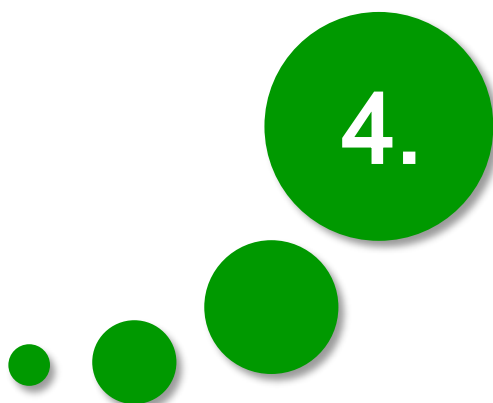




Metodické listy OPVK

Dietní vláknina a esenciální složky potravy, zdraví prospěšné fytochemikálie, význam pestré stravy



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



DIETNÍ VLÁKNINA

O vláknině a jejím pozitivním vlivu na lidský organismus nalézáme zmínky již od dob starověkého Řecka. Ve 20. století byla stimulem renesance zájmu o vlákninu publikace Dennise Burkitta, který v 70. letech zjistil nižší výskyt kolorektálního karcinomu u afrických černochů, kteří konzumují převážně potravu bohatou na vlákninu, ve srovnání s populací západních zemí. Praveký člověk přijímal denně potravou 100-150 g vlákniny, pro porovnání příjem dietní vlákniny v průmyslově rozvinutých zemích dnes činí pouhých 11-13 g/den. Dnes je doporučováno konzumovat 25-30 g vlákniny denně.

Vlákninou rozumíme nestravitelné zbytky rostlinného původu. Tvoří ji heterogenní směs látek různého chemického složení (nejčastěji polysacharidy) a biologických účinků. Pod pojem „dietní vláknina“ dnes zařazujeme nestravitelná residua rostlinného původu v lidské dietě a nejsou to výhradně jen složky membrán rostlinných buněk. Definice dietní vlákniny Americkou asociací chemiků cereálií (AACC – American Association of Cereal Chemists) je: „Dietní vláknina je tvořena požitelnou částí rostlinných nebo obdobných sacharidů, které jsou rezistentní trávení a absorpci v lidském tenkém střevě s kompletní nebo částečnou fermentací v tlustém střevě.“

Pojem vlákniny se většinou vztahuje na tzv. hrubou vlákninu, nerozpustnou ve vodě (IDF – insoluble dietary fibre), která zahrnuje lignin, celuloza a určitý podíl hemicelulos. Vláknina je však z hlediska struktury schopna býti ve vodě rozpustná, což je tzv. rozpustná (SDF – soluble dietary fibre) vláknina, která je tvořena pektiny, gumy, slizy, z hemicelulos – arabinoxylany, β -glukany, glukomannany a galaktomannany. Oba typy vlákniny ovlivňují funkci střev. Mechanismus působení vlákniny je komplexní. Nerozpustná vláknina zvětšuje objem trávené potravy, urychluje střevní pasáž, pozitivně podporuje peristaltiku. Zrychlením pasáže nerozpustnou vlákninou dojde ke kratšímu kontaktu toxických látek se sliznicí, absorpcí toxických látek na molekuly rozpustné vlákniny dochází k jejich omezenému kontaktu se sliznicí. SDF zvyšuje viskozitu obsahu žaludku a střev, zpomaluje promíchávání jejich obsahu, omezuje přístup pankreatických amyláz a lipáz k substrátům a tím absorpci živin střevní stěnou.

V ovoci nalézáme především pektiny. Základní struktura je tvořena lineárním řetězcem D-galakturonové kyseliny a jednotky galakturonové kyseliny jsou do různého stupně (průměrně 70 %) esterifikovány methanolem. Jejich obsah v ovocné dužině je okolo 1 %. Více pektinu se nachází v jablkách, rybíz, angreštu, kdoulích, rajčatech, mrkvi a cukrové řepě, méně v třešních, višních, bezinkách a borůvkách. Pektin ovlivňuje metabolismus glukosy a snižuje množství cholesterolu v krvi. Účinnější je pektin s vyšším obsahem methoxylových skupin (hrozny, broskve).

Vláknina je protektivním materiálem při konstipaci, gastrických a duodenálních vředech, hemorhoidech, také rakovině střev a konečníku aj. chorobách. Konzumace vlákniny je nezbytná nejen pro regulaci trávicího procesu, ale také pro normalizování mnohých metabolických procesů. Preventivní význam dietní vlákniny proti vzniku kolorektálního karcinomu je potvrzen rozsáhlými epidemiologickými studiemi. Z dat soustředěných z 20 populačních studií ve 12 zemích a dále výsledků studií v USA, bylo zjištěno, že zvýšením dietní vlákniny v potravě o 13 g/den bylo dosaženo snížení výskytu kolorektálního karcinomu o 31 %. V roce 1987 byla provedena studie na 12 mužích, kteří byli po 20 dnů živeni experimentální stravou. V období veganské stravy, byly nalezeny nižší hladiny žlučových kyselin a cholesterolu ve stolici oproti období masité nebo vegetariánské stravy. Vysoká koncentrace žlučových kyselin je spojena s rizikem rakoviny tlustého střeva a konečníku. Dále byl studován vliv přídatku 10-36 g pektinu ke stravě u 11 dobrovolníků, u třech nebyl zjištěn žádný efekt a u 8 došlo ke snížení plazmatického cholesterolu průměrně o 11 %. Z metabolických a nutričních poruch se nedostatek vlákniny podílí na vzniku obezity, rozvoji diabetu II. typu a hyperlipidemii. Působení vlákniny je však komplexní proces. Je tedy vhodné přijímat dostatečné množství vlákniny, ale má se dávat přednost ovoci a zelenině. Nadměrná dlouhodobá konzumace vlákniny (nad 30 g denně) není vhodná – mohlo by dojít za účasti kyseliny fytové, která vlákninu doprovází, k vazbě důležitých minerálních látek na vlákninu (vápníku, zinku, ale i draslíku a železa) a tím k jejich trvalým ztrátám. Zvláště nevýhodná je kombinace nadbytku vlákniny s malým příjmem mléka a mléčných výrobků (vegani, makrobiotici). Zvýšíme-li konzumaci vlákniny, musíme zvýšit i množství tekutin.

Tab. Obsah dietní vlákniny v ovoci (% sušiny)

Ovoce	Rozpustná vláknina	Nerozpustná vláknina	Vláknina celkem
jablka	5,8	7,5	13,3
hrušky	7,2	3,8	11
pomeranče	7,8	4,6	12,4
broskve	6,2	6,6	12,8
jahody	5,8	8,2	14



Praktické cvičení - pokus kategorie a - vyžadující běžné vybavení

Kalkulace množství vlákniny v různých odrůdách jablek a její zastoupení ve stravě

Úkol: Pomocí internetu – např. www.kaloricketabulky.cz vypočítejte, kolik vlákniny obsahují odrůdy jablek. Sníte-li denně 1 jablko cca o 250 g, kolik vlákniny % dodáte, víte-li že doporučené množství vlákniny je až 30 g denně. ('Golden Delicious' – 3,5 g/100 g /29 %/, 'Gala' 3,1 g /100 g / 25,8 %/, 'Jonagold' 2 g/100 g / 16,67 %/)

Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Stanovení obsahu pektinu ve vzorku jablka

Princip: Metoda stanovení pektinu dle Cerevitinova – vzorek je extrahován v kyselém prostředí a pektiny jsou extrahovány v ethanolu. Množství pektinu je gravimetricky stanoveno vážením.

Pomůcky: kádinky, Erlenmeyerova baňka, odměrný válec, váhy, Büchnerova nálevka, filtrační papír, sušárna, vodní lázeň

Chemikálie: kyselina chlorovodíková 0,2 M (vodný roztok), ethanol

Pracovní postup: 100g zhomogenizovaného vzorku jablka se naváží do Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorku se odměří 100 ml 0,2 M HCl (16,7 ml 37% HCl do 1l destilované vody). Vzniklý roztok je zahříván na 80 °C po dobu 1 hodiny. Nechá se vychladnout a následuje filtrace přes Büchnerovu nálevku. Filtrát by měl být čirý, jestliže není, filtraci opakujeme. K filtrátu se přidá dvojnásobné objemové množství ethanolu a dobře se promíchá. Následuje další filtrace předem zváženým a vysušeným analytickým filtrem. Vzniklý filtrační koláč se vysuší při 75 °C do konstantní hmotnosti a stanovená hmotnost se zapíše. Provede se výpočet množství pektinu v analyzovaném vzorku.



1. Příprava vzorků jablek k extrakci 2. Vzorky homogenizovaných jablek v termostatu 3. Filtrace 4. Vážení vzniklého produktu

Triterpeny

Triterpeny se klasifikují do skupiny terpenoidů, které společně se steroidy jsou zástupci isoprenoidů, jejichž základní strukturou je isopren (2-methyl-1,3-butadien). Triterpeny jsou většinou tuhé látky a v přírodě se vyskytují ve formě volné či vázané estery či glykosidy. Lze je nalézt v řadě rostlin či ovoci a jejich biologické účinky byly odvozeny z fytotherapeutické praxe. Řadu těchto látek však lze nalézt společně v komplexech, jejichž farmakologické účinky se mohou vzájemně doplňovat. Nejvýznamnějšími zástupci jsou betulín, kyselina ursolová nebo oleanolová. Tyto kyseliny jsou zastoupeny v ovoci, např. v jablečných slupkách.

Triterpeny jsou biologicky velmi účinné molekuly s širokým účinkem a schopností inhibovat enzymy důležité v průběhu inflamatorní reakce i enzymy štěpící vysokomolekulární látky z oblasti energetického metabolismu. Protizánětlivé působení je popisováno několika cestami. Jedná se o inhibice 5-lipoxygenázy v procesu syntézy leukotrienů, dále pak cestou inhibice fosfolipázy séra (např. ursolová kyselina, betulínová kyselina). Kyselina oleanolová má inhibiční účinek v systému komplementu cestou inhibice C3-komplementu. Dalšími efekty triterpenů jsou jejich účinky na inhibici uvolněním mediátorů typu cytokinů a dále pak hepatoprotektivní účinek na proliferaci hepatocytů. Rovněž byly prokázány jejich protinádorové vlivy. Široké spektrum schopností triterpenů inhibovat aktivitu různých enzymů, např. lipázy pankreatické, schopnosti kyseliny ursolové modifikovat účinek i dalších lipáz důležitých pro výživu. Lipáza je hydrolytický enzym, který katalyzuje štěpení esterové vazby triacylglycerolů s mastnými kyselinami s delším uhlíkatým řetězcem. V gastrointestinálním traktu je také přítomna žaludeční (acidostabilní) lipáza, hlavní podíl na trávení má však lipáza pankreatická. Perorálním podáním inhibitorů pankreatické lipázy se sníží resorpce tuků z diety a tím se sníží příjem kalorií. Jednou ze skupin látek, které mohou toto ovlivnit, jsou triterpeny – kyselina ursolová a oleanolová. Z komerčních produktů v oblasti farmakologie je na tomto princip používán lék orlistat, účinná látka lipostatin, který zamezuje vstřebávání tuků a tím napomáhá redukcii tělesné hmotnosti.

Praktické cvičení - pokus kategorie c - možno realizovat po dohodě pouze na specializovaných pracovištích

Inhibitory pankreatické lipázy - experimenty *in vitro*

Princip: Experiment spočívá ve sledování inhibice enzymu pankreatická lipáza *in vitro*, tj. ve zkumavce. Testované inhibitory jsou přidány do roztoku, ve které je stanovena aktivita enzymu pankreatická lipáza a po dobu 2 minut jsou sledovány změny absorbance a kalkulována aktivita.

Chemikálie: kit na stanovení aktivity enzymu lipáza (Dialab, ČR), roztoky testovaných inhibitorů o známé koncentraci účinné látky – ethylacetátový extrakt jablečných slupek, roztok orlistatu, roztok kyseliny ursolové, zdroj humánní lipázy (lyofilizované sérum)

Pomůcky: spektrofotometr, zkumavky pipety, stojan, pipety, termoblok

Pracovní postup: Do zkumavky se napipetuje 1 ml reagensie R1 (kolipáza) z kitu na stanovení aktivity pankreatické lipázy se nepipetuje 0,02 ml enzymu (lyofilizované sérum, či komerční roztok pankreatické lipázy). Vzorek se inkubuje v termobloku na 37°C po dobu 3 minut. Následně se přidá 0,07 ml testovaného inhibitoru a 0,25 ml reagensie 2 (barevný substrát). Jako blank (slepý) test se použije místo 0,07 ml inhibitoru stejné množství fyziologického roztoku). Vzorky jsou proměřeny na spektrofotometru. Sledují se změny absorbance na spektrofotometru při 580 nm po dobu 2 minut.



1. Inkubace vzorků v termobloku 2. Foto spektrofotometru 3. Okno software spektrofotometru - vpravo inhibiční křivky

Výsledná aktivita, resp. inhibice je následně kalkulována:

$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - \text{Aktivita (mAbs / min. vzorku)} / \text{mAbs / min blank} \times 100$$

Výsledky: Příklady stanovených inhibicí u testovaných látek pro inhibici pankreatické lipázy.

inhibitor	koncentrace	% inhibice
Orlistat	2 mmol/l	70,6
Kyselina ursolová	5 mmol/l	44,7
Slupky Jonagold	1,15 g/l*	49,16
Výličky Jonagold	1,15 g/l*	46,38

* navázek přepočten n množství kyseliny ursolové ve vzorku jablek

Flavonoidy

Flavonoidní látky u rostlin zahrnují především anthokyany, chlorofylová a karotenoidní barviva. Anthokyany jsou deriváty gama – pyronu. Podílí se na celkové barevnosti především ovoce. Izolace závisí na druhu a konzistenci ovoce a druhu flavonoidních látek v něm přítomných. U vzorků čerstvého ovoce je nutno povahařením deaktivovat enzymy – polyfenoloxidázy. Suché ovoce je homogenizováno a rovnou extrahováno do organického rozpouštědla.

Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Stanovení anthokyaninů ve vzorku spektrofotometricky

Princip metody: Anthokyaniny se extrahují octanovým pufrům (pH 3,6). Po filtraci se stanovuje absorbance vzniklého barevného roztoku při pH 2 a 3,6 a vlnové délce 500 nm. Z rozdílu absorbancí je odečteno množství anthokyaninů. Metoda je citlivá především na pelargonidin, který je obsažen především v jahodách.

Chemikálie: octanový pufr, kyselina chlorovodíková, pelargoninchlorid, alternativně kongočerveně, uhličitan sodný

Pomůcky: homogenizátor, váhy, filtrační aparatura, filtrační papír, pH metr, spektrofotometr, kyvety

Příprava octanového pufru: Octanový pufr 0,1M příprava: 46,3 ml 0,2 M vodným roztokem kyseliny octové se smíchá s 3,7 ml 0,2 M vodného roztoku octanu sodného

Příprava kalibrační křivky s Kongočervení: Připraví se 0,02% roztok kongočervení v 0,1 M vodném roztoku uhličitanu sodného. Připraví se 5 kalibračních roztoků – ředění 1+1, 1+4, 1+9, 1+14 a 1+19. Roztoky se ředí 0,1 M uhličitanem sodným. Zkalkuluje se koncentrace pro dané roztoky. Z hodnot rozdílu absorbancí se sestrojí kalibrační závislost (lineární) a korekce z kongočerveně se násobí faktorem 1,2 a výsledkem jsou anthokyaninové ekvivalenty vzorku.



Centrifugace vzorků



Pracovní postup: 100 g vzorku jahod (či jiného ovoce) je homogenizován se 100 ml octanového pufru. Směs se centrifuguje při 4 °C, 3000 g po dobu 10 minut.

Supernatant se přefiltruje. K polovině filtrátu se přikapává kyselina chlorovodíková, až je dosaženo hodnoty pH 2. Oba roztoky se nechají stát cca 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně se stanoví absorbance při 500 nm (slepým vzorkem je acetátový pufr).

Rozdíl absorbancí odpovídá absorbanci anthokyaninů ve vzorku. Stejně se proměří standard pelargoninchloridu, popř. alternativně roztok kongočerveně. Z kalibrační křivky se dále odečte množství anthokyaninů ve vzorku.

Kontrolní otázky

1. Co je to dietní vláknina a jak působí na lidský organismus?
2. Kolik je doporučováno denně konzumovat dietní vlákniny?
3. Jakou metodou se stanovuje obsah pektinu?
4. Co jsou triterpeny a jaké jsou jejich biologické účinky?
5. Co jsou to inhibitory pankreatické lipázy?
6. K čemu se užívá lék Orlistat?