

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Antibakteriální účinky isoflavonoidů izolovaných ze
sójových fermentovaných produktů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Sochorová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antibakteriální účinky izoflavonoidů izolovaných ze sójových fermentovaných produktů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2019

Poděkování

Děkuji vedoucí své diplomové práce, doc. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D., za trpělivost a odborné vedení mé diplomové práce. Ráda bych touto cestou poděkovala také Ing. Kláře Laloučkové za přátelský přístup a za pomoc v laboratoři. Velké děkuji, patří také mé rodině a příteli za veškerou podporu při studiu.

Antibakteriální účinky izoflavonoidů izolovaných ze sojových fermentovaných produktů

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá studiem antibakteriálních účinků sojových isoflavonoidů, které byly získány ze sojové fermentované pasty doenjang methanолоvou extrakcí. Minimální koncentrace isoflavonoidů, které inhibovaly bakterie a zapříčinily tak 80 % úbytek růstu oproti kontrole, se označují jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). Testováno bylo celkem 10 kmenů methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*: ATCC 29213, ATCC 33591, ATCC 43300, ATCC BAA 976, CCM 6188, CMM 4442, klinický izolát SA 1, klinický izolát SA 2, klinický izolát SA3 a EMRA-15. MIC vyextrahovaných isoflavonoidů byla stanovena *in vitro* mikrodiluční metodou v mikrotitrační destičce s 96 jamkami uspořádaných v 8 řadách po 12 jamkách.

Růst všech testovaných kmenů byl působením isoflavonoidů inhibován. MIC se pohybovaly v rozmezí 2048-4096 $\mu\text{l/ml}$. Nejcitlivější na antibakteriální účinky byl kmen ATCC 43300, jehož růst byl inhibován při koncentraci 2048 $\mu\text{l/ml}$. V přítomnosti isoflavonoidů s koncentrací 2048 $\mu\text{l/ml}$ byl potlačen také růst klinických izolátů SA 1 a SA 2. Při MIC 4096 $\mu\text{l/ml}$ byl inhibován růst 60 % testovaných MRSA kmenů, konkrétně: ATCC 29213, CCM 6188, ATCC 33591, ATCC BAA 976, klinický izolát SA 3 a EMRA-15. Růst CMM 442 byl inhibován v přítomnosti isoflavonoidů o koncentraci 2560 $\mu\text{l/ml}$. Lze konstatovat, že isoflavonoidy sojových fermentovaných produktů vykazují antibakteriální účinek proti MRSA.

Klíčová slova: inhibice, antibiotika, patogeny, mikrobiota, rezistence

Antibacterial effect of isoflavonoids isolated from fermented soy products

Summary

The thesis presented deals with the study of antibacterial effects of soy isoflavonoids, which were obtained from soy fermented paste doenjang by methanol extraction. The minimum concentration of isoflavonoids, that inhibit bacteria and cause an 80% growth loss compared to control, is referred to as the minimum inhibitory concentration (MIC). In total, 10 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were tested: ATCC 29213, ATCC 33591, ATCC 43300, ATCC BAA 976, CCM 6188, CMM 4442, clinical isolate SA 1, clinical isolate SA 2, clinical isolate SA3 and EMRA-15. The MIC of the extracted isoflavonoids was determined *in vitro* by microdilution method in a microtiter plate with 96 pits arranged in 8 rows of 12 pits.

The growth of all tested strains was inhibited by isoflavonoids. MIC values ranged from 2048-4096 $\mu\text{l} / \text{ml}$. The most sensitive to antibacterial effects was strain ATCC 43300, whose growth was inhibited at concentration of 2048 $\mu\text{l} / \text{ml}$. Growth of clinical isolates SA 1 and SA 2 was also suppressed in the presence of isoflavonoids at 2048 $\mu\text{l} / \text{ml}$. At a MIC of 4096 $\mu\text{l} / \text{ml}$, growth of 60% of the tested MRSA strains was inhibited, namely: ATCC 29213, CCM 6188, ATCC 33591, ATCC BAA 976, clinical isolate SA 3 and EMRA-15. Growth of CMM 442 was inhibited in the presence of isoflavonoids at 2560 $\mu\text{l} / \text{ml}$. It can be stated that the isoflavonoids of soy fermented products show an antibacterial effect against MRSA.

Keywords: inhibition, antibiotics, pathogens, microbiota, resistance

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Původ a rozšíření sóji luštinaté	10
3.2	Pěstování	10
3.3	Živinné složení sójových bobů	12
3.4	Antinutriční látky	14
3.4.1	Saponiny	14
3.4.2	Inhibitory proteáz	15
3.4.3	Kyselina fytová	16
3.4.4	Lektiny	17
3.4.5	Puriny	17
3.5	Fermentované sójové výrobky	18
3.5.1	Natto	19
3.5.2	Tempeh	20
3.5.3	Doenjang	21
3.5.4	Miso	23
3.5.5	Sufu	23
3.5.6	Sójová omáčka	24
3.6	Charakteristika isoflavonoidů	25
3.7	Biosyntéza isoflavonoidů	27
3.8	Metody extrakce	28
3.8.1	Mikrovlákná asistovaná extrakce	28
3.8.2	Tlaková extrakce kapalinou	28
3.8.3	Ultrazvuková asistovaná extrakce	29
3.8.4	Superkritická fluidní extrakce	30
3.9	Stanovení isoflavonoidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	30
3.10	Stanovení isoflavonoidů kapilární elektroforézou	31
3.11	Staphylococcus sp.	32
3.11.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus	32
3.12	Antimikrobiální látky	33
3.12.1	Mechanismus účinků antibiotik	33
3.12.2	Antimikrobiální účinky sójových isoflavonoidů	34
3.12.3	Antimikrobiální rezistence	35
3.12.4	Alternativy antibiotik	36
4	Metodika	38

4.1	Teoretická část.....	38
4.2	Praktická část.....	38
4.2.1	Materiál použitý v teoretické části práce	38
4.2.1.1	Bakteriální kmeny.....	38
4.2.1.2	Kultivační média.....	39
4.2.2	Metody použité v praktické části.....	39
4.2.2.1	Methanolová extrakce isoflavonoidů ze sojové pasty doenjang	39
4.2.2.2	Testování antibakteriálních účinků isoflavonoidů získaných z doenjangu ..	39
4.2.2.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	40
5	Výsledky	41
6	Diskuze	43
7	Závěr	46
8	Literatura	47

1 Úvod

Počátek pěstování sóji se datuje do 11. století před naším letopočtem, kdy byla jedním z hlavních zdrojů potravy v asijských zemích. Objevení fermentace umožnilo vznik nových chutí a právě z Asie pochází většina dnes již tradičních fermentovaných pokrmů, jejichž charakteristický vzhled vzniká působením mikroorganismů a jejich enzymů. Kromě velkého významu fermentace v potravinářství má z výživového hlediska vliv i na stravitelnost bílkovin, které jsou během fermentace hydrolyzovány působením enzymů. Zajímavé jsou ale především isoflavonoidy díky své antimikrobiální aktivitě. V sóje se nachází tři hlavní zástupci isoflavonoidů: genistein, daidzein a glycitein. Nejvíce prostudovaným sójovým isoflavonoidem je právě genistein, jehož antibiotická aktivita je přičítána schopnosti inhibovat jak topoizomerázu II tak i proteinovou tyrosinkinázu. Jelikož rezistence bakterií k antibiotikům rychle roste je na místě hledání nových, alterativních přístupů k léčbě bakteriálních infekcí.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou je, že sójové isoflavonoidy izolované ze sójových produktů mají antibakteriální účinek. Cílem diplomové práce bylo stanovit minimální inhibiční koncentrace na enteropatogenní bakterie mikrodiluční metodou.

3 Literární rešerše

3.1 Původ a rozšíření sóji luštinaté

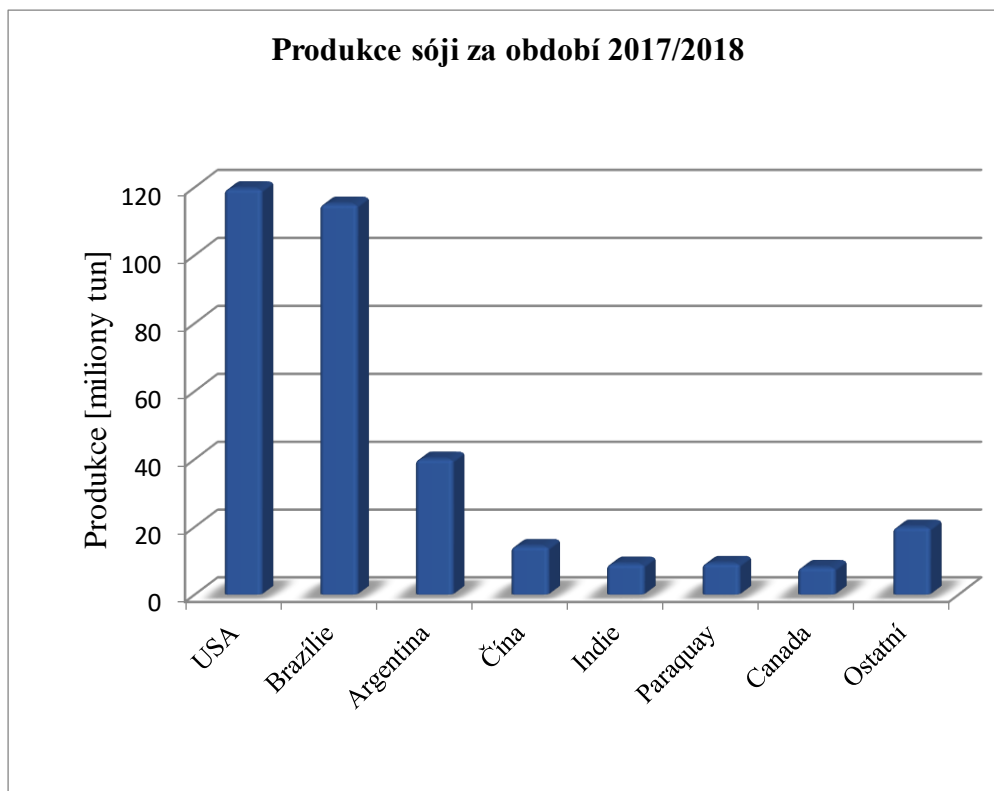
Počátek pěstování sóji se datuje do 11. století před naším letopočtem v severních oblastech dnešní Číny. V Asii byly čerstvé sójové lusky, které se později staly i součástí sušených pokrmů, základním zdrojem potravy (Burton 1997). Za vlády dynastie Chou byla objevena fermentace jako nový způsob úpravy potravin. Fermentované potraviny byly chutnější, lépe stravitelné a staly se tak základem pro vznik dnes již tradičních sójových fermentovaných pokrmů, které se rozšířily do celého světa (Badole & Bodhankar 2013).

Do Evropy byla sója přivezena kolem roku 1700 a do Ameriky o sto let později (Badole & Bodhankar 2013). V Evropě se sóje dařilo v jižních zemích, především v Itálii. V českých zemích byla první snaha o rozšíření sóji v roce 1934, kdy byla pěstována na 1500 ha. Po druhé světové válce se v Československu pěstovala již na ploše 2631 ha. Vzhledem k nízkým výnosům, zapříčiněných klimatickými podmínkami a nevhodnými odrůdami nedošlo na našem území k většímu rozvoji produkce sóji (Flohrová 2001).

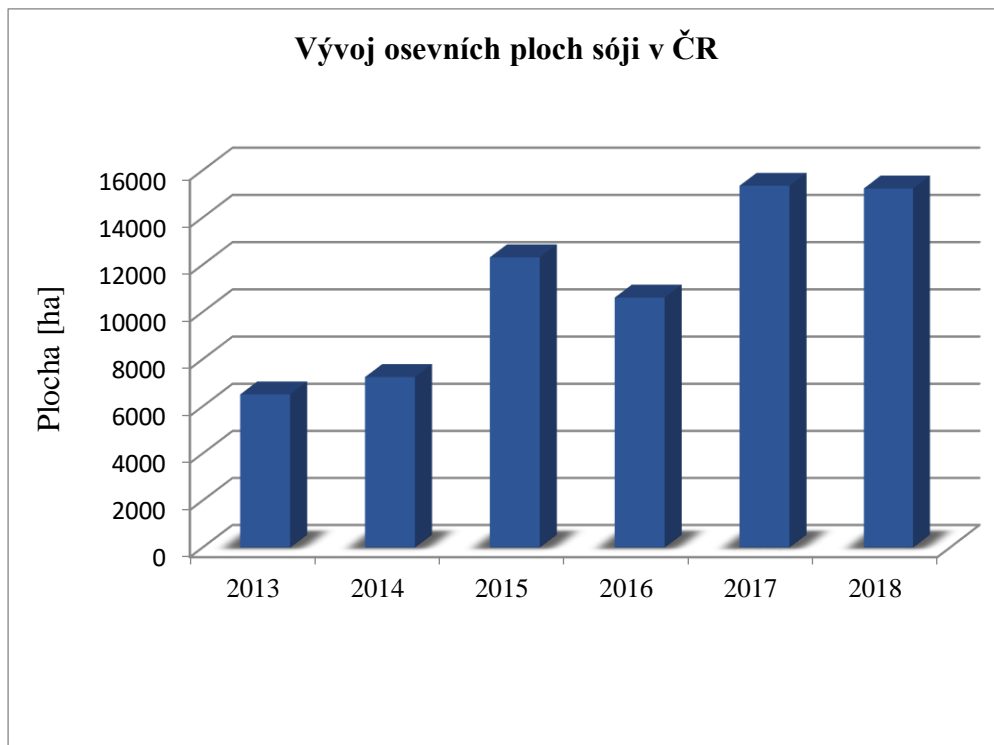
3.2 Pěstování

Vzhledem k nutričním složkám sójových bobů a schopnosti sóji snášet vysoké teploty, hovoří Zhan et al. (2019) o sóje jako o potravině budoucnosti. Obsahuje vysoké procento kvalitních bílkovin, tuků, vitamínů a minerálních látek, které působí pozitivně na lidský organismus. Její konzumace má význam v prevenci osteoporózy, onemocnění srdce a tlumí příznaky spojené s menopauzou (Kalaiselvan et al. 2010).

V současnosti představuje sója více než polovinu pěstovaných olejnatých semen a její produkce neustále roste. Světový trh ovládají čtyři hlavní producenti, kterými jsou Spojené státy americké, Brazílie, Argentina a Čína (Zhan et al. 2019). Za sledované období 2017/2018 bylo vyprodukováno 334,81 milionů tun sóji (Statista 2019a) - viz Graf 1. S globálním oteplováním se rozšiřují i možnosti pro pěstování sóji v zemích, pro které není typickou plodinou. Příkladem je Kanada, ve které vzrostla produkce soji za posledních pět let o 27 % (Gendron St-Marseille et al. 2019). V Kanadě byly také vyšlechtěny odrůdy vhodnější pro pěstování sóji v našem podnebí, kterým se daří v teplejších oblastech České republiky, konkrétně v Polabské nížině a na jižní Moravě v Dolnomoravském a Dyjskosvrateckém úvalu (Flohrová 2001). V současné době se sója pěstuje na ploše 15230 ha (ČSÚ 2019) – viz Graf 2.



Graf 1: Produkce sóji za období 2017/2018 (Statista 2019a)



Graf 2: Vývoj osevních ploch sóji v ČR (ČSÚ 2019)

3.3 Živinové složení sójových bobů

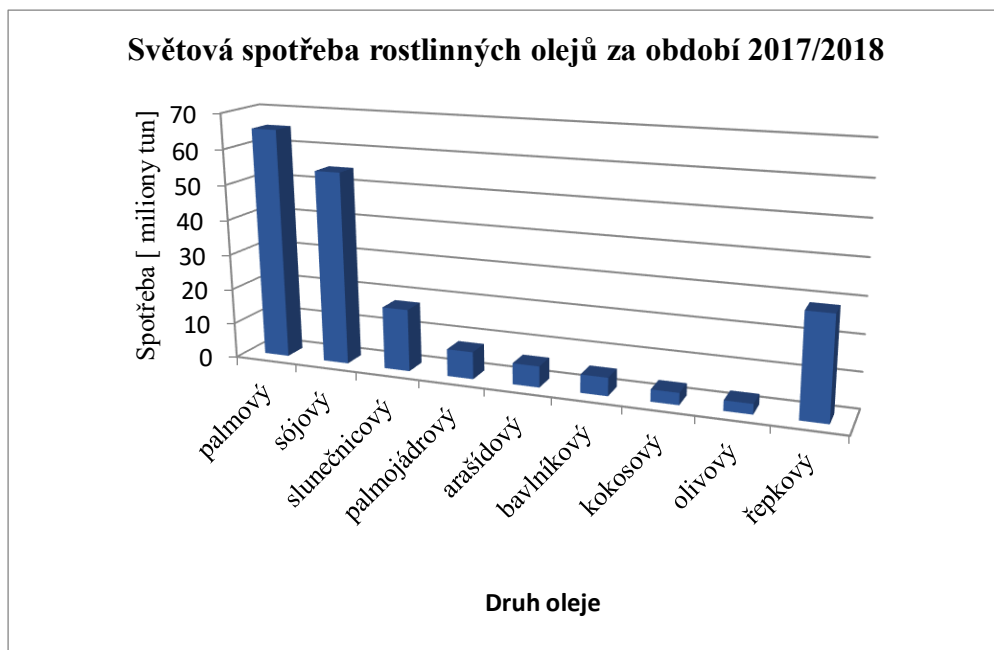
Sójové boby obsahují 36% bílkovin, 30% sacharidů, 19% oleje, 5% vlákniny a popeloviny. Jsou bohatým zdrojem mnoha minerálních látek a vitamínů (Wijewardana et al. 2019) – viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Množství minerálních látek a vitamínů v syrových sójových bobech vztažených na 100g (upraveno dle Vagadia et al. 2017)

Minerály	Hmotnost [mg]
Vápník	277
Železo	15,7
Fosfor	704
Draslík	1797
Hořčík	280
Sodík	0
Zinek	4,89
Vitamíny	Hmotnost [mg]
B ₆	0,3
C	6,0
K	0,04

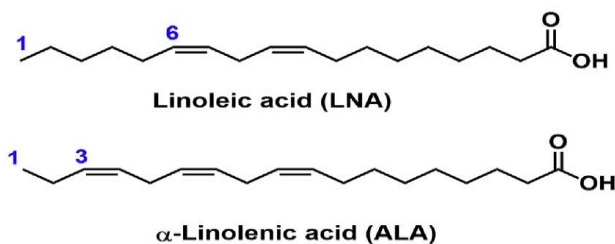
Sójové proteiny svou kvalitou a aminokyselinovým skóre odpovídají živočišným proteinům. Pro lidi, kteří z různých důvodů vynechávají ze svého jídelníčku maso a produkty živočišného původu je tak sója vhodnou náhradou (Guo & Yang 2015). Kromě methioninu, je sója zdrojem esenciálních aminokyselin, které si tělo neumí samo syntetizovat (Friedman & Brandon 2001). Pomocí ultrafiltrace lze sójové proteiny rozdělit na základě molekulové hmotnosti do čtyř frakcí: 2S, 7S, 11S a 15S. V sóje jsou nejvíce zastoupené frakce 7S a 11S. Frakce 7S je zastoupená především β -conglycininem, o molekulové hmotnosti 180-210 kDa, který je tvořen třemi podjednotkami. V menší míře je ve frakci 7S zastoupena lipoxygenáza, β -amyláza a hemaglutinin. Frakci 11S představuje výhradně glycinin, který je tvořen pěti podjednotkami obsahujícími kyselá a bazická polypeptidy (Guo & Yang 2015). Dle Chen et al. (2014) je až 40% sójových proteinů tvořeno právě glycininem.

Spotřeba sójového oleje za období 2017/2018 činila 54, 59 milionů tun a zaujímá tak druhé místo za olejem palmovým (Statista 2019b) – viz Graf 3.



Graf 3: Světová spotřeba rostlinných olejů za období 2017/2018 (Statista 2019b)

Základem oleje jsou triacylglyceroly, obsahující ve své struktuře mastné kyseliny (MK) (Perkins 1995), které jsou zdrojem energie a podílí se na stavbě buněčných membrán. Podle chemické struktury a počtu dvojných vazeb se MK rozdělují do tří skupin na nasycené, obsahující pouze jednoduché vazby a nenasycené MK s jednou, nebo více dvojnými vazbami (El Shatshat et al. 2019). Nasycené MK jsou zastoupené palmitovou (10%) a stearovou kyselinou. 23% MK s jednou dvojnou vazbou tvoří kyselina olejová (Kong et al. 2019). Mastné kyseliny s více dvojnými vazbami se také označují jako polynenasycené neboli PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) a představují 58% všech mastných kyselin v sójovém oleji (Wijewardana et al. 2019). Základem PUFA je uhlovodíkový řetězec, zakončený na jednom konci karboxylovou a na druhém konci methylovou skupinou a podle polohy dvojných vazeb se dělí na omega-3 a omega-6 MK (Visentiny et al. 2019). Hlavním zástupcem omega-3 je s 8% kyselina α -linolenová. Kyselina linolová patří do skupiny omega-6 a v sójovém oleji má s 54% dominantní zastoupení (Wijewardana et al. 2019) – viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Chemická struktura linolové (LNA) a α -linolenové (ALA) kyseliny (El Shatshat et al. 2019)

Nejvýznamnější z rozpustných sacharidů v sóji je sacharóza, která tvoří 25-35% všech sacharidů. Oligosacharidy jsou v sóji zastoupeny galaktooligosacharidy: stachyózou, rafinózou a verbaskózou, které jsou špatně stravitelné a způsobují nadýmání či průjem. Sójové oligosacharidy se mohou uplatnit také jako prebiotika a podporovat imunitní systém (Ma et al. 2017). Celulóza je tvořena glukózovými jednotkami spojených glykosidickou vazbou. Jednotlivé řetězce celulózy jsou vzájemně propojené vodíkovými vazbami a van der Waalsovými silami, které poskytují celulóze určitou odolnost vůči enzymům. Hemicelulózy mají na rozdíl od celulózy nižší molekulovou hmotnost a jsou tvořeny jednotkami xylanu. Celulóza a hemicelulóza jsou společně s pektinem součástí buněčné stěny sójových bobů. Sójový pektin je tvořen neutrálními řetězci obsahující arabinózu a galaktózu a kyselými složkami obsahujícími 20-35% kyseliny uronové (Al Loman & Ju 2017).

3.4 Antinutriční látky

Kromě kvalitních bílkovin a olejů (Kalaiselvan et al. 2010), obsahuje sója značné množství antinutričních látek, které snižují využitelnost těchto živin. Antinutriční látky vznikají v rostlinách přirozeně za účelem obrany proti škůdcům a hmyzu (Gemede & Ratta 2014). Pokud jsou přítomné v nízkých koncentracích, mohou být pro člověka prospěšné (El-Hady & Habiba 2003). Jako příklad lze uvést kyselinu fytovou, lektiny nebo saponiny, které snižují hladinu glukózy v krvi a cholesterol v plazmě (Gemede & Ratta 2014).

3.4.1 Saponiny

Saponiny jsou látky amfifilního charakteru složené z polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofóbní) části. Nepolární složka je tvořena ve vodě nerozpustným aglykonem (Podolak et al. 2010). Polární, ve vodě rozpustnou část představují sacharidy jako hexózy, pentózy nebo kyselina uronová a jsou k aglykonu připojené glykosidickou vazbou. Vzhledem ke své amfifilní povaze působí jako povrchově aktivní látky schopné tvořit pěny, snižovat povrchové napětí a odstraňovat nečistoty. Podle struktury aglykonu dělíme saponiny na triterpenoidní glykosidy, steroidní glykosidy a glykosidy steroidních alkaloidů (Singh et al. 2017).

Glykosidy se označují proto, že obsahují jak cukernou tak necukernou část. Sójové saponiny patří mezi triterpenoidní glykosidy a dělí se na dvě základní skupiny. Skupina A má připojené dva sacharidové řetězce na uhlíku C3 a C22 a označují se jako bidesmosidy. Bidesmosidy se dělí do dalších dvou podskupin podle toho, zda obsahují na uhlíku C 22 acetylovou skupinu či nikoliv. Sójové saponiny skupiny B mají navázaný pouze jeden sacharidový řetězec na uhlíku C3 a nazývají se monodesmosidy. Skupina B se dále rozděluje

na dvě podskupiny na základě konjugace s 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (DDMP) na uhlíku C22 (Barakat et al. 2015). Sojové saponiny konjugované s DDMP jsou citlivé na vysokou teplotu a extrémní pH při kterém ztrácí navázanou DDMP část, takže se s nimi v tepelně opracovaných potravinách nesetkáme. Zvláštní skupinou jsou sójové saponiny skupiny E, které vznikají při extrakci saponinů. Na uhlíku C3 mají navázaný sacharidový řetězec a na uhlíku C22 karbonylovou skupinu (Singh et al. 2017).

Kamo et al. (2014) popisuje jako hlavní pozitiva konzumace sójových saponinů jejich antioxidační účinek, snižování cholesterolu a glykémie, protizánětlivé a protinádorové účinky. Hlavním nebezpečím při zvýšené koncentraci saponinů v krvi je hemolýza erytrocytů. Saponiny reagují s lipidy přítomných v membráně erytrocytů, čímž naruší rovnováhu draselných a sodných iontů a způsobí lýzy buňky která vede k vyplavení hemoglobinu (Zehring et al. 2015).

3.4.2 Inhibitory proteáz

V sóji se nachází značné množství inhibitorů serinových proteáz, z nichž nejznámější je Bowman-Birkův inhibitor o molekulové hmotnosti 7,9 kDa a Kunitzův inhibitor jehož molekulová hmotnost je 20 kDa (Li et al. 2017). Mezi serinové proteázy patří trypsin, chymotrypsin a elastáza (Di Cera 2009). U Bowman-Birkova inhibitoru (BBI) rozlišujeme pět izoform: BBI (A, B, C, C-II, D-II, E-I). BBI inhibuje serinové proteázy přes dvě reakční místa. BBI-A inhibuje jedním reaktivním místem trypsin a druhým chymotrypsin, BBI-D-II inhibuje výhradně trypsin a BBI-C-II má jedno reaktivní místo pro elastázu a druhým může inhibovat jak trypsin tak chymotrypsin. Kunitzův inhibitor je citlivý především na trypsin a v menší míře na chymotrypsin (He et al. 2017).

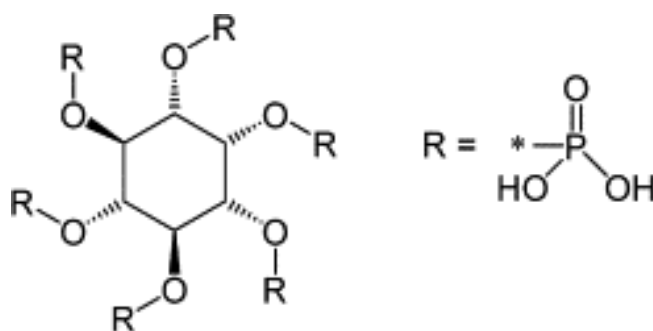
BBI je tvořen 71 aminokyselinami, které jsou zpevněné disulfidovými můstky a prostřednictvím smyčky se naváže na aktivní místo trypsinu. Tím inhibuje jeho aktivitu a schopnost štěpit proteiny (Fields et al. 2012). Vysoké množství serinových inhibitorů v organismu tlumí aktivitu trávicích enzymů trypsinu a chymotrypsinu a může zapříčinit hypertrofii (zvětšení velikosti acinárních buněk) a hyperplazii (zvětšení počtu acinárních buněk) pankreatu. Sójové potraviny obsahují kolem 2 % inhibitorů serinových proteáz (Vagadia et al. 2017), a protože se jedná o peptidy lze jejich škodlivý účinek inaktivovat tepelným záhřevem (Chen et al. 2014).

Dalším biologicky aktivním peptidem v soji je lunasin, který vykazuje protizánětlivé a protirakovinové účinky. Na rozdíl od výše uvedených inhibitorů není schopen odolávat kyselému prostředí a téměř veškerý lunasin se při průchodu trávicím systémem degraduje.

Jednou z možností jak snížit jeho trávení je prostřednictvím serinových inhibitorů, které inhibují proteázy a tím ochrání bílkovinu před štěpením peptidové vazby. Využití lunasinu jako potencionálního léčiva je zatím ve stádiu výzkumu (Price et al. 2016).

3.4.3 Kyselina fytová

Pei et al. (2019) uvádí, že se v rostlinách vyskytuje fosfor nejčastěji ve formě kyseliny fytové, jejíž množství v semenech obilovin a luštěnin se pohybuje v rozmezí 0,5-5 %. Sójové boby obsahují 9,2-16,7 mg kyseliny fytové na 1 g bobů. V semenech se hromadí během dozrávání rostliny. Po konzumaci nedochází k její degradaci, protože v lidském trávicím systému nenajdeme enzym fytázu, který by kyselinu fytovou rozložil. Místo toho dokáže chelatovat vápenaté, hořečnaté, zinečnaté, měďnaté nebo železnaté kationty za vzniku fytátů a tím omezit vstřebávání těchto minerálů v trávicím traktu. Fytáty jsou soli kyseliny fytové se záporným nábojem, které vazbou s minerálními kationty mohou způsobit jejich nedostatek vedoucím k řadě onemocnění (Kumar et al. 2010) – viz Obrázek 2. Z tohoto důvodu jsou dnes mikrobiální fytázy přidávány do potravin během přípravy chleba či mletí obilí (Song et al. 2019).



Obrázek 2: Chemická struktura kyseliny fytové (Kumar et al. 2010)

Příkladem je anémie, která je až u poloviny pacientů způsobená právě nedostatkem železa. Kromě anémie, deficit železa zvyšuje náchylnost organismu k infekcím, u těhotných žen může vyvolat předčasný porod a u dětí má negativní dopad na kognitivní vývoj. Nedostatek zinku, který je potřebný pro růst buněk a jejich proliferaci způsobuje poruchy imunity a zpomalený růst u dětí (Gupta et al. 2015). Kromě minerálních kationtů váže kyselina fytová také proteiny. Nejenže vazbou znemožňuje jejich trávení, ale také tlumí stravitelnost škrobů inhibicí α -amylázy. Kyselina fytová ale nemá pouze negativní vliv na lidský organismus. Působí jako antioxidant a interakcí s kationty železa omezuje oxidační degradaci lipidů a s tím

spojenou tvorbu volných radikálů. Dále brání ukládání vápenatých solí, čímž snižuje riziko tvorby ledvinových kamenů, a vazbou se zinkem snižuje sérový cholesterol (Lee et al. 2015). Podle Diouf-Lewis et al. (2017) existují studie zabývající se využitím kyseliny fytové jako potravního aditiva, které může prodloužit stabilitu rybích lipidů nebo životnost produktů v emulzi.

3.4.4 Lektiny

První zmínka o lektinech pochází z roku 1888, kdy byly vyextrahovány ze semen ricinu. Tyto vazebné proteiny se objevují u rostlin, zvířat i mikroorganismů. Mikrobiální lektiny se dle původu dělí na virové a bakteriální. Bakteriální lektiny mohou být produkovány jako toxiny, nebo jsou umístěny na povrchu bakterie a zprostředkovávají její adhezi. Lektiny u zvířat byly nejprve zkoumány u členovců konkrétně u pavouků a korýšů (Lavín de Juan et al. 2017). U obratlovců rozlišujeme lektiny membránové a rozpustné. Membránové jsou pevně ukotveny na biologické membráně, zatímco rozpustné lektiny mohou membránou procházet. Nejrozšířenější jsou lektiny u rostlin, kde je nacházíme v semenech, listech i kůře a chrání tak rostlinu před napadením mikroorganismy a hmyzem (Carvalho et al. 2018).

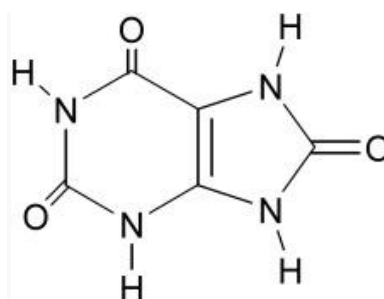
Rostlinné lektiny rozdělujeme do čtyř skupin: merolektiny, hololektiny, chimerolektiny a superlektiny. Sójový lektin patří mezi hololektiny, které obsahují minimálně dvě vazebné domény sacharidů (Vandenborre et al. 2011). Tyto domény mají schopnost navázat se na cukerný zbytek nacházejícího se na povrchu červených krvinek a selektivně je aglutinovat. Schopnosti lektinů vázat cukry se využívá při určování krevních skupin, které se liší právě v posledním cukerném zbytku (Khan et al. 2002). Lektiny, které se při průchodu trávicím traktem na epitelové buňky nenaváží, nevykazují žádný antinutriční účinek. Naopak lektiny, které se naváží na cukerné části v membránách spouští škodlivé reakce. Mohou zapříčinit ztrátu epitelových buněk, narušit metabolismus sacharidů, lipidů nebo bílkovin (Vasconcelos & Oliveira 2004). U tepelně opracovaných pokrmů se s lektiny téměř nesetkáme, protože dochází k denaturaci vazebných proteinů. Další z možností jak potlačit jejich biologickou aktivitu je použití proteolytických enzymů trypsin nebo papain (Gorakshakar & Ghosh 2016).

3.4.5 Puriny

Puriny jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, mezi které patří dusíkaté báze adenin a guanin podílející se na stavbě DNA a RNA. Spolu s pirimidiny se podílí na přenosu genetické informace, ve formě adenosintrifosfátu (ATP) slouží jako zásobní zdroj energie, nebo jsou součástí kofaktorů nezbytných pro enzymatickou aktivitu (Chitrakar et al. 2017). Doporučený

příjem purinů je nižší než 400 mg/den. Potraviny bohaté na puriny jsou maso, zejména vnitřnosti a zvěřina, houby shiitake a sušené ryby jako například ančovičky. Ze sójových produktů je to lyofilizované tofu s celkovým obsahem 293,1 mg purinů na 100 g tofu. Sušené sójové boby obsahují 172,5 mg purinů na 100 g produktu a množství purinů v natto je 113,9 mg/100 g (Kaneko et al. 2014).

Nadměrný přísun purinů v potravinách vede k hyperurikémii a dně. Při hyperurikémii se zvyšuje koncentrace kyseliny močové v séru, jejíž fyziologické hodnoty v séru se u zdravého člověka pohybují v rozmezí 155-339 $\mu\text{m/l}$ u žen a 208-416 $\mu\text{m/l}$ u mužů (Ndrepepa 2018) – viz Obrázek 3.



Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny močové (Makarska- Bialokoz & Lipke 2019)

Při hyperurikémii dochází k ukládání kyseliny močové ve formě krystalů urátu monosodného v okolí kloubů (Azzeh et al. 2017). Vlivem zánětu dochází k zarudnutí, otoku a prudké bolesti postiženého kloubu. Pokud nedojde k úpravě jídelníčku a léčbě může se akutní artritida rozvinout v chronickou formu nemoci, při které vznikají dnavé tofy. Jedná se o uzlovitá ložiska krystalů urátu monosodného, které způsobují deformaci kloubu (Yao et al. 2012). Kyselina močová je organická kyselina, která se špatně rozpouští ve vodě a vylučuje se močí. U člověka je konečným produktem metabolismu purinových látek (Maiuolo et al. 2016), které kromě potravin získáváme i z vnitřních zdrojů. Příkladem jsou nukleové kyseliny nebo purinové nukleotidy adenosinmonofosfát nebo guanosinmonofosfát (Ndrepepa 2018).

3.5 Fermentované sójové výrobky

Vlivem mikroorganismů a jejich enzymů dochází během fermentace k přeměně substrátů na jednodušší látky, které pak dodávají pokrmu nejen charakteristickou chuť ale i vzhled (Lin et al. 2012). Příkladem je slizovitý obal sójových bobů u natto (Shih et al. 2009), nebo bílé mycelium *Rhizopus microsporus var. oligosporus* vytvářející typickou strukturu tempehu (Jennessen et al 2008). Z výživového hlediska je důležitá hydrolyza proteinů pomocí

enzymů, která pak činí bílkoviny lépe stravitelné. Zanedbatelný není ani vznik sekundárních metabolitů během fermentace jako jsou antioxidanty nebo vitamíny a jejich pozitivní vliv na zdraví (Lin et al. 2012).

3.5.1 Natto

Natto je tradiční japonský pokrm, který si dodnes mnoho rodin připravuje sama doma. Základem pro výrobu natto jsou sójové boby fermentované grampozitivní bakterií *Bacillus subtilis* var. *natto*. Prvním krokem přípravy pokrmu je namáčení celých sójových bobů po dobu 20 hodin při teplotě 21-23 °C. Následuje jejich povaření při teplotě 121 °C po dobu 40 minut. Vychladlé boby jsou očkované startovací kulturou *Bacillus subtilis* var. *natto* a poté zabaleny do polystyrenových obalů ve kterých se nechají fermentovat 16-20 hodin při teplotě 42 °C a relativní vlhkosti 85%. Během této doby dochází ke zmnožení naočkované bakterie. Aby proces fermentace proběhl správně, je potřeba zajistit dostatečný přísun kyslíku, protože se *Bacillus subtilis* var. *natto* řadí mezi aerobní bakterie (Wei et al. 2001). U kvalitního natto jsou sójové boby obalené bílým slizem tvořeným polymery kyseliny glutamové. Bílá barva slizu značí dostatečný nárůst *Bacillus subtilis* var. *natto* a správný průběh fermentace. Díky jeho nevábnému vzhledu a charakteristickému zápachu není kromě východní Asie ve světě příliš konzumován. Tradičně se servíruje s rýží nebo se jím dochucují jiné pokrmy (Shih et al. 2009) – viz Obrázek 4.



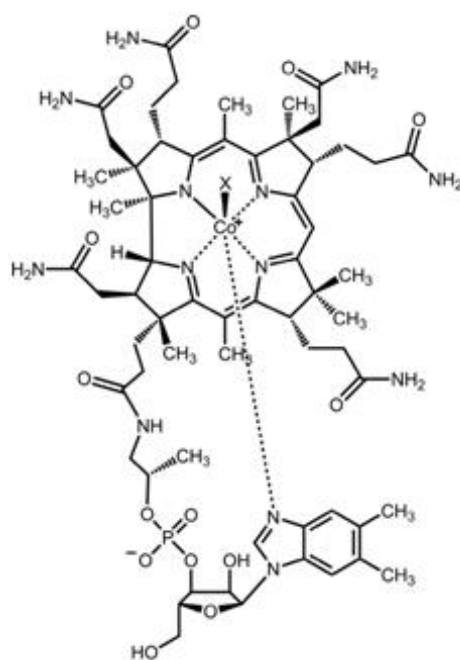
Obrázek 4: Natto s charakteristickým slizovitým obalem (upraveno dle Liu et al. 2018)

Velkou předností tohoto jídla je kromě nízké ceny přítomnost nattokinázy. Jedná se o fibrinolytický enzym produkovaný *Bacillus subtilis* var. *natto* a je tvořen celkem 275 aminokyselinovými zbytky. Nattokináza má až čtyřnásobně silnější fibrinolytickou aktivitu než

plazmin a navíc je také aktivátorem dalších fibrinolytických enzymů jako je například pro-urokináza (Takabayashiet al. 2017). Jak uvádí Chang et al. (2012) je nattokináza schopna rozkládat vlákna fibrinu, zabraňuje jeho hromadění v cévách a předchází tak vzniku trombózy. Natto je spolu s tvrdými sýry, vaječným žloutkem nebo máslem jedním z hlavních zdrojů vitamínu K2, který slouží jako prevence kardiovaskulárních onemocnění, zvyšuje pevnost kostí a tím snižuje riziko zlomenin (Schwalfenberg 2017).

3.5.2 Tempeh

Mezi tradiční pokrmy pocházející z indonéské kuchyně patří bezesporu tempeh, který vzniká fermentací sójových bobů po zaočkování kulturou mikroskopických hub *Rhizopus microsporus var. oligosporus*. Pro vegetariány a obyvatele asijských oblastí, ve kterých převažuje rostlinná strava nad tou živočišnou je tempeh významným zdrojem bílkovin, vápníku a z vitamínů je pak bohatý především na kyselinu listovou a B₁₂ (Gunawan-Puteri et al. 2015) – viz Obrázek 5.



Obrázek 5: Struktura vitamínu B₁₂ (upraveno dle Dereven'kov et al. 2016)

Při přípravě tempehu se nejprve sójové boby nechají přes noc namáčet ve vodě, aby se lépe zbavily slupky. Odslupkované boby se vaří ve vodě 30-40 minut a poté se rozloží na plech, kde vychladnou a oschnou. Vychladlé boby se naočkují čistou kulturou *Rhizopus microsporus var. oligosporu* nebo spory této vláknité houby. Během inkubace, která probíhá při 30-37 °C po dobu 40-48 hodin se vytváří typická struktura tempehu (Mo et al. 2013). Dle Jennessen et al. (2008) bílé mycelium narůstající během fermentace spojuje sójové boby do kompaktní

hmoty a enzymy produkované *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* zlepšují stravitelnost bílkovin. Ve srovnání s ostatními sójovými produkty nalezneme u tempehu i vysoký obsah isoflavonoidů, konkrétně daidzeinu a genisteinu. Při tepelné úpravě, především smažením se ale množství isoflavonoidů může snížit až na polovinu původního obsahu. Přeměnou substrátů v průběhu fermentace vznikají ve vodě rozpustné dusíkaté sloučeniny, aminokyseliny a volné MK, které dodávají tempehu charakteristickou chuť (Jeleń et al. 2013).

Během fermentace vzniká také kobalamin neboli vitamín B₁₂ v množství 0,7-0,8 µg/100 g tempehu. Kobalamin je tvořen složitou molekulou s centrálním atomem kobaltu a je to jediný ve vodě rozpustný vitamín, který se ukládá do jater po mnoho let. Nejstabilnější formou vitamínu B₁₂, který se používá v léčivech a doplňcích stravy, je syntetický kyanokobalamin. Ten se pak v těle člověka přemění na biologicky aktivní formu methylkobalamin. Vitamín B₁₂ je důležitý pro tvorbu erytrocytů, syntézu DNA při dělení buněk, působí jako koenzym a zajišťuje správnou funkci nervového systému. Nedostatek vitamínu B₁₂ je vzácný, ale může se objevit u striktních vegetariánů a veganů. U těchto lidí je právě tempeh jedním z hlavních zdrojů tohoto vitamínu. Jeho nedostatek se projevuje jako megaloblastová anémie (Nakos et al. 2017), pro kterou je typická přítomnost velkých nezralých erytrocytů v kostní dřeni (Castellanos-Sinco et al. 2015).

3.5.3 Doenjang

Doenjang je fermentovaná sójová pasta původem z Koreje. Základem pro výrobu doenjangu tradičním způsobem je meju, které je přirozeně fermentováno bez očkování startovací kulturou (Kim et al. 2018). Meju se připravuje ze sójových bobů, které se nejprve očistí, namáčí ve vodě a poté se 2 hodiny vaří se při 100 °C. Uvařené sójové boby se drtí, formují do požadovaného tvaru a venku zavěšené se nechají 1-2 měsíce fermentovat. Na fermentaci probíhající na vzduchu se podílí kromě *Bacillus subtilis*, což je hlavní přírodní fermentační kultura, i vzdušné mikroby (Park et al. 2003). Sun et al. (2018) řadí mezi hlavní plísně ulpívající na povrchu fermentované pasty rody *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Mucor* sp. a *Rhizopus* sp, které vytváří speciální mikroflóru. Tyto mikroorganismy produkcí enzymů rozkládají proteiny a dodávají meju chuť a aroma (Shin & Jeong 2015).

Hotové meju se spolu s dřevěným uhlím, chilli papričkami a sušeným pepřem vloží do velkého keramického hrnce a zalité roztokem soli se fermentuje další 2-3 měsíce. Během fermentace se z roztoku soli stává sójová omáčka zvaná kanjang, která se zfiltruje a plní do lahví. Pevný podíl se nechá fermentovat další 2 měsíce za vzniku sójové pasty doenjangu (Park et al. 2003) – viz obrázek 6. Konzumací doenjangu je posilována imunita a snižují se IgE

protilátky v těle, což vede k prevenci vzniku alergií a utlumení příznaků s alergií spojených. Kromě jiného se v pastě tvoří dipeptid argininprolin produkující inhibitory enzymu angiotensin-konvertázy. Inhibicí tohoto enzymu předchází vzniku vysokého krevního tlaku (Shin & Jeong 2015).



Obrázek 6: Výroba tradičního doenjangu (upraveno dle Shin & Jeong 2015)

3.5.4 Miso

Miso je tradiční japonské koření pastovité konzistence vyrobené ze sójových bobů, soli a koji. Základem koji může být rýže, ječmen nebo sójové boby. Miso se rozlišuje na základě použitého koji a doby zrání na bílé, červené a hatcho miso. Bílé a červené miso je připraveno z rýžové koji. Bílé miso je rozšířené především ve východní části Japonska, zraje tři až šest měsíců a má jemně slanou chuť. Červené miso oblíbené v severním Japonsku, má výraznější chuť a tmavší barvu díky delšímu zrání, které trvá šest měsíců až rok. Ve středním Japonsku je nejrozšířenější hatcho miso ze sójové koji, které zraje dva roky a má tmavou barvu s intenzivní chutí umami (Inoue et al. 2016). Méně rozšířené je použití koji z ječmene, které je typické hlavně pro regiony Chukyo a Kyushu. Kromě dochucování pokrmů se miso používá při přípravě miso polévky a nahrazuje tak vývar či bujón (Marui et al. 2013).

Prvním krokem při výrobě miso je příprava koji, jejímž základem je nejčastěji rýže, která se přes noc namáčí ve vodě a poté se vaří 30 minut. Vychladlá rýže se naočkuje kulturou *Aspergillus oryzae* a ponechá se fermentovat při 30 °C po dobu 40 hodin. Sójové boby se po nočním stání ve vodě vaří pod tlakem přibližně 15 minut. Rýžová koji se smíchá se solí, vařenými boby a směs se nechá fermentovat při 30 °C. Délka fermentace závisí na druhu miso (Inoue et al. 2009). Během fermentace koji uvolňuje *Aspergillus oryzae* hydrolytické enzymy, které štěpí sacharidy a bílkoviny (Chancharoonpong et al. 2012). Charakteristickou chuť získává miso díky fermentaci, Maillardovým reakcím a schopnosti kvasinek a bakterií mléčného kvašení hydrolyzovat složky sóji (Inoue et al. 2016).

3.5.5 Sufu

Sufu, v některé literatuře označovaný také jako furu, je tradiční čínský sýr roztíratelné konzistence a výrazné chuti. S oblibou je konzumován hlavně na snídani jako příloha k rýži nebo chlebu. Existuje několik druhů sufu rozdělených podle použité výrobní technologie nebo podle barvy. Základní surovinou pro výrobu sufu je tofu, které může být fermentováno přirozenou cestou, plísněmi, bakteriemi nebo enzymaticky. Výroba probíhá ve čtyřech krocích: přípravou tofu, pehtze, solením a zráním (Moy et al. 2012).

Prvním krokem je příprava tofu, které vzniká srážením sójového nápoje solemi nebo kyselinami. Jako srážedla se používají síran vápenatý, chlorid hořečnatý nebo kyselina octová (Fei et al. 2018). Tofu se nakrájí na kostky a zaočkuje se postříkem plísní *Actinomucor elegans* (Liu et al. 2018). Po naočkování čistou kulturou se tofu fermentuje při 15-20 °C po dobu 5-15 dní a vzniká pehtze. Nakonec se kostky pehtze osolí, obalí se ve směsi koření, rýže a zabalené se vkládají do sklenic, kde zrají. U enzymaticky fermentovaného sufu se nepřipravuje pehtze a

nedochází tak k fermentaci. Proto se před zráním, které trvá 6-10 měsíců přidává k tofu již hotové koji. Výroba bakteriálně fermentovaného sufu zahrnuje krok navíc a to přesolování tofu, které trvá dva dny a potřebný obsah soli je 6,5 %. Pehtze se připraví zaočkováním rodem *Bacillus* sp. nebo *Micrococcus* sp. a týdenní fermentací při 30-38 °C. Před solením se pehtze suší, aby si udrželo požadovaný tvar, a zrání netrvá déle než tři měsíce. Barvu a slanou chuť dodává sufu obvazová směs ve které zraje. Nejoblíbenější je červené sufu, které získává barvu díky angkaku přidávaného spolu se solí, cukrem, alkoholem, moukou a kořením do obvazové směsi. Angkak je přírodní barvivo, které vzniká fermentací vařené rýže po zaočkování plísní *Monascus purpureus*. Do obvazové směsi bílého sufu se angkak nepřidává, takže má na rozdíl od červeného sufu světle žlutou barvu i na povrchu. Šedé sufu obsahuje kromě koření a soli také sojovou syrovátku a nepříjemně zapáchá (Han et al. 2001).

3.5.6 Sójová omáčka

Sójová omáčka je oblíbeným dochucovadlem především v asijských zemích, ale díky své výrazné chuti a aroma se rozšířila do celého světa. U shoyu, tradiční japonské omáčky rozlišujeme tři základní druhy. Koikuchi shoyu, tamari shoyu a shiro shoyu, které se liší poměrem sójových bobů a pšenice. Při výrobě tamari shoyu se používají především sójové boby, díky nimž má omáčka tmavší barvu a hustší konzistenci, ale méně aroma než koikuchi shoyu. Naopak shiro shoyu má světle hnědou barvu kvůli vysokému obsahu pšenice. Ze stejného množství sójových bobů a pšenice se vyrábí koikuchi shoyu, které má silné aroma a tmavě hnědou barvu (Lioe et al. 2007). Hnědá barva omáčky vzniká během fermentace a následné pasterizace jako výsledek Maillardovy reakce. Reakce probíhá mezi redukujícími cukry a aminosloučeninami za vzniku hnědých pigmentů. Množství dusíkatých sloučenin se pohybuje okolo 1,3-1,8 % a pro získání dostatečně intenzivní chuti musí být minimálně polovina těchto sloučenin aminokyselinami, především kyselina glutamová. Hotová sójová omáčka obsahuje 1,5–5 % redukujících cukrů, 1,5-2,5 % etanolu, 1-1,5 % glycerolu, 1-2 % organických kyselin a 16-18 % NaCl (Miyagi et al. 2013).

Sójová omáčka se vyrábí dvoustupňovou fermentací. První stupeň se nazývá koji na kterou navazuje druhý stupeň moromi. V prvním stupni fermentace se směs vařených sójových bobů a praženou pšeničnou moukou očkuje sporami *Aspergillus oryzae* nebo *Aspergillus sojae*. Během třídenní inkubace prorůstá mycelium směsí a dodává jí celistvou formu. Po inkubaci se koji namáčí v 18-22% roztoku soli. Tímto namáčením začíná druhý stupeň fermentace moromi, která trvá tři až šest měsíců v závislosti na druhu omáčky (Devanthi et al. 2018). Při fermentaci koji produkuje *Aspergillus oryzae* množství enzymů, jako například pektinázy, celulázy a

hemicelulázy, které narušují buněčnou stěnu sójových bobů. Tím umožňují hydrolytickým enzymům proteázám a amylázám štěpit bílkoviny a škroby uvnitř bobů. Namočením do solného roztoku na začátku fermentace moromi se zastaví růst *Aspergillus oryzae* a usmrtí se nežádoucí mikroflóra. Existují ale i bakterie, které snášejí vysokou koncentraci soli v substrátu dobře a jsou schopné se v něm i množit. Příkladem jsou bakterie mléčného kvašení *Tetragenococcus halophilus* a kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii* a přispívají tak k typické chuti sójové omáčky (Kaewkrod et al. 2018).

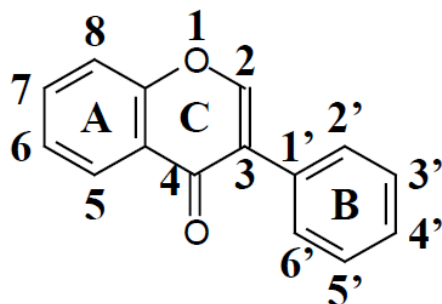
Po dokončení fermentace se filtrací oddělí kapalná a pevná část moromi. Kapalná část se pasteruje a plní do lahví. Podle Světové zdravotnické organizace je optimální denní spotřeba sodíku 2 g/osobu/den což odpovídá 5 g soli. Ve skutečnosti je ale příjem sodíku téměř dvojnásobný a časté a nadměrné dochucování pokrmů sójovými omáčkami s 16-18 % soli tomu přispívá. Zvýšená konzumace soli napomáhá vzniku kardiovaskulárních onemocnění, hypertenzi a poruchám ledvin (Singracha et al. 2017).

3.6 Charakteristika isoflavonoidů

Isoflavonoidy se spolu s lignany, kumestany a stilbeny řadí mezi tzv. fytoestrogeny. Tyto látky mají široké spektrum bioaktivních účinků jako je prevence proti stárnutí, rakovině prsu a prostaty, kardiovaskulárním onemocněním a osteoporóze. Nejbohatším zdrojem isoflavonoidů jsou sójové boby, bohatým zdrojem kumestanů jsou kromě sóje i klíčky jetelu a vojtěška. Lignany jsou ve větší míře zastoupeny například ve lněném semínku (Sirotkin & Harrath 2014). Nejvýznamnějším představitelem stilbenů je resveratrol obsažený v červeném víně. S resveratrolem je spojen takzvaný „francouzský paradox“, který přičítá vysoké konzumaci červeného vína pozitivní vliv na kardiovaskulární systém (Wiciński et al. 2018). Jak název vypovídá, jsou fytoestrogeny z hlediska chemické struktury podobné ženským pohlavním hormonům estrogenům, konkrétně 17 β -estradiolu. Této podobnosti se využívá v případě poklesu estrogenu v období menopauzy, kdy fytoestrogeny mohou chybějící hormon substituovat vazbou na estrogenové α a β receptory (Soni et al. 2014). Tyto receptory se nacházejí v mozku, plicích, kostech, ale i v pohlavních žlázách, prsní žláze nebo placentě (Sirotkin & Harrath 2014). Soni et al. (2014) uvádí, že isoflavonoid genistein, který se přednostně váže s β receptory má až 500 krát vyšší afinitu k estrogenovým receptorům než daidzein a glycitein.

Isoflavonoidy jsou odvozené od benzo- γ -pyronu tvořící kruh A a C. γ -pyron (kruh C) je heterocyklus obsahující kyslík a na uhlíku C3 má navázaný fenylový substituent tvořící kruh B (Szultka et al. 2013) – viz Obrázek 7. Nejvíce zastoupenými isoflavonoidy v sóje jsou aglykony

daidzein, genistein a glycitein, které se vyskytují hlavně jako glykosidy konjugací s glukózou ve formě 7-O-β-D-glykosidů (daidzin, genistin, glycitin), 6-O-acetyl-7-O-β-D-glykosidů (acetyldaidzin, acetylgenistin, acetylglycitin) a 6-O-malonyl-7-O-β-D-glykosidů (malonyldaidzin, malonylgenistin, malonylglycitin) (Shao et al. 2011).



Obrázek 7: Chemická struktura isoflavonoidů (Heinonen et al. 2003)

Konjugované isoflavonoidy se stávají biologicky aktivní až po jejich hydrolyze střevními bakteriemi. Hydrolyzou vzniklé aglykony jsou vstřebány enterocyty a po následné hydroxylaci v játrech, která zvýší jejich rozpustnost, jsou převedeny na kyseliny glukuronovou a sulfonovou a poté vylučovány močí. Sójové fermentované produkty obsahují na rozdíl od těch nefermentovaných více isoflavonoidů ve formě aglykonů a jejich množství se v jednotlivých výrobcích liší (Heinonen et al 2003) – viz Tabulka 2.

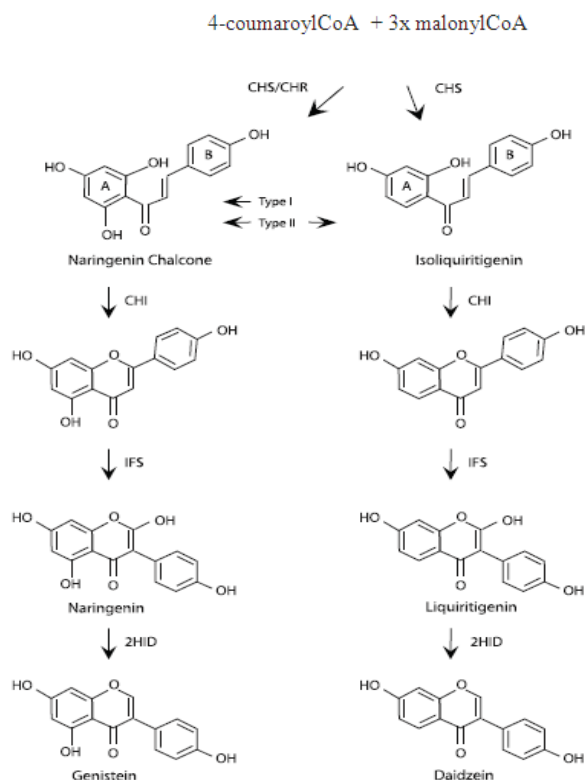
Tabulka 2: Obsah isoflavonoidů ve vybraných sójových produktech
(upraveno dle Cederroth et al. 2012)

Sójový produkt	Daidzein [mg/100g]	Genistein [mg/100g]	Glycitein [mg/100g]	Celkem [mg/100g]
Syrové boby	20,4	22,6	7,6	49,0
Vařené boby	5,0	6,7	0,8	12,5
Natto	33,2	37,7	10,6	82,3
Tempeh	22,7	36,2	3,8	60,6
Miso	16,4	23,2	3,0	41,5
Sójová omáčka	0,8	0,4	0,1	1,2

3.7 Biosyntéza isoflavonoidů

Isoflavonoidy jsou syntetizovány v cytoplazmě rostlin jako ochrana před škůdci, patogeny a biologickými vlivy jako sucho nebo UV záření. Sója vylučuje isoflavonoidy svými kořeny, které působí jako signální molekuly a zprostředkovávají spojení s *Rhizobium*, bakteriemi fixujícími dusík (Sugiyama et al 2017).

Prvním krokem biosyntézy isoflavonoidů je tvorba chalkonu, reakcí 4-coumaroylCoA a tří molekul malonylCoA (Dixon & Steele 1999). V sóje existují dva typy chalkon syntázy, která vznik chalkonu katalyzuje. Chalkon syntáza I katalyzuje vznik naringenin chalkonu za podpory chalkon reductázy, ze kterého se syntetizuje genistein. Chalkon syntáza II může dát vznik jak naringenin chalkonu tak isoliquiritigeninu, vedoucímu k syntéze daidzeinu. Dalším krokem je uzavření heterocyklický kruh za katalýzy chalkon izomerázou a následnou hydroxylací na uhlíku C2, což vede k posunu fenylového substituentu z uhlíku C2 do polohy C3 za katalýzy isoflavon syntázy. Těmito kroky vzniká naringenin respektive liquiritigenin, ze kterých je za přítomnosti 2-hydroxyisoflavon dehydratázy odštěpen kyslík a vodík z uhlíku C2 za vzniku genisteinu respektive daidzeinu. Působením methyltransferáz a glykosyltransferáz jsou přeměněny na glykosidy a skladovány ve vakuolách (Cederroth et al. 2012) – viz Obrázek 8.



Obrázek 8: Biosyntéza isoflavonoidů v sóje (CHS, chalkon syntáza; CHR, chalkon reductáza; CHI, chalkon izomeráza; IFS, isoflavon syntáza; 2HID, 2-hydroxyisoflavon dehydratáza) (upraveno dle Cederroth et al 2012)

3.8 Metody extrakce

Tradiční extrakční metody ustupují takzvaným zeleným technologiím, jejichž hlavním cílem je ochrana životního prostředí a nalezení šetrnějších metod, které budou zároveň poskytovat vysokou účinnost. Minimalizováním procesu extrakce se sníží množství použitých rozpouštědel, vzniklého biologického odpadu a spotřeba energie. Mikrovlnná asistovaná extrakce, ultrazvuková asistovaná extrakce, tlaková extrakce kapalinou a superkritická fluidní extrakce se řadí mezi tyto ekologické metody (Wen et al. 2018).

3.8.1 Mikrovlnná asistovaná extrakce

Mikrovlny, které byly dříve využívány k potlačení aktivity enzymů a bakterií v potravinách (Terigar et al. 2010), v současnosti nalézají uplatnění při extrakci látek z rostlinných matric. Mezi výhody mikrovlnné asistované extrakce (MAE) patří nižší spotřeba materiálu, kratší doba extrakce a minimální manipulace se vzorky, čímž se eliminuje riziko chyby při měření (Elez Garofulicet al. 2013). Principem MAE je lokalizovaný ohřev molekul vody v matrici během krátké doby, řádově několika vteřin. Voda, která absorbuje energii elektromagnetických vln, se v buňkách přehřívá a nárůst tlaku narušuje buněčnou stěnu. Tím dochází k extrakci požadovaných látek z buněk do rozpouštědla (Lee & Choung 2011). Mezi proměnné ovlivňující účinnost MAE patří teplota, čas a složení extrakčních rozpouštědel (Terigar et al. 2010). Nárůst teploty vede ke zvýšení výtěžnosti, protože rozpouštědlo proniká do buněk snadněji, zároveň ale způsobuje rychlejší lýzy buněčné stěny a do rozpouštědla se extrahují i nežádoucí sloučeniny (Elez Garofulic et al. 2013). Terigar et al. (2010) stanovují jako nejvhodnější rozpouštědla pro extrakci isoflavonoidů vodu, metanol, etanol, nebo acetonitril a jako optimální podmínky pro extrakci teplotu 73 °C po dobu osmi minut.

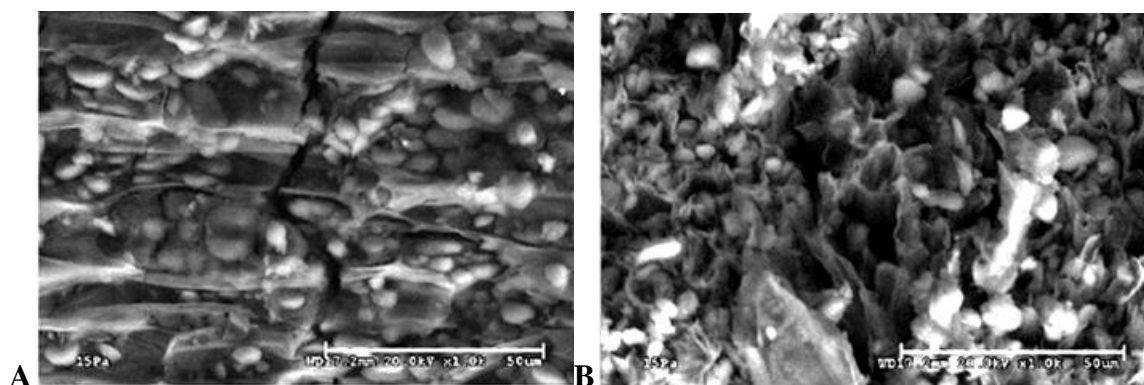
3.8.2 Tlaková extrakce kapalinou

Působením zvýšeného tlaku a teploty na rozpouštědlo se zvyšuje účinnost metody (Mustafa & Turner 2011) za úspory času a extrakčních činidel. Vysoká teplota usnadňuje rozpustnost extrahované látky, ale i rozpouštědla snížením jeho povrchového napětí. Tlaková extrakce kapalinou (PLE) je vhodná pro izolaci analytů z pevné a polotvrdé matrice, polárních látek a látek odolávajícím vysokým teplotám (Azmir et al. 2013). Při extrakci isoflavonoidů se pracuje při tlaku až 20 MPa a teplotou do 200 °C. Ve stanovení optimálních poměrů rozpouštědel se autoři rozcházejí (Rostagno et al 2004). Luthria et al. (2007) uvádí jako ideální kombinaci rozpouštědel pro získání isoflavonoidů směs sulfoxidu, etanolu a vody v poměru

5:70:15. Rostagno et al. (2004) sledovali účinnost extrakce za použití různých rozpouštědel a nejlepšími výsledky dosáhli za použití 70% etanolu.

3.8.3 Ultrazvuková asistovaná extrakce

Principem ultrazvukové asistované extrakce (UAE) je akustická kavitace, vznikající při průchodu ultrazvukové vlny rozpouštědlem. Vlna šířící se kapalným prostředím v něm vytváří expanze a komprese, způsobující změny tlaku, které vedou ke vzniku bublin. Bubliny plynu postupně narůstají, až dosáhnou teploty 5000 K a tlaku 100 MPa. Při těchto hodnotách se stávají nestabilními a dochází k jejich zhroucení. Kolaps bubliny je spojen s uvolněním vysokého tlaku a teploty, které působí na buněčné membrány v rostlinné matici což má za následek její narušení (Tiwari 2015) v podobě mikrotrhlin a pórů (Li et al. 2004) – viz Obrázek 9. Zároveň dochází ke zmenšování částic rozpouštědla, což vede k usnadnění difuze přes buněčnou membránu (Tiwari 2015). Kromě vyšší výtěžnosti patří mezi další výhody UAE zkrácení doby extrakce a s tím spojené nižší náklady na energii, nižší spotřeba rozpouštědel a méně odpadního materiálu (Chemat et al 2017).



Obrázek 9: Sójové vločky pod elektronovým mikroskopem (A, morfologie povrchu vloček po 30 min ultrazvukové asistované extrakce; B, porézní vzhled vloček po 2 h působení ultrazvukové asistované extrakce) (upraveno dle Li et al. 2004).

Klasickým přístrojem v laboratorní praxi založeným na akustické kavitaci je ultrazvuková lázeň, jejímž základem je nerezová nádoba naplněná vodou, ve které se šíří ultrazvukové vlny o frekvenci kolem 40 kHz. Mnohem efektivnějších výsledků je dosaženo za použití ultrazvukové sondy, která se vkládá přímo do rozpouštědla se vzorkem (Picó 2013). Rostagno et al. (2003) úspěšně extrahovali pomocí UAE čtyři deriváty sójových isoflavonoidů a to konkrétně daidzin, glycitin, genistin a malonylgenistin. Vliv na výtěžek extrakce měl i druh

použitého rozpouštědla (Azmir et al. 2013). Kromě isoflavonoidů, lze touto metodou ze sojových bobů izolovat také peptidy (Domínguez-Vega et al. 2010).

3.8.4 Superkritická fluidní extrakce

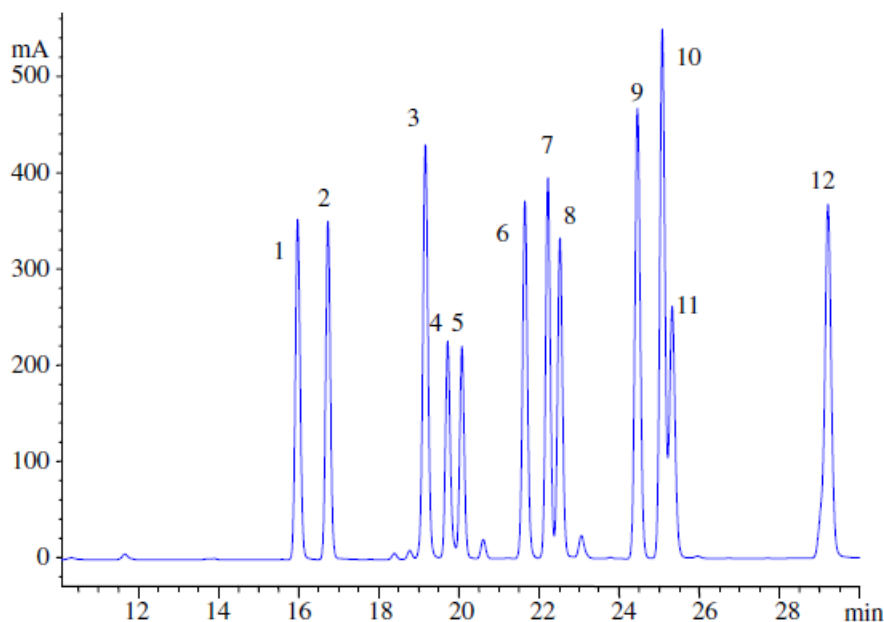
Zahříváním a současným stláčením plynu nebo kapaliny nad jejich kritické hodnoty získáme superkritické kapaliny, které tímto přebírají vlastnosti plynů, jako jsou nízká viskozita nebo vyšší difuzivita rozpouštědla. Aplikací vysokého tlaku a teploty se superkritické kapaliny stávají více rozpustné a rychleji pronikají póry buněčné stěny pevné matrice (Pitchaiah et al. 2019). Nejčastější rozpouštědlo používané v superkritické fluidní extrakci (SFE) je oxid uhličitý, který dosahuje kritické teploty již při 31 °C a tlaku 7,38 MPa. Po extrakci se superkritický oxid uhličitý (SCCO₂) odpařuje, čímž snadno izolujeme vyextrahovanou látku a zároveň odpařením vzniká minimální biologický odpad (Prabhat et al. 2016). Isoflavonoidy se v sóje vyskytují především ve formě polárních glykosidů, zatímco SCCO₂ se používá k extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Přídavkem malého množství polárního rozpouštědla ke SCCO₂ se usnadní rozpustnost polárních částí glykosidu a SFE se tak stává účinnou metodou pro získání isoflavonoidů (Kumhom et al. 2011).

3.9 Stanovení isoflavonoidů vysokoučinnou kapalinovou chromatografií

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, založená na rozdílné afinitě složek vzorku ke stacionární a mobilní fázi. Pro stanovení isoflavonoidů probíhá separace na obrácených fázích (Szultka et al. 2013). Stacionární fáze v koloně je nepolární, tvořena uhlovodíkovými řetězci C-8 nebo C-18 navázaných na silikagel (de Rijke et al. 2006). Pro separaci se používají náplňové kolony s vnitřním průměrem 2,1-5 mm a velikostí částí 3-5 μm. Směs metanolu nebo acetonitrilu s vodou představují polární mobilní fázi (Valls et al. 2009). Aby nedocházelo k asymetrii píku je mobilní fáze okyselena přídavkem kyseliny octové nebo mravenčí, které nahradily kyselinu fosforečnou, kvůli obavám z kontaminace iontového zdroje (Szultka et al. 2013).

Fytoestrogeny díky aromatickým kruhům pohlcují UV záření o vlnové délce 250-270 nm (Wang et al. 2002). Ve struktuře isoflavonoidů se nachází dvě benzenová jádra A a B, přičemž každé jádro pohlcuje UV světlo o jiné vlnové délce. Zatímco jádro A má absorpční maximum při vlnových délkách 240-285 nm, jádro B absorbuje vlnové délky 300-550 nm. Vzhledem k rozdílným vlnovým délkám je nejvhodnější detektor pro měření absorpce UV záření detektor diodového pole, který proměří celé absorpční spektrum v nastavené oblasti vlnových délek (Szultka et al. 2013). Při použití hmotnostního detektoru závisí citlivost a

přesnost měření na iontovém zdroji a analyzátoru. Pro stanovení isoflavonoidů je vhodným zdrojem elektrosprej (ESI), který proudem elektronů ionizuje složky separované v HPLC. Jako analyzátor se používá trojitý kvadrupól, který vykazuje v sériovém řazení za sebou větší selektivitu (Valls et al. 2009) – viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Chromatogram sójových isoflavonoidů (1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, daidzein; 10, acetylgenistin; 11, glycitein; 12, genistein) (Shao et al. 2011).

3.10 Stanovení isoflavonoidů kapilární elektroforézou

Principem kapilární elektroforézy je separace složek vzorku na základě rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Vzorek o objemu 10-50 nl (de Rijke et al. 2006) je dávkován na začátek kapiláry s vnitřním průměrem 50-100 μm , která je naplněná elektrolytem (Wang et al. 2002). Oba konce kapiláry jsou ponořené do zásobníku téhož elektrolytu, kterým je kapilára naplněna. Elektrolyt je obvykle tvořen fosfátovým nebo borátovým pufrem. Přivedením napětí o velikosti 10-30 kV do zásobníku s elektrolytem je zahájena separace složek (de Rijke et al. 2006). Kapilára prochází detektorem, kterým může být v případě separace fytoestrogenů detektor diodového pole (Wang et al. 2002). Oproti HPLC poskytuje kapilární elektroforéza výsledky již během několika minut, ale na úkor nižší citlivosti metody. Stanovení isoflavonoidů daidzeinu a genisteinu probíhá zpravidla při pH 11 a napětí 12 kV (Valls et al. 2009).

3.11 Staphylococcus sp

Stafylokoky jsou grampozitivní koky, uspořádané jednotlivě, po dvojicích, v krátkých řetězcích, ale nejčastěji vytvářejí shluky připomínající hrozen. Jsou to nepohyblivé bakterie, které nevytváří spory a snášejí vyšší koncentrace soli. Schopnosti růst v přítomnosti 10% NaCl se využívá pro vytvoření selektivních půd. Na základě schopnosti tvořit plazmakoagulázu se stafylokoky dělí na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. Pro člověka významné jsou z koaguláza pozitivních *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus intermedius*, který se vyskytuje především na sliznici a kůži zvířat, ale po kousnutí může způsobit hnisavé rány (Votava 2003). Zástupcem koaguláza negativních je *Staphylococcus epidermidis*, který je součástí kožní mikrobioty jako oportunní patogen. Riziko představuje v přítomnosti cizího tělesa v těle, jako jsou umělé čočky či chlopně, jejichž povrch kolonizuje. Vytvořením biofilmu je chráněn před působením antibiotik (Zhang et al. 2019).

Schopnost stafylokoků adherovat různé povrchy od implantátů, katetrů až po potraviny a vytvářet na nich biofilm, je důvodem proč jsou častým původcem onemocnění jak infekční povahy, tak i zdrojem nákazy z kontaminované potravy (Lee et al. 2016). Produkci ve vodě rozpustných, extracelulárních proteinů označovaných jako enterotoxiny působí na střevní sliznici a vyvolává křeče a průjem (Grispoldi et al. 2019). Tvorba biofilmu je pro bakterie výhodné, protože jsou lépe chráněné před imunitním systémem, působením antibiotik (Mirani et al. 2013) a nepříznivými vnějšími podmínkami jako je sucho a vysoká teplota. Vznik biofilmu je řízen pomocí extracelulární genomové DNA. Stafylokoky díky polysacharidovému intercelulárnímu adhezínu (PIA) kolonizují povrch a vytvoří okolo shluku buněk obal tvořený mukoidními látkami, polysacharidy a proteiny. Kromě adheze stojí PIA i za tvorbou slizu, který ještě zvyšuje odolnost kolonie vůči antibakteriálním látkám (Lee et al. 2016). Aby se předcházelo kontaminaci potravin, jsou používána různá aditiva. Mohou být založená na přírodní bázi, jako jsou lysozym a nisin nebo patřit k chemickým látkám typu benzoan sodný nebo kyselina benzoová (Albert Dhayakaran et al. 2015).

3.11.1 Staphylococcus aureus subsp. aureus

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (SA) je všudypřítomná bakterie, vyskytující se jako komenzál na kůži a sliznicích u 10-20 % obyvatel. Řadí se mezi oportunní bakterie, které se při proniknutí do organismu mění na patogenní, způsobující lokální hnisavé záněty kůže až závažná onemocnění jako endokarditida či syndrom toxického šoku (Horn et al. 2018). Základní složkou buněčné stěny je peptidoglykan tvořený polysacharidovými řetězci. Řetězec

se skládá ze N-acetylglukosaminových a N-acetylmuramových kyselinových zbytků, které se na řetězci střídají a jsou vzájemně propojené peptidovými můstky (Livermore 2006). Součástí buněčné stěny je polysacharid A, který se díky kyselině teichoové může adherovat na povrch sliznic a ran (Votava 2003). Vázaná koaguláza je protein na povrchu buněčné stěny, který váže rozpustný fibrinogen a přeměňuje ho na fibrin. Vytvořená fibrinová síť pak chrání stafylokoka před imunitním systémem (Bharadwaz et al. 2017).

β -lactamy jsou širokospektrá baktericidní antibiotika používaná k léčbě infekcí. V současné době je většina stafylokokových kmenů na penicilin rezistentní. V těchto případech se podávají jako antibiotika deriváty penicilinu: methicilin a isoxazolyl penicilin neboli oxacilin (Foster 2019). Problém představují kmeny rezistentní na methicilin označované jako methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Šíření těchto kmenů komplikuje a prodlužuje léčbu, zvyšuje úmrtnost (Yilmaz & Aslantaş 2017) a je ohrožující především pro dlouhodobě hospitalizované pacienty se sníženou imunitou. MRSA jsou rezistentní díky přítomnosti dvou penicilin vázajícím proteinům PBP2 a PBP2'. PBP2' je kódován genem *mecA* na chromozomu stafylokokové kazety a není citlivý k β -laktamovým antibiotikům. V případě, že je původní PBP2 inaktivován, PBP2' ho může zastoupit (Shiga et al. 2013).

3.12 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky vznikají přirozeně v živých organismech nebo jsou uměle syntetizovány. Do těla se dostávají přímo jako součást léčby, nebo sekundárně v podobě reziduí z potravy (Bacanli & Başaran 2019). Podle typu účinku dělíme antibiotika na baktericidní a bakteriostatická. Baktericidní antibiotika působí rychle a bakterie usmrtí během 48 hodin po podání léčiva. Oproti tomu ta bakteriostatická pouze zastavují růst a množení mikroorganismů. Účinkují během 3-4 dnů a je tu riziko, že se začnou opětovně množit. Antibiotika jsou podávána v takových dávkách, které nejsou pro organismus toxické. Toxicitu antibiotika vyjadřuje chemoterapeutický index jako poměr toxické dávky pro hostitele ku dávce účinné na mikroorganismus. Čím je tento index vyšší tím, je látka méně toxická (Votava 2005).

3.12.1 Mechanismus účinků antibiotik

Vzhledem k množství používaných antibiotik, existuje poměrně omezené množství mechanismů, jak mohou svou aktivitu uplatnit. Hlavními mechanismy jsou inhibice syntézy buněčné stěny, bílkovin, nukleových kyselin a poškození cytoplazmatické membrány (Bednář et al. 1999).

Antibiotika mohou působit jako inhibitory syntézy buněčné stěny. Principem je navázání penicilinu a β -laktamů na penicilin vázající protein (PBP), který vzniká v poslední fázi syntézy buněčné stěny a jeho úkolem je zpevnění mureinu. Podobná struktura β -laktamového kruhu a D-alanyl-D-alanyl-dipeptidu nacházejícího se v mureinu umožňuje vazbu k PBP. PBP, který je důležitý pro metabolismus a dělení buňky je β -laktamovým kruhem acylován, což vede k jeho deaktivaci a následné usmrcení buňky. V závislosti na druhu bakterie obsahují buňky tři až osm PBP, které se označují čísly podle molekulové hmotnosti. Vyznačují se také různou citlivostí k jednotlivým antibiotikům. Příkladem je aztreonam, který působí baktericidně pouze na gramnegativní bakterie (Bednář et al. 1999).

Inhibice syntézy bílkovin probíhá na ribosomu a mechanismus účinku závisí na místě působení. Na 30S podjednotku ribozomu se váží jak tetracykliny bránící vazbě aminoacyl-tRNA na příslušné místo ribozomu, tak i aminoglykosidy, které brání vzniku iniciačních komplexů (Bednář et al. 1999). Chloramfenikol vazbou na 50S podjednotku blokuje vznik peptidové vazby inhibicí peptidyltransferázy. Makrolidy inhibují proteosyntézu tím, že po vzniku peptidické vazby brání uvolnění tRNA (Votava 2005).

Vazbou antibiotik na RNA polymerázu dochází k inhibici syntézy mRNA a znemožnění průběhu proteosyntézy. Na tomto principu pracuje například rifampicin patřící mezi ansamycinová antibiotika. Druhou možností je inhibice DNA gyrázy, která je zodpovědná za rozvíjení a následné stáčení řetězce DNA během replikace buňky. Tímto způsobem účinkují chinolony na gramnegativní bakterie (Votava 2005). Poslední z možností jak účinkovat na bakterie je přes poškození cytoplazmatické membrány a změnit tak její propustnosti (Bednář et al. 1999).

3.12.2 Antimikrobiální účinky sójových isoflavonoidů

Kromě antibiotik existují i další, do jisté míry alternativní přístupy k terapii bakteriálních infekcí. Právě vzhledem k rozvoji rezistence bakterií na antibiotika jsou v současné době intenzivně zkoumány. Jednou z alternativ jsou i sojové isoflavonoidy. Nejvíce prozkoumaným sójovým isoflavonoidem je genistein. Jeho antimikrobiální účinky jsou dány schopností inhibovat proteinovou tyrosinkinázu a topoizomerázu II. Inhibicí tyrosinkinázy brání uvolnění tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) a interleukinu-6 (Verdrengh et al. 2004). TNF patří mezi cytokiny a je uvolňován jako odpověď imunitního systému. Při nadměrném vyplavování působí škodlivě a podněcuje apoptózu buněk a nekrózu tkání (Cho et al. 2019). Topoizomeráza II neboli DNA gyráza je enzym nezbytný pro správný průběh transkripce a replikace DNA. Její inhibicí se není buňka schopna dělit a zaniká (Khan et al. 2018). Daidzein

neinhibuje topoizomerázu II s takovou účinností a proto má nižší antimikrobiální aktivitu (Verdrengh et al. 2004).

Nízká biologická využitelnosti iso flavonoidů, která je dána jejich špatnou rozpustností ve vodě a nízkou permeabilitou střev je předmětem mnoha studií. Zkoumána byla biologická derivatizace jako ekologičtější varianta té chemické. Jejím cílem je pomocí mikroorganismů vytvořit nové a stabilnější deriváty, které by jinak synteticky nebylo možné získat. Inkubací genisteinu s *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC 13588 vzniklo pět derivátů. Nejvyšší mikrobiální aktivitu vykazoval 4'-O-isopropylgenistein, který působil inhibičně na methicilin senzitivní SA, MRSA, *Proteus hauserii*, *Salmonella enterica* a *Kocuria rhizophila* (Choi et al. 2018).

Genistein je ve střevech absorbován pasivní difúzí. Rozpuštěním genisteinu nebo použitím ve vodě rozpustného derivátu, vznikne koncentrační gradient, který difuzi urychlí. Potřebný derivát ve formě genistein 7-O-fosfát poskytne inkubace genisteinu s *Bacillus subtilis var natto* BCRC80517. Využitelnost genisteinu je nižší než 5 % a pro terapeutické účinky je vyžadován jeho dlouhodobý a vysoký příjem. Přidáním genistein 7-O-fosfátu, který je defosforylován pomocí alkalické fosfatázy se zvýší koncentrace genisteinu na povrchu kartáčového lemu. Tímto dochází k nárůstu koncentračního gradientu a lepší propustnosti pro genistein (Wang et al. 2015).

3.12.3 Antimikrobiální rezistence

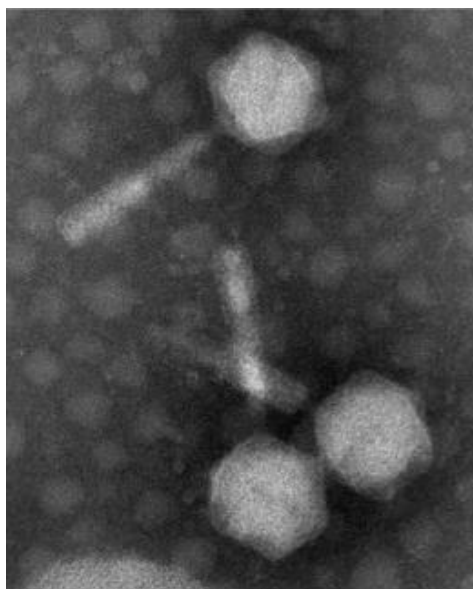
Rezistence vzniká jako odpověď bakterií na účinky antibiotik. Prostřednictvím různých mechanismů snižují účinek antibiotika (WHO 2018). Příkladem jsou gramnegativní bakterie, které změnou velikosti otvorů v buněčné membráně minimalizují množství účinné látky, která se dostane do cytoplazmy. Oproti tomu *Pseudomonas aeruginosa* má v buněčné stěně zabudovaná čerpadla, kterými pumpuje antibiotika z buňky. Jiné bakterie produkcí enzymů degradují léčivo. Například *Klebsiella pneumoniae* takto rozkládá většinu β -laktamových antibiotik. Bakterie se mohou také maskovat změnou struktury cílového receptoru, jako je tomu u *Escherichie coli* nesoucí gen *mcr-1* (CDC 2018).

Každoročně na následky infekcí způsobených rezistentním kmenem bakterie zemře kolem 700 000 lidí. Předpokládá se, že by tento počet mohl vystoupat do roku 2050 až k 10 milionům (Ghosh et al. 2019). Vývoj rezistence je dán evolučně (WHO 2018a), nicméně nadměrné užívání antibiotik jak v humánní medicíně, tak v zemědělství tento postup urychluje (Caffrey et al. 2019).

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří mezi nejrozšířenější rezistentní bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* sp a *Mycobacterium tuberculosis*. Zvýšený výskyt bakteriální rezistence proti antibiotikům zaznamenal Globální systém pro sledování antibiotik ve 22 zemích, zahrnující jak vyspělé tak rozvojové země (WHO 2018a). Pravděpodobnost infekce rezistentní bakterií v zemích, které sdružuje Organizace pro hospodářskou spolupráci a kam také Česká republika patří, byla v roce 2015 17 %. Nejnižší rezistence okolo 5 % je na Islandu, v Norsku a Nizozemsku. Naopak v Rusku, Koreji a Turecku je rezistentních až 35 % bakterií. Předpokládá se, že v zemích třetího světa poroste rezistence až sedmkrát rychleji než v zemích, které jsou součástí Organizace pro hospodářskou spolupráci (OECD 2018).

3.12.4 Alternativy antibiotik

Vzrůstající rezistence bakterií a jejich odolnost proti antibiotikům vede k hledání alternativních způsobů jak v budoucnu antibiotika nahradit. Jednou z možností jsou bakteriofágy, které byly již v minulosti používány k léčbě zvířat. Tyto viry se uchytí na buněčné stěně bakterie a přenesou svoji genetickou informaci do cytoplazmy. Zapojením své DNA do té bakteriální mu umožní syntézu nových bakteriofágů. Po namnožení dochází k destrukci buňky a uvolnění bakteriofágů, kteří jsou připraveni infikovat další bakterie (Ghosh et al. 2019) – viz Obrázek 11.



Obrázek 11: Bakteriofág pod transmisním elektronovým mikroskopem (Yuan et al. 2019).

Hydrolytické enzymy používají predátorské bakterie z rodu *Bdellovibrio* ke zničení gramnegativních bakterií. Vytvořením póru v membráně se dostávají do periplazmatického prostoru, kde vytvoří bdelloblast (Markelova 2010). Cytoplazma napadené bakterie slouží jako zdroj živin pro růst a replikaci (Lambert et al. 2006). Po namnožení buňku lyzují pomocí proteáz a deoxyribonukleáz a šíří se dále (Ghosh et al. 2006).

Nisin je peptid o nízké molekulové hmotnosti, který se běžně používá jako potravní aditivum. Tento bakteriocin produkovaný kmeny *Lactococcus lactis* se ukotví na lipid II v buněčné stěně grampozitivní bakterie. Následným vytvořením pórů, které naruší její stabilitu, dochází k zániku buňky (Sosa Morales et al. 2019). Další z řady zkoumaných bakteriocinů je nukacin-ISK-1 syntetizovaný *Staphylococcus warneri*. Interakcí s lipidy II narušuje syntézu buněčné stěny a je schopný pronikat do biofilmu MRSA (Cavera et al. 2015).

4 Metodika

4.1 Teoretická část

Teoretická část, která byla sepsána formou literární rešerše, obsahuje informace týkající se účinků sóji luštinaté na zdraví člověka, především pak sójových fermentovaných výrobků. Tyto účinky jsou dány přítomností sójových isoflavonoidů o kterých se mimo jiné uvažuje, jako o jedné z alternativních náhrad tradičních antibiotik. Pro vyhledávání zdrojů byly použity výhradně odborné databáze Web of Science, Science Direct a Willey Online Library. Jako klíčová slova pro vyhledávání vědeckých článků a knih byla použita: inhibice, antibiotika, patogeny, mikrobiota a rezistence.

4.2 Praktická část

4.2.1 Materiál použitý v teoretické části práce

4.2.1.1 Bakteriální kmeny

Tabulka 3: Citlivost a kultivační média vybraných kmenů *Staphylococcus aureus* použitých v praktické části

Druh	Kmen	Citlivost	Kultivační médium
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	MSSA	MHB
	ATCC 33591	MSSA	MHB
	ATCC 43300	MRSA	MHB
	ATCC BAA 976	MRSA	MHB
	CCM 6188	MSSA	TSB
	CMM 4442	MSSA	TSB
	klinický izolát 1	MSSA	MHB
	klinický izolát 2	MSSA	MHB
	klinický izolát 3	MSSA	MHB
	EMRSA - 15	MRSA	MHB

Jednotlivé kmeny pocházely z následujících zdrojů:

- ATCC – American Type Culture Collection (Manassas, USA)
- CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Masarykova Univerzita, Brno, ČR)
- klinické izoláty (k. i. 1, k. i. 2, k. i. 3) a epidemický kmen (EMRA – 15) byly poskytnuty Fakultní nemocnicí v Motole (Praha, ČR)

4.2.1.2 Kultivační média

Tabulka 4: Složení použitých kultivačních médií v praktické části (Oxoid, 2019)

Müller-Hinton bujón (MHS)		Trypton sójový bujón (TSB)	
Složení	[g/l]	Složení	[g/l]
Dehydratovaná hovězí infuze	300,0	Pankreatický kasein	17,0
Kasein hydrolyzát	17,5	Enzymaticky štěpené sójové boby	3,0
Škrob	1,5	Chlorid sodný	5,0
		Hydrogenfosforečnan draselný	2,5
		Glukóza	2,5
pH 7,3 ± 0,1 při 25 °C		pH 7,3 ± 0,2 při 25 °C	

4.2.2 Metody použité v praktické části

4.2.2.1 Methanolová extrakce isoflavonoidů ze sojové pasty doenjang

Z doenjangu, sójové fermentované pasty, od značky Haechandle byl odebrán vzorek o hmotnosti 100 g, který byl extrahován ve 100 ml methanolu (Sigma Aldrich, ČR) na třepačce (GFL, Burgwedel, Německo). Extrakce probíhala při 200 otáčkách/min, při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Roztok byl zfiltrován a vložen do vakuové rotační odparky (Büch Labortechnik, Flawil, Švýcarsko), kde byl při 40 °C koncentrován. Následnou lyofilizací byl vysušený vzorek rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (Sigma Aldrich, ČR) a posloužil jako zásobní roztok o koncentraci 51,2 mg/ml. Zásobní roztok byl skladován při – 20 °C.

4.2.2.2 Testování antibakteriálních účinků isoflavonoidů získaných z doenjangu

Minimální inhibiční koncentrace sójových isoflavonoidů byla testována *in vitro* mikrodiluční metodou, která byla prováděna v mikrotitrační destičce s 96 jamkami uspořádaných v 8 řadách po 12 jamkách – viz Tabulka 5. Ze zásobního roztoku (90 µl) byla vytvořena sestupná ředící řada s nejvyšší koncentrací 16 384 µg/ml. Ke standardizaci suspenze jednotlivých bakteriálních kmenů na hustotu 10⁵ CFU/ml byla použita McFarlandova zákalová stupnice s proměřením v nefelometru. Následně byla standardizovaná suspenze o objemu 10 µl naočkována do jamek k zásobnímu roztoku a takto připravené destičky byly vloženy do termostatu na 24 hodin při 37 °C.

4.2.2.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Pro měření zákalu jamek při vlnové délce 405 nm byl použit přístroj Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko). Minimální koncentrace zásobního roztoku isoflavonoidů, které inhibovaly bakterie v jamkách a zapříčinily tak 80 % úbytek růstu vzhledem ke kontrole růstu bakterií (RB) se označují jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). Kontrola citlivosti bakteriálních kmenů k penicilinu G byla provedena stejným způsobem, pouze bylo místo zásobního roztoku isoflavonoidů použito antibiotikum. Pro vizuální kontrolu růstu bylo do všech jamek napipetováno 25 µl methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromidu (MTT; Sigma Aldrich, ČR. Výsledky pro jednotlivé destičky jsou průměry MIC ve sloupcích a ty pak byly použité pro vyhodnocení modusem. Všechny kmeny byly testovány v triplikátech ve třech nezávislých stanoveních.

DOENJANG												
	Bakterie 1						Bakterie 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RB	16384	16384	16384	16354	ČB	RB	16384	16384	16384	16384	ČB
B	RB	8192	8192	8192	8192	ČB	RB	8192	8192	8192	8192	ČB
C	RB	4096	4096	4096	4096	ČB	RB	4096	4096	4096	4096	ČB
D	RB	2048	2048	2048	2048	ČB	RB	2048	2048	2048	2048	ČB
E	RB	1024	1024	1024	1024	ČB	RB	1024	1024	1024	1024	ČB
F	RB	512	512	512	512	ČB	RB	512	512	512	512	ČB
G	RB	256	256	256	256	ČB	RB	256	256	256	256	ČB
H	RB	128	128	128	128	ČB	RB	128	128	128	128	ČB

Tabulka 5: Schéma mikrotitrační destičky pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (A-H, jamky s klesající ředící řadou; RB, růst bakterií; ČB, čistota)

5 Výsledky

Výše uvedeným postupem byla získána data o MIC isoflavonoidů z fermentované sójové pasty *doenjangu* na jednotlivé kmeny *Staphylococcus aureus*. Průměry MIC z každé destičky byly zaznamenány do tabulky, z nichž byl následně stanovený modus, jako nejčastěji se opakující hodnota – viz tabulka 6 ,7. Byla provedena penicilinová kontrola a zjištěné MIC u sbírkových kmenů odpovídají standardním hodnotám.

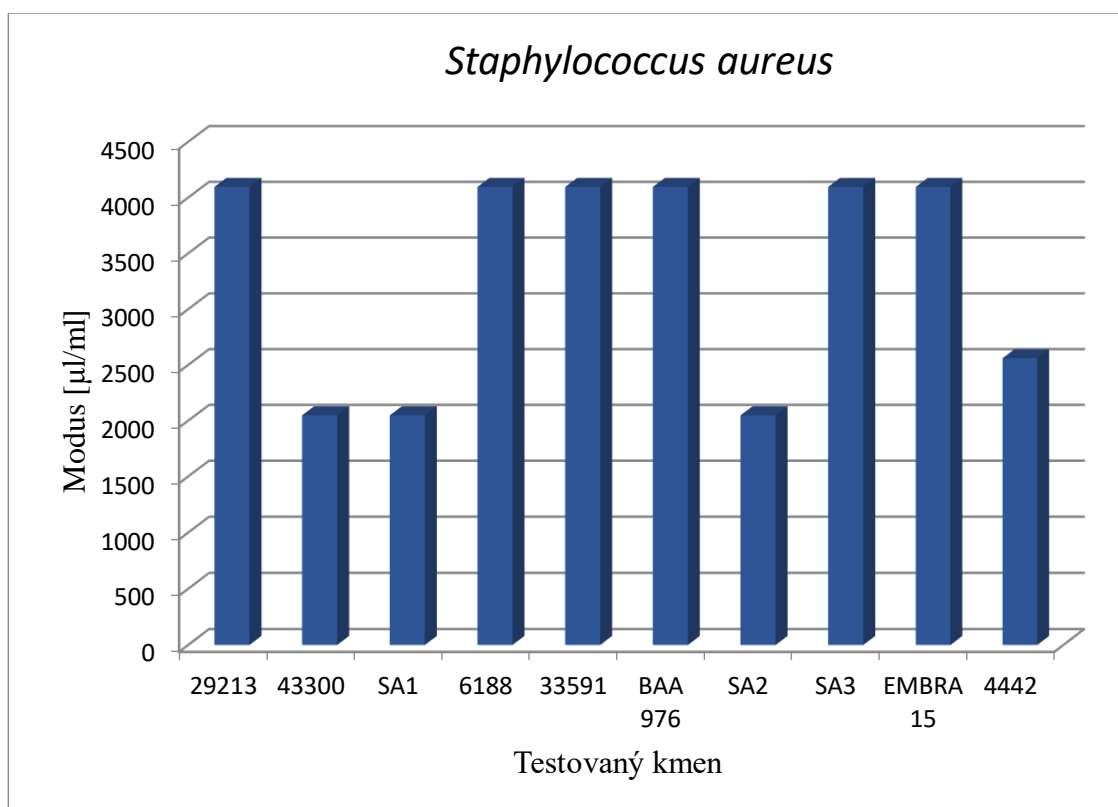
Bakteriální kmen										
DOENJANG	29213	43300	SA1	6188	33591	BAA 976	SA2	SA3	EMRA 15	4442
1	4096	4096	2560	4096	4096	4096	3072	4096	4096	2560
2	4096	2048	2048	4096	4096	4096	3072	4096	4096	4096
3	4096	3413	2048	4096	4096	4096	2048	4096	4096	4096
4	4096	4096	3584	4096	4096	4096	2560	4096	4096	2560
5	4096	4096	4096	4096	4096	4096	2048	4096	4096	2560
6	4096	2048	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	2048
7	4096	2048	3072	4096	4096	4096	2048	4096	4096	3584
8	4096	2048	3584	4096	4096	4096	2048	4096	2560	2560
9	4096	2048	2048	2560	4096	4096	2048	2048	3072	2048
MODUS	4096	2048	2048	4096	4096	4096	2048	4096	4096	2560

Tabulka 6: Minimální inhibiční koncentrace izoflavonoidů proti *Staphylococcus aureus* [mg/ml] (1-9, průměr MIC jednotlivých destiček; MODUS, nejčastěji se opakující hodnota MIC, 29213, 43300, SA1 ,6188, 33591, BAA976, SA2, SA3, EMRA15, 4442- testované kmeny MRSA)

Bakteriální kmen										
	29213	43300	SA1	6188	33591	BAA976	SA2	SA3	EMRA15	4442
A	16384	16384	16384	16384	16384	16384	16384	16384	16384	16384
B	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192
C	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
D	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048
E	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
F	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
G	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
H	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128

Tabulka 7: Schéma destičky značící hodnoty, při kterých došlo k 80% úbytku růstu MRSA (A-H, jamky s ředící řadou; 29213, 43300, SA1 ,6188, 33591, BAA976, SA2, SA3, EMRA15, 4442- testované kmeny MRSA; zelená barva, inhibice růstu; červená barva, nárůst bakterie)

Všech testované kmeny byly působením isoflavonoidů inhibovány. MIC se pohybovaly v rozmezí 2048-4096 $\mu\text{l/ml}$. Nejcitlivější na antibakteriální účinky byl kmen ATCC 43300, jehož růst byl inhibován při koncentraci 2048 $\mu\text{l/ml}$. V přítomnosti isoflavonoidů s koncentrací 2048 $\mu\text{l/ml}$ byl potlačen také růst klinických izolátů SA 1 a SA 2. Při MIC 4096 $\mu\text{l/ml}$ byl inhibován růst 60 % testovaných MRSA kmenů, konkrétně: ATCC 29213, CCM 6188, ATCC 33591, ATCC BAA 976, klinický izolát SA 3 a EMRA-15. Růst CMM 442 byl inhibován v přítomnosti isoflavonoidů o koncentraci 2560 $\mu\text{l/ml}$. Lze konstatovat, že isoflavonoidy sójových fermentovaných produktů vykazují antibakteriální účinek proti MRSA.



Graf 4: Modus minimálních inhibičních hodnot proti nárůstu MRSA (29213, 43300, SA1, 6188, 33591, BAA976, SA2, SA3, EMRA15, 4442- testované kmeny)

6 Diskuze

Podle odhadů WHO (2018) mají lidé, kteří onemocněli MRSA až o 64 % vyšší pravděpodobnost, že na následky infekce zemřou, než lidé nakažení nerezistentní bakterií. Toto vysoké číslo vede k hledání alternativních způsobů jak nahradit tradiční antibiotika v boji proti rezistentním bakteriím. Jednou z možností jsou i sojové isoflavonoidy, jejichž antibakteriální účinky na MRSA byly dokázány v předchozí kapitole. Výsledky měření, které byly předmětem praktické části předložené diplomové práce jsou podpořeny mnoha studiemi.

Hummelová et al. (2014) testovali in vitro antimikrobiální účinky isoflavonoidů na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Největší antibakteriální účinek vykazoval demethyltexasin (6,7,4'-trihydroxyisoflavon) na SA s MIC 16 µg/ml. Kromě SA vykazoval demethyltexasin inhibiční účinek na *Bacillus cereus* a *Staphylococcus epidermidis* se shodnou MIC, která byla 32 µg/ml. Jako druhý nejúčinnější metabolit byl stanoven biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) s MIC 32 µg/ml ke *Streptococcus pyogenes*. *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus* byly biochaninem A inhibovány při stejné MIC 64 µg/ml. MIC genisteinu (5,7,4'-trihydroxyisoflavon) pro potlačení růstu *Streptococcus pyogenes* byla 64 µg/ml.

Demethyltexasin byl Hummelová et al. (2014) vybrán jako metabolit s nejsilnější antimikrobiální aktivitou pro testování kmenů SA. Všechny kmeny SA byly úspěšně inhibovány v rozmezí 16-128 µg/ml. Nejvyšší citlivost na demethyltexasin měly kmeny MSSA (MS 12001), MRSA (CCM 7112), MRSA (MR 12004) a TRSA (TR12001), které byly inhibovány při MIC 16 µg/ml. Nejméně senzitivní na demethyltexasin byly kmeny MSSA (ATCC 25923), MRSA (ATCC 43300), MRSA (ATCC BAA-976) a MRSA (ATCC 33591) pro jejichž inhibici byla potřeba MIC 128 µg/ml. Dále poukazují na to, že antimikrobiální účinnost je ovlivněna polohou hydroxylové vazby na pyranu ve struktuře metabolitů. Nejvyšší aktivitu vykazovaly metabolity s hydroxylovou skupinou na uhlíku C5, C6 a C7.

Choi et al. (2018) se ve své práci zabývali metodou biologické derivatizace k získání nových derivátů genisteinu, které by měly vyšší antimikrobiální aktivitu než zmíněný aglykon. Inkubací genisteinu s *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC 13588 vzniklo pět derivátů. Pouze jeden, 4'-O-isopropylgenistein, vykazoval antimikrobiální účinky: proti MRSA, methicilin senzitivní *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Proteus hauserii*, *Salmonella enterica* a *Kocuria rhizophila*. MIC 4'-O-isopropylgenisteinu pro MRSA byly stanoveny v rozmezí 64-128 µg/ml.

Konkrétně pro kmeny SA (CCARM 3640) byla MIC 64 µg/ml, SA (CCAMR 3634 128) µg/ml a SA (ATCC 33591) 64 µg/ml. Pro potlačení růstu *Proteus hauserii*, *Salmonella enterica* a *Kocuria rhizophila* byla naměřena shodná MIC 32 µg/ml. Nejcitlivějšími kmeny byly MSSA, kdy pro potlačení růstu SA (CCARM 0205) a SA (CCARM 0204) postačila koncentrace 8 µg/ml. Oproti tomu genistein při koncentraci 128 µg/ml neinhiboval žádný z testovaných kmenů.

Další z možností jak podpořit antimikrobiální aktivitu isoflavonoidů, je zvýšit jejich absorpci ve střevě. K tomuto zkoumání byl použit genistein 7-O-fosfát, jako více rozpustný derivát, který vznikl inkubací aglykonu s *Bacillus subtilis var natto BCRC80517*. Studie byla založena na schopnosti alkalické fosfatázy defosforylace genistein 7-O-fosfátu ve střevě a tím zvýšit koncentrační gradient vedoucí k lepší propustnosti genisteinu přes membránu enterocytů. Pro testování *in vitro* byly použity Caco-2 buňky (Wang et al. 2015), které jsou podle Sambuy et al. (2015) využívány pro svou podobnost se střevními epiteliálními buňkami. Původně byly tyto buňky odvozeny z lidského kolorektálního adenokarcinomu za účelem zkoumání absorpčního mechanismu (Marziano et al. 2019).

Předmětem studie Hong et al. (2006) byl vliv genisteinu na probiotické bakterie *Lactobacillus reuteri* a na vybrané enteropatogenní bakterie. Jako zástupci nejvýznamnějších enteropatogenů byly vybrány SA, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* a *Klebsiella pneumoniae*. Účinek genisteinu byl stanoven jako úbytek počtu kolonií tvořících jednotek oproti kontrole. Genistein o koncentraci 100 µM výrazně snížil počet kolonií tvořících jednotek pouze u SA, zahrnující kmeny MRSA. Stejná koncentrace genisteinu nárůst ostatních testovaných bakterií neovlivnila. Ze studie vyplývá, že je možné uvažovat o kombinaci *Lactobacillus reuteri* s genisteinem za účelem zvýšit účinek antibiotik.

Výsledky předchozí studie potvrzuje výzkum Verdrengh et al. (2004), kteří publikovali, že účinkem genisteinu o koncentraci 100 µM se sníží nárůst SA zahrnující i kmeny MRSA, *Streptococcus pasteurianus* a *Bacillus cereus*. Testovány byly také *Escherichia coli* a *Helicobacter pilory* jako zástupce gramnegativních bakterií. Zatímco kmeny *Helicobacter pilory* byly v přítomnosti genisteinu inhibovány, *Escherichia coli* nikoliv. Nejvyššího inhibičního účinku bylo dosaženo při inkubaci MSSA LS-1, který byl zaočkován do bujónu s genisteinem o koncentraci 100 µM a inkubován 10 hodin. S delší inkubací inhibiční aktivita klesala pravděpodobně rozkladem genisteinu.

Kromě isoflavonoidů jsou bioaktivními látkami v sójových bobech také peptidy. Methylové podjednotky peptidů s dlouhým řetězcem, které vazbou na buněčnou stěnu bakterie vytvoří póry, čím naruší permeabilitu membrány a buňka zaniká (Pina-Pérez & Ferrús Pérez 2018). Sitohy et al. (2013) zkoumali antimikrobiální aktivitu dvou methylovaných podjednonek sójových proteinů (MSP) 7S a 11S. Citlivost testovaných bakterií *Listeria monocytogenes* a *Salmonella Enteritidis* na methylované podjednotky byla porovnána s účinkem penicilinu. K inhibici růstu *Listeria monocytogenes* o 50 % došlo v přítomnosti MSP o koncentraci 17 µg/ml, což jsou hodnoty téměř totožné s penicilinovou kontrolou (16 µg/ml). Růst *Salmonella Enteritidis* byl inhibován o 50 % po přidavku MSP o koncentraci 15 µg/ml. Inhibice růstu při inkubaci s penicilinem se projevila až při 85 µg/ml. Nižší koncentrace MSP potřebná k potlačení růstu ve srovnání s penicilinovou kontrolou naznačuje vyšší antibakteriální účinek vůči gramnegativním bakteriím s rezistencí na penicilin.

Kromě antimikrobiálních účinků sójových isoflavonoidů je známá také jejich antioxidační aktivita. Z fermentované pasty doenjang byly extrakcí se směsí acetonitrilu a methanolu získány čtyři sloučeniny identifikované jako daidzein, genistein, glycitein a 6,7,4'-trihydroxyisoflavon. Testována byla antioxidační aktivita proti volným radikálům 1,1-difeny-2-pikrylhydrazyl (DPPH) a superoxidu. Z uvedených sloučenin měl nejvyšší antioxidační aktivitu 6,7,4'-trihydroxyisoflavon. Jeho koncentrace $31.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$ snížila množství DPPH o polovinu a stejný účinek měl při $50.0 \pm 2.5 \mu\text{M}$ i na superoxid (Roh et al 2011).

7 Závěr

V teoretické části práce jsou formou literární rešerše sepsány poznatky o původu sóji, živinovém složení sójových bobů, jejich charakteristika z hlediska chemické struktury a proces biosyntézy izoflavonoidů. Hlavní část teorie je věnována fermentovaným sójovým produktům a jejich účinkům na lidské zdraví. Kromě pozitivně působících bioaktivních látek jako jsou izoflavonoidy či methylované peptidy, obsahují řadu antinutitivních látek. Nutno podotknout, že malé koncentrace těchto látek mohou být prospěšné.

Antibakteriální aktivita vyextrahovaných isoflavonoidů byla stanovena *in vitro* mikrodiluční metodou v mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Testováno bylo 10 kmenů methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a růst všech kmenů byl působením izoflavonoidů inhibován. Inhibiční koncentrace se pohybovaly v rozmezí 2048-4096 $\mu\text{g/ml}$. Nejcitlivější na antibakteriální účinky byly kmeny ATCC 43300 a klinické izoláty SA 1 A SA2, které byly inhibovány v přítomnosti izoflavonoidů o koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$.

Vzhledem k výsledkům získaných v praktické části, které jsou podpořené řadou studií, mohou být do budoucna sójové izoflavonoidy využité jako vhodná alternativa k tradičním antibiotikům.

8 Literatura

- Al Loman A, Ju LK. 2017. Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects. *Enzyme and Microbial Technology* **106**:35-47.
- Albert Dhayakaran RP, Neethirajan S, Xue J, Shi J. 2015. Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilm. *LWT - Food Science and Technology* **63**:859-865.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**:426-436.
- Azzeh FS, Al-Hebshi AH, Al-Essimii HD, Mohammed A. Alarjah MA. 2017. Vitamin C supplementation and serum uric acid: A reaction to hyperuricemia and gout disease. *PharmaNutrition* **5**:47-51.
- Bacanli M, Başaran N. 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology* **125**:462-466.
- Badole SL, Bodhankar SL. 2013. Chapter 8 - Glycine max (Soybean) Treatment for Diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*: 77-82.
- Barakat H, Reim V, Rohn S. 2015. Stability of saponins from chickpea, soy and faba beans in vegetarian, broccoli-based bars subjected to different cooking techniques. *Food Research International* **76**:142-149.
- Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. 1999. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Marvil, Praha.
- Bharadwaz M, Manna P, Das D, Dutta N, Kalita J, Unni B, Deka Boruah HP. 2017. Isolation, purification, and characterization of staphylocoagulase, a blood coagulating protein from *Staphylococcus* sp. MBBJP S43. *International Journal of Biological Macromolecules* **102**:1312-1321.
- Burton JW. 1977 Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research* **53**:171-186 .

- Caffrey N, Invik J, Waldner CL, Ramsay D, Checkley SL. 2019. Risk assessments evaluating foodborne antimicrobial resistance in humans: A scoping review. *Microbial Risk Analysis* **11**:31-46.
- Carvalho EVMM, Oliveira WF, Coelho LCBB, Correia MTS. 2018. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sciences* **207**:152-157.
- Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Michael L. Chikindas ML. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* **46**:494-501.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health, *Molecular and Cellular Endocrinology* **355**:192-200.
- ČSÚ. 2019. Odhady sklizně. Český statistický úřad, Praha. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/odhady-sklizne-operativni-zprava-k-15-8-2018> (accessed March 2019).
- DCD. 2018. How Antibiotic Resistance Happens. U. S. Department of Health and Human Services. Atlanta. Available from <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html> (accessed April 2019).
- de Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**:31-63.
- Dereven'kov IA, Salnikov DS, Silaghi-Dumitrescu R, Makarov SV, Koifman OI. 2016. Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. *Coordination Chemistry Reviews* **309**:68-83.
- Di Cera E. 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*. **61**:510-515.
- Dixon RA, Steele CL. 1999. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4**:394-400.
- Domínguez-Vega E, García MC, Crego AL, Marina ML. 2010. First approach based on direct ultrasonic assisted enzymatic digestion and capillary-high performance liquid chromatography for the peptide mapping of soybean proteins. *Journal of Chromatography A* **1217**:6443-6448.

- El Shatshat A, Pham AT, Rao PPN. 2019. Interactions of polyunsaturated fatty acids with amyloid peptides A β 40 and A β 42. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **663**:34-43.
- Elez Garofulić I, Dragović-Uzelac V, Režek Jambrak A, Jukić M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering* **117**:437-442.
- El-Hady EAA, Habiba RA. 2003. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds, *LWT - Food Science and Technology* **36**:285-293.
- Fei Y, Li L, Chen L, Zheng Y, Yu B. 2018. High-throughput sequencing and culture-based approaches to analyze microbial diversity associated with chemical changes in naturally fermented tofu whey, a traditional Chinese tofu-coagulant. *Food Microbiology* **76**:69-77.
- Fields C, Mallee P, Muzard J, Lee GU. 2012. Isolation of Bowman-Birk-Inhibitor from soybean extracts using novel peptide probes and high gradient magnetic separation. *Food Chemistry* **134**:1831-1838.
- Flohrová A. 2001: Zkušenosti s pěstováním sóji v zahraničí a ČR. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha.
- Foster TJ. 2019. Can β -Lactam Antibiotics Be Resurrected to Combat MRSA?. *Trends in Microbiology* **27**:26-38.
- Friedman M, Brandon DL. 2001. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:1069-1086.
- Gemedde HF, Ratta N. 2014. Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* **3**:284-289.
- Gendron St-Marseille AF, Bourgeois G, Brodeur J, Mimee B. 2019. Simulating the impacts of climate change on soybean cyst nematode and the distribution of soybean. *Agricultural and Forest Meteorology* **264**:178-187.
- Ghosh C, Sarkar P, Issa R, a Haldar J. 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology* **27**:323-338.

- Grispoldi L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, Popescu PA, Pandolfi F, Cenci-Goga BT. 2019. Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows, *Journal of Dairy Science* **102**:1059-1065.
- Guo J, Yang XQ. 2015. *Modifying Food Texture*. Woodhead Publishing.
- Han BZ, Frans FM, Nout MJR. 2001. A Chinese fermented soybean food. *International Journal of Food Microbiology* **65**:1-10.
- He H, Li X, Kong X, Hua Y, Chen Y. 2017. Heat-induced inactivation mechanism of soybean Bowman-Birk inhibitors. *Food Chemistry* **232**:712-720.
- Heinonen SM, Hoikkala A, Wähälä K, Adlercreutz K. 2003. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects.: Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **87**:285-299.
- Hong H, Landauer MR, Foriska MA, Lendney GD. 2006. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *Jurnal of Basic Microbiology*. **46**:329–335.
- Horn J, Stelzner K, Rudel T, Fraunholz M. 2018. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *International Journal of Medical Microbiology* **308**:607-624.
- Hummelova, J, Rondevaldova J, Balastikova A, Lapcik O, Kokoska L. 2015. Relationship between structure and in vitro antibacterial activity of selected isoflavones and their metabolites with special focus on antistaphylococcal effect of demethyltaxasin. *Letters in applied microbiology* **60**:242-247.
- Chancharoonpong C, Hsieh PC, Sheu SC. 2012. Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation. *APCBEE Procedia* **2**:57-61.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **34**:540-560.

- Chen J, Wang J, Song P, Ma X. 2014. Determination of glycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay *Food Chemistry* **162**:27-33.
- Chen Y, Xu Z, Zhang C, Kong X, Hua Y. 2014. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. *Food Chemistry* **154**:108-116.
- Chitrakar I, Kim-Holzappel DM, Zhou W, French JB. 2017. Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *Journal of Structural Biology* **197**:354-364.
- Cho O, Jang YJ, Park KY, Heo TH. 2019. Beneficial anti-inflammatory effects of combined rosuvastatin and cilostazol in a TNF-driven inflammatory model. *Pharmacological Reports* **71**:266-271.
- Choi H, Park JS, Kim KM, Kim M, Ko KW, Hyun CG, Ahn JW, Seo JH, Kim SY. 2018. Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **63**:255-261.
- Inoue K, Gotou T, Kitajima H, Mizuno S, Nakazawa T, Yamamoto N. 2009. Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **108**:111-115.
- Inoue Y, Kato S, Saikusa M, Suzuki C, Otsubo Y, Tanaka Y, Watanabe H, Hayase F. 2016. Analysis of the cooked aroma and odorants that contribute to umami aftertaste of soy miso (Japanese soybean paste). *Food Chemistry* **213**:521-528.
- Kalaiselvan V, Kalaivani M, Vijayakumar A, Sureshkumar K, Venkateskumar K. 2010. Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a therapeutic agents. *Pharmacognosy Reviews* **4**:111-7.
- Kamo S, Suzuki S, Sato T. 2014. The content of soyasaponin and soyasapogenol in soy foods and their estimated intake in the Japanese. *Food Science and Nutrition* **2**:289–297.
- Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, Inazawa K, Yamaoka N. 2014. Total Purine and Purine Base Content of Common Foodstuffs for Facilitating Nutritional Therapy for Gout and Hyperuricemia. *Biological and Pharmaceutical* **37**: 709-721

- Khan F, Khan RH, Sherwani A, Mohmood S, Azfer MA. 2002. Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor* **8**:293-300
- Khan T, Sankhe K, Suvarna V, Sherje A, Patel K, Dravyakar B. 2018. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **103**:923-938.
- Kim MJ, Kwak HS, Kim SS. 2018. Effects of salinity on bacterial communities, Maillard reactions, isoflavone composition, antioxidation and antiproliferation in Korean fermented soybean paste (doenjang). *Food Chemistry* **245**: 402-409.
- Kong W, Baeyens J, De Winter K, Urrutia AR, Degreève J, Zhang H. 2019. An energy-friendly alternative in the large-scale production of soybean oil. *Journal of Environmental Management* **230**:234-244.
- Kumhom T, Elkamel A, Douglas PL, Douglas S, Pongamphai S, Teppaitoon W. 2011. Prediction of isoflavone extraction from soybean meal using supercritical carbon dioxide with cosolvents. *Chemical Engineering Journal* **172**:1023-1032.
- Lambert C, Morehouse KA, Chang CY, Sockett RE. 2006. *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Current Opinion in Microbiology* **9**:639-644.
- Lavín de Juan L, García Recio V, Jiménez López P, Girbés Juan T, Cordoba-Diaz M, Cordoba-Diaz D. 2017. Pharmaceutical applications of lectins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **42**:126-133.
- Lee JH, Choung MG. 2011. Determination of optimal acid hydrolysis time of soybean isoflavones using drying oven and microwave assisted methods. *Food Chemistry* **129**:577-582.
- Lee JS, Bae YM, Han A, Sun-Young Lee SY. 2016. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp.. *LWT- Food Science and Technology* **73**:707-714.
- Li H, Pordesimo L, Weiss J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International* **37**:731-738.

- Li X, Hua Y, Chen Y, Kong X, Zhang C, Yu X. 2017. An advance for removing antinutritional protease inhibitors: Soybean whey purification of Bowman-Birk chymotrypsin inhibitor by combination of two oppositely charged polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **164**: 349-357.
- Lin CC, Wu PS, Liang DW, Kwan CC, Chen YS. 2012. Quality, Antioxidative Ability, and Cell Proliferation-Enhancing Activity of Fermented Black Soybean Broths with Various Supplemental Culture Medium. *Journal of Food Science* **77**:95-101.
- Liu Y, Song H, Luo H. 2018. Correlation between the key aroma compounds and gDNA copies of *Bacillus* during fermentation and maturation of natto. *Food Research International* **112**:175-183.
- Livermore DM. 2006. Can β -lactams be re-engineered to beat MRSA?. *Clinical Microbiology and Infection* **12**:11-16.
- Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry* **105**:325-333.
- Ma Y, Wu X, Giovanni V, Meng X. 2017. Effects of soybean oligosaccharides on intestinal microbial communities and immune modulation in mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**:114-121.
- Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology* **213**:8-14.
- Makarska-Bialokoz M, Lipke A. 2019. Study of the binding interactions between uric acid and bovine serum albumin using multiple spectroscopic techniques. *Journal of Molecular Liquids* **276**:595-604.
- Markelova NY. 2010. Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**:428-431.
- Marui J, Tada S, Fukuoka M, Wagu Y, Shiraishi Y, Kitamoto N, Sugimoto T, Hattori R, Suzuki S, Kusumoto KI. 2013. Reduction of the degradation activity of umami-enhancing purinic

- ribonucleotide supplement in miso by the targeted suppression of acid phosphatases in the *Aspergillus oryzae* starter culture. *International Journal of Food Microbiology* **166**:238-243.
- Marziano M, Tonello S, Cantù E, Abate G, Vezzoli M, Rungratanawanich W, Serpelloni M, Lopomo NF, Memo M, Sardini E, Uberti D. 2019. Monitoring Caco-2 to enterocyte-like cells differentiation by means of electric impedance analysis on printed sensors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1863**:893-902.
- Mirani ZA, Aziz M, Khan MN, Lal I, Hassan N, Khan SI. 2013. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacilin. *Microbial Pathogenesis* **61-62**:66-72.
- Moy YS, Lu TJ, Chou CC. 2012. Volatile components of the enzyme-ripened sufu, a Chinese traditional fermented product of soy bean. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **113**:196-201.
- Mustafa A, Turner C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* **703**:8-18.
- Ndrepepa G. 2018. Review: Uric acid and cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* **484**:150-163.
- OECD. 2018. Stopping antimicrobial resistance would cost just USD 2 per person a year. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available from <http://www.oecd.org/health/stopping-antimicrobial-resistance-would-cost-just-usd-2-per-person-a-year.htm> (accessed April 2019).
- Park KY, Jung KO, Sook-Hee Rhee SH, Yung Hyun Choi YH. 2003. Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **523**:43-53.
- Perkins EG. 1995. *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*.
- Picó Y. 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **43**:84-99.
- Pina-Pérez MC, Ferrús Pérez MA. 2018. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science and Technology* **72**:114-124.

- Pitchaiah KC, Sujatha K, Deepitha J, Ghosh S, Sivaraman N. 2019. Recovery of uranium and plutonium from pyrochemical salt matrix using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* **147**:194-204.
- Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry reviews proceedings* **9**:425-474.
- Prabhat P, Rao A, Kumar P, Tomar BS. 2016. Supercritical fluid extraction and purification of uranium from crude sodium diuranate. *Hydrometallurgy* **164**:177-183.
- Price SJ, Pangloli P, Krishnan HB, Dia VP. 2016. Kunitz trypsin inhibitor in addition to Bowman-Birk inhibitor influence stability of lunasin against pepsin-pancreatin hydrolysis. *Food Research International* **90**:205-215.
- Roh C, Jung U, Jo SK. 2011. 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone from Doenjang inhibits lipid accumulation. *Food Chemistry* **129**:183-187.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* **1012**:119-128.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta* **522**:169-177.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, *Cell Biology and Toxicology* **21**:1-26
- Shao S, Duncan AM, Yang R, Marccone MF, Rajcan I, Tsao R. 2011. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. *Food Research International* **44**:2425-2434.
- Shiga K, Gomi K, Nishimura M, Watanabe M, Nomura F, Kajiyama N. 2013. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci by detection of penicillin-

- binding protein 2 and penicillin-binding protein 2' using a bioluminescent enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods* **388**:40-45.
- Shin D, Jeong D. 2015. Korean traditional fermented soybean products: Jang. *Journal of Ethnic Foods* **2**:2-7
- Singh B, Singh JP, Singh N, Kaur A. 2017. Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. *Food Chemistry* **233**:540-549.
- Sirotkin AV, Harrath AH. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology* **741**:230-236.
- Sitohy M, Mahgoub S, Osman A, El-Masry R, Al-Gaby A. 2013. Extent and Mode of Action of Cationic Legume Proteins against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. *Probiotics and antimicrobial proteins* **5**:195-205.
- Song HY, El Sheikha AF, Hu DM. 2019. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. *Trends in Food Science & Technology* **86**:553-562.
- Soni M, Rahardjo TWB, Soekardi R, Sulistyowati Y, Lestariningsih, Yesufu-Udechuku A, Irsan A, Hogervorst E. 2014. Phytoestrogens and cognitive function: a review. *Maturitas* **77**:209-220.
- Sosa Morales MC, Juárez AC, Montich GG, Álvarez RMS. 2019. Interaction of the antibiotic peptide nisin with anionic membranes in different phase-states: a vibrational study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **215**:389-397.
- Statista. 2019a. Soybean production worldwide 2012/13-2018/19, by country. Statista New York. Available from <https://www.statista.com/statistics/263926/soybean-production-in-selected-countries-since-1980/> (accessed March 2019).
- Statista. 2019b. Vegetable oils: global consumption by oil type 2013/14 to 2018/2019. Statista New York. Available from <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> (accessed March 2019).

- Sugiyama A, Yamazaki Y, Hamamoto S, Takase H, Yazaki K. 2017. Synthesis and Secretion of Isoflavones by Field-Grown Soybean. *Plant* **58**:1594-1600.
- Sun X, Lyu G, Luan Y, Zhao Z, Yang H, Dan Su D. 2018. Analyses of microbial community of naturally homemade soybean pastes in Liaoning Province of China by Illumina Miseq Sequencing. *Food Research International* **111**:50-57.
- Szultka M, Buszewski B, Papaj K, Szeja W, Rusin A. 2013. Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. *Trends in Analytical Chemistry* **47**:47-67.
- Terigar BG, Balasubramanian S, Boldor D, Xu Z, Lima M, Sabliov CM. 2010. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresource Technology* **101**:2466-2471.
- Tiwari BK. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry* **71**:100-109.
- Vagadia BH, Vanga SK, Raghavan V. 2017. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review. *Trends in Food Science and Technology* **64**:115-125.
- Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A* **1216**:7143-7172.
- Vandenborre G, Smaghe G, Van Damme EJM. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* **72**:1538-1550.
- Vasconcelos IM, Oliveira JTA. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* **44**:385-403.
- Verdrengh M, Collins LV, Bergin P, Tarkowski A. 2004. Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. *Microbes and Infection* **6**:86-92.
- Visentini FF, Perez AA, Santiago LG. 2019. Self-assembled nanoparticles from heat treated ovalbumin as nanocarriers for polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* **93**:242-252.

- Votava M. 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.
- Votava M. 2005. Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno.
- Wang CC, Prasain JK, Barnes S. 2002. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B* **777**:3-28.
- Wang ST, Fang TF, Hsu C, Chen CH, Lin CJ, Su NW. 2015. Biotransformed product, genistein 7-O-phosphate, enhances the oral bioavailability of genistein. *Journal of Functional Foods* **13**:323-335.
- Wen C, Zhang J, Zhang H, Dzah CS, Zandile M, Duan Y, Ma H, Luo X. 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **48**:538-549.
- WHO. 2018. Antimicrobial resistance. World Health Organisation, Geneva. Available from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed April 2019).
- WHO. 2018a. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. World Health Organisation, Geneva. Available from <https://www.who.int/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows> (accessed April 2019).
- Wiciński M, Leis K, Szyperski P, Węciewicz MM, Mazur E, Pawlak-Osińska K. 2018. Impact of resveratrol on exercise performance: A review. *Science & Sports* **33**:207-212.
- Wijewardana C, Reddy KR, Bellaloui N. 2019. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry* **278**:92-100.
- Yao X, Ding Z, Xia Y, Wei Z, Luo Y, Feleder C, Dai Y. 2012. Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by scopoletin and underlying mechanisms. *International Immunopharmacology* **14**:454-462.
- Yılmaz EŞ, Aslantaş Ö. 2017. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **10**:1059-1064.

- Yuan Y, Qu K, Tan D, Li X, Wang L, Cong C, Xiu Z, Xu Y. 2019. Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis* **128**:329-336.
- Zehring J, Reim V, Schröter D, Neugart S, Schreiner M, Rohn S, Maul R. 2015. Identification of novel saponins in vegetable amaranth and characterization of their hemolytic activity. *Food Research International* **78**:361-368.
- Zhan J, Twardowska I, Wang S, Wei S, Chen Y, Ljupco M. 2019. Prospective sustainable production of safe food for growing population based on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) crops under Cd soil contamination stress. *Journal of Cleaner Production* **212**:22-36.
- Zhang X, Li X, Liu Q, Ke S, Ji Y, Liu S, Sui G. 2019. Rapid and semiquantitative detection of *Staphylococcus epidermidis* in humor samples by microfluidic platform. *Sensors and Actuators B: Chemical* **278**:8-14.

