

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická**

Prebiotika a jejich využití v potravinářství

David Šilha

**Bakalářská práce
2009**

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **David ŠILHA**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**

Název tématu: **Prebiotika a jejich využití v potravinářství**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Definujte prebiotika a probiotika a uveďte jejich význam.
- 2) Uveďte požadavky na prebiotika a vypracujte přehled dosud využívaných prebiotik.
- 3) Vyhledejte metodiky sloužící k ověření prebiotických vlastností.
- 4) Zhodnoťte význam používání prebiotik pro lidské zdraví a uveďte konkrétní příklady využití.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Jarmila Vyřasová, CSc.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Ing. Petra Šnévajsová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 23.6.2009

David Šilha

SOUHRN

Probiotika, prebiotika a jejich pozitivní vliv na lidské zdraví je v současnosti často diskutované téma. Tato bakalářská práce shrnuje současné vědecké poznatky o účincích probiotik a prebiotik na lidský organismus, jejich využití v potravinářském průmyslu a stanovení prebiotických vlastností.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, prebiotika, synbiotika, střevní mikroflóra, funkční potraviny, potravinová vláknina

SUMMARY

Probiotics, prebiotics and their positive effect on human health are frequently discussed topics these days. This bachelor thesis summarizes current scientific knowledge of effects of probiotics and prebiotics on human organism, their utilisation in food industry and determination properties of prebiotics.

KEYWORDS

probiotics, prebiotics, synbiotics, intestinal microflora, functional food, food fibre

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. Ing. Jarmile Vytrasové, CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady a konzultace v průběhu práce.

1	Ú V O D.....	9
2	P R O B I O T I K A.....	10
2.1	Druhy probiotik a něco málo z historie	10
2.2	Požadavky na probiotika	12
2.3	Dávky probiotik a legislativní úprava	13
2.4	Mechanismus účinku probiotik.....	14
2.5	Přehled účinků probiotik	14
3	P R E B I O T I K A.....	17
3.1	Požadavky na prebiotika.....	18
3.2	Fyziologické důsledky fermentace prebiotik.....	19
3.3	Strukturně-funkční vztahy	21
3.4	Druhy prebiotik	22
3.5	Prebiotické oligosacharidy.....	23
3.5.1	Laktulosa.....	24
3.5.2	Laktosukrosa	24
3.5.3	Galaktooligosacharidy	25
3.5.4	Fruktooligosacharidy	27
3.5.5	Inulin.....	30
3.5.6	Sojové oligosacharidy.....	32
3.5.7	Xylooligosacharidy.....	33
3.5.8	Isomaltooligosacharidy	34
3.6	Vláknina jako prebiotikum	35
3.7	Potenciální prebiotika.....	36
4	Ú Č I N K Y P R E B I O T I K.....	38
4.1	Vstřebávání minerálních látek	38
4.2	Vliv fruktanových prebiotik na metabolismus lipidů.....	38
4.3	Prebiotika a rakovina tlustého střeva.....	39
4.4	Prebiotika v kojenecké výživě	39
4.5	Antiadhesivní vliv prebiotik	40
5	T E S T O V Á N Í P R E B I O T I C K Ý C H.....	41
	V L A S T N O S T Í.....	41
5.1	Nestravitelnost – testování odolnosti prebiotik k žaludeční kyselosti, enzymatické hydrolyze a gastrointestinálnímu vstřebávání	41
5.2	Testování kvašení pomocí střevní mikroflóry	43
5.2.1	Testování kvašení pomocí fermentorů.....	44
5.3	Testování selektivní stimulace růstu a/nebo činnosti střevních bakterií	46
5.3.1	Testování na selektivních agarech.....	47
5.3.2	Spektrofotometrické měření růstu mikroorganismů.....	48
5.3.3	Testování pomocí fluorescenční hybridizace in situ (FISH)	48
5.3.4	Testování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).....	49
5.4	Testování odolnosti prebiotik při technologickém zpracování.....	50
5.4.1	Prebiotická činnost a prebiotický index (PI).....	50
5.4.2	Vliv nízkého pH na prebiotika	51
5.4.3	Vliv tepla a nízkého pH na prebiotika	52
5.4.4	Vliv Maillardových reakcí na prebiotika.....	52
5.5	Směrnice pro hodnocení prebiotik	53
6	Z Á V Ě R.....	54
7	S E Z N A M P O U Ž I T É L I T E R A T U R Y.....	55

1 ÚVOD

V dobách, kdy člověk musel těžce pracovat a měl nedostatek potravy, bylo jeho hlavním požadavkem, aby mu strava dodala dostatek energie. V uplynulém století již nedostatek potravy přestal být významným faktorem a zájem spotřebitelů se soustředil na to, aby strava byla chutná, snadno připravitelná a aby se potravinářské výrobky daly dlouho skladovat. V dnešní době nejsou potraviny chápány jen jako „pouhý“ zdroj energie a důležitých živin. S rozvojem celé řady civilizačních chorob a jiných zdravotních obtíží u lidí (kardiovaskulární onemocnění, osteoporóza, diabetes, rakovina, aj.) se začalo více studovat, co nám mohou přinést jednotlivé složky potravy a kterými látkami bude výhodné potraviny obohacovat. Začalo se hovořit o tzv. funkčních potravinách.

Funkční potraviny jsou jednou z oblastí potravinářského průmyslu s největší dynamikou růstu. Přímo nebo preventivně ovlivňují zdraví konzumenta, a tím jsou pro spotřebitele atraktivní. Mezi takové potraviny patří právě ty, jež obsahují probiotické kultury nebo prebiotické sacharidy (Rudolfová a Čurda, 2005). Nejdříve věnovali pozornost funkčním potravinám v Japonsku, poté v USA a nyní i v Evropě (Pánek a kol., 2002).

Tlusté střevo je metabolicky nejučinnějším orgánem v důsledku výkonnosti jeho mikroflóry. Její složení a činnost se dají ovlivnit žádoucím směrem výživou. Proto se na tento úsek funkčních potravin soustředil mimořádný zájem s cílem posílit normální, pro zdraví člověka příznivé funkce a předcházet jejich narušení. V posledních desetiletích se dynamicky rozvíjel výzkum probiotik a prebiotik (Kalač, 2003)

Dnes se problematikou funkčních potravin, zejména probiotiky a prebiotiky, zabývá celá řada předních odborníků z řad lékařů, biologů, mikrobiologů a dietologů. V probiotických a prebiotických potravinách a preparátech je ještě veliká budoucnost. Je zřejmé, že probiotika a prebiotika se vzájemně doplňují. Probiotikum je podporováno prebiotikem.

Synbiotikum je definováno jako produkt, který obsahuje jak probiotika, tak prebiotika, přičemž se očekává tzv. synergický účinek od těchto dvou složek. Nejjednodušším příkladem synbiotika pro lidskou výživu je jogurt s obsahem probiotických bifidobakterií a prebiotickou oligofruktózou (Rada, 2008).

Mezi prebiotika patří zejména oligosacharidy. V dnešní době je velký potenciál testování nových prebiotik a jejich začleňování do potravinářského průmyslu.

2 PROBIOTIKA

Slovo probiotikum pochází z řeckého pro bios (= pro život) a používá se pro živé mikroorganismy (převážně bakterie mléčného kvašení) (Rudolfová a Čurda, 2005). Termín „probiotikum“ poprvé použili Stillwell a Lilly v roce 1965 (Sýkora a kol., 2006).

Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých organismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflóry. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a kvasinky rodu *Saccharomyces* (Nevoral, 2005). Existuje ale i celá řada jiných definic termínu probiotikum.

2.1 Druhy probiotik a něco málo z historie

Tab. č. 1: Nejčastěji používaná probiotika (upraveno dle Nevorala, 2005)

Rod Lactobacillus
<i>L. acidophilus</i>
<i>L. casei, spec. rhamnosus (Lactobacillus GG)</i>
<i>L. casei Shirota</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
<i>L. reuteri</i>
<i>L. brevis</i>
<i>L. cellobiosus</i>
<i>L. curvatus</i>
<i>L. fermentum</i>
<i>L. plantarum 299v</i>
Grampozitivní koky
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

<i>S. diacetylactis</i>
<i>S. intermedius</i>
<i>E. coli</i> (sérotyp O83:K24:H1)
Rod Bifidobacterium
<i>B. bifidum</i>
<i>B. adolescentis</i>
<i>B. animalis</i>
<i>B. infantis</i>
<i>B. longum</i>
<i>B. thermophilum</i>
Kvasinkovité mikroorganismy
<i>Saccharomyces boulardii</i>

Výčet probiotických mikroorganismů je však daleko pestřejší a zahrnuje další bakteriální rody a druhy (*Bacillus*, *Clostridium butyricum*, *Propionibacterium*) a také plísň (*Aspergillus oryzae*) (Rada, 2008).

Probiotické mikroorganismy mají uplatnění jak ve výživě lidí, tak zvířat. Tyto různorodé kultury jsou dnes běžně přidávány do různých potravin. Jsou jimi např.:

- Mléčné kysané výrobky (hlavně bifidobakterie a *Lactobacillus casei*)
- Sýry (bifidobakterie, laktobacily, propionové bakterie)
- Fermentované masné výrobky (různé mléčné bakterie)
- Náplně sušenek a oplatek (*Enterococcus faecium*) (Rada, 2008).

Také mohou být do těla dodány v podobě lyofilizovaných kultur ve formě kapslí, tablet nebo sirupů (Ebringer a kol., 1999).

Prospěšné vlastnosti potravin obsahující živé mikroorganismy, jako je fermentované mléko, jsou známy již mnoho století. O jejich využití v léčbě tělesných onemocnění se zmiňovaly již biblické texty. Uznávaní vědci jako byl Hippokrates a mnoho dalších nepovažovali kysané mléko jen za potravinu, ale i za lék (Lourens-Hattingh a Viljoen, 2001). Němečtí autoři velice často za první popis probiotika uvádějí práci Döderleinovu, který v roce

1892 navrhl vaginální bakterie produkující kyselinu mléčnou k inhibici růstu patogenních mikroorganismů (Lata a kol., 2007). Větší vědecký zájem v této oblasti nastal až v roce 1908 po zveřejnění knihy „Prodloužení života“ od Ilji Mečnikova. Ten ve svém díle naznačil, že by lidé konzumací fermentovaného mléka s obsahem laktobacilů mohli prodloužit svůj život (Elmer a kol., 2007). Tuto hypotézu podložil dlouhověkostí bulharských rolníků, kteří konzumovali fermentované mléko skutečně ve velkém množství (Gibson a Fuller, 2000). Někteří autoři jdou ještě dále do historie a jako jednoho ze zakladatelů probiotik uvádějí Henryho Tissiera, který v roce 1899 poprvé izoloval bifidobakterie (dnes asi nepoužívanější probiotické bakterie) ze stolice kojenců. Významnou osobou je také Alfréd Nissle, který v roce 1916 izoloval nepatogenní *Escherichia coli* ze stolice vojáka, který jako jediný odolával infekci úplavice. Tento kmen je zajímavý tím, že se jako probiotikum pro prevenci střevních infekčních onemocnění používá dodnes (Rada, 2008). Od této doby se vědci zabírali souvislostmi mléčných bakterií a zdravím člověka i zvířat (Suvarna a Boby, 2005).

2.2 Požadavky na probiotika

Probiotické přípravky, respektive mikroorganismy v nich obsažené, musí vedle prokázaného pozitivního vlivu na zdravotní stav člověka splňovat i některá další kritéria, mají-li se stát skutečnými pomocníky střevní mikroflóry. Tato kritéria lze rozdělit do několika kategorií (Nevoral, 2005).

Prospěšnost pro zdraví

- Schopnost kolonizace a adherence
- Antagonistický vliv na patogenní mikroflóru
- Schopnost tvorby antimikrobiálních substancí
- Schopnost imunomodulace
- Měřitelná a klinicky dokumentovatelná užitečnost pro zdraví příjemce
- Odolnost v kyselém prostředí a v přítomnosti žluči (nesmí být při průchodu zažívacím traktem zničeny nebo oslabeny) (Gaelle, 2009)

Mikrobiologické bezpečnostní požadavky

- Možnost přesného taxonomického zařazení

- Humánní původ
- Netoxičnost a nepatogenost
- Genetická stabilita
- Schopnost přežít, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí

Průmyslové parametry

- Stabilita žádaných vlastností během výroby (přežití např. proces sušení a lyofilizaci – Cupáková a kol., 2002), transportu a skladování
- Příznivé organoleptické vlastnosti
- Probiotický preparát musí obsahovat dostatečně velké množství životaschopných buněk (Collins a Gibson, 1999).

Požadavky na lidský původ probiotik a jejich aplikaci v živém stavu jsou relativizovány skutečností, že *Streptococcus bouardii* má probiotické účinky a není lidského původu a některé účinky vykazují také mikrobiální komponenty (např. peptidoglukan a lipopolysacharid) (Frič, 2005). Bylo například zjištěno, že za inhibici nádoru jsou zodpovědné peptidoglukany buněčných stěn. Jsou složeny z muramylpeptidů a jejich protinádorové účinky jsou založeny pravděpodobně na aktivaci makrofágů (Cupáková a kol., 2002).

2.3 Dávky probiotik a legislativní úprava

Velice důležitým aspektem pro účinnost probiotik je samozřejmě jejich množství v dané potravíně, či nějakém preparátu obsahujícím probiotické bakterie. Vždy záleží na tom, zda budeme používat probiotika k léčbě nebo jen jako prevenci. Dle toho se také liší dávky podávání. Probiotický preparát musí obsahovat určité minimální množství kolonie tvořících jednotek („colony forming units“ – CFU) na dávku. Denní dávka 10^6 až 10^9 CFU se považuje za minimální účinnou dávku pro terapeutické účely (Sýkora a kol., 2006). Přípravky s obsahem probiotických bakterií 10^6 a menším nemají prakticky žádný klinický význam. Optimální terapeutická dávka by se měla pohybovat mezi 10^{10} a 10^{11} CFU denně (Mego, 2005).

Existují samozřejmě určité zákonné požadavky na obsah probiotických bakterií v daných potravinách. Tuto problematiku upravuje zejména Vyhláška č. 77/2003 Ministerstva

zemědělství, kterou se stanoví jejich obsah pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. V příloze č. 2 („Fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky na jednotlivé mléčné výrobky a na druhy mikroorganismů mléčného kysání“) ve výše zmíněné vyhlášce je pak uveden minimální obsah jednotlivých druhů probiotických mikroorganismů (Vyhláška MZe č.77/2003 Sb.).

2.4 Mechanismus účinku probiotik

Probiotika produkují substance, kterými mohou inhibičně působit na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Mezi tyto inhibiční substance patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Snižují počet životaschopných buněk, ovlivňují metabolismus bakterií a produkci jejich toxinů. Některé probiotické kmeny jsou mimořádně schopné adherovat na střevní epitel, a proto kompetitivní inhibicí blokují adhezní místa na střevním epitelu pro potenciální patogenní bakterie. Využívají také nutriety, které by jinak byly spotřebovávány patogenními mikroorganismy (Nevoral, 2003).

Některá probiotika mají schopnost degradovat receptory pro toxiny na střevní sliznici. Pro preventivní a terapeutické použití probiotik je důležitá jejich schopnost stimulovat specifickou i nespecifickou imunitu (Nevoral, 2005).

2.5 Přehled účinků probiotik

Různé studie v dnešní době postupně prokazují příznivý vliv probiotických mikroorganismů na lidské zdraví. Probiotika umožňují zlepšení osídlení trávicího ústrojí mikroflórou, která může potlačovat nežádoucí anaerobní, zejména klostridiovou mikroflóru a jiné zástupce mikroflóry trávicího ústrojí, které mají prokazatelně nepříznivé účinky na zdraví (Turek a Hrubý, 2002).

Přehled pozitivních účinků probiotik:

- Zmírňují laktosovou intoleranci (Nevoral, 2005)
- Snižují hladinu sérového cholesterolu (Turek a Hrubý, 2002)
- Působí proti vzniku rakoviny (Nevoral, 2005)

- Prospívají imunitnímu systému (Krejsek a kol., 2007)
- Zvyšují adsorpci vápníku (Kohout, 2008)
- Zlepšují prokrvení a hybnost střeva (Kohout, 2008)
- Produkují vitaminy skupiny B a vitamin K (Ebringer a kol., 1999)

Asi 10-15% dospělé populace má výrazně sníženou aktivitu střevní laktasy a po požití již malého množství laktosy má zažívací potíže. Mluvíme o tzv. intoleranci k laktose. Laktosa je metabolizovaná bakteriemi a výsledkem je flatulance, průjem, nevolnost a bolesti břicha (Nevoral, 2005). Dalším problémem souvisejícím s intolerancí laktosy je deficiencie vápníku (Suvarna a Boby, 2005). Tito lidé lépe snášejí fermentovaná mléka. Jejich efekt se vysvětluje delší cestou zažívacím ústrojím a účinkem živých bakterií, které obsahují laktasu. Probiotikum pomocí laktasy, kterou obsahují, pomáhá štěpit laktosu v tlustém střevě a tak zlepšuje toleranci laktosy. Laktasu produkují zejména mléčné bakterie jako je *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* v jogurtech (Nevoral, 2005). Toleranci k laktose mohou zlepšit i kmeny produkující β -galaktosidasu. Ta je nezbytná k degradaci disacharidu laktosy na glukosu a galaktosu (Suvarna, Boby, 2005).

Střevní mikroflóra je též schopna ovlivňovat tvorbu karcinomu produkcí enzymů, které mění ve střevě prekarcinogeny na karcinogeny. Mezi tyto enzymy patří β -glukuronidasa, azoreduktasa a nitroreduktasa. Některé mikroorganismy jsou však schopny chránit hostitele tím, že tyto enzymatické aktivity tlumí. *Lactobacillus casei GG*, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* významně snižují množství těchto enzymů ve stolici. Některé studie na zvířatech ukázaly schopnost probiotik inhibovat růst nádorových buněk. Nicméně přehled desítek epidemiologických studií neprokázaly významný plošný vliv fermentovaných potravin na incidenci karcinomů (Wolowski a kol., 2001; Nevoral, 2005).

Mléčné bakterie v mikroflóře trávicího ústrojí se mohou podílet na snížení hladiny cholesterolemie tím, že zvyšují vylučování žlučových kyselin stolicí. K endogenní tvorbě žlučových kyselin využívá lidský organismus jako základní substrát cholesterol. Za běžných fyziologických podmínek probíhá enterohepatální oběh žlučových kyselin ze střeva zpět do jater a je použita znovu více než třetina žlučových kyselin. Pokud dojde k vazbě žlučových kyselin na bakteriální buňky mléčné mikroflóry, pak se zpětně nevstřebají a jsou vyloučeny stolicí. K tomuto efektu přispívá též vápník obsažený v mléčných výrobcích, protože volné ionty vápníku vytvářejí se žlučovými kyselinami nerozpustné sloučeniny, které se též

neresorbují a odcházejí stolicí. Čím větší podíl žlučových kyselin je vyloučeno ze střeva stolicí, tím větší množství cholesterolu musí organismus použít k jeho doplnění. Tím dochází ke snížení hladiny cholesterolu v krvi (Turek a Hrubý, 2002).

Ve studii Výzkumného ústavu mlékárenského se zaměřili na sledování účinku kmene *Enterococcus faecium* CCDM 922, mj. na účinky ve vztahu k lipidovému metabolismu. Tento kmen byl vybrán na základě jeho dřívějšího zapojení společně s dalšími mikroorganismy do klinické studie prováděné Státním zdravotním ústavem. Výsledky studie ukázaly schopnost kmene snižovat celkový cholesterol a zvyšovat jeho frakci HDL (lipoprotein o vysoké hustotě; high density lipoprotein). Studie byla prováděna ve spolupráci s 52 dobrovolníky ve věku 18-82 let. Kohorta byla rozdělena do dvou skupin, pokusné a kontrolní. Obě skupiny konzumovaly jogurtový nápoj v množství 100 ml denně po dobu 12 týdnů. Pokusná skupina v jogurtovém nápoji navíc přijímala kmen CCDM 922 v denzitě minimálně $3,7 \cdot 10^7$ CFU. Po testu došlo u pokusné kohorty vlivem konzumace mléčných nápojů ke zvýšení hodnoty HDL o 0,16 mmol/l. Poměr rizikovosti onemocnění kardiovaskulárními nemocemi, tj. poměr celkového cholesterolu a HDL cholesterolu se též u celé kohorty zlepšil o 1,49 na 4,46, která je uváděna jako hodnota, která již nepředstavuje zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění (Šalaková a kol., 2008).

Velmi důležitou funkcí mikrobiální flóry je její působení jako ochranné bariéry – označované někdy jako kolonizační rezistence anaerobů a aerobů gastrointestinálního traktu (GIT). Tato kolonizační rezistence je zajišťována několika mechanismy: receptorovou blokadou (obsazení potenciálních vazebných míst střevní výstelky), brždění růstu či usmrcení cizích mikroorganismů (produkce bakteriostatických a baktericidních látek), kompeticí o nutriční substráty (výživové látky, vitaminy, růstové faktory), snížením střevního pH, přímým antagonismem fyziologické mikroflóry vůči patogenním a potenciálně patogenním mikroorganismům. Střevní mikroflóra tak zajišťuje ochranu proti širokému spektru střevních patogenů (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*,...), potenciálních patogenů (*Clostridia*, *Helicobacter*,...) a kvasinek (*Candida albicans*) (Forejt, 2008).

Probiotika jsou dnes také úspěšně používána k obohacování krmiva pro zvířata. Probiotika v krmivech posílí daného živočicha, rychleji roste a dojde ke zvýšené produkci např. mléka a vajec (Dunne a kol., 2001).

3 PREBIOTIKA

Prvně byl výraz „prebiotikum“ použit v roce 1990 (Gibson a Fuller, 2000). Prebiotika jsou nestravitelné potravinové složky, které příznivě ovlivňují hostitele, a tím selektivně stimulují růst a aktivitu jednoho nebo limitovaného počtu bakterií v tlustém střevě, čímž zlepšují zdraví svého hostitele (Gibson a Roberfroid, 1995). Tato definice byla aktualizována v roce 2004 a prebiotikum je nyní definováno jako selektivně fermentovatelná látka, která umožní konkrétní změny, a to jak ve složení a/nebo činnosti gastrointestinální mikroflóry (Wang, 2008). Jinými slovy jsou prebiotika substance potravin, které podporují růst probiotických mikroorganismů (Su a kol., 2007 a). Ve většině případů se jedná o podporu zvýšení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, což byl také jeden z prvních větších zájmů o prebiotika (Oliveira a kol., 2009). Jedná se to látky nenatravitelné enzymy eukaryotických buněk, ale ve střevě se stávají substráty enzymů mikroflóry. Mikrobiální enzymy štěpí tyto substráty na látky významné pro střevní mikroflóru i střevní sliznici (krátké mastné kyseliny, aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory a antioxidanty). Tyto substance kryjí značnou část nutričních potřeb kolonické sliznice, která není schopna vyživit se pouze substráty z krevního oběhu (Frič, 2008). Výše zmíněným mikrobiálním metabolismem vedoucím k fermentaci sacharidů na organické kyseliny, hlavně butyrát, dochází ke krytí až 50% denních energetických požadavků kolonické sliznice (Tuohy a kol., 2003).

Prebiotika lze také definovat jako sacharidy se stupněm polymerace dva a více, které jsou rozpustné v 80% ethanolu a nenatravitelné pankreatickými enzymy gastrointestinálního traktu. Některé sacharidy, v současné době potenciální prebiotika, zjevně nespádají do této definice, jelikož některé mají stupeň polymerace i vyšší než deset, což je mírně chemicky odlišuje (Cummings a kol., 2001).

Možnost obohacování potravin o prebiotika je mnohem širší, než možnost přidávání probiotických bakterií do potravin. Je to dáno větší tepelnou stabilitou, rezistencí vůči kyslíku a dalšími faktory (Manning a Gibson, 2004). V současnosti se mnoho prebiotických látek přidává do jogurtů a ostatních fermentovaných mléčných výrobků, tak jako i do celého spektra dalších potravin (Huebner a kol., 2008). Dále mohou být přidávány do nápojů, pomazánek, kojenecké výživy, pekařských výrobků, cukrovinek, čokolády, žvýkaček, polévek, omáček a dresinků, masných výrobků, instantních potravin, konzervovaných potravin, různých potravinových doplňků, krmiv (Gibson a kol., 2004), bonbónů a ovocných šťáv (Looijer-van Langen a Dieleman, 2009).

V mnoha potravinářských výrobcích mohou prebiotika výrazně zlepšit organoleptické vlastnosti. Používají se pro jejich technologické vlastnosti (Wang, 2008) nebo úpravu lépe vyváženého nutričního složení (Franck, 2002).

3.1 Požadavky na prebiotika

Obdobně jako u probiotik jsou definovány některé požadavky, které musí splňovat, aby mohly být za probiotikum považovány, platí také pro prebiotika určité charakteristické znaky. Od zavedení pojmu prebiotikum se věnovalo této problematice mnoho pozornosti, vědeckého a průmyslového zájmu (Roberfroid, 2007). V minulosti byl za důkaz účinnosti prebiotika považován pouze bifidogenní účinek nějaké látky (Ouwehand a kol., 2005). Dnes jsou za základní kritéria pro látky s prebiotickými účinky považovány tyto skutečnosti:

- Substrát nesmí být hydrolyzován a/nebo vstřebáván v žaludku a tenkém střevě
- Slouží selektivně určitým bakteriím tlustého střeva jako substrát, který zvyšuje metabolickou aktivitu těchto bakterií nebo podporuje jejich růst
- Kvašením substrátu by měly být navozeny prospěšné systémové účinky na hostitele (Manning a Gibson, 2004).

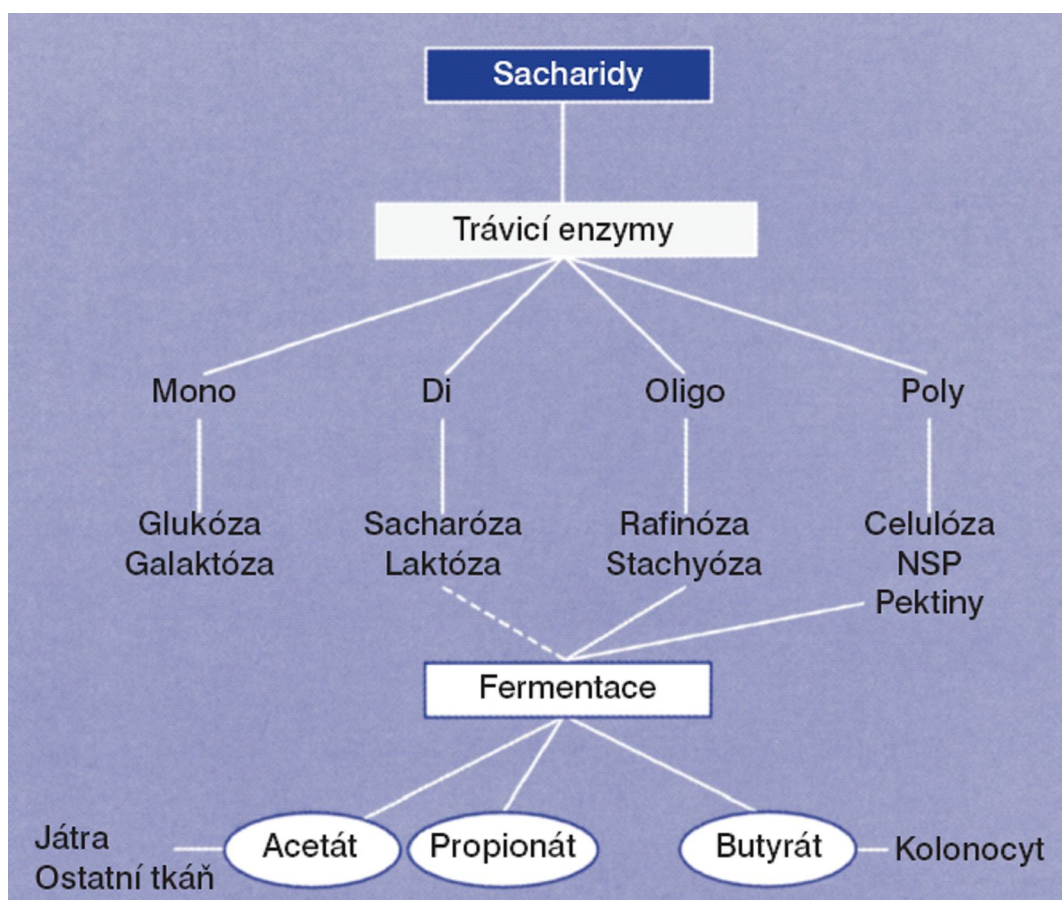
Uvedená podmínka, která říká, že prebiotikum nesmí být hydrolyzováno a/nebo vstřebáváno v žaludku a tenkém střevě, nemusí být vždy úplně tak striktní, ale mělo by být zaručeno, že značné množství této látky se dostane především do tlustého střeva, kde bude sloužit jako kvasný substrát (Roberfroid, 2007). Gibson a Roberfroid (1995) dále uvádějí, že prebiotika by měla mít celkově pozitivní vliv na zdraví a pohodu jedince. U látky, která má být prebiotikem, musí být znám původ, čistota, chemické složení a struktura (FAO, 2009).

Zatím u nás neexistuje žádná zákonná úprava, která by ošetřovala množství nebo druh prebiotik v potravinách. Je ale zřejmé, že pro dobře rozvinutou mikroflóru jsou prebiotika potřebná. Probiotika a prebiotika dohromady tvoří tzv. synbiotika. Strava je hlavním faktorem ovlivňujícím střevní mikroflóru a pomocí potravin je možné ovlivňovat složení střevní mikroflóry. Prebiotický substrát je selektivně využíván prospěšnou střevní mikroflórou, ale nepodporuje potenciální patogeny jako jsou bakterie rodu *Clostridium* produkující toxiny, proteolytické bakterie rodu *Bacteroides* a toxigenní *Escherichia coli*. Tímto způsobem se

prospěšnější část mikroflóry, což jsou především mléčné bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, stává ve střevě dominantnější a mohou podporovat blahodárné účinky (Manning a Gibson, 2004).

3.2 Fyziologické důsledky fermentace prebiotik

Existují dva hlavní typy anaerobní fermentace prováděné ve střevě, sacharolytické a proteolytické (Manning a Gibson, 2004). Fermentací prebiotik dochází ke snížení pH v tlustém střevě a následně ve stolici, což je způsobeno produkcí krátkořetězcových mastných kyselin a kyseliny mléčné (Ebringer, 2002). Hlavním produktem fermentace jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs = short-chain fatty acids), hlavně acetát, propionát a butyrát. Fermentace příslušných sacharidů je znázorněna na obr. č. 1.



Obr. č. 1: Zdroje bakteriální fermentace (Hermans a Buts, 2002)

Mezi ostatní produkty kvašení patří ethanol, laktát, sukcinát, formiát, valerát a kaproát. Rozvětvené řetězce mastných kyselin s krátkým řetězcem jako je isobutyryát, 2-methylbutyryát a isovalerát mohou být tvořeny fermentací aminokyselin (Fooks a kol, 1999). Ty mohou být dále metabolizovány a mohou být poskytovatelem energie pro hostitele, částečně zásobují sliznici tlustého střeva a příznivě působí na střevní peristaltiku. Urychlením peristaltiky se zkrátí doba, kdy je v kontaktu kolonocyt s perorálně přijímanými potravinovými karcinogeny (např. 3,4-benzpyrén, nitrosaminy, pyrolyzáty bílkovin a aminokyselin) a snížené pH inhibuje aktivitu dehydrogenas a hydroxylas, které mění žlučové kyseliny na karcinogenní kyselinu deoxycholovou a lithocholovou (Ebringer, 2002).

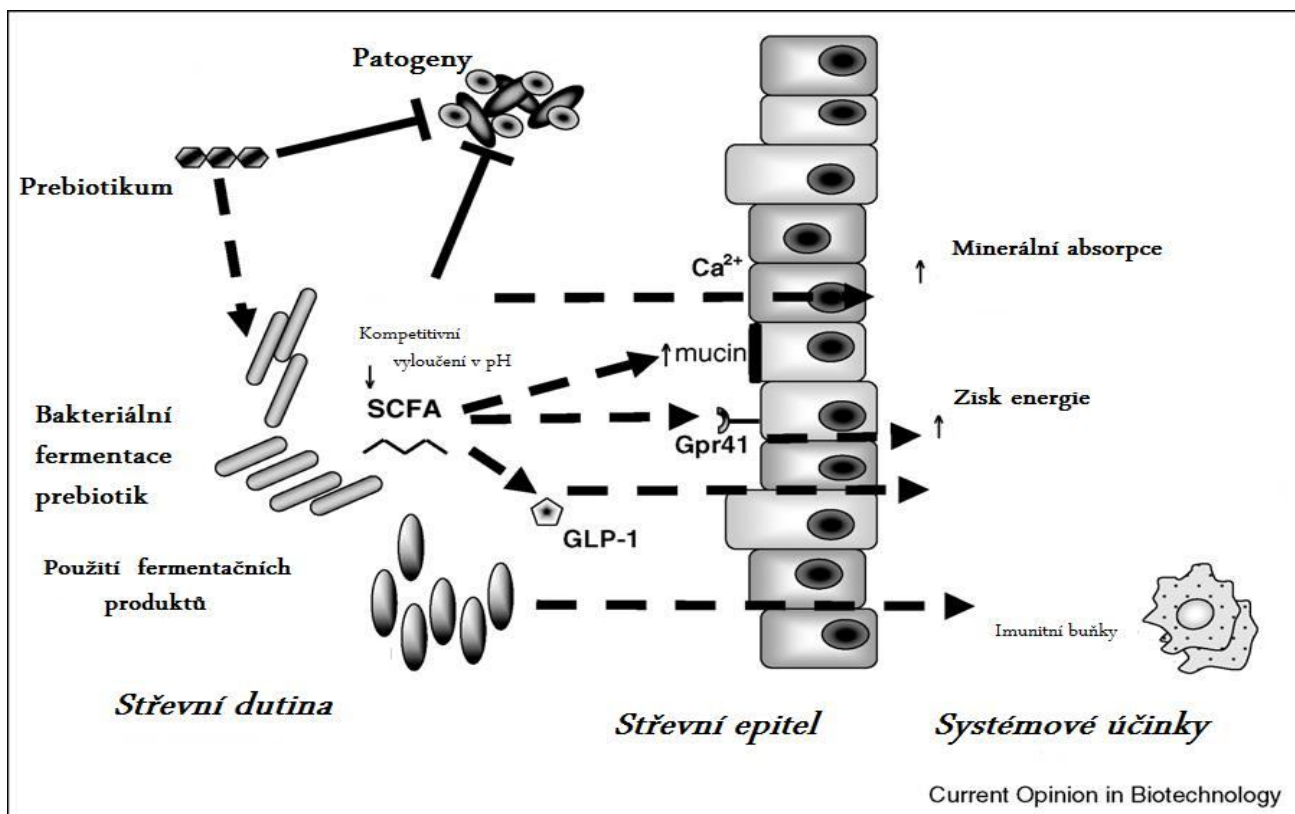
Sacharidy jsou preferovaný zdroj energie pro střevní mikroflóru, ale v době nepřítomnosti některých skupin mikroorganismů, například klostridií, se fermentace sacharolytická změní spíše na proteolytickou (Ouwehand a kol., 2005). Konečné produkty proteolytického kvašení mohou být toxické (Manning a Gibson, 2004), na rozdíl od metabolismu sacharidů, kde jsou konečné produkty neškodné a některé dokonce potřebné pro svého hostitele (Fooks a kol, 1999). Mezi zmíněné toxické produkty proteolytického kvašení patří fenolické sloučeniny, aminy, amoniak (Manning a Gibson, 2004) a indol (Fooks a kol, 1999). Uvolňování amoniaku může vést ke zvýšenému riziku vzniku rakoviny tlustého střeva a neoplastickému růstu epitelu tlustého střeva, tvorba fenolických látek může vést také ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku rakoviny (Ouwehand a kol., 2005).

Fermentací prebiotik se selektivně modifikuje mikroflóra tlustého střeva. Při přemnožení bakterií mléčného kvašení se bakteroidy, koliformní bakterie a grampozitivní koky zachovávají v poměrně nízkém počtu (Ebringer, 2002). V nedávných studiích byly identifikovány další mikroorganismy (např. *Faecalibacterium prausnitzii*), které mají schopnost rozkládat prebiotika. Naopak produkty fermentace laktobacilů a bifidobakterií, jako jsou kyseliny mléčná a octová, mohou být degradovány jinými bakteriemi jako jsou *Anaerostipes caccae* nebo *Roseburia intestinalis* (Saulnier a kol., 2009).

Dochází také ke zvýšení hmotnosti stolice, což souvisí s vysokým obsahem bakterií přemnožených v důsledku fermentačních procesů. Má to za následek vyšší frekvenci vyprazdňování střev a napomáhá předcházení zácpě. Jeden gram oligofruktosy zvýší hmotnost stolice o 1,5-2 g. Bakterie mléčného kvašení produkují také trávicí enzymy, které se podílejí na utilizaci balastních látek z potravy (Ebringer, 2002).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs = short-chain fatty acids) jsou schopny zlepšit slizniční morfologii vyšší tvorbou mucinu. Některé SCFA, především butyryát, inhibuje růst buněk rakoviny tlustého střeva. SCFA se mohou vázat na specifické receptory jako je

G-protein vázaný na receptor 41 (Grp 41), tento receptor je silný regulátor hostitelské energetické rovnováhy (Saulnier a kol., 2009). Mechanismus účinku prebiotik je uveden na obr. č. 2.



Obr. č. 2: Mechanismus účinku prebiotik (Saulnier a kol., 2009)

3.3 Strukturně-funkční vztahy

Prebiotické vlastnosti sacharidů mohou být ovlivněny několika faktory. Těmito faktory jsou zejména monosacharidové složení, molekulová hmotnost a obsah glykosidické vazby. Bylo zjištěno, že dosud známá prebiotika jsou složena převážně z glukosy, galaktosy, xylosy a fruktosy. Prebiotický potenciál oligosacharidů složených s jiných monosacharidů není zatím znám. Vazba mezi monosacharidovými jednotkami je velice důležitým a rozhodujícím faktorem při určování selektivity kvašení a stravitelnosti v tenkém střevě. Polysacharidy obecně nejsou považovány za prebiotika, kdežto oligosacharidy ano. Inulin má

největší molekulovou hmotnost z prebiotických oligosacharidů. Vliv molekulové hmotnosti na prebiotické sacharidy je znázorňován tím, že xylian s vysokou molekulovou hmotností není prebiotikum, ale xylooligosacharidy s nižší molekulovou hmotností již prebiotickou aktivitu vykazují. Dá se předpokládat, že čím delší oligosacharidový řetězec, tím pomalejší fermentace v tlustém střevě (Manning a Gibson, 2004).

3.4 Druhy prebiotik

Předpokladem zařazení k prebiotikům je stimulace některých bakterií ve střevě. Po požití stravy obsahující nestravitelné sacharidy dojde k selektivní fermentaci pomocí střevní mikroflóry (Manning a Gibson, 2004). Jakákoliv dietární složka, schopná projít v neporušeném stavu do tlustého střeva (nestravitelné nebo málo stravitelné sacharidy, některé peptidy, bílkoviny nebo některé lipidy), může být potenciálním prebiotikem (Fooks a kol., 1999). Většina zájmů o rozvoj prebiotik se soustřeďuje na nestravitelné oligosacharidy (Manning a Gibson, 2004). Široká škála prebiotik byla izolována z rostlinných materiálů, např. β -glukany z ovsu, inulin z kořene čekanky, oligosacharidy z cibule, pórku a fazolí (Su a kol., 2007 b).

Již u celé řady různých nestravitelných oligosacharidů byl prokázán prebiotický efekt (Fooks a kol., 1999). Mezi tyto oligosacharidy jsou řazeny:

- Laktulosa
- Fruktooligosacharidy (FOS)
- Galaktooligosacharidy (GOS)
- Sojové oligosacharidy
- Laktosukrosa
- Isomaltooligosacharidy
- Glukooligosacharidy
- Xylooligosacharidy
- Palatinosa (Manning a Gibson, 2004).

Tento výčet prebiotik je doplňován ještě o inulin (patřící mezi fruktooligosacharidy) a gentiooligosacharidy (Rastall a Maitin, 2002).

Existuje mnoho známých oligosacharidů používaných jako prebiotika hlavně na japonském trhu. V Evropě a USA jsou na trhu používány především fruktooligosacharidy a inulin a to hlavně díky ekonomické výrobě těchto látek a reprodukovatelně prokázaným prebiotickým účinkům na lidi. Galaktooligosacharidy jsou také na trzích USA a Evropy rozšířené, ale zatím nejsou tak využívány. Navzdory mnoha komerčně dostupných oligosacharidů je stále snaha identifikovat další vhodné látky s prebiotickými vlastnostmi (Rastall a Maitin, 2002).

3.5 Prebiotické oligosacharidy

Jedná se o hlavní komponenty různých dietních výrobků (např. mléko) a od roku 1980 je jejich využití ve funkčních potravinách stále prozkoumáváno (Kolida a kol, 2002). Během uplynulých deseti let přitáhly pozornost jako funkční složky potravin, zejména v Japonsku a Evropě (Boehm a kol., 2005).

Oligosacharidy jsou glykosidy, obsahující tři až deset monosacharidových podjednotek. Přesto jsou i disacharidy, jako je laktulosa, svými vlastnostmi velmi podobné tri- a vyšším sacharidům a také je řadíme mezi oligosacharidy v potravinách (Crittenden a Playne, 1996). Na světovém trhu se uplatňuje více než dvacet typů nestravitelných oligosacharidů (Sako a kol., 1999). Potravinářsky využívané oligosacharidy jsou převážně směsi oligosacharidů o různém stupni polymerace, monosacharidů a původních polysacharidů a disacharidů (Crittenden a Playne, 1996).

Oligosacharidy jsou rozpustné ve vodě a mírně sladké. Jejich sladivost se pohybuje v rozmezí 0,3 a 0,6 násobku sladivosti sacharosu. Sladivost je závislá na molekulární hmotnosti a na celkovém složení celé molekuly daného oligosacharidu. Největší zájem o oligosacharidy jako potravinářské přísady pramení z jejich mnoha fyziologicky prospěšných vlastností (Crittenden a Playne, 1996).

Díky prokázanému účinku probiotik na lidské zdraví existuje na světových trzích velké množství produktů s obsahem prebiotických bakterií. Například v mlékárenských výrobcích je velmi těžké zajistit dostatečný rozvoj pozitivních mikroorganismů, zejména bifidobakterií, v důsledku citlivosti na pH a obsah kyslíku. Příklad vhodných oligosacharidových prebiotik zajistí přežití dostatečného počtu bifidobakterií

v mlékárenských výrobcích během standardní trvanlivosti produktů (Lourens-Hattingh a Viljoen, 2001).

Mnoho oligosacharidů není člověkem tráveno a mají využití v nízkokalorických potravinách a výrobcích pro diabetiky (Crittenden a Playne, 1996). Energetická hodnota nestravitelných oligosacharidů je 1,0 – 2,0 kcal/g, což odpovídá 30-50% energetické hodnoty stravitelných oligosacharidů (Sako a kol., 1999). Nestravitelnost některých oligosacharidů umožňuje plnit funkci vlákniny a prebiotika (Crittenden a Playne, 1996).

K nejvýznamnějším zdrojům oligosacharidů, které se nachází přirozeně v potravinách, patří topinambur, česnek, čekanka, pór, artyčok, cibule, pšenice (Kalač, 2003). Další potravinářsky významné oligosacharidy mohou být vyráběné komerčně hydrolýzou polysacharidů (např. potravní vláknina, škrob) nebo prostřednictvím enzymatické činnosti a to z jednoduchých sacharidů transglykosilací (Manning a Gibson, 2004; Crittenden a Playne, 1996).

3.5.1 Laktulosa

Laktulosa je ze všech oligosacharidů nejpoužívanější a nejčastěji vyráběný oligosacharid. Podobně jako galaktooligosacharidy je laktulosa odvozená od laktosy (Crittenden a Playne, 1996). Jedná se o syntetický disacharid ve formě β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Fru. Laktulosa byla původně používána jako projímadlo, protože není hydrolyzována nebo absorbována v tenkém střevě (Gibson, 2004). Před 40 lety byla laktulosa používána jako prebiotický doplněk kojenecké stravy ke zvýšení počtu laktobacilů ve střevech kojenců. Nicméně specifita tohoto substrátu pro zvyšování počtu mikroorganismů nebyla potvrzena z hlediska molekulárně biologických aspektů (Collins a Gibson, 1999).

Laktulosa se získává z laktosy a to izomeračním procesem v alkalickém prostředí. Jako minoritní produkt této reakce vzniká současně epilaktosa (Velíšek, 1999).

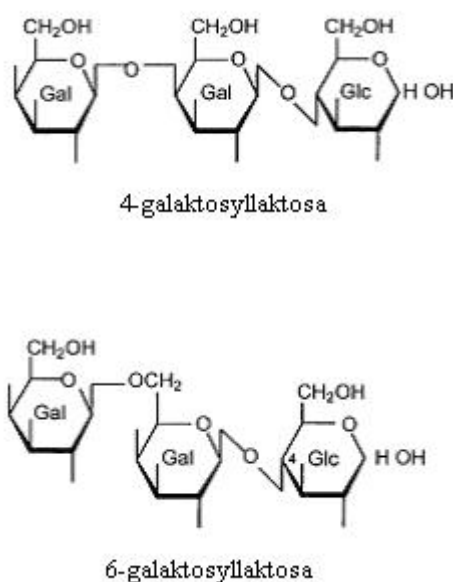
3.5.2 Laktosukrosa

Tento trisacharid se vyrábí z laktosy a patří mezi bifidogenní oligosacharidy. Laktosukrosa se vyrábí ze směsi laktosy a sacharosy za účasti enzymu β -fruktofuranosidasy (Gibson, 2004). Laktosukrosa byla vyvinuta v Japonsku ve spolupráci tří firem zaměřených

na cukrovarnický a farmaceutický průmysl. Poptávka na tento oligosacharid a jeho použití se v dnešní době rapidně zvyšují (Crittenden a Playne, 1996).

3.5.3 Galaktooligosacharidy

Jsou to oligosacharidy obsahující galaktosu ve formě $\text{Glu } \alpha 1 \rightarrow 4 [\beta \text{ Gal } 1 \rightarrow 6]_n$. Kde n nabývá hodnot od dvou do pěti (Gibson, 2004). Jedná se o látky živočišného původu, zdrojem je hlavně kravské mléko (Rudolfová a Čurda, 2005) nebo se galaktooligosacharidy vyrábějí komerčně z laktosy s využitím galaktosyltransferázní aktivity β -galaktosidasy (stručné schéma uvedeno na obr. č. 4) (Crittenden a Playne, 1996). Po reakci laktosy a daného enzymatického preparátu následují další technologické kroky zahrnující odbarvení, demineralizaci, filtraci, koncentrování a poté vzniká buď sirup nebo po technologickém sušení se získává prášková forma. Vazby mezi galaktosovými jednotkami závisí na enzymu a podmínkách reakce. Nejčastěji vzniká $\beta 1 \rightarrow 4$ vazba (4'-GOS), kdy β -galaktosidasa pochází z bakterie *Bacillus circulans* nebo *Cryptococcus laurentii* a $\beta 1 \rightarrow 6$ (6'-GOS) přičemž je tento enzym získán z *Aspergillus oryzae* nebo *Streptococcus thermophilus* (Sako a kol., 1999). Konkrétní struktury galaktooligosacharidů jsou na obr. č.3 a možné mikrobiální zdroje β -galaktosidas jsou uvedeny v tab. č.2.



Obr. č. 3: Struktura 4'-GOS a 6'-GOS (Sako a kol., 1999)

Bakteriální zdroje	Kvasinkové zdroje	Plísněvé zdroje
<i>Escherichia coli</i>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Thermus equaticus</i>	<i>Sporobolomyces singularis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Streptococcus lactis</i>		<i>Aspergillus phoenicis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>		<i>Mucor pusillus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		<i>Mucor miehei</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Neurospora croussa</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		<i>Penicillium simplicissimum</i>

Tab. č. 2: Přehled nejpoužívanějších mikrobiálních zdrojů β -galaktosidas
(Rudolfová a Čurda, 2005)

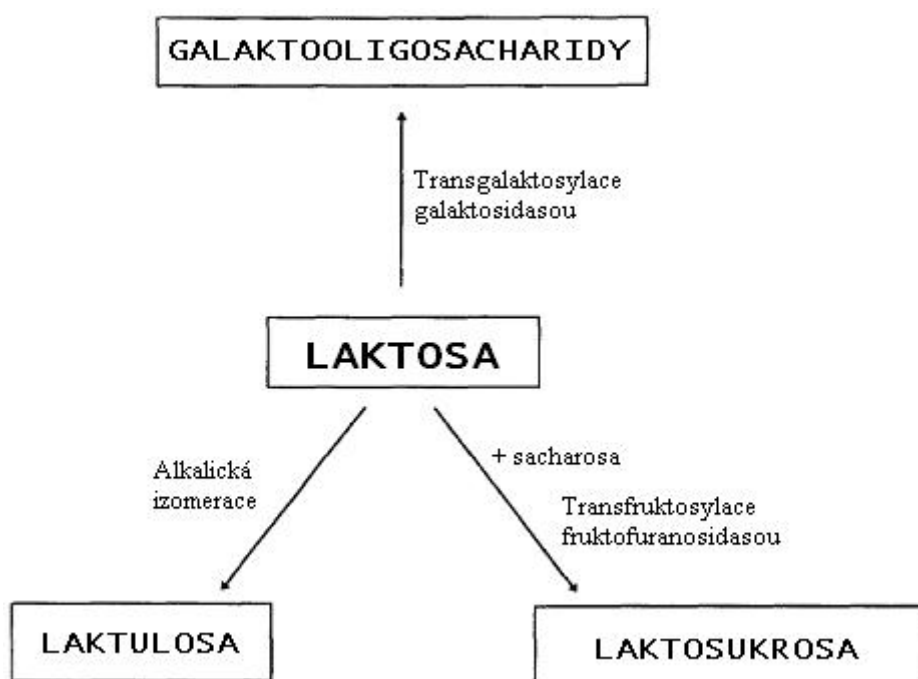
Komerčně dostupné preparáty galaktooligosacharidů jsou směsi obsahující více než 55% oligosacharidů, kolem 20% laktosu, 20% glukosu a malé množství galaktosu. Galaktooligosacharidy jsou dostupné v kapalně i práškové formě. Relativní sladivost těchto látek bývá kolem 35% sladivosti čisté sacharosy. Na japonském trhu existuje produkt s obchodním názvem Oligomate 55, je viskóznější než kukuřičný sirup a má podobný osmotický tlak a vodní aktivitu jako roztok sacharosy o stejné koncentraci. Může tedy být použit zároveň jako konzervační látka v potravinářství (Sako a kol., 1999). U mražených produktů ovlivňují bod tuhnutí, u tepelně zpracovávaných potravin omezují hnědnutí v důsledku Maillardových reakcí. Mohou být také využívány jako inhibitory retrogradace škrobu (Rudolfová a Čurda, 2005). Uvádí se, že galaktooligosacharidy jsou nejčastěji vyráběné prebiotické sacharidy na světě (Boehm a kol., 2005).

Galaktooligosacharidy jsou poměrně stabilní sloučeniny (stabilnější než fruktooligosacharidy) při zahřevu na 160°C po dobu 10 minut při neutrálním pH, 120°C po dobu 10 minut při pH = 3 a 100°C po dobu 10 minut při pH = 2. Stabilita se projevuje i při delším skladování a kyselém prostředí (Sako a kol., 1999).

Prebiotická funkce je často studována z pohledu zkvasitelnosti čistou nebo smíšenou mikrobiologickou kulturou. Tyto metody budou neobjektivní, pokud bude ve vzorku obsažena D-glukosa, D-galaktosa a laktosa (Maischberger a kol., 2008). Podle studie byly rozdílné

galaktooligosacharidy použity jako substráty pro růst *Bacillus lactis* a *Lactobacillus rhamnosus*. *Lactobacillus rhamnosus* preferoval jako substrát monosacharidy a disacharidy, kdežto bakterie *Bacillus lactis* rostly přednostně na substrátu obsahujícím trisacharidy a tetrasacharidy. Zdá se, že *Bacillus lactis* má specifický transportní systém galaktooligosacharidů, který není přítomný u *Lactobacillus rhamnosus*. Enzym β -galaktosidasa, který se projevuje hydrolytickou aktivitou vůči galaktooligosacharidům, ale ne vůči laktose, byl popsán u *Bifidobacterium adolescentis* (Rastall a Maitin, 2002).

Všechny testované kmeny bifidobakterií a pediokoků produkují β -galaktosidasu, která jim umožňuje růst na galaktosyllaktose. Žádný z testovaných kmenů laktokoků nemůže růst na galaktosyllaktose jakožto jediném zdroji uhlíku, jelikož nevykazuje aktivitu β -galaktosidasy a pouze devět z jednadvaceti testovaných laktobacilů prokazovalo aktivitu tohoto enzymu a tudíž byl možný jejich nárůst na galaktosyllaktose (Gopal a kol., 2001).



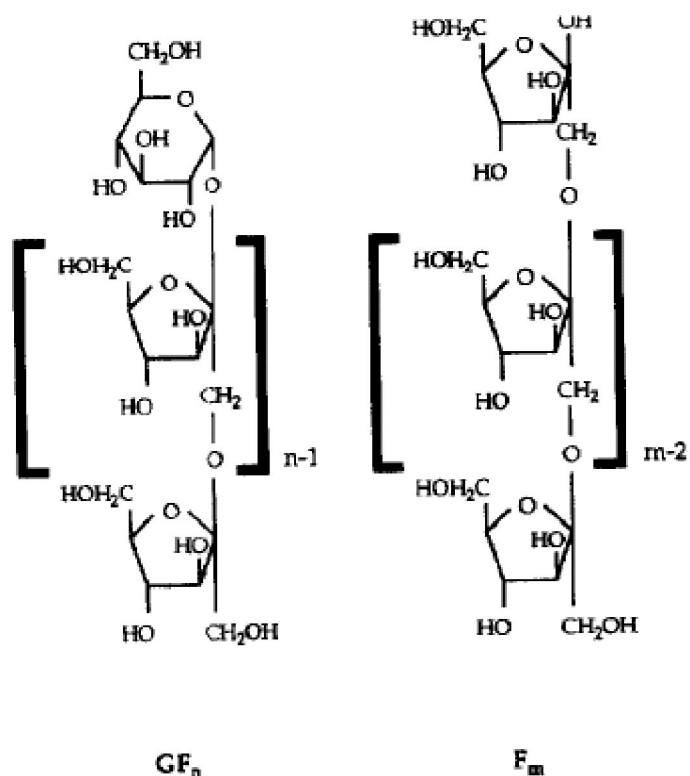
Obr. č. 4: Oligosacharidy průmyslově vyráběné z laktosy (Crittenden a Playne, 1996)

3.5.4 Fruktooligosacharidy

Struktura

Reprezentují jednu z hlavních skupin bifidogenních oligosacharidů (Crittenden a Playne, 1996). Mezi prebiotiky zaujímají právě fruktooligosacharidy hlavní pozici v oblasti výzkumu. Molekuly těchto oligosacharidů jsou složeny z β -D-fruktofuranos spojených β -(2 \rightarrow 1) vazbou (Roberfroid, 2002). Jedná se o polymery s polymeračním stupněm 2-30 (Rudolfová a Čurda, 2005). První monomer v řetězci je buď glukosylový (G) nebo fruktosylový (F) zbytek. Tvoří homologickou řadu oligosacharidů odvozených od sacharosy a jsou označovány zkráceným vzorcem GF_n nebo FF_n (Roberfroid, 2002). Ve skutečnosti se jedná o oligomery typu $[\beta\text{-D-Fru-(2}\rightarrow\text{1)}]_{n-1}\text{-}\beta\text{-D-Fru-(2}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-D-Glc}$, zkráceně GF_n a nebo typu $[\beta\text{-D-Fru-(2}\rightarrow\text{1)}]_n$, přičemž n nabývá hodnot 2-9 (stupeň polymerace). Tyto sloučeniny se nazývají oligofruktosa (Velíšek, 1999).

Obchodní fruktooligosacharidy jsou komplexní směsi oligosacharidů (Rastall a Maitin, 2002). Struktura fruktanů je uvedena na obr. č. 5.



Obr. č. 5: Chemická struktura fruktanů (Gibson a Roberfroid, 1995)

Výroba

Průmyslová výroba se realizuje dvěma rozdílnými procesy, což má za následek nepatrně odlišné konečné produkty. První metoda, při níž vznikají fruktooligosacharidy, vychází ze sacharosy transfruktosilázni aktivitou enzymu β -fruktofuranosidasa, pro správný průběh je potřeba vysoká koncentrace počátečních surovin (Crittenden a Playne, 1996). Průmyslově mohou být vyráběny také hydrolyzou inulinu nebo ze sacharosy z červené řepy účinkem fruktosylfuranosidasy z plísně rodu *Aspergillus niger* (transfruktosylace) (Rudolfová a Čurda, 2005) nebo účinkem enzymu endoinulinasa (Roberfroid, 2000).

Dávkování

Účinkům při různých dávkách se věnuje celá řada vědeckých skupin a zájem o tuto problematiku roste. U fruktooligosacharidů bylo zjištěno, že jsou účinné u člověka v dávkách 5g denně, což bylo potvrzeno ve studii ve vztahu ke zvýšení růstu bifidobakterií (Rastall a Maitin, 2002). Průměrná spotřeba byla odhadnuta na 1 až 4 g ve Spojených státech amerických, v Evropě se zase nejčastěji udává spotřeba v rozmezí 3 až 11 g. Je vidět, že dávky jsou udávány v mnoha studiích v různých hodnotách (Roberfroid, 2000). Někteří autoři uvádějí denní potřebu až okolo 15 g, ale již při dávkách 3-6 g denně se snižuje produkce toxických složek a nežádoucích enzymů ve střevech o 40-45% (Rudolfová a Čurda, 2005).

Fruktooligosacharidy jsou rostlinného původu, vyskytují se zejména v plodinách jako čekanka, cibule, rajčata, česnek, banán (Rudolfová a Čurda, 2005), pšenice, pórek (Roberfroid, 2000), žito, ječmen (Voragen, 1998) a topinambur (Velíšek, 1999). Hlavní zastoupení je tedy v mnoha druzích ovoce a zeleniny, kde je v čerstvém stavu zpravidla okolo 6% fruktooligosacharidů (Rudolfová a Čurda, 2005). Přesto se dá konstatovat, že pouhý příjem z výše jmenovaných zdrojů fruktooligosacharidů není postačující na rozvoj blahodárných účinků (Manning a Gibson, 2004).

Vlastnosti

Fruktooligosacharidy jsou ve vodě dobře rozpustné látky, které vykazují 40-60% sladivosti sacharosy, nehydrolyzují se sacharidasami, a proto jsou klasifikovány jako nerozpustná vláknina. V tlustém střevě jsou však fermentovány mnoha anaerobními bakteriemi za vzniku nižších mastných kyselin, L-mléčné kyseliny a plynů (oxidu uhličitého, methanu, vodíku). Proto jsou také nazývány střevní potravou (Velíšek, 1999). Na druhou stranu ale nejsou využívány patogenními mikroorganismy tlustého střeva (enteropatogenní *Escherichia coli* - EEC, *Clostridium perfringens*) ani bakterií *Streptococcus mutans* v ústech a tudíž nepřispívají ke vzniku zubního kazu (Rudolfová a Čurda, 2005). Především je

oceňována skutečnost, že fruktooligosacharidy jsou důležitým růstovým faktorem blahodárně působících probiotických bifidobakterií (*Bifidobacterium bifidum*) (Velíšek, 1999).

3.5.5 Inulin

Inulin patří sice mezi fruktooligosacharidy, je ale nejvíce prostudovaný, uznávaný a používaný jako potravinářská přísada v mnoha zemích bez jakéhokoli omezení, proto je v mnoha studiích posuzován samostatně a odděleně od ostatních fruktooligosacharidů. Škála produktů, obsahujících inulin a/nebo jinou oligofruktosu a mající příznivý vliv na střeva a celkové blaho, začínají převažovat na Evropském trhu (Kolida, 2002).

Struktura

Mezi tzv. inuliny se zařazují polymery složené z lineárních řetězců D-fruktofuranos obsahující zpravidla jako koncovou jednotku D-glukosu (glukofruktany). Jsou vázány vzájemně glykosidickou vazbou (Velíšek, 1999). Z chemického pohledu je lineární řetězec inulinu buď α -D-glukopyranosyl- $[\beta$ -D-fruktofuranosyl] $_{n-1}$ - β -D-fruktofuranosid nebo β -D-fruktopyranosyl- $[\beta$ -D-fruktofuranosyl] $_{n-1}$ - β -D-fructofuranosid. Ve vazbě fruktosyl-glukosa je vždy β -(2 \leftrightarrow 1) jako u sacharosy, ale u fruktosyl-fruktosové vazby je β -(1 \leftarrow 2). Inulin je obecný termín, který zahrnuje všechny β -(1 \leftarrow 2) lineární molekuly. Pro označování oligofruktos a/nebo inulinu je povoleno označení oligomery, ale i polymery (Roberfroid, 2007). Fruktany obecně jsou značně polydisperzní sloučeniny, jsou to směsi příbuzných sloučenin se stupněm polymerace (počtem vázaných molekul fruktosy) zpravidla 2 až 60 a někdy i více (Velíšek, 1999).

Vlastnosti

Jedná se o bílou krystalickou látku, řazenou mezi fyziologicky velmi pozitivně působící nevyužitelné polysacharidy, tedy mezi potravinovou vlákninu, neboť není hydrolyzována v horní části gastrointestinálního traktu hydrolasami slin ani pankreatickou a střevní hydrolasou (α -amylasa, sacharasa, maltasa aj. sacharidasy) (Velíšek, 1999). Tím se dostává až do tlustého střeva v neporušeném stavu (Kolida, 2002).

Dávkování a výskyt

Denní doporučené dávky inulinu (a produktů jeho hydrolyzy) přijímaného společně s potravou se pohybují od 1 do 12 g v závislosti na stravování. Přirozený inulin se vyskytuje v kořenech čekanky (*Cichorium intybus*), hlízách topinambur (*Helianthus tuberosus*) (Roberfroid, 2002; Velíšek, 1999) a dalších přírodních zdrojích, z nichž ty nejvýznamnější jsou uvedeny u fruktooligosacharidů. Čekankový inulin se skládá ze směsi oligomerů a polymerů se stupněm polymerace 2-60, průměrný stupeň polymerace je 12 (Roberfroid, 2007). Příklady zastoupení inulinu v některých plodinách je uvedeno v tab. č. 3.

Tab. č. 3: Obsah inulinu v některých rostlinách (g/100 g) (Ebringer, 2002)

Cibule	2 – 7
Česnek	9 – 16
Pórek	3 – 10
Artyčok	3 – 10
Čekanka (kořen)	35 – 47
Topinambur (hlíza)	16 – 20
Chřest	4 – 18
Pampeliška	12 – 15
Banán	0,3 – 0,7
Rýže	0,5 – 1,0
Ječmen	0,5 – 1,5
Pšenice	1 – 4

Inulin je většinou používán při výrobě výrobků s nízkým obsahem tuku, zatímco oligofruktosy jsou využívány vesměs v nízkokalorických ovocných produktech jako jsou jogurty, kde vyrovnávají sladkost a vysokou intenzitu sladidel používaných v potravinářských přípravcích (Oliveira, 2009).

Splnění kritérií prebiotik

Odolnost inulinu a oligofruktos na trávicí procesy byly již velice rozsáhle studovány v různých studiích a různými metodami jak „in vivo“ tak „in vitro“. Jedná se skutečně o nestravitelný oligosacharid a je klasifikován také jako dietní vláknina (Gibson a kol., 2004). Většina studií podává informace o fermentaci blahodárnou flórou, zejména bifidobakteriemi a v menší míře laktobacily, zatímco celkové počty bakterií *Escherichia coli* a *Clostridium*

perfringens byly zachovány na poměrně nízkých hodnotách, jelikož nedošlo k podpoře růstu těchto mikroorganismů vlivem působení prebiotik (Kolida, 2002). Metody „in vivo“ a „in vitro“ byly prováděny na zvířatech, zejména byli použiti potkaní. Bifidogenní efekt byl pozorován u potkanů krmených oligofruktosou, zatímco počty laktobacilů byly ve zvýšené míře zjištěny u potkanů krmených buď samotnými oligofruktosami nebo směsmi oligofruktos a inulinu. Zároveň docházelo k potlačení bakterií rodu *Clostridium* zvýšením relativního podílu butyrátu (Gibson a kol., 2004). Byl sledován výběr 28 bakterií mléčného kvašení (rod *Lactobacillus*) a bifidobakterií a jejich schopnost fermentace inulinu a oligofruktos na MRS agaru. Jedenáct z šestnácti bakterií rodu *Lactobacillus* a sedm z devíti bifidobakterií byly schopné fermentovat substrát (Kaplan a Hutkins, 2002).

3.5.6 Sojové oligosacharidy

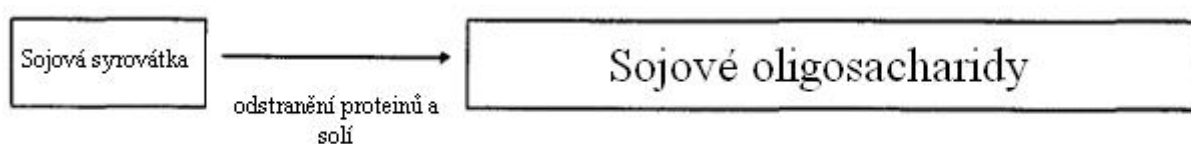
Jedná se o α -galaktosyl deriváty sacharosy (Velíšek, 1999). Mezi známé zástupce sojových oligosacharidů jsou řazeny stachyosa a rafinosa. V posledních letech začal narůstat zájem o rostlinné polysacharidové buněčné stěny jako zdroje nových prebiotických látek (Rastall a Maitin, 2002). Stachyosa i rafinosa jsou nestravitelné, a proto se dostávají v nedotčené podobě do střev, kde působí jako prebiotika, jelikož zde stimulují růst zejména bifidobakterií (Crittenden a Playne, 1996). Obsah sojových oligosacharidů ve vybraných plodinách je uveden v tab. č. 4.

Tab. č. 4: Obsah stachyosy a rafinosy ve vybraných luštěninách (% v sušině) (Velíšek, 1999)

Luštěnina	Rafinosa	Stachyosa
fazol obecný	0,3 - 1,1	3,5 - 5,6
hrách setý	0,6 - 1,0	1,9 - 2,7
čočka jedlá	0,3 - 0,5	1,9 - 3,1
sója štětinatá	0,2 - 1,8	0,02 - 4,8
cizrna beranní	0,7 - 0,9	1,5 - 2,4

Výroba

Na rozdíl od jiných oligosacharidů jsou sojové oligosacharidy extrahovány přímo ze surového materiálu a tyto výrobní procesy nevyžadují žádné enzymatické pochody (stručné schéma výroby je uvedeno na obr. č. 6). Izolovaná a zakoncentrovaná sojová syrovátka, což je vedlejší produkt výroby sojových bílkovinných izolátů a koncentrátů (Velíšek, 1999), obsahuje velké množství oligosacharidů jako je rafinosa, stachyosa, tak jako sacharosa, glukosa a fruktosa. Všechny tyto cukry jsou extrahovány ze sojové syrovátky a koncentrací se vyrábí sirup sojových oligosacharidů (Crittenden a Playne, 1996).



Obr. č. 6: Výroba sojových oligosacharidů (Crittenden a Playne, 1996)

Splnění kritérií prebiotik

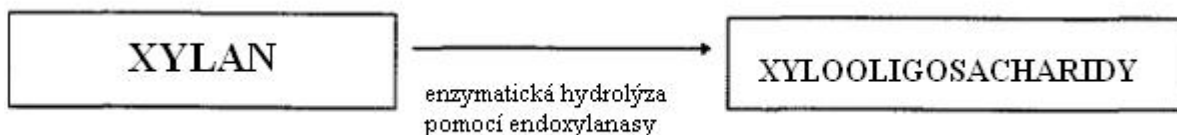
Sojové oligosacharidy jako je stachyosa a rafinosa jsou schopné odolávat žaludeční kyselosti a enzymatické hydrolyze. Jsou schopny se dostat bez velkých ztrát do tlustého střeva. Fermentační schopnosti těchto oligosacharidů byly studovány buď ve směsi nebo samostatně jako individuální komponenty. Jedna z prvních studií se zabývala kvašením rafinosy v čistých kulturách mikroorganismů a bylo zjištěno, že byla metabolizována bifidobakteriemi a řadou střevních mikroorganismů, s výjimkou *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis* a *Escherichia coli*. I mnoho následujících studií potvrdilo tyto závěry, na některé střevní bakterie byl dokázán dokonce až inhibiční vliv. Důkazy o stoprocentním prebiotickém chování zatím ale stále chybí (Gibson a kol., 2004).

3.5.7 Xylooligosacharidy

Na počátku 90. let byl na trhu zastoupen pouze velice malý podíl těchto oligosacharidů. Nicméně v dnešní době je požadována rostoucí tendence výroby i použití v potravinářském průmyslu (Crittenden a Playne, 1996). Komerční produkty jsou složené převážně z disacharidu xylobiosa a malým množstvím vyšších oligosacharidů (Gibson a kol., 2004). Jsou používány zejména při výrobě různých prebiotických nápojů, jelikož mají schopnost podporovat růst bifidobakterií ve střevech (Crittenden a Playne, 1996).

Výroba

Surový materiál pro syntézu xylooligosacharidů je polysacharid xylan, který je extrahován převážně z kukuřice (Gibson a kol., 2004). Xylan je hydrolyzován na xylooligosacharidy řízenou enzymatickou aktivitou enzymu endo-1,4- β -xylanosa (Crittenden a Playne, 1996). Stručné schéma výroby xylooligosacharidů je uvedeno na obr. č. 7.



Obr. č. 7: Výroba xylooligosacharidů (Crittenden a Playne, 1996)

Splnění kritérií prebiotik

Xylan byl označen jako dietní vláknina, to naznačuje, že xylooligosacharidy by mohly dosáhnout tlustého střeva v neporušeném stavu, ale tento předpoklad nebyl doposud zcela důvěryhodně potvrzen. Studie prováděné na zkvasitelnost a stimulaci růstu některých probiotických mikroorganismů dokazují, že jsou xylooligosacharidy metabolizovatelné většinou bifidobakterií, laktobacilů a dalších bakterií, výjimku tvoří rod *Bacteroides* a *Clostridium butyricum*. Novější nedávná studie s čistými kulturami prokázala, že xylooligosacharidy z ovesného xylanu byly metabolizovány bifidobakteriemi, bakteriemi rodu *Bacteroides*, *Clostridium difficile* a *Escherichia coli*. Metabolizovatelnost těchto oligosacharidů se v této studii nepotvrdila. Tato studie poukazuje na nedostatečnou selektivitu při kvašení. Tyto testy ale byly prováděny s čistými kulturami a nenavozují skutečné prostředí v tlustém střevě (Gibson a kol., 2004).

3.5.8 Isomaltooligosacharidy

Komerčně vyráběné isomaltooligosacharidy se dodávají ve formě směsí složených z oligosacharidů o různých molekulových hmotnostech (Gibson a kol., 2004). Jedná se o oligosacharidy obsahující 2-5 glukosových jednotek propojených vazbami α -D-(1 \rightarrow 6) a částečně také α -D-(1 \rightarrow 4) (Velíšek, 1999). Provedené studie na modelu střevních podmínek

ukázaly, že při fermentaci se zvyšoval počet bakterií mléčného kvašení (Gibson, 2004). Fermentační vlastnosti těchto oligosacharidů byly testovány s čistými kulturami a byly provedeny i studie na lidech. Při testech s čistými kulturami bylo zjištěno, že *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium infantis* metabolizují tyto oligosacharidy. Byly metabolizovány i rodem *Bacteroides*, dále *Enterococcus faecalis* a *Clostridium ramosus*, ale ne řadou dalších střevních bakterií. Dostupné „in vitro“ zkoušky neprokázaly selektivní stimulaci růstu bakterií. „In vivo“ byly provedeny zkoušky u dobrovolníků a výsledné počty bakteriální populace byly zjišťovány na selektivních agarových půdách, nebyl ale zjištěn výrazný nárůst bifidobakterií. V jiných studiích u lidí bylo zase při vyšších dávkách potvrzeno zvýšení počtu bifidobakterií. Kvalitu prebiotik a splnění požadavků na prebiotika nelze ale hodnotit jen podle nárůstů bifidobakterií a celkového počtu mikroorganismů, proto se v dnešní době nepovažují za právoplatná prebiotika a jsou prováděny další studie (Gibson a kol., 2004).

3.6 Vláknina jako prebiotikum

Mezi tzv. nevyužitelné polysacharidy se řadí celulóza, hemicelulózy a pektin, dále polysacharidy používané jako aditivní látky (polysacharidy mořských řas, mikrobiální polysacharidy, rostlinné gummy a slizy, modifikované polysacharidy) a lignin. Některé z nich, např. pektin, mohou být relativně dobře využitelné. Tyto látky se souhrnně nazývají sice zavádějícím, vágním, nepřesným a obtížně definovatelným, avšak všeobecně rozšířeným a akceptovaným termínem vláknina nebo také vláknina potravy (Velíšek, 1999). Vláknina je běžnou složkou většiny potravin rostlinného původu (Blaut, 2002). V potravě je zjednodušeně rozdělena do tří skupin podle její rozpustnosti ve vodě (Kvasničková, 2000). Jedná se o rozpustnou, nerozpustnou a směsnou vlákninu. Nejdůležitější charakteristikou všech tří skupin je jejich rezistence k účinkům hydrolytických enzymů trávicího traktu, což z nich dělá vhodný substrát pro mikrobiální fermentaci (Farkaš a Francanová, 2008). Obecně lze říci, že jak zkvasitelná, tak i nezskvasitelná vláknina má za následek zvýšení růstu střevní mikroflóry (Blaut, 2002). Jednotlivé druhy vlákniny můžeme nalézt v různých druzích plodů, semen, ořechů a luštěnin. Příklady obsahu vlákniny ve vybraných potravinách jsou uvedeny v tab. č. 5. Doporučené denní množství vlákniny je přibližně 30-35 g, což zhruba odpovídá 0,5 kg

ovoce a zeleniny (Farkaš a Francanová, 2008). Poměr nerozpustné a rozpustné vlákniny v potravě by měl být asi 3:1 (Velíšek, 1999).

Tab. č. 5: Příklady obsahu vlákniny v potravinách (Velíšek, 1999)

	Vláknina (% sušiny)		
	rozpustná	nerozpustná	celkem
ovoce			
jablka	5,6 - 5,8	7,3 - 7,5	12,8 - 13,3
broskve	4,1 - 7,1	3,4 - 6,4	7,5 - 13,5
jahody	5,1 - 7,7	6,8 - 10,6	11,9 - 18,3
pomeranče	6,5 - 9,8	3,9 - 5,2	10,4 - 15,0
zelenina			
mrkev	4,4 - 14,9	10,4 - 11,1	14,8 - 26,0
zelí	13,5 - 16,6	4,2 - 20,8	27,6 - 37,4
rajčata	0,8 - 3,5	3,2 - 12,8	6,7 - 13,6
zelený hrášek	5,9	15,0	20,9
luštěniny			
fazole	7,2 - 12,4	9,1 - 9,6	16,8 - 21,5
brambory			
syrové	2,8 - 3,5	2,4 - 3,2	5,2 - 6,7
vařené	4,8	2,6	2,2
cereální výrobky			
mouka pšeničná bílá	2,0	1,2	3,2
mouka pšeničná celozrnná	2,6	1,7	10,3
chléb pšeničný	1,6 - 2,7	1,1 - 2,9	2,7 - 5,6
chléb žitný	6,7	6,6	13,3
kukuřičné lupínky	0,2 - 0,4	0,5	0,7 - 0,9

3.7 Potenciální prebiotika

V mnoha studiích byl vyšetřován prebiotický potenciál mnoha dalších sloučenin. Avšak důkazy, poukazující na splňování prebiotických podmínek, nejsou natolik přesvědčivé, aby se prováděly nějaké podrobnější analýzy. Mezi takoveto sloučeniny patří oligodextrany, kyselina glukonová, gentiooligosacharidy, pektinové oligosacharidy, manooligosacharidy, rezistentní škrob a jeho deriváty, N-acetylchito-oligosacharidy, polydextrosa a cukerné alkoholy (Gibson a kol., 2004). Mezi další potenciální prebiotika patří arabinooligosacharidy z cukrové řepy, rhamnogalacturonooligosacharidy z jablka, arabinoxyloligosacharidy

z pšenice, galakturonooligosacharidy, které lze získat z polygalakturonové kyseliny. Tyto látky byly doposud zkoušeny jen v čistých kulturách řady střevních bakterií. U pektinových oligosacharidů byl prokázán bifidogenní efekt, ne ale o takové selektivitě, jako třeba u fruktooligosacharidů (Rastall a Maitin, 2002).

Rafinosové oligosacharidy jsou nestravitelné oligosacharidy se stupněm polymerace tři až šest. Semena vlčího bobu jsou nejbohatším zdrojem těchto rafinos (obsah je až 120 g/kg sušiny), u kterých bylo prokázáno v předběžných studiích prebiotické chování. Testy byly prováděny na potkanech a bylo dosaženo výsledků srovnatelných s výsledky při použití čisté rafinosy nebo fruktooligosacharidů. Byla tedy potvrzena selektivní stimulace růstu bakterií rodu *Bifidobacterium* látkami ze semen vlčích bobů, je potřeba však provést další srovnávací studie pro definitivní závěry (Martínez-Villaluenga a kol., 2008).

4 ÚČINKY PREBIOTIK

Existuje mnoho blahodárných účinků, doprovázejících využívání probiotických bakterií. Jelikož prebiotické sacharidy podporují probiotika, dají se účinky probiotik spojovat s účinky prebiotik. Mezi hlavními účinky prebiotik jsou uváděny v mnoha literaturách vstřebatelnost minerálních látek, vliv prebiotik na metabolismus lipidů, prebiotika jako ochrana před rakovinou tlustého střeva apod.

4.1 Vstřebávání minerálních látek

Prebiotika jako jsou inulin, oligofruktosy, glukooligosacharidy a galaktooligosacharidy stimulují absorpci některých minerálních látek, zejména pak hořčíku, vápníku a železa. Osteoporosa je velice rozšířená choroba, nabývající epidemiologické závažnosti. Jedním z rizikových faktorů je právě nedostatečný příjem vápníku (Scholz-Ahrens a kol., 2001). Ačkoliv je tenké střevo hlavním místem absorpce vápníku v lidském organismu, existuje myšlenka, že k absorpci dochází v celé délce střev, tudíž je maximální vstřebávání i v tlustém střevě velice žádoucí (Manning a Gibson, 2004). Existují vědecké důkazy o podpoře vstřebávání vápníku inulinovým typem fruktanů. Zkoušky byly prováděny na zvířatech i na lidech (Roberfroid, 2001). Velice důležité je, že zvýšená vstřebatelnost vápníku vede k jeho zvýšenému množství v kostech (Macfarlane a kol., 2006).

4.2 Vliv fruktanových prebiotik na metabolismus lipidů

V problematice metabolismu lipidů jsou velice často diskutována také prebiotika (Roberfroid, 2001). Strava podávaná potkanům, na kterých byl sledovaný vliv prebiotik fruktanového typu na metabolismus lipidů, byla obohacena 10% oligofruktosy a došlo k významnému snížení koncentrace triacylglycerolů a fosfolipidů. To je téměř výhradně dáno poklesem koncentrace VLDL (lipoprotein o velmi nízké hustotě; very low density lipoprotein). To je pravděpodobně výsledek snížené syntézy triacylglycerolů v játrech. Jaterní buňky izolované z modelových potkanů měly mírně nižší schopnost esterifikovat palmitát (C14) na triacylglycerol, ale o 40% nižší schopnost syntetizovat triacylglycerol z acetátu (C14)

v porovnání s jaterními buňkami kontrolních potkanů. Tyto výsledky podporují hypotézu, že opět došlo k poklesu tvorby mastných kyselin (lipogenese) v játrech z důvodu snížení aktivity všech lipogenních enzymů. V nedávné studii se ukázalo, že když byla oligofruktosa přidávána do stravy obsahující 10% vepřového sádla, 4% kukuřičného oleje a 0,15% cholesterolu po dobu 3 týdnů, došlo ke snížení koncentrace volného cholesterolu i přes tučnost podávané stravy (Delzenne a Kok, 2001).

4.3 Prebiotika a rakovina tlustého střeva

Mnoho chorob lidských střev vzniká v distálním tračníku, zejména se jedná o rakovinu tlustého střeva (Manning a Gibson, 2004). Prebiotika mohou předcházet vzniku rakoviny tlustého střeva (Buddington a kol., 1996). Celkově druhou nejčastější rakovinou u lidí je právě rakovina tlustého střeva a předpokládá se, že nádory vznikají asi 100 krát častěji v tlustém střevě než v tenkém střevě. Došlo k několika studiím o využití prebiotik jako prevence rakoviny střev, a to především na zvířecích modelech. Prebiotika mohou chránit před rozvojem tohoto závažného onemocnění dvěma mechanismy.

Prvním je tvorba ochranných metabolitů. Butyrát jako jeden z konečných produktů fermentace prebiotik stimuluje apoptózu karcinogenních buněk. Z tohoto důvodu je žádoucí zvýšit množství butyrátu vznikajícího ve střevech. Mezi hlavní producenty butyrátu při fermentaci z hlediska střevní mikroflóry jsou bakterie rodu *Clostridium* a *Eubacterium*. Druhou možností je ovlivnění metabolismu bakterií tlustého střeva tak, aby produkovaly větší množství prospěšných metabolitů. Hlavním cílem je zaměnit metabolismus bakterií rodu *Clostridium* a *Bacteroides* z proteolytického na sacharolytický. Dodnes bylo málo prebiotik hodnoceno z tohoto pohledu na lidech a na zvířatech. Je potřebné provést další studie (Manning a Gibson, 2004).

4.4 Prebiotika v kojenecké výživě

Prebiotika jsou rovněž velice významná v kojenecké výživě. U kojenců krmených uměle připravenou dětskou výživou byly zaznamenány obvykle nižší hodnoty

bifidobakterií v porovnání s kojenými dětmi. Mnoho studií v tomto ohledu potvrdilo prebiotické účinky mateřského mléka (Saulnier a kol., 2009). Mateřské mléko obsahuje řadu substrátů pro bakteriální růst (Reid, 2008) a vede k mnohem rozmanitější mikroflóře s převahou bifidobakterií a laktobacilů v zažívacím traktu kojenců (Boehm a kol., 2003). Kromě 7% laktosy obsahuje ještě přibližně 1% neutrálních oligosacharidů a asi 0,1% kyselých oligosacharidů. Jejich biologická funkce není ještě zcela objasněna. Existují však důkazy o tom, jak jsou oligosacharidy mateřského mléka významné pro již zmiňované bifidogenní účinky, ale i protiinfekční a protialergické. Doposud bylo charakterizováno zhruba 130 neutrálních a kyselých oligosacharidů. Jejich spektrum v mateřském mléce je závislé hlavně na krevní skupině matky (Boehm a kol., 2005). Oligosacharidy mateřského mléka mohou chránit děti před průjmovým onemocněním a snad i proti respiračním chorobám. Bylo potvrzeno, že inhibují patogeny jako je *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, enteropatogenní *Escherichia coli* a *Streptococcus pneumoniae* při „in vitro“ i „in vivo“ testech (Haschke a kol., 2001) a jsou silnými inhibitory bakteriální adheze na střevním epitelu (Walker a Duffy, 1998). Nedávno bylo prokázáno, že oligosacharidy jsou rezistentní vůči enzymatickému trávení v horní části gastrointestinálního traktu, což je jedna z podmínek prebiotik (Boehm a kol., 2003). Oligosacharidy, včetně N-acetylglukosaminu, glukosových, galaktosových a fukosových oligomerů nebo některých glykoproteinů, tvořící podstatnou část mateřského mléka, jsou specifické růstové faktory pro bifidobakterie (Collins a Gibson, 1999). Kravské mléko obsahuje jen malé množství prebiotik. Je ale možné ho prebiotickou vlákninou, podobnou, jaká je v mléce mateřském, obohatit. Nelze doplnit ale všechny takové sloučeniny do umělé výživy (Gregora, 2004).

4.5 Antiadhesivní vliv prebiotik

Prebiotické oligosacharidy mohou selektivně zabránit adhezi některých bakteriálních druhů napodobováním vazebných míst. Nedávné studie dokazují, že prebiotika mohou působit jako lákadlo pro patogenní buněčné receptory ve střevě. Galaktooligosacharidy dokonce snižují přilnavost enteropatogenní *Escherichia coli* (Saulnier a kol., 2009).

5 TESTOVÁNÍ PREBIOTICKÝCH VLASTNOSTÍ

Optimální výživa je klíčový faktor ovlivňující fyziologické funkce každého jednatelivce. Kromě vitaminů, optimálního obsahu energetických a strukturálních složek potravy, které jsou většinou uvolňovány trávicími enzymy a resorbovány již v tenkém střevě, patří k optimální výživě i zdraví prospěšné střevní mikroorganismy, které se obecně nazývají probiotika (problematice probiotik se věnuje kapitola 2). Schopnost kolonizovat střevní niku je dána jednak genetickými vlastnostmi mikroorganismů a jednak vhodným prostředím podporujícím růst. Hlavními součástmi prostředí, které pozitivně ovlivňují růst probiotik, jsou právě prebiotika (Erban, 2005). Jestliže mají být shromažďovány smysluplné, objektivní a spolehlivé údaje na různá prebiotika, musí být rigorózní zkoušky potenciálních prebiotik provedeny pomocí standardizovaných metod. Pro každé potenciální prebiotikum by tyto metody měly prokázat odolnost vůči žaludeční kyselosti, enzymatické hydrolýze, gastrointestinálnímu vstřebávání, dále by měly prokázat schopnost kvašení střevní mikroflórou a selektivní stimulaci růstu a/nebo aktivity střevních bakterií (Roberfroid, 2007).

5.1 Nestravitelnost – testování odolnosti prebiotik k žaludeční kyselosti, enzymatické hydrolýze a gastrointestinálnímu vstřebávání

Chceme-li aby bylo prebiotikum účinné, musí se dostat do střev alespoň v nějaké podobě. Díky chemické struktuře prebiotických oligosacharidů tyto látky nepodlehnu trávení ve slinivce břišní a trávení střevními enzymy a dostanou se tedy do tlustého střeva. Je ale složité a časově náročné shromáždit experimentální důkazy (Cummings a kol., 2001). Účinnost prebiotika může být testováno metodami „in vivo“ i „in vitro“. „In vitro“ metody zahrnují převážně stanovení odolnosti vůči kyselým podmínkám (např. silně kyselé pH v žaludku) a enzymatické hydrolýze (např. ve slinách, slinivce břišní, tenkém střevě). Po vhodné inkubaci a hydrolýze produktů je stanoven obsah pomocí chemických nebo enzymatických standardizovaných metod. Při „in vivo“ metodách se používají k měření odolnosti vůči jakýmkoli endogenním trávicím procesům měření ve stolici potkanů bez

mikroorganismů nebo po antibiotickém potlačení střevní flóry (Gibson a kol., 2004). Další invazivní metody zahrnují intubaci do gastrointestinálního systému živých potkanů. Modely použitelné pro lidi zahrnují buď přímé využití nestrávených molekul v distálním ileu a výkalech nebo metody nepřímého hodnocení, kdy se ani glykémie ani insulinémie po perorálním podání prebiotického sacharidu výrazně nezvýší (Roberfroid, 2007). Modely, které jsou hojně uznávány jako hodnotná alternativa ke studiu, jsou fyzické osoby, které byly podrobeny ileostomii (řez kyčelníku přes břišní stěnu) (Gibson a kol., 2004). Studie dokázaly, že když se oligosacharid inulinového typu nebo olifruktosa použije při ileostomii, průměrné využití v ileu je mezi 86 a 89%. Testy po izolaci střevního obsahu po požití stravy s obsahem oligofruktos taktéž dokazují využitelnost okolo 89%.

Existují i další metody zkoumání nestravitelnosti. Jedná se převážně o nepřímé metody. Několik studií ukázalo, že po příjmu prebiotik se zvyšuje množství vydechovaného vodíku. Přestože se jedná o důkaz zkvasitelnosti prebiotik, neposkytuje ale informace o skutečném rozsahu jejich nestravitelnosti. Fruktooligosacharidy se stupněm polymerace dva a tři byly inkubovány „in vitro“ s lidskými slinami nebo s potkaním pankreatickým homogenátem a bylo stanoveno, že nejsou stravitelné nebo přesněji velice obtížně stravitelné. Žádná změna v obsahu glukosy v krvi ani inzulinu nebyla zaznamenána při podávání 25 g dávky směsi fruktooligosacharidů se stupněm polymerace dva, tři a čtyři zdravým jedincům. Stejně tak nebylo zjištěno zvýšené množství glukosy v krvi při podávání fruktanů extrahovaných z artyčoků (polymerační stupeň sedm, i více), které byly podávány v dávkách 5, 10 nebo 20 g samostatně nebo v kombinaci i s jinými sacharidy (Cummings a kol., 2001). Nilsson a kol. inkubovali v čerstvých žaludečních šťávách frakce fruktanů získané z různých obilovin po dobu 1 hodiny a tyto testy dokázaly, že při pH 1,05 bylo 10-15% fruktanů hydrolyzováno, ale při pH větším než 1,8 bylo degradováno méně než 1% fruktanů. Když probíhala inkubace s potkaním homogenizovaným obsahem střev, míra hydrolyzy fruktanů také nepřesáhla 1%. Všechny tyto studie se týkají fruktanů o různých velikostech molekul. Nebyly získány přesvědčivé důkazy o trávení v žaludku a tenkém střevě s použitím specifických trávicích enzymů savců (Nilsson a kol., 1988).

Relativně jednoduchý soubor kritérií z hlediska stravitelnosti je potřeba posoudit u lidí. Lidské studie jsou časově náročné a bylo by nerozumné očekávat, že každé nové prebiotikum podstupuje celý proces zkoušení stravitelnosti, resp. nestravitelnosti. V praxi to znamená, že „in vitro“ vlastnosti nových prebiotik jsou pravděpodobně související s jejich fyziologickou funkcí a analytickými výsledky, které mohou být použity pro posouzení potenciálu prebiotik. Tyto analytické výsledky by měly obsahovat několik bodů. Jedná se o:

- podrobný popis chemické struktury
- stanovování odolnosti vůči žaludečním šťávám
- stanovení odolnosti vůči enzymům slinivky břišní
- stanovení odolnosti vůči enzymům tenkého střeva

Dále by měla být posouzena i zkvasitelnost prebiotik (Cummings a kol., 2001).

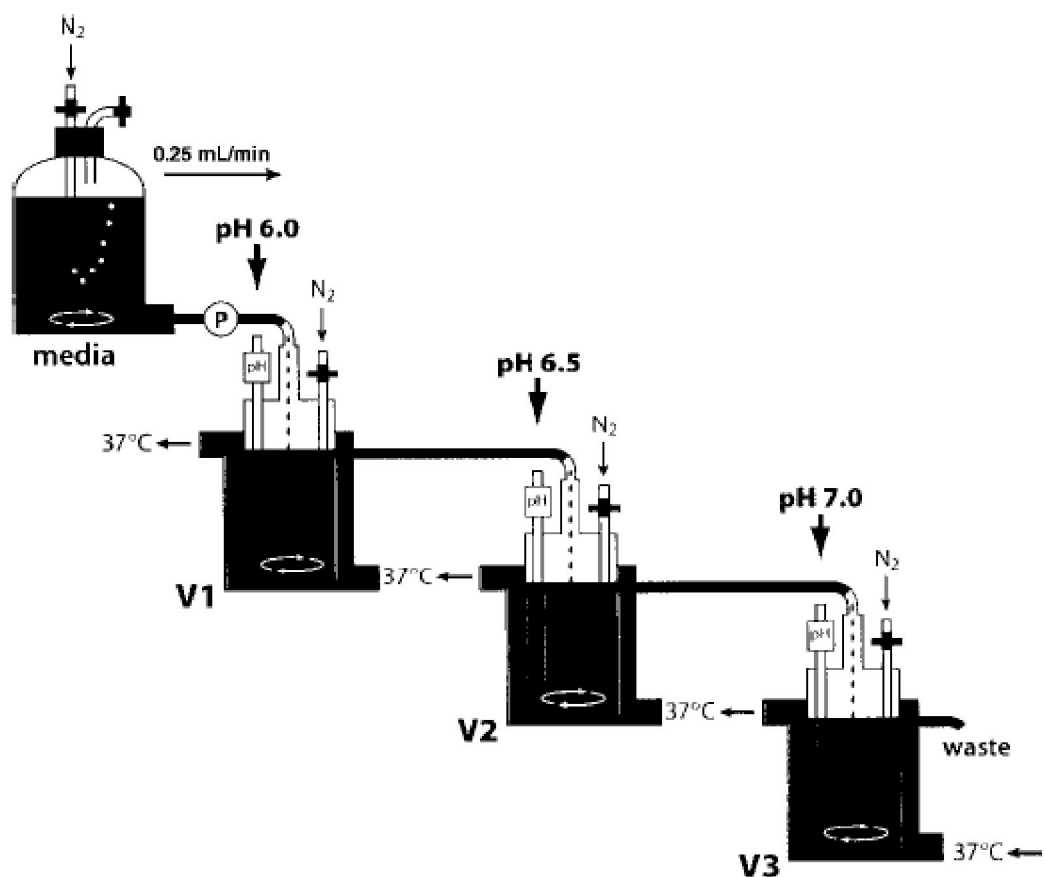
5.2 Testování kvašení pomocí střevní mikroflóry

Všechny sacharidy, které se dostanou do střev, jsou potenciální substráty pro kvašení pomocí mikroflóry intestinálního traktu. Existuje množství „in vitro“ a „in vivo“ studií zabývajících se fermentací sacharidů střevními bakteriemi (Cummings a kol., 2001). Nejčastěji používané metody „in vitro“ studií anaerobních fermentací smíšenými bakteriálními populacemi, především fekálními bakteriemi, jsou dávkové a nepřetržité fermentační systémy. Jako dávky do fermentorů jsou očkované buď čisté kultury nebo vybrané druhy bakterií nebo nejlépe výkaly s obsahem sacharidů, které mají být studovány. Multikomory kontinuálních kulturních systémů byly vyvinuty pro napodobování tělesných, anatomických a nutričních charakteristik gastrointestinálního traktu. Tyto modely jsou užitečné pro odhad místa a rozsahu prebiotického kvašení (Gibson a kol., 2004). „In vivo“ fermentace nestravitelných sacharidů může být studována v laboratorních podmínkách na zvířatech, hospodářských zvířatech a lidech. Při pokusech u potkanů jsou přidávána testovaná prebiotika do potravin nebo pitné vody, ale mohou být podávány také sondou. Zvířata jsou pak v předem daném čase usmrcena. Fekální vzorky a obsah trávicího traktu jsou pak shromažďovány k analýze. Studium fermentace sacharidů v potravě člověka je realizováno dvěma hlavními přístupy. První z nich je nepřímé shromažďování vydechovaného vzduchu u dobrovolníků v pravidelných časových intervalech a měření koncentrace plynů, především vodíku. Ostatní postupy se skládají ze shromažďování výkalů po perorálním podávání a měří se využití testovaných sacharidů (Roberfroid, 2007).

5.2.1 Testování kvašení pomocí fermentorů

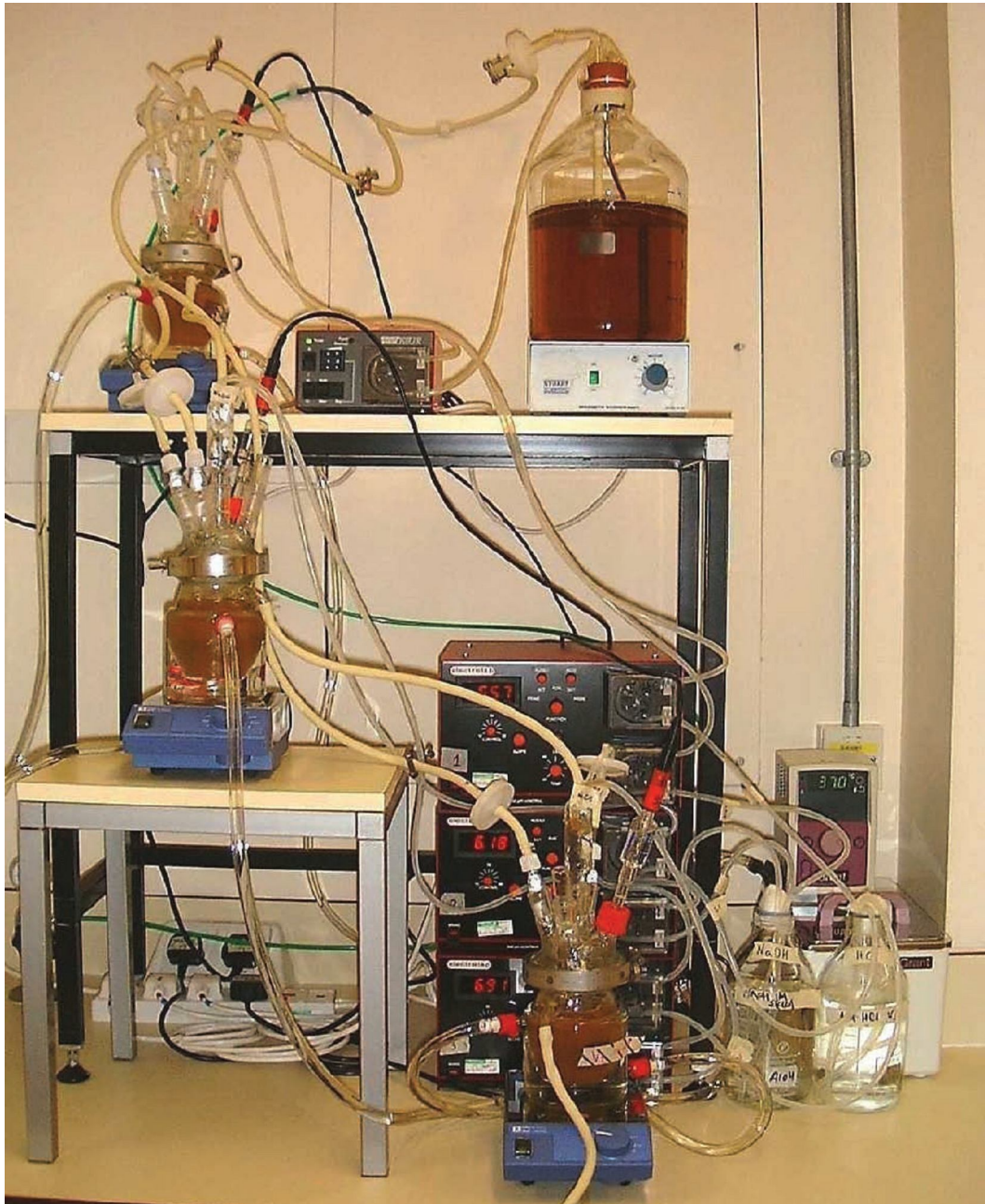
Nejjednodušší „in vitro“ fermentor je statické dávkovací zařízení. Substrát o známé koncentraci v nádobě obsahuje dále fekální suspenzi nebo přesně definované kultury. Inkubace se provádí anaerobně při teplotě 37°C po krátkou dobu, ve většině případů po dobu 24-48 hodin. Vzorky jsou odebrány v pravidelných časových intervalech. Tato metoda je poměrně rychlá a může tedy sloužit jako rychlý srovnávací postup jednotlivých substrátů. Další výhodou je potřeba jen malého množství vzorku, což je důležité zejména v případech, kdy je nedostatek testovaného materiálu.

Fermentory jsou uzavřené systémy, ve kterých je substrát v limitovaném množství. Růst kultury lze popsat typickou růstovou křivkou. Kontinuální systémy (chemostaty) mohou být použity k simulaci střevních podmínek důkladněji. Proměnlivé ředění a další parametry optimální pro růst mohou být určeny podle ustálených pravidel. V semikontinuálních systémech je médium přidáváno a kultura je ve stanovených intervalech odstraňována. Existují i jiné varianty chemostatů. Například byl použit systém o dvou nádobách s membránou mezi nimi, jedná se o difúzní chemostat. Tady je umožněna difúze růstových faktorů a jejich metabolitů mezi jednotlivými komorami, pro buňky je však membrána nepropustná. Byly také vyvinuty vícestupňové chemostaty a jsou využívány jako účinný střevní model, v němž každá část představuje jiný region střeva z pohledu fyzikálně-chemických charakteristik prostředí. Model podle Macfarlana se skládá ze tří částí spojených do série (zapojení chemostatu je znázorněno na obr. č. 7). První blok je bohatý na živiny, dochází k rychlému průchodu, jsou zde nastaveny kyselé podmínky a má malý provozní objem. Třetí část systému má mnohem méně živného substrátu, je zde neutrální pH, pomalý průchod a nejvyšší provozní objem. Ve druhém bloku jsou nastaveny podmínky mezistupně mezi blokem 1 a 3. První blok simuluje tedy podmínky, které jsou v proximálním traktu střeva, druhý blok simuluje podmínky příčného tračníku a třetí blok sestupného tračníku (Gibson a Fuller, 2000).



Obr. č. 7: Kontinuální chemostat používaný k imitaci mikrobiálního prostředí tlustého střeva (složený ze tří částí –V1, V2, V3 – lišící se podmínkami a velikostí) (Gibson a Fuller, 2000).

Testování probiotik a prebiotik se věnují na Univerzitě Reading ve Velké Británii. Probiotické a prebiotické účinky testují na obdobném zařízení, které modeluje lidské střevní prostředí, ještě před zkouškami na lidech (uvedeno na obr. č. 8) (Gibson, 2007).



Obr. č. 8: Aparatura modelující prostředí tlustého střeva používaná k testování probiotik a prebiotik (Gibson, 2007)

5.3 Testování selektivní stimulace růstu a/nebo činnosti střevních bakterií

Splnění tohoto kritéria je velice často testováno a je nejvíce diskutabilní. Zahrnuje anaerobní odběr vzorků, následují spolehlivé a kvantitativní mikrobiologické analýzy na

širokou škálu bakteriálních rodů. Jednoduché potvrzení kvašení a stimulace jednoho mikrobiálního kmene nelze považovat za potvrzení prebiotického účinku.

Mnohé z prvních publikací v tomto směru a některá současná literatura popisují prováděné studie s čistými kulturami. Obvykle to zahrnuje výběr z řady kmenů *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* a jiných bakterií jako jsou *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.* a *Escherichia coli*. Počet testovaných kmenů kolísá v různých studiích a přehledech. Problémem přístupu k výzkumům je samozřejmě to, že vybrané kmeny nemohou být skutečně považovány za reprezentativní zástupce mikroflóry tlustého střeva. Dalším problémem v mnoha studiích je použití široké škály bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ale pouze jednoho nebo dvou kmenů z těch „nežádoucích“ druhů. Takové studie nemohou posoudit, zda dochází k selektivní metabolizaci a měly by takové závěry být využity jen v počátečním vyšetřování prebiotik (Gibson a kol., 2004). Více významné „in vitro“ metody ke studiu prebiotických oligosacharidů používají fekálních vzorků, které zajišťují, že této zkoušce budou vystaveny zástupci různých bakteriálních druhů. Studia změn v populacích vybraných rodů a druhů mohou poukázat na to, zda je stimulace selektivní, či nikoliv. Použití fekálií dává přesnější reprezentační zastoupení mikroflóry distálního tračníku střeva. Hlavním problémem při použití fekálních vzorků je identifikace jednotlivých rodů a druhů mikroorganismů (Roberfroid, 2007).

5.3.1 Testování na selektivních agarech

Tradičně se identifikace mikroorganismů dělá kultivací na řadě selektivních agarů a následují morfologické a biochemické testy (Roberfroid, 2007). Ke kultivačnímu posouzení účinku daného prebiotika na mikroorganismy lze využít čisté kultury střevních bakterií nebo jejich směsné kultury, které lépe vystihují rozmanitost střevní mikroflóry. Tyto metody jsou vhodné pro rychlé porovnání několika prebiotik. Jejich výhodou je, že může být provedeno několik simultánních měření, lze pracovat v malém měřítku a analýza je hotova do 24 hodin (Rycroft a kol., 2001). Tento přístup je postačující pro stanovení, že prebiotika selektivně podporují žádoucí mikroorganismy a potlačuje ty nežádoucí, ale nedává skutečný obraz o změnách v osídlení, ke kterým došlo. To je nevyhnutelné, protože se udává, že asi jen 50% mikrobů v tlustém střevě bylo dosud identifikováno (Gibson a kol., 2004). Růst střevních směsných kultur byl donedávna zjišťován jako počet kolonií na selektivních agarech.

Nicméně tento přístup je nevýhodný z několika závažných důvodů. Jde hlavně o časovou náročnost takové činnosti, pracovní náročnost, malou rozlišovací schopnost (Rycroft a kol., 2001) a subjektivní pohled pracovníka (Gibson a Fuller, 2000). Efektivnější a spolehlivější jsou molekulární metody hodnocení růstu a identifikace bakterií. Molekulárně biologické metody jsou výhodnější, spolehlivější a zahrnují detekci různorodých druhů bakterií (Roberfroid, 2007).

5.3.2 Spektrofotometrické měření růstu mikroorganismů

Spektrofotometrickému stanovení mikroorganismů v podmínkách prebiotik, tedy jejich zvýšenému růstu nebo naopak inhibici, se věnují autoři v mnoha odborných článcích. Jednodenní kultury mikroorganismů, které se testují na ovlivnění prebiotickými oligosacharidy, kultivované v bujónu podle Wilkinse-Chalgrena se přenesou v množství 0,3 ml do 10 ml základního média, obsahujícího trypton (10 g), živný bujón č. 2 (10 g), Tween 80 (1 ml), L-cystein hydrochlorid (0,5 g), destilovanou vodu (1 l) a pH se upraví na hodnotu 7. Základní medium se doplní testovaným prebiotikem. Veškeré přítomné monosacharidy se odstraní předkultivací s bakterií *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, tento kmen využije z média monosacharidy jako je glukosa, fruktosa, laktosa a galaktosa. Zkumavky se zaočkovaným základním médiem doplněné o sledované prebiotikum se inkubují při vhodné teplotě a čase pro daný mikroorganismus. Následně se proměřuje absorbance při 620 nm (Rada a kol., 2008).

5.3.3 Testování pomocí fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Nejčastěji používaným molekulárním přístupem je metoda FISH (fluorescent in situ hybridization), která zahrnuje použití specifických oligonukleotidových sond, orientujících se na diskriminační oblasti v rRNA molekulách. Mezi časté cílové skupiny, pro které jsou používány oligonukleotidové sondy, patří rod *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Eubacterium* (Roberfroid, 2007) a *Clostridium*. Tato moderní technika umožňuje zjistit různorodost bakteriální flóry rychlým, kulturně nezávislým a spolehlivým způsobem. Cílem této metody je určitá oblast v rRNA molekulách, specifické skupiny bakterií

lze odlišit od ostatních bakterií ve smíšené kultuře. Metoda FISH je významná tím, že odstraňuje nejednoznačnost, která je významným rysem tradičních kultivací na selektivních agaroch. Kromě toho je fluorescenční hybridizace kulturně nezávislá technika, která nevyžaduje předchozí anaerobní kultivace a růst mikroorganismů na laboratorních médiích (Gibson a kol., 2004). Při fluorescenční hybridizaci in situ dochází k interakci mezi rodově specifickými fluorescenčně značenými oligonukleotidy a extraktem vzorku, který obsahuje bakteriální rRNA. Tímto způsobem označené buňky se vyčísľují pomocí fluorescenční mikroskopie (Rycroft a kol., 2001) nebo s použitím tzv. „flow cytometru“ (Franks a kol., 1998). Při průtokové cytometrii (flow cytometry) dochází ke kvantifikaci bakterií při FISH metodě. V současné době dochází ke zlepšování metod a zvětšování rozlišovacích schopností průtokové cytometrie (Gibson a kol., 2004).

5.3.4 Testování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Možnost taxonomického zařazení umožňují metody založené na izolaci bakteriální DNA přímo z přírodního materiálu, následné amplifikaci úseku kódujícího 16S rRNA (Uhlík a kol., 2008). Bakteriální ribosomy obsahují molekuly, které mohou být identifikovány na molekulární úrovni (Gibson a kol., 2004). Po mnoha letech zkoumání na sebe molekulární techniky založené na 16S rRNA sekvencích přitáhly velkou pozornost, jakožto to na spolehlivé metody detekce a identifikace bakteriálních druhů. Metody zahrnující 16S rRNA hybridizační sondy a PCR primery umožňují poměrně rychlou a hlavně specifickou detekci mikroorganismů. Metody PCR (polymerázová řetězová reakce) mohou být využity k detekci bakterií v různých fylogenetických úrovních v závislosti na použitých primerech, hybridizačních metodách a různých technikách PCR (Matsuki a kol., 2002). Franks a kol. (1998) začali používat osm 16S rRNA cílených sond pro velké druhy a skupiny anaerobních střevních bakterií ve výkalech dobrovolníků. Na druhou stranu techniky PCR se zvláštními 16S rDNA oligonukleotidovými primery byly vyvinuty pro detekci bakterií v složitém ekosystému. Zatím byly konkrétní oligonukleotidové primery navrženy pro mnoho druhů bakterií, u kterých je známo, že se vyskytují ve střevním traktu, a tyto primery jsou úspěšně používány. Nicméně mikroflóru ve střevech je obtížné studovat pouze s primery, které jsou specifické pouze na úrovni druhu v důsledku velké rozmanitosti mikroorganismů. Je tedy výhodnější použít primery specifické pro významné rody a skupiny přítomné ve střevech.

Rodově specifické primery byly vytvořeny pro bakterie rodu *Bifidobacterium* a byly také rozsáhle testovány (Matsuki a kol., 2002).

Využitím různých oblastí sekvencí 16S rRNA je možné určit pořadí basí, které jsou charakteristické pro různé taxony a mohou být použity jako cíle pro genové sondy (Gibson a kol., 2004).

5.4 Testování odolnosti prebiotik při technologickém zpracování

Prebiotika, která mají sloužit jako funkční složky potravin, musí být chemicky stabilní při zpracování potravin, musí tedy odolávat vyšším teplotám, nízkému pH a průběhu Maillardových reakcí. Této problematice se věnuje několik studií.

Například suchý záhřev inulinu z čekanky nebo artyčoků na 60 minut při teplotě mezi 135 a 195°C má za následek značnou degradaci inulinu, která se pohybuje mezi 20 a 100% a často to vede ke vzniku nových produktů. Přesto i když se prebiotika chemicky pozmění, svou funkční aktivitu si mohou zachovat nebo dokonce se jejich funkční aktivita zvýší po tepelném ošetření. Zahřátí inulinu na 195°C po dobu 30 minut má za následek úplný rozklad na řetězce fruktanů a nových nízkomolekulárních látek. To má ve výsledku za následek prokázanou významně vyšší stimulaci růstu rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Enterobacteriaceae* a významnou inhibici růstu potenciálních patogenů.

5.4.1 Prebiotická činnost a prebiotický index (PI)

Je efektivní hodnotit stabilitu prebiotik při podmínkách zpracování po chemické i funkční stránce (Huebner a kol., 2008). Prebiotická aktivita odráží schopnost daného substrátu podporovat růst organismu v porovnání s jinými organismy a ve srovnání s růstem na neprebiotických substrátech jako je glukosa (Huebner a kol., 2007). Proto sacharidy mají pozitivní prebiotickou činnost pokud jsou metabolizovány stejně jako glukosa probiotickými bakteriemi, ale nejsou metabolizovány ostatními střevními mikroorganismy. Prebiotika jsou funkčně stabilní, pokud jejich prebiotická činnost před a po zpracování potravin zůstane stejná nebo vzroste. Výsledky takových studií mohou být užitečné pro identifikaci prebiotik přidávaných do mléčných výrobků a jiných potravin (Huebner a kol., 2008).

Stanovování prebiotického indexu se provádí většinou zaočkováním 1% (V/V) jednodenní čisté kultury probiotické bakterie do samostatných zkumavek obsahujících MRS bujón s 1% (m/V) glukosy nebo 1% (m/V) testovaného prebiotika. Zkumavky se kultivují při 37°C za anaerobních podmínek (85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) v anaerostatech pro bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, pro aerobní bakterie při běžné okolní atmosféře. Po 0, 24 a 48 hodinách inkubace je zjišťováno pomnožení dané bakterie. Pomnožení enterických bakterií se zjišťuje přidáním 1% (V/V) enterické směsi mikroorganismů do zkumavek obsahující M9 bujón s 1% (m/V) glukosy nebo 1% (m/V) testovaného prebiotika, po inkubaci za aerobních podmínek se opět po 0, 24 a 48 hodinách vyhodnocuje pomnožení enterických bakterií (Huebner a kol., 2007). Podstatné je, že se buněčná hustota stanovuje na bázi optické hustoty (optical density, O.D.) spektrofotometrickým proměřováním při 600 nm. Jedná se o jednodušší a rychlejší techniku určování prebiotické aktivity. Experimenty potvrdily, že výsledky spektrofotometrického stanovení jsou srovnatelné s hodnotami získanými počítáním kolonií na agarových selektivních půdách. Prebiotická aktivita je vyjádřena pomocí rovnice (Huebner a kol., 2008):

$$\text{Prebiotická aktivita} = \left[\frac{\log \text{O.D. probiotických bakterií na prebiotiku po 24hod.} - \log \text{O.D. probiotických bakterií na prebiotiku po 0hod.}}{\log \text{O.D. probiotických bakterií na glukose po 24hod.} - \log \text{O.D. probiotických na glukose po 0hod.}} \right] - \left[\frac{\log \text{O.D. střevních bakterií na prebiotiku po 24hod.} - \log \text{O.D. střevních bakterií na prebiotiku po 0hod.}}{\log \text{O.D. střevních bakterií na glukose po 24hod.} - \log \text{O.D. střevních bakterií na glukose po 0hod.}} \right]$$

Obecně platí, že tyto metody poskytují indexy, které odrážejí relativní schopnost daného prebiotika specificky působit na dané probiotické bakterie. Jsou založeny na měření mikrobiální populace, rychlosti růstu a asimilaci substrátu. Tyto indexy lze využít pro srovnávání různých sacharidů a jejich potenciálu ke stimulaci růstu konkrétních probiotik (Huebner a kol., 2007).

5.4.2 Vliv nízkého pH na prebiotika

Při testování vlivu nízkého pH bylo přidáno zkoušené prebiotikum do citrát-fosfátového pufru o koncentraci 20 mmol/l při pH 3,0; 4,0; 5,0 a 6,0. Vzorky byly po dobu 24 hodin při pokojové teplotě (21°C). Po 24 hodinách bylo upraveno pH na hodnotu 7,0

s použitím hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Poté byla opět měřena optická hustota buněk v médiu. Lze konstatovat, že prebiotika jsou odolná nízkým hodnotám pH (Huebner a kol., 2008).

5.4.3 Vliv tepla a nízkého pH na prebiotika

Při testech bylo opět přidáno sledované prebiotikum do citrát-fosfátového pufru o koncentraci 20 mmol/l při pH 4,0; 5,0; 6,0 a 7,0. Vzorky byly 30 minut ve vodní lázni o teplotě 85°C. Poté byly vzorky ochlazeny, pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným a podrobeny měření optické hustoty buněk. Výsledky takových pokusů ukazují, že vysoká teplota a nízké pH dohromady může způsobovat částečnou hydrolyzu prebiotických oligosacharidů (Huebner a kol., 2008).

5.4.4 Vliv Maillardových reakcí na prebiotika

Lze říci, že tvorba Maillardových reakcí může snížit činnost prebiotických sacharidů. Při Maillardových reakcích redukující cukry reagují s aminokyselinami za vzniku produktů o vyšší molekulové hmotnosti, které mohou mít vliv na chuť, vůni a barvu potravin.

Prebiotika se přidávají při testování odolnosti vůči Maillardovým reakcím opět do fosfát-citrátového pufru o koncentraci 20 mmol/l a pH 7,0 s 1% glycinem. Roztok se zahřeje na teplotu 85°C ve vodní lázni. Vzorky se po určitých časových intervalech odstraňují z vodní lázně, případně se upraví pH roztoku na hodnotu 7,0 pomocí kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu sodného. Tvorba produktů Maillardových reakcí se sleduje v určitých časových intervalech měřením absorbance při vlnové délce 420 nm. Měření absorbance při 420 nm je uznávaná metoda stanovování indexu zhnědnutí. Vznik produktů Maillardových reakcí vede k nárůstu absorbance. Zhnědnutí se stanovuje pro každé prebiotikum v různých časových intervalech vzhledem k rozsahu zhnědnutí ve vzorku obsahujícím glukosu po 3 nebo 6 hodinách. Procentně vyjádřené relativní zhnědnutí lze vyjádřit vztahem:

$$\text{Procento relativního zhnědnutí} = \frac{\text{Průměr absorbanzí při 420 nm směsi s prebiotikem v čase t1}}{\text{Průměr absorbanzí při 420 nm směsi s glukosou v čase t2}} \times 100\%$$

(Huebner a kol., 2008)

5.5 Směrnice pro hodnocení prebiotik

Na konferenci FAO (Food Quality and Standards Service) o prebiotikách byly vysloveny doporučené pokyny pro metodiky hodnocení prebiotik, aby vedly k efektivnímu a bezpečnému použití v potravinách. Stručné schéma hodnocení prebiotik dle organizace FAO je uvedena na obr. č. 9.

Obr. č. 9: Směrnice pro hodnocení prebiotik (FAO, 2009)

6 Z Á V Ě R

Modifikace lidské střevní mikroflóry má v současné době velký potenciál. Úprava vhodným a požadovaným směrem může být realizována dvěma způsoby. Prvním je zařadit do stravy významný podíl prospěšných probiotických bakterií následně kolonizujících trávicí trakt, především bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, druhým způsobem je přidávání nestravitelných prebiotických oligosacharidů do stravy a tím podpořit rozvoj žádoucích bakterií (Montesi a kol., 2005).

Koncepce prebiotik je poměrně mladá oblast vědeckých výzkumů ve směru mikrobiologie, chemie a biochemie potravin. Počátek zájmu o prebiotika byl v polovině 90. let minulého století. Dnes je již zřejmé, že zájem v této oblasti je oprávněný a žádoucí. Ve velkém rozsahu jsou v dnešní době vyvíjeny nové látky s prebiotickými vlastnostmi podrobované přísným zkouškám. Této problematice se věnuje celá řada předních světových univerzit a výzkumných týmů. V době, kdy jsou ve světě řešeny velké problémy s civilizačními chorobami, je aktuální řešit problematiku funkčních potravin a jejich přínos lidskému zdraví.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BLAUT M. (2002): Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. 41: 11-16

BOEHM G., FANARO S., JELINEK J., STAHL B., MARINI A. (2003): Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatrica Supplement*. 441: 64-67

BOEHM G., STAHL B., JELINEK J., KNOL J., MINIELLO V., MORO G.E. (2005): Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica*. 49: 18-21

BUDDINGTON R.K., WILLIAMS C.H., CHEN S., WITHERLY S.A. (1996): Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 63: 709-716

COLLINS M.D., GIBSON G.R. (1999): Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69: 1052S – 1057S

CRITTENDEN G.R., PLAYNE M.J. (1996): Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*. 7: 353-361

CUMMINGS J.H., MACFARLANE G.T., ENGLYST H.N. (2001): Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 415S-420S

CUPÁKOVÁ, Š., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P., NECIDOVÁ, L. (2002): Úloha probiotik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství*. 52: 66-68

DELZENNE N.M., KOK N. (2001): Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 456-458

DUNNE C., MAHONY L.O., MURPHY L., THORNTON G., MORRISSEY D., HALLORAN S.O., FEENEY M., FLYNN S., FITZGERALD G., DALY CH., KIELY B., SULLIVAN G.C.O., SHANAHAN S.O., COLLINS J.K. (2001): In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correaltion with in vivo findings. The American Journal of Clinical Nutrition. 73: 386S-392S

EBRINGER L. (2002): Probiotiká, prebiotiká a synbiotiká. In Muzikář V., Bartl V. Mikrobiologie potravin a její příspěvek ke zdraví a moderní technologii. Akademie věd ČR. str. 58-67

EBRINGER L., FERENČÍK M., MIKEŠ Z. (1999): Fortifikácia potravín probiotickými baktériami. In Muzikář V., Bartl V. Aktuální problematika mikrobiologie potravin. Akademie věd ČR. str. 33-39

ELMER G.W., McFARLAND L.V., McFARLAND M. (2007): The Power of Probiotics: Improving Your Health wih Beneficial Microbes. The Haworth Press, Inc. 236 s., ISBN: 0-7890-2901-4

ERBAN V. (2005): Testování polysacharidů jako prebiotika. Chemické listy. 99: 661-671

FARKAŠ A., FRANCANOVÁ D. (2008): Miesto prebiotík a probiotík v klinickej výživě. Ambulantná terapia. 1: 48-53

FAO (FOOD QUALITY AND STANDARDS SERVICE): FAO Technical Meeting on PREBIOTICS. Dostupné z:
www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf (10.4.2009)

FOOKS L.J., FULLER R., GIBSON G.R. (1999): Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy Journal. 9: 53-61

FOREJT M. (2008): Působení probiotik na imunitní systém organismu. Potravinářská revue. 2: 18-19

FRANCK A. (2002): Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87: 287-291

FRANKS A.H., HARMSSEN H.J.M., RAANGS G.C., JANSEN G.J., SCHUT F., WELLING G.W. (1998): Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3336-3345

FRIČ P. (2008): Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatric pro praxi*. 1: 24-29

FRIČ P. (2005): Probiotika v terapii chorob trávicieho ústrojí. *Interní medicína pro praxi*. 10: 434-437

GAELLE Q.: Syntetická zpráva: Konzumenti (CG1), Probiotics. Institut National de la Recherche Agronomique, France. Dostupné z: <http://flairflow4.vscht.cz> (15.2.2009)

GIBSON G.R. (2007): Functional foods: probiotics and prebiotics. *Culture*. 28: 1-3

GIBSON G.R. (2004): Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*. 1: 25-31

GIBSON G.R., FULLER R. (2000): Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use. *The Journal of Nutrition*. 130: 391-395

GIBSON G.R., PROBERT H.M., LOO J.V., RASTALL R.A., ROBERFROID M.B. (2004): Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17: 259-275

GIBSON G.R., ROBERFROID M.B. (1995): Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412

GOPAL P.K., SULLIVAN P.A., SMART J.B. (2001): Utilisation of galacto.oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. International Dairy Journal. 11: 19-25

GREGORA M. (2004): Výživa malých dětí. Grada Publishing. 96 s. ISBN: 80-247-9022-X

HASCHKE F., FIRMANSYACH A., MENG M., STEENHOUT H., CARRIÉ A.-L. (2001): Functional food for infants and children. Monatsschrift Kinderheilkunde. 149: S66-S70

HERMANS D., BUTS J.-P. (2002): Střevní flóra: klíčový faktor zdraví kojenců. Čtvrtletní noviny pro pracovníky ve zdravotnictví. Číslo 2., str. 1-11

HUEBNER J., WEHLING R.L., HUTKINS R.W. (2007): Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal. 17: 770-775

HUEBNER J., WEHLING R.L., PARKHURST A., HUTKINS R.W. (2008): Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal. 18: 287-293

KALACĚ, P. (2003): Funkční potraviny – kroky ke zdraví. Dona. 130 s. ISBN 80-7322-029-6

KAPLAN H., HUTKINS R.W. (2000): Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2682-2684

KOHOUT P. (2008): Význam probiotik pro zdravé zažívání. Potravinářská revue. 2: 17-18

KOLIDA S., TUOHY K., GIBSON G.R. (2002): Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 87: 193S-197S

KREJSEK J., KUDLOVÁ M., KOLÁČKOVÁ M., NOVOSAD J. (2007): Nurič, probiotika a imunitní systém, II.část: Nurič, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. Pediatr. pro Praxi. 3: 125-128

KVASNIČKOVÁ A. (2000): Sacharidy pro funkční potraviny: probiotika-prebiotika-synbiotika. ÚZPI Praha. 81s., ISBN: 80-7271-001-X

LATA J., JURÁNKOVÁ J., PŘÍBRAMSKÁ V., OSTŘÍŽEK T. (2007): Probiotika v gastroenterologii a hepatologii. Interní medicína pro praxi. 1: 7-10

LOOIJER-VAN LANGEN M.A.C., DIELEMAN L.A. (2009): Prebiotics in Chronic Intestinal Inflammation. Inflammatory bowel disease. 15: 454-462

LOURENS-HATTINGH A., VILJOEN B.C. (2001): Yogurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal. 11: 1-17.

MACFARLANE S., MACFARLANE G.T., CUMMINGS J.H. (2006): Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 24: 701-714

MAISCHBERGER T., NGUYEN T.-H., SUKYAI P., KITTL R., RIVA S., LUDWIG R., HALTRICH D. (2008): Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. Carbohydrate Research. 343: 2140-2147

MANNING T.S., GIBSON G.R. (2004): Prebiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 18, s. 287-298

MARTÍNEZ-VILLALUENGA C., CHICHOLOSKA J., KLIBER A., GULEWICZ K. (2008): Raffinose family oligosaccharides of lupin (*Lupinus albus* L. cv multolupa) as a potential prebiotic. Proceedings of the Nutrition Society. 67 (OCE), E55

MATSUKI T., WATANABE K., FUJIMOTO J., MIYAMOTO Y., TAKADA T., MATSUMOTO K., OYAIZU H., TANAKA R. (2002): Development of 16S rRNA-Genetargeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. Applied and Environmental Microbiology. 68: 5445-5451

MEGO M. (2005): Probiotiká. Via pract.. 9: 354-357

MONTESI A., GARCÍA-ALBIACH R., POZUELO M.J., PINTADO C., GONI I., ROTGER R. (2005): Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 281-289

NEVORAL J. (2005): Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatr. pro Praxi*. 2: 59-65

NEVORAL J., a kol.: *Výživa v dětském věku*. Nakladatelství H & H, 2003, ISBN 80-86-022-93-5

NILSSON U., ØSTE R., JØGERSTAD M., BIRKHED D. (1988): Cereal Fructans: In Vitro and In Vivo Studies on Availability in Rats and Humans. *The Journal of Nutrition*. 118: 1325-1330

OLIVEIRA R.P.S., FLORENCE A.C.R., SILVA R.C., PEREGO P., CONVERTI A., GIOIELLI L.A., OLIVEIRA M.N. (2009): Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*. 128: 467-472.

OUWEHAND A.C., DERRIEN M., VOS W., TIIHONEN K., RAUTONEN N. (2005): Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 212-217

PÁNEK J., POKORNÝ J., DOSTÁLOVÁ J., KOHOUT P. (2002): *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis. 207s., ISBN: 80-86320-23-5.

RADA V. (2008): Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Potravinářská revue*. 2: 15-16

RADA V., NEVORAL J., TROJANOVÁ I., TOMÁNKOVÁ E., ŠMEHILOVÁ M., KILLER J. (2008): Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Anaerobe*. 14: 205-208

RASTALL R.A., MAITIN V. (2002): Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 490-496.

REID G. (2008): Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. *International Dairy Journal*. 18: 969-975

ROBERFROID M.B. (2002): Functional food concept and its application to prebiotics. *Digest Liver Dis*. 34: 105S-110S

ROBERFROID M.B. (2000): Chicory Fructooligosaccharides and the Gastrointestinal Tract. *Nutrition*. 16: 677-679

ROBERFROID M.B. (2007): Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*. 137: 830S – 837S

ROBERFROID M.B. (2001): Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 406-409

RUDOLFOVÁ J., ČURDA L., (2005): Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chem. Listy* 99 (2005): 168-174

RYCROFT C.E., JONES M.R., GIBSON G.R., RASTALL R.A. (2001): A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 878-887

SAKO T., MATSUMOTO K., TANAKA R. (1999): Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9: 69-80

SAULNIER D.M.A., SPINLER J.K., GIBSON G.R., VERSALOVIC J. (2009): Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 1-7

SCHOLZ-AHRENS K.E., SCHAAFSMA G., HEUVEL E., SCHREZENMEIR J. (2001): Effects of prebiotics on mineral metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 459-464

SU P., HENRIKSSON A., MITCHELL H. (2007 a): Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 2392-2400

SU P., HENRIKSSON A., MITCHELL H. (2007 b): Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe*. 13: 134-139

SUVARNA V.C., BOBY V.U. (2005): Probiotics in human health: a current assessment. *Current Science*. 88: 1744-1748

SÝKORA J., SCHWARZ J., SIALA K. (2006): Probiotika a dětský věk. *Pediatr. pro Praxi*. 5: 264-270

ŠALAKOVÁ A., DRBOHLAV J., PEROUTKOVÁ J., PECHAČOVÁ M. (2008): Výzkum probiotických mikroorganismů pro využití v mléčných výrobcích a funkčních potravinách. In Kopáček J. Kroměřížské mlékařské dny 2008. Kromilk s.r.o.. Str. 102-105

TUOHY K.M., PROBERT H.M., SMEJKAL C.W., GIBSON G.R. (2003): Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Druck discovery today*. 8: 692-700

TUREK B., HRUBÝ S. (2002): Zákulisí prebiotik a probiotik. In Muzikář V., Bartl V. Mikrobiologie potravin a její příspěvek ke zdraví a moderní technologii. Akademie věd ČR. Str. 68-71

UHLÍK O., JEČNÁ K., MACKOVÁ M., LEIGH M.B., DEMNEROVÁ K., MACEK T. (2008): Využití značení stabilními isotopy pro detekci mikroorganismů aktivních při degradaci xenobiotik. *Chemické listy*. 102: 474-479

VELÍŠEK J. (1999): *Chemie potravin 1*, Tábor: OSSIS., 352 s., ISBN: 80-902391-3-7

VORAGEN A.G.J. (1998): Technological aspect of functional food-related carbohydrates. Trends in Food Science & Technology. 9: 328-335

Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví obsah pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Dostupné z: <http://www.esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=2003s077> (28.2.2009)

WALKER W.A., DUFFY L.C. (1998): Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. Journal of Nutritional Biochemistry. 9: 668-675

WANG Y. (2008): Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food research International. doi:10.1016/j.foodres.2008.09.001

WOLLOWSKI I., RECHKEMMER G., POOL-ZOBEL BL. (2001): Protective role of probiotics in colon cancer. The American Journal of Clinical Nutrition. 73: 451–455