

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Lupina jako zdroj prebiotických oligosacharidů

Bakalářská práce

Autor práce: Tereza Kodešová

Obor studia: ATZD

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Martina Geigerová

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 21.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. a Ing. Martině Geigerové za vedení, pomoc, ochotu a cenné rady, které mi při zpracovávání této práce poskytly.

Lupina jako zdroj prebiotických oligosacharidů

Souhrn

V současné době se lupina začíná pěstovat a využívat k výživě hospodářských zvířat, ale i lidí, mnohem více než dříve. Důvodem je vyšlechtění nových „sladkých“ odrůdy lupin, které již neobsahují tolik antinutričních látek a zároveň obsahují vysoké procento bílkovin. Díky vysokému obsahu oligosacharidů rafinosové řady (RSO) slouží lupina nejen jako zdroj proteinu, ale také jako zdroj prebiotik. Cílem práce proto bylo ověření přítomnosti oligosacharidů rafinosové řady v lupině a jejich následné vyextrahování. Při zjišťování množství RSO byl použit enzymatický test od Megazyme[®]. Testována byla mouka se semen Lupiny bílé (*Lupinus albus*) odrůdy Zulika. Pro porovnání obsahu RSO v semenech s jinými plodinami, byly použity extrahované šroty z řepky, slunečnice a sóji. Bylo zjištěno, že v extrahovaných šrotech slunečnice bylo $1,73 \pm 0,26$ g RSO/100 g šrotu, řepky $1,79 \pm 0,14$ g RSO/100 g šrotu a sóji $6,96 \pm 0,21$ g RSO/100 g šrotu. Lupinová mouka obsahovala největší množství RSO a to $8,26 \pm 0,14$ g/100 g mouky. Poté co bylo prokázáno, že semena lupiny obsahují RSO, mohlo být dalším krokem vyizolování těchto oligosacharidů z mouk u tří odrůd Lupiny bílé (Amiga, Dieta a Zulika). K extrahování oligosacharidů byla použita upravená metoda podle Ekvala s kol. (2007) a k izolaci oligosacharidů rafinosové řady metoda podle Warda a kol. (2006). U odrůdy Amiga bylo vyextrahováno 2,84 g RSO/100 g mouky, Dieta 1,38 g RSO/100 g mouky a Zulika 1,74 g RSO/100 g mouky. Účinnost zvoleného postupu extrakce byla 21 %. Nízká výtěžnost byla způsobena přítomností nežádoucích oligosacharidů v některých frakcích, či malou efektivností zvoleného postupu. Toto množství však je dostačující pro provedení dalších experimentů, při testování růstu střevních bakterií na RSO z lupiny. Z výsledků vyplývá, že v porovnání s jinými plodinami obsahují semena lupiny vysoký podíl RSO a že tyto oligosacharidy dokážeme ze semen lupiny vyextrahovat. Lupinu i výrobky z lupiny, lze díky vysokému obsahu RSO řadit mezi funkční potraviny.

Klíčová slova: lupina, prebiotika, oligosacharidy rafinosové řady, bifidobakterie, výživa člověka

Lupine as a source of prebiotic oligosaccharides

Summary

Lupine is used as nutrition for farm animals as well as for people nowadays much more than before. The reason is that new „sweet“ varieties of lupine have been created, which do not contain so much anti-nutritive substances and also have a high percentage of proteins. Because of a high content of soybean oligosaccharides (SOS), lupine is not only used as a source of protein, but also as a source of prebiotics. The aim of the study was to evaluate the presence of SOS in lupine and then to extract it. For the quantification of SOS in lupine meal from white lupine seeds (*Lupinus albus*) variety Zulika the enzymatic test from Megazyme[®] was used. For comparison with other crops, meal from rapeseed, sunflower and soybean were also tested. Sunflower had $1,73 \pm 0,26$ g SOS/100 g of meal. Rapeseed had $1,79 \pm 0,14$ g SOS/100 g of meal. Soybean had $6,96 \pm 0,21$ g SOS/100 g of meal. Lupine meal had the highest quantity of SOS $8,26 \pm 0,14$ g/100 g of meal. When it has been proven that lupine contains SOS, the next step was to extract SOS from lupine. Three meals from three different varieties of white lupine (Amiga, Dieta and Zulika) were chosen for this aim. The modified method by Ekval et al. (2007) was used for oligosaccharides extraction and the method by Wardet et al. (2006) was applied for isolation of soybean oligosaccharides. Amiga had 2,84 g SOS/100 g of meal, Dieta had 1,38 g SOS/100 g of meal and Zulika had 1,74 g SOS/100 g of meal. Efficiency of the SOS extraction was 21 %. A low efficiency of the SOS extraction is probably caused by presence of other oligosaccharides in some fractions or by a low efficiency of extraction itself. However, this amount is sufficient for further experiments in which the growth of intestinal bacteria on SOS from lupine can be tested. Results showed that lupine seeds have the highest proportion of SOS compared with other crops and that these oligosaccharides can be extracted. Because of high amount of SOS, lupine and its products may be classified as functional foods.

Keywords: lupine, prebiotic, soybean oligosaccharides, bifidobacteria, human nutrition

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Hypotéza a cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Mikrobiota trávicího traktu	3
3.2 Probiotika.....	4
3.3 Prebiotika.....	6
3.4 Synbiotika	8
3.5 Prebiotické oligosacharidy	9
3.5.1 Fruktooligosacharidy (FOS)	9
3.5.2 Galaktooligosacharidy (GOS).....	9
3.5.3 Xylooligosacharidy (XOS)	10
3.5.4 Oligosacharidy rafinosové řady (RSO) - Sójové oligosacharidy (SOS)...	10
3.5.5 Isomaltooligosacharidy (IMO)	12
3.5.6 Laktulosa.....	12
3.6 Prebiotické polysacharidy - inulin.....	12
3.7 Zdroje prebiotických oligosacharidů	13
3.7.1 Sója	14
3.7.2 Lupina	14
3.7.2.1 Lupina bílá a její odrůdy.....	15
3.7.2.2 Využití lupiny.....	16
4 Metodika	18
4.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinosové řady ve vybraných hospodářských plodinách	18
4.2 Extrakce prebiotických oligosacharidů z mouky lupiny	19
4.2.1 Extrakce oligosacharidů rafinosové řady.....	20
4.2.2 Analýza frakcí.....	21
5 Výsledky	23
5.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinosové řady ve vybraných hospodářských plodinách	23
5.2 Extrakce oligosacharidů rafinosové řady z mouky lupiny	23
6 Diskuze	26
7 Závěr	31
8 Zdroje:.....	32

1 Úvod

Zdraví a dobrá fyzická kondice je v dnešní době velmi diskutovaným tématem. Obzvláště dnes, kdy lidstvo ve vyspělých státech trpí četnými civilizačními nemocemi jako je obezita, vysoká hladina cholesterolu, vysoký krevní tlak, cukrovka, zácpa nebo karcinom tlustého střeva. Ke zdravé a vitální kondici člověka a obecně živočichů neodmyslitelně patří zdravý zažívací trakt, který umožňuje přijímat potřebné živiny a vylučovat z těla škodlivé látky.

Většina lidí ví o podstatě probiotik jako takových, ale už méně lidí je obeznámeno s důležitostí prebiotik, která probiotika vyživují a napomáhají tak k udržení rovnováhy střevní mikrobioty.

Zdrojem prebiotik jsou různé oligosacharidy a neškrobné polysacharidy, které můžeme nalézt např. v kořenech čekanky (inulin), semenech hrachu, sóji nebo lupiny. Problém u hrachu či sóji je vysoké procento antinutričních látek, které se v dnešních odrůdách lupiny vyskytují v menší míře nebo se nevyskytují vůbec. Lupina by tudíž mohla být vhodnějším zdrojem prebiotik.

2 Hypotéza a cíl práce

Pro úpravu rovnováhy intestinální mikrobioty a podporu rozvoje bifidobakterií v trávicím traktu je doporučována konzumace prebiotik. Jako prebiotika jsou často používány oligosacharidy. Bylo prokázáno, že výrazný bifidogenní efekt mají oligosacharidy rafinosové řady, které jsou obsaženy zejména v luštěninách. Předpoklad je tedy takový, že lupina obsahuje oligosacharidy rafinosové řady, které bude možné využít jako prebiotika ve výživě lidí.

Cílem práce je ověřit, zda lupina obsahuje oligosacharidy rafinosové řady, tedy prebiotické oligosacharidy, využitelné pro výživu lidí a tyto oligosacharidy následně izolovat.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiota trávicího traktu

Trávicí trakt člověka zajišťuje příjem a zpracování potravy tak, aby mohla být co nejlépe a nejefektivněji využívána. Začíná dutinou ústní, pokračuje jícnem, žaludkem, tenkým střevem a končí střevem tlustým. Tlusté střevo je děleno na 5 částí: slepé střevo, vzestupný, příčný, sestupný tračník a esovitá klička. Z mikrobiologického hlediska to je nejosídlenejší část trávicího traktu (Macfarlane a Cummings, 1991), viz tabulka 1.

Tabulka 1.: Přibližné počty bakterií (log CFU*/g) v různých částech trávicího traktu různých živočišných druhů (Hill, 1995).

	Člověk	Potkan	Prase	Myš	Králík
Ústní dutina	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8
Žaludek	<3	7	6-7	7	4
Jejunum	<3	7	8	7	4
Ileum	5	8	10	8	8
Tlusté střevo	11	11	11	11	11

* CFU – colony forming units = kolonie tvořící jednotky

Tlusté střevo slouží na rozdíl od střeva tenkého, které vstřebává živiny, hlavně ke vstřebání přebytečné vody ve stolici zpět do těla. Přes stěnu tlustého střeva se dokáží vstřebat i minerální látky a některé metabolity vzniklé činností střevní mikrobioty (Solař, 2010). Jedná se o místo s nejintenzivnější mikrobiální činností.

Mikrobiota je pro trávicí trakt velmi důležitá. Fermentuje zbytky nestrávené potravy. Do tlustého střeva se denně dostane cca 20 až 60 g sacharidů ve formě vlákniny nebo poly a oligosacharidů, 5 až 20 g proteinů (Macfarlane a Cummings, 1991) a 3,5 g tuku (Priebe a kol., 2002). Jelikož je sacharolytické štěpení pro bakterie energeticky výhodnější, jsou v první části tlustého střeva nejprve štěpeny nestrávené sacharidy (Van Loo, 2004). V další části převažují spíše proteolytické, metanogení a sulfátredukující bakterie (Macfarlane a Cummings, 1991).

Při štěpení sacharidů, vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jako jsou např. kyselina octová, máselná či propionová, což vede ke snížení pH v tlustém střevu a ke zlepšení absorpce minerálních látek (Geigerová a kol., 2014). Mikrobiota slouží jako bariera proti patogenům, obsazuje potenciální vazebná místa na střevní výstelce, a tím zabraňuje

k uchycení patogenů, stimuluje imunitní střevní systém, tvoří látky, které působí na prokrvení střevní mukózy, redukují průchod bakterií z trávicího traktu do těla a produkují vitaminy (Zbořil a kol. 2005).

Mikrobiota v tlustém střevu je velmi rozmanitá a můžeme zde nalézt více než 1000 druhů mikroorganismů. Skladba se mění dle stravovacích návyků hostitele. Její složení je tudíž hostitelsky specifické a mění se během života jedince (Ventura a kol., 2009). Trávicí trakt plodu neobsahuje žádné mikroorganismy. Ke kolonizaci trávicího traktu dochází až v momentě porodu, kdy se mikroorganismy z matky přenesou na novorozeně (Solař, 2010). Díky velké konzumaci mateřského mléka, které obsahuje vysoké množství oligosacharidů, mají kojenci ve střevech obecně více bifidobakterií, které jsou těmito oligosacharidy podporovány (Woodsmansey, 2007). Kolem druhého roku života se začíná složení mikrobioty podobat mikrobiotě dospělého jedince (Frühaufer, 2011). Dospělí mají narozdíl od kojenců více bakterií patřících do kmenů *Bacteroidetes*, *Firmicutes* a *Proteobacteria* (Ventura a kol., 2009). Čím je hostitel starší, tím je mikrobiální složení méně různorodé (Woodsmansey, 2007). Složení střevní mikrobioty lze ovlivnit pomocí probiotik a prebiotik.

3.2 Probiotika

Slovo probiotikum pochází z řeckého slova „pro bios“ v překladu „pro život“ (Gismondo a kol., 1999) a bylo poprvé použito Lilly a Stillwellem (1965).

Dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization - WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization - FAO) jsou probiotika nepatogenní mikroorganismy, přirozeně se vyskytující v tlustém střevu, které díky své činnosti napomáhají ke stabilitě střevní mikrobioty, mají blahodárné účinky na zdraví a napomáhají při prevenci a léčbě různých chorobných stavů (WHO, 2001).

Fuller (1992) stanovil podmínky, které musí bakterie splňovat, aby mohly být jako probiotika využitelná. Musí být schopná růst ve velkém měřítku, měly by být při skladování životaschopné a stabilní, žít přirozeně ve střevním ekosystému a musí být prospěšný pro zdraví hostitele.

Jako příklad probiotik si můžeme uvést bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* nebo *Pediococcus*, které společně chrání organismus hostitele proti patogenním organismům a posilují jeho imunitu (Soccol a kol., 2010). V tabulce 2 jsou uvedeny mikroorganismy, které jsou v této době za probiotika považovány.

Tabulka 2: Mikroorganismy považované za probiotika (Frühauf, 2011).

Lactobacilus	Bifidobacterium	Ostatní
<i>acidophilus</i>	<i>adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>amylovarus</i>	<i>bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>casie</i>	<i>breve</i>	<i>Enterococcum faecium</i>
<i>crispatus</i>	<i>infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>delbruckii</i>	<i>lactis</i>	<i>Lactococcus lacti</i>
<i>gallinarum</i>	<i>longum</i>	<i>Leuconostoc mesenterioides</i>
<i>gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>johnsonii</i>		<i>Propionibacterium freudenraichii</i>
<i>paracasei</i>		<i>Sacharomyces boulardi</i>
<i>plantarum</i>		<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>reuteri</i>		<i>Sporolactibacillus inulinus</i>
<i>rhamnusus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>

Vztah mezi zdraví prospěšnými mikroorganismy v tlustém střevu a patogeny je velmi úzký. Pokud se tato rovnováha naruší, spěje to rychle k rozmnožení patogenu a dále k následným problémům (Sarkar, 2013).

Probiotika můžeme nalézt jak v mléčných výrobcích, jako jsou fermentované mléko, kefir nebo jogurt (Hosono, 1992; Metchnikoff, 2004), tak i ve výrobcích bezmléčných. Prodávají se také jako doplňky stravy v podobě kapslí a často jsou přidávána do kojeneckých výživ (Soccol a kol., 2010).

Probiotika jsou pro zdraví člověka velmi důležitá díky jejich schopnosti vytvářet antimikrobiální látky, které dokáží v tlustém střevu omezovat rozvoj patogenních organismů a zabraňují k jejímu uchycení na stěnu tlustého střeva. Mezi další funkce probiotik patří ovlivnění hodnoty pH v tlustém střevu tak, aby měly samy vhodné podmínky pro množení a růst, čímž ovlivňují a redukují složení kolonizace střevní mikrobioty. Stimulují také fagocytózní děje a tvorbu imunitních protilátek. Souhrnem všech těchto vlastností tedy napomáhají proti zácpě, průjmům, zánětům a karcinomům tlustého střeva a posilují imunitu hostitele (Rada, 2010).

3.3 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím prospívají ke zdraví hostitele (Gibson a kol., 2004). Jsou to většinou neškrobové polysacharidy (inulin) nebo oligosacharidy (Roberfroid a kol., 2010).

Poprvé prebiotika popsali Gibson a Roberfroid (1995) jako oligosacharidy, které jsou rezistentní proti kyselosti žaludku, enzymům trávicího traktu a nejsou absorbovatelné v tenkém střevě. Tudíž jsou pro člověka nestravitelné. Tyto oligosacharidy jsou fermentovány v tlustém střevu pomocí střevních bakterií (i probiotických) na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA – short-chain fatty acid) a plyny (Van Loo, 1999).

Ideálně by prebiotika měla být fermentována selektivně, tzn., že různá prebiotika by měla být štěpena specifickými probiotiky (Roberfroid, 2007).

V tabulce 3 jsou uvedeny podmínky, které musí sacharidy dodržet, aby mohly být v dnešní době považovány za prebiotika. Mají být pro člověka nestravitelné, selektivně fermentovatelné a mít pozitivní účinky na zdraví člověka. Selektivní fermentace musí být pozorována jak *in vitro*, tak *in vivo* prostředí (zvířecí trávicí trakt, lidský trávicí trakt) (Preter a Verbeke, 2015).

Prebiotika můžeme nalézt v ovoci, zelenině, luštěninách či cereáliích. V dnešní době jsou již vyráběny i průmyslově (Bláha a Víšek, 2011).

Tabulka 3: Probiotický efekt oligosacharidů (převzato z: Preter a Verbeke, 2015).

Substrát	Nestravitelný		Selektivní fermentace				Pozitivní účinky na zdraví člověka			
	Citace	Výsledek	Citace	In Vitro	Citace	Zvířata	Citace	Lidé	Citace	Prebiotika
Laktulosa	Penasar a Kumari (2011)	+	Cardelle-Cobas a kol. (2012), Rycroft a kol. (2001)	+	Nilsson a Nyman (2005)	+/-	Schumann (2002)	+	Panesar a Kumari (2011)	Ano
FOS	Cummings a kol. (2001), Roberfroid a kol. (2010)	+	Roberfroid a kol. (2010), Rycroft a kol. (2001)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	Ano
GOS	Hernández a kol. (2012), Aachary a kol. (2011)	+	Maathuis a kol. (2012), Rycroft a kol. (2001)	+	Macfarlane a kol. (2008)	+	Macfarlane a kol. (2008)	+	Macfarlane a kol. (2008)	Ano
XOS	Broekaert a kol. (2011), Aachary a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011), Rycroft a kol. (2001)	+	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	Ano
IMOS	Goffin a kol. (2001)	-	Rycroft a kol. (2001)	+	Goffin a kol. (2001)	+	Goffin a kol. (2001)	+/-	Goffin a kol. (2001), Yen a kol. (2011)	Ne
AXOS	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	+	Broekaert a kol. (2011)	Ano
Inulin	Cummings a kol. (2001), Roberfroid a kol. (2010)	+	Rycroft a kol. (2001), Roberfroid a kol. (2010)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	+	Roberfroid a kol. (2010), Macfarlane a kol. (2008)	Ano

(+) efekt byl prokázán v několika studiích, (+/-) k dispozici jsou jen omezená data, (-) nepotvrzená data

Prebiotika mají příznivé účinky na lidský organismus. Hlavní funkcí prebiotik je to, že slouží jako zdroj uhlíku a energie pro probiotika. Uvolněnou energii probiotika následně využívají ke stimulaci svého růstu a množení. Prebiotika mají také imunologické účinky, kdy dochází k aktivaci leukocytů v tlustém střevu, zvyšuje se počet buněk v Peyerových plátech, dochází k podpoře produkce bakteriocinů probiotickými bakteriemi proti patogenním bakteriím a v tenkém střevu se zvyšuje hladina IgA. Mezi další funkce patří posílení bariery střeva, acidifikace v tlustém střevu, podpora absorpce vody a sodíku a zlepšení dostupnosti vápníku a hořčíku (Bláha a Víšek, 2011).

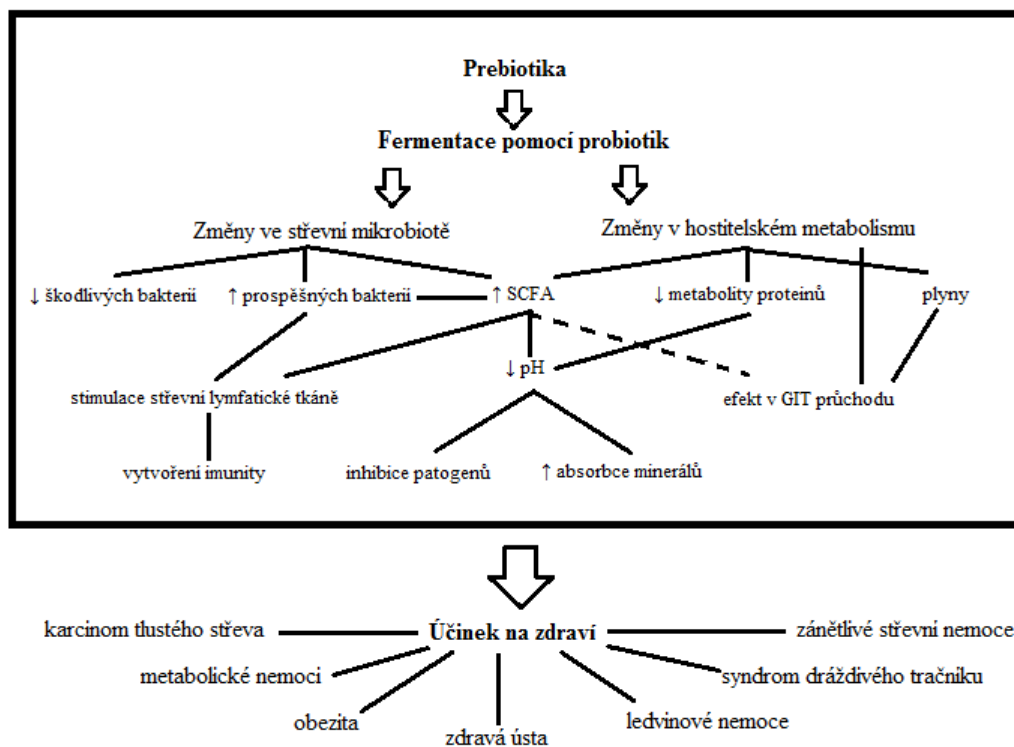
Výsledky studie Silk a kol. (2009) ukazují, že prebiotika jako jsou galaktooligosacharidy mohou pomoci při zmírnění symptomů syndromu dráždivého tračníku (Irritable Bowel Syndrome - IBS).

3.4 Synbiotika

Kombinace probiotik a prebiotik se nazývá synbiotika (Tuohy a kol., 2005). Prebiotika podporují funkci probiotik a společně tak napomáhají k udržení rovnováhy mikrobioty v gastrointestinálním traktu (GIT). Zároveň prebiotika probiotika vyživují (Kolida a Gibson, 2011).

Výhodou synbiotik je zejména to, že prebiotika v kombinaci s probiotiky společně vytváří změny v metabolismu a střevní mikrobiotě hostitele. Snižují počet škodlivých bakterií a metabolitů proteinu a zvyšují SCFA a bakterie prospěšné pro hostitele. Tím se stimuluje funkce střevní lymfatické tkáně a podporuje imunitní systém jedince. Snižuje se pH ve střevech, což podporuje inhibici patogenů a zvyšuje absorpci minerálních látek pomocí tlustého střeva. Vedlejšími produkty jsou plyny, které vznikají při štěpení zbytků proteinu a oligosacharidů (obr. 1).

Rios de Souza a kol. (2015) uvádí, že prebiotika napomáhají společně s probiotiky proti střevní infekci, posilují imunitu, působí pozitivně proti obezitě a snižují riziko rakoviny tlustého střeva.



Obrázek 1.: Přehled účinků synbiotik na lidský organismus (upraveno dle Preter a Verbeke, 2015).

3.5 Prebiotické oligosacharidy

Oligosacharidy jsou sacharidy, které se skládají z dvou až deseti molekul monosacharidu. Mezi prebiotické oligosacharidy řadíme fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS), xylooligosacharidy (XOS), isomaltoligosacharidy (IMO), oligosacharidy rafinosové řady (RSO) a laktulosu (Charalampopoulos a Rastall, 2012).

3.5.1 Fruktooligosacharidy (FOS)

Fruktooligosacharidy jsou krátké řetězce fruktosy (3 - 7 molekul), které jsou díky β -glykosidické vazbě, $\beta(1, 2)$, pro člověka nestravitelné. V některých rostlinách se vyskytují přirozeně. Vyrábí se enzymatickou hydrolyzou inulinu (Roberfroid a kol., 2010) nebo syntézou ze sacharosy pomocí fruktosylfuranosidasy (Rudolfová a Čurda, 2005).

Fruktooligosacharidy se dělí na GF_n typ a F_n typ (G = glukosa, F = fruktosa a n = počet jednotek fruktosy). GF_n typ tedy představuje fruktuktooligosacharidy skládající se z molekul fruktosy zakončený molekulou galaktosy. F_n typ jsou fruktooligosacharidy složené pouze z molekul fruktosy (Bohačenko a Pinkrová, 2014).

Pozitivní účinky na člověka jsou pozorovány při dávce 2 až 10 g fruktooligosacharidů na den (Rudolfová a Čurda, 2005).

Fruktooligosacharidy působí proti průjmům a dají se koupit jako doplňky stravy při užívání antibiotik, kdy je střevní mikroflóra oslabena, např. Laktobacily COMPLEX a fruktooligosacharidy (Walmart a.s.).

3.5.2 Galaktooligosacharidy (GOS)

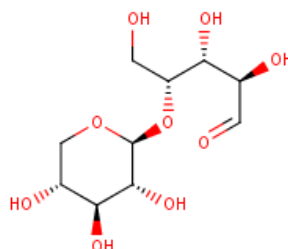
Galaktooligosacharidy (α -D-glukosa-(1-4)- β -D-galaktosa-(1-6)_n) se skládají z molekul glukosy a galaktosy. V řetězci bývá 2 – 5 jednotek galaktosy. Vyrábí se enzymatickou přeměnou z laktosy nebo laktulosy. Jsou živočišné povahy a můžeme je nalézt v lidském či kravském mléce (Tuohy a kol., 2005).

Pokud jsou použity v potravinářství, jsou galaktooligosacharidy schopny zvýšit viskozitu a ovlivnit bod tuhnutí výrobku. Dále také zadržují vlhkost a snižují tak aktivitu vody, čímž výrazně omezují průběh nežádoucích mikrobiálních dějů, které mohou ve výrobku nastat (Rudolfová a Čurda, 2005).

Galaktooligosacharidy se prodávají také jako doplňky stravy ve formě bílého prášku či tobolek např. GOS (rozpustná vláknina), GOS kapsle (NutriExact).

3.5.3 Xylooligosacharidy (XOS)

Xylooligosacharidy se skládají nejčastěji z 3 – 9 molekul xylosy spojené $\beta(1-4)$ glykosidickou vazbou (Broekaert a kol., 2011) (obr. 2). Vyskytují se v ovoci, zelenině, mléku či medu. Nejvyužívanějším xylooligosacharidem je xylobiosa, což je disacharid používaný v potravinářství (Vazquez a kol., 2000). Dle Rycroft a kol. (2001) napomáhají xylooligosacharidy k růst bifidobakterií.



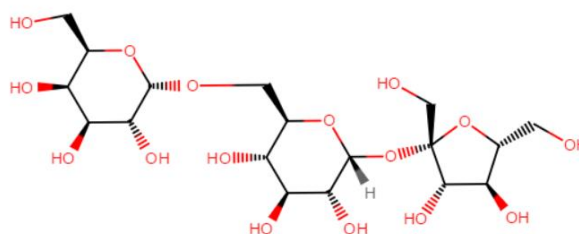
Obrázek 2: Strukturní vzorec xylobiosy

(<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/xylobiose>).

3.5.4 Oligosacharidy rafinosové řady (RSO) - Sójové oligosacharidy (SOS)

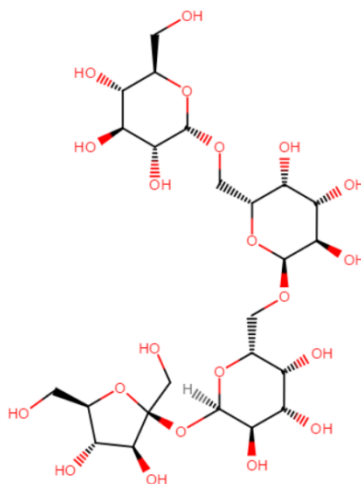
Nejvíce oligosacharidů rafinosové řady obsahují sójové boby, ve kterých může být až 150 g těchto oligosacharidů na 1 kg bobů (De Reu a kol., 1997), ale jsou obsaženy i v dalších luštěninách. Nejčastějšími oligosacharidy rafinosové řady jsou rafinosa, stachyosa a verbaskosa, též nazývané jako sójové oligosacharidy (Mitsouka, 1992). Hara a kol. (1997) uvádí, že pro podporu růstu probiotických bakterií stačí denně sníst 1 až 2 g těchto oligosacharidů.

Rafinosa (obr. 3) je trisacharid tvořený galaktosou, glukosou a fruktosou (α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-glukosa-(1-2)- β -D-fruktosa) (Mitsouka, 1992).



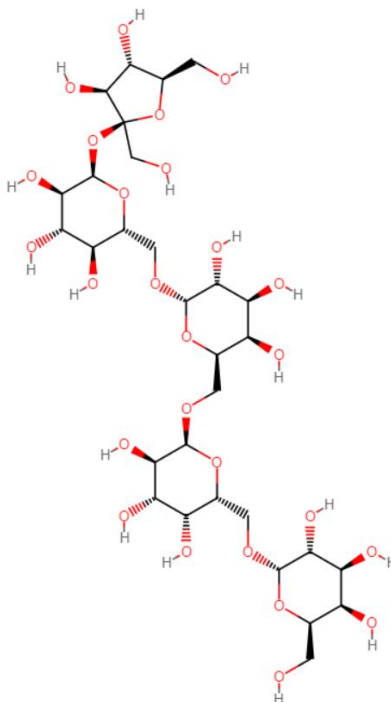
Obrázek 3: Strukturní vzorec rafinosy (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/raffinose>).

Stachyosa (obr. 4) je tetrachacharid tvořený dvěma galaktosami, glukosou a fruktosou (α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-glukosa-(1-2)- β -D-fruktosa) (Mitsouka, 1992).



Obrázek 4: Strukturní vzorec stachyosy
(<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/stachyose>).

Verbaskosa (obr. 5) je pentasacharid tvořený třemi galaktosami, glukosou a fruktosou (α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-galaktosa-(1-6)- α -D-glukosa-(1-2)- β -D-fruktosa) (Mitsouka, 1992).



Obrázek 5: Strukturní vzorec verbascosy
(<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/verbascose>).

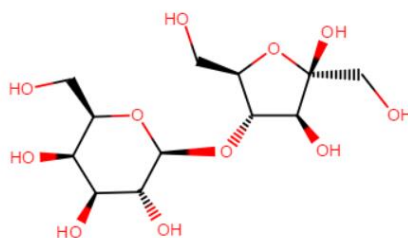
Dle výsledků Rios de Souza a kol. (2015) byl po přidání oligosacharidů rafinosové řady v prostředí *in vitro* pozorován nárůst bakterií rodu *Lactobacilus* a *Bifidobacterium*, a pokles počtu bakterií *Escherichia coli* a rodu *Streptococcus*.

3.5.5 Isomaltooligosacharidy (IMO)

Isomaltooligosacharidy jsou sacharidy skládající se z 3 – 9 molekul glukosy, spojené $\alpha(1, 6)$ vazbou. V přírodě se vyskytují v sojových bobech či cukrové třtině. Mají bifidogenní účinky, ale některé studie je mezi prebiotika nezařazují, jelikož jsou částečně tráveny v tenkém střevu, viz tabulka 2 (Gofin a kol., 2001).

3.5.6 Laktulosa

Laktulosa (4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-fruktosa) je disacharid (obr. 6). Vzniká enzymatickou syntézou z laktosy a skládá se z molekul galaktosy a fruktosy (Panesar a Kumari, 2011).



Obrázek 6: Strukturní vzorec laktulosity

(<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/lactulose>).

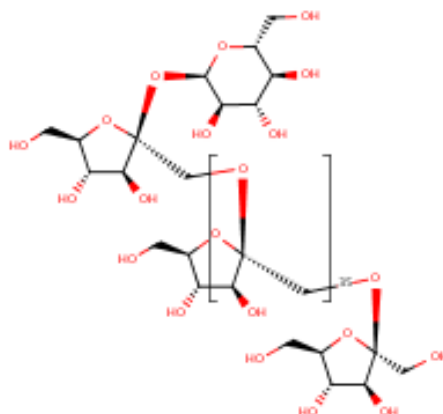
Laktulosa se přidává do léčivých přípravků proti zácpě, kde působí jako projímadlo např. Laktulosa Sandoz 670 mg/ml ve formě roztoku, který obsahuje 670 mg laktulosity na 1 ml roztoku. Tento přípravek se dá využít i při jaterních onemocnění (lekarna.cz).

3.6 Prebiotické polysacharidy - inulin

Polysacharidy jsou sacharidy skládající se z více než 10 molekul monosacharidu. Mezi prebiotické polysacharidy řadíme inulin (Nováková, 2012).

Inulin (obr. 7) je neškrobový polysacharid, strukturou podobný fruktooligosacharidům. Skládá se z 10 – 60 molekul fruktózy (polyfruktosan) spojený vazbou $\beta(1, 2)$ (Stewart et al. 2008). Ve vysušeném stavu to je bílý prášek, který nemá žádnou chuť ani vůni (Silvia, 1996).

Inulin patří mezi rezervní polysacharidy, tzn., že se při jeho odbourávání v rostlině uvolňuje potřebná energie (Nováková, 2012). Lze ho tedy nalézt v kořenech čekanky (15 až 20 %), cibuli (1 až 5 %), česneku (4 až 12 %) nebo banánu (0,2 %). V dnešní době ho lze i syntetizovat ze sacharosy (Niness, 1999). Jeho sumární vzorec je $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$ (Nováková, 2012).



Obrázek 7: Strukturální vzorec inulinu (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/inulin>).

V současné době se vyrábějí směsi na pečení chleba, které v sobě obsahují inulin např. Vital PREBIO. To slouží ke zvýšení obsahu prebiotické vlákniny ve stravě člověka (Nováková, 2012). Aby mohl být produkt označen jako produkt inulinový, musí obsahovat více jak 3 – 6 g inulinu na 100 g výrobku (European Parliament, 2006).

Inulin lze koupit ve formě sypkého přípravku v mnoha internetových obchodech (např. myprotein.cz).

3.7 Zdroje prebiotických oligosacharidů

V České republice se v poslední době řeší otázka pěstování rostlinných proteinových krmiv pro hospodářská zvířata. Jako proteinové krmivo rostlinného původu označujeme obecně luskoviny (Suchý a kol., 2016). Tyto plodiny mají nejen vysoký obsah proteinu, ale i vysoké procento prebiotických oligosacharidů (Homolka a Kudrna, 2007).

Suchý a kol. (2016) zkoumal rozdíly mezi množstvím proteinu obsažených v luskovinách a to konkrétně u hrachu, sóji, řepky, lupiny a bobu. Dle výsledků bylo nejvíce proteinů obsaženo v sóji a lupině.

3.7.1 Sója

Sója (*Glycine*) se řadí do čeledi bobovitých a stejně jako u lupiny je známo mnoho odrůd např. Bohemians, Brunensis či Korus. Rostliny bývají 20 – 150 cm vysoké. Květy jsou bílé až fialové, motýlkovitého tvaru, utvářející květenství ve tvaru hroznu (Minkevič a Borkovskij, 1953). Semena jsou kulatá, uložená v lusku. Barva je žlutá, zelená, hnědá až černá. Mívají nahořklou chuť (Polák, 1955). Sójový extrahovaný šrot a sójová moučka bývá používána ke krmným účelům u drůbeže a prasat, díky vysokému obsahu dusíkatých látek (36,6 – 50,4 %), zejména lysinu, tryptofanu, isoleucinu, valinu a treoninu. Sójová semena obsahují ale také mnoho antinutričních látek, jako je např. antitrypsin, který zabraňuje štěpení bílkovin v tenkém střevu (Larbier a Leclercq, 1994).

Semena sóji obsahují mimo jiné i poměrně vysoké procento tuků (13,4 – 26,4 %) a prebiotických oligosacharidů, jako je stachyosa (1,7 – 3,7 %) nebo rafinosa (0,5 – 1,8 %) (Honig a Rackis, 1979; Lee a Choung, 2011).

Dle Ruiz a kol. (2006) byl pozorován negativní vliv na zdravotní stav králíků při zkrmu extrahovaného sójového šrotu.

3.7.2 Lupina

Lupina (*Lupinus*) neboli vlčí bob se řadí do čeledi bobovitých a patří k rostlinám pocházejících od Středomořího moře (Štranc a kol., 2008). Je známo přes 300 druhů lupiny (Kohajdová a kol., 2011). Mezi nejvýznamnější druhy v Evropě patří lupina bílá (*Lupinus albus*), lupina žlutá (*Lupinus luteus*), lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius*) a lupina proměnlivá, zvaná též andská (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Hýbl a kol., 2011).

Semena lupiny obsahují vysoký obsah dusíkatých látek, lipidů, neškrobových polysacharidů a oligosacharidů, zejména oligosacharidů rafinosové řady (Volek, 2009). Dříve se lupina z důvodu její nahořklé chuti pěstovala pouze pro krmné účely hospodářských zvířat (Arnoldi a kol., 2011). V dnešní době jsou pěstovány „sladké“ odrůdy, které mají obsah hořkých a antinutričních látek nízký. Tudíž jsou vhodné i pro spotřebu člověkem (Aniszewski a kol., 2001).

Volek (2009) pozoroval rozdíly mezi brojlerovými králíky krmnými sójovým šrotem, slunečnicovým šrotem a semeny lupiny bílé odrůdou Amiga. Bylo zjištěno, že u králíků krmnými lupinou, se nevyskytovaly trávicí potíže tak často jako u ostatních. To mohlo být způsobeno vysokým obsahem prebiotických oligosacharidů v semenech lupiny, které

podporují růst bakterií mléčného kvašení a tím zvyšují i koncentraci kyseliny mléčné ve střevech.

Suchý a kol. (2016) zjistil, že se lupiny odlišného druhu, ale i odrůdy, ve výživových hodnotách liší. Ukázalo se, že z pohledu množství a kvality proteinu obsaženého v rostlině je k pěstování a ke zkrmu nejvhodnější lupina bílá. Konkrétně to byla odrůda Zulika, která měla na rozdíl od dalších zkoumaných odrůd (Amiga, Dieta) velice dobrý výnos i výživovou hodnotu.

3.7.2.1 Lupina bílá a její odrůdy

Lupina bílá (*Lupinus albus*) je 75 – 100 cm vysoká rostlina s vegetační dobou trvajícím 130 – 180 dní. Obvykle kvete bíle nebo modrobíle (obr. 8). Semena jsou velká, zploštělá a hranatá, uložena v lusku (obr. 9). Barva je žlutobílá. Semena bývají používány při výrobě mouky, ze které se pak mohou vyrábět špagety nebo pečivo (Hýbl a kol., 2011). Semena obecně obsahují vysoké procento dusíkatých látek (40 %), lipidů (12 %), hlavně nenasyčených mastných kyselin, a vlákniny, která zlepšuje střevní peristaltiku a snižuje hodnotu cholesterolu v krvi. Mouka ze semen lupiny má nízký obsah škrobu a zpomaluje stárnutí pečiva (Homolka a Kudrna, 2007).

Mimo jiné se dá lupina využít k obohacování půdy, díky její schopnosti vázat do půdy vzdušný dusík, pomocí hlízkových bakterií (Hýbl a kol., 2011).

V České republice se pěstuje mnoho druhů Lupiny bílé, jako příklad si můžeme uvést odrůdy Amiga, Butan, Dieta, Oležka a Wat (Homolka a Kudrna, 2007).



Obrázek 8: Lupina bílá (celá rostlina)

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/68/5202.jpg).



Obrázek 9: Semena lupiny bílé (<http://www.freegluten.cz/lupina-lustenina-na-vzestupu>).

Amiga se řadí mezi sladké odrůdy lupiny. Je to tedy středně raná odrůda s nízkým obsahem antinutričních a alkaloidních látek. Rostliny jsou vysoce odolné proti poléhání. Květy jsou modrobílé. Semenná zralost se pohybuje okolo 136 dní. Obsah dusíkatých látek v sušině semen je 37,5 %. Obsah lipidů je 14 %. V České republice byla tato odrůda registrována v roce 2004. Udržovatelem této odrůdy je Florimond Desprez z Francie (Vrabec, 2008).

Zulika je poloraná odrůda řadící se také mezi sladké odrůdy. Květy jsou modrobílé. V České republice byla tato odrůda registrovaná v roce 2007. Udržovatelem této odrůdy je OSEVA PRO s.r.o. (Mezlik, 2008).

Odolnost rostlin odrůdy Dieta proti poléhání je průměrná. Obsah dusíkatých látek v sušině semene je 39,6 % a lipidů je 12,5% (Vrabec, 2008). Dieta je to vysoká, velkolistá a velkozrnná rostlina. Udržovatelem této odrůdy je Lyle Morrison & Partners z Velké Británie.

3.7.2.2 Využití lupiny

Lupina má mnoho možností využití. Lupina se dá pěstovat jako okrasná rostlina, kdy se na internetu dají koupit jednotlivá semena různých odrůd lupiny (osiva-semena.cz). Lupina se dá využít v rybářství jako návnada, kdy se prodávají semena lupiny naložené ve sladkém nálevu (arybarstvi.cz). Semena lupiny se nakládají do oleje a poté se konzumují (obr. 10). Tento výrobek je volně dostupný na internetu pod názvem Tremocos do olival (Portugalshop). V poslední době se semena hojně používají k výrobě mouky, která se následně přidává do průmyslově vyráběných produktů a to jak do pečiva, špaget, sušenek, cukrový, chlebu či masných výrobků (Homolka a Kudrna, 2007). Na trhu lze sehnat i výživový doplněk ve formě proteinu extrahovaného z lupiny např. Bio Vegan Lupina protein

200g PURYA! (Elixir) (obr. 11) či lupinové kávy (Bioobchod) (obr. 12). Lupina se dá také využít v kosmetice např. šampon podporující růst vlasů (Yves-rocher) (obr. 13).



Obrázek 10: Semena naložená do oleje: Tremocos do olival
(<http://www.portugalshop.cz/tremocos/tremocos-do-olival-lustenina-350-g>).



Obrázek 11: Výživový doplněk ve formě proteinu vyextrahovaného z lupiny: Purya!
(<https://www.elixi.cz/purya-bio-vegan-lupina-protein-200-g-p46228/>).



Obrázek 12: Lupinová káva (<http://www.bioobchod.cz/kava-lupinova-prazena-mleta-bio-250g>).



Obrázek 13: Šampón podporující růst vlasů s extraktem z lupiny (http://www.yves-rocher.cz/sampon_podporujici_rust_vlasu).

4 Metodika

4.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinosové řady ve vybraných hospodářských plodinách

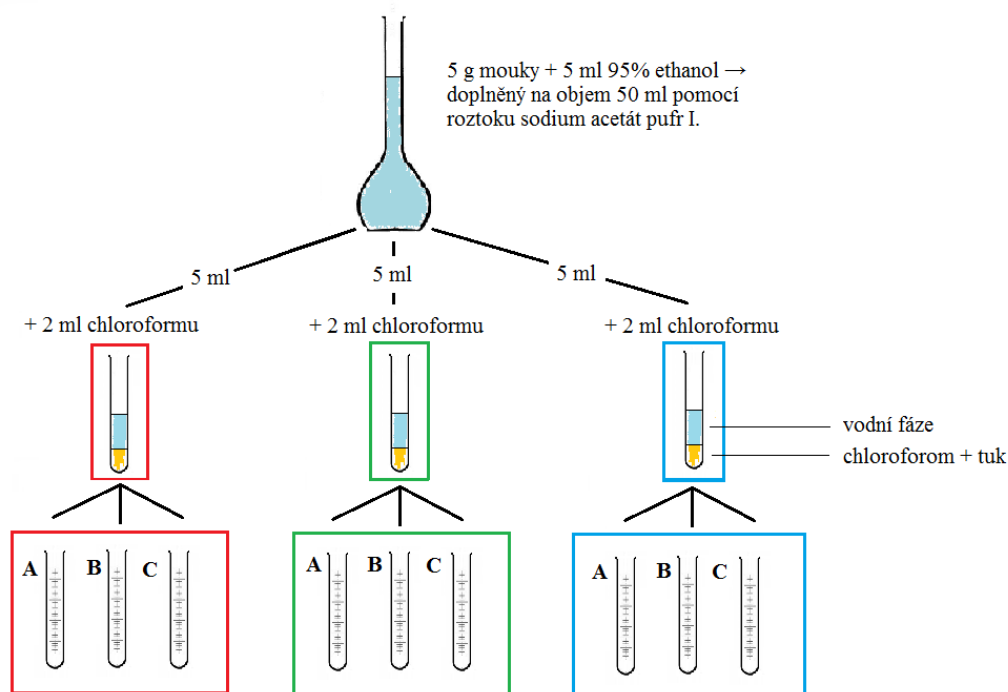
Pro stanovení množství oligosacharidů rafinosové řady byly vybrány hospodářsky významné plodiny, ze kterých se nejčastěji vyrábějí proteinové krmné směsi pro hospodářská zvířata. Sledovanými plodinami byly řepka, slunečnice, sója a lupina. Stanovení se provádělo pomocí biochemického testu od Megazyme[®].

Princip tohoto testu spočívá v tom, že dochází pomocí enzymů α -galaktosidasy a invertasy k rozštěpení oligosacharidů rafinosové řady (rafinosy, stachyosy a verbaskosy) na jednotlivé molekuly D-galaktosy, D-glukosy a D-fruktosy (obr. 14). Následně se spektrofotometricky změří množství D-glukosy ve vzorku, přičemž platí, že jedna molekula glukosy se rovná jednomu oligosacharidu. Tímto testem nelze určit přesné množství jednotlivých oligosacharidů rafinosové řady, ale pouze jejich celkové množství.

Test obsahuje několik lahviček s chemikáliemi, ze kterých byly dle návodu namíchány potřebné roztoky (sodium acetát pufr I., invertasa, α -galaktosidasa s invertasou, GOPOD), a kontrolní vzorek mouky.

Na stanovení bylo potřeba 0,5 g vzorku či kontrolní mouky. Toto množství bylo smícháno s 5 ml 95% čistého nedenaturovaného etanolu. Roztok byl následně vložen na 5 minut do vodní lázně o teplotě 85°C, čímž bylo dosaženo inaktivace přítomných enzymů. Roztok byl poté kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a následně doplněn po rysku pomocí roztoku sodium acetát pufr I. Připravený roztok byl ponechán po dobu 15 minut při pokojové teplotě, což vedlo k vylouhování látek z mouky do roztoku. Po promíchání bylo ze vzorku odebráno po 5 ml do tří centrifugačních zkumavek a přidáno po 2 ml chloroformu. Roztok v centrifugačních zkumavkách byl zvortexován a následně zcentrifugován po dobu 10 min na 3000 ot/min. Pomocí centrifugy byl oddělen tuk, který byl navázán na chloroform, a vodní fáze, která obsahovala oligosacharidy. Z každé centrifugační zkumavky bylo odebráno po 200 μ l vodní fáze do dalších třech zkumavek označenými písmeny A, B, C. Do zkumavky A bylo přidáno 200 μ l roztoku sodium acetát pufr I., do zkumavky B bylo přidáno 200 μ l roztoku invertasy a do zkumavky C bylo přidáno 200 μ l roztoku α -galaktosidasa s invertasou. Pro test bylo také potřeba vytvořit slepý vzorek (400 μ l roztoku sodium acetát pufr I.) a glukosovou kontrolu (100 μ l 5. lahvičky (glukosa) + 300 μ l roztoku sodium acetát pufr I.). Upravené vzorky, slepý vzorek a glukosová kontrola byly zakryty alobalem a inkubovány při 50 °C na 20 minut. Po uplynulé době bylo do každé zkumavky přidáno 3 ml roztoku GOPOD,

a poté vloženy zpět do vodní lázně na dobu 20 minut, což vedlo k červenému zabarvení roztoku. Roztoky byly poté přelity do kyvet a vloženy do spektrofotometru Tecan, kde byla změřená absorbance při vlnové délce 510 nm. Výsledek byl poté přepočítán na gramy RSO ve 100 g mouky za pomoci vzorců uvedených v testu Megazyme®.



Obrázek 14: Postup při stanovování množství RSO ve vybraných hospodářských plodinách (zkumavka A: 200 μ l vodní fáze + 200 μ l roztoku sodium acetát pufr I, zkumavka B: 200 μ l vodní fáze + 200 μ l roztoku invertasy, zkumavka C: 200 μ l vodní fáze + 200 μ l roztoku α -galaktosidasa s invertasou).

4.2 Extrakce prebiotických oligosacharidů z mouky lupiny

Poté co byla ověřena přítomnost oligosacharidů rafinosové řady v lupině, bylo možné přejít k samotnému extrahování. K izolaci rafinosy a stachyosy je nejprve třeba extrahovat ze vzorku pomocí vody a etanolu všechny sacharidy a poté je separovat pomocí molekulového síta na gelové permeační chromatografii. Identifikace jednotlivých sacharidů pak probíhá pomocí chromatografie na tenké vrstvě.

Byly vybrány nejvýznamnější odrůdy lupiny pěstované v ČR: Amiga, Zulika a Dieta. Zvolená metoda, musí být provedena tak, aby byly odstraněny všechny látky, které by mohly výsledek ovlivnit a musí být zároveň šetrná k potřebným oligosacharidům.

4.2.1 Extrakce oligosacharidů rafinosové řady

K extrakci sacharidů byla použita upravená metoda dle Ekvalla a kol. (2007) a k izolaci jednotlivých oligosacharidů pak metoda podle Warda a kol. (2006). Z rozemleté mouky z bobů lupiny bylo odebráno přibližně 5 g vzorku a smícháno s 40 ml destilované vody a s 40 ml 96% etanolu. Roztok byl promíchán a následně zahřán pomocí vodní lázně na 90 °C po dobu 10 minut, což vedlo k deaktivaci enzymů, které by mohly sacharidy poškodit. Z důvodu uvolnění co nejvíce oligosacharidů do roztoku, byla směs následně promíchána po dobu 30 minut na míchačce. Poté byl roztok zcentrifugován na 6500 ot/min při 4 °C po dobu 10 minut, tím se od sebe oddělila pevná a tekutá složka. Tekutá složka byla slita do centrifugačních zkumavek, smíchána s 99% chloroformem, promíchána a znovu vložena do centrifugy na 6500 ot/min při 4 °C po dobu 5 minut. Na 11,5 ml roztoku bylo přidáno 2,5 ml chloroformu. Přidáním chloroformu a centrifugací bylo docíleno oddělení tukové složky od sacharidového roztoku, který byl ihned odebrán a přefiltrován pomocí filtračního papíru. Filtrace byla prováděna z důvodu odstranění pevných zbytků.

Přefiltrovaný roztok zbavený pevné a tukové složky se následně vložil do vakuové odparky a nechal se odpařovat po dobu 20 minut při 40 °C do medové konzistence. Pokud byla konzistence příliš tuhá, roztok se rehydratoval pomocí ddH₂O. Dalším krokem bylo aplikování roztoku na kolonu, gelové permeační chromatografie, kde byly od sebe odděleny jednotlivé typy oligosacharidů podle metody Warda a kol. (2006). Princip oddělení sacharidů spočívá v tom, že gelová kolona slouží jako pórovitá membrána, která propustí pomocí gravitace nejdříve těžší, větší molekuly (oligosacharidy) a poté molekuly menší (monosacharidy), které se v molekulovém sítu více zachytí (Hagel, 2001). V tabulce 4 jsou uvedeny sumární vzorce a molekulové hmotnosti jednotlivých sacharidů, obsažených v lupině.

Tabulka 4: Přehled sacharidů obsažených v lupině (TOXNET, 2017).

Sacharid	CAS Registrační číslo	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
Galaktosa	59-23-4	180.155	C6-H12-O6
Sacharosa	57-50-1	342.295	C12-H22-O11
Rafinosa	512-69-6	504.435	C18-H32-O16
Stachyosa	470-55-3	666.575	C24-H42-O21
Verbascosa	546-62-3	828.715	C30-H52-O26

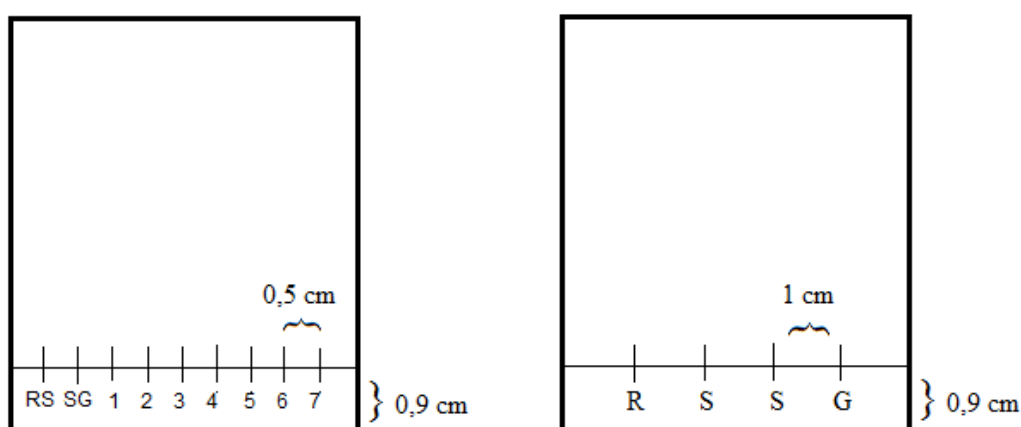
Pro pokus byla použita skleněná kolona se stacionární fází Toyopearl HW40F o rozměrech 1,6 x 180 cm. Jako mobilní fáze byla použita 1% kyselina octová. Kolona byla napojena na sběrač frakcí Gilson FC 204 Fraction Collector, pomocí kterého byl zajištěn sběr vzorků (frakcí) po padesáti kapkách do jednotlivých očíslovaných zkumavek. Poté co kolonou prošel celý vzorek, byla provedena analýza frakcí na tenkovrstvé chromatografii.

4.2.2 Analýza frakcí

Analýza jednotlivých frakcí byla prováděna pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin layer chromatography). Je to chemicko-biologický proces, při kterém se pomocí stacionární fáze (hliněná destička s vrstvou silikagelu – Alugram SIL G/UV₂₅₄) a mobilní fáze (isopropanol:voda:amoniak) oddělí jednotlivé molekuly, obsažené v roztoku, podle afinity ke stacionární fázi. To slouží k určení, v jakých zkumavkách se potřebné oligosacharidy nacházejí a zdali nebyl vzorek kontaminován jinými nežádoucími sacharidy.

K rozpoznání jednotlivých frakcí sacharidů, bylo potřeba připravit vzorky se standardy stachyosy a rafinosy, které byly žádané, ale také sacharosy a galaktosy, které byly pro pokus nežádoucí. Standardy byly připraveny o koncentraci 3 mg sušeného sacharidu na 1 ml destilované vody.

Standardy i vzorky se poté aplikovaly po dvou kapkách o objemu 0,9 μ l na TLC destičku o rozměrech 6,7 x 5 cm. Byla zhotovena i kontrolní TLC destička, kam byly aplikovány pouze standardy. Standardy byly rovněž aplikovány i na destičku se vzorky. Destičky byly popsány dle obrázku 15.



Obrázek 15: Popsání TLC destičky se vzorky a se standardy a kontrolní TLC destičky se standardy (RS: rafinosa a stachyosa, SG: sacharosa a galaktosa).

Jednotlivé vzorky získané z kolony byly na destičky aplikovány podle pořadí odkapu z kolony. Po zaschnutí, byly jednotlivé destičky vloženy do mobilní fáze, která byla připravena pomocí isopropanolu, amoniaku a destilované vody v poměru 5:1:2, v našem případě 27 ml, 5,4 ml a 11 ml. Toto množství bylo rozděleno do dvou skleněných nádobek. Mobilní činidlo zde bylo použito pro separaci frakcí na destičce. Po vyjmutí destičky bylo označeno čelo, místo, kam roztok vystoupal, cca 1 až 0,5 cm od horního okraje. Destička byla vysušena a vložena do mineralizačního činidla obsahujícího 15% roztok kyseliny sírové v etanolu. Po mineralizaci byla destička vysušena pomocí horkovzdušné pistole do té doby, dokud na destičce nedošlo k vizualizaci jednotlivých frakcí (hnědé skvrny) (obr. 16).

Pro detekci případného zbytkového proteinu byl použit test na přítomnost proteinů podle Bradforda (1976). Do 30 μ l vzorku bylo přidáno 150 μ l destilované vody a 150 μ l Bradfordova činidla. Vzorky i předem připravené standardy (lidský sérový albumin) byly proměřeny na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 595 nm.

Frakce, které obsahovaly pouze žádané oligosacharidy s obsahem proteinu maximálně do 1 mg/ml, byly kvantitativně převedeny do předem zvážené lyofilizační baňky a zlyofilizovány při -56°C po dobu 2 dnů. Lyofilizační baňka byla i s oligosacharidy následně zvážena a byla vypočítána hmotnost vyizolovaných oligosacharidů.

5 Výsledky

5.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinosové řady ve vybraných hospodářských plodinách

Prvotním cílem pokusu bylo potvrdit přítomnost oligosacharidů rafinosové řady (RSO) v lupině. Pomocí enzymatického testu pro stanovení RSO od Megazyme[®] bylo zjištěno a následně porovnáno množství těchto oligosacharidů v jednotlivých vybraných hospodářských plodinách. Výsledky byly zpracovány do tabulek a následně vyhodnoceny.

Z tabulky 5 lze vyčíst, že největší podíl oligosacharidů rafinosové řady byl zjištěn v bobech lupiny. Lupina obsahovala $8,26 \pm 0,14$ g RSO na 100 g mouky. Sója obsahovala také velké množství RSO, konkrétně $6,96 \pm 0,21$ g těchto oligosacharidů na 100 g šrotu, což je velmi podobné s výsledky u lupiny. Nejméně oligosacharidů rafinosové řady bylo zjištěno v extrahovaných šrotech řepky ($1,79 \pm 0,14$ g RSO / 100 g šrotu) a slunečnice ($1,73 \pm 0,26$ g RSO / 100 g šrotu).

Tabulka 5: Zjištěné množství přítomných oligosacharidů rafinosové řady (RSO) ve vybraných plodinách.

	RSO	
	g/100 g	SD*
Lupina - Zulika (mouka)	8,26	0,14
Sója (extrahovaný šrot)	6,96	0,21
Řepka (extrahovaný šrot)	1,79	0,14
Slunečnice (extrahovaný šrot)	1,73	0,26

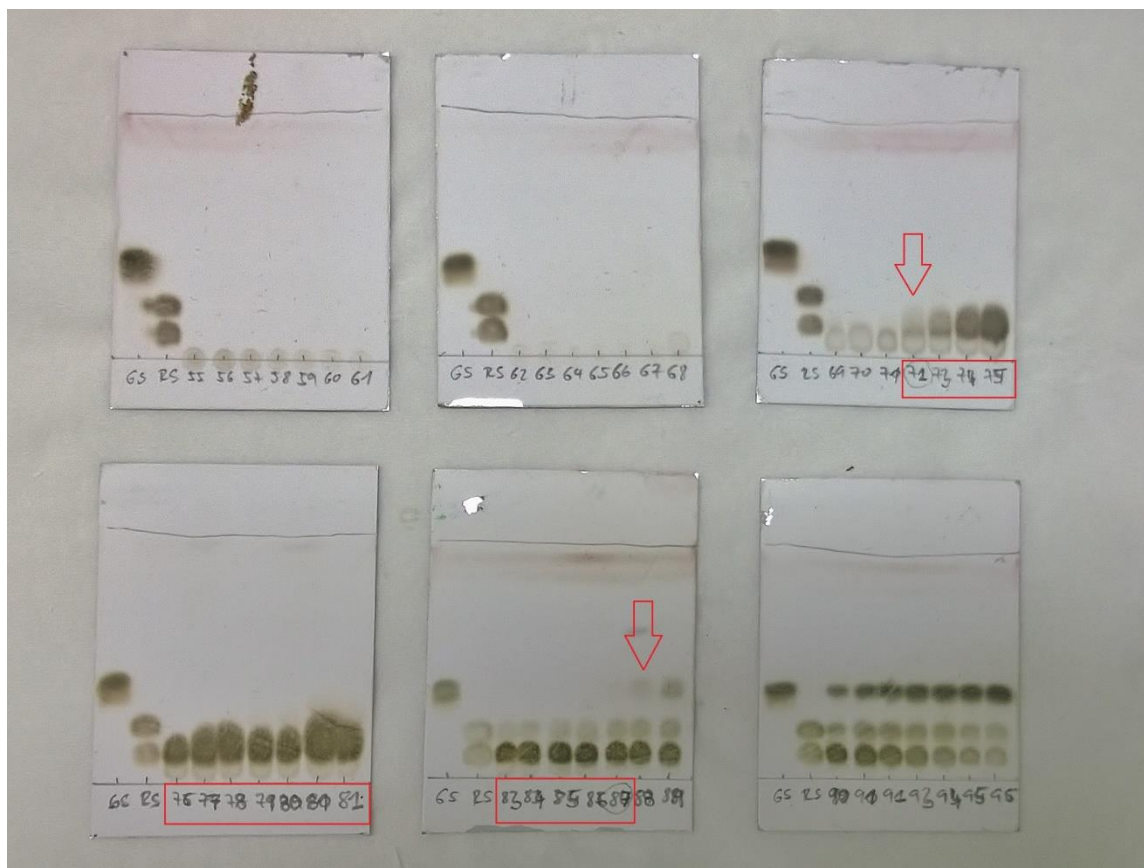
*SD: směrodatná odchylka

5.2 Extrakce oligosacharidů rafinosové řady z mouky lupiny

Po zjištění podílu oligosacharidů rafinosové řady v plodinách, byla druhým cílem izolace těchto oligosacharidů z vybraných odrůd lupiny, což byly Zulika, Amiga a Dieta.

Na obrázku 16 jsou červeně vyznačeny frakce, které obsahovaly pouze požadované oligosacharidy rafinosové řady, tzn. bez příměsí galaktosy či sacharosy. Bylo předpokládáno, že se potřebné oligosacharidy budou vyskytovat ve frakcích od č. 50 do č. 100. Jako příklad uvádím obrázek 16, vzorek Zulika, kdy se oligosacharidy rafinosa a stachyosa vyskytovaly od

frakce č. 72 až do č. 104. Od frakce č. 87 byly v těchto frakcích přítomny jiné příměsi, kdy došlo k vizualizaci galaktosy, tudíž byly pro pokus nepoužitelné. Výsledky u odrůd Amiga a Dieta byly s mírnými odchylkami shodné.



Obrázek 16: Frakce obsahující výlučně oligosacharidy rafinósové řady (RSO) označené v červeném rámečku (vzorek: Zulika).

V tabulce 6 jsou zapsány zjištěné hmotnosti vyizolovaných oligosacharidů rafinósové řady. Nejvíce oligosacharidů rafinósové řady bylo vyizolovááno z odrůdy Amiga, ze které se vyizolovalo 2,84 g RSO na 100 g mouky. Nejméně bylo vyizolováno 1,38 g RSO na 100 g mouky z odrůdy Dieta. Z odrůdy Zulika bylo vyizolováno 1,74 g RSO na 100 g mouky, z čehož se dá předpokládat, že zvoleným postupem bylo vyizolováno cca 21 % oligosacharidů rafinósové řady z celkového zjištěného množství těchto oligosacharidů.

Tabulka 6: Množství vyizolovaných oligosacharidů rafinosové řady (RSO) z jednotlivých odrůd lupiny.

	RSO
Odrůda lupiny	g/100 g mouky
Zulika	1,74
Amiga	2,84
Dieta	1,38

6 Diskuze

Oligosacharidy rafinosové řady jsou nedílnou součástí semen hospodářských plodin. Některé plodiny těchto oligosacharidů obsahují více a některé méně. Plodiny jako je řepka či slunečnice těchto oligosacharidů moc neobsahují. Luštěniny už těchto oligosacharidů obsahují více. Tento předpoklad byl u našich výsledků potvrzen. Sója a lupina obsahovaly v semenech větší podíl RSO než semena řepky a slunečnice. Nejvíce jich podle našich výsledků obsahuje lupina. Aby mohly být naše výsledky porovnávány s výsledky ostatních autorů, bylo potřeba výsledky přepočítat na množství RSO v sušině. Předpokladem bylo, že mouka ze semen lupiny obsahuje 15 % vlhkosti (tab. 7).

Dle studií Martieney-Villaluenga a kol. (2005a), kdy byly oligosacharidy extrahovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) dle Granito a kol. (2002), bylo u třinácti španělských odrůd lupiny zjištěno, že odrůdy lupiny bílé (*Lupinus albus*) obsahují na rozdíl od odrůd lupiny žluté (*Lupinus luteus*) a lupiny úzkolisté (*Lupinus angustifolius*) nejméně verbaskosy. U některých odrůd lupiny bílé nebyla verbaskosa nalezena vůbec. Bylo však nalezeno vysoké množství stachyosy (tab. 7). Průměrné množství oligosacharidů rafinosové řady u odrůd lupiny bílé bylo 7,12 g RSO na 100 g sušiny, což odpovídá našim výsledkům.

Toto množství potvrzuje i Muzquiz a kol. (1999), který zkoumal množství oligosacharidů rafinosové řady u odrůd lupiny bílé *Lupinus albus* cv. Bardo a *Lupinus albus* cv. Bac. Průměrné množství těchto oligosacharidů vybraných odrůd lupiny bylo 8,3 g RSO na 100 g sušiny (tab. 7). Muzquiz a kol. (1999) zkoumal také množství oligosacharidů rafinosové řady v hrachu (*Pisum sativum*), sóji (*Glycine max*), bobu (*Vicia faba*) a fazolu (*Phaseolus vulgaris*) (tab. 7). V odrůdě hrachu Kastor bylo nalezeno 8,43 g RSO na 100 g sušiny, což je více než uvádí Ekvall a kol. (2007) i Brummer a kol. (2015), to mohlo být způsobeno výběrem odrůdy hrachu. Z výsledků lze vyčíst, že velké procento oligosacharidů rafinosové řady bylo nalezeno i ve fazolu odrůdy Saxa, který obsahoval 6,85 g RSO na 100g sušiny. Při porovnání s výsledky podle Brummera a kol. (2015) je toto množství nesrovnatelně vyšší. Nejméně oligosacharidů rafinosové řady obsahovala odrůda bobu Nadwielanski 4,7 g RSO na 100 g sušiny. Odrůda sóji Nawiko obsahovala 6,5 g RSO na 100 g sušiny, což je srovnatelné s našimi výsledky.

U výsledků Ekvalla a kol. (2007), který extrahoval oligosacharidy z dvaceti odrůd semen hrachu, bylo zjištěno, že hrách obsahuje cca 5,67 g oligosacharidů rafinosové řady na

100 g sušiny. Výsledky také poukazují na to, že povařením hrachu se množství oligosacharidů v semenech sníží o 1/3 (tab. 7).

Podle studie Xiaoli a kol. (2008), kteří zkoumali množství oligosacharidů rafinosové řady a sacharosy u 19 druhů semen cizrny, bylo zjištěno, že v cizrně je obsaženo průměrně 3,18 g RSO ve 100 g sušiny těchto semen (tab. 7).

Brummer a kol. (2015) zkoumal množství jednotlivých sacharidů v různých hospodářských plodinách, jako jsou fazole, cizrna, čočka a hrách (tab. 7). Z výsledků vyplývá, že nejméně oligosacharidů rafinosové řady nalezneme v semenech cizrny a fazolu. Dále pak v čočce a nejvíce v hrachu. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s výslednými hodnotami dle Xiaoli a kol. (2008) a Ekvalla a kol. (2007).

Wongputtisín a kol. (2015) uvádí, že u odrůdy sóji *Glycine max* cv. Chiang Mai60 je množství oligosacharidů rafinosové řady okolo 15,33 g na 100 g sušiny, z toho 0,8 g rafinosy, 14,5 g stachyosy a 0,2 g verbaskosy (tab. 7). Což je více než u lupiny. Tento výsledek mohl být ovlivněn odrůdou, která obsahovala velké množství stachyosy.

U našich výsledků bylo prokázáno, že lupina obsahuje více oligosacharidů rafinosové řady, než ostatní vybrané plodiny (tab. 7). Bylo zjištěno, že lupina bílá odrůda Zulika obsahuje $8,26 \pm 0,14$ g RSO na 100 g mouky tzn. 9,2 g RSO na 100 g sušiny. Z této hodnoty bylo však extrahováno pouze 1,74 g RSO, což odpovídá cca 21 % (tab. 7). Nižší výtěžnost byla způsobena přítomností nežádoucích oligosacharidů (sacharosa a galaktosa) v některých frakcích, které musely být z procesu získávání odstraněny. Nižší výtěžnost může být způsobena i malou efektivností zvoleného postupu extrakce. Mnohem účinnější metodu uvádí (Martínez-Villaluenga a kol., 2004), kdy byla extrakce RSO prováděna přes křemelinu a dřevěné uhlí. Účinnost této metody byla 99,4 %.

Tabulka 7 : Množství oligosacharidů rafinosové řady v různých hospodářských plodinách.

	Rafinosa (g/100 g suš.)	Stachyosa (g/100 g suš.)	Verbaskosa (g/100 g suš.)	RSO (g/100 g suš.)	Citace
<i>L. albus</i> cv. Zulika	nezjištěno	nezjištěno	nezjištěno	9,20	
Sója	nezjištěno	nezjištěno	nezjištěno	8,19	Mé výsledky
Řepka	nezjištěno	nezjištěno	nezjištěno	2,11	
Slunečnice	nezjištěno	nezjištěno	nezjištěno	2,00	
<i>L. albus</i> cv. multolupa	0,62	5,74	0,19	7,56	
<i>L. albus</i> cv. marta	0,33	7,24	0,94	8,51	Martieney-
<i>L. albus</i> LO-3844	0,44	7,26	nenalezena	7,71	Villaluenga a kol.
<i>L. albus</i> LO3846	0,54	6,85	nenalezena	7,39	(2005a)
<i>L. albus</i> LO-3848	0,36	5,71	nenalezena	6,07	
<i>L. albus</i> LO-3855	0,48	4,98	nenalezena	5,46	
<i>L. albus</i> cv. Bardo	1,90	5,40	1,18	8,48	
<i>L. albus</i> cv. Bac	1,41	6,10	0,73	8,24	
<i>P. sativum</i> cv. Kastor	2,31	2,97	3,15	8,43	Muzquiz a kol. (1999)
<i>G. max</i> cv. Nawiko	2,83	3,67	nenalezena	6,50	
<i>V. faba</i> cv. Nadwielanski	1,78	2,92	nenalezena	4,70	
<i>P. vulgaris</i> cv. Saxa	0,64	6,21	nenalezena	6,85	
Hrách - čerstvý	2,95	1,44	1,29	5,67	Ekvalla a kol.
Hrách - spařený	2,18	1,17	0,57	3,92	(2007)
Cizrna	neuveдено	neuveдено	neuveдено	3,18	Xiaoli a kol. (2008)
Fazole - Navy	0,29	2,17	0,10	2,56	
Fazole - Pinto	0,34	1,89	0,07	2,30	
Cizrna - Desi	0,47	1,65	0,04	2,18	
Cizrna - Kabuli	0,37	1,14	0,04	1,55	Brummer a kol.
Čočka - zelená	0,20	1,83	1,34	3,37	(2015)
Čočka - červená	0,16	1,76	1,10	3,20	
Hrách - zelený	0,56	1,98	1,61	4,15	
Hrách - žlutý	0,89	2,06	1,56	4,51	
<i>Glycine max</i> cv. Chiang Mai60	0,8	14,5	0,2	15,33	Wongputtisina a kol. (2015)

Rada (2007) zkoumal pomocí enzymatického testu od Megazyme[®], množství oligosacharidů rafinosové řady v sójových krmivech (BR1, BR2 a BR3) a potravinách (sójová mouka, sójový granulát, sušená sójová smetana, sójový řez, sójový suk) (tab. 8). Dle výsledků bylo zjištěno, že nejvíce RSO bylo nalezeno v sójové mouce. Za předpokladu, že pro podporu růstu probiotických bakterií stačí denně sníst 1 až 2 g oligosacharidů rafinosové řady (Hara a kol., 1997), lze minit, že by tuto potřebu mohl pokrýt jeden sójový suk (50 g) denně, který obsahuje cca 1,4 g RSO.

Pokud dle výsledků Rady (2007) lze předpokládat, že 100 g sójové mouky obsahuje 5,5 – 4,5 g RSO, můžeme vydedukovat, že obsah RSO v lupinové mouce dle našich výsledků 8,26 g RSO/100 g mouky je nejen dostačující, ale i vyšší. Lupina je proto lepším zdrojem oligosacharidů rafinosové řady než sója.

Tabulka 8: Obsah oligosacharidů rafinosové řady v krmných směsích a potravinách (Rada, 2007).

Krmivo/výrobek	g RSO/kg	g RSO/100 g
BR1	21,17 ± 2,28	2,1
BR2	21,06 ± 3,98	2,1
BR3	22,16 ± 1,66	2,2
Sójová mouka hladká	45,33 ± 8,15	4,5
Sójová mouka hrubá	55,88 ± 14,71	5,5
Sójový granulát	33,56 ± 6,89	3,3
Sójová smetana sušená	18,19 ± 3,32	1,8
Sójový řez	21,62 ± 1,49	2,2
Sójový suk	27,82 ± 5,38	2,8

Suchý a kol. (2001) uvádí, že vyšlechtěním nových odrůd „sladké“ lupiny s nízkým obsahem antinutričních látek a vysokým obsahem proteinů se může lupina významně uplatnit ve výživě zvířat i lidí. U potravin obohacenými lupinou byl prokázán vliv na zmírnění pocitu hladu, ovlivnění bilance energie, pozitivně ovlivňují glykemii, hladinu krevních lipidů a hypertenzi, dále také zlepšují vyprazdňování střev. Nevýhodou jsou možné alergické reakce na protein z lupiny. Lupina také pozitivně ovlivňuje vlastnosti potravin, např. dodávají nažloutlou barvu či zpomalují stárnutí pečiva (Homolka a Kudrna, 2007). Vyizolované

oligosacharidy rafinosové řady zkracují dobu fermentace u mléčných výrobků a mohou se přidávat do různých funkčních potravin, které pak mají prebiotický efekt (Martínez-Villaluenga a kol., 2005b).

7 Závěr

Lupina obsahuje oligosacharidy rafinosové řady. Rozdíly v množství RSO v semenech lze pozorovat u různých plodin i odrůd, ale i přes mírné odchylky bylo potvrzeno, že lupina obsahuje v semenech největší podíl RSO. Tyto oligosacharidy se podařilo ze semen extrahovat v podobě bílého prášku. Zvolená extrakce nebyla příliš účinná (21 %), ale bylo získáno dostatečné množství oligosacharidů pro další testování.

Lupina se pomalu stává součástí naší stravy a to v různých formách např. v pečivu, těstovinách či jako doplňky stravy. Bylo ověřeno, že lupina obsahuje dostatečné množství oligosacharidů rafinosové řady, aby mohla sloužit při pravidelné konzumaci jako zdroj prebiotik. Lupina i vyextrahované oligosacharidy rafinosové řady se dají využít pro výživu lidí a výrobky z lupiny lze tedy zařadit mezi funkční potraviny.

8 Zdroje:

Aachary, A. A., Prapulla, S. G. 2011. Xylooligosacharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 10, 2-16.

Aniszewski, T., Ciesiolka, D., Gulewicz, K. 2001. Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupine seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochemistry*, 57 (1), 43-50.

Arybarstvi, specialista na rybářské návnady. Vlčí bob lupina v nálevu Cukk Lupin 225 g. [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: <http://www.arybarstvi.cz/vlci-bob-lupina-v-nalevu-cukk-lupin-225-g-6466.html>.

Arnoldi A., Boschini G., Resta D., Scigliuolo G., Sirtori E. 2011. The nutraceutical Properties of lupin seed: focus on proteins and peptides. In: Abstracts of the 13th International lupin conference. Lupin crops – an opportunity for today, a promise for the future. Poznań, Poland, pp. 169.

Bioobchod.cz. Přírodní produkty. Lupinové kafe pražené mleté BIO 250g. [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: <http://www.bioobchod.cz/kava-lupinova-prazena-mleta-bio-250g>.

Bláha, V., Víšek, J. 2011. Význam prebiotik v potravě. *Practikus*, 8, 25-28.

Bohačenko, I., Pinkrová, J. 2014. Stanovení obsahu fruktanů metodou HPLC s refraktometrickou detekcí. *Listy cukrovarské a řepářské*, 1, 28-32.

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstaete, W., Delcour, J. A. 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans,

arabinoxylan-aligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 178-194.

Brummer, Y., Kaviani, M., Tosh, S. M. 2015. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International*, 67, 117-125.

Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Collins, M., Kolida, S., Rastall, R. A. 2012. In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed faecal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2024-2032.

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 415-420.

Charalampopoulos, D., Rastall, R. 2012. Prebiotics in foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 187-191.

De Reu, J. C., Linssen, V. A. J. M., Rombouts, F. M., Nout, M. J. R. 1997. Consistency polysaccharidase activities and non-starch polysaccharides content of soya beans during tempe fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 73, 357-363.

Ekvall, J., Stegmark, R., Nyman, M. 2006. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum Sativum* L.) and effects of blanching. *Journal Food Comp. And Anal.* 20, 13-18.

Elixir.cz. Váš elixír zdraví a krásy. PURYA! Bio Vegan Lupina protein 200g [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: <https://www.elixi.cz/purya-bio-vegan-lupina-protein-200-g-p46228/>.

European Parliament. 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *OJEU*, 9-25.

Finegold, S. M., Sutler, V. L. a Mathisen, G. E. 1983. Normal indigenous intestinal flora. In: Human Intestinal Microflora in Health and Disease (Hentges, D. J., ed.), pp. 3-31. Academic Press, London, U. K.

Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization. 2001. citováno 30. 11. 2016. [online] http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

Frühauf, P. 2011. Mikrobiota v období mezi 6. a 24. měsícem. *Pediatr pro praxi*, 12 (3), 214-216.

Fuller, R. 1992. Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, U. K.

García-Ruiz, A. I., García-Palomares, J., García-Rebollar, P., Chamorro, S., Carabaño, R., de Blas, J. C. 2006. Effect of protein source and enzyme supplementation on ileal protein digestibility and fattening performance in rabbits. *Span. J. Agric. res.* 4, 297-303.

Geigerová, M., Vlková, E., Skřivanová, E., Bunešová, V. 2014. Odlišnost v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců a možnosti jeho ovlivnění. *Veterinářství* 7/2014, 522-526.

Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125 (6), 1401-1412.

Gismondo, M. R., Drago, L., Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *int. J. Antimicrob. Agents*, 12, 287-292.

Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., Paquot, M. 2011. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 21, 394-409.

- Granito, M., Frías, J., Doblado, R. Guerra, M., Champ, M., Vidal-Vaverde, C. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food research and Technology*, 214, 226-231.
- Hagel, L. 2001. Gel-filtration chromatography. *Curr protoc Mol Biol* Chapter 10, Unit 10 19.
- Hara, T. Ikeda, N., Hatsumi, K., Watabe, J., Lino, H., Mitsuoka, T. 1997. Effects of small amount ingestion of soybean oligosaccharides on bowel habits and fecal flora of volunteers. *Jap. J. Nutr.* 55, 79-84.
- Hernández-Hernández, O., Marín-Manzano, M. C., Rubio, L. A., Moreno, F. J. Sanz, M. L., Clemente, A. 2012. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their rezistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *J. Nutr.* 142, 1232-1239.
- Hill, M. J. 1995. The normal gut bacterial flora. In: *Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology*, Hil, M. J. (ed.), Taylor and Francis, London. 5-30.
- Homolka, P., Kudrna, V. 2007. Uplatnění lupiny ve výživě přežvýkavců. *Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha*, pp. 44.
- Honig, D. H., Rackis, J. J. 1979. Determination of the total pepsin pancreatin indigestible content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran and corn bran. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1262-1266.
- Hosono, A. 1992. Fermented Milk in the Orient. In: *Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences*, Y. Nagasawa, A. Hosono (Eds.) ElsevierApplied Science, London, UK, 61-78
- Hruška, J. 1955. *Luskoviny*. Praha: SZN.
- Hýbl, M., Ondřej, M., Seidenglanz, M., Vaculík, A. 2011. Metodika pěstování lupiny bílé, žluté a úzkolisté. *Certifikovaná metodika. Asociace pěstitelů a zpracovatelů luskovin*, ISBN: 978-80-87360-02-6, pp. 36.

- Kohajdová, Z., Karovičová, J., Schmidt, Š. 2011. Lupin composition and possible in bakery. A review. Czech Journal Food Science, 29 (3), 203-211).
- Larbier, M., Leclercq, B. 1994. Nutrition and feeding of poultry. Nottingham University press, Loughborough, Leicestershire, pp. 305.
- Lee, J. H., Choung, M. G. 2011. Comparison of nutritional components in soybean varieties with different geographical origins. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 54, 254-263.
- Lekarna. cz. První internetová lékárna v ČR. Laktulosa sandoz 670 mg/ml 1x500ml/335gm IIA Roztok [online]. [cit. 2016-12-05]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/laktulosa-sandoz-670mg-ml-1x500ml-335gm-ii-a-roztok/>.
- Lilly, D. M., Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms, Science, 147, 747-748.
- Maathus, A. J., van den Heuvel, E. G., Schoterman, M. H. a Venema, K. 2012. Galacto-oligosaccharides have prebiotic activity in dynamic *in vitro* colon model using a C-labeling technique. J. Nutr. 142, 1205-1212.
- Macfarlane, G. T. a Cummings, J. H. 1991. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease (Phillips, S. F., Pemberton, J. H. & Shorter, R. G., eds.), pp. 51-92. Raven Press, New York, NY.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. a Macfarlane, S. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. J. Appl. Microbiol. 104, 305-344.
- Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Gulewicz, K., Vidal-Valverde, C. 2004. Improved method to obtain pure alpha-galactosides from lupin seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (23), 6920-6922.

- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Vidal-Valverde, C. 2005a. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91, 645-649.
- Martínez-Villaluenga C., Frías J, Vidal-Valverde C., Gómez R. 2005b. Raffinose family of oligosaccharides from lupin seeds as prebiotics: Application in dairy products. *Journal of Food Protection*, 68 (6), 1246-1252.
- Metchnikoff, I. I. 2004. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*, Springer Publishing Company, New York, NY, USA.
- Mezlík, T. 2008. Přehled registrovaných odrůd sóji, lupiny a bobu. *Úroda* 12, 50-53.
- Minkevič, I. A., Borkovskij V. J. 1953. *Olejniny*. (Překlad z ruského originálu *Masličnyje kultury*, Selchozgiz Moskva. Vydání první. Praha: SZN, pp. 394.
- Mitsuoka, T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Appl. Sci., London, 69-114.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M. M., Folkman, W., Gulewicz, K. 1999. Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides: Preparative method for their isolation and purification. *Indus. Crops and Prod.*, 19, 183-188.
- Myprotein. Fuel your ambition. Inulin. [online] [cit. 2016-12-05]. Dostupné z: <https://www.myprotein.cz/sports-nutrition/inulin/10530732.html>.
- Nilsson, U. A Nyman, M. 2005. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerization and solubility. *Br. J. Nutr.* 94, 705-713.
- Niness, K. R. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129, 1402-1406.
- Nováková, E. 2012. Balastní látky a prebiotika v pekařské výrobě. *Potravinářská revue* 2/2012, 13-15.

NutriExact. GOS. [online] [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: http://www.nutriexact.cz/kategorie/?_search-key=GOS&search-form=Vyhledat.

Osiva-semena.cz. Lupina. [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: http://www.osiva-semena.cz/search.php?orderby=position&orderway=desc&search_query=lupina&submit_search=Hledat.

Panesar, P. S. A Kumari, S. 2011. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnol. Advan.* 29, 940-948.

Polák, J. 1955. *Strukoviny*. Vydání první. Bratislava: SVPL, pp. 216.

Portugal shop. Tremocos do olival, luštěnina, 350g. [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: <http://www.portugalshop.cz/tremocos/tremocos-do-olival-lustenina-350-g>.

Preter, D. V., Verbeke, K. 2015. Functional aspects of probiotics and the impact on human health. *Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, ISBN-10: 1910190098, 13-26.

Priebe, M. G., Vonk, R. J., Sun, X., He, T., Harmsen, H. J. Welling, G. W. 2002. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre and probiotics. *Eur. J. Nutr.* 41 (Suppl. 1), 12-10.

Rada, V. 2007. *Nutriční vlastnosti sójových sacharidů ve vztahu k nepřezývkům*. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha, pp. 25.

Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi.* 12(2). 92-97.

Rios de Souza, V., Menezes, C. C., Cunha, L. R., Pereira, P. A. P. a Pinto, U. M. 2015. Prebiotics: Technological aspects and human health. *Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, ISBN-10: 1910190098, 275-288.

- Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr.* 137, 830S-837S.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104, 1-63.
- Rudolfová, J., Čurda, L. 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy.* 99. 168 – 174.
- Rycroft, C. E., Jones, R. M., Gibson, G. R. A Rastall, R. A. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91, 878-887.
- Sarkar. S., 2013. Potential of probiotics as pharmaceutical agent: a review. *BFJ* 115, 1658-1687.
- Schuman, C. 2002. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *Eur. J. Nutr.* 41, 17-25.
- Silk, D. B., Dvis, A., Vulevic, J. Trozsis, G., a Gibson, G. R. 2009. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosacharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29, 508-518.
- Silvia, R. F. 1996. Use of inulin as a natural texture modifier. *Cereal Foods World* 41, 792-794.
- Soccol, C. R., de SouzaVandenberghe, L. P., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., de DeaLindner, J., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. 2010. The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4), 413-434.
- Solař, S. 2010. Prebiotika a probiotika v klinické praxi. *Medicína pro praxi.* 7(1), 14-18.

Stewart, M. L., Timm, D. A., Slavin, J. L. 2008. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an *in vitro* fermentation system. *Nutr. Res.* 28, 329-334.

Suchý, P., Straková, E., Herzig, I. 2011. Nové poznatky o využití semen rodu *Lupinus* ve výživě člověka a zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha, pp. 40.

Suchý, P., Straková, E., Herzig, I. 2016. Možnosti využití lupiny bílé ve výživě zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha, pp. 43.

Štranc, P., Štranc, J., Štranc, D. 2008. Nové poznatky o pěstování lupiny v ČR (1. část). *Úroda* 3, 72-74.

TOXNET, 2017. U. S. National Library of Medicine. [online]. [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>.

Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Bruck, W. M., Gibson, G. R. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 11, 75-90.

Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N. a kol. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr.* 81, 121-132.

Van Loo, J. 2004. The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. *Nutr. Res. Rev.* 17, 89-98.

Ventura, M., Turrone, F., Canchaya, C., Vaughan, E. E., O'Toole, P. W., van Sinderen, D. 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Font. Biosci.* 14, 3214-3221.

Vrabec, M. 2008. Charakteristika a metodika pěstování lupin na základě výsledků výzkumu a šlechtění ve světě, s přihlédnutím k podmínkám v ČR. [online]. Selgen. [cit. 2016-12-05]. Dostupné z:

http://selgen.cz/sprava/wp-content/uploads/2012/01/2008_01_25_metodika_lupina.pdf.

Volek, Z. 2009. Využití lupiny bílé (*Lupinus albus*, odrůda Amiga) ve výkrmu brojlerových králíků. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., ISBN: 978-80-7403-033-8, pp. 16.

Walmart a.s. Klub zdraví. Laktobacily COMPLEX s fruktooligosacharidy [online] [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: https://www.klubzdravi.cz/produkty/laktobacily-complex-s-fruktooligosacharidy_2871.aspx.

Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B. 2006. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6), 4497-4499.

Woodsmansey, E. J. 2007. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 1178-1186.

Wongputtisin, P., Ramaj, R., Unpaprom, Y., Kawaree, R., Pongtrakul, N. 2015. Raffinose family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of prebiotic substances. *Inter. J. of Food Science and Technol.*, 50, 1750-1756.

Xiaoli, X., Liyi, Y., Shuang, H., Wie, L., Yi, S., Hao, M., Jusong, Z., Xiaoxiong, Z. 2008. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 111, 215-219.

Yves Rocher. Créatur de la cosmetique végétela. Šampon podporující růst vlasů. [online] [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: https://www.yves-rocher.cz/sampon_podporujici_rust_vlasu.

Zbořil, V., Prokopová, L., Hertlová, M. 2005. Mikroflóra trávicího traktu klinické souvislosti. Praha. Grada publishing, a.s. ISBN 80-247-0584-2.