

Gangliozidi u mlijeku

doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0302

*Slavica Potočki**, *Marko Mesarić*Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet,
Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju,
Šalata 3, 10000 Zagreb

Prispjelo - Received: 23.10.2015.

Prihvaćeno - Accepted: 16.05.2016.

Sažetak

Gangliozidi su vrsta glikosfingolipida. Prisutni su u tkivima i biološkim tekućinama uključujući i mlijeko sisavaca gdje se nalaze u membrani mliječne lipidne globule. Gangliozidima se daje sve veća važnost zbog njihovih brojnih funkcija. Tako se gangliozidi hrane dovode u vezu s razvojem crijevnog imunološkog sustava. Količina gangliozida koja se unosi hranom mogla bi pridonositi njihovom povoljnom utjecaju na zdravlje, no njihova prosječna količina prisutna u bilo kojoj ljudskoj hrani nije poznata. Ciljevi ovog rada bili su odrediti koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina u mlijeku (ljudsko, kravlje, ovčje, kozje i napitak od soje), te utvrditi postoji li razlika u odnosu na ljudsko mlijeko te ispitati utjecaj pasterizacije na sadržaj gangliozida i sijaloglikoproteina u kravljem mlijeku. Lipidi su ekstrahirani iz mlijeka, te su potom kvantitativno određeni gangliozidi i sijaloglikoproteini. Dobiveni rezultati ukazuju na razliku u koncentracijama gangliozida u kravljem mlijeku različitog udjela mliječne masti. Koncentracija gangliozida u kravljem mlijeku je značajno manja, a u napitku od soje značajno veća u odnosu na ljudsko mlijeko. Koncentracija sijaloglikoproteina u napitku od soje značajno je manja u odnosu na ljudsko mlijeko. Koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina ne razlikuju se značajno u sirovom i pasteriziranom kravljem mlijeku.

Ključne riječi: sfingolipidi, gangliozidi, mlijeko

Uvod

Zadnjih godina posvećuje se puno pažnje funkcionalnoj hrani i bioaktivnim sastavnicama hrane, kao što su specifični proteini, peptidi, lipidi i ugljikohidrati. Funkcionalna hrana je dio uobičajene prehrane koja uz osnovno hranidbeno djelovanje ima i raznovrsne fiziološke dobrobiti (Pravst, 2012), a može reducirati i rizik nastanka kroničnih bolesti. Poznato je da je mlijeko najpotpunija prirodna hrana za sve novorođene sisavce, uključujući i čovjeka. Mnoga istraživanja pokazuju da mlijeko sa svojim brojnim biološki aktivnim sastojcima, kao što su imunoglobulini, antibakterijski peptidi, antimikrobni proteini, oligosaharidi i lipidi, štiti novorođenčad i odrasle od uzročnika bolesti. Bioaktivna mliječna mast je sačinjena s više od 400 masnih kiselina, od kojih se većina nalazi u sastavu triacilglicerola (Jensen, 2002).

Polarni lipidi, glikolipidi i fosfolipidi amfipatskih svojstava, biološki su zanimljiva grupa lipida. Interes za polarne lipide mlijeka raste zbog njihovih prehrambenih i tehnoloških svojstava. Polarni lipidi se nalaze u membrani mliječne lipidne globule (milk fat globule membrane, MFGM) (Yamakawa, 1988; Spitsberg, 2005). Membrana mliječne lipidne globule sastoji se od oko 60 % proteina i 40 % lipida, uglavnom triacilglicerola, kolesterola, fosfolipida i sfingolipida. Zbog mogućih pozitivnih učinaka na zdravlje postoji veliko zanimanje za fosfolipide hrane (Kullenberg i sur., 2012). Sastav MFGM se može mijenjati ovisno o fazi laktacije (Reinhardt i Lippolis, 2008), prehrani (Lopez i sur., 2008) i zdravstvenom stanju mliječne žlijezde (Addis i sur., 2011). Najveći dio sfingolipida čine sfingomijelini te manjim udjelom ceramidi i gangliozidi (Jensen,

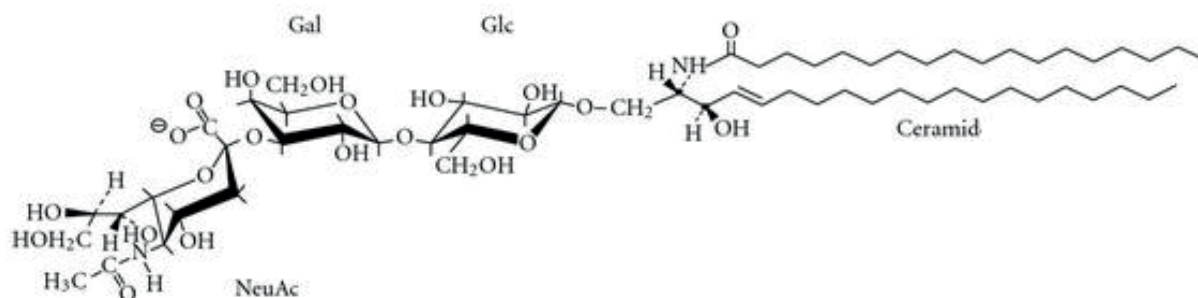
*Dopisni autor/Corresponding author: e-mail: slavica.potocki@mef.hr

2002). Ceramid nastaje vezanjem masne kiseline amidnom vezom na dugolančanu sfingozinsku bazu (Merrill, 2007). Gangliozidi su vrsta glikosfingolipida koji se sastoje od hidrofobnog ceramida i hidrofilnog oligosaharidnog lanca (Svennerholm, 1980) (sl. 1). U sastavu ugljikohidratnog dijela nalaze se uglavnom glukoza, galaktoza i *N*-acetilgalaktozamin te jedna ili više sijalinskih kiselina. Glukoza ili galaktoza se vežu β -glikozidnom vezom na 1-OH ceramida. Strukturne varijacije se mogu javiti i u lipidnom dijelu gangliozida, (kao što su duljina lanca sfingozinske baze i vrsta masne kiseline). Sijalinske kiseline su derivati neuraminske kiseline (Blix i sur., 1957), a u sastavu poznatih gangliozida najčešće se nalazi *N*-acetilneuraminska kiselina (NeuAc), rjeđe *N*-glikolilneuraminska kiselina (NeuGc). U mliječnim proizvodima i biološkim uzorcima sijalinske kiseline se obično nalaze u obliku glikokongugata (glikoproteina, glikolipida i lipopolisaharida), (Yamakava, 1988; Blix i sur., 1955). Sijalinske kiseline pridonose prijeko potrebnim funkcijama tijekom embrionalnog razvoja (Schwarzkopf i sur., 2002).

Gangliozidi imaju brojne biološke funkcije, jer sudjeluju u diferencijaciji, proliferaciji, neurogenezi, regulaciji staničnog rasta, signalizaciji i apoptozi (Allende i Proia, 2002; Park i sur., 2005; Mendez-Otero i Santiago, 2003; Morales i sur., 2004; Svennerholm i sur., 1991). Poznato je da gangliozidi imaju sposobnost vezanja bakterijskih toksina, virusa i peptidnih hormona zbog čega postaju važni antimikrobni, antivirusni i enterotoksinski inhibitori (Colarow i sur., 2003; Delorme i sur., 2001; Suh i sur., 2004; Todeschini i Hakomori, 2008; Fishman, 1982; Otnaess i sur., 1983). Učinak gangliozida hrane povezuje se s razvojem crijevnog imunološkog sustava (Vazquez i sur., 2005;

Newburg i sur., 2005; Ryan i sur., 2013; Varki i Varki, 2007). Gangliozidi su prisutni u visokim koncentracijama u živčanom tkivu, a pronađeni su u malim količinama i u drugim tkivima i tjelesnim tekućinama, uključujući i mlijeko sisavaca (Ando i sur., 1978; Harth i sur., 1978; Pan i sur., 2000; Ledeen i Yu, 1982). Varijacije u vrsti gangliozida ovise o vrsti tkiva (Lacomba i sur., 2010). Ljudski kolostrum i kravlje mlijeko imaju poseban sastav gangliozida. G_{D3} je glavni gangliozid ljudskog kolostruma, kravljeg mlijeka i mliječnih formula, a smanjuje se u prijelaznom i zreom mlijeku, dok se udio G_{M3} povećava do 50 % (Pan i Izumi, 2000). Količina gangliozida se razlikuje i ovisno o dobi (Riboni i sur., 1992; Pan i Izumi, 1999; Puente i sur., 1992), te animalnoj vrsti (Pan i Izumi, 2000). Gangliozidi mlijeka mijenjaju crijevnu floru stimulacijom rasta *Bifidobacterium* vrsta i smanjenjem udjela *Escherichia coli* (Rueda i sur., 1998). Istraživanja pokazuju da povećani unos gangliozida prehranom može povećati koncentraciju gangliozida u animalnim tkivima (Park i sur., 2005). Glavni prehrambeni izvor gangliozida jesu mliječni proizvodi, jaja i meso (Vesper i sur., 1999). Količina gangliozida unesena hranom mogla bi biti važan čimbenik koji doprinosi spomenutoj zdravstvenoj dobrobiti gangliozida. Obzirom da je prosječna konzumacija gangliozida u ljudskoj prehrani još uvijek nepoznata, cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentraciju gangliozida u raznim vrstama mlijeka kao glavnim prehrambenim izvorima gangliozida, te sojinom napitku koji je često u upotrebi kao zamjena za mlijeko. Osim toga, cilj je bio istražiti postoji li značajna razlika u koncentraciji gangliozida i sijaloglikoproteina u raznim vrstama mlijeka u odnosu na ljudsko mlijeko te ispitati utjecaj pasterizacije na njihovu koncentraciju u kravljem mlijeku.

Slika 1. Struktura G_{M3} gangliozida



Materijal i metode

Uzorci

Gangliozidi i sijaloglikoproteini određeni su u pastereziranom kravljem mlijeku (0,9 %, 2,8 % i 3,8 % mliječne masti; Dukat d.o.o., Zagreb, Croatia), sirovom i pastereziranom kravljem mlijeku (2,8 % mm, Dukat d.o.o., Zagreb, Croatia), sirovom ovčjem te pastereziranom kozjem mlijeku (Vindija d.o.o., Varaždin, Croatia) i napitku od soje (Alinor, Italija). Za analizu gangliozida i sijaloglikoproteina upotrijebljeno je po 5 uzoraka navedenih vrsta mlijeka te 20 uzoraka mlijeka zdravih žena (uzorci su prikupljeni od dobrovoljnih davateljica u Klinici za ženske bolesti i porode, Petrova 13, Zagreb, između 3. i 42. dana dojenja).

Ekstrakcija lipida

Uzorci mlijeka (1 mL) su zamrznuti i liofilizirani u uparivaču opremljenom jedinicom za hlađenje. U liofilizirani uzorak se dodaje 2 mL smjese kloroform:metanol:voda ($v:v:v = 4:8:3$) i ostavi 1 sat na tresilici. Nakon toga se smjesa centrifugira, supernatant se odvoji te se na talog doda 1 mL iste smjese otapala. Ostavi se na tresilici 1 sat te se potom centrifugira. Supernatanti se spoje i u njima odredi sadržaj gangliozida, dok se u talogu odredi sadržaj sijaloglikoproteina.

Kvantitativno određivanje gangliozida

Na 20 μL supernatanta dodaje se 480 μL destilirane deionizirane vode, 500 μL Svennerholmovog reagensa i ostavi se 20 minuta u vodenoj kupelji na 100 °C. U ohlađenu smjesu dodaje se 1,5 mL smjese butanol:butil-acetat ($v:v = 15:85$), dobro se promiješa, te se centrifugira 2 minute na 3000 o/min. Nakon toga se očita apsorbancija gornje faze pri 580 nm. Koncentracija gangliozida odredi se interpolacijom iz baždarnog dijagrama priređenog s poznatim koncentracijama *N*-acetilneuraminske kiseline (0,1 mg/mL), (raspon linearnosti 1-10 $\mu\text{g/mL}$).

Svennerholmov reagens se priprema tako da se pomiješa 10 mL 2 %-tnog rezorcinola, 80 mL conc. HCl, 0,25 mL 0,1 M CuSO_4 i nadopuni se do 100 mL destiliranom vodom. Reagens se priprema najmanje 4 sata prije uporabe, a stabilan je do sedam dana na 4 °C (Svennerholm, 1957).

Kvantitativno određivanje sijaloglikoproteina

Na talog se dodaje 150 μL 0,1 M H_2SO_4 , promiješa se i ostavi 1 sat na 80 °C. Nakon toga se centrifugira 10 minuta na 6000 o/min. Za određivanje sijalinske kiseline oslobođene s proteina nakon djelovanja H_2SO_4 uzima se 100 μL supernatanta na koji se dodaje 10 μL 0,1 M CaCl_2 i 20 μL 0,04 M NaIO_4 , promiješa se i ostavi 20 minuta na ledenoj kupelji. Tada se dodaje 250 μL rezorcinolnog reagensa, promiješa se, ostavi 5 minuta u ledenoj kupelji, a nakon toga 15 minuta na 100 °C. Smjesa se ohladi i dodaje se 250 μL *t*-butanola, promiješa i ostavi 3 minute na 37 °C. Nakon toga se očita apsorbancija na 630 nm (Jourdan i sur., 1971). Koncentracija sijaloglikoproteina odredi se interpolacijom iz baždarnog dijagrama priređenog s poznatim koncentracijama *N*-acetilneuraminske kiseline (0,1 mg/mL), (raspon linearnosti 1-10 $\mu\text{g/mL}$).

Rezorcinolni reagens se priprema otapanjem 0,6 g rezorcinola u 40 mL destilirane deionizirane vode, 60 mL conc. HCl i 0,25 mL 0,1 M CuSO_4 (prije uporabe).

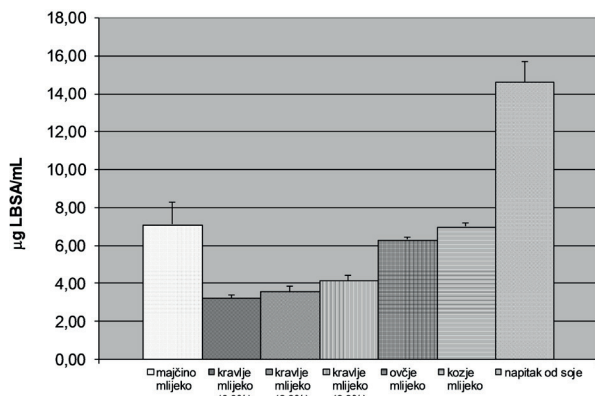
Statistička analiza

Statistička analiza je provedena pomoću Mann-Whitney testa upotrebom MedCalc programskog sustava za obradu podataka (verzija 10.2.0.0). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrijednost $P \leq 0,05$.

Rezultati i rasprava

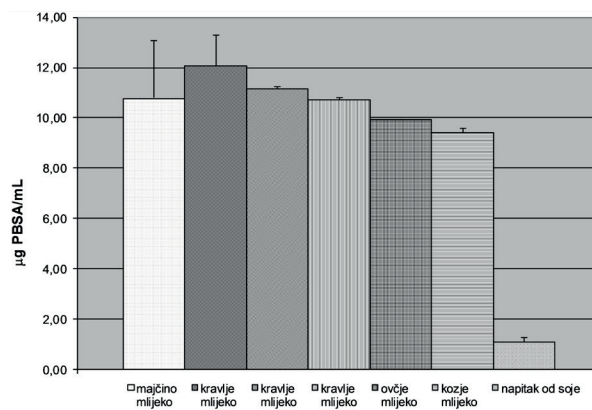
U ovome radu određene su koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina u raznim vrstama mlijeka i mliječnom napitku od soje. Najveća koncentracija gangliozida (izražena kao lipidno vezana sijalinska kiselina), nađena je u napitku od soje (14,61 $\mu\text{g/mL}$), (sl. 2), a sijaloglikoproteina (izražena kao proteinski vezana sijalinska kiselina) u kravljem mlijeku (0,9 %) (12,09 $\mu\text{g/mL}$) (sl. 3). Dobiveni rezultati pokazuju da je u kravljem mlijeku najveća koncentracija gangliozida bila u mlijeku s najvećim udjelom mliječne masti (3,8 %), (sl. 2) što je i očekivano i ukazuje na korelaciju između količine lipida i koncentracije gangliozida. Nasuprot tome, najveća koncentracija sijaloglikoproteina bila je u kravljem mlijeku s najmanjim udjelom mliječne masti (0,9 %), (sl. 3). Dobiveni rezultati pokazuju značajno manju koncentraciju gangliozida svih vrsta kravljeg mlijeka (0,9 %, 2,8 %, 3,8 %) u odnosu na ljudsko mlijeko (tab. 1, sl. 2). U usporedbi s ljudskim mlijekom koncentracija sijaloglikoproteina

Slika 2. Masena koncentracija gangliozida u raznim vrstama mlijeka



LBSA = lipidno vezana sijalinska kiselina
 Rezultati su prikazani kao sr.vr. ± st. dev.

Slika 3. Masena koncentracija sijaloglikoproteina u raznim vrstama mlijeka



PBSA = proteinski vezana sijalinska kiselina
 Rezultati su prikazani kao sr.vr. ± st. dev.

Tablica 1. Koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina (Mann-Whitney test)

mg/ mL	N	Vrsta uzorka	M (IKR 25 th ; 75 th)	Statistička značajnost (P)
G	5	Sirovo kravlje mlijeko	3,75 (3,16; 4,10)	0,222
	5	Pasterizirano kravlje mlijeko	3,19 (2,92; 3,40)	
SGP	5	Sirovo kravlje mlijeko	12,83 (11,92; 13,54)	0,841
	5	Pasterizirano kravlje mlijeko	12,96 (11,77; 13,29)	
G	20	Ljudsko mlijeko*	7,27 (6,35; 8,69)	
	5	Kravlje mlijeko (0,9 %)	3,10 (2,95; 3,63)	0,004
	5	Kravlje mlijeko (2,8 %)	3,68 (3,26; 3,80)	0,005
	5	Kravlje mlijeko (3,8 %)	4,23 (3,83; 4,39)	0,007
	5	Ovčje mlijeko	6,24 (5,77; 7,00)	0,154
	5	Kozje mlijeko	7,13 (6,82; 7,31)	0,519
	5	Napitak od soje	14,61 (13,89; 15,11)	0,001
	SGP	20	Ljudsko mlijeko**	10,58 (9,47; 11,71)
5	Kravlje mlijeko (0,9 %)	12,28 (11,27; 12,72)	0,118	
5	Kravlje mlijeko (2,8 %)	10,98 (10,52; 11,93)	0,455	
5	Kravlje mlijeko (3,8 %)	10,77 (9,90; 11,45)	0,946	
5	Ovčje mlijeko	9,61 (9,40; 10,49)	0,277	
5	Kozje mlijeko	9,21 (8,81; 10,07)	0,067	
5	Napitak od soje	1,11 (0,94; 1,36)	0,001	

G = gangliozidi; SGP = sijaloglikoproteini; N = broj uzoraka; M = median; IKR = interkvartilni raspon; * = usporedba svih vrsta mlijeka u odnosu na ljudsko mlijeko; ** = usporedba svih vrsta mlijeka u odnosu na ljudsko mlijeko

je bila značajno manja u napitku od soje (tab. 1, sl. 3).

Koncentracija gangliozida i sijaloglikoproteina, određena u ovčjem (sirovo mlijeko) i kozjem (pasterizirano) mlijeku nije se značajno razlikovala u usporedbi s ljudskim mlijekom. Koncentracija gangliozida i u ovčjem i u kozjem mlijeku bila je veća u odnosu na kravlje mlijeko (sl. 2) i korelirala je s količinom masti u mlijeku. Količina masti u kravljem mlijeku manja je u odnosu na količinu masti u ljudskom, kozjem i ovčjem mlijeku. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima našeg ranijeg pokusa u kojem su određene koncentracije sfingozinskih baza u raznim vrstama mlijeka. Koncentracija ukupnog sfingozina u ovčjem i kozjem mlijeku bila je značajno veća u odnosu na kravlje mlijeko (Ribar i sur., 2006). Nasuprot tome, koncentracija sijaloglikoproteina u ovčjem i kozjem mlijeku bila je manja u odnosu na kravlje mlijeko (sl. 3).

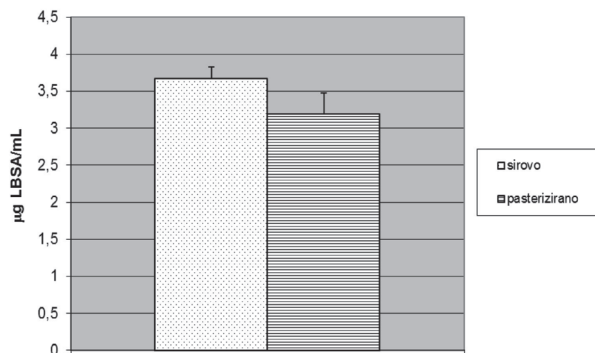
Mliječna mast ovčjeg i kozjeg mlijeka obiluje triacilglicerolima koji sadrže masne kiseline sa 6-10 ugljikovih atoma. Masne kiseline $C_{6:0}$, $C_{8:0}$ i $C_{10:0}$ mogu biti zastupljene 15-18 % u kozjem, 12-14 % u ovčjem i samo 5-9 % u kravljem mlijeku. Smatra se da svojstva masti prisutnih u ovčjem i kozjem u usporedbi s kravljim mlijekom, predstavljaju prednost za zdravlje potrošača (Sanz Sampelayo i sur., 2007). Zbog male molekulske mase kraćih masnih kiselina i njihove topljivosti, hidroliza je brža i kompletnija nego u dugolančanih masnih kiselina. Smanjena duljina lanca znači da se masne kiseline u tijelu brže apsorbiraju i metaboliziraju, zbog čega su osobito interesantne s terapijskog gledišta.

U radu su određene koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina u kravljem mlijeku prije i nakon pasterizacije kako bi se ispitalo utječe li obrada sirovog mlijeka na njihovu koncentraciju. Dobiveni re-

zultati pokazuju da nema značajne razlike (sl. 4, 5).

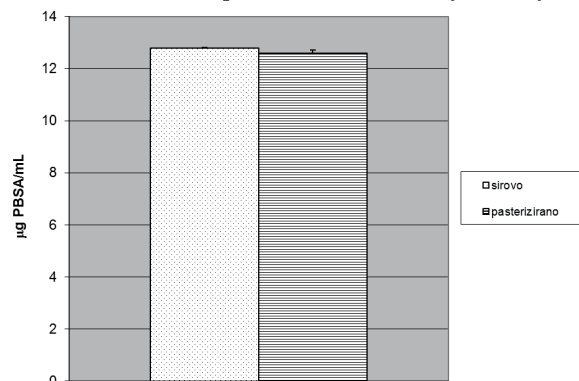
Način prerade hrane djeluje na njezine funkcionalne komponente. Neke tehnike prerade hrane povećavaju, dok druge smanjuju koncentraciju funkcionalnih komponenata. Korisni učinci na zdravlje se uglavnom pripisuju konzumiranju sirovog mlijeka. Budući sirovo mlijeko predstavlja zdravstveni rizik zbog moguće kontaminacije patogenim mikroorganizmima koji potječu od životinja ili kontaminacije tijekom skupljanja ili pohranjivanja mlijeka, preporučuje se termička obrada mlijeka prije konzumiranja (Claeys i sur., 2013; Robinson i sur., 2014). Podaci o utjecaju zagrijavanja na sastojke mlijeka, osim za kravlje mlijeko, vrlo su oskudni. Termička obrada mlijeka uglavnom utječe na MFGM i veliki broj proteinskih komponenata osjetljivih na zagrijavanje, što mijenja aglomeraciju masnih globula (Raynal-Ljutovac i sur., 2007), a može doći i do uklanjanja fosfolipida (van Boekel i Walstra, 1995). Međutim, pretpostavlja se da zagrijavanje ima neznatan učinak na prehrambenu vrijednost mliječne masti. Bez obzira na činjenicu da se sastav mlijeka i termička stabilnost određenih komponenti mlijeka mogu razlikovati ovisno o vrsti, rezultati istraživanja na kravljem mlijeku (Claeys i sur., 2013), se mogu ekstrapolirati i na mlijeko drugih vrsta. Izgleda da fizikalno-kemijske promjene zbog zagrijavanja i homogenizacije pozitivno utječu na djelovanje lipaze na triacilglicerole, a time i na probavljivost mlijeka (Fave i sur., 2004; Michalski i Januel, 2006). Može se pretpostaviti da se prehrambene vrijednosti sirovog mlijeka, uključujući i njegovo sudjelovanje u unosu kalcija, fosfora, proteina, esencijalnih aminokiselina i brojnih vitamina, uglavnom očuvaju nakon pasterizacije ili UHT (ultrahigh temperature) obrade.

Slika 4. Masena koncentracija gangliozida u sirovom i pasteriziranom kravljem mlijeku



LBSA = lipidno vezana sijalinska kiselina
Rezultati su prikazani kao sr.vr. ± st. dev.

Slika 5. Masena koncentracija sijaloglikoproteina u sirovom i pasteriziranom kravljem mlijeku



PBSA = proteinski vezana sijalinska kiselina
Rezultati su prikazani kao sr.vr. ± st. dev.

Koncentracija gangliozida u ljudskom mlijeku u velikoj se mjeri razlikuje između uzoraka, a čimbenici koji dovode do toga nisu još jasno dokazani (Martin-Sosa i sur., 2004). No, poznato je da se udio masti, kao i sastav masnih kiselina u majčinom mlijeku, mijenjaju ovisno o njihovom sastavu u hrani (Fidler i sur., 2000; De laš i sur., 2005). Na temelju mehanizma djelovanja gangliozida pretpostavlja se da oni pridonose antibakterijskom svojstvu mlijeka, čemu u prilog idu rezultati istraživanja baktericidnih učinaka koji ukazuju na izravnu korelaciju s ukupnom količinom gangliozida u ljudskom mlijeku (Salcedo i sur., 2015). Neka istraživanja pokazuju da masne kiseline, koje su dio ceramidnog dijela gangliozida, mogu pridonijeti baktericidnom djelovanju gangliozida (Sprong i sur., 2001).

Zadnjih 15-tak godina sfingolipidi prisutni u prehrani predmet su sve većeg interesa (Vesper i sur., 1999). Procjenjuje se da sfingolipidi čine 0,01-0,02 % ljudske prehrane. Godišnje se unese oko 115 g sfingolipida, uglavnom putem mliječnih proizvoda (Vesper i sur., 1999). Mliječna mast, osim što je izvor biološki aktivnih lipidnih komponenata, služi i kao važan medij za dostavu hranjivih tvari uključujući i vitamine topljive u mastima (Parodi, 1997). Sfingolipidi i njihovi metaboliti biološki su aktivne molekule s brojnim korisnim učincima na ljudsko zdravlje (Vesper i sur., 1999; Possemiers i sur., 2005; Schmelz i sur., 2000; Eckhardt i sur., 2001). Imaju važne uloge kao unutarstanične signalne molekule u raznim biološkim procesima, kao i značenje u regulaciji upalnih procesa (Duan i Nilsson, 2009). Sfingolipidi se povezuju s metaboličkim bolestima i apoptozom. Dokazan je inhibitorni učinak nekih sfingolipida na tumorogenezu kolona (Duan i Nilsson, 2009) te se pretpostavlja da bi konzumiranje hrane bogate sfingolipidima moglo smanjiti opasnost nastanka raka kolona u ljudi (Vesper i sur., 1999). Unatoč podacima na temelju kojih se pretpostavlja da sfingolipidi iz hrane mogu štiti od razvoja bolesti (najviše dokaza za rak kolona i aterosklerozu), malo je podataka o koncentraciji sfingolipida i slobodnih sfingozinskih baza u hrani. Ohlsson i suradnici (Ohlsson i sur., 2010) objavili su da ljudi uobičajenom prehranom najviše unose i apsorbiraju sfingomijelin. Mnogi mikroorganizmi, mikrobnih toksini i virusi se na stanicu vežu pomoću sfingolipida. Zanimljivo je da se sfingolipidi iz hrane mogu natjecati za stanična vezivna mjesta i tako olakšati uklanjanje

patoloških organizama iz crijeva. Dokazan je preventivni učinak prehranbenih sfingolipida, uglavnom gangliozida, protiv bakterijskih toksina i infekcije (Sprong i sur., 2002; Rueda, 2007). Pretpostavlja se da su glikosfingolipidi jedni od neimunoglobulinskih tvari u ljudskom mlijeku koje štite od patogena. Mlijeko i mliječni proizvodi glavni su izvor sfingolipida, spojeva s brojnim biološkim funkcijama te stoga rezultati ovog rada predstavljaju doprinos poznavanju sadržaja gangliozida i sijaloglikoproteina u namirnicama i time omogućuju daljnja istraživanja o njihovom učinku.

Zaključci

Najveća koncentracija gangliozida (14,61 µg/mL) dobivena je u napitku od soje, a najveća koncentracija sijaloglikoproteina (12,09 µg/mL) u kravljem mlijeku s 0,9 % mm. Koncentracija gangliozida u kravljem mlijeku značajno je manja, a u napitku od soje značajno veća u odnosu na ljudsko mlijeko. Koncentracija gangliozida u kravljem mlijeku u korelaciji je s udjelom mliječne masti. Koncentracija sijaloglikoproteina u napitku od soje značajno je manja u odnosu na ljudsko mlijeko. Koncentracije gangliozida i sijaloglikoproteina u sirovom i pasteriziranom kravljem mlijeku ne razlikuju se značajno.

Gangliosides in milk

Abstract

Gangliosides belong to a group of glycosphingolipids which are naturally found in biological tissues and fluids including mammalian milks. Considering milk, gangliosides are exclusively found in the membrane of the milk fat globule. Recently, gangliosides are becoming more and more interesting due to their numerous functions. Dietary gangliosides have been related to the development of the intestinal immune system. The content of gangliosides ingested by a diet may be an important factor contributing to health benefits from gangliosides. The average amount of gangliosides in any human food is currently unknown. The aim of this study was to determine the concentrations of gangliosides and sialoglycoproteins in milk (human, cow's, sheep's, goat's)

and soya drink. Additionally, the aim was to compare the concentrations regarding to human milk and to investigate the effect of pasteurization. Lipids were extracted from milk and gangliosides and sialoglycoproteins were determined quantitatively. The results of this research illustrate differences between the concentrations of gangliosides in cow's milk with various content of milk fat. The concentration of gangliosides in cow's milk is significantly lower regarding to human milk. The concentration of gangliosides in soya drink is significantly higher regarding to human milk. The concentration of sialoglycoproteins in soya drink is significantly lower than in human milk. The concentrations of gangliosides and sialoglycoproteins in cow's milk were not significantly different before and after pasteurization.

Key words: sphingolipids, gangliosides, milk

Objašnjenje korištenih kratica za gangliozide,

G_{D3} , G_{M3} :

Nomenklatura po L. Swennerholm-u:

G = gangliozid

M, D = broj molekula sijalinske kiseline (mono-, di-)

3 = duljina (sastav) ugljikohidratnog lanca (Galaktoza-Glukoz-Ceramid)

Zahvale

Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta kojeg je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Zahvaljujemo se na tehničkoj pomoći gospođi S. Magoš i gospodinu G. Kapustiću.

Literatura

- Addis, M.F., Pisanu, S., Ghisura, S., Pagnozzi, D., Marogna, G., Tanca, A., Bios, G., Cacciotto, C., Alberti, A., Pittau, M., Roggio, T., Uzzau, S. (2011): Proteomics and Pathway Analyses of the Milk Fat Globule in Sheep Naturally Infected by *Mycoplasma agalactiae* Provide Indications of the In Vivo Response of the Mammary Epithelium to Bacterial Infection, *Infection and Immunity* 79 (9), 3833-3845. doi: 10.1128/IAI.00040-11
- Allende, M.L., Proia, R.L. (2002): Lubricating cell signaling pathways with gangliosides, *Current Opinion in Structural Biology* 12 (5), 587-592. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00376-7
- Ando, S., Chang, N.C., Yu, R.K. (1978): High-Performance Thin-Layer Chromatography and Densitometric Determination of Brain Ganglioside Compositions of Several Species, *Analytical Biochemistry* 89 (2), 437-450. doi: 10.1016/0003-2697(78)90373-1
- Blix, G., Lindberg, E., Odin, L., Werner, I. (1955): Sialic Acids, *Nature* 175 (4451), 340-341. doi: 10.1038/175340a0
- Blix, F.G., Gottschalk, A., Klenk, E. (1957): Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids, *Nature* 179 (4569), 1088-1088. doi: 10.1038/1791088b0
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013): Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits, *Food Control* 31 (1), 251-262. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.035
- Colarow, L., Turini, M., Teneberg, S., Berger, A. (2003): Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1631 (1), 94-106. doi: 10.1016/S1388-1981(02)00360-8
- Delaš, I., Kačunco, T., Beganović, J., Delaš, F. (2005): Fatty acid composition of human milk and infant formulas, *Mljekarstvo* 55 (2), 101-112.
- Delorme, C., Brussow, H., Sidoti, J., Roche, N., Karlsson, K.A., Nesser, J.R., Teneberg, S. (2001): Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: Identification of a sialic acid-binding epitope, *Journal of Virology* 75 (5), 2276-2287. doi: 10.1128/JVI.75.5.2276-2287.2001
- Duan, R.D., Nilsson, A. (2009): Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development, *Progress in Lipid Research* 48 (1), 62-72. doi: 10.1016/j.plipres.2008.04.003
- Eckhardt, E.R., Wang, D.Q.H., Donovan, J.M., Carey, M.C. (2001): Dietary sphingomyelin (SM) significantly inhibits intestinal cholesterol (Ch) absorption by lowering thermodynamic activity (TA) of Ch in bile salt (BS) mixed micellar solution, *Gastroenterology* 120 (5), A679-A680. doi: 10.1016/S0016-5085(08)83382-3
- Fave, G., Coste, T.C., Armand, M. (2004): Physicochemical properties of lipids: New strategies to manage fatty acid bioavailability, *Cellular and Molecular Biology* 50 (7), 815-831.
- Fidler, N., Salobir, K., Stibilj, V. (2000): Fatty acid composition of human milk in different regions of Slovenia, *Annals of Nutrition and Metabolism* 44, 187-193. doi: 10.1159/000046682
- Fishman, P.H. (1982): Role of Membrane Gangliosides in the Binding and Action of Bacterial Toxins, *Journal of Membrane Biology* 69 (2), 85-97. doi: 10.1007/BF01872268

15. Harth, S., Dreyfus, H., Urban, P., Mandel, P. (1978): Direct Thin-Layer Chromatography of Gangliosides of a Total Lipid Extract, *Analytical Biochemistry* 86 (2), 543-551. doi: 10.1016/0003-2697(78)90781-9
16. Jensen, R.G. (2002): The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000, *Journal of Dairy Science* 85 (2), 295-350. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4
17. Jourdan, G.W., Dean, L., Roseman, S. (1971): Sialic Acids. 11. Periodate-Resorcinol Method for Quantitative Estimation of Free Sialic Acids and Their Glycosides, *Journal of Biological Chemistry* 246 (2), 430-435.
18. Kullenberg, D., Taylor, L.A., Schneider, M., Massing, U. (2012): Health effects of dietary phospholipids, *Lipids in Health and Disease* 11 (3). doi: 10.1186/1476-511x-11-3
19. Lacomba, R., Salcedo, J., Alegria, A., Lagarda, M.J., Barbera, R., Matencio, E. (2010): Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review, *J Pharm Biomed Anal* 51 (2), 346-57. doi: 10.1016/j.jpba.2009.04.023
20. Ledeen, R.W., Yu, R.K. (1982): Gangliosides - Structure, Isolation, and Analysis, *Methods in Enzymology* 83, 139-191. doi: 10.1016/0076-6879(82)83012-7
21. Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J.M. (2008): Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (13), 5226-5236. doi: 10.1021/jf7036104
22. Martin-Sosa, S., Martin, M.J., Garcia-Pardo, L.A., Hueso, P. (2004): Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 39 (5), 499-503. doi: 10.1097/00005176-200411000-00010
23. Mendez-Otero, R., Santiago, M.F. (2003): Functional role of a specific ganglioside in neuronal migration and neurite outgrowth, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36 (8), 1003-1013. doi: 10.1590/S0100-879X2003000800006
24. Merrill, A.H., Wang, M.D., Park, M., Sullards, M.C. (2007): (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology, *Trends in Biochemical Sciences* 32 (10), 457-468. doi: 10.1016/j.tibs.2007.09.004
25. Michalski, M.C., Januel, C. (2006): Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?, *Trends in Food Science & Technology* 17 (8), 423-437. doi: 10.1016/j.tifs.2006.02.004
26. Morales, A., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. (2004): Glycosphingolipids and mitochondria: Role in apoptosis and disease, *Glycoconjugate Journal* 20 (9), 579-588. doi: 10.1023/B:GLYC.0000043294.62504.2c
27. Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M., Morrow, A.L. (2005): Human milk glycans protect infants against enteric pathogens, *Annual Review of Nutrition* 25, 37-58. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553
28. Ohlsson, L., Hertvig, E., Jonsson, B.A., Duan, R.D., Nyberg, L., Svernlöv, R., Nilsson, A. (2010): Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin, *American Journal of Clinical Nutrition* 91 (3), 672-678. doi: 10.3945/ajcn.2009.28311
29. Otnaess, A.B.K., Laegreid, A., K. Ertresvag, K. (1983): Inhibition of Entero-Toxin from Escherichia-Coli and Vibrio-Cholerae by Gangliosides from Human-Milk, *Infection and Immunity* 40 (2), 563-569.
30. Pan, X.L., Izumi, T. (1999): Chronological changes in the ganglioside composition of human milk during lactation, *Early Human Development* 55 (1), 1-8. doi: 10.1016/S0378-3782(98)00105-4
31. Pan, X.L., Izumi, T. (2000a): Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas, *Early Human Development* 57 (1), 25-31. doi: 10.1016/S0378-3782(99)00051-1
32. Pan, X.L., Izumi, T., Yamada, H., Akiyoshi, K., Suenobu, S., Yokoyama, S. (2000b): Ganglioside patterns in neuroepithelial tumors of childhood, *Brain & Development* 22 (3), 196-198. doi: 10.1016/S0387-7604(00)00091-7
33. Park, E.J., Suh, M., Ramanujam, K., Steiner, K., Begg, D., Clandinin, T.T. (2005): Diet-induced changes in membrane gangliosides in rat intestinal mucosa, plasma and brain, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 40 (4), 487-495. doi: 10.1097/01.MPG.0000157199.25923.64
34. Parodi, P.W. (1997): Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition, *Australian Journal of Dairy Technology* 52 (2), 109-118.
35. Possemiers, S., Van Camp, J., Bolca, S., Verschaere, W. (2005): Characterization of the bactericidal effect of dietary sphingosine and its activity under intestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology* 105 (1), 59-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.007
36. Pravst, I. (2012): Health claims An opportunity for science, *Agro Food Industry Hi-Tech* 23 (5), 2-3.
37. Puente, R., Garciapardo, L.A., Hueso, P. (1992): Gangliosides in Bovine-Milk - Changes in Content and Distribution of Individual Ganglioside Levels during Lactation, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 373 (5), 283-288. doi: 10.1515/bchm3.1992.373.1.283
38. Raynal-Ljutovac, K., Park, Y.W., Gaucheron, F., Boulhallab, S. (2007): Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research* 68 (1-2), 207-220. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.006
39. Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D. (2008): Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrum to milk, *Journal of Dairy Science* 91 (6), 2307-2318. doi: 10.3168/jds.2007-0952
40. Ribar, S., Karmelic, I., Mesarić, M. (2006): Sfingozinske baze u mlijeku, *Mljekarstvo* 56 (3) 255-268.

41. Riboni, L., Acquotti, D., Casellato, R., Ghidoni, R., Montagnolo, G., Benevento, A., Zecca, L., Rubino, F., Sonnino, S. (1992): Changes of the Human Liver Gm3 Ganglioside Molecular-Species during Aging, *European Journal of Biochemistry* 203 (1-2), 107-113. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19834.x
42. Robinson, T.J., Scheftel, J.M., Smith, K.E. (2014): Raw Milk Consumption among Patients with Non-Outbreak-related Enteric Infections, Minnesota, USA, 2001-2010, *Emerging Infectious Diseases* 20 (1), 38-44. doi: 10.3201/eid2001.120920
43. Rueda, R., Sabatel, J.L., Maldonado, J., Molina-Font, J.A., Gil, A. (1998): Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants, *The Journal of Pediatrics* 133, 90-94. doi: 10.1016/S0022-3476(98)70184-2
44. Rueda, R. (2007): The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection, *British Journal of Nutrition* 98, S68-S73. doi: 10.1017/S0007114507832946
45. Ryan, J.M., Rice, G.E., Mitchell, M.D. (2013): The role of gangliosides in brain development and the potential benefits of perinatal supplementation, *Nutrition Research* 33 (11), 877-887. doi: 10.1016/j.nutres.2013.07.021
46. Salcedo, J., Gormaz, M., Lopez-Mendoza, M.C., Nogarotto, E., Silvestre, D. (2015): Human Milk Bactericidal Properties: Effect of Lyophilization and Relation to Maternal Factors and Milk Components, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 60 (4), 527-532. doi: 10.1097/MPG.0000000000000641
47. Sanz Sampelayo, M.R., Chilliard, Y., Schmidely, Ph., Boza, J. (2007): Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research* 68 (1-2), 42-63. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.017
48. Schmelz, E.M., Sullards, M.C., Dillehay, D.L., Merrill, A.H. (2000): Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice, *Journal of Nutrition* 130 (3), 522-527.
49. Schwarzkopf, M., Knobloch, K.P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., Horst-korte, R. (2002): Sialylation is essential for early development in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8), 5267-5270. doi: 10.1073/pnas.072066199
50. Spitsberg, V.L. (2005): Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical, *Journal of Dairy Science* 88 (7), 2289-2294. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4
51. Sprong, R.C., Hulstein, M.F.E., Van der Meer, R. (2001): Bactericidal activities of milk lipids, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4), 1298-1301. doi: 10.1128/AAC.45.4.1298-1301.2001
52. Sprong, R.C., Hulstein, M.F.E., van der Meer, R. (2002): Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens, *International Dairy Journal* 12 (2-3), 209-215. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00139-X
53. Suh, M., Belosevic, M., Clandinin, M.T. (2004): Dietary lipids containing gangliosides reduce *Giardia muris* infection in vivo and survival of *Giardia lamblia* trophozoites in vitro, *Parasitology* 128, 595-602. doi: 10.1017/S0031182004005128
54. Svennerholm, L. (1957): Quantitative Estimation of Sialic Acids. 2. A Colorimetric Resorcinol-Hydrochloric Acid Method, *Biochimica et Biophysica Acta* 24 (3), 604-611. doi: 10.1016/0006-3002(57)90254-8
55. Svennerholm, L. (1980): Ganglioside designation, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 125, 11. doi: 10.1007/978-1-4684-7844-0_2
56. Svennerholm, L., Rynmark, B.M., Vilbergsson, G., Fredman, P., Gottfries, J., Mansson, J.E., Percy, A. (1991): Gangliosides in Human Fetal Brain, *Journal of Neurochemistry* 56 (5), 1763-1768. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb02078.x
57. Todeschini, A.R., Hakomori, S.I. (2008): Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1780 (3), 421-433. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.10.008
58. van Boekel M.A.J.S., Walstra, P. (1995) Effect of heat treatment on chemical and physical changes to milkfat globules. Chapter 3: Special issue No. 9501. In P.F. Fox (Ed.), Heat-induced changes in milk (pp. 51-65), Brussels: International Dairy Federation.
59. Varki, N.M., Varki, A. (2007): Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease, *Laboratory Investigation* 87 (9), 851-857. doi: 10.1038/labinvest.3700656
60. Vazquez, E., Gil, E., Rueda, R. (2005): Dietary gangliosides: Beneficial effects for the neonate and potential mechanism of action, *Early Nutrition and Its Later Consequences: New Opportunities* 569, 179-180. doi: 10.1007/1-4020-3535-7_33
61. Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H. (1999): Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition, *Journal of Nutrition* 129 (7), 1239-1250.
62. Yamakawa, T. (1988): Thus Started Ganglioside Research, *Trends in Biochemical Sciences* 13 (11), 452-454. doi: 10.1016/0968-0004(88)90221-6