálními infekcemi (Stahl et al., 2001; Morrow et al., 2004).

Ovšem ne všechny matky mají možnost krmit děti, svým vlastním mateřským mlékem. Existuje několik způsobů, jak tuto tekutinu nahradit a dopřát tak dítěti vyvážený přísun živin. A právě kvůli těmto náhražkám je důležité pochopit složení a význam oligosacharidů mateřského mléka, což nám umožní lepší metody izolace a analýzy oligosacharidů. Na základě lepší detekce a analýzy oligosacharidů je možné zdokonalovat složení umělých výživ a také možná v budoucnosti vybrat v bankách mateřských mlék nejvhodnější a nejvíce podobné mléko, které by kojeneček dostal od své matky, pokud by mohl být kojen.

Mléka z banky jsou mnohem lepší alternativou, než mléka umělá, ale jejich nevýhodou je to, že se ve složení mohou od vlastního mléka matky velmi lišit (Stahl et al., 2001). Tomu by mohla napomoci analýza oligosacharidů mateřského mléka. Na jejím základě by se mohlo lépe zjistit složení mléka a to by znamenalo přirozenější výživu pro kojence. Zároveň by se měl brát v potaz věk kojence a tomu by mělo odpovídat složení mléka z daného období laktace. To všechno by však mohlo mít za následek zvýšení ceny a větší nedostupnost mléka v bankách. Již v dnešní době existují černé trhy s mateřským mlékem a tato skutečnost by to ještě více podpořila (Rothová, 2012; Conley, 2010). Černý trh s sebou nese spoustu rizik (Keim et al., 2013). Nepasterované nebo špatně pasterované mléko může obsahovat potenciální virální a bakteriální patogeny (např. HIV, CMV apod.) a navíc není znám celkový zdravotní stav „dárkyně“ a hygienické podmínky, ve kterých bylo mléko skladováno (Conley, 2010).

Banky mateřského mléka nejsou pouze ve vyspělých zemích, ale i v zemích rozvojových. V roce 1985 byla založena nezisková organizace pro podporu těchto mléčných bank. Ovšem zejména v rozvojových zemích se musí klást důraz na ošetření a zdravotní nezávadnost mléka z důvodu vysokého množství nemocných žen virem HIV (Jones 2003). Pasterace mateřského

mléka se nepoužívá pouze u mlék v mléčných bankách. V rozvojových zemích se doporučuje pasterace matkám, které jsou schopny kojit, ale jsou nakaženy virem HIV. Tím se jejich mléko stává pro kojence neškodné a je zároveň mnohem levnější a vhodnější alternativou než jsou umělé kojenecké výživy (De Cock et al., 2000).

7 Závěr

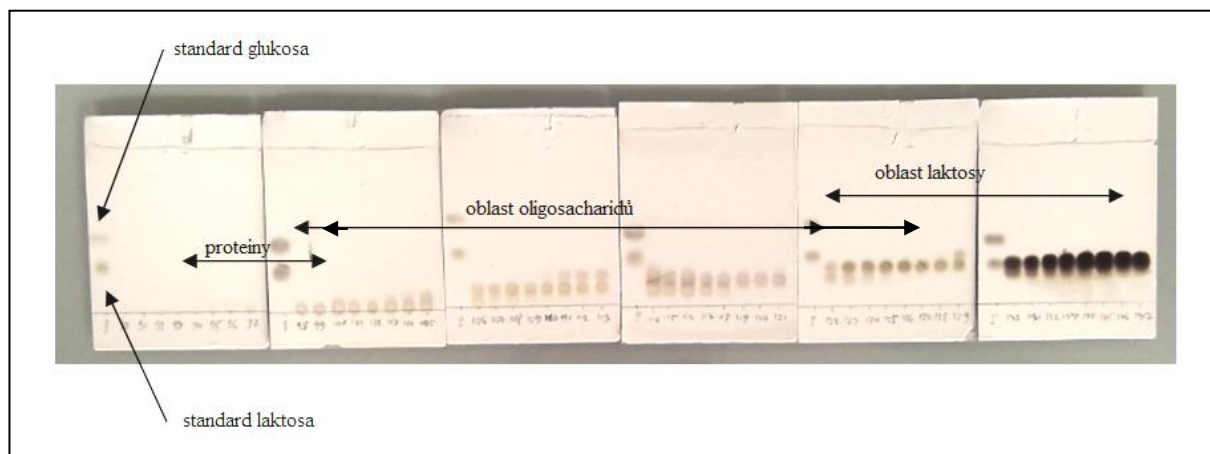
Izolace oligosacharidů mateřského mléka proběhla pomocí metody obsahující několik částí: gelovou permeační chromatografií, tenkovrstvou chromatografií a následný test pro stanovení proteinů dle Bradfordové. Díky této metodě se podařilo izolovat frakce obsahující pouze oligosacharidy s nepatrným množstvím proteinů (méně než 1 µg/ml), což je množství, které test dle Bradfordové není schopný detekovat. Vzhledem k malému množství a kvalitě izolovaných oligosacharidů lze tuto metodu považovat za spíše kvalitativní, než kvantitativní. Vybrané izolované frakce byly poslány ke kvalitativní analýze do Švýcarska, kde byly identifikovány některé druhy oligosacharidů mateřského mléka.

To, že je mateřské mléko považováno za nejvhodnější výživu pro kojence, je i díky přítomnosti oligosacharidů. Přispívají ke správnému vývoji a růstu dítěte a právě jejich znalost může významně přispět k lepšímu vývoji umělých kojeneckých výživ. Známé složení oligosacharidů mateřského mléka by také mohlo vést ke vhodnému výběru mlék z mléčných bank na základě specifity bifidogenní populace v trávicím traktu kojence.

To všechno by v budoucnu mohlo pomoci matkám, které nemohou své děti kojit, ale chtějí mu zajistit vše potřebné pro jeho zdravý růst.

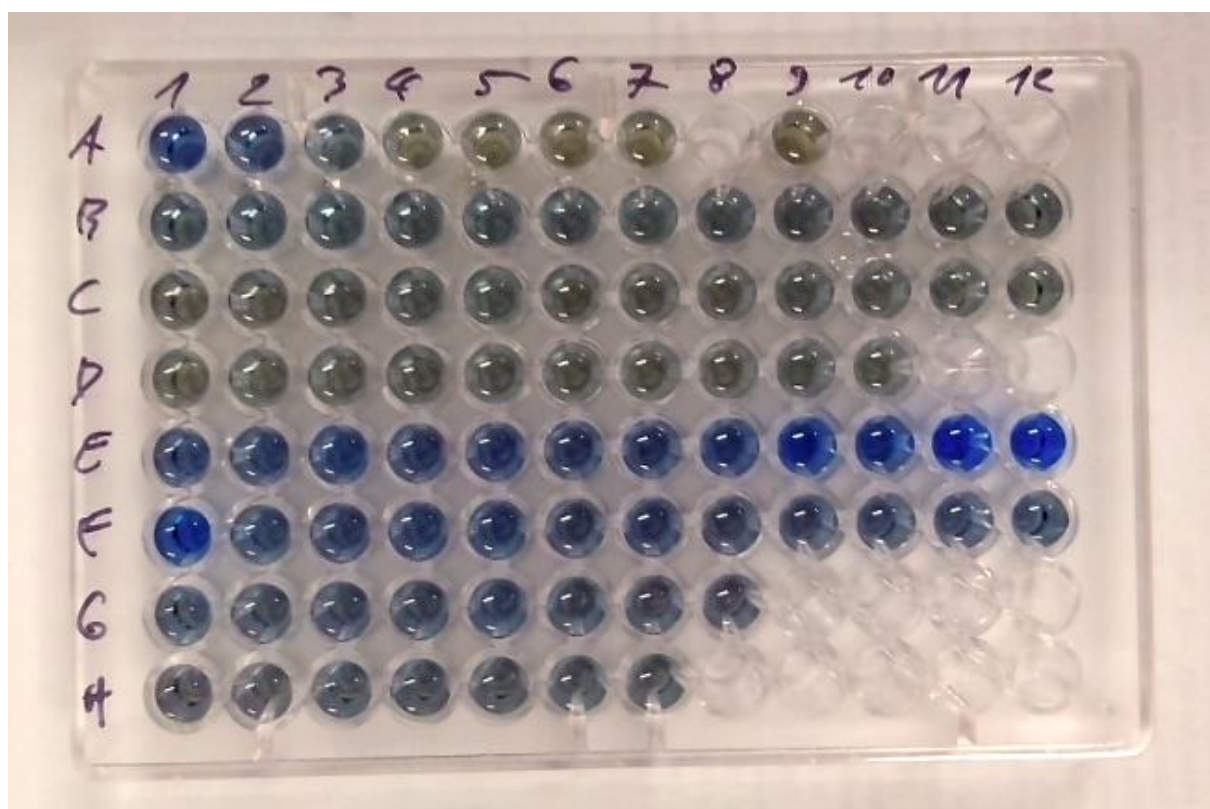
8 Přílohy

Obr. 9 Výsledek tenkovrstvé chromatografie (TLC)



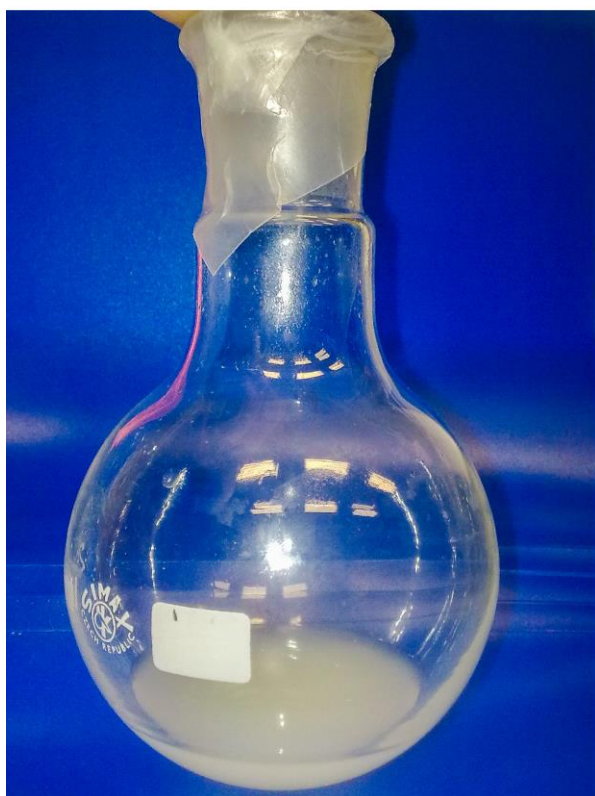
Frakce 90 – 144, frakce 103 – 138 obsahují oligosacharidy. U některých frakcí se oblasti překrývají.

Obr. 10 Výsledek testu dle Bradfordové



A1 (standard 1, $c = 20 \mu\text{g/ml}$), A2 (standard 2, $c = 10 \mu\text{g/ml}$), A3 (standard 3, $c = 5 \mu\text{g/ml}$),
A4 (standard 4, $c = 2,5 \mu\text{g/ml}$), A5 (standard 5, $c = 2 \mu\text{g/ml}$), A6 (standard 6, $c = 1 \mu\text{g/ml}$),
A7 (standard 7, $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$), A9 (BLANK)
B - D (vzorek OMM č. 1), E - G (vzorek OMM č. 2), H (vzorek OMM č. 3)

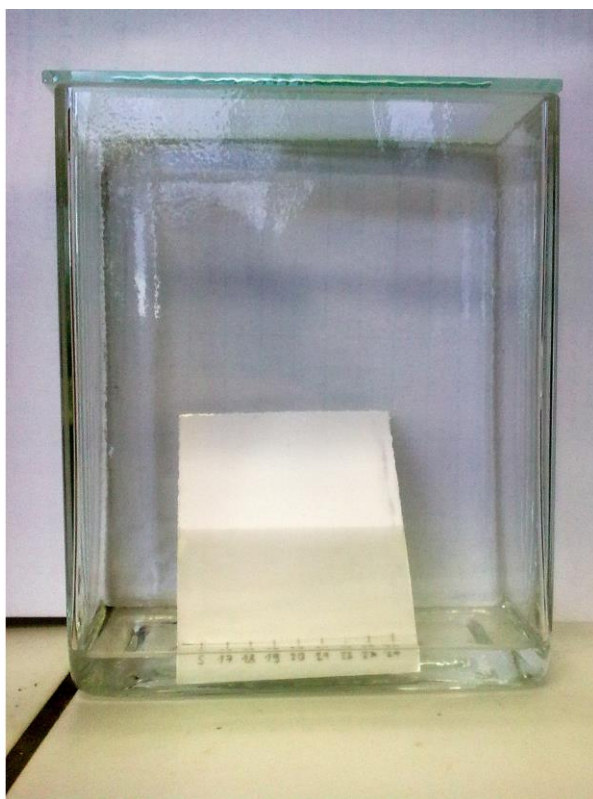
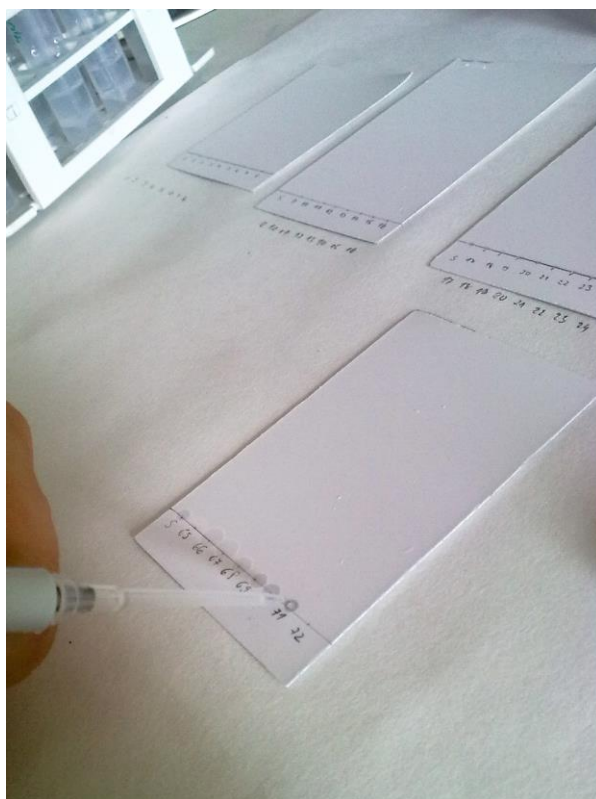
Obr. 11 OMM před nanesením na kolonu



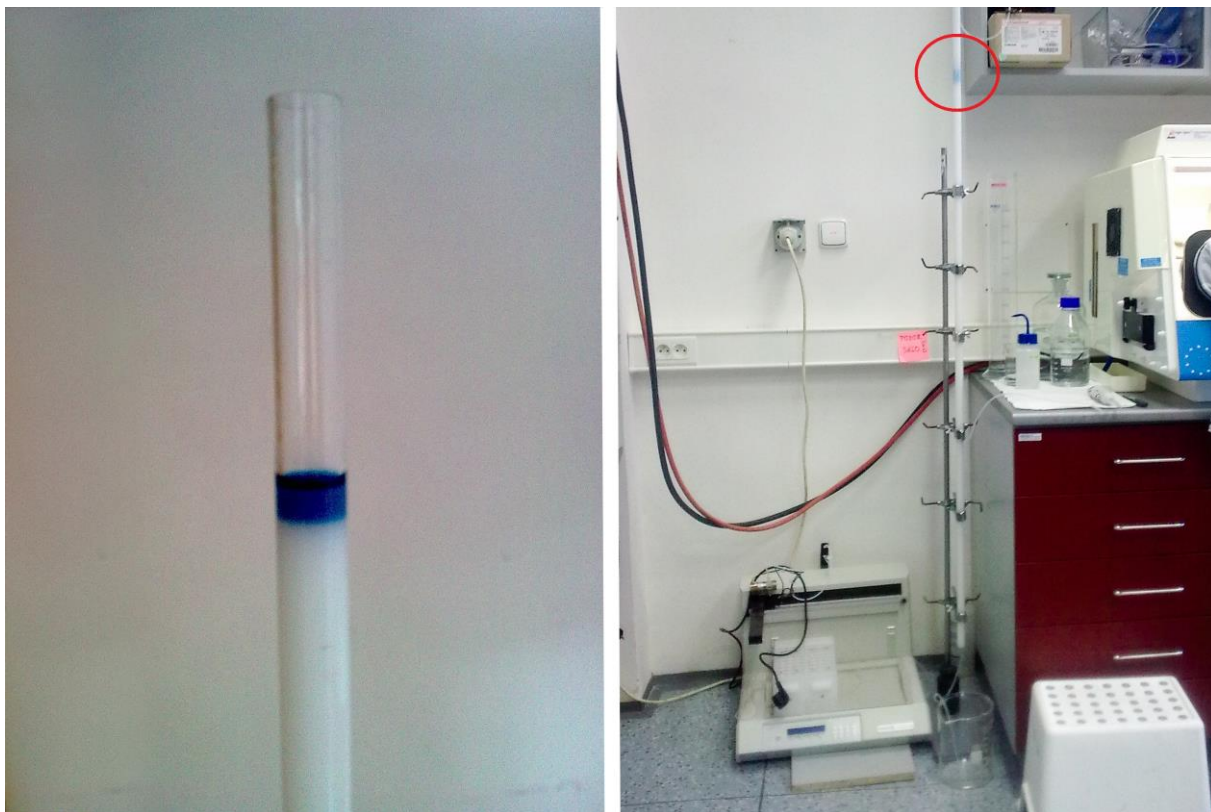
Obr. 12 Medium Toyopearl HW-40F



Obr. 13 Naneseí frakcí na TLC destičku a následné vložení do mobilní fáze



Obr. 14 Nanesený Blue dextran a měření VOIDU



9 Seznam Literatury

- Albrecht, S.**, Schols, H.A., Van den Heuvel, E.G., Voragen, A.G. and Gruppen, H., 2011. Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydrate Research*, 346(16): 2540-2550.
- Allen, L.H.**, 2012. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3 (3): 362–369.
- Anonim**, 2012. HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Online 31. 1. 2015. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>.
- Anumula, K.R.**, 2006. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 350(1): 1–23.
- Asakuma, S.**, Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., Kitaoka, M., 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40): 34583-34592.
- Baker, D.**, Taylor, H., Henderson, J. 1998. Inequality in infant morbidity: causes and consequences in England in the 1990s. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 52(7): 451-458.
- Baldrianová, L.**, Barath, P., 2011. Ionová chromatografie na profesionální úrovni. *Chemagazín*, 11(6): 10-11.
- Banapurmath, C.R.**, Banapurmath, S., Kesaree, N., 1996. Developing brain and breastfeeding. *Indian Pediatrics*, 33: 35-38.
- Barr, G.**, Bingham, E.C., 1931. A monograph of viscometry. *Journal of Rheology* (1929-1932), 2(2): 236-237.
- Barrie, H.**, Martin, E., Ansell, C., 1975. Milk for babies. *The Lancet*, 305(7920): 1330-1331.
- Bode, L.**, 2006. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *The Journal of nutrition*, 136(8): 2127–2130.
- Bode, L.**, 2009. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews*, 67(2): 183-191.
- Bode, L.**, 2013., Human milk oligosaccharide and their beneficial effects. In: Zibadi, S., Watson, R.R., Preedy, V.R., *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Wageningen Academic Publisher. The Netherlands. 515-531. ISBN 978-90-8686-209-2.

- Bode, L.**, Kunz, C., Muhly-Reinholz, M., Mayer, K., Seeger, W., Rudolf, S., 2004. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost*, 92(6): 1402–1410.
- Boehm, G.**, Stahl, B., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., 2003. Oligosaccharides. *Functional dairy products*, 203–243.
- Boehm, G.**, Jelinek, J., Stahl, B., Van Laere, K., Knol, J., Fanaro, S., Moro, G., Vigi, V., 2004. Prebiotics in infant Formulas. *Journal of clinical gastroenterology*, 38: 76-79.
- Brandtzeag, P.**, 2003. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, 21(24): 3382-3388.
- Carlson, S.E.**, 1985. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *The American journal of clinical nutrition*, 41(4): 720-726.
- Castellote, C.**, Casillas, R., Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F.J., Castell, M., Moretones, M.G., Lopez-Sabater, M.C., Franch, A., 2011. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of nutrition*, 141(6): 1181–1187.
- Conley, M.**, 2010. December 6. USDA weighs in on breast milk sharing. ABC News.
- Cleary, T.G.**, 2004. Human milk protective mechanisms. In: Pickering, K.L., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Schanler, R., *Protecting Infants through Human Milk*. Experimental Medicine and Biology. USA. 145-154. ISBN 0-306-48588-5.
- Coppa, G.V.**, Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., Giorgi, P.L., 1993. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*, 91(3): 637-641.
- Coppa, G.V.**, Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Ficcadenti, A., Padella, L., Santoro, L., Soldi, S., Carlucci, A., Bertino, E., 2011. Oligosaccharides in 4 different milk groups, bifidobacteria, and *Ruminococcus obeum*. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 53(1): 80-87.
- Česko. Vyhláška č. 137** ze dne 17. 3. 2004 o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných. In: *Sbírka zákonů České Republiky*. 2004. částka 45. s. 1914. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-137-2004-sb-o-hygienickych-pozadavcich-na-stravovaci-sluzby-a-o-zasadach-osobni-a-provozni-hygieny-pri-cinnostech-epidemiologicky-zavaznych>.
- Daniels, M.C.**, Adair, L.S., 2005. Breast-feeding influences cognitive development in Filipino children. *The Journal of nutrition*, 135(11): 2589–2595.
- Davis, D.T.**, Holt, C., Christie, W.W., Mephram, T.B., 1983. The composition of milk. *Biochemistry and lactation*, 71-117.

- De Cock, K.M.**, Fowler, M.G., Mercier, E., de Vincenzi, I., Saba, J., Hoff, E., Shaffer, N., 2000. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *Jama*, 283(9): 1175-1182.
- Egge, H.**, Dell, A., Von Nicolai, H., 1983. Fucose containing oligosaccharides from human milk. I. Separation and identification of new constituents. *Archives of biochemistry and biophysics*, 224(1): 235-253.
- Eglin, R.P.**, Wilkinson, A.R., 1987. HIV infection and pasterisation of breast milk. *The Lancet*, 329(8541): 1093.
- Field, C.J.**, 2005. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of nutrition*, 135(1): 1-4.
- Finke, B.**, 2000. Isolierung und Charakterisierung von Oligosacchariden aus humanen und tierischen Milchen. Shaker. Germany. 145. ISBN 3-8265-7224-6
- Finke, B.**, Stahl, B., Pfenninger, A., Karas, M., Daniel, H., Sawatzki, G., 1999. Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. *Analytical Chemistry*, 71(17): 3755–3762.
- Frühauf, P.**, 2009. Poučení z mateřského mléka. Online 31. 1. 2015. Dostupné z: http://www.internimediceina.cz/incpdfs/act-000059-0001_10_2.pdf.
- Fuchs, S.C.**, Victora, C.G., Martines, J. 1996. Case-control study of risk of dehydrating diarrhoea in infants in vulnerable period after full weaning. *British Medical Journal*, 313(7054): 391-394.
- Gabrielli, O.**, Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C. Coppa, G.V., 2011. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, 128(6): 1520-1531.
- Gallagher, W.**, 1992. The motherless child. *Sciences-New York*, 32(4): 12-15.
- Garofalo, R.**, 2010. Cytokines in human milk. *The Journal of pediatrics*, 156(2): 36–40.
- German, J.B.**, Freeman, S.L., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. In Nestle Nutrition workshop series. *Pediatric programme*, 62: 205–222.
- German, J.B.**, Dillard, C.J., Ward, R.E., 2002. Bioactive components in milk. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(6): 653–658.
- Gnoth, M.J.**, Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S., 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *The Journal of nutrition*, 130(12): 3014-3020.

- Greer, F.R.**, 2001. Do breastfed infants need supplemental vitamins?. *Pediatric Clinics of North America*, 48(2): 415–423.
- Gribble, K.D.**, 2014. Perception and management of risk in Internet based peer-to-peer milk-sharing. *Early Child Development and Care*, 184(1): 84-98.
- Hanson, L.A.**, Korotkova, M., Lundin, S., Haversen, L., Silfverdal, S.A., Mattsby-Baltzer, I., Strandvik, B., Telemo, E., 2003. The transfer of immunity from mother to child. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 987(1): 199-206.
- Harmsen, H.J.M.**, Wildeboer–Velloo, A.C., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., Welling, G.W., 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(1): 61–67.
- Henderson, J.J.**, Hartmann, P.E., Newnham, J.P., Simmer, K., 2008. Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics*, 121(1): 92–100.
- Hickey, R.M.**, 2012. The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *International Dairy Journal*, 22(2): 141–146.
- Horáková, D.**, Němec, M., Szostková, M., 2003. Laboratorní cvičení z fyziologie. Online 25. 2. 2015. Dostupné z: http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf.
- Charlwood, J.**, Tolson, D., Dwek, M., Camilleri, P., 1999. A detailed analysis of neutral and acidic carbohydrates in human milk. *Analytical Biochemistry*, 273(2): 261-277.
- Chaturvedi, P.**, Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L.K., Newburg, D.S., 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 11(5): 365-372.
- Chaturvedi, P.**, Warren, C.D., RuizPalacios, G.M., Pickering, L.K., Newburg, D.S., 1997. Milk oligosaccharide profiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. *Analytical Biochemistry*, 251(1): 89-97.
- Isailovic, D.**, Kurulugama, R.T., Plasencia, M.D., Stokes, S.T., Kyselova, Z., Goldman, R., Clemmer, D.E., 2008. Profiling of human serum glycans associated with liver cancer and cirrhosis by IMS-MS. *Journal of proteome research*, 7(3): 1109–1117.
- Janness, R.**, 1979. The composition of human milk. *Semin Perinatol*, 3(3): 225-239.
- Jeurink, P.**, Van Bergenhenegouwen, J., Jimenez, E., Knippels, L., Fernandez, L., Garssen, J., Knol, J., Rodriguez, J., Martin, R., 2013. Human milk: A source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4(1): 17-30.

- Johnson, P.H.**, Watkins, W.M., 1992. Purification of the Lewis blood-group gene associated α -3/4-fucosyltransferase from human milk: An enzyme transferring fucose primarily to Type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconjugate Journal*, 9(5): 241-249.
- Jones, F.**, 2003. History of North American donor milk banking: One hundred years of progress. *Journal of Human Lactation*, 19(3): 313-318.
- Keim, S.**, Hogan, J.S., McNamara, K.A., Gudimetla, V., Dillon, C.E., Kwiek, J.J., Geraghty, S.R., 2013. Microbial contamination of human milk purchased via the internet. *Pediatrics*, 132(5): 1227-1235.
- Kelly, D.**, Conway, S., Aminov, R., 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in immunology*, 26(6): 326–333.
- Kobata, A.**, 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 86(7): 731–47.
- Kramer, M.S.**, Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R.W., Matush, L., Igumnov, S., Fombonne, E., Bogdanovich, N., Ducruet, T., 2008. Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Archives of General Psychiatry*, 65(5): 578-584.
- Kruger, N.J.**, 1994. The Bradford method for protei quantitation. In: Walker, J.M., *Basic protein and peptide protocols*. Humana Press. USA. 32: 9-15. ISBN 978-0-89603-268-2.
- Kulski, J.K.**, Hartmann, P.E., 1981. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *The Australian journal of experimantal biology and medical science*, 59(1): 101–114.
- Kumazaki, T.**, Yoshida, A., 1984. Biochemical evidence that sector gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81(13): 4193-4197.
- Kuntz, S.**, Rudloff, S., Kunz, C., 2008. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *British Journal of Nutrition*, 99(3): 462-471.
- Kunz, C.**, Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S., 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual review of nutrition*, 20(1): 699-722.
- Kunz, C.**, Rudloff, S., Hintelmann, A., Pohlentz, G., Egge, H., 1996. High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *Journal of Chromatography B: Biochemical Sciences and Applications*, 685(2): 211-221.

- Kunz, C.**, Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., Jensen, R., 1999. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clinics in perinatology*, 26(2): 307-333.
- Kyunghun, J.**, Vi, N., Jaehan, K., 2012. Human milk oligosaccharides: the novel modulator of intestinal microbiota. *BMB Reports*, 45(8): 433-441.
- Labusová, E.**, 2008. Rozdíly mezi kojením a umělou výživou. Online 31. 1. 2015. Dostupné z: http://www.evalabusova.cz/clanky/rozdily_mezi.php.
- Lane, J.A.**, Mehra, R.K., Carrington, S.D., Hickey, R.M., 2011. Development of biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides. *Analytical Biochemistry*, 410(2): 200-205.
- Life Sciences Research Office (LSRO)** American Societies for Nutritional Sciences. Assessment of Nutrient Requirements for Infant formulas. 1998. *The Journal Nutrition*, 128(11): 2059–2294.
- LoCascio, R.G.**, Desai, P., Sela, D.A., Weimer, B., Mills, D.A., 2010. Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Applied and environmental mikrobiology*, 76(22): 7373-7381.
- Locascio, R.G.**, Ninonuevo, M.R., Freeman, S.L., Sela, D.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., German, J.B., 2007. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22): 8914–8919.
- Lönnerdal, B.**, 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6): 1537-1543.
- Marino, K.**, Lane, J.A., Abrahams, J.L., Struwe, W.B., Harvey, D.J., Marotta, M., Rudd, P.M., 2011. Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography. *Glycobiology*, 21(10): 1317–1330.
- Martinez-Ferez, A.**, Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C.A., Pohlentz, G., Boza, J.J., Guadix, E.M., Kunz, C., 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal*, 16(2): 173-181.
- McDougal, J.S.**, Martin, L.S., Cort, S.P., Mozen, M., Heldebrant, C.M., Evatt, B.L., 1985. Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special reference to antihemophilic factor. *Journal of Clinical Investigation*, 76(2): 875-877.
- McGuire, W.**, Henderson, G., Fowlie, P.W., 2004. Feeding the preterm infant. *BMJ*, 329: 1227–1230.

McVea, K.L.S.P., Turner, P.D., Pepler, D.K., 2000. The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *Journal of Human Lactation*, 16(1): 13-20.

Měchurová, A., 2013. Prodám mléko: Zn. mateřské. Online 4. 3. 2015. Dostupné z: <http://www.babyweb.cz/prodam-mleko-zn-materske>.

Moro, E., 1900. Morphologische und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakterien-flora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrbuch. Kinderh.*, 61: 686-734.

Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M.L., Meinzen-Derr, J. K., Newburg, D.S., 2004. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of pediatrics*, 145(3): 297-303.

Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V., 2014. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial microbes*, 5(3): 273-283.

Mydlilová, A., 2006. Banky mateřského mléka v ČR. *Pediatric pro praxi*, 1: 56-57.

Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., 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(4): 1315-1320.

Newburg, D.S., Neubauer, S.H., 1995. Carbohydrates in milk, analysis, quantities, and significance. In: Jensen, R.G., *Handbook of milk composition*. Academic Press. San Diego. 273–349. ISBN: 978-0-12-384430-9.

Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M., Altaye, M., Chaturvedi, P., Meinzen-Derr, J., Guerrero, M.D.L., Morrow, A.L., 2004. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*, 14(3): 253–263.

Ninonuevo, M., An, H., Yin, H., Killeen, K., Grimm, R., Ward, R., Lebrilla, C., 2005. Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis*, 26(19): 3641–3649.

Ninonuevo, M.R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R.E., Clowers, B.H., Lebrilla, C.B., 2006. A strategy for annotating the human milk glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20): 7471–7480.

Ninonuevo, M.R., Ward, R.E., LoCascio, R.G., German, J.B., Freeman, S.L., Barboza, M., Lebrilla, C.B., 2007. Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 361(1): 15–23.

Nommsen, L.A., Lovelady, C.A., Heinig, M.J., Lönnerdal. B., Dewey, K.G., 1991. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the

first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition*, 53(2): 457–465.

Nommsen-Rivers, L.A., Dolan, L.M., Huang, B., 2012. Timing of stage II lactogenesis is predicted by antenatal metabolic health in a cohort of primiparas. *Breastfeeding Medicine*, 7(1): 43–49.

Orloff, S.L., Wallingford, J.C., McDougal, J.S., 1993. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *Journal of Human Lactation*, 9(1): 13-17.

Pang, W.W., Hartmann, P.E., 2007. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 12(4): 211–221.

Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Donnet-Hughes, A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?. *Pediatrics*, 119(3): 724–732.

Reilly, J.J., Armstrong, J., Dorosty, A.R., Emmett, P.M., Ness, A., Rogers, I., Steer, C., Sherriff, A., 2005. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *British Medical Journal*, 330(7504): 1357.

Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137(3): 830-837.

Rothová, R., 2012. Prodám mateřské mléko, zn.: Ihned! Online 31. 1. 2015. Dostupné z: <http://www.maminka.cz/clanek/prodam-materske-mleko-zn-ihned>.

Ruhaak, L.R., Lebrilla, C.B., 2013. Current methods for the analysis of human milk oligosaccharides (HMOs) and their novel applications. In: Weimer, B.C., Slupsky, C., *Metabolomics in Food and Nutrition*. Woodhead Publishing Limited. USA. 124-147. ISBN 978-1-84569-512-5.

Ruhaak, L.R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A.M., Wuhler, M., 2010. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8): 3457–3481.

Scariati, P.D., Grummer-Strawn, L.M., Fein, S.B., Yip, R., 1997. Risk of diarrhea related to iron content of infant formula: lack of evidence to support the use of low-iron formula as a supplement for breastfed infants. *Pediatrics*, 99(3): 2.

Sela, D.A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S.A., Tan, K.M., Eom, H.J., Joachimiak, A., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2012. *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* ATCC 15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology*, 78(3): 795-803.

Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. USA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(48): 18964-18969.

Sela, D.A., Mills, D.A., 2010. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. Trends in microbiology, 18(7): 298-307.

Scientific Committee on Food. 2003. Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formula and Follow-on Formula. Brussels, Belgium. European Commission. SCF/CS/NUT/IF/65 Final 2003.

Schwan, W.R., Dunek, C., Gebhardt, M., Engelbrecht, K., Klett, T., Monte, A., Toce, J., Rott, M., Volk, T.J., LiPuma, J.J., Liu, X.T., McKelvey, R., 2010. Screening a mushroom extract library for activity against *Acinetobacter baumannii* and *Burkholderia cepacia* and the identification of a compound with anti-*Burkholderia* activity. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 9(4).

Stahl, B., Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Finke, B., Sawatzki, G., 2001. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-bloodgroup-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. In: Bioactive Components of Human Milk. Newburg, D.S., Advances in Experimental Medicine and Biology. USA. 501: 299-306. ISBN 978-1-4613-5521-2.

Stahl, B., Thurl, S., Zeng, J., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M., Sawatzki, G., 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Analytical Biochemistry, 223(2): 218–226.

Sumiyoshi, W., Urashima, T., Nakamura, T., Arai, I., Saito, T., Tsumura, N., Wang, B., Brand-Miller, J., Watanabe, Y., Kimura, K., 2003. Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. British Journal of Nutrition, 89(1): 61-69.

Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Tovar, K., Sawatzki, G., 1997. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. Glycoconjugate Journal, 14(7): 795–799.

Thurl, S., Munzert, M., Henker, J., Boehm, G., Müller-Werner, B., Jelinek, J., Stahl, B., 2010. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. British Journal of Nutrition, 104(9): 1261-1271.

Tomandl, J., 2009. Schéma separace molekul gelovou chromatografií. Online 2. 1. 2015. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Gelov%C3%A1_chromatografie.png.

- Tully, D.B.**, Jones, F., Tully, M.R., 2001. Donor milk: what's in it and what's not. *Journal of Human Lactation*, 17(2): 152–155.
- Urashima, T.**, Saito, T., Nakamura, T., Messer, M., 2001. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate journal*, 18 (5): 357–371.
- Urashima, T.**, Taufik, E., Fukuda, K., Asakuma, S., 2013. Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(3): 455–466.
- Van de Perre, P.**, 2003. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*, 21(24): 3374–3376.
- Varki, A.**, 2008. Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine*, 14(8): 351–360.
- Vokurková, I., 2013. Mateřské mléko nad zlato. Litr se prodává i za 1200 korun. Online 4. 3. 2015. Dostupné z: http://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/zdravi/materske-mleko-nad-zlato-litr-se-prodava-i-za-1200-korun_259055.html#.VPd2AfmG8o4.
- Wang, B.**, McVeagh, P., Petocz, P., Brand-Miller, J., 2003. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formulafed infants. *The American journal clinical nutrition*, 78(5): 1024–1029.
- Wang, B.**, 2009. Sialic acid in an essential nutrient for brain development and cognition. *Annual review of nutrition*, 29: 177-222.
- Ward, R.E.**, Ninonuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B., German, J.B., 2006. *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and environmental microbiology*, 72(6): 4497-4499.
- Wells, J.C.K.**, 1996. Nutritional considerations in infant formula design. *Seminars in Neonatology*, 1(1): 19-26.
- Wight, N.E.**, 2001. Donor human milk for preterm infants. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, 21(4): 249–54.
- Wu, S.**, Tao, N., German, J.B., Grimm, R., Lebrilla, C. B. 2010. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *Journal of proteome research*, 9(8): 4138-4151.
- Young, W.P.**, 2009. Overview of bioactive components in milk and dairy products. In: Young, W.P., *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell. USA. 3-12. ISBN 978-0-8138-1982-2.

Zivkovic, A.M., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2011. Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 108(1):4653–4658.