

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



Biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu

Bakalářská práce

Autor práce: Klára Vašíčková

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Potůčková

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing.Miroslavě Potůčkové za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala během psaní bakalářské práce a zároveň za čas, který věnovala konzultacím.

Biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu

Souhrn

Cílem bakalářské práce bylo shrnout současné poznatky o biologických vlastnostech kaseinomakropeptidu. Kaseinomakropeptid je hydrofilní, většinou glykosylovaný polypeptid, jež vzniká z κ -kaseinu během procesu proteolýzy této bílkoviny účinkem enzymu chymozinu.

Polypeptid vykazuje řadu zajímavých funkčních a biologických vlastností, díky nimž má potenciál pro široké využití v potravinářském průmyslu a vývoj nových potravin s přidanou hodnotou. Mezi jeho hodnotné fyzikálně-chemické schopnosti patří povrchová aktivita (emulgační a pěnotvorné vlastnosti), želírovací a adsorpční vlastnosti, termo- a acidobazická stabilita. Z biologických účinků lze jmenovat zejména antialergenní, antibakteriální, antikariogenní, antivirotické, dietetické a imunomodulační prebiotické vlastnosti a vliv na gastrointestinální trakt.

Řadou studií bylo pozorováno, že vyšší biologickou aktivitu vykazují glykosylované formy kaseinomakropeptidu, ať již v nativní či hydrolyzované formě. Důležitý je zejména obsah kyseliny sialové. Dobré bioaktivní schopnosti prokázaly též konjugáty polypeptidu s galaktooligosacharidy. Antibakteriální účinek kaseinomakropeptidu byl prokázán například u patogenních kmenů bakterií *Escherichia coli* ETEC K88, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *typhimurium* CECT 443 a *Listeria monocytogenes* CECT 935. Prebioticky polypeptid působil mimo jiné na mikroorganismy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium bifidum* CCDM 94, *Bifidobacterium thermophilum* RB 267, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactobacillus rhamnosus* RW-959-M. Antikariogenní vlastnosti kaseinomakropeptidu byly s úspěchem uplatněny na vybrané kmeny *Streptococcus mutans*, *sanguis* a *sobrinus* a modelový systém hydroxyapatitu. Glykosylované formy polypeptidu také stimulovaly sekreci žaludečních a pankreatických enzymů a cholecystokininu, avšak nebyl prokázán jeho pozitivní vliv na potlačení chuti k jídlu, pocitu hladu a množství přijaté stravy a energie.

Klíčová slova: biologická aktivita, glykomakropeptid, kasein, kaseinomakropeptid, prebiotika

Caseinomacropeptide biological properties

Summary

The aim of the bachelor thesis was to summarize the current knowledge about biological properties of caseinomacropeptide. Caseinomacropeptide is hydrophilic, mostly glycosylated peptide which comes from κ -casein during its chymosin proteolysis.

Polypeptide has a lot of interesting functional and biological properties thanks which has a wide potential for food industry and development of new products with added value. Its valuable physico-chemical properties include surface activity (emulsifying and foaming properties), gel-forming and adsorption properties, thermo- and acidobasic stability. From the biological effects may be mentioned antibacterial, anticariogenic, antiviral, dietary, effects on the gastrointestinal tract, hypoallergenic and immunomodulatory properties and prebiotic.

In many studies was observed that the higher biological activity of caseinomacropeptide (native or hydrolysed forms) is connected with its glycosylation. One of the most important parameters is also sialic acid content. Good bioactive properties also demonstrated polypeptide conjugates with galactooligosaccharides. Antibacterial effect of caseinomacropeptide was recorded for example against pathogenic strains of *Escherichia coli* ETEC K88, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp *typhimurium* CECT 443 a *Listeria monocytogenes* CECT 935. Polypeptide acted as prebiotic for *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium bifidum* CCDM 94, *Bifidobacterium thermophilum* RB 267, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517, *Lactococcus lactis* subsp. *Lacti* and *Lactobacillus rhamnosus* RW-959-M. Anticariogenic properties of caseinomacropeptide were successfully used against selected strains of *Streptococcus mutans*, *sanguis* and *sorbinus* and model hydroxyapatite system. Glycosylated forms of polypeptide also stimulated gastric and pancreatic enzymes and cholecystokinin secretion but any positive influence of caseinomacropeptide on appetite and hunger suppressing and food and energy intake decreasing has not been observed.

Keywords: Biological activity, glycomacropeptide, casein, caseinomacropeptide, prebiotics

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Přehled literatury	3
3.1	Kasein	3
3.1.1	Frakce kaseinu	4
3.1.1.1	α_{s1} -kasein.....	4
3.1.1.2	α_{s2} -kasein.....	4
3.1.1.3	β -kasein	5
3.1.1.4	κ -kasein	6
3.1.2	Kaseinová micela.....	8
3.1.2.1	Struktura kaseinové micely	9
3.2	Kaseinomakropeptid	11
3.2.1	Funkční vlastnosti kaseinomakropeptidu	12
3.2.1.1	Povrchová aktivita kaseinomakropeptidu.....	12
3.2.1.2	Želírovací vlastnosti kaseinomakropeptidu.....	12
3.2.1.3	Adsorpční vlastnosti kaseinomakropeptidu.....	12
3.2.1.4	Termostabilita a acidobazická stabilita kaseinomakropeptidu	14
3.2.2	Biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu	18
3.2.2.1	Antibakteriální a antivirotický účinek kaseinomakropeptidu	18
3.2.2.2	Prebiotický účinek kaseinomakropeptidu.....	19
3.2.2.3	Antikariogenní vlastnosti CMP	22
3.2.2.4	Vliv kaseinomakropeptidu na gastrointestinální trakt.....	23
3.2.2.5	Vliv kaseinomakropeptidu na pankreatickou sekreci	25
3.2.2.6	Vliv kaseinomakropeptidu na regulaci hmotnosti	26
3.2.2.7	Další biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu	29
4	Závěr	30
5	Seznam literatury	32
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	38

1 Úvod

Mléko je kompletní a komplexní potravina vhodná pro specifické požadavky potomstva savců, tedy pro jeho růst a vývoj. Jeho složení je výsledkem dlouhé a pomalé evoluce, která začala před 150 miliony let, dlouho před domestikací přežvýkavců, ke kterému došlo před 10 000 lety.

Syntéza výměšků mateřských žláz je kódována širokým počtem genů, které jsou aktivovány během laktace. Mléko obsahuje mnoho zdraví prospěšných látek ovlivňujících fyziologické funkce organismu nebo snižujících rizika onemocnění. Jedná se o hlavní složky, jako jsou lipidy, cukry (zahrnující i oligosacharidy) a proteiny, ale také o celou řadu minerálních látek a vitamínů. Některé složky však zůstávají doposud stále neprostudované nebo jejich funkce nejsou dostatečně objasněné. Na druhou stranu jiné složky jsou již dobře známy pro svůj význam ve výživě, jako například mléčné bílkoviny, které poskytují organismu esenciální a neesenciální aminokyseliny sloužící jako substrát pro postnatální metabolismus. Dále jsou tyto aminokyseliny také základní stavební jednotkou tkáňových proteinů syntetizovaných během růstu. U mléčných bílkovin i dalších složek byla potvrzena jejich biologická aktivita. Mnoho dalších bioaktivních látek mléka je však třeba ještě identifikovat.

Kaseinomakropeptid je glykosylovaný peptid vznikající odštěpením z κ -kaseinu enzymem chymozinem. Vyznačuje se řadou funkčních a biologických schopností, jež jsou zajímavé z technologického i výživového hlediska. Mezi jeho fyzikálně-chemické vlastnosti patří povrchová aktivita, želírovací schopnost, dobré adsorpční vlastnosti, termostabilita a acidobazická stabilita. Z biologicky aktivních schopností lze jmenovat například vliv na gastrointestinální a pankreatickou sekreci, prebiotický, antibakteriální a antivirový účinek.

2 Cíl práce

Hypotéza: Kaseinomakropeptid je syrovátková bílkovina, jež je díky své biologické aktivitě vhodná pro využití ve výživě lidí.

Cílem bakalářské práce je zpracování literární rešerše shrnující současné poznatky o biologických vlastnostech kaseinomakropeptidu, faktorech, které je ovlivňují, a potenciálu jejich využití v lidské výživě.

3 Přehled literatury

3.1 Kasein

Kaseiny jsou fosfoproteiny o typickém prvkovém složení bílkovin (C, N, H, O, S), jež jsou syntetizovány za hormonální regulace prsními epitelovými buňkami samic savců jako více či méně velké a stabilní částice, nazývané micely. Tyto kulovité, poněkud zploštělé částice jsou výsledkem seskupení malých nespojitých podjednotek neboli submicel, které jsou spojeny koloidním fosforečnanem vápenatým esterově vázaným na hydroxylovou skupinu serinu a někdy i threoninu. Kaseinové micely jsou přítomné v mléku všech savců a vyznačují se poměrně širokou distribucí velikosti. V kravském mléce, doposud nejdůkladněji prostudovaném druhu mléka, jsou micely kaseinu tvořeny z několika typů kaseinových molekul. Tyto molekuly, nazývané frakce, vycházejí ze 4 jednotlivých kopií autosomálních genů. Jsou to geny, jež kódují 4 rozdílné polypeptidové řetězce (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -kasein). Na základě různých testů lze říci, že složení kaseinu je specifické pro každý savčí druh a v závislosti na typu savce může protein tvořit i více než 80 % všech bílkovin mléka. Obsah proteinu představuje téměř 80 % celé bílkovinné frakce v mléce přežvýkavců, zatímco v lidském mléce je množství kaseinu nižší než 50 % všech bílkovin (McSweeney et Fox, 2013; Prokš, 1964).

Kaseiny jsou fosforylovány během syntézy a shlukovány ve velké micely obsahující vápník vázaný na fosfor ve formě fosforečnanu vápenatého. Součástí micely jsou obvykle všechny kaseinové frakce, ale na povrchu je vždy κ -kasein, který díky své hydrofilní povaze stabilizuje micelu ve vodním prostředí mléka. Tyto proteiny jsou primárním zdrojem vápníku a fosforu, esenciálních minerálů potřebných pro vývoj kostí a tkáňový růst. Fosfor je také důležitou látkou pro buněčný metabolismus. Jakmile je mléko požit, trávicí enzymy, v první řadě chymozin, rozštěpí κ -kasein a tím, v kombinaci s kyselým pH, destabilizují celou micelu, což vede ke koagulaci jednotlivých frakcí na žaludeční sraženinu, která zadržuje tuk, jež zůstává zachycen v žaludku. Zachycený tuk je atakován lipázami, kaseiny jsou pak hydrolyzovány dalšími proteázami. Vývoj mechanismu přeměny tekutého substrátu (mléko) na pevný (žaludeční koagulát), byl důležitý pro evoluci vhodného trávicího systému u mladých kojených mláďat (McSweeney et Fox, 2013).

V posledních 20 letech nastal značný pokrok v pochopení struktury a genového kódování této mléčné bílkoviny. Rozvoj v molekulární biologii, genomice a proteomice umožnil charakterizovat, jak genom jedinice přispívá ke změnám ve struktuře proteinu a jak

jsou jednotlivé genetické polymorfy zodpovědné za mimořádnou složitost a širokou variabilitu kaseinových frakcí jak mezi živočišnými druhy, tak i v rámci jednoho druhu. Dosud bylo charakterizováno několik desítek genetických variant kaseinu v kravském, ovčím a kozím mléce (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.1 Frakce kaseinu

3.1.1.1 α_{s1} -kasein

Nejvíce zastoupenou kaseinovou frakcí je α_{s1} -kasein (α_{s1} -CN) představující 40 % celkového obsahu bílkoviny v kravském mléce. Protein je složen ze 199 aminokyselin a obsahuje 8 fosforylovaných aminokyselinových zbytků. Převažující genetickou variantou u Tura domácího je B-8P obsahující 8 fosforylovaných serinových zbytků. Jedná se o Ser₄₅, Ser₄₇, Ser₆₄, Ser₆₆, Ser₆₇, Ser₆₈, Ser₇₅ a Ser₁₁₅. Celkem byla identifikována 2 centra fosforylace v α_{s1} -CN, pozice Ser₄₅ a Ser₄₇ a Ser₆₄, Ser₆₆, Ser₆₇, a Ser₆₈. Tato centra hrají klíčovou roli ve stabilizaci kaseinových micel fosforečnanem vápenatým.

Dalšími genetickými variantami α_{s1} -kaseinu jsou A, C, D, E, F, G a H. U varianty A chybí aminokyselinové zbytky v pozici 14 - 26 kvůli exonovému přesmyku. Varianta C obsahuje jako 192. aminokyselinu Glu místo Gly. U α_{s1} -CN D je zbytek Ala v pozici 53 nahrazen fosforylovaným Thr zbytkem. V pořadí aminokyselin, tedy v primární struktuře, se liší i zbylé varianty, jež byly nalezeny v mléce různých plemen krav.

Na základě jiných technik měření byla zjištěna sekundární struktura. Sekundární struktura α_{s1} -CN byla studována za využití čtených postupů. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací výskyt sekundární struktury v této frakci nepotvrdila. Jak uvádí McSweeney a Fox (2013), procento α -helix šroubovice bylo v roce 1966 odhadnuto Herkovitsem na 5 – 15 %, v roce 1988 Bylerem na 20 % a v roce 2005 Malinem na 13 – 15 %. Pro zastoupení β -listové struktury byla určena Bylerem v roce 1988 hodnota 17 – 20 %, zatímco v roce 2005 prokázal Malin 34 – 46 % (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.1.2 α_{s2} -kasein

α_{s2} -kasein (α_{s2} -CN) tvoří až 10 % celkového kaseinu v kravském mléce. Jednotlivé genetické varianty se liší úrovní fosforylace a počtem mezimolekulových disulfidových můstků.

Pro tuto frakci kaseinu je charakteristická genetická varianta A-10P. Tato genetická varianta má 3 fosforylační centra v pozicích peptidového řetězce 8 – 16 (Ser₈, Ser₉, Ser₁₀,

Ser₁₆), 56 – 63 (Ser₅₆, Ser₅₇, Ser₅₈, Ser₆₁) a 126 – 133 (Ser₁₂₉, Ser₁₃₁). Primární struktura se také může lišit zařazením Gln jako 87. aminokyseliny místo Glu. Vedle toho byly také pozorovány varianty A s 11, 12 a 13 fosforylovanými zbytky.

Primární sekvence α_{s2} -CN A obsahuje dále 2 cysteinové zbytky (Cys₃₆, Cys₄₀), které se vyskytují v mezimolekulárních i intramolekulárních disulfidových vazbách. V této frakci izolované z kravského mléka bylo nalezeno více jak 85 % bílkoviny v monomerní formě, jež obsahovala intramolekulární disulfidový můstek. Zbývající podíl tvořily dimery, které byly orientovány paralelně či antiparalelně.

U α_{s2} -CN byl také potvrzen genetický polymorfismus. Varianta B byla vzácně zaznamenána u plemene *Bos taurus indicus* (Zebu Cattle) v Jižní Africe. α_{s2} -CN C byl objeven u Jaka divokého. Odlišuje se v pozici 33, 47 a 130 polypeptidového řetězce, kde Gly, Thr a Ile jsou nahrazeny Glu, Ala a Thr v tomto pořadí. Dále ještě existuje α_{s2} -CN D, jež se liší absencí 9 aminokyselinových zbytků na pozici 51 – 59, což je způsobeno přesmykem exonu VIII, 27. nukleotidové sekvence, která tuto část kóduje.

Sekundární struktura α_{s2} -CN byla stejně jako u α_{s1} -frakce charakterizována mnoha technikami, jež přinesly významné poznatky. V roce 1978 byla navržena struktura, která se skládala z 54 % α -helixu, z 15 % β -listu a 32 % neuspořádaných struktur. V roce 2003 byl navržen model molekuly složený ze 45 % α -helixu, 6 % β -listu a ze 49 % neuspořádaných struktur (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.1.3 β -kasein

β -kasein (β -CN) představuje 35 % hlavní bílkoviny kravského mléka. Primární struktura obsahuje 209 aminokyselinových zbytků s variabilním složením pozorovaným ve 4 úsecích: záměna Glu za Gln na pozici 117, 175 a 179 a dále převrácení pozic Pro₁₃₇ a Leu₁₃₈. N-konec β -CN (aminokyseliny 1 – 40) obsahuje veškerý čistý náboj molekuly, je málo hydrofobní a zahrnuje pouze 2 proliny. V tomto úseku se také nachází 5 fosforylovaných serinových zbytků: Ser₁₅, Ser₁₇, Ser₁₈, Ser₁₉ a Ser₃₅, z nichž první 4 tvoří centrum fosforylace. Střední část molekuly (aminokyseliny na pozici 41 – 135), má pouze malý náboj a tlumí hydrofobní vlastnosti. C-konec (úsek řetězce 136 – 209) obsahuje hodně nepolárních zbytků a je charakterizován malým nábojem a vysokou hydrofobicitou.

Nejobvyklejší genetickou variantou je β -CN A²-5P, dalšími jsou například A¹, A³, B, C, D, H¹ a H². Některé genetické varianty se liší v pozicích aminokyselinových zbytků, jiné v jejich absenci. U korejského skotu byla také pomocí elektroforézy identifikována varianta

A⁴. A¹ β -CN se odlišuje od varianty A² substitucí Pro místo His na pozici 67, zatímco A³ obsahuje jako 106. aminokyselinu Gln místo His.

β -CN B je mutací varianty A¹. To znamená, že obsahuje Arg místo Ser na pozici 122. β -CN C je také odvozen od β -CN A¹, není fosforylován v místě Ser₃₅ a jako 37. aminokyselinu má Lys místo Glu. β -CN D se od A² odlišuje pouze v pozici 18, kde se nachází Lys místo fosforylovaného serinového zbytku. Varianta E obsahuje Lys místo Glu jako 36. aminokyselinu. β -CN F je na pozici 152 zastoupen Leu místo Pro. Varianta G-5P, která je stejná jako A¹ a F, má Leu v místě Pro v pořadí 137 nebo 138, což závisí na určené sekvenci. V molekule H¹ nastaly 2 substituce, které se vztahují k β -CN A². Jedná se o záměnu Arg za Cys na pozici 25 a Leu za Ile v pozici 88 polypeptidového řetězce. Genetická varianta H² se odlišuje od A² na 2 pozicích, místo Leu je jako 93. aminokyselina Met a místo Gln je Glu. Poslední polymorfní frakce, I, obsahuje na pozici 93 pouze Leu místo Met (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.1.4 κ -kasein

V rámci jednotlivých kaseinových frakcí je κ -kasein (κ -CN) poměrně unikátní. Vyznačuje se nejmenší molekulou, má nízkou úroveň fosforylace a nízkou citlivost vůči vápníku. Zároveň je to jediná frakce kaseinu, která se vyskytuje v glykosylované formě. Primární úsek je tvořen ze 169 aminokyselin a hlavní genetická varianta je A-1P. Stejně jako u ostatních frakcí byla potvrzena fosforylace i této molekuly. Monofosforylovaná forma κ -CN je pravděpodobně fosforylována výhradně na pozici Ser₁₄₉, zatímco difosforylovaná forma na pozicích Ser₁₂₁ a Ser₁₄₉. U trifosforylované bílkoviny pak dodatečná (doplňková) fosforylovaná aminokyselina není Ser, ale Thr na 145. místě peptidového řetězce.

V primární struktuře genetického polymorfu je 17 aminokyselin kladně nabitě, kdežto 28 jich je nabitě záporně. Je zde také 14 aromatických zbytků. Hydrofobnost a náboj jsou nerovnoměrně rozděleny po celé molekule. Negativní náboj byl nalezen pouze v *N*-koncové části 1 – 20 a *C*-koncové části 115 – 169. Řetězec mezi 21. a 114. aminokyselinou postrádá záporně nabitá rezidua. Další záporné náboje, jež vycházejí z fosforylace, jsou také na *C*-konci bílkoviny. Negativní náboje vznikající z glykosylace se pak mohou vyskytnout na šestém threoninovém zbytku *C*-konce. Kladný náboj je naopak soustředěn na *N*-konci molekuly. V úseku 1 – 20 převládá hydrofilní chování, kdežto sekvence 21 – 110 je silně hydrofobní. Úsek 110 – 120 je silně hydrofilní, zatímco ve zbytku řetězce, tedy aminokyselin 121 – 169 se nacházejí některé hydrofilní i hydrofobní oblasti. Je třeba poznamenat,

že posttranslační modifikace, tedy fosforylace a glykosylace, které se objevují v této části bílkoviny, omezují významně hydrofobní vlastnosti.

Další běžně se vyskytující genetickou variantou je κ -CN B, který se odlišuje od varianty A záměnou na pozici 136 (Ile za Thr) a 148 (Ala za Asp). Polymorf C je od A rozdílný záměnou His za Arg na 97. místě polypeptidového řetězce. Dále byly zaznamenány varianty E, F¹, F², G¹, G², H, I a J, jež se rovněž vyznačují záměnami aminokyselin v určitých pozicích.

E κ -CN má substituovanou pozici 155, kde je Ser nahrazen Gly. Polymorfní frakce F¹, která byla zachycena u obou druhů Zebu, obsahuje jako 148. aminokyselinu Val místo Asn. κ -CN F² je označován jako odvozenina κ -CN B, která navíc substituuje His místo Arg na pozici 10. Varianta G¹ byla nalezena u alpského plemene krav a v peptidovém řetězci má jako 97. aminokyselinu Cys místo Arg. κ -CN G² byl charakterizován v mléce *Bos gruniens*. Bylo dokázáno, že obsahuje Ala místo Asn na pozici 148. U Pincgavského skotu byla identifikována polymorfní frakce H, která se odlišuje od varianty A záměnou 135. aminokyseliny Ile za Thr. U další varianty κ -CN, I, dochází k záměně Ala za Ser na pozici 104. Poslední nalezenou genetickou variantou je κ -CN J, jež nejspíš vzniká substitucí aminokyseliny Ser Arg na 155. místě polypeptidového řetězce.

Z kaseinových frakcí, je κ -CN jediný, u kterého byl prokázán výskyt posttranslační glykosylace. Bylo pozorováno, že okolo 40 % proteinu glykosylováno není, přičemž jeho zbytek může obsahovat až šest sacharidových jednotek. Místa glykosylace v molekule frakce byla nalezena na threoninových zbytcích v pozicích 121, 131, 133, 142, 145 a 165 polypeptidového řetězce. Rozdílné formy glykosylovaného κ -CN mohou být odděleny elektroforézou díky rozdílnému isoelektrickému bodu a molekulové hmotnosti. Tato metoda položila základ pro objasnění glykosylačního vzorce bílkoviny. Použitím hmotnostní spektrometrie pak bylo pozorováno, že monoglykoformy κ -kaseinu jsou glykosylovány výhradně na Thr₁₃₁, diglykoformy na Thr₁₃₁ a Thr₁₃₂ a triglykoformy na Thr₁₃₁, Thr₁₃₃ a Thr₁₄₂. U tetraglykoformy genetické varianty B byla zaznamenána glykosylace na pozici Thr₁₄₅, ale také na již zmíněných úsecích Thr₁₃₁, Thr₁₃₃ a Thr₁₄₂. 2 zbývající možná místa vazby sacharidů se vyskytují na pozicích Thr₁₂₁ a Thr₁₆₅. Obecně, κ -CN B je pravděpodobně více glykosylován než genetická varianta A.

Z technologického hlediska se nejdůležitější peptidová vazba κ -CN nalézá mezi 105. a 106. aminokyselinou, tedy Phe a Met. Tato vazba je štěpena chymozinem, čímž je vyvolána hydrolyza molekuly, jež díky své hydrofilitě tvoří obal kaseinové micely. Micela tak ztrácí stabilitu ve vodním prostředí mléka a rozpadá se na jednotlivé frakce, které koagulují. Toho je

využíváno při výrobě tvarohu, zrajících i nezrajících sýrů. *N*-konec úseku, 1 – 105, vycházející z proteolýzy κ -CN vyvolané chymozinem se nazývá para- κ -kasein a *C*-konec úseku 106 – 169 kaseinomakropeptid (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.2 Kaseinová micela

Jednotlivé frakce kaseinu se v mléce v nativním stavu nacházejí ve formě kaseinových micel. Kaseinové micely jsou částice koloidní velikosti. Mohou být popsány jako systém založený na vícenásobných molekulových subjektech, jež jsou organizovány prostřednictvím nekovalentních mezimolekulových vazeb. Existence těchto koloidních částic je umožněna díky stabilizaci fosforečnanem vápenatým. Tento systém slouží jako prvotní výživový zdroj vápníku, fosforu a aminokyselin při růstu a vývoji savčích novorozeňat. Mezi jeho biologické funkce patří přenos fosforečnanu vápenatého bez procesu vápenatění skrz mléčnou žlázu. Pojem „kaseinová micela“ byl používán po mnoho let všeobecně pro koloidní částice v mléce na bázi fosforylovaných proteinů obsahujících vápník. Dnes je zřejmé, že tato molekulová struktura je závislá na pH, teplotě a přítomnosti solí.

Sušina kaseinových micel je tvořena z cca 94 % bílkovin a 6 % koloidního fosforečnanu vápenatého (CCP). Tato nízkomolekulární látka je složena převážně z vápníku a fosforu s malým množstvím hořčíku a citrátu. Micely jsou také vysoce hydratované a obklopené takzvaným hydratačním obalem, tedy vrstvou čisté vody. Mléko všech živočišných druhů je bílé. Za to jsou zodpovědné právě kaseinové micely, jež mají schopnost rozptylovat světlo. Bílá barva mléka se ztrácí, pokud je jejich struktura narušena. K tomu může dojít pomocí rozpuštění CCP přidáním citrátu, ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA) nebo oxalátu, dále rostoucím pH nebo přidáním močoviny či alkoholu.

Pomocí elektronové mikroskopie bylo pozorováno, že kaseinové micely mají obecně kulovitý tvar. Jejich průměrná distribuce velikosti u kravského mléka se pohybuje od 50 do 500 nm a molekulová hmotnost od 10^6 do 3×10^9 Da. V porovnání s kaseinovými micelami kravského mléka jsou micely v lidském mléce malé (asi 60 nm v průměru), zatímco například v koňském mléce jsou velké (asi 500 nm). Částice kaseinu v koňském mléce jsou v průměru až 40krát větší než v kravském mléce. Kravské mléko obsahuje 10^{14} – 10^{16} micel na ml, jež jsou hustě natěsnány vedle sebe (McSweeney et Fox, 2013).

3.1.2.1 Struktura kaseinové micely

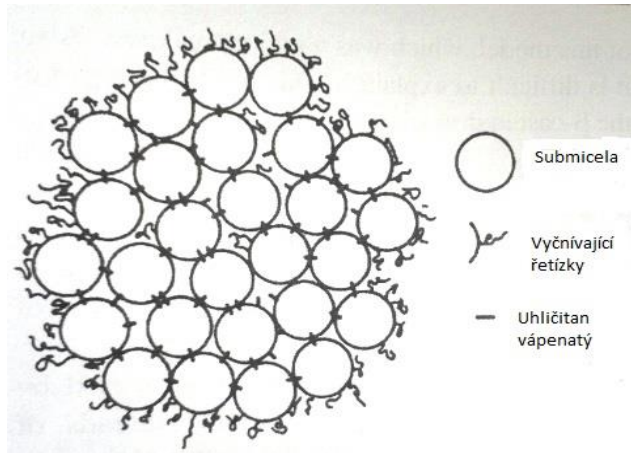
Znalost micelární struktury je důležitá pro mnoho procesů, které kaseinové částice podstupují při zpracování mléka a výrobě mléčných produktů. Kaseinová micela představuje zajímavý a složitý případ globulární bílkoviny s kvartérní strukturou.

Základní modul struktury kaseinové micely představuje vrstva κ -CN obklopující zbylé hydrofobní a na vápník citlivé frakce, jež je analogická lipidové emulzi, ve které jsou triglyceridy obklopeny tenkou vrstvou emulgátoru. Neboť bylo pozorováno že, odstranění CCP vede k rozpadu micel na částice, tato sloučenina je hlavním činidlem ve spojování kaseinových frakcí do vyšších struktur. Vlastnosti CCP záleží na řadě faktorů, zejména jsou pozitivně ovlivněny vyšší koncentrací vápníku. Mezi další činitele patří teplota, pH a přítomnost denaturačních činidel jako je močovina nebo etanol.

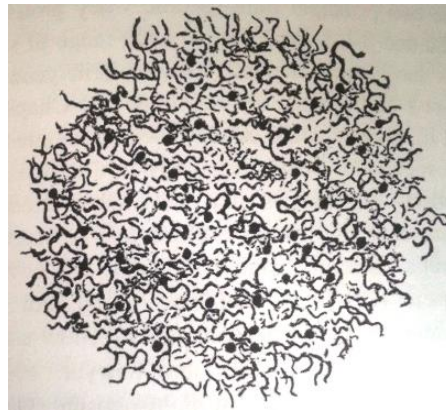
Mezi hlavní faktory, které mění vlastnosti struktury micel, patří:

- Množství κ -CN, který představuje asi 15 % celkového obsahu. Tato frakce je důležitá pro stabilizaci hydrofobních kaseinů citlivých na vápník, tedy pro α_{s1} - , α_{s2} - a β -kaseiny, jež tvoří zbylých 85 % obsahu proteinu. κ -kasein tvoří, díky své hydrofilní povaze dané glykosylací, povrchovou vrstvu kaseinových micel (McSweeney et Fox, 2013).
- Přítomnost chymozinu a dalších proteáz, které jsou důležité pro rychlou a specifickou hydrolýzu κ -CN (McSweeney et Fox, 2013).
- Tepelné ošetření mléka. Při zahřívání na teploty, při nichž denaturuje syrovátková bílkovina β -laktoglobulin, dochází k jejímu napojení na κ -CN čímž jsou modifikovány vlastnosti micel, například její přístupnost proteolytickým enzymům a termolabilita (McSweeney et Fox, 2013).

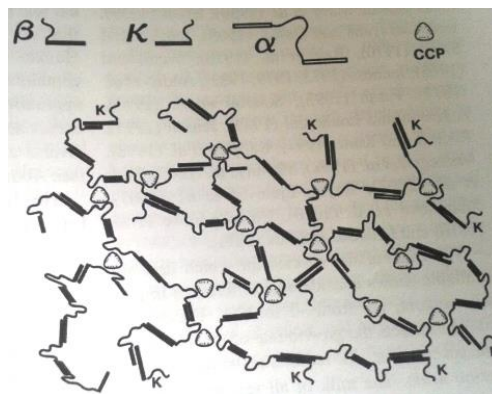
Během posledních 50 let bylo představeno velké množství modelů kaseinových micel. Na základě získávání dalších informací o struktuře kaseinu, byly postupně zdokonalovány od jádra s povrchovou vrstvou κ -kaseinu až po submicely. Submicelární modely kaseinové micely jsou uvedeny na obrázcích 1 až 3.



Obrázek1: Submicelární model kaseinové micely podle Walstry a Jenness z roku 1984 (McSweeney et Fox, 2013).



Obrázek 2: Submicelární model kaseinové micely podle Holta z roku 1994 (McSweeney et Fox, 2013).



Obrázek 3: Model dvojitého spojení kaseinové micely podle Horna z roku 1998 (McSweeney et Fox, 2013).

3.2 Kaseinomakropeptid

Kaseinomakropeptid (CMP) je hydrofilní glykosylovaný peptid, jež vzniká z κ -CN během procesu proteolýzy této mléčné bílkoviny účinkem enzymu chymozinu. Chymozin je proteáza, která hydrolyzuje peptidovou vazbu κ -CN mezi jeho 105. a 106. aminokyselinou (mezi fenylalaninem a methioninem). Protein je rozštěpen na 2 části, hydrofobní para- κ -kasein (aminokyseliny 1 – 105) a CMP (aminokyseliny 106 – 169). Tím je kaseinová micela zbavena svého hydrofilního obalu a dochází k jejímu rozpadu a vysrážení. κ -CN je *in vivo* degradován během žaludeční fáze trávení a tohoto procesu je též využíváno pro výrobu sýrů. Díky své hydrofilitě zůstává CMP součástí mléčného séra a je řazen mezi syrovátkové bílkoviny (McSweeney et Fox, 2013).

Neboť u κ -CN se vyskytuje genetický polymorfismus, je tomu tak i u CMP. Sekvence peptidu je zachována ve všech genetických variantách proteinu a všechny posttranslační modifikace bílkoviny se nacházejí právě v CMP úseku molekuly. Nicméně, pro genetickou variantu I je serinový zbytek (pozice 104 aminokyselinového řetězce) nahrazen více hydrofobním alaninovým zbytkem. Polymorfní frakce mohou být od sebe odděleny například gelovou elektroforézou v kombinaci s iontově výměnnou chromatografií. Nejčastěji varianty, A (CMP A) a B (CMP B), se od sebe liší ve 2 aminokyselinových zbytcích, Thr nebo Ile na 136. pozici sekvence a Asp nebo Ala na 148. místě polypeptidové vazby (Abd El-Salam et al., 1996; McSweeney et Fox, 2013).

Struktura CMP je dále charakteristická absencí aromatických aminokyselin a většinou i cukerným zbytkem. Pokud je peptid glykosylován, často je označován také jako glykokaseinomakropeptid (gCMP). Rozdílnost cukerných zbytků (zejména v uhlíkatých a fosfátových skupinách) dále určuje heterogenitu CMP. Z CMP mleziva a zralého kravského mléka byly izolovány 4 různé oligosacharidické skupiny skládající se z galaktózy (Gal), *N*-acetylneuraminové kyseliny (NeuNAc), *N*-acetylgalaktózaminu (GalNAc), *N*-acetylgalaktózaminitolu (GalNAc-ol):

Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-ol,

NeuNAc α (2 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-ol,

Gal β (1 \rightarrow 3)[NeuNAc α (2 \rightarrow 6)]GalNAc-ol,

NeuNAc α (2 \rightarrow 3)Gal(1 \rightarrow 3)[NeuNAc α (2 \rightarrow 6)]GalNAc-ol (Abd El-Salam et al., 1996).

3.2.1 Funkční vlastnosti kaseinomakropeptidu

Funkční vlastnosti CMP jsou v dnešní době intenzivně studovány. Potenciál pro vývoj nových potravin mají zejména jeho povrchová aktivita a z ní vyplývající emulgační a pěnotvorné schopnosti, želírovací a adsorpční vlastnosti a termostabilita (Setarehnejad et al., 2010; Siegert et al., 2012; Thomä-Worringer et al., 2006).

3.2.1.1 Povrchová aktivita kaseinomakropeptidu

CMP je hydrofilní, ve vodě rozpustný polypeptid, jehož molekula vykazuje záporný náboj i při nízkých hodnotách pH. Minimální rozpustnost nativního CMP je mezi hodnotami pH 1 a 5 (Chobert et al., 1989). Polypeptid je povrchově aktivní s dobrými emulgačními schopnostmi. Maximální emulgační kapacity dosahuje v alkalickém prostředí, uspokojujivá je i jeho povrchová aktivita při pH 4,5 – 5,5. To by mohlo být s výhodou využito při produkci potravin, které prochází během výrobního procesu většími změnami aktivní kyselosti (Chobert et al., 1989; Moreno et al., 2002; Thomä-Worringer et al., 2006).

3.2.1.2 Želírovací vlastnosti kaseinomakropeptidu

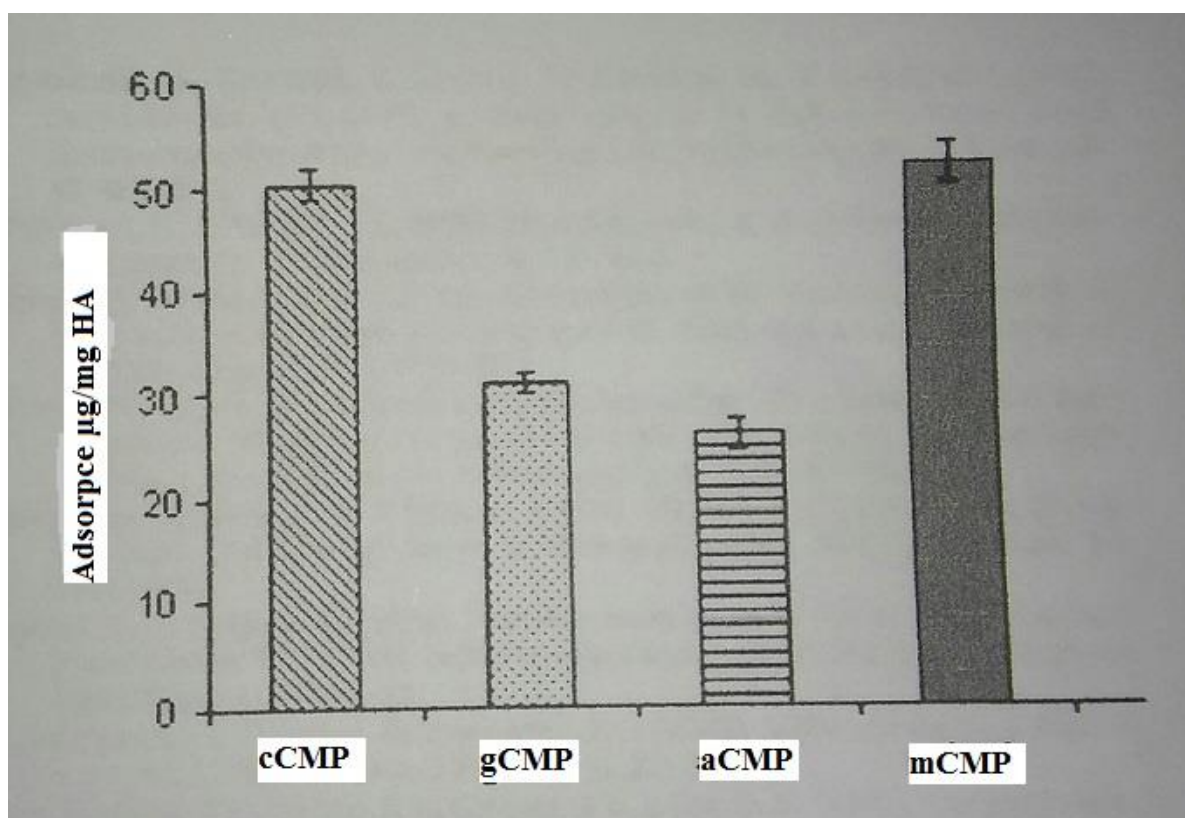
Želírovací schopnosti CMP jsou dány jeho složením. Tento polypeptid tvoří na základě zvolených podmínek „heat-set“ (například 12,5% roztok CMP, 80 °C a pH 7,0) i „cold-set“ (kupříkladu 9,3% roztok CMP, 20 °C a pH 4,5) gely. V případě směsných gelů CMP s bílkovinami bylo zjištěno, že polypeptid není zabudován do proteinové sítě a tedy zůstává rozpuštěn v roztoku (Ahmed et Ramaswamy, 2003; Thomä-Worringer et al., 2006).

Želírovacími vlastnostmi CMP se zabývali též Thomä-Worringer a kol. (2006), kteří je využili při výrobě sněhových pusinek a ovocného želé. Zjistili, že obohacením receptury sněhových pusinek o 10 % polypeptidu došlo ke snížení hustoty směsi během vaření a tudíž pěna potřebná ke zhotovení tohoto produktu nebyla stabilní. Naopak, v případě ovocného želé obsahujícího 9,3 % CMP, byla pozorována při pH 4,5 vyšší rychlost želírování a pevnější textura (Thomä-Worringer et al., 2006).

3.2.1.3 Adsorpční vlastnosti kaseinomakropeptidu

Adsorpční vlastnosti CMP jsou významné z hlediska tvorby biologických obalů chránících nutričně významné látky před degradací během jejich výroby, skladování a průchodu lidským gastrointestinálním traktem. Lze jimi vysvětlit též jeho antikariogenní účinek. Adsorpčními vlastnostmi CMP se zabývali mezi jinými i Setarehnejad a kol. (2010).

Autoři charakterizovali adsorpci CMP o různé čistotě (cCMP o čistotě 85 %, gCMP o čistotě 41 %, aCMP o čistotě 59 % a mCMP, jež byl připraven z 41% gCMP a 59% aCMP) na hydroxyapatit (HA). Výsledky jejich měření jsou znázorněny na obrázku 4. Autoři pozorovali, že množství polypeptidu adsorbovaného na HA se pohybovalo v rozmezí 26 až 52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ v závislosti na typu substrátu. V nejvyšším množství byly adsorbovány na HA cCMP a mCMP. Toto zjištění může být vysvětleno na základě jejich struktury a přítomnosti určitého množství syrovátkových bílkovin a peptidů (Grenby et al., 2001; Setarehnejad et al., 2010).



Obrázek 4: Stanovení adsorpce CMP na HA. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 3 paralelních stanovení (Setarehnejad et al., 2010).

Mechanismus, kterým se CMP váže na HA, není dosud zcela objasněn. V předešlých *in vitro* studiích bylo zaznamenáno, že na HA jsou přednostně adsorbovány peptidy a bílkoviny, které jsou kyselé či bohaté na prolin, neboť jejich funkční skupiny se na něj mohou vázat přes vápenaté ionty (kyselé skupiny) nebo pomocí vodíkových můstků (polyprolinové šroubovicové struktury). Obě kritéria splňuje právě CMP obsahující přibližně 14 % prolinu a 16 % kyselých funkčních skupin. Lepší adsorpční vlastnosti cCMP oproti gCMP a aCMP lze vysvětlit jeho vyšším záporným nábojem. Na HA byl nejlépe adsorbován mCMP, tedy směs aCMP a gCMP, což by mohlo být pravděpodobně způsobeno jejich

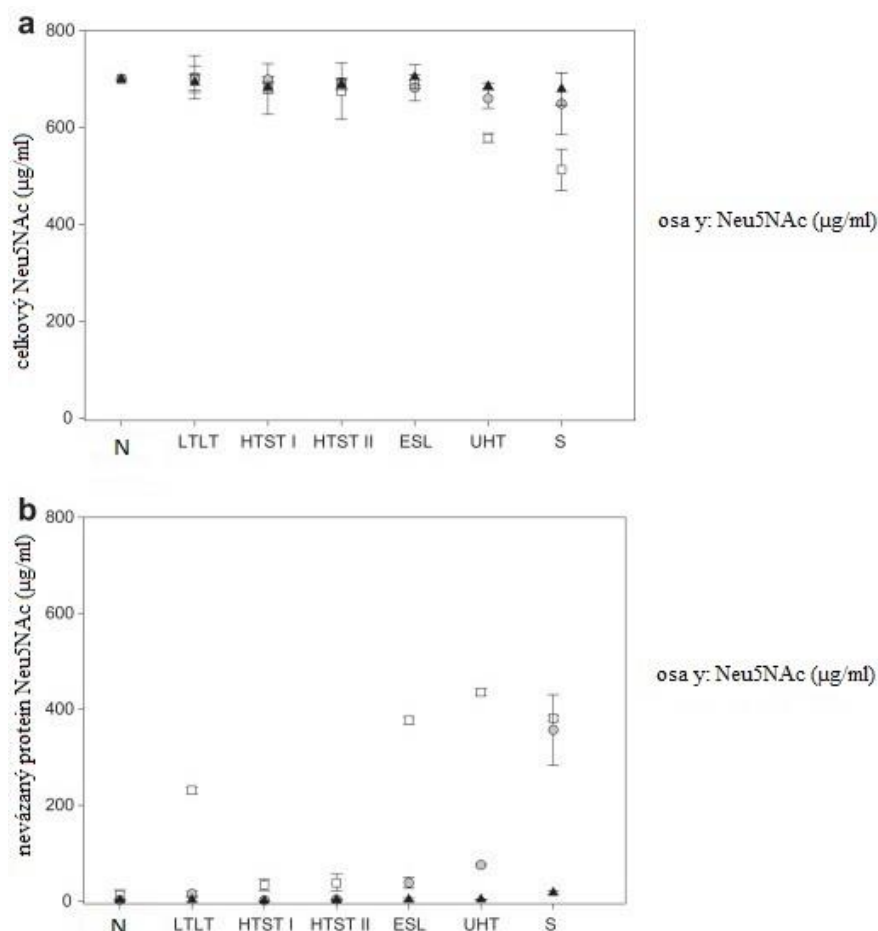
synergickým účinkem. Jako příklad uvádějí autoři Vacca a kol. (2000) prodlouženou konformaci na prolin bohatých proteinů a peptidů, která umožňuje větší míru interakce mezi proteinem a HA. Tím by se zvýšila stabilita a schopnost tvořit povlak. To by mohlo znamenat, že CMP tvoří ochrannou vrstvu na povrchu HA, která poskytuje fyzickou překážku s pufrovací a chelatační schopností vedoucí ke snížení jeho demineralizace (Setarehnejad et al., 2010; Vacca et al., 2000).

3.2.1.4 Termostabilita a acidobazická stabilita kaseinomakropeptidu

Při tepelném zpracování mohou nastat ve struktuře proteinů a peptidů vratné či nevratné změny. Jejich rozsah závisí na intenzitě aplikovaného záhřevu. Dalším důležitým faktorem je v ovlivnění bílkovinné struktury hodnota pH prostředí, jež určuje hodnotu povrchového náboje molekuly. V případě gCMP pH určuje také stabilitu glykosidické skupiny, která je citlivá ke kyselé hydrolyze. Stabilita gCMP vůči tepelnému ošetření a kyselosti prostředí je důležitá zejména pro výrobu a skladování produktů obsahujících jako funkční složku jmenovaný polypeptid. Mezi jinými se tímto tématem zabývali i Siegert a kol. (2012). Autoři studovali termostabilitu gCMP vůči různým druhům tepelného ošetření a pH. Substrát podrobili dlouhodobé pasteraci (LTLT, 65 °C, 30 min), šetrné pasteraci (HTST I, 72 °C, 30 s), vysoké pasteraci (HTST II, 85 °C, 4 s), ultrapasteraci (ESL, 127 °C, 2 s), UHT sterilaci (UHT, 135 °C, 5 s) a sterilaci (S, 110 °C, 20 min). Takto připravené vzorky byly skladovány při 3 různých teplotách (4, 10 a 20 °C) za pH v rozmezí 2 – 9 po dobu 12 dnů. Jako standard byl použit tepelně neošetřený polypeptid (N). Termostabilita byla charakterizována jako množství celkové a uvolněné kyseliny *N*-acetylneuraminové (Neu5NAc) a acidobazická stabilita jako množství uvolněné Neu5NAc po 0, 6 a 12 dnech skladování, neboť množství volné Neu5NAc odpovídá degradaci gCMP.

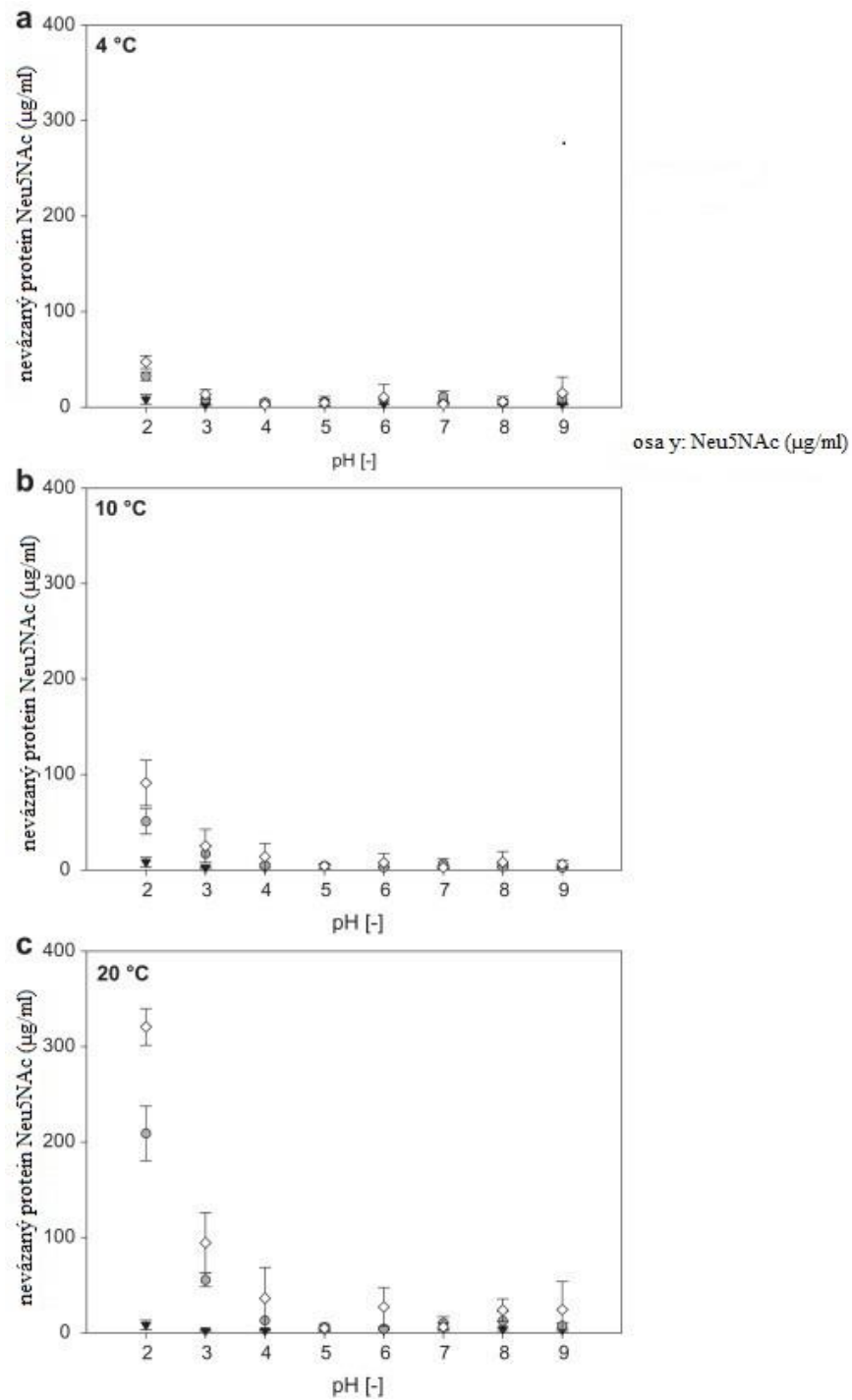
Výsledky stanovení tepelné stability gCMP jsou znázorněny na obrázku 5. Je z nich patrné, že celkové množství vázané Neu5NAc (a) i koncentrace uvolněné Neu5NAc (b) při pH 7 bylo téměř konstantní (celkové množství vázané Neu5NAc ~ 700 µg/ml, množství uvolněné Neu5NAc ~ 0 µg/ml) při všech typech tepelného záhřevu. Při nižších hodnotách pH (2 a 4) pak byl zaznamenán nárůst uvolněné Neu5NAc zejména u vzorků ošetřených vyššími teplotami (ESL, UHT, S), který zároveň odpovídal poklesu celkového množství vázané Neu5NAc. Zaznamenané hodnoty potvrzují, že množství uvolněné Neu5NAc dobře charakterizuje degradaci molekuly polypeptidu. Na základě získaných výsledků lze pak dále říci, že gCMP se vyznačuje za neutrálního pH dobrou termostabilitou vůči všem typům

průmyslově používaných tepelných záhřevů. To je stejný závěr, ke kterému v roce 2004 došli Lieske a kol. Výsledkem jejich studie bylo zjištění stability při neutrálním pH během procesu membránové filtrace. V kyselém prostředí (pH 2) však mohou vysoké teploty sterilačního ošetření vyvolat až ztrátu funkčnosti polypeptidu. Může díky nim dojít ke změnám stavby glykosidového zbytku gCMP či k přechodu na neglykosylovaný CMP. To vede k významným modifikacím jeho technologických a biologických vlastností. Nicméně, některé uvolněné oligosacharidické skupiny si mohou stále zachovat svou biologickou aktivitu a schopnost vázat například patogenní mikroorganismy nebo toxiny (Abe et al., 1991; Lieske et al., 2004; Siegert et al., 2012).



Obrázek 5: Stanovení termostability gCMP. Závislost celkového obsahu Neu5NAc (a) a obsahu uvolněné Neu5NAc (b) na tepelném ošetření. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku z 3 paralelních měření. Tepelně neošetřený gCMP (N), dlouhodobá pasterace (LTLT), šetrná pasterace (HTST I), vysoká pasterace (HTST II), ultrapasterace (ESL), UHT sterilace (UHT), sterilace (S). □ – pH 2, ○ – pH 4 ▲ – pH 7 (Siegert et al., 2012).

Výsledky stanovení acidobazické stability během skladování jsou uvedeny na obrázku 6. Je na nich dobře vidět zvýšená degradace gCMP zejména v silně kyselých (2 – 3) a zásaditých (8 – 9) oblastech pH. Nejlepší stabilita polypeptidu byla naopak zaznamenána v neutrálním prostředí (pH 7) stejně jako při stanovení termostability. Bylo pozorováno také vyšší uvolňování Neu5NAc za vyšších skladovacích teplot (10 a 20 °C), optimální je tedy skladovat gCMP za chladu (4 °C) (Siegert et al., 2012).



Obrázek 6: Stanovení acidobazické stability gCMP během skladování. Závislost obsahu uvolněné Neu5NAc na pH a teplotě skladování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku z 3 paralelních měření. ▼ – 0, ● – 6, ◇ – 12 dnů (Siegert et al., 2012).

3.2.2 Biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu

3.2.2.1 Antibakteriální a antivirotický účinek kaseinomakropeptidu

Adheze bakterií na střevní epitel je důležitým faktorem, který ovlivňuje jejich schopnost osídlit a, v případě patogenních kmenů, infikovat trávicí trakt. Řada studií je proto zaměřena na vyhledávání látek s antibakteriálním účinkem, které tomuto jevu dokáží zabránit, a na charakterizaci mechanismu jejich působení. Antibakteriální vlastnosti byly pozorovány i u CMP. Hermes a kol. (2013) se ve svém výzkumu zaměřili na vliv tohoto polypeptidu na adhezi enterotoxigenního kmene *Escherichia coli* K88 (ETEC K88) na střevní buňky. Tento patogen se váže na receptory v intestinálním epitelu pomocí bílkovinných fimbrií, většinou přes glykoproteiny, sialoglykoproteiny nebo glykosfingolipidy.

Autoři charakterizovali antibakteriální účinek gCMP vůči ETEC K88 *in vitro* na buňkách střevní mukózy původem z jejuna, duodena a tlustého střeva odstavených selat. Po přidavku gCMP pozorovali sníženou přilnavost bakteriálních buněk na jejunální mukózu a jejich velmi špatnou schopnost adheze na duodenální mukózu a tkáň tlustého střeva. Hermes a kol. (2013) získané výsledky vysvětlují tím, že příjem gCMP ve stravě pravděpodobně způsobuje nárůst nezpracovaných proteinů, amoniaku a koncentrace isokyselin v tlustém střevě. Takto se dostává vyšší množství bílkovin do jeho zadní části, kde jsou fermentovány bakteriemi a mohou se hromadit na vazebných receptorech ETEC K88 (Fairbrother et al., 2005; Hermes et al., 2013; Nagy et Fekete, 2005). Autoři dále zjistili, že gCMP byl v inhibici adheze ETEC K88 účinnější než jeho neglykosylované homology. Tento polypeptid byl také při průchodu gastrointestinálním traktem štěpen v menší míře než neglykosylované varianty. To je pravděpodobně zapříčiněno jeho složitější strukturou, jež činí molekulu méně přístupnou působení endogenních proteáz, jako jsou trypsin, chymotrypsin a pepsin (Brody, 2000; Hermes et al., 2013).

Laparra a kol. (2013) studovali antibakteriální vlastnosti hydrolyzovaného kravského gCMP a galaktooligosacharidů odvozených od laktózy (GOS-La) a laktulózy (GOS-Lu) vůči *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *typhimurium* CECT 443 a *Listeria monocytogenes* CECT 935. Antibakteriální účinek vybraných látek byl posuzován dle míry přilnutí bakteriálních buněk k mucinu a dle množství produkovaných zánětlivých cytokinů střevním epitelem (IL-1 β a TNF- α).

Autoři pozorovali, že v rámci vybraných patogenů měl za standardních podmínek vyšší schopnost adheze na mucin kmen CECT 443. Aplikace GOS-Lu nepřineslo ani u jednoho z patogenů žádné významné změny v charakterizované vlastnosti. Oproti tomu

přídavek GOS-La významně snížil adhezní schopnosti CECT 443 a glykosylované hydrolyzáty gCMP obou mikroorganismů. Tyto výsledky lze pravděpodobně vysvětlit blokací vazebných míst na povrchu střevních epitelálních buněk (mucinu), které využívají použité kmeny bakterií, pomocí GOS-La a hydrolyzátů gCMP obsahujících cukerný zbytek.

Dále bylo zjištěno, že inokulace střevního epitelu buněčnou suspenzí CECT 443 i CECT 935 vyvolalo produkci cytokinů IL-1 β a TNF- α . Koncentrace IL-1 β významně vzrostla i v případě přídavku GOS-La a směsi hydrolyzovaného gCMP s GOS-La, pravděpodobně jako výsledek jejich metabolizace patogeny. Aplikace GOS-Lu toto zvýšení syntézy cytokinu IL-1 β v případě CECT 935 nevyvolala, stejně jako přídavek hydrolyzátů gCMP a jejich směsi s GOS-Lu u obou patogenů. Oba testované oligosacharidy a hydrolyzát gCMP pak úspěšně snížily sekreci TNF- α u kmene CECT 935. To naznačuje schopnost těchto látek narušit interakci mezi CECT 935 a buňkami střevního epitelu, čímž by mohly působit jako podpora přirozené střevní bariéry (Kagnoff et Eckmann., 1997; Laparra et al., 2013).

Malkoski a kol. (2001) a Thomä-Worringer a kol. (2006), ve svých *in vivo* studiích dokázali, že nativní nebo hydrolyzovaný CMP účinně inhibuje řadu dalších bakteriálních patogenů. Jedním z příkladů je sekvence 138 - 158 polypeptidového řetězce, jež obsahuje monofosforylovaný serin v pozici 149. Tento hydrolytický štěp polypeptidu úspěšně působil proti pomnožování patogenních kmenů *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* a *Escherichia coli*. Autoři dále poukázali na schopnost CMP zamezit vazbě toxinů cholery na jejich oligosacharidových receptorech na buněčné stěně a chránit tělní buňky před infekcí virem chřipky (Dziuba et Minkiewicz, 1996; Kawasaki et al., 1993; Malkoski et al., 2001; Thomä-Worringer et al., 2006).

3.2.2.2 Prebiotický účinek kaseinomakropeptidu

Probiotické mikroorganismy, mezi něž patří mimo jiných i vybrané kmeny laktobacilů a bifidobakterií, jsou obecně kultury, které vyžadují pro úspěšný růst nutričně bohatá média. Citlivé jsou zejména bifidobakterie, jež navíc obtížněji prospívají v živných prostředích na bázi mléka, neboť potřebují jednodušší zdroje dusíku. Látky, jež selektivně podporují růst probiotických mikroorganismů, jsou nazývány prebiotika. Mezi ně je řazen i CMP a výzkumu jeho prebiotických vlastností byla věnována řada prací (Robitaille et Champagne, 2014).

Cievárek a kol. (2010) porovnávali účinky přídavku 2 % hovězího CMP, kombinace ovčího a kozího CMP a hovězích syrovátkových bílkovin na růst a produkci kyselin kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 a *Bifidobacterium bifidum* CCDM 94

v odstředěném mléce. *B. lactis* totiž vykazuje zajímavé technologické charakteristiky, které zahrnují toleranci kyslíku a kyselin. To vytváří lepší možnosti jejich využití v porovnání s ostatními druhy bifidobakterií při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Pro svůj růst však potřebují dostatek volných aminokyselin a peptidů (Petschow et Talbott, 1991). Autoři charakterizovali růst a fermentační schopnost zvolených kmenů probiotik v 10 různých médiích: 1 (odstředěné mléko s 0,5 % tuku a s přidavkem 0,5 % kyseliny glutamové, 0,5 % kvasničného extraktu, 0,05 % *L*-cystein-HCl a 0,05 % kyseliny askorbové), 2 (médiu 1 s 2% přidavkem CMP), 3 (odstředěné mléko s 0,5 % tuku, 0,5% kvasničného extraktu a 0,05% *L*-cystein-HCl), 4 (médiu 3 s 2% přidavkem CMP), 5 (odstředěné mléko s 0,5 % tuku, 0,05 % *L*-cystein-HCl a 0,05 % kyseliny askorbové), 6 (médiu 5 s 2% přidavkem CMP), 7 (odstředěné mléko s 0,5 % tuku, 0,5 % kvasničného extraktu a 0,05 % kyseliny askorbové), 8 (médiu 7 s 2% přidavkem CMP), 9 (odstředěné mléko s 0,5 % tuku) a 10 (médiu 9 s 2% přidavkem CMP). Zaznamenali, že kmen *B. lactis* BB12 rostl ve všech studovaných médiích, samozřejmě v závislosti na inokulu, což je vidět v tabulce 1. Nízké inokulum nebylo schopné fermentovat médiu 3, 9, 10. Nejnižší hodnoty pH (4,1) u nízkého inokula bylo dosaženo v médiích 2, 4, 7 a 8 a při pH 4,2 v 1. Nejnižší hodnota pH u vysokého inokula byla v médiu 3, 7 (pH 4,0) a 2 (pH 4,1). *B. bifidum* CCDM 94 bylo schopno snížit hodnotu pH v téměř všech studovaných médiích více ($p > 0,05$) než *B. lactis* BB12. V médiích 1, 2, 4, 7 a 8 bylo dosaženo u obou kultur při obou velikostech inokula nejnižší hodnoty pH (3,9 – 4,0). Nejhůře byla naopak fermentována média 3 (pH 5,7) a 10 (pH 5,9). *B. bifidum* CCDM 94 vždy produkovalo významně ($p > 0,05$) vyšší množství kyselin. Celkově nejlepších výsledků bylo tedy dosaženo při přidavku kravského CMP, za nímž následovala kombinace ovčího a kozího CMP. Rozdíl mezi nimi však nebyl statisticky významný ($p < 0,05$). Prebiotický účinek CMP lze pravděpodobně vysvětlit tím, že polypeptid neobsahuje pouze pro bifidobakterie dobře dostupný dusík, ale také fermentovatelné aminocukry, jako je kyselina sialová a GalNAc (Azuma et al., 1984; Cicvárek et al., 2010).

Tabulka 1: Vliv přidavku CMP na růst probiotických mikroorganismů v závislosti na aktivní kyselosti média. Výsledky jsou ve formě aritmetického průměru z 3 paralelních měření (Cicvárek et al., 2010).

Médium	Nízké inokulum				Vysoké inokulum			
	CCDM 94 ^a		BB12 ^b		CCDM 94 ^a		BB12 ^b	
	pH [-]	CPM ^c [log KTJ]	pH [-]	CPM ^c [log KTJ]	pH [-]	CPM ^c [log KTJ]	pH [-]	CPM ^c [log KTJ]
1	3,9	8,5	4,2	9,5	3,9	8,9	4,4	8,6
2	3,9	8,9	4,1	8,6	4,0	8,7	4,1	8,6
3	5,7	9,0	6,4	4,8	3,9	8,4	4,0	9,4
4	4,0	8,6	4,1	9,5	4,0	9,1	4,2	8,9
5	4,7	6,7	4,6	9,1	4,8	4,7	4,5	8,9
6	4,4	8,0	4,9	7,3	4,4	7,9	4,7	7,8
7	3,9	9,0	4,1	9,1	4,7	9,0	4,0	9,5
8	3,9	9,3	4,1	9,3	4,2	8,8	4,2	9,1
9	4,5	8,8	6,6	7,0	4,4	8,6	4,8	8,9
10	5,9	0,9	6,4	8,5	6,0	5,5	4,9	8,5

^a*Bifidobacterium bifidum*

^b*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

^ccelkový počet mikroorganismů

Cílem separátu Robitailla (2013) bylo zhodnotit vliv glykosylačních a sekvenčních variací mezi kravským a kozím CMP na jeho prebiotické vlastnosti. Autor zvolil přidavek 2 mg/ml CMP (směs glykosylovaného a neglykosylovaného CMP) nebo β -laktoglobulinu a stanovoval změnu růstu 2 vybraných kmenů probiotik, *Lactobacillus rhamnosus* RW-959-M a *Bifidobacterium thermophilum* RB 267. Bylo zjištěno, že aplikace CMP zvýšila mikrobiální růst v průměru 1,2 až 1,8 \times , což bylo více ($p > 0,05$), než v případě β -laktoglobulinu. CMP také snížil čas potřebný k dosažení maxima růstové křivky a zvýšil hustotu buněk. Nebyl však pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi působením kravského a kozího CMP, což je v souladu s výsledky Cicvářka a kol. (2010) (Cicvárek et al., 2010; Robitaille, 2013).

Robitaille a Champagne (2014) se zaměřili na hodnocení prebiotických vlastností hydrolyzátů CMP připravených ošetřením polypeptidu pepsinem nebo trypsinem (dávka 0,5 g/l). Jako růstového média bylo použito MRS agaru nebo odstředěného mléka a jako probiotických kmenů opět bakterií *Lactobacillus rhamnosus* RW-959-M a *Bifidobacterium thermophilum* RB 267. Bylo pozorováno, že pepsinový hydrolyzát CMP může podporovat růst obou kultur, které rostly špatně v MRS i odstředěném mléce. Zaznamenané zlepšení bylo v závislosti na kmenu zhruba 1,5 \times pro MRS a 1,7 až 2,6 \times pro mléko. Trypsinový hydrolyzát

CMP byl pak v porovnání s pepsinovým méně ($p > 0,05$) účinný u všech analyzovaných kmenů ve všech použitých růstových médiích. (Robitaille et Champagne, 2014).

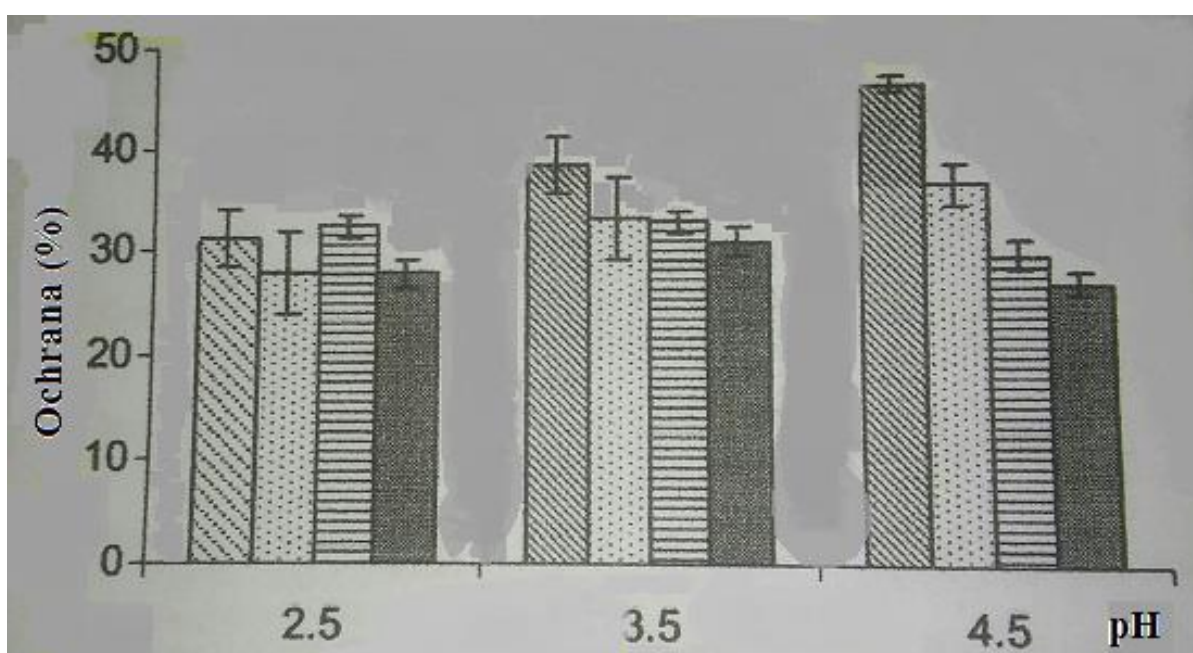
Muthaiyan a kol. (2012) studovali prebiotické vlastnosti konjugátů CMP s galaktooligosacharidy (GOS), jež byly připraveny pomocí Maillardovy reakce. Účinek těchto látek byl charakterizován jako vliv na růst a toleranci žluči kmenem *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517, když byly konjugáty CMP s GOS použity jako jediný zdroj uhlíku. Autoři prokázali schopnost vybraných probiotických mikroorganismů nejen fermentovat konjugáty CMP s GOS, ale také jejich zvýšenou rezistenci vůči koncentraci žluči po aplikaci těchto látek. To činí konjugáty CMP s GOS potenciálním víceúčelovým prebiotickým substrátem tvořícím zkvasitelný zdroj pro produkci prospěšných metabolitů v hostitelském organismu (Muthaiyan et al., 2012). Bouhallab a kol. (1993) a Thomä-Worringer a kol. (2006) pozorovali, že 2 hydrolyzáty CMP s různou molekulární hmotností stimulovaly růst bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* v odstředěném mléce (Bouhallab et al., 1993; Thomä-Worringer et al., 2006).

3.2.2.3 Antikariogenní vlastnosti CMP

Jednou z dalších bioaktivních vlastností CMP, jež je intenzivně studována, je jeho antikariogenní účinek. Bylo totiž pozorováno, že polypeptid může účinně inhibovat přilnutí bakterií způsobující zubní kaz jako *Streptococcus mutans*, *sanguis* a *sobrinus* na zubní sklovinu, čímž pozitivně mění složení mikrobioty zubního plaku (Thomä-Worringer et al., 2006).

Touto problematikou se zabývali také Setarehnejad a kol. (2010), kteří charakterizovali adsorpci CMP a jeho vliv na rozpustnost HA, jež sloužil jako model pro zubní sklovinu. Podmínky jejich experimentu a použité substráty již byli popsány v kapitole 3.2.1.3. Autoři zaznamenali, že všechny použité formy polypeptidu (cCMP, gCMP, aCMP a mCMP) prokázaly dobrou adhezivitu na HA při všech zvolených hodnotách pH (2,5; 3,5; 4,5). Jak je patrné z obrázku 7, nejvyšší ochranný účinek (28 – 32 %) byl celkově pozorován pro pH 2,5. To lze pravděpodobně vysvětlit nejvyšší mírou rozpustnosti HA (nejsilnějším uvolňováním Ca a P ze sloučeniny) při této aktivní kyselosti (Larsen et Nyvad, 1999). V rámci jednotlivých typů bylo nejlepší ochrany HA vůči demineralizaci dosaženo při použití cCMP (45 %) při pH 4,5. Tento substrát také prokázal vzrůstající trend ochranného účinku z 30 na 45 %, který byl vyšší než u mCMP bez zbytkových syrovátkových proteinů. Přítomnost těchto zbytkových proteinů u cCMP by tedy mohla ovlivnit míru redukce

rozpuštěnosti HA. Autoři se domnívali, že lepší antidemineralizační funkce cCMP je pravděpodobně způsobena zbytkovým obsahem syrovátkových bílkovin v substrátu, zejména α -laktalbuminu. Tento protein má totiž schopnost vázat při pH 4,5 Ca. Tato studie tedy ukázala, že cCMP, gCMP, aCMP a mCMP měly ochranný účinek proti kyselému rozpouštění HA. Všechny formy CMP chránily HA v kyselém pH a jejich účinky rostly s rostoucím pH pro cCMP, gCMP. Výsledky studie prokázaly, že CMP, v závislosti na své formě a čistotě, by mohl účinně, díky adsorpci na zubní sklovinu, působit vůči její demineralizaci a chránit ji před narušením patogeny podílejícími se na vzniku zubního kazu (Lønnerdal et Glazier, 1985; Setarehnejad et al., 2010).



Obrázek 7: Vliv přidavku CMP na demineralizaci HA. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 3 paralelních stanovení. ▨ cCMP; ▩ gCMP; ▨ aCMP; ■ mCMP (Setarehnejad et al., 2010).

3.2.2.4 Vliv kaseinomakropeptidu na gastrointestinální trakt

Problematika působení CMP na gastrointestinální soustavu a její funkce je studována zhruba od roku 1970. Jedny z prvních hypotéz vyslovili vědci z Výživového institutu Moskevské Lékařské Akademie, kteří zdůrazňovali roli tohoto polypeptidu při žaludeční sekreci u novorozenečných savců. Na pokusných zvířatech (psi a krysy) bylo pozorováno, že intravenózní infúze s obsahem CMP (směsi s obsahem gCMP a čisté frakce o koncentraci 0,1 až 3,3 mg/kg živé váhy) vedla k potlačení sekrece žaludečních kyselin a naopak

ke stimulaci syntézy žaludečních proteáz (Guilloteau et al., 1994; Slygin et al., 1974). Tyto pochody jsou indukovány hormonálně a pomocí různých stimulantů, například gastrinem a jeho C-koncovým tetrapeptidem, pentagastrinem, histaminem a příjmem potravy. Zaznamenaná doba odezvy byla relativně dlouhá (1 až 2 h po infúzi, v případě čistého gCMP 30 min) a účinky trvaly v průměru 3 až 5 h (Stan et al., 1983). Tyto výsledky by mohly být pravděpodobně vysvětleny snížením hladiny gastrinu v krvi a žaludečních tkáních. Abd El-Salam a kol. (1996) navíc zaznamenali, že intravenózní injekce pepsinových hydrolyzátů kaseinu nejen snižovala sekreci žaludečních kyselin u psů, ale také stimulovala jejich pankreatickou sekreci, tlumila žaludeční a střevní motilitu a zpomalovala aktivitu dvanáctníku (Abd El-Salam et al., 1996; Pedersen et al., 2000; Yvon et al., 1994).

Autoři Yvon a kol. (1994) využili ve svém pokusu telata krmená náhražkou mléka založenou na syrovátkových proteinech bez CMP. Zjistili, že intravenózní infúze CMP během jídla (v dávce 2 mg/kg živé váhy) vyvolala u experimentální skupiny mírné snížení koncentrace H^+ iontů ve slezu, ale nevedla k výrazným změnám v celkovém množství vyprodukovaných žaludečních sekretů (šťáv, kyselin a enzymů) ve srovnání s kontrolním stádem, jemuž CMP podáván nebyl. Naopak zaznamenali, že jakmile byla CMP v koncentraci odpovídající jeho nativnímu obsahu v kravském mléce (210 mg/kg živé váhy) obohacena telecí krmná dávka, došlo ke zpomalení jak žaludeční sekrece (šťávy, kyseliny a enzymy), tak i ke snížení koncentrace gastrinu a zejména cholecystokininu (CCK) a ke zvýšení obsahu somatostatinu v plazmě. Tyto účinky byly pozorovány během prvních 2 h po krmení. Oproti tomu při pětinasobně vyšších dávkách polypeptidu byly jmenované změny mírnější nebo žádné (Yvon et al., 1994). U prasat bylo při přidavku CMP do stravy zaznamenáno zvýšení produkce slinivkových šťáv. Bylo potvrzeno, že tento jev nesouvisí s celkovou dávkou proteinů v krmné dávce, neboť podání dvacetinásobku celkového množství kaseinu bez obsahu CMP oproti kontrolnímu vzorku nemělo žádný účinek. Navíc byla zaznamenána korelace odezvy sekrece slinivky na koncentraci CMP v duodenální infúzi obsahující směs látek podporujících trávení (Guilloteau et al., 1994). Při výzkumu účinku tohoto polypeptidu na lidský gastrointestinální trakt bylo mimo jiné zjištěno, že orální podání 4 g CMP snížilo po 30 min o 15 % sekreci žaludečních kyselin. Neboť stejný účinek nebyl pozorován při dávce 1 g, lze říci, že není funkcí pufrační kapacity polypeptidu (Guilloteau et al., 1994; Yvon et al., 1993; Yvon et al., 1994).

Řada studií zaměřených na toto téma byla provedena také *in vitro* pomocí izolovaných orgánů, především krysího původu. Přídavek hydrolyzáta gCMP v množství 1 mg/ml do uchovávacího roztoku pro izolovaný krysí žaludek například vyvolal po 30 min 51%

snížení vylučování kyselin. Autoři Cuber a kol. (1989) použili pro tvorbu systému eliminujícího ostatní stimuly mimo přidavku CMP, jež by se mohly podílet na sekreci CCK *in vivo*, izolovaný krysí dvanáctník a lačník. Při infúzi polypeptidu (délka trvání 30 min, dávka odpovídající nativnímu množství) bylo pozorováno okamžité zvýšení hladiny CCK v krvi, které dosáhlo své maximální hodnoty během prvních 10 min. Tato nejvyšší zaznamenaná hladina hormonu, pak přetrvávala během celé doby podávání infúze (Beucher et al., 1994; Cuber et al., 1989; Guilloteau et al., 1994; Yvon et al., 1994).

Z výsledků uvedených prací vyplývá, že významnou roli při účinku CMP na gastrointestinální trakt hraje struktura polypeptidu. Čas a způsob odezvy zkoumaných orgánů záleží na přítomnosti cukerných zbytků v molekule, případně na typu hydrolyzátu. Díky úspěšné aplikaci CMP modifikovaného proteolýzou bylo demonstrováno, že úplná molekula polypeptidu není k vyvolání požadovaného účinku zapotřebí. Pro podporu sekrece CCK je však nutný obsah glykosidických skupin, jež obsahují kyselinu sialovou. Mechanismus účinku polypeptidu na trávicí trakt zatím nebyl plně objasněn. Na základě výsledků popsaných výše se lze domnívat, že CMP působí na buněčné mechanismy žaludečních a střevních (luminálních) receptorů a tedy na sekreční buňky těchto orgánů (Yvon et Pelissier., 1987; Yvon et al., 1993; Yvon et al., 1994).

3.2.2.5 Vliv kaseinomakropeptidu na pankreatickou sekreci

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, CMP má schopnost ovlivňovat pankreatickou sekreci. Touto problematikou se zabývali mimo jiných i Pedersen a kol. (2000). V jejich studii byl laboratorním krysám intraduodenálně podán sodík (ve formě solného roztoku) nebo bikarbonát spolu s různými druhy bílkovin (gluten, syrovátkové proteiny bez obsahu CMP a izolát CMP) a následně charakterizována pankreatická odpověď. Jako kontrola bylo použito standardní krmení.

Autoři zaznamenali, že aplikace čistého roztoku NaCl neměla žádný pozorovatelný účinek na pankreatickou sekreci. Při podání standardní krmné dávky byla odpověď tohoto orgánu významná mezi 40. a 100. min pro sodík i bikarbonát. Gluten a syrovátkové bílkoviny neobsahující CMP pak vyvolaly jen malou stimulaci pankreatické sekrece, která byla významná pouze pro bikarbonát. Nárůst charakterizované orgánové odpovědi byl významně ($p > 0,05$) nižší než při podání izolátu CMP. V případě polypeptidu byla zaznamenána vzrůstající pankreatická sekrece, jež vrcholila v závislosti na jeho koncentraci ve 20. až 40.

(0,1 a 0,2 g CMP) nebo 40. až 60. min (0,4 a 0,8 g CMP) a na bazální úroveň klesla nejdříve 2 h po aplikaci (0,1 a 0,2 g polypeptidu).

Na základě těchto výsledků autoři dokázali, že podání CMP v dostatečném množství významně stimuluje sekreci pankreatu a to jak její intenzitu, tak délku. Zároveň postulovali, že pozorované lze pravděpodobně vysvětlit vlivem polypeptidu na uvolňování CCK (Pedersen et al., 2000).

3.2.2.6 Vliv kaseinomakropeptidu na regulaci hmotnosti

Jak již bylo podrobněji popsáno v kapitole 3.2.2.4 a 3.2.2.5, CMP má schopnost stimulovat sekreci CCK, jež mimo jiné ovlivňuje pocity sytosti a hladu v organismu. Příklad polypeptidu nebo jeho biologicky aktivních frakcí do lidské stravy by tedy mohl uspořádat dosažení pocitu sytosti, čímž by mohl být využit k snížení příjmu energie a regulaci hmotnosti (Abd El-Salam et al., 1995; Koegh et al., 2010; Pedersen et al., 2000). Touto problematikou se mezi jinými zabývali i Gustafson a kol. (2001), Hursel a kol. (2010) a Koegh a kol. (2010).

Gustafson a kol. (2001) provedli studii, které se zúčastnilo 20 mužů a 32 žen ve věku mezi 18 až 35 lety. Ženy nesměly být gravidní, kojící a mít nepravidelný menstruační cyklus. Zájemkyně splňující uvedené podmínky absolvovaly testovací období během folikulární fáze menstruačního cyklu. Respondenti v experimentální skupině (26) konzumovali mimo pravidelné stravy zahrnující snídaně, obědy a večere nekalorický nápoj s ovocnou příchutí a přísadkou CMP po dobu 5 dnů. Nápoj podávaný kontrolní skupině (26) polypeptid neobsahoval. Vyhodnocení výzkumu je uvedeno v tabulce 2 a 3. Autoři zjistili, že ženy obecně zkonsumovaly ($p > 0,05$) méně jídla ve srovnání s muži. Energetický příjem před obědem pak u obou pohlaví koreloval s příjmem energie po obědě. Výsledky neprokázaly žádnou korelaci mezi reakcí na přísadu CMP a pohlavím. Také nebyl ani u jednoho z pohlaví pozorován žádný vliv zahrnutí tohoto polypeptidu do stravy na objektivní či subjektivní pocit sytosti, nasycení nebo chuti k jídlu (Gustafson et al., 2001).

Tabulka 2: Vliv přidavku CMP na množství zkonsumované stravy a přijaté energie. Výsledky jsou vypočítány metodou nejmenších čtverců (Gustafson et al., 2001).

Skupina	Hmotnost oběda [g]	Energie oběda [J]	Energie před obědem [J]	Energie po obědě [J]	Celková energie [J]
1	345,9 ± 15,3	3212,9 ± 142,3	2264,8 ± 209,6	5084,8 ± 354,0	7349,6 ± 405,8
2	344,0 ± 15,2	3195,3 ± 141,0	2512,1 ± 209,2	4590,7 ± 351,5	7066,4 ± 403,3
3	342,4 ± 15,4	3180,3 ± 143,1	2320,9 ± 210,9	5102,0 ± 356,1	7422,4 ± 407,9
4	341,2 ± 14,8	3169,4 ± 137,7	1993,7 ± 202,1	5546,3 ± 341,4	7495,6 ± 391,6

Tabulka 3: Vliv přidavku CMP na množství zkonsumované stravy a přijaté energie v závislosti na pohlaví. Výsledky jsou vypočítány metodou nejmenších čtverců (Gustafson et al., 2001).

Pohlaví	Hmotnost talíře [g]	Energie oběda [J]	Energie před obědem [J]	Energie po obědě [J]	Celková energie [J]
Ženy	270,5 ± 9,2	2512,9 ± 85,9	1892,8 ± 126,4	4453,0 ± 213,8	6305,3 ± 245,2
Muži	416,2 ± 12,0	3866,0 ± 111,3	2653,1 ± 164,8	5708,6 ± 278,2	8361,7 ± 318,8

Cílem Koegha a kol. (2010) bylo charakterizovat účinek stupně glykosylace CMP na pocit sytosti a příjem potravy. Jako substrát byly použity 3 typy gCMP, CMP s nízkým stupněm glykosylace (3,5 % NeuNAc a 1,5 % Gal), gCMP (12,0 % NeuNAc a 4,2 % Gal) a koncentrát syrovátkových bílkovin (WPC) ochuzený o gCMP. Testovací panel byl tvořen 20 muži s nadváhou (průměrná hmotnost 97,4 kg) ve věku 57 let s BMI 31,5. Respondenti zkonsumovali během 3 dnů celkem 4 50g dávky vybraného typu substrátu (kontrolní skupině byla podávána glukóza), které obsahovaly průměrně 895 kJ. Účinek aplikace polypeptidu byl posuzován ve vztahu k sekreci CCK (vzorky krve byly odebrány před a po konzumaci gCMP v časovém rozpětí 15, 30, 60, 90, 120 a 180 min), subjektivnímu pocitu sytosti (záznamy byly provedeny ve stejných časových intervalech jako odběry krve) a množství přijaté potravy (během experimentu bylo panelistům poskytnuto teplé jídlo *ad libitum*). Bylo zjištěno, že přijímaná energie v době oběda nebyla rozdílná u jednotlivých typů gCMP. Podle tabulky 4 byla celková přijatá energie při podávání syrovátkového koncentrátu ochuzeného o gCMP 3985 kJ. V porovnání s energetickým příjmem při požívání jednotlivých substrátů gCMP i kontrolní glukózy byl tedy rozdíl minimální (gCMP 3785 kJ, CMP s nízkým stupněm glykosylace 3797 kJ a glukóza 3870 kJ) (Koegh et al., 2010).

Tabulka 4: Vliv WPC a CMP s různým stupněm glykosylace na příjem energie a makronutrientů. Výsledky jsou uvedeny jako střední hodnota z 20 paralelních měření \pm směrodatná odchylka (Koegh et al., 2010).

	WPC		gCMP		CMP		Glukóza	
	Střední hodnota	SD	Střední hodnota	SD	Střední hodnota	SD	Střední hodnota	SD
Energie [kJ]	3985	917	3785	1037	3797	1023	3870	999
Bílkoviny [g]	63,8	18,3	61,3	19,6	61,0	16,6	63,4	18,7
Tuky [g]	21,5	6,9	20,6	7,1	20,3	6,6	21,5	6,8
Sacharidy [g]	119,8	26,6	112,5	31,4	113,6	35,7	113,4	30,5

Autoři po vyhodnocení výsledků shrnuli, že ani jeden z typů gCMP neměl vliv na žádný ze stanovovaných parametrů, tedy že aplikace CMP bez ohledu na jeho stupeň glykosylace neovlivnila sekreci CCK, subjektivní pocit sytosti ani příjem potravy (Koegh et al., 2010). Toto zjištění je v rozporu s jinými studiemi, které byly provedeny v dané oblasti. Například autoři Bowen a kol. (2006) uvádějí, že 19 obézních mužů konzumujících jídlo s podobnými substráty (52 g syrovátkových nebo kaseinových bílkovin a 56 g laktózy a glukózy) měli o 10 % vyšší energetický příjem. Také hladina CCK byla o 71 % vyšší po 90 min konzumace bílkovin než v případě cukrů (Bowen et al., 2006; Koegh et al., 2010).

Hursel a kol. (2010) hodnotili účinek přídatku syrovátkových proteinů s přirozeným obsahem CMP avšak ochucených o α -laktalbumin a izolátu α -laktalbuminu do jogurtového nápoje z plnotučného mléka na výdej energie a potlačení chuti k jídlu. Studie se zúčastnilo celkem 18 žen a 17 mužů ve věku 20 a 21 let s BMI 23. Jogurtový nápoj byl respondentům podáván k snídani po dobu 3 následujících týdnů. Autoři zaznamenali, že konzumace obou typů obohaceného jogurtového nápoje k snídani vedla u panelistů ke zvýšení energetického výdeje a zlepšení rovnováhy bílkovin a tuku v organismu. Podle autorů Vedhorse a kol. (2009) výsledek této studie potvrzuje, že vysokobílkovinná snídane zvyšuje termogenezi v porovnání s nízkobílkovinnou snídaní. Z hlediska potlačení chuti k jídlu a snižování pocitu hladu pak bylo lepších výsledků dosaženo v případě produktu obohaceného o α -laktalbumin. Toto lze pravděpodobně vysvětlit energetickou náročností kaseinu, která je menší (8,2 kJ/ATP) v porovnání s α -laktalbuminem a syrovátkou (8,6 a 8,4 kJ/ATP) (Hursel et al., 2010; Vedhors et al., 2009).

3.2.2.7 Další biologické vlastnosti kaseinomakropeptidu

Struktura molekuly CMP vykazuje díky svému složení významné antialergenní a dietetické vlastnosti. Polypeptid je charakteristický absencí fenylalaninu, je tedy vhodný jako zdroj aminokyselin pro fenylketonuriky. Díky vysokému obsahu aminokyselin s rozvětveným řetězcem (valinu, leucinu a isoleucinu) a zároveň deficitu aromatických aminokyselin ho lze dále s výhodou využít v dietě pacientů s onemocněními jater (Abd El-Salam et al., 1996). Kyselina sialová, jež je součástí cukerného zbytku gCMP, je v poměrně vysokých koncentracích přítomna v nervové tkáni (v mozku a centrálním nervovém systému) ve formě gangliosidů a glykoproteinů, které přispívají k funkci buněčných membrán, membránových receptorů a normálnímu vývoji mozku (Wang et al., 2001). Bylo také zaznamenáno, že požívání CMP zvyšuje absorpci zinku (Kelleher et al., 2003). Polypeptid však obsahuje velké množství threoninu, které by při jeho nadměrné konzumaci mohlo způsobit hyperthreanemii (Rigo et al., 2001; Thomä-Worringer et al., 2006).

CMP vykazuje také imunomodulační vlastnosti. Ve studiích zaměřených na tuto problematiku byla po aplikaci polypeptidu pozorována, v závislosti na jeho dávce a obsahu kyseliny sialové, úspěšná inhibice mitogenů vyvolávajících proliferaci lymfocytů či apoptóza určitých lymfocytů.

4 Závěr

Hypotézou této bakalářské práce bylo, že CMP je syrovátková bílkovina, jež je díky své biologické aktivitě vhodná pro využití ve výživě lidí.

Tento polypeptid byl zkoumán pro mnoho zajímavých vlastností, jak funkčních tak především biologických. Jednou z důležitých fyzikálně-chemických vlastností je jeho povrchová aktivita, která byla maximální v alkalickém prostředí a uspokojivá i při hodnotách pH 4,5 – 5,5. Významné jsou také adsorpční schopnosti CMP, které by mohly být s výhodou využity pro tvorbu biologických obalů chránících nutričně významné složky před degradací během výrobního a skladovacího procesu, případně během jejich průchodu trávicím traktem. Dalšími významnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jsou jeho termostabilita a acidobazická stabilita, jež umožňují začlenit CMP jako funkční složku do široké palety potravinářských produktů.

CMP prokázal také řadu bioaktivních účinků. Obecně lze říci, že vyšší bioaktivitu vykazují glykosylované formy polypeptidu, ať už v nativní či hydrolyzované formě. Dobrých výsledků bylo také dosaženo v případě konjugátů CMP s galaktooligosacharidy (zkoumán byl jejich prebiotický potenciál). Mezi významné biologické schopnosti polypeptidu patří zejména antibakteriální a prebiotická činnost. Bylo prokázáno, že aplikace CMP dokázala úspěšně potlačovat růst patogenních kmenů bakterií *Escherichia coli* ETEC K88, *Listeria monocytogenes* CECT 935, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *typhimurium* CECT 443 a *Streptococcus mutans*, *sanguis* a *sobrinus*. Naopak pomnožování *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium bifidum* CCDM 94, *Bifidobacterium thermophilum* RB 267, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517, *Lactobacillus rhamnosus* RW-959-M a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bylo přidavkem polypeptidu podpořeno. Díky dobrým adsorpčním schopnostem, jež byly potvrzeny na modelovém systému HA a byly spojeny s ochranou této sloučeniny vůči demineralizaci, a zároveň inhibicí růstu kmenů *Streptococcus mutans*, *sanguis* a *sobrinus* mechanismem pokrytí vazebných míst pro tyto mikroorganismy, prokázal CMP také antikariogenní vlastnosti.

Polypeptid se dále vyznačuje účinky na zvířecí i lidský gastrointestinální trakt. V řadě studií bylo po jeho aplikaci pozorováno snížení sekrece žaludečních kyselin a žaludeční i střevní motility a naopak zvýšení syntézy žaludečních a pankreatických enzymů a CCK. Jiné práce na toto téma však po přidavku CMP žádné popisované změny nepozorovaly. Rozpory lze vysvětlit různou formou použitého polypeptidu, neboť pro pozitivní vliv na trávicí trakt je důležitý obsah kyseliny sialové, jež je součástí glykosidové skupiny. Ačkoli glykosylovaná

forma CMP moduluje gastrointestinální procesy, jeho pozitivní účinek na objektivní či subjektivní pocit sytosti, nasycení, chuti k jídlu a množství přijaté potravy a energie potvrzen nebyl. Nelze tedy předpokládat, že by přidavek tohoto polypeptidu mohl pomáhat při regulaci hmotnosti.

Závěrem je možno říci, že hypotéza bakalářské práce byla potvrzena a CMP je syrovátková bílkovina, jež je díky své biologické aktivitě vhodná pro využití ve výživě lidí.

5 Seznam literatury

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., Buchheim, W. 1996. Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. *Int. Dairy Journal* 6 (4). 327-341.
- Abe, H., Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., Nagao, E., Tomita, M. 1991. Heat Stability of Bovine Lactoferrin at Acidic pH. *Journal of Dairy Science* 74 (1). 65-71.
- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S. 2003. Effect of High-Hydrostatic Pressure and Temperature on Rheological Characteristics of Glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science* 86 (5). 1535-1540.
- Azuma, N., Yamauchi, K., Mistuoka, T. 1984. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human κ -casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (8). 2159-2162.
- Beucher, S., Levenez, F., Yvo, M., Corring, T. 1994. Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 5 (12). 578-584.
- Bouhallab, S., Favrot, C., Moubois, J. L. 1993. Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Le Lait*. 73 (1). 73-77.
- Bowen, J., Noakes, M., trenerry, C., Clifton, P. M. 2006. Energy Intake, Ghrelin, and Cholecystokinin after Different Carbohydrate and Protein Preloads in Overweight Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91 (4). 1477-1483.
- Brody, E. P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*. 84 (1). S39-S46.
- Cicvárek, J., Čurda, L., Elich, O., Dvořáková, E., Dvořák, M. 2010. Effect of Caseinomacropeptide Concentrate Addition on the Growth of Bifidobacteria. *Czech J. Food Sci.* 26 (6). 485-494.

Cuber, J. C., Vilas, F., Charles, N., Bernard, C., Chayvialle, J. A. 1989. Bombesin and nutrients stimulate release of CCK through distinct pathways in the rat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 256 (6). G989-G996.

Dziuba, J., Minkiewicz, P. 1996. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *International Dairy Journal*. 6 (11-12). 1017-1044.

Fairebrother, J. M., Nadeau, É., Gyles, C. L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*. 6 (1). 17-39.

Grenby, T. H., Andrews, A. T., Mistry, M., Williams, R. J. H. 2001. Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations in vitro. *Journal of Dentistry*. 29 (2). 83-92.

Guilloteau, P., Huerou-Luron, I. L. Chayvaille, J. A. Toullec, L., Legeas, M., Bernard, C., Roger, L., Mendy, F. 1994. Effect of caseinomacropptide (CMP) on gastric secretion and plasma gut regulatory peptides in preruminant calves. *Reproduction Nutrition Development*. 34 (6). 612.

Gustafson, D. R., McMahon, D. J., Morrey, J., Nan, R. 2001. Appetite is not influenced by unique milk peptide: caseinomacropptide (CMP). *Appetite*. 36 (2). 157-163.

Hermes, R. G., Molist, F., Pérez, J. F., Gomes de Segura, A., Ywazaki, M., Davin, R., Nofrarías, M., Korhonen, T. K., Martín-Orúe, M. S. 2013. Casein glycomacropptide in the diet may reduce *Escherichia coli* attachment to the intestinal mucosa and increase the intestinal lactobacilli of early weaned piglets after an enterotoxigenic *E.coli* K88 challenge. *British Journal of Nutrition*. 109 (6). 1001-1012.

Hursel, R., van der Zee, L., Margriet S. Westerterp-Plantenga. 2010. Effects of a breakfast yoghurt, with additional total whey protein or caseinomacropptide-depleted α -lactalbumin-enriched whey protein, on diet-induced thermogenesis and appetite suppression. *British Journal of Nutrition*. 103 (5). 775-780.

- Chobert, J. M., Touati, A. Bernard-Harp, C., Dalgarrondo, M., Nicolas, M. G. 1989. Solubility and emulsifying properties of kappa casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*. 13 (6). 457-473.
- Kagnoff, M. F., Eckmann, L. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *Journal of Clinical Investigation*. 100 (1). 6-10.
- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimot, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M., Nakajima, I. 1993. pH-dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*. 48 (4). 191-196.
- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., Lönnerdal, B. 2003. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77 (5). 1261-1268.
- Keogh, J. B., Woonton, B. W., Taylor, Ch. M., Janakievski, F., Desilva, K., Clifton, P. M. 2010. Effect of glycomacropeptide fractions on cholecystokinin and food intake. *British Journal of Nutrition*. 104 (2). 256-290.
- Laparra, J. M., Hernandez-Hernandez, O., Moreno, F. J., Sanz, Y. 2012. Neoglycoconjugates of caseinomacropeptide and galactooligosaccharides modify adhesion of intestinal pathogens and inflammatory response(s) of intestinal (Caco-2) cells. *Food Research International*. 54 (1). 1096-1102.
- Larsen, M., Nyvad, B. 1999. Enamel Erosion by Some Soft Drinks and Orange Juices Relative to Their pH, Buffering Effect and Contents of Calcium Phosphate. *Carrier Research*. 33 (1). 81-87.
- Lieske, B., Konrad, G., Kleinschmidt, T. (2004). Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. II. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide. *Milchwissenschaft-Milk Science International*. 59. 291-294.

- Lönnerdal, B., Glazier, C. 1985. Calcium binding by α -lactalbumin in human milk and bovine milk. *Journal of Nutrition*. 115 (9). 1209-1216.
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J., Reynolds, E. C. 2001. Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (8). 2309-2315.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. 2013. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. *Advanced Dairy Chemistry*. New York. p.1-548. ISBN: 978-1-4614-4713-9
- Moreno, F. J., López-Fandiño, R., Olano, A. 2002. Characterization and Functional Properties of Lactosyl Caseinomacropeptide Conjugates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50 (18). 5179-5184.
- Muthaiyan, A., Hernandez-Hernandez, O., Moreno, F. J., Sanz, M. L., Ricke, S. C. 2012. Hydrolyzed Caseinomacropeptide Conjugated Galactooligosaccharides Support the Growth and Enhance the Bile Tolerance in *Lactobacillus* Strains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60 (27). 6834-6845.
- Nagy, B., Fekete, P. Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (6-7). 443-454.
- Pedersen, N. L. R., Domaine N. C., Mahé, S., Chariot, J., Rozé, C., Tomé, T. 2000. Caseinomacropeptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides*. 21 (10). 1527-1535.
- Petschow, B. W., Talbott, R. D. 1991. Response of Bifidobacterium Species to Growth Promoters in Human and Cow Milk. *Pediatric Research*. 29 (2). 208-213.
- Prof. Ing. Dr. Prokš, J. 1964. *Mlékařství díl I*. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 63-70 s.

- Rigo, J., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., Nyambugabo, K., Sawatzki, G., Studzinski, F. 2001. An Infant Formula Free of Glycomacropeptide Prevents Hyperthreoninemia in Formula-Fed Preterm Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 32 (2). 127-130.
- Robitaille, G. 2013. Growth-promoting effects of caseinomacropeptide from cow and goat milk on probiotics. *Journal of Dairy Research*. 80 (1). 58-63.
- Robitaille, G., Champagne, C. P. 2014. Growth-promoting effects pepsin- and trypsin-treated caseinomacropeptide from bovin milk on probiotics. *Journal of Dairy Research* 81 (3). 319-324.
- Setarehnejad, A., Kanekanian, A., Tatham, A., Abedi, A. 2010. The protective effect of caseinomacropeptide against dental erosion using hydroxyapatite as a model system. *International Dairy Journal*. 20 (9). 652-656.
- Siegert, S., Tolkach, A., Kulozik, U. 2012. The pH-dependent thermal and storage stability of glycosylated CMP. *LTW – Food Science and Technology*. 47 (2). 407-412.
- Shlygin, G. K., Vasilevskaya, M. P., Chernikov, M. P., Nikolskaya, G. V. 1971. Antigastrin action of glycomacropeptide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 72 (6). 1368-1371.
- Thomä-Worringer, C., J., Sørensen, J., López-Fandiño, R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*. 16 (11). 1324-1333.
- Vacca S. A. M., Bowen, W. H. 2000. The Effects of Milk and Kappa-Casein on Salivary Pellicle Formed on Hydroxyapatite Discs in situ. *Carriers Research*. 34 (1). 88-93.
- Veldhorst, M. A., Nieuwenhuizen, A. G., Hochstenbach-Waelen, A., Westerterp, K. R., Engelen, M. P. K. J., Brummer, R. J. M., Deutz, N. E. P., Westerterp-Plantenga, M. S. 2009. 28 (2). 147-155.

Wang, B., Miller, J. B., McVeagh, P., Petocz, P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74 (4). 510-515.

Yvon, M., Beucher, S., Guilloteau, P., Heurou-Luron, I., Corring, T. 1994. Effects of caseinomacropptide (CMP) on digestion regulation. *Reproduction Nutrition Developement*. 34 (6). 527-537.

Yvon, M., Levieux, D., Valluy, M. C., Pélissier, J. P., Patureau-Mirand, P. 1993. Colostrum Protein Digestion in Newborn Lambs. *Nutrient Requirements and Interactions*. 123 (3). 586-596.

Yvon, M., Pélissier, J. P. 1987. Charakterization and Kinetics of Evacuation Peptides Resulting from Casein Hydrolysis in the Stomach of the Calf. 35 (1). 148-156.

6 Seznam použitých zkratek a symbolů

Ala – alanin

Arg – arginin

ATCC – *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517

ATP – adenosintrifosfát

BB12 – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12

CCDM 94 – *Bifidobacterium bifidum* CCDM 94

CCET 443 – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *typhymarium* CCET 443

CCK – cholecystokinin

CCP – koloidní fosforečnan vápenatý

CECT 935 – *Listeria monocytogenes* CECT 935

CMP – kaseinomakropeptid

CN – kasein

Cys – cystein

EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová

ESL – ultrapasterace

EPEC K88 – *Escherichia coli* K88

FPLC – rychlo-bílkovinná kapalinová chromatografie

gCMP – glykokaseinomakropeptid

GalNAc – *N*-acetylgalaktózamin

GalNAc-ol – *N*-acetylgalaktózaminitol

GMP – glykomakropeptid

Glu – glutamin

Gly – glycin

GOS - galaktooligosacharidy

GOS-La – laktóza

GOS-Lu – laktulóza

HA – hydroxyapatit

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HTST I. – šetrná pasterace

HTST II. – vysoká pasterace

Ile – izoleucin

Leu – leucin

LTLT – dlouhodobá pasterace

Neu5AC, NeuNAc – kyselina *N*-acetylneuraminová

Pro – prolin

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

S – sterilace

SD – směrodatná odchylka

Ser – serin

Thr – threonin

UHT – vysokoteplotní úprava

WPC – bílkovinný syrovátkový koncentrát