(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 243011 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433785**
(22) Data zgłoszenia: **2020.05.05**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.08 BUP 32/2021**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.06.05 WUP 23/2023**

(51) MKP:
A23L 33/21 *(2016.01)*
A23L 33/125 *(2016.01)*
A23L 29/30 *(2016.01)*

(73) Uprawniony z patentu:
KASKAT SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gorzów Wielkopolski, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
WŁODZIMIERZ GRAJEK, Poznań, PL

(74) Pełnomocnik:
Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:
Preparat prebiotyczny i zawierający go środek spożywczy

PL 243011 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest preparat prebiotyczny (prozdrowotny środek spożywczy), podawany człowiekowi w dziennej dawce w ilości 1–5 g/d, charakteryzujący się tym, że w jego skład wchodzi mieszanina oligosacharydów, o stopniu polimeryzacji w zakresie 2–10, stosowanych w proporcji: 15–40% fruktooligosacharydów, 15–70% galaktooligosacharydów i 15–40% ksylooligosacharydów. Preparat prebiotyczny może być podawany człowiekowi samodzielnie, lub w mieszaninie z innymi składnikami funkcjonalnymi i nośnikami lub jako dodatek do środków spożywczych, korzystnie do mieszanek mlecznych. Preparat prebiotyczny jest wytwarzany poprzez wymieszanie mechaniczne lub pneumatyczne sproszkowanych oligosacharydów lub przez ich rozpuszczenie w cieczy, korzystnie wodzie, i zagęszczenie do postaci syropu lub wysuszenie do postaci sproszkowanej, jedną ze znanych metod suszenia, szczególnie metodą rozpyłową lub fluidalną. Wynalazek wpływa korzystnie na rozmnażanie się bakterii jelitowych z rodzaju *Lactobacillus*, w tym probiotycznych szczepów należących do tego rodzaju, jak *Lactobacillus rhamnosos* GG i *Lactobacillus acidophilus* La5.

Stan techniki

W ostatnich latach podejmowany jest duży wysiłek, aby wprowadzić do sproszkowanych produktów wartość dodaną w formie dodatków wzbogacających te produkty w składniki podnoszące ich wartość żywieniową, bezpieczeństwo i stabilność fizyko-chemiczną (Sharma i in. 2012). Szczególnie atrakcyjnym dodatkiem do sproszkowanych środków spożywczych są bakterie probiotyczne i prebiotyki. Pod pojęciem probiotyku rozumiemy środek spożywczy zawierający żywe bakterie, które podane w odpowiedniej ilości korzystnie działają na zdrowie człowieka (FAO-WHO 2001), natomiast termin prebiotyki odnosi się do składników żywności, które nie podlegają trawieniu pod wpływem enzymów trawiennych człowieka, lecz przechodzą do jelita grubego, gdzie stanowią pożywkę dla wybranych grup bakterii, korzystnych dla zdrowia konsumenta (Bindels i in. 2015).

Prebiotyki wybiórczo stymulują rozmnażanie i metabolizm co najmniej jednej z grup bakterii jelitowych, których populacje są korzystne dla zdrowia człowieka, przy czym korzyści te powinny być potwierdzone wynikami badań naukowych (Bindels i in. 2015; Śliżewska i in. 2013). Wśród mikroorganizmów korzystnie wpływających na zdrowie człowieka wymienia się zarówno uznane szczepy probiotyczne o potwierdzonym działaniu, ale także bakterie autochtonicznych z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* występujących w sposób naturalny w przewodzie pokarmowym. Zwiększenie liczebności komórek dobroczynnych mikroorganizmów wywiera pozytywny wpływ na dobrostan człowieka, a korzyści zdrowotne uzyskane ze spożycia prebiotyków są podobne do korzyści uzyskanych ze stosowania probiotyków.

Większość substancji prebiotycznych stanowią węglowodany, przede wszystkim poli- i oligosacharydy. Występują one w wielu roślinach stanowiących surowce do produkcji żywności, stąd ich naturalna obecność w takich produktach, jak produkty zbożowe, owocowo-warzywne czy mleczne (Kuntz i in. 2013).

Do najbardziej znanych probiotyków należą: fruktooligosacharydy (FOS), inulina, galaktooligosacharydy (GOS), transgalaktooligosacharydy (TOS), ksylooligosacharydy (XOS), izomaltooligo-sacharydy (IMOS), laktuloza, oligosacharydy mleka, skrobia oporna, arabinosacharydy, celuloza, hemicelulozy, pektyny, beta-glukany, gumy, kompleksy tych sacharydów i ich pochodne, w tym alkohole cukrowe. Szczegółowe dane na temat budowy chemicznej najważniejszych probiotyków można znaleźć w niektórych pracach przeglądowych (Ibrahim 2018; Belorkar i Gupta 2016, Gibson and Rastall 2006, BeMiller 2019). Podstawowym kryterium aktywności prebiotycznej danej substancji jest stymulacja drobnoustrojów probiotycznych. Cecha ta jest weryfikowana w specjalistycznych testach mikrobiologicznych, w których bada się wpływ obecności danego prebiotyki na rozwój ilościowy bakterii prebiotycznych, stosowanych w czystych kulturach (*in vitro*), lub rozwój ilościowy określonych grup drobnoustrojów w treści jelita grubego (*in vivo*).

Sposób postępowania przy testowaniu fermentacji oligosacharydów przez bakterie został przedstawiony w wielu pracach mikrobiologicznych (Aquino i in. 2016; Kunova i in. 2011; Gałązka i in. 2003). Do analizy wykorzystuje się zwykle szczepy bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju Lactobacillus i *Bifidobacterium* wyizolowane z produktów spożywczych oferowanych na rynku, szczepy z uznanych kolekcji krajowych i międzynarodowych drobnoustrojów oraz izolaty z organizmu człowieka (biopsje, kał, skóra). Większość drobnoustrojów stosowanych w testach fermentacyjnych stanowią szczepy dobrze znane i opisane w literaturze naukowej.

Testy fermentacyjne przeprowadza się przez obserwację dynamiki wzrostu poszczególnych szczepów lub kultur wieloszczepowych w odpowiednich pożywkach hodowlanych, do których dodaje się wybrane prebiotyki lub nieznane substancje, które chce się zweryfikować pod kątem zdolności do stymulowania wzrostu mikroorganizmów testowych.

Najczęściej stosowaną pożywką hodowlaną faworyzującą wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest pożywka MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, 1960). W jej skład wchodzą: pepton – 10,0 g/L, ekstrakt wołowy – 8,0 g/L, ekstrakt drożdżowy – 4,0 g/L, D(+) glukoza – 20,0 g/L, wodorofosforan di potasu – 2,0 g/L, Tween 80 – 1,0 g/L, cytrynian amonu – 2,0 g/L, octan sodu – 5,0 g/L, siarczan magnezu – 0,2 g/L, siarczan manganu – 0,04 g/L. W miejsce glukozy wprowadza się badany prebiotyki, najczęściej w stężeniu od 0,5% do 3% w/v. Bakterie mlekowe, z uwagi na ich szybki wzrost, hoduje się przez 24 h w brzeczce MRS w temperaturze 37°C (temperatura ciała ludzkiego). Po zakończeniu hodowli ustala się bilans gęstości populacji komórek bakteryjnych. Jest on oparty o pomiar liczebności komórek bakteryjnych zaraz po zaszczepieniu pożywki oraz natychmiast po zakończeniu hodowli. Pomiar liczebności komórek bakteryjnych może być przeprowadzony dwoma metodami:

- metodą płytkową przez pomiar ilości kolonii wyrosłych na płytce Petriego z agarem MRS,
- przez pomiar spektrofotometryczny zmętnienia pożywki, w której rosną bakterie, przy długości fali 600 (lub 540) nm.

W pierwszym przypadku wynik wyraża się jako jtk/ml, to znaczy liczbę jednostek tworzących kolonie zawartych w 1 ml pożywki, w drugim podaje jako bezwymiarową wartość gęstości optycznej (np. OD=0,4).

W przypadku bifidobakterii wybór pożywki jest mniej jednoznaczny, gdyż w publikacjach zalecane są różne pożywki. W porównawczych studiach nad wyborem pożywki dla mierzenia liczebności tej grupy mikroorganizmów wskazano, że najbardziej selektywna jest pożywka TOS-MUP, jednak wymaga ona, aby liczebność badanych kultur była powyżej 10^6 jtk/ml (Ghoddusi i Hassan 2011). W skład tej pożywki wchodzą: hydrolizat kazeinowy – 10 g/L, ekstrakt drożdżowy – 1 g/l, wodorofosforan monopotasu 3 g/L, wodorofosforan di potasu 4,8 g/L, siarczan amonu – 3 g/L, siarczan magnezu siedmiowodny – 0,2 g/l, chlorowodorek L-cysteiny 0,5 g/L, propionian sodu – 15 g/l i galaktooligosacharydu. Dla zwiększenia selektywności zalecany jest dodatek antybiotyku muciprocyny. Hodowlę na tej pożywce należy jednak kontynuować przez 3 doby. Alternatywną pożywką do liczenia bifidobakterii, stosowaną przez wielu badaczy, jest pożywka MRS z dodatkiem L-cysteiny w ilości 0,5 g/L, jako czynnika wychwytującego cząsteczki tlenu, co ułatwia prowadzenie hodowli w warunkach absolutnie beztlenowych. Obie pożywki TOS i MRS mogą być stosowane do namnażania bifidobakterii, choć zdarza się, że niektóre szczepy rosną tylko na jednej z nich.

W literaturze naukowej można znaleźć opisy wielu eksperymentów, w których oceniano wpływ prebiotyków na wzrost poszczególnych szczepów bakterii *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp. Najlepiej opisanymi prebiotykami są poli- i oligosacharydy fruktozowe (Oku i Nakamura 2017, Domininguez i in. 2013; Kulczyński i Gramza-Michałowska 2016). W 2016 r. oligofruktoza i fruktooligosacharydy uzyskały statut GRAS i mogą być stosowane między innymi do produktów mlecznych w ilości 0,4–6,7% i mogą być spożywane w dawce 6,2–12,8 g/d. (Office of Food Additive Safety, 2016).

Galaktooligosacharydy (GOS) stanowią oligomery zbudowane z 2–9 jednostek galaktopiranozylowych połączonych z końcową resztą glukozy. Polimery te można otrzymać przez ekstrakcję z materiału roślinnego (rafinoza i oligosacharydy sojowe), na drodze syntezy enzymatycznej z laktozy stosując beta-galaktozydazę w reakcji transglikozylacji (Hingu i Shah 2013). Występują one także w mleku kobiecym i krowim.

Ksylooligosacharydy (XOS) są polimerami D-ksylanów. Można je uzyskać przez hydrolizę enzymatyczną ksylanów, które są ważnymi składnikami roślin, w tym wielu drzew (Gupta i in. 2016).

Zagadnieniu wpływu prebiotyków na rozwój populacji drobnoustrojów jelitowych, a szczególnie bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* jest poświęcona bogata literatura naukowa. Studia mikrobiologiczne nad fermentacją fruktanów przeprowadzili Rossi i in. (2005). Autorzy ci badali 55 szczepów B*ifidobacterium* rosnących w pożywkach wzbogaconych w fruktooligosacharydy i inulinę. Pod uwagę wzięto Raftilose Synergy (mieszanina FOS i inuliny), Raftilose HP (inulina, DP 25) i Raftilose P95 (95% FOS DP 3-10) firmy Orafti (Belgia). Wymienione sacharydy różniły się długością łańcuchów polimerowych oraz proporcjami między FOS a inuliną. Badania wykazały, że spośród badanych szczepów tylko osiem posiadało zdolność hydrolizy inuliny. Stwierdzono szczepozależną zdolność do fermentowania fruktanów o określonej długości łańcuchów. Zdolność do fermentacji fruktanów wykazały nie tylko szczepy kolekcyjne, ale również izolaty z kału. Wykryto krzyżowe odżywianie bifidobakterii, to znaczy,

że bakterie nierozkładające inuliny wykorzystywały mono- i oligosacharydy uwalniane z inuliny przez szczepy, które miały zdolność do jej degradacji. Ivanowska i in. (2015) badali wpływ kapsułkowania probiotycznych bakterii *L. casei* 01 razem z inuliną wzbogaconą w oligofruktozę na przeżywalność bakterii. Wykazano, że dodatek 3% w/w prebiotyków zwiększył przeżywalność i poprawił wyniki długotrwałego przechowywania preparatu. Wspólne kapsułkowanie probiotyków i prebiotyków było także przedmiotem badań Kailasapathy'ego (2005). Autor badał trzy różne prebiotyki kapsułkowane z dwoma szczepami kolekcyjnymi *Lactobacillus acidophilus*. Jako prebiotyki były użyte: inulina, oligofruktoza i wysoko amylozowa skrobia kukurydziana w stężeniu 1% w/v. Wykazano, że najlepsze efekty prebiotyczne dał dodatek 1% amylozy Himaize.

W innych badaniach wyizolowano z fermentowanego mleka i mieszanki mlecznej pięć szczepów probiotycznych, należących do trzech gatunków *Lactobacillus* sp., i poddano je testom fermentacyjnym z pożywką MRS, do której dodano preparat Frutafit HD (Sensus), składający się głównie z inuliny, oraz preparat Oligomate 55, zawierający 55% GOS (Yakult) i Regulact, zawierający laktulozę (Figueroa-Gonzales i in. 2019). Wyniki badań wykazały, że wszystkie badane szczepy były zdolne do metabolizowania prebiotyków. Większość bakterii rosła szybciej na GOS i FOS, niż na laktulozie. Bardzo dobre rezultaty dała hodowla *L. rhamnosus* GG na pożywce z Oligomate 55, natomiast najgorzej wypadł w teście fermentacyjnym *L. casei* Shirota.

Badacze polscy analizowali wpływ dodatku fruktanów na mikroflorę bio-jogurtu zawierającego *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* sp.(Gustaw i in. 2011). Jogurt był wyprodukowany z mleka odtłuszczonego, a dodatek FOS i inuliny wynosił 1–3%. Autorzy stwierdzili, że dodatek FOS wywołał efekt stymulujący na bakterie probiotyczne.

W innych studiach, nawiązujących do modelu mikrobiologicznego jogurtu, badano profile fermentacyjne i przeżywalność *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* oraz *Bifidobacterum lactis* w kokulturze z bakteriami *Streptococcus thermophilus*. Hodowlę tych bakterii prowadzono w odtłuszczonym mleku z dodatkiem oligofruktozy (Orafti P95) i inuliny (Orafti GR). Wykazano, że dodatek obu typów fruktanów korzystnie wpłynął na przebieg fermentacji ko-kultur bakterii *S. thermophilus* z pozostałymi bakteriami, a szczególnie *T. thermophius* + *L. rhamnosus*.

Tureccy badacze Mumcu i Temiz (2014) badali wpływ sześciu komercyjnych prebiotyków na wzrost i aktywność kwasotwórczą dwóch probiotycznych szczepów *L. acidophilus* i dwóch szczepów *Bifidobacteria* sp. Pod uwagę wzięto FOS, inulinę, GOS, oligosacharydy sojowe, XOS i laktulozę. Każdy z prebiotyków był testowany indywidualnie. Wykazano, że wzrost i kwasotwórczość bakterii były zależne zarówno od typu dodanego prebiotyku, jak również od jego stężenia. Kunova i in. (2011) badali zdolność 12 szczepów pałeczek mlekowych do metabolizowania sześciu rodzajów prebiotyków, w tym GOS, Oligomate 55NP, inulinę i laktulozę, raftilozę D-rafinozę. Wszystkie badane szczepy wykazały zdolność do wzrostu na wymienionych sacharydach. Najlepszym źródłem węglowodanów dla wzrostu pałeczek mlekowych była inulina, a następnie laktuloza i rafinoza. Również mieszanina GOS i FOS dawała dobre przyrosty komórek bakteryjnych.

Salavati Schmitz i Allenspach (2017) badali dwa szczepy należące do gatunku Enterococcus faecium oraz dodatkowo *Bifidobacterium longum* i *B. infantis*. Jako probiotyki stosowali fruktooligosacharydy (FOS), mannano-oligosacharydy (MOS) i preparat Preplex, stanowiący mieszaninę FOS i gumy arabskiej, podawane w stężeniu 0,1%, 1% i 2%. Wyniki badań wykazały, że w odróżnieniu od eterokoków, bifidobakterii dobrze reagowały na dodatek prebiotyków, szczególnie gumy arabskiej.

Zamiast wyizolowanych sacharydów rolę prebiotyku może spełniać naturalny materiał roślinny wprowadzony do produktu spożywczego, jako kompleksowe źródło sacharydów. Przykładem takiego podejścia jest jogurt wzbogacony w pulpę zielonego banana (Costa i in. 2017). Wykazano, że we wzbogaconym jogurcie odnotowano przyspieszony wzrost *Lb. acidophilus* i *B. bifidum*. Innym przykładem prebiotyku może być sok z mango wzbogacony w FOS i bakterie probiotyczne (Acevero-Martinez i in. 2018). Wyniki badań, w których oceniano przeżywalność bakterii *L. paracasei*, *L. casei* i *L. rhamnosus* w czasie przechowywania w temperaturze 4°C pokazują, że dodatek 5% FOS pozwolił na uzyskanie produktu o dobrej jakości sensorycznej i dobrej przeżywalności probiotycznego szczepu *L. casei*.

Stymulujące działanie fruktooligosacharydów na bakterie fermentacji mlekowej i bifidobakterii zostało omówione w wielu innych publikacjach naukowych (Kaplan i Hutkins 2000; Mao i in. 2015).

Szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym znalazły także galaktooligosacharydy. Wichienchot i in. (2016) przedstawili wyniki badań, w których do syntezy GOS zastosowano β-galaktozydazę produkowaną przez *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*. Enzym ten został następnie wykorzy-

stany do syntezy GOS. Wykazano, że uzyskane galaktooligosacharydy stymulowały wzrost *Bifidobacterium* wyizolowanych z kału. W innych badaniach do hodowli bakterii kałowych zastosowano preparaty Bimuno®, zawierające 52% i 65% galaktooligosacharydów, podane w ilości 1, 05 i 0,033 g/L (Grimaldi i in. 2016). Wykazano, że dodatek prebiotyku wpływał korzystanie na skład mikrobioty jelitowej.

Badania modelowe przeprowadzili Martinez i in. (2013), którzy opracowali model imitujący warunki jelita grubego człowieka i świni (TIM-2, TNO). W modelu tym przeprowadzili badania symulujące trawienie pokarmu z dodatkiem GOS podanych w postaci preparatu Vivinal. Wyniki badań potwierdziły korzystne działanie GOS na pałeczki mlekowe i bifidobakterie.

W badaniach *in vitro* i *in vivo* na szczurach z zastosowaniem wysoko oczyszczonych GOS (Hong i in. 2016) wykazano, że dodatek tych sacharydów silnie stymulował rozmnażanie się komórek *B. bifidum* i *B. longum*, szczególnie w pierwszych 12 h po spożyciu. Żywienie tych zwierząt karmą z dodatkiem GOS przez okres kilku tygodni wpłynęło na istotne zwiększenie liczebności populacji bifidobakterii. Badania czeskich naukowców wykazały, że mieszanina GOS i maltodekstryny sprzyja szybszemu rozwojowi populacji bifidobakterii, które osiągnęły ponad 25% udział w całej populacji drobnoustrojów. Dużą aktywność prebiotyczną wykazują także galaktosacharydy ludzkiego mleka (HMO). Badania wykazały, że spośród kilku gatunków bifidobakterii izolowanych z kału, tylko *B. infantis* posiadała kompleks enzymatyczny potrzebny do utylizacji wszystkich ludzkich GOS. Badacze japońscy studiowali wpływ mieszaniny laktulozy z rafinozą i galaktooligosacharydem, w celu znalezienia dobrej formuły oligosacharydów przeznaczonych dla modyfikowanego mleka dla niemowląt (Ehara i in. 2016). Łączne podanie wszystkich trzech prebiotyków wyraźnie zwiększyło liczebność *B. breve* i *B. longum*.

Badania nad prebiotycznymi właściwościami galaktooligosacharydów były także przedmiotem innych studiów potwierdzających ich dobroczynny wpływ na rozmnażanie bakterii fermentacji mlekowej i bifidobakterii, w tym znanych probiotycznych szczepów pochodzenia jelitowego należących do tych rodzajów (Walton i in. 2016, Vulevic 2015).

Wśród prebiotyków, które wzbudzają w ostatnich latach zainteresowanie są również ksylooligosacharydy. Przykładem takich badań może być praca Okazaki i in. (1990). W badaniach uwzględniono dziewięć rodzajów bakterii, w tym bifidobakterie, pałeczki mlekowe, i enterokoki. Badania objęły testy fermentacyjne *in vitro* prowadzone w warunkach beztlenowych oraz badania żywieniowe *in vivo*. Spośród badanych izolatów *Bifidobacteroum adolescentis* dobrze fermentowało ksylobiozę i ksylotriozę. Również mieszanina ksylanooligosacharydów była utylizowana przez *B. adolescensis, B. infantis* i *B. longum*. Bakterie mlekowe nie rozkładały XOS, z wyjątkiem *L. fermentum*. Finegolda i in. (2014) opisali wyniki 12-tygodniowych eksperymentów, którym poddano osoby spożywające 1,4 g /d i 2,8 g/d XOS. Analiza składu mikrobiologicznego kału wykazała wzrost liczebności bifidobakterii, szczególnie widoczny przy wyższej dawce prebiotyku. Badania na ludziach prowadzili także Lin i in. (2016). Badacze obserwowali, że u osobników spożywających dietę wzbogaconą w XOS wzrastała zarówno liczebność bifidobakterii, jak i bakterii *Lactobacillus*. Korzystny wpływ XOS na wzrost pałeczek mlekowych obserwowali także Yu i in. (2015). Badali oni wpływ ksylooligosacharydów o stopniu polimeryzacji 1–6, wyizolowanych z kolb kukurydzy, na 10 szczepów należących do gatunku *L. plantarum*. Wyniki badań pokazały, że wpływ dodatku ksylooligosacharydów na pałeczki mlekowe był szczepozależny. Najlepszy wzrost wykazał szczep *L. plantarum* S2 i odnotowano stymulujący wpływ XOS. W 2015 r po raz pierwszy przeprowadzono szeroko zakrojone badania pilotażowe nad prebiotycznym działaniem XOS na mikrobiotę przewodu pokarmowego dorosłych ochotników zdrowych i ze predyspozycją do cukrzycy. W badaniach uczestniczyło 16 osób zdrowych i 13 osób z predylekcją do cukrzycy, którzy uzupełniali dzienną dietę 2 g XOS. Badania wykazały wyraźną korzystną zmianę mikrobioty jelitowej pod wpływem spożywania ksylooligosacharydów. Dobroczynne działanie XOS na mikrobiotę ludzi obserwowali także inni badacze (Lin i in. 2016). Analizowano także wpływ dodatku XOS na jakość pitnego jogurtu. Wykazano, że obecność XOS, podanych w formie sproszkowanej i ciekłej w ilości 1, 3 i 5%, nie wpłynęła na liczebność bakterii, lecz zmieniła właściwości sensoryczne produktu (Penksza i in. 2018). Bardzo szerokie badania nad wpływem prebiotyków na mikrobiotę jelitowa dorosłych ludzi przeprowadzili badacze szwajcarsko-holenderscy (Fehbaum i in. 2018). Stosując specjalną platformę skriningową przeprowadzili fermentacje z zastosowaniem pożywki imitującej płyn jelita krętego wzbogacony w dodatek kilku komercyjnych preparatów prebiotycznych, zawierających FOS, GOS, XOS i beta-glukan. Wyniki badań wykazały, że wszystkie zastosowane sacharydy wykazały działanie probiotyczne. Najsilniejszy efekt bifidogenny wywarły inulina, GOS i XOS. Korzystny wpływ XOS w połączeniu z inuliną na wzrost bifidobakterii obserwowali także Lecerf i in. (2012).

Wzbogacanie środków spożywczych w prebiotyki w celu uzyskania żywności funkcjonalnej od szeregu lat jest przedmiotem patentowania. Pierwsze patenty w tej dziedzinie pojawiły się już w latach 90. Przykładem takiego patentu jest polski wynalazek z 1998 r. PL/EP 2162020. Dotyczy on preparatu żywnościowego zawierającego fruktooligosacharydy, wykazujące działanie prebiotyczne, połączone z mąką sojową, zmiażdżonym siemieniem lnianym i suszonymi owocami dzikiej róży lub borówki bruszniczy.

W opisie patentowym TW201431495(A) przedstawiono sposób przygotowania funkcjonalnego fermentowanego mleka o obniżonej kwasowości i małej zawartości laktozy poprzez wzbogacenie go w galaktooligosacharydy (GOS), fruktooligosacharydy (FOS) i bakterie *Bifidobacterium*. Istotą rozwiązania jest konwersja laktozy w mleku do galaktooligosacharydu przed poddaniem mleka procesowi fermentacji, po czym wprowadza się FOS i mleko zaszczepia się bifidobakteriami. Dodatek FOS i GOS sprzyja rozmnażaniu probiotycznego mikroorganizmowi.

W innym rozwiązaniu (EP 2672844 (B1) przedstawiono formułę modyfikowanego mleka dla niemowląt, do którego dodano mieszaninę 2'-fukozylo-laktozy, 3'-sialolylo-laktozy i 6'-sialolylo-laktozy, jako preparatu stymulującego bifidobakterie w przewodzie pokarmowym dzieci.

W rozwiązaniach dotyczących przygotowania lub kompozycji sproszkowanych preparatów mlecznych dla dzieci i niemowląt wzbogaconych w prebiotyki opisano wiele zestawów prebiotyków, których celem jest poprawa stanu mikrobiologicznego mikrobioty jelitowej, faworyzowanie wzrostu bifidobakterii, zapobieganie stanom zapalnym, wspomaganie trawienia, zapobieganie biegunkom, modulację układu odpornościowego i wzmocnieniu wielu innych funkcji związanych ze zdrowiem i bezpieczeństwem dzieci. I tak, w rozwiązaniu CN1024229023(A) do mleka w proszku wprowadzono dodatek maltodekstryn, oligosacharydu i fruktooligosacharydu, w rozwiązaniu CN108174921(A) do sproszkowanego mleka dla niemowląt dodano GOS i FOS, natomiast w patencie CN108902325 (A) przedstawiono formułę na bazie mleka w proszku z dodatkiem GOS i polidekstrozy.

Do polepszenia właściwości zdrowotnych mieszanki mlecznej dla dzieci, obok składników mlecznych, wprowadzono do niego różne dodatki oraz prebiotyki, w tym GOS, FOS i laktozę, oligosacharydy inulinowe i laktitol. Opracowana mieszanka wg CN106035674 (A) pozwalała na zachowanie równowagi żywieniowej, immunologicznej i kwasowej. Mieszanka wspomagała także rozmnażanie się korzystnych dla zdrowia bakterii jelitowych, poprawiała adsorpcję wapna i magnezu, a także pokrywała potrzeby energetyczne organizmu dzieci. Korzystny dla zdrowia dzieci jest także produkt mleczny, którego formuła została przedstawiona w CN109965026 (A). Składa się on z sproszkowanego mleka pełnego i odtłuszczonego, sproszkowanych białek serwatkowych, oleju sojowego, sacharozy, maltodekstryny i fruktooligosacharydu, a także kilku ekstraktów roślinnych i dodatków mineralno witaminowych.

Jako składniki wzmacniające rozmnażanie bifidobakterii zaproponowano także kompozycję obejmującą dodatek rafinozy połączonej, z co najmniej jednym sacharydem z grupy obejmującej laktulozę, FOS, w tym kestozę i nystozę i GOS (JPH10175867).

W opisie CN101263841 (A) przedstawiono funkcjonalne mleko wzbogacone, w co najmniej jeden z wymienionych składników, a mianowicie: oligomannozę, ksylooligosacharyd, fruktooligosacharyd, galaktooligosacharyd, stachiozę, rafinozę, izomalto-oligosacharyd. Wymienione dodatki pomagają w zaparciach, wzmagają reprodukcję korzystnych bakterii, regulują mikroekologię jelitową, poprawiają system immunologiczny, zapobiegają hiperlipidemii, wspomagają trawienie i wchłanianie składników odżywczych zawartych w mleku.

Wynalazek z dziedziny produkcji żywności CN107094895 (A) wskazuje na korzystne efekty wprowadzenia do sproszkowanego fortyfikowanego mleka dodatku prebiotyków w formie maltodekstryn, galaktooligosacharydu i proszków owocowych. Uzyskany produkt był przeznczony do żywienia dzieci.

Korzystna dla zdrowia formuła, przedstawiona w opisie CN107568341 (A), obejmuje składniki mleczne w postaci płynnej i sproszkowanej oraz różne dodatki, w tym dodatki prebiotycze, ksylooligosacharyd, inulinę, izomaltooligosacharyd i dodatki roślinne oraz dodatki bakterii probiotycznych w postaci szczepów należących do bifidobakterii, *L. acidophilus, L. bulgaricus, L. rhamnosus, Streptococcus thermophilus* i innych organizmów. Produkcja tego produktu polega na odważenie składników, homogenizację, sterylizację, koncentrację, suszenie rozpyłowe i pakowanie.

W wynalazku CN107712059 (A) opisano skład formuły sproszkowanego produktu wzmacniającego tworzenie tkanki mięśniowej ludzi starych i zapobiegającej sarkopenii. Formuła ta obok licznych składników mlecznych, tłuszczowych, witaminowych i mineralnych zawiera także dodatek GOS, FOS i ekstrakty roślinne.

W opisie CN108576218(A) przedstawiono wynalazek polegający na wprowadzeniu do mleka koziego przeciwnadciśnieniowych peptydów oraz substancji prebiotycznych o charakterze węglowodanowym, jak beta-cyklodekstryny, ksylooligosacharydy, ksylitol oraz polisacharydy z Hovenia acerba. Przedmiotem zastrzeżenia patentowego CN102318677 (A) jest z kolei mieszanka mleczna, do której dodano ksylooligosacharyd i laktazę.

W wynalazku CN102379392 (A) przedstawiono prozdrowotną żywność i sposób jej przygotowania. W jej skład wchodzą substancje prebiotyczne wspomagające wzrost bifidobakterii, jak błonnik spożywczy rozpuszczalny i nierozpuszczalny, XOS, FOS, izomaltooligosacharyd i peptyd sojowy. Metoda przygotowania proszku polega na przygotowaniu błonnika, wymieszaniu składników i ich granulowaniu.

Przedmiotem zastrzeżeń patentowych CN104719475 (A) jest proszek mleczny wzbogacony w oligosacharydy glukozowe, fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy i inulinę. Patent obejmuje zastosowanie wymienionych prebiotyków w fermentowanych napojach mlecznych, śmietankach, suchych ciastach mlecznych oraz takich produktach mlecznych, które zawierają surowce mleczarskie w formie ciekłej i sproszkowanej, dodatki białkowe lub roślinne, szczepy drobnoustrojów i wodę. Sposób wytwarzania produktu polega na rozpuszczenie składników, wprowadzenie dodatków, wymieszanie, homogenizację, sterylizację, inokulację, fermentację, mieszanie i wtórną homogenizację. Substancje probiotyczne zostały zastosowane w celu skrócenia czasu fermentacji i redukcji biomasy bakteryjnej.

Dodatki prebiotyczne wprowadzane są także do produktów ciekłych. W wynalazku CN109479967 (A) przedstawiono ciekły produkt mleczny wzbogacony w galaktooligosacharyd. Określono go, jako produkt wartościowy żywieniowo, bezpieczny i wspierający przewód pokarmowy.

W innym rozwiązaniu CN110140773 (A) przedstawiono napój probiotyczny, w skład którego wchodził odtłuszczone mleko, dekstryny oporne, GOS, FOS, polidekstroza, ksylitol, proszek jagodowy, inulina oraz bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Formuła zapewnia długą trwałość produktu i jego dobre cechy sensoryczne. Wynalazca deklaruje, ze produkt działa korzystnie na kobiecy układ rozrodczy.

W skład innego napoju probiotycznego opisanego w CN110150525 (A) wchodzi polidekstroza, GOS IMOS, GOS, stachioza, tłuszcz roślinny, sproszkowane mleko pełne i bakterii probiotyczne. Dzięki dużemu dodatkowi prebiotyków produkt odznacza się korzystnym działaniem na przewód pokarmowy, produkowane metabolity bakteryjne, w tym ważne aminokwasy, antybakteryjne i antywirusowe substancje, bioaktywne peptydy, a także reguluje pracę wielu organów wewnętrznych.

Szeroki zestaw sacharydów prebiotycznych zawiera prebiotyczna kompozycja ujawniona w opisie US2017258823 (A1). Obejmuje ona obok innych składników takie sacharydy, jak inulinę, FOS, laktulozę, GOS, rafinozę, stachylozę, izomaltooligosacharyd i XOS. Kompozycja ta gwarantuje synergistyczne działanie fizjologiczne.

Przedmiotem zastrzeżeń patentowych CN110169456 (A) jest skład mlecznej odżywki dla dzieci, który obejmuje surowe mleko, cukier, kompleks witamin i minerałów, GOS i/lub FOS, fosfatydyloserynę, stabilizatory, węglan sodu i fosforan sodu. Wynalazcy podkreślają wysoką wartość żywieniową produktu.

W wynalazku EP 1 993 576 (B1) ujawniono skład mieszaniny prebiotyków wzmacniających działanie probiotyków przeznaczonych do produktów spożywczych, szczególnie odżywek dla dzieci. W skład mieszaniny wchodzą N-acetylowane i sialylowane oligosacharydy wybrane z grupy galaktooligosacharydów o określonej budowie chemicznej. Prebiotyki są wprowadzane do produktu łącznie z bakteriami *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Modyfikowane chemicznie galaktooligosacharydy, stosowane jako prebiotyki, opisano także w opisie US 8,361,530 (B2). Zdecydowana większość prebiotyków jest dodawana w formie gotowych, komercyjnych preparatów, o różnym stopniu czystości. W opisie patentowym JPH0430744 (A) z 1992 r. przedstawiono odmienny sposób wprowadzania probiotyku do produktu. W wynalazku zagęszcza się mleko i dodaje enzym beta-galaktozydazę, po czym podnosi temperaturę i dochodzi do samoczynnej transgalaktozydacji z utworzeniem GOS. Gotowy produkt poddaje się suszeniu rozpyłowemu. Podobne rozwiązanie zaproponowano w patencie TW201206354 (A) oraz w KR20110069202 (A).

W dziedzinie techniki związanej z żywnością dla niemowląt przedstawiono rozwiązanie CN110115291 (A) dotyczące sproszkowanego mleka z dodatkiem bioaktywnego białka laktoferyny. Sproszkowany produkt składa się ze sproszkowanego mleka, laktoferyny, izolatu białkowego, prebiotyków i probiotyków.

W opisie CN108402371 (A) ujawniono kompozycję prebiotyku przeznaczonego dla osób w średnim i starszym wieku cierpiące na zaparcia. W skład probiotyku weszły inulina, FOS, lewuloza oraz witamina C. Preparat wzmaga perystaltykę i rozluźnia treść jelit.

W rozwiązaniu CN107041455 (A) przedstawiono produkt mleczny o cechach probiotyku, który zawiera inulinę, FOS, maltodekstrynę oraz składniki białkowe i fosfolipidy pochodzenia sojowego. Wynalazca podkreśla, że po spożyciu produktu widoczna jest lepsza absorpcja białka.

W opisie patentowym CN109619595 (A) ujawniono kompozycję prebiotyczną i sposób jej zastosowania. Zawiera ona maltodekstrynę, FOS IMOS oraz cztery szczepy probiotyczne, w tym trzy należące do *Lactobacillus* i jedna *Bifidobacterium*. W praktyce uzyskano synergię między pro- i prebiotykami w poprawie składu mikroflory jelitowej.

Wśród preparatów prebiotycznych zapobiegających zaburzeniom jelitowym i polepszających mikrobiotę jelitową należy wymienić produkt, którego kompozycja została przedstawiona w CN109718289 (A). Jego głównym składnikiem prebiotycznym jest GOS i FOS oraz ekstrakty chińskich roślin leczniczych. Preparat zapobiega zaparciom i wspomaga mikrobiotę jelitową. Inny preparat prebiotyczny został oparty na izomalto-oligosacharydy (CN110167362 (A)).

W preparacie prebiotycznym przeznaczonym do zastosowań żywieniowych lub farmaceutycznych zestawiono dwa oligosacharydy – GOS i FOS; przy czym oba sacharydy miały stopień polimeryzacji 2–7, a udział każdego z nich w mieszaninie wynosił co najmniej 5%. Preparat jest przeznaczony do zwalczania lub prewencji w przypadku zakłóceń jelitowych, stanów zapalnych jelita grubego, nowotworów jelita grubego i infekcji jelit mikroorganizmami patogennymi (NZ540576 A). W wynalazku amerykańskim US2017000811 (A1) ujawniono kompozycje z galaktooligosacharydem preferencyjnie stymulującym bifidobakterie. Oligosacharydy ekstrahowane z mleka krowiego zastosowano w wynalazku RU2013157161 (A). Mieszanina rozpuszczalnych oligosacharydów z mleka oraz galaktooligosacharydów uzyskanych przez syntezę enzymatyczna z laktozy za pomocą beta-galaktozydazy odznaczała się tym, że zawartość monosacharydów w tej mieszaninie nie przekraczała 5%. W opisie ujawniono także kompozycję odżywczą dla niemowląt, zbliżoną do mleka ludzkiego, zawierającą wymienione oligosacharydy pochodzące z mleka, która wykazuje właściwości prozdrowotne polegające na ochronie immunologicznej, zmniejszaniu ryzyka infekcji lub zmniejszaniu przypadków alergii pokarmowej.

W wynalazku TW201822650 przedstawiono z kolei kompozycję odżywki dziecięcej w skład której wchodził oligosacharyd mleka ludzkiego lub jego prekursor. Zastrzeżono także, że odżywka może zawierać mieszaninę galaktooligosacharydu i/lub polidekstroza oraz probiotyk, np. *L. rhamnosus* GG i oligosacharydy mleka ludzkiego. Preparat działa korzystnie na mikrobiom jelitowy i poprawia wybrane markery immunologiczne, strukturę mózgu i funkcje jelitowe.

W probiotyku przedstawionym w wynalazku WO 2016/122885 (A1) jako substancje wspomagające rozwój dobroczynnych bakterii zastosowano kilkanaście form oligosacharydów, w tym gluko-oligosacharydy, GOS, FOS, manno-oligosacharydy, arabino-oligosacharydy, XOS, gliko-GOS, gliko-mannooligosacharydy, gliko-arabino-oligosacharydy, frukto-pochodne tych oligosacharydów, manno- pochodne tych oligosacharydów i inne. Bardzo szeroką aktywność prebiotyczną ma preparat ujawniony w JP2019123752 (A). Pomaga on w nietolerancji laktozy, działa na wzdęcia, zgagę, rozstrój żołądka, nudności, biegunki, bóle i skurcze żołądka i wymioty. W jego skład wchodzi galakto-oligosacharyd korzystnie w połączeniu z probiotycznymi bakteriami.

Zdecydowana większość wynalazków dotyczy prebiotyków zawierających oligosacharydy pochodzenia roślinnego. Tylko nieliczne odnoszą się do oligosacharydów zawartych w mleku ssaków. W opisie NZ519706 (A) przedstawiono prebiotyk oparty na zestawie oligosacharydów neutralnych i kwaśnych, wyekstrahowanych z mleka, co najmniej dwóch różnych zwierząt. Ciekawym rozwiązaniem jest kompozycja prebiotyczną zawierająca galaktooligosacharyd produkowany przez *Lactobacillus plantarum* w selektywnej pożywce wzrostowej. W takich warunkach wytwarza on beta-galaktozydazę, która konwertuje laktozę do GOS (US2918303857).

W wynalazku WO2018048305 (A1) zastosowano kompozycję galaktooligosacharydów o stopniu polimeryzacji 3, które odznaczają się rozgałęzioną budową. Wchodzą one w skład preparatu, razem z GOS linearnymi. Rozgałęzione GOS stymulują wydzielanie w jelitach mucyny. W wynalazku jest opisana szczegółowa budowa rozgałęzionych GOS, w raz z typami wiązań chemicznych występujących w tych sacharydach.

W rozwiązaniu WO2019193357 (A1) przedstawiono skład i sposób produkcji probiotyku zawierającego nierozpuszczalne oligosacharydy i monosacharydy nadające preparatowi dużą słodkość. Formuła obejmuje laktulozę, GOS o stopniu polimeryzacji 4, 3 i 2 ora GOS wytworzone z laktulozy.

W WO2019193357 (A1) ujawniono sposób uzyskania składników probiotyku o wysokiej słodkości. Efekt ten uzyskano przez galaktozylację, fukozylację lub deglikozylację słodkich glikozydów.

W polskim zgłoszeniu patentowym opisano rozwiązanie polegające na dodatku inuliny do ciasta drożdżowego bez dodatku cukru jako prebiotyk i substancja słodząca.

Firma Nutricia opatentowała środek odżywczy dla niemowląt, który zawiera martwe komórki *Bifidobacterium breve* oraz niestrawne oligosacharydy A i B o stopniu polimeryzacji 2–200, przy czym pod terminem niestrawne oligosacharydy należy rozumieć sacharydy z długiej listy prawie wszystkich znanych dotąd oligosacharydów naturalnych (PL/EP 2162020)

W publikacji Katarzyna Śliżewska i wsp.: „Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle", ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, 1 (86), 5–20 na str. 6 wskazano, iż substancje o właściwościach prebiotycznych muszą selektywnie stymulować wzrost i aktywność wybranych szczepów bakterii jelitowych mających korzystny wpływ na zdrowie. Na str. 8 wyjaśniono, że w celu oceny zdolności prebiotyku do selektywnej stymulacji bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* wprowadzono tzw. indeks prebiotyczny (PI), który można obliczyć z równania: PI = (Bif/Total) – (Bac/Total) + (Lac/Total) – (Clos/Total). Indeks prebiotyczny pozwala określić zmiany liczby populacji (Bif – *Bifidobacterium*, Bac – *Bacteroides*, Lac – *Lactobacillus*, Clos – *Clostridium*, Total – suma bakterii) w danym czasie w warunkach *in vitro*. Na str. 10 wskazano, iż w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzono właściwości prebiotyczne takich oligosacharydów, jak: fruktooligosacharydy (FOS), galaktooligosacharydy (GOS) i ksylooligosacharydy (XOS) o stopniu polimeryzacji (DP) do 10.

W publikacji Michał Tułaza i wsp. "Prebiotyki. Cz. I – Historia, mechanizmy działania, wymagania, efekty zdrowotne", Aptekarza Polski, 02/06/2017 ujawniono, iż żywność bogata w substancje prebiotyczne była stosowana już w czasach prehistorycznych. Bakterie posiadające praktycznie wyłącznie metabolizm sacharolityczny (czyli pozbawione aktywności proteolitycznej), mogą być uznane za potencjalnie korzystne dla organizmu człowieka. Taki profil metaboliczny jest charakterystyczny właśnie dla bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus*) oraz bifidobakterii (*Bifidobacteriu*m). Jedną z miar pozwalających dość precyzyjnie scharakteryzować prebiotyk w kierunku selektywności stymulacji drobnoustrojów jest tzw. indeks prebiotyczny, który definiuje się jako zmianę proporcji korzystnych bakterii (z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*) i tych uważanych za niepożądane (bakterie z rodzajów *Clostridium* i *Bacteroides*). To właśnie wspomniane rodzaje *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* są głównym „punktem uchwytu" dla prebiotyków. Zazwyczaj zmiany ilościowe w większej części dotyczą *Bifidobacterium*, co ma związek z tym, że znajduje się ich więcej w przewodzie pokarmowym człowieka, w porównaniu do bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Dodatkowo bifidobakterie wykazują preferencje pokarmowe w kierunku oligosacharydów, które są jednymi z najczęściej stosowanych substancji prebiotycznych.

W publikacji Małgorzaty Ziarno i Doroty Zaręby "Probiotyki i prebiotyki jako dodatki do żywności – co się zmieniło", Forum Mleczarskie Biznes 2/2018 (32) wskazano, iż prebiotyk powinien pobudzać wzrost i/lub aktywność drobnoustrojów naturalnie zasiedlających różne rejony przewodu pokarmowego, które pozytywnie oddziałują na zdrowie i samopoczucie gospodarza (w szczególności szczepów probiotycznych z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*). Aktualnie stosowanymi prebiotykami są przede wszystkim oligosacharydy. Ze względu na strukturę chemiczną wśród oligosacharydów można wymienić fruktooligosacharydy (FOS), galaktooligosacharydy (GOS), ksylooligosacharydy (XOS). Fruktooligosacharydy są krótkołańcuchowymi fruktanami, czyli „polimerami" fruktozy, zawierającymi 2–4 jednostki fruktozylowe połączone wiązaniami β-(2,1)-glikozydowymi. Galaktooligosacharydy mają w składzie cząsteczek od 3 do 10 monomerów galaktozy i glukozy, połączonych wiązaniami glikozydowymi.

Ksylooligosacharydy są to łańcuchy cząsteczek ksylozy połączone wiązaniami β-1,4, o stopniu polimeryzacji od 2 do 10.

W opisie patentowym PL/EP 216 2020 T3 ujawniono środek odżywczy dla niemowląt i/lub małych dzieci [0009] z mieszaniną niestrawnych oligosacharydów, korzystnie z fruktooligosacharydów, galaktooligosacharydów i ksylooligosacharydów [0026]. Niestrawny oligosacharyd A jest korzystnie oligosacharydem wybranym z grupy składającej się z β-galaktooligosacharydu, α-galaktooligosacharydu [0033]. Niestrawny oligosacharyd B jest korzystnie fruktooligosacharydem [0034]. Jeśli kompozycja zawiera niestrawny oligosacharyd A i B, to stosunek niestrawnego oligosacharydu A do niestrawnego oligosacharydu B wynosi korzystnie od 1/99 do 99/1, korzystniej od 1/19 do 19/1, a nawet korzystniej od 1 do 19/1 [0036].

Jednocześnie, istnieją takie oligosacharydy, uznawane powszechnie za prebiotyki, które zgodnie z wiedzą ze stanu techniki zwykle nie stymulują wzrostu różnych gatunków bakterii z rodzaju L*actobacillus*. Dotyczy to w szczególności ksylo-oligosacharydów.

W publikacji Kontula P, Wright A, Mattila-Sandholm T.: Oat bran β-gluco- and xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 45, 163–169, 1998 (strona: 165) wykazano eksperymentalnie, że bakterie Lactobacillus rhamnosus, *L. plantarum* i *Lactococcus lactis* nie fermentują oligomerów ksylozy. Dane te są bardzo wiarygodne, gdyż pochodzą z najlepszego ośrodka badawczego probiotyków w Europie.

W monografii Gibsona GR i Rastalla RA: Prebiotics: development & application. John Wiley & Sons Ltd, 2006 (strona: 120) podkreśla się, że ksylooligosacharydy stymulują selektywnie wzrost bifidobakterii, jednak nie wymieniono ani słowem ich prebiotycznego działania w stosunku do *Lactobacillus* sp.

Na brak efektu stymulującego ksylooligosacharydów wobec pałeczek mlekowych *L. acidophilus* wskazują także wyniki badań badaczy tureckich (Mumcu AS i Temiz A.: Effects of prebiotics on growth and acidifying activity of probiotic bacteria. GIDA 39(2), 71–77, 2017, strona: 74).

Dane naukowe wskazują także, że nie tylko czyste ksylooligosacharydy nie stymulują wzrostu *Lactobacillus* sp., ale także ksylo-oligosacharydy w połączeniu z innymi sacharydami nie wykazują takiej aktywności. W pracy Mei G-Y et ah: Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics, Canadian Journal of Microbiology 57, 857–865, 2011 (strona: 861) pokazano, że ksylooligosacharydy w kompleksach z arabinosachary darni (arabinoksylany) nie stymulują wzrostu *L. rhamnosus, L. plantarum, L. kefir* i *L. reuteri.*

W kontekście nieoczywistości zastrzeganego wynalazku warto zauważyć, że cytowane powyżej publikacje, odnoszą się do ksylanooligosacharydów wchodzących w skład kompozycji prebiotycznej opisanej w wynalazku. Publikacje te odzwierciedlają panującego w stanie techniki przekonania o braku pozytywnego wpływu ksylooligosacharydów na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Wyniki ujawnione poniżej wykazują natomiast nieoczekiwanie efekt zupełnie odwrotny tj. nieoczekiwanie dowodzą, że w przypadku dwóch wymienionych w zgłoszeniu szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* dodanie do kompozycji prebiotycznej ksylanooligosacharydów wzmacnia dodatkowo wzrost tych szczepów bakterii probiotycznych.

Co więcej, z ujawnionych poniżej danych eksperymentalnych wynika, że dla dwóch różnych przebadanych przez twórców szczepów bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*, dla których nieoczekiwanie zaobserwowano pozytywny wpływ ksylooligosacharydów, efekt ten jest uzyskiwany dla zasadniczo różnych poziomów zawartości ksylooligosacharydów. I tak w przypadku *Lactobacillus rhamnosus* GG efekt wzmocnienia obserwowano dla zawartości 30–38% ksylooligosacharydów, natomiast w przypadku *Lactobacillus acidophilus* La5 efekt wzmocnienia obserwowano dla zawartości 17–25% ksylooligosacharydów w kompozycji prebiotycznej.

A więc wcale nie jest oczywiste, że kompozycja opisana w wynalazku zawierająca ksylooligosacharydy będzie posiadała poprawione właściwości prebiotyczne w stosunku do niektórych szczepów bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*. Tym bardziej nieoczekiwany jest efekt definiujący zakresy zawartości ksylooligosacharydów w kompozycji prebiotycznej skuteczne wobec konkretnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* nieoczekiwanie wrażliwych na stymulację ksylooligosacharydarni. W szczególności nieoczekiwany w świetle znanego stanu techniki jest skład zastrzeganej obecnie kompozycji prebiotycznej przeznaczonej do stymulowania wzrostu probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG. Wyniki ujawnione w zgłoszeniu były całkowicie nieoczekiwane, a specyficzny skład zastrzeganej kompozycji, skutecznej tylko wobec tego szczepu, nie mógł być przewidziany przez specjalistę. Większość badań naukowych dotyczy analizy wpływu dodatku pojedynczych preparatów prebiotycznych na mikrobiotę jelitową i ich skutki w odniesieniu do zdrowia człowieka. Istnieje mało danych naukowych na temat działania kompleksów prebiotycznych, obejmujących jednocześnie kilka prebiotyków. W literaturze patentowej ujawniono szereg wynalazków omówionych powyżej, w których stosowano bądź pojedyncze oligosacharydy, bądź oligosacharydy w wieloskładnikowych kompozycjach, jednak żadne z rozwiązań nie przedstawiało kompozycji oligosacharydów o składnikach i stężeniach faworyzujących wzrost ściśle określonej grupy drobnoustrojów. Dane eksperymentalne wskazują, że połączenie wielu oligosacharydów w jedną kompozycję nie zawsze przynosi pozytywny efekt. Dla stymulacji wzrostu określonych grup bakterii wymagany jest nie tylko odpowiedni dobór komponentów, ale także proporcje między nimi i dawki.

Problem techniczny

Celem wynalazku jest przygotowanie preparatu prebiotycznego, który wspierałby kierunkowo rozmnażanie się komórek bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Szczególnie pożądane jest, aby był on zdolny

do stymulowania probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG oraz probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* La5.

Poszukiwany preparat prebiotyczny powinien nadawać się do stosowania jako dodatek do produktów spożywczych, zwłaszcza produktów mlecznych, w szczególności mieszanek mlecznych w proszku, w związku z tym powinien stanowić kompozycję składników rozpuszczalnych w wodzie, korzystnie w formie sproszkowanej i niewywierających istotnego wpływu na cechy fizyko-chemiczne i sensoryczne środków spożywczych, do których preparat prebiotyczny będzie wprowadzony.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja dodatku prebiotycznego do środków spożywczych wspierającego rozmnażanie się probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp., charakteryzująca się tym, że stymuluje rozmnażanie probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG i składa się z 17–38% fruktooligosacharydów, 32–45% galaktooligosacharydów i 30–38% ksylooligosacharydów, przy czym dawka dobowa dodatku wynosi od 1 g do 5 g.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest środek spożywczy zawierający dodatek prebiotyczny według wynalazku określony powyżej.

Korzystnie, środek spożywczy według wynalazku jest produktem mlecznym, korzystnie mieszanką mleczną w proszku.

Szczegółowe omówienie wynalazku

Preparat według wynalazku charakteryzuje się tym, że w jego skład wchodzą oligomery składające się z fruktozy, galaktozy i ksylozy. Oligomerami tymi są fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy i ksylooligosacharydy o stopniu polimeryzacji od 2 do 10, korzystnie 2–5. Wymienione oligomery odznaczają się tym, że nie są trawione w przewodzie pokarmowym człowieka przez enzymy żołądka, dwunastnicy i jelita cienkiego i ulegają hydrolizie dopiero przez enzymy produkowane przez mikrobiotę jelitową, w tym przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, w tym przez bakterie należące do gatunków *L.* rhamnosus, *L. acidophilus, L. casei, L. plantarum* i *L. fermentum*.

Fruktooligosacharydy i ksylooligosacharydy, stosowane według wynalazku, są pochodzenia roślinnego i są pozyskane z materiału roślinnego na drodze hydrolizy enzymatycznej, natomiast stosowane galaktooligosacharydy, mogą być produktem syntezy oligomerów z laktozy przy użyciu beta-galaktozydazy. Każdy z wymienionych polimerów może być polimerem zbudowanym z jednego typu reszt cukrowych lub może zawierać w cząsteczce dodatkowo inne sacharydy, w tym cząsteczki glukozy.

Jednym z kluczowych elementów opisywanego wynalazku są proporcje między wymienionymi trzema oligosacharydami i łączna dawka tych składników spożyta przez konsumenta w ciągu dnia. Korzystnie masa preparatu probiotycznego powinna składać się w 15–40% z fruktooligosacharydów o DP=3–5. 15–65% galaktooligosacharydów o DP=2–8 i 15–35% z ksylooligosacharydu o DP=2–9, a łączna ilość preparatu, według wynalazku, spożyta dziennie wraz ze środkiem spożywczym, do którego została wprowadzona, powinna wynosić 0,5–5 g, korzystnie od 0,5 do 3 g.

Preparat prebiotyczny może być wytwarzany przez odważenie poszczególnych sproszkowanych składników i ich wymieszanie mechaniczne lub pneumatyczne w mieszalniku lub złożu fluidalnym.

Preparat prebiotyczny może być również wytwarzany przez rozpuszczenie oligosacharydów w cieczy, korzystnie wodzie, i zagęszczenie do postaci syropu lub wysuszenie do postaci sproszkowane jedną ze znanych metod, korzystnie metodą rozpyłową lub fluidalną.

Korzystnie, oligosacharydy tworzące prebiotyk są rozpuszczone w mleku pełnym lub mleku odtłuszczonym, względnie w roztworze mleka pełnego lub mleka odtłuszczonego, lub w mleku razem z białkami roślinnymi, białkami mlecznymi, białkami serwatkowymi, izolatami tych białek, koncentratami tych białek, permeatem serwatki lub permeatem mleka, tłuszczem roślinnym, tłuszczem mlecznym, witaminami lub solami mineralnymi, lub mieszaninami skomponowanymi z tych składników.

Korzystnie, oligosacharydy tworzące prebiotyk są rozpuszczone w wodzie razem ze sproszkowanymi odpowiednikami nietłuszczowych składników, względnie tworzą emulsję ze składnikami nietłuszczowymi i tłuszczowymi tych mieszanin.

Korzystnie, preparat prebiotyczny w formie stałego proszku jest mieszany w mieszalniku z innymi składnikami sproszkowanych środków spożywczych w ten sposób, że najpierw wprowadza się 100–200 części masy środka spożywczego lub składników nie oligosacharydowych a następnie, przy włączonym mieszadle, wprowadza się powoli 10–50 części masy oligosacharydów i miesza całość do ujednolicenia składu takiej mieszaniny, a następnie dodaje się powoli kolejne porcje środka spożywczego lub składników nie oligosacharydowych w proporcji od 1:5 do 1:100, zwiększając stopniowo masę uzyskanej

mieszaniny o kolejną porcję sproszkowanego środka spożywczego lub składników nie oligosacharydowych dopiero po dokładnym wymieszaniu wcześniejszej zestawionej mieszaniny.

Korzystnie, składniki mieszanin oligosacharydów z innymi składnikami mają postać sproszkowaną o granulacji do 700 μm, w przypadku mieszanek mlecznych korzystnie 100–250 μm.

Korzystnie, sproszkowane mieszaniny preparatu prebiotycznego ze środkami spożywczymi lub innymi składnikami poddaje się w trakcie mieszania składników procesowi aglomerowania jedną ze znanych metod.

Korzystnie, suche, sproszkowane produkty finalne, zawierające oligosacharydy prebiotyczne z innymi składnikami, mają końcową wilgotność nie przekraczającą 5%.

Przykłady

Ustalenie składu kompozycji dodatku prebiotycznego według wynalazku.

Przebadano wpływ różnych niestrawnych sacharydów dopuszczonych do stosowania w produktach spożywczych na wybrane szczepy bakterii probiotycznych. Pod uwagę wzięto trzy rodzaje oligosacharydów: fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy i ksylooligosacharydy. W badaniach uwzględniono tylko oligosacharydy dostępne komercyjnie. Wymienione grupy oligosacharydów stanowią główne składniki odżywcze dla bakterii jelita grubego. Istotą zaplanowanych eksperymentów były testy porównawcze przeprowadzone w celu wyłonienia kompozycji prebiotyków i ich stężenia, która będzie wyraźnie faworyzowała rozmnażanie się, co najmniej jednego szczepu bakterii probiotycznych. W tym celu zestawiono wymienione rodzaje oligosacharydów w mieszane pary lub jako cały, trójskładnikowy kompleks.

Odniesieniem dla kompozycji prebiotycznych były prebiotyki stosowane pojedynczo, a także kontrola pozytywna na pożywce z dodatkiem glukozy i kontrola negatywna na pożywce pozbawionej jakichkolwiek cukrów.

Metodyka badań

Oligosacharydy

Jako źródło fruktanów wybrano preparat Actilight Fibre 950P, wyprodukowany przez Tereos France (filia Beghin Meiji, znanego producenta FOS). Preparat zawiera fruktooligosacharydy o stopniu polimeryzacji 3–5, przy czym zawartość GF2 – ok. 37%, GF3 – 53% i GF4 – ok. 10%. Czystość preparatu wynosi 95%, a FOS zostały wyizolowane z błonnika buraków cukrowych. Produkowany on jest w formie białego proszku, o dobrej rozpuszczalności w wodzie. Może być wykorzystywany do produkcji produktów mlecznych.

Źródłem galaktooligosacharydów był preparat Vivinal GOS Powder, produkowany przez znaną firmę mleczarską FrieslandCampina Dorno (Holandia). Składa się on z galaktooligosacharydów pochodzenia mlecznego o DP=2-5 – 69%, laktozy – 23%, monosacharydów (glukozy i galaktozy) – 5%. Preparat ma postać bezwonnego, białego proszku, dobrze rozpuszczalnego w wodzie. Jest polecany do wzbogacania produktów mleczarskich.

Źródłem ksylooligosacharydów był preparat XOS-95 Power, produkcji Van Wankum Ingredients, uzyskany z kolb kukurydzianych na drodze hydrolizy enzymatycznej. Oligosacharydy zawarte w tym preparacie mają stopień polimeryzacji 2–9 i wiązania β-1,4 glikozydowe, przy czym oligomery o DP 2–4 stanowią ponad 65%. Czystość preparatu wynosi 95%. Produkt jest zalecany przez producenta do wspierania wzrostu bifidobakterii.

Bakterie testowe

Do badań użyto szczepy *Lactobacillus fermentum* (izolat z kału), *Lb. plantarum* PL 4 (izolowany z napoju fermentowanego DARPRO, Mlekovita), *Lb. casei* 7/14 (izolat z kału), *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* La5 oraz *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20088, *B. longum* supsp. *infantis* Reuter ATCC 15697, *B. bifidum* 456, *B. breve* DSM 20091.

Wszystkie użyte szczepy zostały wyizolowane do ludzi i wykazują właściwości funkcjonalne. Szczepy wyizolowane z kału wykazują właściwości adhezyjne oraz aktywność antybakteryjną wobec bakterii chorobotwórczych. Część szczepów pochodzi ze znanych kolekcji międzynarodowych, w tym kilka jest szeroko znanych ze swoich silnych właściwości prozdrowotnych (*B. lactis* Bb-12, *L. rhamnosus* GG i *L. acidophilus* La5).

Badania optymalizacyjne przeprowadzono dla znanych probiotycznych szczepów bakterii rodzaju *Lactobacillus*, tj. szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG (dalej L4) oraz probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* La5 (dalej L5).

Testy fermentacyjne

Analizę zdolności prebiotycznych stosowanych szczepów przeprowadzano w oparciu o testy fermentacyjne, w których bakterie hodowano w tych samych warunkach i na tych samych pożywkach, stosując jako zmienną doświadczalną rodzaj dodawanego do pożywki oligosacharydu. Pożywką bazową dla hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* była pożywka MRS o składzie (g/L): pepton – 10,0, ekstrakt wołowy – 8,0, ekstrakt drożdżowy – 4,0, węglowodan – 20,0, K2HPO4 – 2,5, **T**ween 80 – 1,0, cytrynian amonu – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu – 0,2 i siarczan manganu – 0,04. Początkowe pH pożywki wynosiło 6,2. Do hodowli bifidobakterii stosowano tę samą pożywkę MRSc, ale z dodatkiem 0,5 g/L L-cysteiny, jako czynnika wiążącego tlen.

Jako węglowodany zastosowano: fruktooligosacharyd (FOS), galaktooligosacharyd (GOS), ksylooligosacharyd (XOS), mieszaninę FOS+GOS, mieszaninę FOS+XOS, mieszaninę GOS+XOS, mieszaninę FOS+GOS+XOS. Kontrolę pozytywną stanowiła pożywka z D-glukozą, a kontrolę negatywną pożywka MRS bez żadnego cukru. Wszystkie węglowodany dodawano w stężeniu 20 g/L. W ten sposób powstało 9 pożywek różniących się jedynie rodzajem dodanego węglowodanu.

W celu przygotowania inoculum przeprowadzono 48 godzinne hodowle testowych szczepów w temperaturze 37°C na pożywce agarowej pełnej MRS na płytkach Petriego. Hodowle były prowadzone w warunkach beztlenowych w pojemnikach z wkładem AnaeroPack (Mitsubishi Gas Chemical America). Następnie zebrano ezą komórki i zaszczepiono nimi brzeczkę MRS w falkonach o poj. 15 ml. Kultury wgłębne bakterii testowych były hodowane w temp. 37°C. Hodowle testowe kultur *Lactobacillus* p. hodowano przez 24 h, natomiast hodowle bifidobakterii przez 48 godzin. Po zakończeniu hodowli brzeczki intensywnie mieszano i pobierano próbki do oznaczenia liczebności komórek. Uzyskane kultury poszczególnych szczepów testowych służyły jako kultury inokulacyjne do posiewu pożywek z dodatkiem oligosacharydów stosowanych w testach fermentacyjnych.

Pożywki testowe (wszystkie 9 pożywek) po rozlaniu do falkonów o poj. 10 ml, były sterylizowane w temp. 121°C przez 15 min, schłodzone do 37°C i zaszczepiane po 0,2 ml poszczególnymi kulturami inokulacyjnymi. Fermentacje testowe były prowadzone w trzech powtórzeniach w warunkach identycznych, jak kultury inokulacyjne: 24/48 h, temp. 37°C, warunki beztlenowe.

Oznaczanie liczebności komórek

Liczebność komórek bakteryjnych określano dwoma metodami: przez pomiar zmętnienia pożywki (gęstość optyczna; optical density; OD_{600}) oraz metodą posiewową przez liczenie jednostek tworzących kolonie. Zmętnienie pożywki oznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy dł. światła 600 nm. W tym celu pobierano 10 ml pożywki hodowlanej, odwirowywano komórki przy 10000 g, zlewano supernatant, a komórki ponownie zwieszano w takiej samej ilości wody destylowanej. Pomiary wykonywano po 5-krotnym rozcieńczeniu zawiesiny komórkowej w wodzie.

Przy oznaczaniu liczebności komórek metodą posiewową, po zakończeniu fermentacji z każdego falkonu pobierano po 1 ml kultury, przeprowadzano dziesiętne rozcieńczenia i wysiewano je po 0,1 ml na płytki Petriego z agarem MRS (Graso, Polska) w celu przeprowadzenia pomiaru liczebności populacji komórek w poszczególnych kulturach. Płytki z pałeczkami mlekowymi inkubowano w temp. 37°C przez 48 h, natomiast hodowle bifidobakterii prowadzono przez 72 h w temp. 37°C, w pojemnikach z atmosferą beztlenową. Po zakończeniu hodowli przeprowadzano liczenie kolonii wyrośniętych na płytkach i na tej podstawie, uwzględniając dziesiętne rozcieńczenia, obliczano liczebność komórek w fermentacjach testowych. Wyniki wyrażano w jtk/mL (jednostki tworzące kolonie w przeliczeniu na 1 mililitr kultury bakteryjnej; *ang. CFU/mL*).

Testowane kompozycje dodatków

W badaniach wykorzystano różne składy mieszanin trójskładnikowych.

Przetestowano dwa warianty eksperymentalne różniące się sumarycznym stężeniem badanych komponentów. Pierwszy wariant eksperymentalny zakładał przygotowanie 16 różnych mieszanin składników o sumarycznym stężeniu komponentów wynoszącym 2%. W drugim wariancie również przygotowano 16 mieszanin, w których sumaryczne stężenie komponentów wynosiło 3%. Graniczne wartości stężeń badanych komponentów ustalono na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań wstępnych.

Plan eksperymentu przedstawiono w tabeli 1 dla dawki 2% oligosacharydów i w tabeli 2 dla dawki 3% sacharydów.

Tabela 1. Składy mieszanin eksperymentalnych dla dodatku stanowiącego 2% składu pożywki hodowlanej.

	FOS	GOS	XOS	SUMA kontrolna
	A:A	B:B	C:C	A+B+C
	%	%	%	%
1	0,5	0,75	0,75	2
2	1	0,5	0,5	2
3	0,708333	0,583333	0,708333	2
4	0,5	0,75	0,75	2
5	0,75	0,5	0,75	2
6	0,583333	0,833333	0,583333	2
7	0,5	1	0,5	2
8	0,833333	0,583333	0,583333	2
9	1	0,5	0,5	2
10	0,583333	0,583333	0,833333	2
11	0,5	0,5	1	2
12	0,75	0,75	0,5	2
13	0,5	0,5	1	2
14	0,75	0,5	0,75	2
15	0,5	1	0,5	2
16	0,708333	0,708333	0,583333	2

Tabela 2. Składy mieszanin eksperymentalnych dla dodatku stanowiącego 3% składu pożywki hodowlanej

Próba	FOS	GOS	XOS	SUMA kontrolna
	%	%	%	%
1	1,125	0,75	1,125	3
2	2	0,5	0,5	3
3	1,125	1,125	0,75	3
4	1,25	0,5	1,25	3
5	0,75	0,75	1,5	3
6	0,75	1,5	0,75	3
7	0,5	0,5	2	3
8	0,5	0,5	2	3
9	1,25	1,25	0,5	3
10	0,5	1,25	1,25	3
11	0,5	2	0,5	3
12	0,5	2	0,5	3
13	0,5	1,25	1,25	3
14	1,25	0,5	1,25	3
15	1,5	0,75	0,75	3
16	2	0,5	0,5	3

Wyniki poszczególnych eksperymentów dla szczepu L4, gdzie w pożywce zastosowano 2% dodatek prebiotyków przedstawiono w tabeli 3. Oligosacharydy podano w różnych proporcjach wyznaczonych przez program statystyczny. Pożywki zawierały fruktooligosacharydy (Component 1; A), galaktooligosacharydy (Component 2; B) i ksylooligosacharydy (Component 3; C).

Tabela 3. Gęstość populacji komórek L4 w hodowlach testowych na pożywkach zawierających 2% dodatek oligosacharydów

	FOS	GOS	XOS	Wynik
Próba	%	%	%	OD600nm
1	0,5	0,75	0,75	0,82
2	1	0,5	0,5	0,91
3	0,708333	0,583333	0,708333	0,189
4	0,5	0,75	0,75	0,82
5	0,75	0,5	0,75	0,821
6	0,583333	0,833333	0,583333	0,98
7	0,5	1	0,5	0,93
8	0,833333	0,583333	0,583333	0,96
9	1	0,5	0,5	0,9
10	0,583333	0,583333	0,833333	0,1
11	0,5	0,5	1	0,93
12	0,75	0,75	0,5	0,94
13	0,5	0,5	1	0,91
14	0,75	0,5	0,75	0,821
15	0,5	1	0,5	0,91
16	0,708333	0,708333	0,583333	0,92

Uzyskane wyniki eksperymentalne poddano analizie statystycznej, w ramach której wyliczono funkcję zmiany gęstości optycznej w zależności od udziału w mieszaninie składnika B oraz C, przy stałym poziomie składnika A=0,5%. Następnie wyznaczono ekstremum funkcji opisującej płaszczyznę odpowiedzi w oparciu o ustalony model regresji. Optymalnej kombinacji komponentów poszukiwano w pełnym zakresie zmienności badanych komponentów, nadając każdemu z nich jednakową wagę. W rezultacie przeprowadzonej analizy wyznaczono optymalna mieszaninę o składzie przedstawionym w tabeli 4. Podane wartości odpowiadają zawartości procentowej poszczególnych składników w pożywce.

Tabela 4. Wyniki optymalizacji składu mieszaniny prebiotyków dla szczepu L. rhamnosus GG przy 2% dodatku oligosacharydów

FOS	GOS	XOS	(OD600nm)
0,774869974	0,646236356	0,57889367	0,990840687

Kolejnym etapem badań były testy fermentacyjne z użyciem pożywek zawierających dodatek 3% oligosacharydów podanych w różnych wzajemnych proporcjach, opisanych w Tabeli 5. Porównując zmętnienie pożywek (OD_{600}) zawierających 2% oligosacharydów (Tabela 3), ze zmętnieniem pożywek zawierających 3% oligosacharydów (Tabela 5) widoczny jest znacznie lepszy wzrost bakterii na pożywce o większej zawartości oligosacharydów, które pełniły rolę głównego źródła węgla i energii dla hodowanego mikroorganizmu. Zależność ta jest zależnością oczekiwaną i zgodną z prawidłowościami występującymi w hodowlach drobnoustrojów.

Tabela 5. Gęstość populacji komórek *Z. rhamnosus* GG w hodowlach testowych na pożywkach zawierających 3% dodatek oligosacharydów

	FOS	GOS	XOS	Wynik
Próba	A:A	B:B	C:C	OD (600nm)
	%	%	%	
1	1,125	0,75	1,125	0,82
2	2	0,5	0,5	0,87
3	1,125	1,125	0,75	0,86
4	1,25	0,5	1,25	0,91
5	0,75	0,75	1,5	0,86
6	0,75	1,5	0,75	0,89
7	0,5	0,5	2	0,83
8	0,5	0,5	2	0,81
9	1,25	1,25	0,5	0,89
10	0,5	1,25	1,25	0,93
11	0,5	2	0,5	0,88
12	0,5	2	0,5	0,85
13	0,5	1,25	1,25	0,91
14	1,25	0,5	1,25	0,93
15	1,5	0,75	0,75	0,96
16	2	0,5	0,5	0,89

Uzyskane wyniki eksperymentalne poddano, podobnie jak poprzednio, analizie statystycznej i w oparciu o jej wyniki ustalono skład optymalnej kompozycji prebiotyku, najkorzystniejszej dla wzrostu populacji komórek bakteryjnych. Przeprowadzone badania wykazały, że najkorzystniejszą kompozycją prebiotyku dla stymulowani wzrostu *L. rhamnosus* GG w hodowlach testowych na pożywkach zawierających 3% dodatek oligosacharydów jest skład dodatku: 0,5% fruktooligosacharydów, 1,35% galaktooligosacharydów i 1,14% ksylooligosacharydów.

Kolejnym testowanym szczepem był *Lactobacillus acidophilus* La5 (w skrócie L5). Jest to znany, bezpieczny, szeroko przebadanych szczep probiotyczny, stosowany jako składnik probiotycznych środków spożywczych i suplementów diety, a także probiotycznych formulacji farmaceutycznych. Biorąc pod uwagę jego znaczenie dla przemysłu spożywczego przeprowadzono badania mające na celu określenie najkorzystniejsze stężenia dla poszczególnych składników oligosacharydowych. Przeprowadzono 16 hodowli bakterii, stosując układ składnikowy przedstawiony w Tabeli 6. Jako kryterium oceny aktywności prebiotycznej zastosowanych oligosacharydów przyjęto ilościowy wzrost populacji bakterii mierzony zmętnieniem pożywki oznaczonym pomiarem gęstości optycznej (OD_{600}) przy dł. fali 600 nm.

Tabela 6. Gęstość populacji komórek L5 w hodowlach testowych na pożywkach zawierających 2% dodatek oligosacharydów.

	FOS	GOS	XOS	Wynik
Próba	A:A	B:B	C:C	OD (OD600nm)
	%	%	%	---
1	0,5	0,75	0,75	1,28
2	1	0,5	0,5	1,33
3	0,708333	0,583333	0,708333	1,34
4	0,5	0,75	0,75	1,28
5	0,75	0,5	0,75	1,3
6	0,583333	0,833333	0,583333	1,32
7	0,5	1	0,5	1,33
8	0,833333	0,583333	0,583333	1,31
9	1	0,5	0,5	1,31
10	0,583333	0,583333	0,833333	1,28
11	0,5	0,5	1	1,25
12	0,75	0,75	0,5	1,36
13	0,5	0,5	1	1,22
14	0,75	0,5	0,75	1,22
15	0,5	1	0,5	1,31
16	0,708333	0,708333	0,583333	1,32

Optymalne kompozycje oligosacharydów dla wzrostu bakterii *L. acidophilus* La5 przy 2% dodatku sacharydów przedstawiono w Tabeli 7. Optymalną kompozycją aoligosacharydów dla wzrostu tego szczepu okazała się mieszanina 0,74% fruktooligosacharydów, 0,76% galaktooligosacharydów i 0,5% ksylooligosacharydów.

Tabela 7. Wyniki optymalizacji składu mieszaniny prebiotyków dla szczepu L5 przy ich 2% dodatku

FOS	GOS	XOS	OD600nm
0,743	**0,7569**	**0,5**	1,348187711

Przeprowadzono również cykl fermentacji eksperymentalnych z użyciem pożywek zawierających 3% dodatek składników prebiotycznych. Układ eksperymentalny i wyniki z pomiarów zmętnienia pożywek (gęstości optycznej) przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Gęstość populacji komórek L5 w hodowlach testowych na pożywkach zawierających 3% dodatek oligosacharydów

	Component 1	Component 2	Component 3	Response 1
Run	A:A	B:B	C:C	Optical density (600nm)
	%	%	%	
1	1,125	0,75	1,125	1,32
2	2	0,5	0,5	1,33
3	1,125	1,125	0,75	1,36
4	1,25	0,5	1,25	1,33
5	0,75	0,75	1,5	1,29
6	0,75	1,5	0,75	1,35
7	0,5	0,5	2	1,21
8	0,5	0,5	2	1,2
9	1,25	1,25	0,5	1,34
10	0,5	1,25	1,25	1,31
11	0,5	2	0,5	1,37
12	0,5	2	0,5	1,39
13	0,5	1,25	1,25	1,29
14	1,25	0,5	1,25	1,37
15	1,5	0,75	0,75	1,33
16	2	0,5	0,5	1,37

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła ustalić optymalny skład dodatku. Wyniki optymalizacji kompozycji oligosacharydów faworyzujących wzrost bakterii *L. acidophilus* La5, prezentowane w Tabeli 9, wskazują na uzyskanie maksymalnej gęstości komórek przy wysoki, stężeniu galaktooligosacharydów.

Tabela 9. Wyniki optymalizacji składu mieszaniny prebiotyków dla szczepu *L acidophilis* La5 przy ich 3% dodatku

FOS	GOS	XOS	OD 600nm
0,5	2	0,5	1,377089452

Podsumowując przeprowadzone badania należy stwierdzić, że matematyczna analiza danych pozwoliła na przygotowanie regresyjnych modeli matematycznych dobrze dopasowanych do rzeczywistych zależności między badanymi zmiennymi niezależnymi (zawartość poszczególnych składników dodatku) i wskaźnikiem obrazującym rzeczywisty wzrost populacji bakteryjnych (OD_{600}).

W efekcie otrzymano optymalne, zweryfikowane eksperymentalnie, składy dodatku prebiotycznego stymulujące wzrost wybranych bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* sp. Przykładowe realizacje zostały podsumowane w Tabeli 10.

Tabela 10. Zbiorcze zestawienie optymalnych kompozycji oligosacharydów dla wybranych szczepów bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* sp.

Szczep bakterii	2% dodatek oligosacharydów			3% dodatek oligosacharydów		
	FOS	GOS	XOS	FOS	GOS	XOS
L. rhamnosus	0,8	0,6	0,6	0,5	1,4	1,1
L. acidophilus	0,74	0,75	0,5	0,5	2	0,5

Nieoczekiwanie, kluczowymi składnikami prebiotycznymi okazały się fruktooligosacharydy i galaktooligosacharydy. Dane przedstawione w Tabeli 10 wskazują dodatkowo na wpływ całkowitej dawki oligosacharydów na optymalny składu preparatu. Te nieregularności odnotowano dla obu szczepów pałeczek mlekowych.

W przypadku obu badanych szczepów probiotycznych najmniejszy udział w zoptymalizowanych kompozycjach miały ksylooligosacharydy.

Ostatecznie zoptymalizowane kompozycje oligosacharydów FOS : GOS : XOS dla stymulacji wzrostu bakterii *L. rhamnosus* GG wynoszą 17–38% FOS, 32–45% GOS i 30–38% XOS, a dla stymulacji bakterii *L. acidophilus* La5 kształtują się jak 17–37% FOS, 37–67% GOS i 17–25% XOS. Biorąc pod uwagę całość przeprowadzonych badań nad rolą poszczególnych pojedynczych składników oraz ich kompozycji dwu- i trójskładnikowych oraz badania optymalizacyjne przeprowadzone dla dwóch najważniejszych szczepów probiotycznych, można stwierdzić, że uniwersalną kompozycją składnikową oligosacharydów FOS:GOS:XOS, przeznaczoną do stymulacji wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, jest dodatek zawierający w swojej masie 15–40% fruktooligosacharydów, 15–65% galaktooligosacharydów oraz 15–35% ksylooligosacharydów, a wymagana sumaryczna dawka tych oligosacharydów przeliczeniu na masę mieszanki mlecznej powinna wynosić 0,5–1% w/w.

Proponowana technologia wzbogacania mieszanek mlecznych obejmuje wprowadzenie oligosacharydów w formie sypkich składników do mieszalnika, razem z innymi składnikami, w proporcjach podanych powyżej, w łącznej ilości 0,5–1% w/w w stosunku do całkowitej masy mieszanek mlecznych.

Produkcja mieszanek mlecznych, polegająca na mechanicznym wymieszaniu odważonych składników, przebiega w warunkach mało stresowych. Składniki prebiotyczne, wprowadzone do mieszanek w formie sproszkowanych oligosacharydów, nie są narażone ani na ekstremalną temperaturę, ani na czynniki utleniające, ani na skokowe zmiany pH, czy inne niekorzystne czynniki. Można więc mówić o zachowaniu całości wprowadzonych oligosacharydów w formie czynnej i niezmienionej ilościowo. Jest to o tyle ważne, że badania naukowców tureckich wskazują na możliwość wystąpienia dużych strat prebiotyków w trakcie obróbki żywności, na przykład w procesie ekstruzji surowców zbożowych, czy przy niskim pH (3,0–4,0) w napojach niegazowanych (Duar i in. 2015). W warunkach produkcyjnych

przewidzianych w projekcie straty oligosacharydów można pominąć, a więc opracowane formuły kompozycji trójskładnikowych są ostateczne i powinny spełnić swoją rolę w mieszance mlecznej, czyli stymulować wzrost bakterii jelitowych z rodzaju *Lactobacillus*.

Podsumowanie

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że wzrost szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* najsilniej stymuluje dodatek galaktooligosacharydów, natomiast wzrost bifidobakterii stymulują zarówno fruktooligosacharydy, jak i galaktooligosacharydy.

Silnym stymulatorem bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest także trójskładnikowa mieszanina, w skład której wchodzą fruktooligosacharydy o DP=3–5, galaktooligosacharydy o DP=2–8 i ksylooligosacharydy o DP=2–9.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na występowanie efektu synergii między poszczególnymi składnikami trójskładnikowego preparatu prebiotycznego.

Mieszaniny dwuskładnikowe i trójskładnikowe silniej stymulują wzrost bakterii *Lactobacillus* sp., niż B*ifidobacterium*.

Wykazano, że najkorzystniejszą kompozycją prebiotyczną dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest preparat, składający się z 15–40% fruktooligosacharydów, 15–65% galaktooligosacharydów i 15–35% ksylooligosacharydów.

Największą aktywność prebiotyczną dla szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG wykazuje formuła 17–38% FOS, 32–45% GOS i 30–38% XOS.

Największą aktywność prebiotyczną dla szczepu *Lactobacillus acidophilus* La5 wykazuje formuła 17–37% FOS, 37–67% GOS i 17–25% XOS.

Piśmiennictwo

1. Acevedo-Martinez E, Gutierrez-Cortes C, Garcia-Mahecha M, Diaz-Moreno C. Evaluation of viability of probiotic bacteria in mango (Mngifera indica L Cv. “Tommy Atkins”) beverage. Dyna 85(207), 84–92, 2018.
2. Adams CA, Gutierrez B: Human milk oligosaccharides: the first prebiotics. Acta Scientific Nutritional Health 3(12), 172–175, 2019
3. Arshad NH, Zaman SA, Rawi MH, Sarbini SR.: Resistant starch evaluation and in vitro fermentation of *lemantak* (native sago starch), for probiotic assessment. International Food Research Journal 25(3), 951–957, 2018.
4. Belorkar SA, Gupta AK.: Oligosaccharides: a boon from nature’s desk. AMB Express 6, 82, 1–11, 2016.
5. BeMiller JN.: Oligosaccharides. In: Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition).pp. 49–74, AACC, Elsevier Inc., 2019.
6. Bindels LB, Delzenne N, Cani PD, Walter J: Towards a more comprehensive concept for probiotics. National Review of Gastroenterology and Hepatology, 12(5), 303–310, 2015.
7. Chen H, Chen S, Chen H, Wu Y, Shu G., Effect of carbon source and prebiotics added to growth media on proliferation and survival of *Lactobacillus bulgaricus* LB6 during freeze-drying. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6(6), 894–899, 2014.
8. Costa EL, Alencar NMM, dos Santos Rullo BG, Taralo RL: Effect of green banana pulp on physicochemical and sensory properties of probiotic yoghurt. Food Science and Technology 37(3), 1–9, 2017.
9. De Man JD, Rogosa M, Sharpe ME: A medium for the cultivation of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology 23, 130–135. 1960.
10. De Souza Aquino J, Batista KS, Menezes FNDD, Lins PP, de Sousa Gomes JA, da Silva LA: Models to evaluate the prebiotic potential of foods. In: Functional Food – Improve Health through Adequate Food, Ch 12, pp. 235–256, 2016, DOI: 10.5772/ intechopen.69174.
11. Dominguez AL, Rodrigues LR, Lima NM, Teixeira JA: An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. Food Bioprocess Technology 6(12), 2013. DOI 10.1007/sl 1947-013-1221-6.
12. Duar RM, Ang PT, Hoffman M, Wehling R, Hutkins R, Schlegel V.: Processing effects on four prebiotic carbohydrates supplemented in an extruded cereal and a low pH drink. Cogent Food and Agriculture 1, 1013782, 2015.

13. Ehara T, Izumi H, Tsuda M i in. Combinational effects of prebiotic oligosaccharides on bifidobacterial growth and host gene expression in a simplified mixed culture model and neonatal mice. British Journal of Nutrition 116(2), 270–278, 2016.
14. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization – World Health Organization. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Available from: ftp://ftp.fao.org/ es/esn/food/wgreport2.pdf
15. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization – World Health Organization. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Nutrition Paper 85. 2006. Available from: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf
16. FAO-WHO. Food and Agriculture Organization – World Health Organization. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Available from: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf
17. Fehlbaum S, Prudence K, Kieboom J i in.; In vitro fermentation of selected prebiotics and their effects on the composition and activity of the adult gut microbiota. International journal of Molecular Sciences 19, 3097, 2018.
18. Figueroa-Gonzales I, Rodroguez-Serrano G, Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Cruz-Guerrero A: Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. Food Science and Technology Campinas 39(3), 747–753, 2019.
19. Finegold SM, Li A, Summanen PH, Downes J i in.: Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. Food and Function 5(3), 403–614, 2014.
20. Gałązka I, Klewicki R, Śliżewska K.: Zdolność wybranych szczepów *Lactobacillus* sp. do fermentowania oligosacharydów i oligopolioli o zróżnicowanym stopniu polimeryzacji. Żywność 2(35), 28–37, 2003.
21. Ghoddusi H, Hassan K: Selective enumeration of Bifidobacteria: a comparative study. Milchwissenschaft 66(2), 149–151, 2011.
22. Gibson GR, Rastall RA.: Prebiotics: development and application. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Chichester, England, 2006.
23. Grimaldi R, Swann JR, Vulevic J, Gibson GR, Costabile A.: Fermentation properties and potential prebiotic activity of Bimuno® galacto-oligosaccharide (65% galacto-saccharide content) on in vitro gut microbiota parameters. British Journal of Nutrition 116(3), 480–486, 2016.
24. Gueimonde M, Salminen S.: New methods for selecting and evaluating probiotics. Digestive and Liver Disease 38(2), 242–247, 2006.
25. Gustaw W, Kordowska-Wiater M, Kozioł J.: The influence of selected probiotics on the growth oflactic acid bacteria for bio-yoghurt production. Acta Scientiarum Polonorum Technol. Aliment. 10(4), 455–466, 2011.
26. Hingu MN, Shah HS: Review: role of galactooligosaccharides as prebiotic. The Microbes 5(11), 15–29, 2013.
27. Hong KB, Kim JH, Kwon HK, Han SH, Park Y, Suh HJ: Evaluation of prebiotic effects of high-purity galactooligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. Food Technology and Biotechnology 54(2), 156–163, 2016.
28. Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L i in.: Microbial characterization of probiotics – advisory report of the Working Group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). Molecular and Nutritional Food Research 57, 1479–1504, 2013.
29. Ibrahim OO: Functional oligosaccharides: chemicals structure, manufacturing, health benefits, applications and regulations. Journal Food Chemistry and Nanotechnology 4(4), 65–76, 2018.
30. Ivanowska TP, Zhivikj Z, Mladenovska K, Petrushevska-Tozi L; Influence of oligofructose-enriched inulin on survival of microencapsulated Lactobacillus casei 01 and adhesive properties of symbiotic microparticles. Macedonian Pharmaceutical Bulletin 61(1), 35–43, 2015.
31. Jach M, Łoś R, Maj M, Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. Postępy Mikrobiologii 52(2), 161–170, 2013.

32. Janovic-Malinovska R, Kuzmanova S, Winkelhausen E. Oligosaccharide profile in fruit and vegetables as sources of prebiotics and functional foods. International Journal of Food Properties 17(5), 949–965, 2014.
33. Kailasapathy CIK.: Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. Food Microbiology and Safety 70(1), 18–23, 2005.
34. Kaplan H, Hutkins RW: Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria, Applied and Environmental Microbiology 66(6), 2682–2684.
35. Kim H-J, Shin SI, Lee S-J, Moon TW, Lee Ch. J.: Screening and selection of *Bifidobacterium* strains isolated from human feces capable of utilizing resistant starch. Journal of the Science of Food and Agriculture 98, 5901–5907, 2018.
36. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR: Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition 87(2), 193–197, 2002.
37. Kulczyński B, Gramza-Michałowska A.: Właściwości prozdrowotne fruktanów typu inuliny. Medycyna Rodzinna 19(2), 86–90, 2016.
38. Kunova G, Rada V, Lisova I, Rockova S, Vlkova E.: On vitro fermentability of prebiotic oligosaccharides by *Lactobacilli.* Czech Journal of Food Science 29, S49-S54, 2011.
39. Kutz MGF, Fiates GMR, Teixeira E: Characteristics of prebiotic food products containing inulin. British Food Journal 115(2), 235–251, 2013.
40. Lecerf J-M, Depeint F, Clerc E, Dugenet Y.: Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone shows prebiotic properties. British Journal of Nutrition 108(1), 1847–1858, 2012.
41. Lin S-H, Chou L-M, Chien Y-W, Chang J-S, Lin Ch-I: Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. Gastroenterology Research and Practice, 1–6, 2016 DOI 10.1155/2016/5789232.
42. Liu F, Li P, Chen M i in.: Fructooligosaccharide (FAS) and galactooligosaccharide (GOS) increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism in healthy young population. Scientific Reports, 7, 11789, DOI: 10.1038/s41598-017-10722-2.
43. Mao B, Li D, Liu X, Chen YQ, Zhang H, Chen W: In vitro fermentation of oligosaccharides with human bacteria. Food Function 6(3), 947–954, 2015.
44. Martinez RCR, Cardarelli HR, Borst W, Albrecht S i in.: Effect of galactooligosaccharides and Bifidobacterium animalis Bb-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698, microbial community structure, and metabolite production in an in vitro colonic model set up with human or pig microbiota. FEMS Microbiology and Ecology 84, 110–123, 2013.
45. Mattila-Sandholm T, Blum S, Collins JK, Crittenden R, de Vos W i in.: Probiotics: towards demonstrating efficacy. Trends in Food Science and Technology 10, 393–399, 1999.
46. Monteagudo-Mera A, Arthur JC, Jobin C, Keku T i in.: High purity galacto-oligosaccharides (GOS) enhance specific Bifidobacterium species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. Beneficial Microbes 7(2), 247–264, 2016.
47. Morais RMSC, Morais AMMB, Dammak I, Bonilla J i in. Functional drhydrated foods for health preservation. Hindawi Journal of Food Quality, pp 1–29, Article ID 1739636, 2018.
48. Mtasher AS, Abdulhussein AJ, Mutlag SH: Probiotics and prebiotics. International Journal of Current Research, 10(11), 75341-75352, 2018.
49. Mumcu AS, Temiz A.: Effect of prebiotics on growth and acidifying activity of probiotic bacteria. GIDA 39(2), 71–77, 2014.
50. Musilova S, Rada V, Marounek M i in: Prebiotic effects of a novel combination of galactooligosaccharides and maltodextrins. Journal of Medicinal Food 18(6), 685–689, 2015.
51. Nilegaonkar S, Agte V.: Prebiotics. Ch. 27. In: Comprehensive Food Fermentation Technology Eds Pandey A, Soccol CS, Lorroche C, Gnansounou E, Singh P., pp. 839–660, Asiatech Publishers Inc., 2010.
52. Office of Food Additive Safety (HFS-255), Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA, 7.01.2016.
53. Okazaki M, Fujikawa S, Matsumoto N: Effect of xylooligosaccharides on the growth of bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora 9(2), 77–86, 1990.

54. Oku T, Nakamura S: Fructooligosaccharide: metabolism through gut microbiota and prebiotic effect. Food and Nutrition Journal 2, 128, 2017, DOI: 10.29011/2575-7091:100028.
55. Oliviera RPS, Casazza AA, Aliakbarian B i in. Influence of fructooligosacharides on the fermentation profile and viable counts in a symbiotic low fat milk. Brazilian Journal of Microbiology 44(2), 431–434, 2013.
56. Padalino M, Perez-Conesa D, Lopez-Nicolas R, Frontela-Saseta C, Ros-Berruezo G.: Effect of fructooligosaccharides and galactoolgosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk. International Dairy Journal 27, 27–33, 2012.
57. Penksza P, Banka Z, Szilard K i in.: Utilization of xylo-oligosaccharides as prebiotics in yoghurt. Journal of Hygienic Engineering and Design, 22, 66–71, 2018.
58. Quigley EMM: Microbiome-directed therapies: past, present and future. Prebiotics and probiotics in digestive healt. Clinical Gastroenterology and Hepatology 17, 333–344, 2019.
59. Roberfroid M: Prebiotics: the concept revisited. Journal of Nutrition, 137, 830–837, 2007.
60. Rossi M, Corradini C, Amaretti Z i in.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Applied and Environmental Microbiology 71(10), 6150–6158, 2005.
61. Salavati Schmitz S, Allenspach K.: Effects of different oligosaccharides on growth of selected probiotic bacterial strains. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 9(2), 572–576, 2017.
62. Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R.: Probiotic for human use. Nutrition Bulletin 43, 212-225, 2018.
63. Schwab C, Gaenzle M: Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactosaccharides. FEMS Microbiology Letters 315, 141-148, 2011.
64. Sharma A, Jana AH, Chavan RS.: Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications - a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11, 518-528, 2012.
65. Silva PB, Garcia S, Baldo C, Celligoi MAPC: Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by Bacillus substilis NATTO CCT 7712. Acta Alimentaria 46(2), 145–151, 2017.
66. Singh RS, Singh RP.: Production of fructooligosaccharidesfrom inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. Food Technology and Biotechnology 48(4), 435–450, 2010.
67. Slavin J: Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. Nutrients 5, 1417–1435, 2013.
68. Sliżewska K, Nowak A, Barczyhska R, Libudzisz Z: Prebiotyki-definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. Żywność Nauka Technologia Jakość 1(86), 5–20, 2013.
69. Soccol CR, de Souza Vandenberghe LP, Spier MR, Pedroni Medeiros AB i in.: The potential of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology, 48(4), 413–434, 2010.
70. Soral-Smietana M, Wronkowska M, Biedrzycka E, Bielecka M, Ocieka K.: Native and physically-modified starches – utilization of resistant starch by bifidobacteria (in vitro). Polsh Journal of Food and Nutrition Science 14/55 (3), 273-279, 2005.
71. Vulevic J, Juric A, Walton GE, Claus SP.: Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabolomics in elderly persons. British Journal of Nutrition 114(4), 586–595, 2015.
72. Walton GE, van den Heuvel EG, Kosters MH i in.: A randomized crossover study investigating the effects of galactooligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age. British Journal of Nutrition 107(10), 1466–1475, 2016.
73. WGO. Probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organization Global Guidelines. Eds.: GuarnerF i in., pp. 1–35, 2017.
74. Wichienchot S, Hemmaratchirakul J, Jaturapiree P, Pruksari S: Evaluating prebiotic property of galactooligosaccharide produced by Lactobacillus pentosus var. plantarum BFP32 in fecal batch culture. International Food Research Journal 23(5), 2241–2248, 2016.
75. Yang J, Summanen PH, Henning SM i in.: Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: a pilot study. Frontiers in Physiology 6, art. 216, 2015.

76. Yu X, Yin J, Li L, Luan Ch i in.: Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from corn cobs and their in vitro antioxidant activity when combined with Lactobacillus. Journal of Microbiology and Biotechnology 25(7), 1084–1092, 2015.
77. Zhang Y, Wang Y, Zheng B, Lu X, Zhuang W.: The in vitro effects retrograded starch (resistant starch type 3) from lotus seed starch on the proliferation of Bifidobacterium adolescentis. Food and Function 4, 1609–1616, 2013

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja dodatku prebiotycznego do środków spożywczych wspierającego rozmnażanie się probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus sp.*, **znamienna tym**, że stymuluje rozmnażanie probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG i składa się z: 17–38% fruktooligosacharydów, 32–45% galaktooligosacharydów i 30–38% ksylooligosacharydów, przy czym dawka dobowa dodatku wynosi od 1 g do 5 g.
2. Środek spożywczy zawierający dodatek prebiotyczny określony w zastrz. 1.
3. Środek spożywczy według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest produktem mlecznym, korzystnie mieszanką mleczną w proszku.