

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

PAVLÍNA ZEDNÍČKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agromická fakulta
Ústav chemie a biochemie



Agromická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



Sója – funkční potravina
Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Pavlína Zedníčková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Sója – funkční potravina vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce profesoru RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D. za odborné vedení, paní laborantce Jaromíře Kroupové za pomoc v laboratoři, Gabče Slavičkové za zprostředkování pomoci, Michalu Polákovi za pomoc při statistickém zpracování, mamince Věře Zedníčkové za revizi a Vojtovi za pevné nervy.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce pojednává o sóji jako o funkční potravíně. Funkční potravina obsahuje složky, které pozitivně ovlivňují lidské zdraví. Takových složek – nutriceutik má sója hned několik. Mezi velmi ceněné patří fytoestrogeny. Tyto rostlinné látky mají slabý estrogení účinek a jsou důležitou součástí lidské výživy. Příznivě působí zejména při prevenci osteoporózy, rakoviny prsu či prostaty, kardiovaskulárních onemocnění nebo potíží při menopauze. V experimentální části se sledoval obsah isoflavonů v různých druzích sójových potravin, včetně samotných sójových bobů. Jako metoda byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem.

KLÍČOVÁ SLOVA

sója, funkční potraviny, fytoestrogeny, isoflavony, HPLC, hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT

This diploma thesis is about soybean as functional food. Functional food contain components with positive effect on human health. In soybean there are lot of these components and very valued are phytoestrogens. Phytoestrogens has estrogenic activity with positive effect in prevention of osteoporosis, breast and prostate cancer, cardiovascular disease and menopausal problems. In experimental part was measured level of isoflavones in different kinds of soy food. The method for separation was high performance liquid chromatography with mass spectrometry.

KEY WORDS

soybean, functional food, phytoestrogens, isoflavones, HPLC, mass spectrometry

OBSAH

1	Úvod	11
2	Cíl práce.....	12
3	Funkční potraviny.....	13
3.1	Rozdělení funkčních potravin.....	13
3.1.1	Pravé funkční potraviny.....	13
3.1.2	Nepřavé funkční potraviny	14
3.2	Významná nutriceutika.....	14
3.2.1	Probiotika, prebiotika a synbiotika.....	14
3.2.2	Potravní vláknina.....	15
3.2.3	Antioxidanty	16
3.2.4	Složky tuků.....	16
3.2.5	Peptidy a bílkoviny.....	17
3.2.6	Fytochemické látky	17
4	Sója.....	18
4.1	Popis rostliny	18
4.2	Pěstování a sklizeň	18
4.3	Chemické složení sojových bobů	19
4.3.1	Bílkoviny	19
4.3.2	Lipidy	20
4.3.3	Sacharidy	21
4.3.4	Polyfenoly.....	21

4.3.4.1	Fytoestrogeny	22
4.3.4.1.1	Isoflavony	23
4.3.4.1.2	Lignany	25
4.3.4.1.3	Kumestany	25
4.3.4.1.4	Stilbeny	25
4.3.5	Inhibiční látky.....	26
4.4	Mechanismus účinku	26
4.5	Vliv na zdraví člověka	28
4.5.1	Rakovina prsu a prostaty	29
4.5.2	Kardiovaskulární onemocnění	30
4.5.3	Menopauza.....	31
4.5.4	Vliv ostatních složek semene sóji.....	32
4.6	Výrobky ze sóji.....	34
4.6.1	Fermentované	34
4.6.1.1	Sojové omáčky	34
4.6.1.2	Miso.....	35
4.6.1.3	Tempeh.....	35
4.6.1.4	Natto	35
4.6.2	Nefermentované.....	35
4.6.2.1	Sojové mléko a nápoje	35
4.6.2.2	Tofu	36
4.7	Metody stanovení isoflavonů v biologických matricích	36
4.7.1	Příprava vzorku	36
4.7.2	Extrakce a přečištění.....	37

4.7.2.1	Soxhletova extrakce	38
4.7.2.2	Extrakce pevnou fází (SPE)	38
4.7.3	HPLC	38
4.7.4	Detekce	39
4.7.4.1	Detektor diodového pole	39
4.7.4.2	Hmotnostní spektrometrie	40
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
5.1	Materiál.....	42
5.1.1	Vzorky	42
5.1.2	Chemikálie.....	43
5.1.3	Přístroje a pomůcky	43
5.1.4	Software.....	44
5.2	Metodika.....	44
5.2.1	Příprava vzorků	44
5.2.2	Podmínky HPLC	44
5.2.3	Laboratorní měření	45
5.2.4	Statistické zpracování výsledků.....	46
5.3	Výsledky.....	48
6	Diskuze	58
7	Závěr.....	61
8	Použitá literatura.....	63
9	Seznam obrázků.....	70
10	Seznam tabulek.....	71

11	Seznam zkratek.....	72
	Přílohy	74
	Seznam příloh.....	81

1 ÚVOD

Funkční potraviny jsou jednou z nejvíce se rozvíjející oblastí vědy. Tyto produkty jsou zajímavé jak z pohledu spotřebitele, tak průmyslu. Spotřebitele lákají z pohledu udržování dobrého zdravotního stavu a předcházení nemocí, a že jsou to potraviny pocházející z přírodních zdrojů. Potravinářský průmysl tuhle myšlenku spotřebitelů podporuje a těží z přidané hodnoty výrobků.

Sója jako funkční potravina je jednou ze surovin s nejvyšším potenciálem. Sojové boby jsou jednou z nejvíce vyráběných a prodávaných komodit na celém světě (Rostagno, 2009). Zájem o sóju a sójové výrobky v západních zemích v posledních letech prudce vzrostl. Důsledkem jsou zdravotní účinky látek obsažených v sójových bobech, zejména bílkovin a isoflavonů (Shao *et al.*, 2009).

Isoflavony jsou také známé jako fytoestrogeny, protože se nacházejí v rostlinných potravinách (hlavně těch sójových) a mají estrogení aktivitu. Bylo provedeno mnoho výzkumů na potenciální zdravotní přínos isoflavonů. Mezi hlavní účinky patří prevence hormonálně dependentních nádorů – prsu a prostaty, kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy a příznaků menopauzy (Umphress, 2005). Důkazy poskytují nejen epidemiologické studie, které prokazují nižší výskyt těchto onemocnění v asijských zemích (Čína, Japonsko), které mají vysokou spotřebu sóji, ale také z intervenčních studií, které vychází z tohoto vztahu (Rostagno, 2009).

Kompletní separace celého spektra isoflavonů během několika minut a jejich detekce v nanogramech z různých rostlinných materiálů, klinických vzorků a potravin se v současnosti provádí pomocí moderních analytických metod. Tato skutečnost je klíčovým parametrem pro přesnou kontrolu kvality zemědělských a potravinářských produktů (Vacek *et al.*, 2008).

Nejběžnější metodou pro extrakci isoflavonů z pevných vzorků je extrakce v systému pevná látka-kapalina za použití extrakčního rozpouštědla, nejčastěji směs methanolu a vody v poměru 80:20, ethanolu v různých procentech (70-96%) nebo acetonitrilu. Nejvhodnější analytickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s UV/VIS detektorem, detektorem diodového pole (DAD) nebo hmotnostním spektrometrem (MS) (López-Gutiérrez, 2014).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na dané téma. Popsat význam funkčních potravin a jejich rozdělení, význam flavonoidních látek ve funkčních potravinách a vliv flavonoidních látek na zdraví člověka. Dále jsem měla za úkol vysvětlit, jakými metodami můžeme stanovovat flavonoidní látky v biologických matricích. V experimentální části byl cílem monitoring fytoestrogenů ve vybraných druzích sójových výrobků pomocí moderních separačních technik a zpracování a vyhodnocení dosažených výsledků.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

3 FUNKČNÍ POTRAVINY

Funkční potravina je potravina obsahující takovou složku, ať už živinu či jinou složku, která záměrně pozitivním způsobem ovlivňuje jednu nebo více funkcí lidského organismu a má fyziologický nebo psychologický účinek nad rámec tradičního nutričního účinku. Účinné složky funkčních potravin nazýváme nutriceutika, jejichž hlavní úlohou je především prevence (Komprda, 2008). Významným nutriceutikem jsou zejména látky rostlinného původu, kdy naprostá většina příznivě působících látek ve funkčních potravinách pochází právě z rostlin.

Aby mohla být potravina objektivně označena jako funkční, musí splňovat několik základních požadavků. Klíčovým znakem je vědecké prokázání zdravotního přínosu pro člověka. Zdraví totiž v dnešní době nechápeme jenom jako stav bez nemoci, ale jako stav tělesné, duševní i sociální pohody. Potravina musí být dostupná, běžně konzumovaná většinou populace a zdravotně prospěšné složky musí být v potravine obsaženy v obvyklém množství, aby konzumace uhradila významnou část doporučeného denního příjmu účinné složky (Kalač, 2008).

Cílem funkčních potravin není léčit choroby, ale naopak jim předcházet. Jsou vyráběny za tímto účelem. Běžné potraviny jsou většinou obohacovány účinnými složkami (Kalač, 2003).

3.1 Rozdělení funkčních potravin

3.1.1 Právě funkční potraviny

Tzv. pravými funkčními potravinami nazýváme potraviny, jejichž složka či složky jsou přirozeně obsaženy v potravine a mají pozitivní účinek na organismus. Podle názoru některých odborníků by se jen tyto potraviny měly považovat za funkční. Rostliny se mohou obohacovat účinnými složkami pomocí genetické modifikace, ale i klasickými postupy. Koncentraci obsahových látek může ovlivnit i způsob pěstování (hnojení, působení světla, vláhy, doby sklizně atd.) (Prugar, 2006).

3.1.2 Nepravé funkční potraviny

Samotná účinná složka potravin se nazývá nutriceutikum a pokud touto složkou obohatíme potravinu, tzv. fortifikujeme, získáme funkční potravinu označovanou jako nepravá. Je tedy do výrobku přidávána za účelem zvýšení nutriční hodnoty potraviny a její zdravotní prospěšnosti. Významné jsou hlavně látky, které se běžně nekonzumují (např. echinacea, ginkgo-biloba, aloe apod.), které se uplatňují spíše ve farmacii (Prugar, 2006).

Mezi nejčastější druhy funkčních potravin patří:

- potraviny, do kterých jsou přidány složky s příznivým vlivem na lidské zdraví. Např. probiotika a prebiotika v mléčných zakysaných výrobcích.
- potraviny, u kterých jsou odstraněny složky s nepříznivým vlivem na lidské zdraví. Např. trans-mastné kyseliny ve ztužených tucích.
- potraviny, jejichž přirozeně se vyskytující složky jsou chemicky modifikovány. Např. hydrolýza bílkovin v kojenecké výživě, která se provádí v důsledku snížení možné alergenity.
- potraviny, u kterých se zvyšuje biologická dostupnost jedné nebo více složek (Winklerová, 2009).

3.2 Významná nutriceutika

Mezi významné účinné složky funkčních potravin patří celá řada zdravotně prospěšných látek.

3.2.1 Probiotika, prebiotika a synbiotika

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které mají pozitivní vliv na organismus, zejména střevní mikroflóru. Mezi probiotika jsou v dnešní době řazeny hlavně druhy bakterií rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Saccharomyces*.

Tyto prospěšné bakterie mléčného kysání mají schopnost překonat nepříznivé prostředí v žaludku člověka - nízké pH, přítomnost kyseliny chlorovodíkové a proteolytických enzymů – lysozymu, který způsobuje rozklad pravých jogurtových

bakterií. Dále musí být odolné proti žlučovým kyselinám, nízkému povrchovému napětí v zažívacím traktu a peristaltice střev.

Prebiotikum je skupina nestravitelných látek, které pozitivně ovlivňují růst, přežití a aktivitu probiotických bakterií ve střevech člověka. Nejčastěji se jako prebiotika používají oligosacharidy – inulin a oligofruktosa, které slouží jako substrát pro pozitivní bakterie tlustého střeva. Prebiotika upravují a stabilizují rovnováhu střevní mikroflóry.

Podstatou účinku **synbiotik** je společné působení probiotika a příslušného prebiotika v tlustém střevě po příjmu v potravíně. Prospěšná bakterie má k dispozici vhodný substrát a zvýší se šance bakterií prosadit se v konkurenčním prostředí trávicího traktu (Zedníčková, 2013).

3.2.2 Potravní vláknina

Vláknina patří mezi významné zdravotně prospěšné složky potravin. Samotný termín byl poprvé použit v roce 1953 a v roce 1972 byla formulována první definice, která zněla: „jsou to zbytky rostlinných buněčných stěn, které nejsou štěpeny trávicími enzymy člověka“. Dodnes však neexistuje jednotná definice vlákniny, neboť míra stravitelnosti složek vlákniny je různá a závisí také na samotném žvýkání či průchodu trávicím traktem (Kalač, 2008).

Z chemického hlediska je to komplex neškrobových polysacharidů a několika dalších složek - celulóza, lignin, vosky, chitiny, pektiny, beta-glukany, oligosacharidy, inulin, kyselina fytová a její fosfátové skupiny, polyfenoly (třísloviny), kutiny a fytoosteroly. Lidské enzymy nedokážou vlákninu rozložit na dostatečně malé, stravitelné jednotky. Z tohoto důvodu se vláknina nemění na energii a není možné ji kaloricky využít.

Vláknina na sebe váže vodu a vyvolává pocit sytosti. V žaludku prodlužuje pobyt tráveniny, ale na druhou stranu zkracuje dobu průchodu střevem; živiny se tak dostávají do vzdálenějšího úseku střeva a mohou taky být využity lépe. Při absorpci glukosy dochází k prodlevě, tím nedojde k výraznému zvýšení hladiny krevní glukosy, což má za následek zlepšení glykémie. Vláknina také snižuje hladinu krevního cholesterolu. Podporuje vysokou tvorbu bakteriální biomasy, přičemž dochází k vyvázání amoniaku a jeho vylučování především ve stolici; nezatěžují se tolik ledviny a játra. Další významnou

funkcí je ochrana před různými nemocemi trávicího traktu, ať už zácpou, žaludečními či duodenálními vředy nebo hemoroidy (Komprda, 2003).

Všeobecně se doporučuje konzumovat vlákninu v poměru 3:1 nerozpustných a rozpustných neškrobových polysacharidů a celkový doporučený denní příjem činí 30 gramů (Komprda, 2003). Pro děti a dospívající mládež do 15 let určila *Americká nadace pro zdraví* pravidlo „věk+5“, které doporučuje, aby denní příjem vlákniny u dětí byl rovný k jejich věku plus dalších 5 g (Hampl, 1998).

3.2.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které se podílejí na vychytávání volných radikálů a jejich odstranění z buněk. Volné radikály jsou nestabilní, vysoce reaktivní částice s oxidačním účinkem obsahující nepárový elektron. Vyvolávají vznik oxidačního stresu, kdy může dojít k poškození klíčových složek v buňce a tím k vyvolání mutace – vzniku nádorů, urychlení stárnutí, vzniku aterosklerózy, komplikací při cukrovce nebo celkovému oslabení obranyschopnosti organismu (Jordán, 2001; Kalač, 2003).

Dostatek antioxidantů ve stravě pomáhá snížit riziko kardiovaskulárních chorob a některých typů rakoviny. Nejvýznamnějším zdrojem je ovoce, zelenina, čaj i celozrnné obiloviny, jejichž účinnost je dle odborníků podstatně vyšší než u preparátů označovaných jako doplňky stravy. Mezi nejvýznamnější antioxidanty pak patří vitamin E, β -karoten, vitamin C a rostlinné fenoly, jako např. flavonoidy a katechiny (Kalač, 2003).

3.2.4 Složky tuků

Významným nutričním funkčním potravin jsou i některé složky tuků – polynenasycené mastné kyseliny, konjugovaná kyselina linolová a některé složky rostlinných olejů, zejména fytosteroly a fytostanoly (Kalač, 2003).

Polynenasycené mastné kyseliny, označovány jako PUFA, řadíme mezi esenciální MK, které si organismus nedovede vytvořit a musíme je tedy přijímat v potravě. Označujeme je jako n-3 kyseliny (dříve omega-3) a řadíme sem kyselinu α -linolenovou, eikosapentaenovou a dokosahexaenovou. Tyto látky působí protizánětlivě, vasodilatačně a snižují agregaci trombocytů, čímž snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění.

Konjugovaná kyselina linolová se tvoří v bacheru přežvýkavců a vyskytuje se tedy v jejich tuku – mléčný tuk (zejména máslo) v množství 0,6 až 1,3 % z celkových MK. Její předpokládané příznivé účinky jsou antikarcinogenita, antiaterogenita, antioxidační účinky a posílení imunitního systému (Komprda, 2014).

Fytosteroly neboli rostlinné steroly jsou složky rostlinných olejů chemicky příbuzné cholesterolu. Avšak oproti cholesterolu je člověk nedokáže syntetizovat a musí je přijímat v potravě. Vyskytují se zejména v panenských olejích, které nejsou upravovány rafinací, nejvíce v řepkovém, sezamovém, slunečnicovém, ale i sójovém. Tyto složky rostlinných olejů brání vstřebávání cholesterolu a působí antiskleroticky. Další složkou tuků jsou fosfolipidy, z nichž nejvýznamnější je lecitin (Kalač, 2003).

3.2.5 Peptidy a bílkoviny

Významnou složkou bílkovin jsou zejména esenciální aminokyseliny. Pro dospělého člověka jsou nepostradatelnými AK lysin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, threonin, methionin a lysin; pro děti pak ještě další 2 – arginin a histidin. Při nedostatku kterékoliv z těchto AK může dojít k zastavení syntézy bílkovin a vést k fatálním důsledkům. Tato AK se pak nazývá limitující – u obilovin je to lysin, u luštěnin methionin.

Z některých bílkovin se mohou uvolňovat peptidy, které mají podobné vlastnosti jako hormony a zasahují do regulačních procesů v organismu. Musíme však brát v potaz, že některé bílkoviny mohou způsobovat alergie a zapříčinit tak nežádoucí vedlejší účinky (Kalač, 2003).

3.2.6 Fytochemické látky

Nejvýznamnější skupinu rostlinných metabolitů představují polyfenoly. Jsou to produkty sekundárního metabolismu rostlin a dělíme je na 4 skupiny – fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Flavonoidy dále dělíme do 6 skupin, z nichž pro účely této práce jsou nejvýznamnější isoflavonoidy označované také jako fytoestrogeny. V nejvyšší koncentraci se nachází v sóji a sojových výrobcích (Mandelová, 2005).

4 SÓJA

Sója luštinatá (*Glycine max* L.) je luskovina z čeledi bobovité (*Fabaceae* syn. *Leguminosae*), pochází z jihovýchodní Asie, pravděpodobně z Číny. Semena se nazývají sojové boby a řadí se mezi luštěniny, díky vysokému obsahu tuků i mezi olejninu (Dostálová, 2003). Sója má vysoké uplatnění a z hlediska světového obchodu náleží k velice žádaným komoditám. Hlavním produktem je olej, avšak zásadní význam mají pevné zbytky po extrakci olejů – sojové extrahované šroty (Houba, 2009). Tato plodina má velký význam v lidské výživě, je zdrojem kvalitních bílkovin a dalších biologicky aktivních látek v chudých, ale i vyspělých zemích světa (Bulková, 2011). V současné době se zvyšuje produkce geneticky modifikované sóji, která je odolná proti působení herbicidu *Roundup* (Kadlec, 2012).

Sójové boby se používají zejména jako hodnotné krmivo. Asi jedna třetina produkce se spotřebuje pro lidskou výživu a další část se využívá v kosmetickém či jiném průmyslu na výrobu mýdel, barev a laků, smaltů nebo syntetického kaučuku.

4.1 Popis rostliny

Je to jednoletá, samosprašná rostlina s křivým kořenem, na kterém se vlivem nitrifikačních bakterií rodu *Rhizobium* vytváří hlízkové uzliny, které umožňují vazbu vzdušného dusíku, který je začleňován do organických sloučenin. Tyto bakterie také zvyšují koncentraci isoflavonů, podobně jako v případě napadení rostliny patogenem nebo jiným škůdcem. Lodyha je vzpřímená, rozvětvená a dorůstá délky 60-90 cm. Listy jsou složité, řapíkaté a jejich velikost a tvar jsou charakteristické pro každou odrůdu. Květenství je hrozen složený z 5-10 květů. Plodem je lusk, který obsahuje obvykle 2-3 semena. Pro potravinářské účely se preferují semena světlé barvy (Houba, 2011).

4.2 Pěstování a sklizeň

Sója je jednou ze čtyř nejvíce rozšířených plodin (po kukuřici, pšenici a rýži) a mezi luskovinami a olejninami patří k nejpěstovanějším. Hlavní pěstební oblastí je Latinská Amerika (Brazílie, Argentina), kde sklizňová plocha činí 92,99 milionů hektarů. Dalšími významnými oblastmi pěstování jsou Severní Amerika (USA) a Asie (Čína, Indie). V Evropě se větší plochy nachází v Itálii, Francii, Maďarsku, Srbsku nebo na Ukrajině. V České republice se pěstuje pouze nová odrůda vyšlechtěná v Kanadě se zkráceným

generativním obdobím, jelikož plodina je náročná na teplo a vyžaduje dostatečnou vlhkost prostředí. Sklízí se po opadání listů a vlhkosti semen 16 až 18 % (Houba, 2011). Po sklizni se předčišťuje a ukládá na roštech s aktivním větráním k dosažení vlhkosti max. 16 % (Houba, 2009).

Seznam doporučených odrůd vydává každoročně Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ). Mezi významné hospodářské vlastnosti sóji, které jsou tímto orgánem hodnoceny, patří:

- ranost – velmi rané, rané, středně rané
- výnos semene
- agronomická charakteristika – zralost, délka rostliny (cm), odolnost proti poléhání před sklizní, výška nasazení prvního lusku (cm)
- odolnost proti chorobám – bakteriózy, sklerotiniová hniloba
- kvalita semene – obsah dusíkatých látek (%), obsah tuku (%), hmotnost tisíce semen (HTS) v gramech (ÚKZUZ, 2013).

4.3 Chemické složení sojových bobů

Díky obsahovým látkám, řadíme sóju mezi funkční potraviny. Sojové boby mají vysokou nutriční hodnotu díky obsahu jakostních bílkovin, tuků, minerálních látek a vitamínů (Bulková, 2011). Ceněné jsou i z hlediska obsahu rostlinných estrogenů.

Zralé semeno obsahuje v průměru živiny uvedené v příloze 1.

4.3.1 Bílkoviny

Bílkoviny mají vysokou biologickou hodnotu díky svému vysokému obsahu esenciálních aminokyselin. Představují nejcennější složku. Ze všech luskovin obsahují nejvíce lyzinu (Dvořáčková *et al.*, 2011). I přes vysoký obsah bílkovin, okolo 40 %, je však tato bílkovina neplnohodnotná v porovnání s referenčním proteinem ve vejci nebo ostatních živočišných produktech. Aminokyseliny nejsou zastoupeny ve správném poměru a využitelnost bílkoviny se tak podstatně snižuje. Limitující aminokyselinou je methionin (Komprda, 2014). Díky vysokému obsahu lyzinu se kombinací s obilnou bílkovinou získá plnohodnotný protein (Jooyandeh, 2011). Velkou výhodou konzumace sojových bílkovin je omezení příjmu cholesterolu a tuku z bílkovin živočišných a to vede ke snížení hladiny

krevních lipidů, hlavně cholesterolu. Sójové bílkoviny jsou hodnotné i pro své funkční vlastnosti, mají schopnost vázat vodu a tuk a přeměňují se na strukturu podobnou vlastnostem vláknitých bílkovin masa. Díky tomuto poznatku, se sójová bílkovina začala používat jako náhražka masa (Dostálová, 2003). Jejich funkcí je také snížení sérového cholesterolu, prevence kardiovaskulárních onemocnění, snížení tělesného tuku a podpora sérového inzulínu. Peptidy mají zase antioxidační aktivitu, inhibují některé konvertující enzymy a podporují fagocytózu (Jooyandeh, 2011).

U některých jedinců však může sójová bílkovina vyvolat alergii, je tedy řazena mezi alergeny a složka musí být uvedena na obalu potraviny dle vyhlášky č. 113/2005 O způsobu označování potravin a tabákových výrobků a Nařízení EP a Rady (EU) č. 1169/2011.

4.3.2 Lipidy

Z výživového hlediska je složení mastných kyselin sójových lipidů příznivé vzhledem k vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin. Nejvýznamnější je kyselina linolenová, která jako kyselina řady n-3 má význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Dvořáčková *et al.*, 2011). Působí protizánětlivě, vasodilatačně a snižuje agregaci trombocytů (Komprda, 2014). Dále jsou významné kyselina α -linolenová a arachidonová.

Sója neobsahuje cholesterol a má velice příznivý poměr esenciálních mastných kyselin (Dvořáčková *et al.*, 2011). Obsahuje fosfolipidy, které jsou nezbytnou součástí lidské výživy. Jsou to deriváty glycerolu, na jejichž řetězci je estericky vázaná kyselina fosforečná. Nachází se v rostlinných i živočišných membránách jako součást lipoproteinů. Mají emulgační vlastnosti, stabilizují lipoproteiny, ovlivňují rozpustnost LD (low density) lipoproteinů v krevní plazmě. Vznikají z prekurzorů působením enzymů fosfolipas za katalýzy složek na alkohol – glycerol (Velíšek, 2009).

Sójový olej působí příznivě na nervovou soustavu, pokožku a látkovou přeměnu. Obsahuje vitamíny a provitamíny rozpustné v tucích, betakaroten (3,5 mg), vitamín E (více než 50 mg) a nenasycené mastné kyseliny, které tvoří polovinu obsahu (Dvořáčková *et al.*, 2011).

4.3.3 Sacharidy

Obsah sacharidů v sojových bobech není nijak významný. Obsahuje velmi malé množství škrobu, asi 10 % sacharosy, okolo 5 % nerozpustných oligosacharidů – rafinosa, stachyosa, které způsobují nadýmání (Dostálová, 2003). Důležitý je pouze obsah vlákniny, která pomáhá prodloužit vstřebávání živin a má ochranné účinky na tenké a tlusté střevo. Zabraňuje vzniku žlučových kamenů a podporuje jejich rozpouštění (Dvořák, 2007). Vyrábí se většinou ze slupek sojových bobů (Kadlec, 2012).

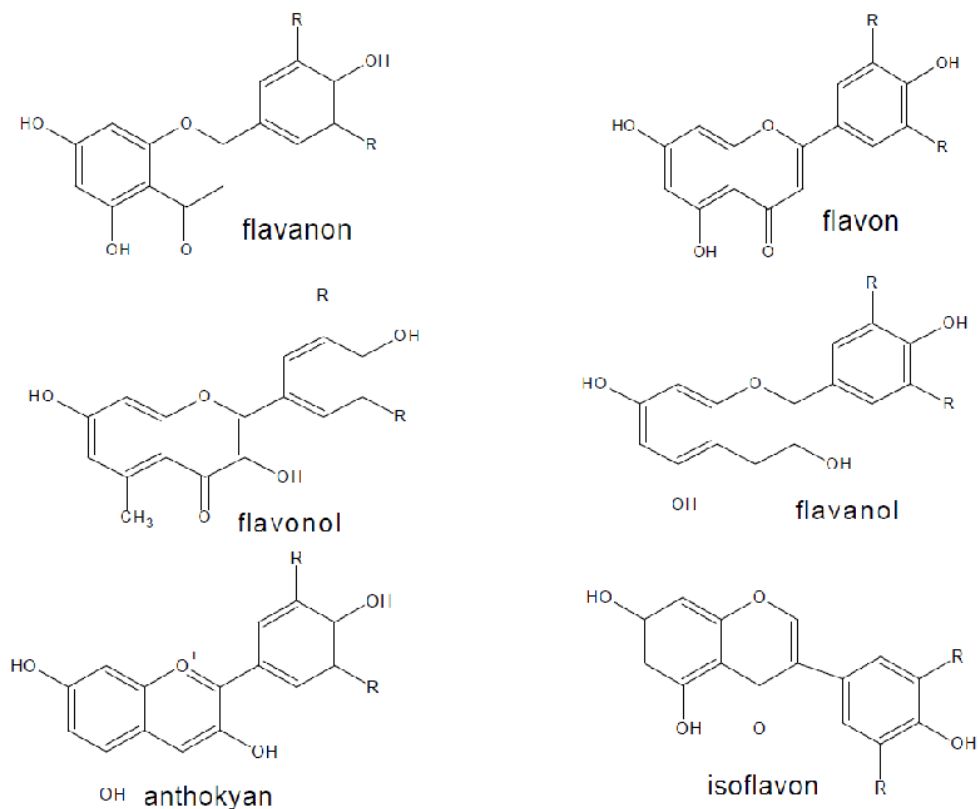
4.3.4 Polyfenoly

Rostlinné fenoly jsou složkou lidské stravy a některé z nich jsou používány jako účinné antioxidanty v potravinových doplňcích nebo léčivých přípravcích. Fenolické látky se obecně dělí na jednoduché fenoly a polyfenoly (Vacek *et al.*, 2010).

Polyfenoly jsou přírodní antioxidanty a patří sem velká skupina látek. Je to nejrozmanitější skupina rostlinných metabolitů. Společným znakem pro tyto látky je, že ve struktuře obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Vyskytují se v běžných potravinách, hlavně v ovoci a zelenině. Bylo prokázáno, že polyfenoly mají vyšší antioxidační aktivitu než některé vitamíny, jejich účinek je tedy vyšší. Mezi nejrozšířenější a nejčastěji se vyskytující polyfenoly patří skupina látek nazývaných flavonoidy. Hlavní skupiny flavonoidů tvoří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a isoflavony (Obr. 1) (Mandelová, 2005).

V rostlinách se vyskytují ve volné formě jako aglykony, ale častěji bývají vázané ve formě konjugátů (glykosidy). Vyskytují se však i jako oligomery nebo polymery (např. proantokyanidiny, lignany či lignin) (Vacek *et al.*, 2010).

Nejvýznamnějším flavonolem je kvercentin, nacházející se v cibuli, jablkách, zeleném a černém čaji. Vázaný s cukernou jednotkou rhamnosou se označuje jako rutin, který pomáhá zlepšovat stav cévní stěny. V čaji jsou přítomné flavanoly katechiny (Trna, 2002). Zvláštní skupinu pak tvoří isoflavony, které jsou schopné se navázat na estrogenové receptory a kvůli tomu se jim říká fytoestrogeny (Mandelová, 2005).

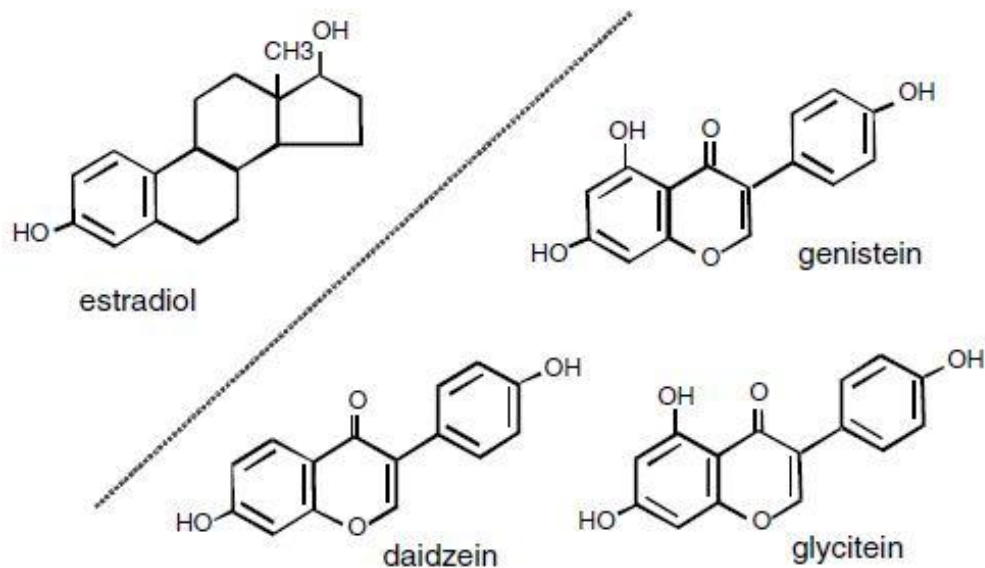


Obr. 1: Struktura flavonoidů (Komprda, 2008)

4.3.4.1 *Fytoestrogeny*

Fytoestrogeny jsou rostlinné nesteroidní estrogenní látky, mezi které řadíme zejména isoflavony, stilbeny, lignany, kumestany a prenylflavonoidy. Jsou to sekundární metabolity rostlin, které mají hlavní roli v rostlinných obranných mechanismech včetně antimikrobiálních vlastností a při reakcích přecitlivělosti. Tyto látky jsou důležité díky jejich biologické aktivitě jako významný zdroj pro lidskou výživu (Salter, 2012).

Rostlinné estrogény chemicky nepatří mezi steroidy, jsou steroidním hormonům pouze strukturně podobné (Obr. 2). Jsou to vícesytné fenoly (Kalač, 2003), kdy základem je fenolové jádro, které umožňuje vazbu na estrogenní receptor s následnou metabolickou aktivitou (Vrzáňová, 2003).



Obr. 2: Strukturální podobnost sloučenin s hormonem estradiolem (Sugano, 2006)

Podobnost fytoestrogenů s ženskými pohlavními hormony – estrogeny zapříčiňuje to, že některé tyto sloučeniny mohou nahrazovat estradiol, neaktivnější ženský pohlavní hormon tvořící se ve folikulech vaječníků (Kalač, 2003). Pokud je hladina estrogenů v krvi nízká, což je velmi běžné u žen v menopauze, působí rostlinné estrogény stejně jako ty lidské. Jestliže je však hladina hormonů normální, působí pak antiestrogenně a snižují tak riziko rakoviny prsu (hormonálně vázaný nádor), zvyšují hustotu kostní tkáně a zmírňují i některé potíže provázející klimakterium (Kunová, 2011).

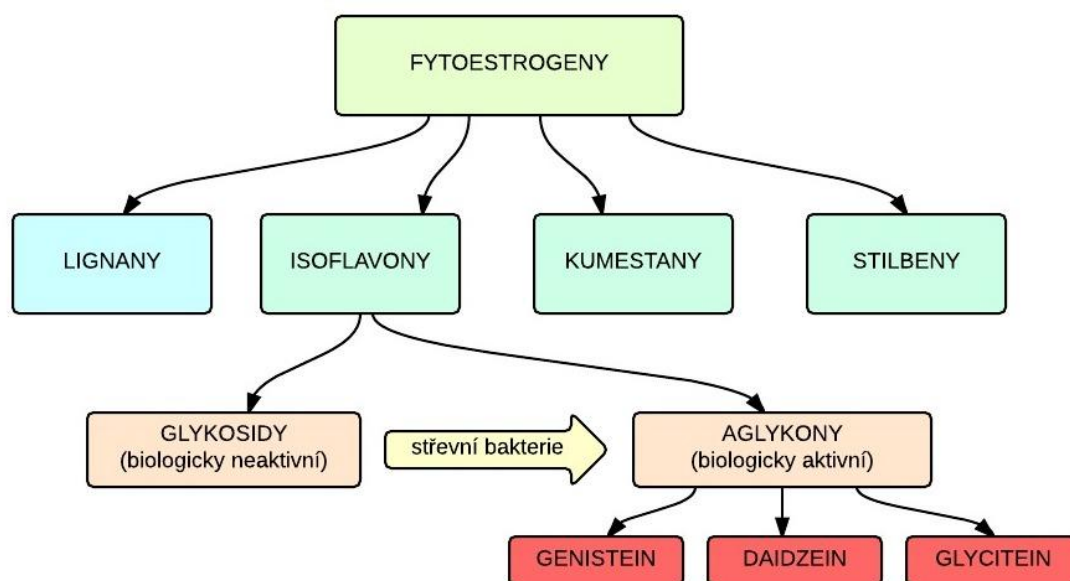
4.3.4.1.1 Isoflavony

Nejvýznamnější z fytoestrogenů jsou isoflavony (Jooyandeh, 2011). Sójové boby a sójové výrobky obsahují isoflavony, které jsou kvůli jejich estrogení aktivitě označovány jako fytoestrogeny. Je také kladena značná pozornost na jejich fyziologické funkce (Chen *et al.*, 2008).

Mezi nejdůležitější zástupce patří aglykony genistein, daidzein a glycitein. Jejich poměr v sóje a sójových výrobcích bývá obvykle 1:1:0,2. Obsah se však liší podle oblasti, podmínek pěstování a zpracování (Mandelová, 2005). Studie také ukazují, že zvýšení dávky hnojiv a řízené zavlažování zvyšují jejich koncentraci v semenech sóji. Tohoto

poznatku by se mohlo využít pro zvětšení zájmu o sójové výrobky a využít tak ochranného účinku isoflavonů proti civilizačním chorobám moderní doby (Singh, 2010).

Isoflavony jsou v matrici i ve výrobku vázány na sacharidy, čímž vytváří jejich příslušné β – glykosidy. Ty se pak označují jako isoflavonoidy - genistin, daidzin, glycitin apod. (Kalač, 2003). Tyto glykosidové formy jsou biologicky neaktivní. Po požití jsou v trávicím traktu hydrolyzovány bakteriálními β -glukosidázami ve střešní stěně, což má za následek konverzi na jejich odpovídající bioaktivní aglykony (genistein a daidzein) (Obr. 3). Pouze aglykonové formy jsou biologicky aktivní a absorbovány v zažívacím traktu. Daidzein může být dále metabolizován na equol a O-demethyngolensin, genistein na p-ethyl-fenol (Cederroth, Nef 2009). Isoflavony jsou dále vstřebávány do krve a roznášeny do příslušných orgánů, kde se chovají podobně jako steroidní hormony. Účinnost isoflavonů je však podstatně nižší než je tomu u lidských hormonů (Kalač, 2003). Genistein má několikanásobně vyšší aktivitu než daidzein (Sugano, 2006).



Obr. 3: Schematické znázornění podtříd fytoestrogenů (Soni *et al.*, 2014)

Sójové boby obsahují okolo 580-3800 mg isoflavonů na kilogram bobů (Mandelová, 2005). Zpracování sójových bobů pro výrobu potravinářských výrobků zvyšuje hydrolýzu glykosidů, což má za následek zvýšení koncentrace aglykonů. Aglykonové isoflavony (daidzein, glycitein a genistein) jsou dostupnější a více vstřebávány než glykosidy.

Dle studie Chena *et al.*, kteří analyzovali celkový obsah isoflavonoidů v sóji a sojových produktech, se více aglykonů nachází ve fermentovaných sojových produktech než v těch nefermentovaných. Koncentrace aglykonů se při fermentaci výrazně zvyšuje, což poukazuje na větší zdravotní účinky těchto výrobků a jejich větší využitelnost lidským organismem. Tato studie také ukázala, že celkový obsah isoflavonoidů se liší u různých odrůd rostliny (Chen *et al.*, 2008).

4.3.4.1.2 Lignany

Lignany jsou dimery vzniklé spojením dvou fenylypropanových jednotek (Mandelová, 2005). Mezi nejvýznamnější zástupce patří matairesinol, sekoisolariciresinol a jeho diglukosid (Harmatha, 2002). V rostlinách se vyskytují vázané na cukry, ale nejsou přímými estrogeny. Jsou aktivovány chemickou přeměnou probíhající ve střevní mikroflóře. Vzniknou tzv. savcí lignany enterodiol a enterolakton (Kalač, 2003), jejichž účinek je hlavně estrogenní a kancerostatický, tedy zpomalují či zastavují rakovinu - zejména prsu, prostaty, plic a tlustého střeva (Harmatha, 2002).

4.3.4.1.3 Kumestany

Hlavním zdrojem kumestanů jsou vojtěška a jetel, tedy krmivo pro zvířata, což může mít jak výhody, tak nevýhody pro následnou lidskou výživu (Bedell, 2014). Obsahují ho však i naklíčené sójové boby (Vránová, 2012). Po požití dochází k přeměně na kumestrol, který má silnou afinitu k estrogenímu receptoru. Stejně jako genistein a daidzein se přednostně váže na ER β než ER α . Z fytoestrogenů má také nejsilnější afinitu k ER a to pouze 5-10x nižší než 17 β -estradiol, tedy až 30-40x vyšší než u isoflavonů. Je proto považován za nejsilnější fytoestrogen (Bedell, 2014).

4.3.4.1.4 Stilbeny

Nejrozšířenějším stilbenem je resveratrol neboli 3,5,4-hydroxystilben, vyskytující se zejména ve slupce červené vinné révy. V rostlinách se vyskytuje zejména ve formě trans. Stejně jako isoflavonoidy se resveratrol vstřebává ve střevech jako aglykon. Hlavní zdravotní přínos této sloučeniny je prevence kardiovaskulárních chorob a rakoviny. Resveratrol má schopnost vázat se na ER, avšak oproti ostatním je považován za velmi slabý fytoestrogen.

4.3.5 Inhibiční látky

Na druhou stranu sójové boby obsahují i látky, které působí toxicky a antinutričně. Můžou mít tedy i negativní dopad na lidskou výživu. Vhodným technologickým způsobem je však lze skoro úplně odstranit, a proto se doporučuje konzumovat pouze tepelně opracované sójové boby, čímž se zvýší i stravitelnost bílkovin. Avšak sójové bílkoviny mohou na některé jedince působit jako alergeny a při intenzivním záhřevu sójových bílkovin může vznikat lysinoalanin, který působí toxicky na ledviny.

Mezi inhibiční látky patří zejména inhibitory proteas (trypsinové inhibitory), které snižují využitelnost bílkovin, lektiny zpomalující růst, kyselina fytová, která snižuje využitelnost minerálních látek, především vápníku a hořčíku, goitrogenní látky narušující funkci štítné žlázy, saponiny porušují sliznici střeva, zpomalující růst a využitelnost živin, některé nestravitelné oligosacharidy způsobující nadýmání nebo puriny související se vznikem dny.

Fytoestrogeny mohou při vysokém příjmu působit negativně zejména u těhotných a kojících žen. Dochází k problémům v reprodukci, narušení menstruačního cyklu, ojediněle může docházet k poškození plodu (chlapců) a špatnému vývoji pohlavního ústrojí u chlapců (Dostálová, 2003). Vedlejší účinky jsou velmi vzácné, vyskytnout se mohou zejména mírné gastrointestinální obtíže a únava. Patří také mezi endokrinní disruptory, které narušují funkci endogenních hormonů. Genistein je schopný inhibovat thyroideální peroxidázu (TPO), což je enzym, který katalyzuje reakce vedoucí ke vzniku hormonů štítné žlázy – thyroxinu (T4) a trijodthyroninu (T3).

Nicméně u žen v období před, během a po menopauze nebyly prokázány žádné negativní účinky a jejich konzumace je naopak velmi prospěšná (Lapčík, Sosvorová, 2011).

4.4 Mechanismus účinku

Hlavním účinkem flavonoidů je estrogení aktivita. Fytoestrogeny se váží na estrogení receptor v jádře buněk cílových tkání a po aktivaci působí jako transkripční faktory. Navazují se do specifických úseků DNA – estrogen response element (ERE) a ovlivňují tak proliferaci a diferenciaci buněk. Závisí na pozici OH-skupin.

Estrogenní aktivita isoflavonů závisí částečně na tkáni a vzhledem k odlišné distribuci v organismu i na typu estrogenního receptoru ER (ER α nebo ER β). Exprese ER α je prováděna hlavně do nadledvinek, ledvin, plic a varlat. ER β je pak roznášen zejména do thymu, močového měchýře, plic, kostí, prostaty a cév. Oba receptory jsou exprimovány do prsou a dělohy (Sugano, 2006). Isoflavony se přednostně váží na ER β .

Estrogenní receptory dělíme na cytoplazmatické (CP) nebo transmembránové (TM). Nejsilnějším aktivátorem ER je lidský hormon 17 – β – estradiol. Po aktivaci CP ER dochází ke zvýšenému růstu buněk. TM ER je dvojího typu – spřažený s G - proteinem nebo má funkci tyrosinkinázy. Efektorem receptorů spřažených s G – proteinem je adenylátcykláza, jejíž 2. buněčným poslem je cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), který dále aktivuje proteinkinázu A. Druhým receptorem může být fosfolipáza C, která aktivuje proteinkinázu C, 2. buněčným poslem jsou vápenaté ionty. ER s funkcí tyrosinkinázy spolu s receptory spřaženými s G – proteinem aktivují kaskádu bílkovin, tzv. mytogenem aktivované proteinkinázy, které aktivují bílkovinu Akt (tzv. faktor přežití) a FAK (fokální adhezivní kinázu). Výsledkem je schopnost buňky přežít v daných podmínkách, aktivací FAK buňka získá pohyblivost a aktivací CP ER začne neomezeně růst. Tyto podmínky jsou příznivé zejména pro rakovinné buňky a riziko rakoviny se výrazně zvyšuje. Fytoestrogeny se váží na stejné receptory jako přirozené lidské hormony a jsou jejich antagonisty, soutěží s nimi o vazebné místo receptoru. Po vazbě fytoestrogenu na receptor dochází k utlumení signálu, nedochází k aktivaci receptorů a riziko rakoviny se naopak výrazně snižuje.

Dalším účinkem je antioxidační působení. Závisí především na počtu a pozicích OH-skupin v molekule. Tyto OH-skupiny mají schopnost vychytávat nepárové elektrony volných radikálů a zabránit tak oxidativnímu poškození buněk. Isoflavony mohou také snižovat riziko zánětlivých stavů inhibicí lipoxygenázové aktivity. Základním substrátem pro lipoxygenázy je kyselina arachidonová, jejíž metabolity leukotrieny, mají silné prozánětlivé účinky. Inhibicí enzymu nedochází k jejich vzniku.

Flavonoidy jsou řazeny také mezi antikarcinogeny. Hlavním mechanismem je inhibice prooxidačních enzymů fáze I (PIE) a indukce konjugačních, detoxifikačních enzymů fáze II (PIIE). Tyto mikrozomální enzymy, nacházející se zejména v játrech, jsou velmi důležité pro organismus při likvidaci xenobiotik (cizích látek pro organismus).

Xenobiotika jsou málo reaktivní a i málo škodlivé. Aby se mohla navázat na nějakou látku, která je odstraněna z organismu, musí se nejprve zreaktivnit. To mají za úkol PII. Zreaktivněné sloučeniny je potřeba rychle navázat a odstranit, což se děje pomocí PIIE. Zreaktivněné částice jsou velmi škodlivé a agresivní. Při nedostatku PIIE nebo pokud reakce není příliš rychlá, může dojít k poškození buněk či vzniku karcinogenů.

Tato nutriční doplňky mohou zabránit vzniku karcinomu i pomocí blokace G1/S přechodu buněčného cyklu. V tomto cyklu dochází k dělení buněk, a pokud buňka ztratí kontrolu, dochází ke zhoubnému bujení. Důležitým transkripčním faktorem je protein p53, který je faktorem pro aktivaci exprese genů pro regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy. Při poškození DNA roste jeho koncentrace v buňce. Protein se navazuje do promotoru dalších genů, aktivuje protein p21, který se naváže na cyklin – bílkovina, která „postřikuje“ fázi buněčného cyklu, a tím dochází k blokaci samotného buněčného cyklu a tedy zástavě bujení. Indukce apoptózy, vlastní buněčné smrti, je zprostředkována pomocí enzymů kaspáz. Kaspázou aktivovaná DNasa přechází do jádra a odbourává nukleovou kyselinu. K tomuto kroku dochází při neopravitelných genetických poškozeních (Komprda, 2008).

4.5 Vliv na zdraví člověka

Přestože byla sója konzumovaná již před více než 1000 lety, teprve v nedávné době byla zařazena do jídelníčku západních zemí. Je to především díky tomu, že se v dnešní době klade důraz na zdravý životní styl a lidé si uvědomují, co může nezdravá strava způsobit. Hlavním atributem sojových bobů je jejich zdravotní přínos spojovaný s prevencí a léčbou mnoha chronických onemocnění. Sója poskytuje lidskému organismu prospěšné látky – bílkoviny, vitamíny, minerály, vlákninu a flavonoidy (Jooyandeh, 2011).

Možnost příznivého vlivu fytoestrogenů na lidské zdraví se začal zkoumat v osmdesátých letech, kdy vznikly studie srovnávající euroamerickou a asijskou populaci z pohledu výskytu a závažnosti příznaků menopauzy a výskytu onemocnění, jejichž původ souvisí s pohlavními hormony (hormonálně dependentní nádory apod.). Po vyloučení rasových, kulturních vlivů a genetických předpokladů se jako možná příčina rozdílů mezi populacemi ukázaly odlišné stravovací návyky, zejména rozdílný příjem rostlinných polyfenolů (Lapčík, Sosvorová, 2011).

Množství fytoestrogenů ve výrobku závisí na technickém procesu používaném při zpracování. Jejich obsah v různých typech výrobků se značně liší. Isoflavonoidy mohou snížit riziko vzniku řady rakovin, včetně prsu, plic, tlustého střeva, konečníku, žaludku a prostaty (Jooyandeh, 2011). Snižují riziko osteoporózy zvýšením hustoty kostí, koncentraci LD lipoproteinů a hladinu cholesterolu v krvi.

Fyziologický význam flavonoidů spočívá v antioxidačním působení, kdy závisí na počtu a pozicích OH-skupin. Dochází k inhibici lipoxygenázové aktivity (Komprda, 2008), která syntetizuje lipoxiny a leukotrieny odpovědné za zánětlivé a alergické reakce v organismu (Holková *et al.*, 2009). Dále jsou schopny tvořit komplexy s kovy. Mezi další účinky patří antikarcinogenní působení, estrogení účinky, antimikrobiální účinky, hypocholesterolemický účinek, inhibice hemolýzy a stabilizace kostí (Komprda, 2008).

4.5.1 Rakovina prsu a prostaty

Rakovina prsu je poměrně běžná v západních zemích, ale stále častěji se objevuje i v jiných částech světa (Singh, 2010). Sója a sójové výrobky jsou široce konzumovány hlavně v asijských zemích. Epidemiologické studie naznačují, že právě v těchto oblastech je mnohem nižší výskyt rakoviny prsu a prostaty ve srovnání se západními státy, což odborníci připisují právě zvýšené konzumaci isoflavonoidů (Chen *et al.*, 2008).

Díky těmto poznatkům se začalo přemýšlet, že sójové výrobky obsahující isoflavonoidy mají antikarcinogenní vlastnosti. Jelikož jsou strukturálně podobně endogenním estrogenům, váží se na ER a vyvíjí tak podobný účinek jako estrogény. Isoflavony se váží na místa estrogeních receptorů více než léky používané v boji s rakovinou prsu (tamoxifen) (Sabaté, 2001). Konzumace již 40 mg isoflavonů denně vede ke snížení hustoty prsní tkáně u žen po menopauze (Singh, 2010).

Již v roce 1990 Barnes *a kol.* jako první uvedli, že strava bohatá na sóju snižuje výskyt nádorů mléčné žlázy u laboratorních myší (Singh, 2010). V průběhu let bylo provedeno mnoho studií řešící problematiku rizika rakoviny prsu a příjmu sójových výrobků. Většina z nich potvrdila, že při příjmu sójových výrobků se může riziko rakoviny snížit o několik procent, ale pouze u žen v premenopauzálním věku (Sabaté, 2001). Většina studií byla také prováděna pouze v asijské populaci a výzkum ve zbytku části světa chybí (Kwang, 2014). Riziko se snižuje také, když člověk konzumuje sóju v dětství nebo

adolescentním věku, u žen pak pokud mají po 10 let vysoký příjem těchto látek (Beddel *et al.* 2014).

Sójové isoflavony jsou rovněž zapojeny v prevenci a léčbě rakoviny prostaty (Singh, 2010). Konzumace sóji, především během adolescence a puberty, může snížit riziko vzniku karcinomu prostaty, avšak konzumace v pozdějším věku tento efekt ztrácí. Daidzen a genistein jsou přirozené inhibitory tyrozinkinázových receptorů. Byla prokázána inhibice vzniku zhoubného bujení a inhibiční efekt isoflavonoidů na růst nádorových buněk. Antikarcinogenní efekt mají též lignany (Schmidt, 2007).

4.5.2 Kardiovaskulární onemocnění

Mezi kardiovaskulární onemocnění (CVD) patří celá řada nemocí:

- hypertrofická kardiomyopatie - stav, při kterém má srdce zhoršenou funkci a to bez zjevné příčiny
- srdeční arytmie
- ischemická choroba srdeční
- ateroskleróza (Garg, 2013).

CVD se však neobjevuje pouze v západních zemích, jako většina civilizačních a dalších nemocí, ale naopak v Číně a Indii je počet úmrtí na tuto chorobu vyšší než v rozvinutých státech světa. Zjevně je to zapříčiněno tím, že některé typy CVD se nedají ovlivnit stravováním a mnohdy jsou dědičné (Singh, 2010).

Choroba, která se stravou a zdravým životním stylem ovlivnit dá, je ateroskleróza. Je to nahromadění tukových lézí v cévách, které jsou poškozené zejména vysokým obsahem cholesterolu, vysokým tlakem, cukrovkou. S věkem totiž dochází k degeneraci pružné cévní stěny, která se tak stává křehčí a dochází k hromadění těchto lézí, tzv. kornatění tepen. Při oddělení od cévní stěny vznikne sraženina, která ucpe cévu a výsledkem je pak infarkt nebo mozková mrtvice (Garg, 2013).

Pozitivní účinek na cévní stěnu mají i isoflavony, které stimulují aktivitu NO syntázy a tak nepřímo podporují vazodilataci – rozšíření cév. Genistein snižuje hodnoty krevního cukru a koncentraci inzulínu v krvi. Isoflavony mají také příznivý efekt na koncentraci a složení plazmatických lipidů, snižují LDL a triacylglyceridy a zvyšují

koncentraci HDL cholesterolu (Lapčák, Sosvorová, 2011). Oxidativní poškození buněčných lipidů významně přispívá k rozvoji CVD. Při peroxidaci PUFA se tvoří hydroperoxydy, radikálové meziprodukty a vedlejší oxidační produkty, které se vylučují močí. Fritz a spol. (2003) zjistili, že koncentrace produktů sekundární oxidace lipidů je velmi nízká u žen, kterým byla podávána strava se sójovými isoflavony (Singh, 2010).

Existuje rovněž názor, že pozitivní účinky jsou způsobeny za účasti sójového proteinu, nikoli isoflavonů samotných (Lapčák, Sosvorová, 2011).

4.5.3 Menopauza

S ohledem na současnou délku života, se odhaduje, že mnoho žen bude žít třetinu svého života v menopauze. V důsledku dlouhodobého nedostatku estrogenů během menopauzy byla zavedena hormonální substituční terapie (HST), která zmírňuje příznaky a snižuje riziko zlomenin v pozdějším věku (Lagari, 2014). Má však i své nevýhody, a to zejména zvýšení rizika rakoviny prsu a dělohy. V České republice je extrémní nárůst karcinomu prsu. V současné době je počet nových případů onemocnění rakovinou prsu 7 tisíc/rok, před 15 lety to byly tři a půl tisíce. Vědci často opakují, že se přesně neví, co karcinom prsu způsobuje. Avšak např. v USA, kde byla HST v klimakteriu zakázána, se podařilo výskyt tohoto onemocnění od roku 2012 do roku 2014 snížit o 15 % (Máslková, 2015). Proto stále větší počet žen hledá jiné, přírodní alternativy. Takovouto alternativou jsou sójové isoflavony, kdy v asijských zemích bylo opět zaznamenáno méně příznaků spojených s menopauzou než v západních zemích, což je připisováno právě sójovým výrobkům. Při dostatku estrogenů totiž fytoestrogeny působí antiestrogeně a snižují tak riziko rakoviny spojené s hormony.

Isoflavony zmírňují vazomotorické příznaky (VMS), jako je noční pocení, které může chronicky ovlivnit spánek. Mnoho menopauzálních symptomů, např. podrážděnost, změny nálady, ztráta paměti a únava, může být ve skutečnosti výsledkem chronické nespavosti (Lagari, 2014). V roce 2011 byla provedena studie u žen, které byly rozděleny do dvou skupin – jedna skupina byla léčená 80 mg isoflavonů/denně a druhé bylo podáváno placebo. Pokus byl prováděn po dobu čtyř měsíců. Bylo potvrzeno výrazné snížení nespavosti ve skupině žen, kterým byly podávány isoflavony a to z 89,5 % na začátku pokusu na 36,9 % na konci. Ve skupině žen s placebem to pak byl pokles z 94,7% na 63,2% (Singh, 2010).

Osteoporóza, je metabolické onemocnění kostí vyznačující se ztrátou kostní hmoty a zhoršením kostní tkáně, což má za následek zvýšené riziko zlomenin. Toto globální onemocnění postihuje 150 milionů jedinců po celém světě. Nejrizikovější skupinou jsou ženy po menopauze, protože právě menopauza a pokles estrogenu bývá jednou z příčin tohoto onemocnění. Některé studie vykazují pozitivní vliv příjmu sójových produktů na kostní tkáň, avšak existují i studie, které tento vliv nepotvrzují a výsledky jsou nejasné (Singh, 2010). Fytoestrogeny jsou však považovány za možné terapeutické látky při osteoporóze (Lagari, 2014). Vliv isoflavonoidů na kostní tkáň probíhá jak prostřednictvím estrogenových receptorů, tak mechanismy na ER nezávislými. Isoflavony zvyšují syntézu vitamínu D, stimuluji příjem vápníku a zvyšují diferenciaci a proliferaci kostních buněk (Lapčík, Sosvorová, 2011). Z většiny literatury a studií vyplývá pozitivní vztah mezi isoflavony a kostní tkání u žen před a po menopauze. Účinná dávka je 90 mg/denně po dobu 6 měsíců (Bedell *et al.*, 2014).

4.5.4 Vliv ostatních složek semene sóji

Fyziologický účinek se předpokládá při příjmu 60-100 mg/den. Resorpce z trávicího traktu činí totiž pouze 8 % (Komprda, 2008). Vstřebatelnost je velmi závislá na složení střevní mikroflóry, zejména při konverzi daidzeinu na equol. Ve studii, která identifikovala „producenty equolu“ kultivací fekální flóry zdravých dospělých Japonců *in vitro*, bylo zjištěno, že na přeměně daidzeinu v equol se podílí 3 bakteriální kmeny: gram negativní *Bacteroides ovatus* spp., gram pozitivní *Streptococcus intermedius* spp. a *Ruminococcus productus* spp. (Salter, 2012).

Skutečný příjem isoflavonů v Evropě je však menší než 1 mg/denně, v Asii pak činí asi 35 mg/den (Komprda, 2008). Na zdravotních účincích sóji se nepodílí pouze isoflavony, ale i ostatní složky obsažené v bobech. Sója jako funkční potravina obsahuje několik významných nutraceutik – peptidy, potravní vlákninu a sacharidy důležité pro výživu bifidobakterií, složky tuků, antioxidanty a již zmiňované fytochemické látky. Jejich funkce a zdravotní přínos pro člověka jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tab. 1: Vliv biologických složek sóji na zdraví člověka (Sighn, 2010)

Biologická složka	Funkce	Zdravotní účinek
Sójové peptidy:		
Lunasin	inhibice acetylace histonů	antikarcinogenní
Bowman -birk	-	proti rakovině dutiny ústní, hlavy a krku a jako vyhlazovač kůže
Sójové peptidy s antihypertenzní aktivitou	inhibice angiotensin konvertujícího enzymu	proti vysokému tlaku
Peptidy v sójových hydrolyzátech	stimulace LDL cholesterolových receptorů	hypcholesterolemický účinek, proti obezitě
Isoflavony	estrogenní aktivita	proti rakovině prsu, prostaty, osteoporóze, zmírňuje příznaky menopauzy
	antioxidační aktivita	snižuje riziko CVD
Tokoferoly(α, β, γ, δ-isomery)	vychytávání volných radikálů (silný antioxidant)	prevence Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, zlepšuje imunitní systém
Lecithin	složka buněčné membrány	prevence Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby
	inhibice tvorby homocysteinu	snižuje riziko CVD
	syntéza VLDL, který přenáší alkohol z jater	snižuje tvorbu žlučnickových kamenů
	sójové liposomy	hydratuje pokožku
Steroly	emulgátor	snižuje celkový a LDL cholesterol
Rafinosa	jako prebiotikum, prostředí pro bifidobakterie	inhibice patogenů, snižuje riziko rakoviny tlustého střeva

4.6 Výrobky ze sóji

Sojové boby se většinou průmyslově zpracovávají a většina výrobků se používá k obohacování potravin o složky s významnou nutriční hodnotou. Důležitými komponenty jsou zejména bílkoviny, vláknina či nenasycené mastné kyseliny. Jako složky funkčních potravin se využívají lecitin, isoflavony, tokoferoly, fytosteroly, fytoestrogeny ad.

Významnými surovinami jsou sójový olej, který se vyrábí obdobně jako stolní oleje a i jeho využití je podobné – do majonéz, tatarok či pro výrobu rostlinných tuků. Jako emulgátor se pak využívá sójový lecitin získávaný ze sójového oleje odslizováním. Sójové mouky, krupice a vločky obsahují okolo 50 % bílkovin a vyrábí se plnotučné, polotučné či odtučněné. Z nich se pak vyrábí texturované sojové bílkoviny, které nahrazují maso nebo jsou přidávány do masných výrobků. Vyrábí se buď extruzí nebo spřádáním jako u vláken pro textilní průmysl. Principem je přeměnit globulární bílkoviny sóji na vláknité bílkoviny podobné proteinům masa (Kadlec, 2012).

Sojové výrobky můžeme dále rozdělit na fermentované a nefermentované.

4.6.1 Fermentované

Fermentované sojové výrobky se vyrábí záměrnou fermentací substrátu živými mikroorganismy, používají se kvasinky, bakterie i plísně. Výrobek získá novou chuť, vůni i texturu nebo se jeho sensorické vlastnosti zvýrazní, může také dojít ke zvýšení nutriční hodnoty obohacením o mikrobiální bílkoviny, AK, lipidy, vitamíny a také ke snížení obsahu toxických látek. Fermentace je důležitým konzervačním způsobem, hlavně v rozvojových zemích, kde jsou těžko dostupné ostatní způsoby konzervace - chlazení či mražení a potraviny by se tak rychle kazily. V těchto zemích mají fermentované výrobky i svůj původ a jsou často alternativou čerstvého masa – významným zdrojem bílkovin a vitamínů.

4.6.1.1 Sojové omáčky

Při výrobě se používá plíseň *Aspergillus oryzae* nebo *Aspergillus soyae*. Rozlišují se dva základní typy: **japonský typ shoyu**, který je vyroben z rozdrcených, napařených sojových bobů a rozdrcené, pražené pšenice ve stejném poměru a **čínský typ tamari**, který je vyroben pouze ze sojových bobů. Omáčka je tmavě hnědé barvy, má slanou, ostrou, nakyslou chuť a výrazné aroma připomínající masový bujón.

4.6.1.2 Miso

Miso je luštěninová pasta ze sojových bobů a rýže, popřípadě ječmene. Má konzistenci arašidového másla. Vyrábí se většinou přirozenou fermentací, která může trvat až 3 roky. Používá se zejména v japonské kuchyni jako koření do polévek. Chuť výrobku dávají vyšší alkoholy, které tvoří s kyselinami ze sojového oleje estery. Dlouhodobé skladování a tedy i konzervace jsou zajištěny vysokým obsahem soli.

4.6.1.3 Tempeh

K výrobě jsou používány plísňe rodu *Rhizopus*. Můžeme si ho představit jako plátek „masa“. Je to výrobek bohatý na bílkoviny, minerální látky, vitamíny skupiny B, isoflavony i vlákninu. Plísňe produkují enzymy, které způsobují důležité biochemické změny při fermentaci – zvyšují obsah vitamínů, odolnost k autooxidaci, změkčují strukturu bobů a odstraňují i nepříjemnou luštěninovou chuť.

4.6.1.4 Natto

Připravuje se z celých sojových bobů, které se spařují nevyluštěné. Fermentace probíhá pomocí bakterie *Bacillus subtilis var. Natto*. Barva a chuť odpovídají použitému mikroorganismu při fermentaci. Používá se jako ochucovadlo masa, plodů moře, zeleniny i jako příloha (Špalek *et al.*, 2008).

4.6.2 Nefermentované

4.6.2.1 Sojové mléko a nápoje

Sójové mléko je kapalný extrakt získaný po vaření, mletí a přefiltrování sójových bobů. Extrakt má konzistenci, která je velmi podobná kravskému mléku a je často používán jako jeho alternativa, zejména při intoleranci na mléčný cukr laktosu. Na trhu jsou dostupné čtyři hlavní typy sójových mléčných výrobků - neslazené, slazené, ochucené a s nízkým obsahem tuku.

Neslazené sójové mléko obvykle obsahuje pouze vodu a sojové boby. Slazené sójové mléko bývá nejčastěji doslazováno rýžovým sirupem, medem, kukuřičným či ječmenným sladovým extraktem. Ochucené sojové mléko může být slazené i neslazené s různými příchutěmi - kakaa, vanilky, jahody apod. Sojové mléko bývá často fortifikováno přísadkami vitamínů a minerálních látek ke zvýšení jeho nutriční hodnoty.

Celkový obsah sušiny u sójových nápojů se pohybuje okolo 8 - 10% v závislosti na obsahu sušiny v bobech. Sójové mléko může být dále zpracováváno do mražených dezertů (zmrzliny) a fermentovaných produktů (sójové jogurty a sójové sýry), které se vyrábí podobně jako v mlékárenském průmyslu.

4.6.2.2 Tofu

Tofu se vyrábí podobně jako sýry z mléka a má i podobnou strukturu. Sójové mléko se zahřívá a sráží koagulačními činidly (glukono - δ - lakton, CaCl_2 , CaSO_4) a vzniklá sraženina se lisuje za účelem odstranění syrovátky. Vzniklý produkt připomíná gel a může mít různé stupně tvrdosti v závislosti na typu a množství použitého koagulantu a také na způsobu zpracování. Obsah vody je asi 85%, dále obsahuje 7,8% bílkovin, 4,2% lipidů a 2 mg/g vápníku (Boye, 2010).

4.7 Metody stanovení isoflavonů v biologických matricích

Analýza isoflavonů zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků, z nichž každý vyžaduje zvláštní pozornost, aby nedošlo ke kontaminaci nebo vzájemným interakcím mezi molekulami, např. hydrolýze.

Jednotlivé kroky zahrnují získání reprezentativního vzorku a jeho dezintegraci a homogenizaci, následuje extrakce a přečištění, separace a identifikace jednotlivých látek, detekce a vyhodnocení získaných výsledků (Vacek *et al.*, 2008).

Analýza isoflavonů v biologických vzorcích je složitá vzhledem k nízké účinnosti chromatografické separace a časově náročné přípravě vzorků, proto je nutné zhodnotit a upravit chromatografické podmínky, aby byla separace co nejúčinnější (Klejdus, 2004). Pro jejich kvantifikaci a identifikaci je velmi vhodná kombinace vysoce efektivní a selektivní izolace s vysoce efektivními a citlivými separačními metodami. Pro stanovení isoflavonů se běžně používá HPLC (vysoko účinná kapalinová chromatografie) spojená s detektorem UV-vis-diodového pole (DAD) a / nebo hmotnostním spektrometrem (MS) (Klejdus, 2005).

4.7.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku může zahrnovat několik kroků, v závislosti na vlastnostech a parametrech vzorku. Mezi základní přípravné fáze patří hlavně lyofilizace pro odstranění vody,

homogenizace, prosévání, extrakce cílových sloučenin, pre-koncentrace, hydrolýza a derivatizace. Cílem je zejména zvýšit efektivitu analýzy, odstranit nebo snížit možný negativní vliv ostatních molekul, zvýšit citlivost analýzy zvýšením koncentrace analytu nebo transformovat zkoumané látky na vhodnější formu, která se dá lépe oddělit, detekovat a kvantifikovat (Rostagno *et al.*, 2009).

Konečným cílem pro stanovení isoflavonů je získat koncentrovaný extrakt se všemi isoflavony bez rušivých sloučenin z matrice. Jedná se zejména o odstranění vody, homogenizaci, případně odstranění tuku pomocí hexanu, to však může jinak vést k chybám při stanovení.

Hydrolýza je metoda, která se používá pro stanovení aglykonů. Dochází k hydrolýze glykosidů, tedy k rozbití vazeb mezi isoflavonem a cukernou jednotkou. Nejkonvenčnější hydrolytický postup zahrnuje přidání anorganické kyseliny HCl. Nejpoužívanějším rozpouštědlem je methanol (Naushad, 2014).

4.7.2 Extrakce a přečištění

Extrakční fáze je velice důležitý proces pro získání analytu z matrice. Cílem extrakce je tedy odstranit všechny nežádoucí sloučeniny, které by mohly rušit analýzu a získat malé množství kapaliny se vzorkem. Extrakční metoda by měla být rychlá a především selektivní, aby nedocházelo k interferenci analytu s ostatními složkami matrice, které by mohly způsobit problémy při stanovení (rozmývání píků, poškození kolony, atd.) (Vacek *et al.*, 2008). To nám umožní kvantitativní stanovení cílových sloučenin. Pro efektivní extrakci je důležité zvolit správné parametry - zejména použité rozpouštědlo, teplotu extrakce, množství vzorku a dobu působení (Rostagno *et al.*, 2009).

Převažující techniky pro izolaci isoflavonů ze sójových bobů a sójových produktů jsou jednoduché třepání, Soxhletova extrakce nebo extrakce pomocí ultrazvuku. Využívá se však i moderních technik jako je superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce urychleným tokem rozpouštědla (ASE) apod. (Klejdus, 2005). Jelikož příprava vzorku hraje klíčovou roli pro celou analýzu, roste význam i kombinovaných a párových technik, které jsou často jediným způsobem jak dosáhnout dobré účinnosti a selektivity extrakce (Klejdus, 2010).

4.7.2.1 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je nejstarší extrakční technikou. Byla vyvinuta již v roce 1879 a po mnoho let sloužila jako standardní metoda. Princip spočívá ve vložení vzorku do extrakční patrony. V destilační baňce je rozpouštědlo, které se zahřívá. Vzniklé páry kondenzují v chladiči a promývají vzorek v patroně, tím dochází k extrakci látek. Po ochlazení systému se extrahované látky přefiltrují do baňky a vznikne výsledný roztok s látkami, které chceme stanovovat. Tento postup se většinou opakuje ve dvou cyklech (Luque de Castro, 2009).

4.7.2.2 Extrakce pevnou fází (SPE)

SPE je jednoduchá technika pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Tato technika může být použita k přečištění extraktů, ale i pro extrakci / zakoncentrování sojových isoflavonů z potravin (Rostagno, 2005). Princip spočívá v zachycení molekuly na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká. Využívá se chemických vlastností molekul, kdy analyty ulpívají na sorbentu v důsledku vzájemných mezimolekulových interakcí (vazeb) (Klouda, 2003). Využívá se extrakčních kolonek, které musí být nejprve zvlhčeny. Poté se nanese vzorek a kolonka se promývá, aby došlo k odmytí nežádoucích látek. Následně se provede eluce pro získání vzorku zakoncentrovaném na sorbentu (Klejduš, 2014).

4.7.3 HPLC

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, založená na dělení analytu mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fází (MF) je kapalina, neboli eluent, která má také vliv na separaci složek. Stacionární fází (SF) je náplňová kolona, která má různou délku, vnitřní průměr a náplň v závislosti na typu separovaných látek a separaci. Je naplněna sorbentem – většinou silikagel, oxid hlinitý, aktivní uhlí, měniče iontů - v závislosti na typu chromatografie. V koloně dochází k samotné separaci na základě rozdílné afinity látek k SF. Dochází zde k rozdílné distribuci mezi MF a SF – pokud má látka vyšší afinitu k SF, má delší retenční čas a naopak. Látky jsou detekovány v detektoru, signál vyhodnocen na počítači (Klouda, 2003).

V současné době je HPLC na reverzní fází nejvíce uplatňovanou technikou pro stanovení isoflavonů. Používají se kolony, jejichž stacionární fází tvoří silikagel, na který je navázán oktadecyl C18 (Klejduš, 2008). Separace isoflavonů na reverzní fází je založena

na hydrofobní interakci jednotlivých isoflavonů se stacionární fází. Retenční časy jednotlivých látek závisí především na jejich rozpustnosti ve vodě. Bylo potvrzeno, že retenční čas na reverzní fází se zvyšuje s rostoucí hydrofobností analytu (Vacek *et al.*, 2008). Jako mobilní fáze se obvykle používá methanol nebo acetonitril, v různém poměru s vodou obsahující malé množství kyseliny (mravenčí, octová, fosforečná). Jelikož isoflavony mají slabě kyselou povahu, může použití kyselin zpřístupnit snadný rozklad analytů, zvýší se účinnost chromatografické separace, rozlišení a tvar píku.

Ke zkrácení doby analýzy lze použít ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC). Výhodou této techniky je lepší rozlišení, kratší čas analýzy a vyšší citlivost. Kromě toho UHPLC může být spojena s MS/MS pro rutinní analýzy, protože umožňuje rychlou detekci více sloučenin v kratším čase (Naushad, 2014).

4.7.4 Detekce

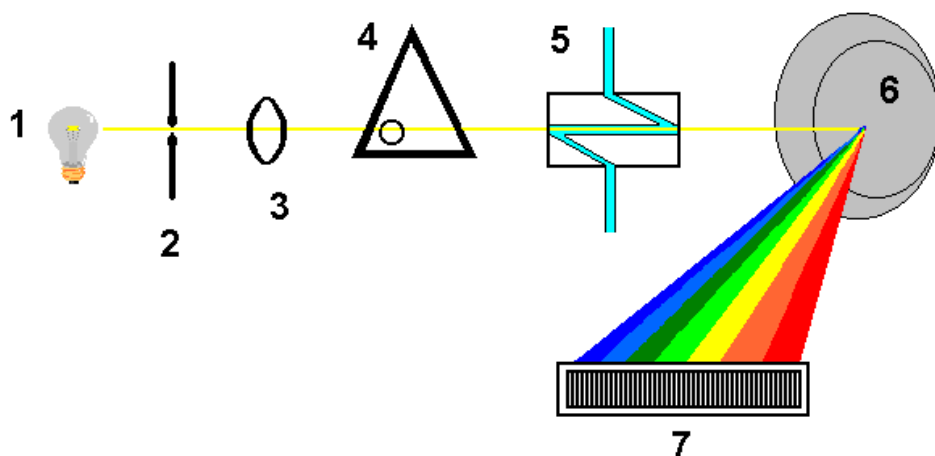
Nejčastěji se používá metoda HPLC spojená s ultrafialovým (UV) detektorem, detektorem diodového pole (DAD), hmotnostním spektrometrem (MS), DAD-MS, UV-MS nebo tandemovým MS (MS/MS) (Naushad, 2014). Pro separaci isoflavonů byla vypracována celá řada analytických postupů pomocí HPLC s různými způsoby detekce (Mikelová *et al.*, 2004), mezi nejvyužívanější patří DAD a UV detektor. Vlnová délka při stanovení se volí v rozmezí 230 až 280 nm, protože všechny isoflavony vykazují intenzivní absorpci v této UV oblasti spektra. Klejdus *et al.* zjistili, že vlnová délka 254 nm je nejvhodnější pro stanovení všech isoflavonů, DAD vykazoval nejlepší odpověď (Klejdus, 2005).

Nedostatečná je izokratická eluce, proto je nutné použít eluci gradientovou. Sloučeniny jsou si chemicky velmi podobné a je nutné je od sebe oddělit. Izokratická eluce může být použita v případě, že glykosidy byly rozrušeny hydrolýzou a stanovují se pouze aglykony (Rostagno, 2009).

4.7.4.1 Detektor diodového pole

Detektor s diodovým polem (DAD) snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace. Záření ze zdroje prochází měrnou celou detektoru a spektrálně se rozkládá na holografické mřížce. Na fotodiody pak dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je přitom spojena s kondenzátorem, který je

nabitý na stanovenou hodnotu. Po dopadu záření na diodu vzniká proud, který vybíjí kondenzátor. Kondenzátory se nabíjí a měří se proud potřebný na jejich dobití (Obr. 4) (Nováková, 2013).

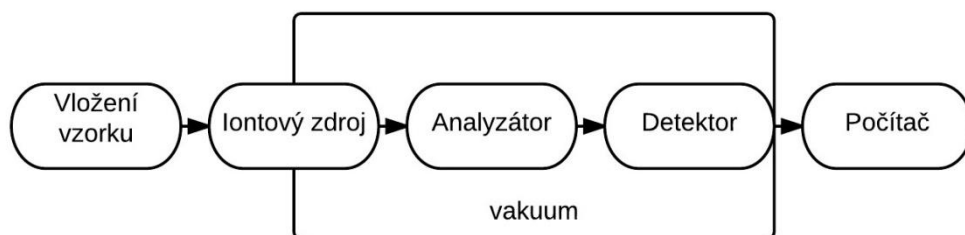


Obr. 4: Schéma detektoru s diodovým polem. 1 – deuteriová výbojka, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – průtoková cela, 6 – holografická mřížka, 7 – diodové pole (Nováková, 2013)

4.7.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr (MS) se ve spojení s HPLC využívá jako detektor. Toto spojení je klíčové pro analýzu reálných vzorků – biologických matric, tkání či tekutin, které jsou tvořené vysokým počtem složek a mnohdy jsou si tak podobné, že se běžnými detektory nedají identifikovat. Využití MS je široké – k určení molekulové hmotnosti, identifikaci látek i ke kvantifikaci.

Princip spočívá ve třech krocích. Nejprve se vzorek musí zionizovat, nejčastěji se využívá měkká ionizace, kdy nevzniká tolik fragmentů, které ruší analýzu. Ionty jsou dále vedeny do analyzátoru, kde dochází k jejich dělení dle poměru hmotnosti ku náboji m/z . Nakonec jsou ionty detekovány v detektoru (Obr. 5) (Nováková, 2013).



Obr. 5: Schéma hmotnostního spektrometru

Nejpoužívanější ionizační techniky se provádí za atmosferického tlaku – elektrosprej či chemická ionizace. Jako analyzátory se používají zejména trojitý kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu (TOF), Orbitrap apod. Detektorem většinou bývá nějaký násobič – elektronový či fotonásobič. Analýza a detekce iontů probíhá za vakua, protože za jiných podmínek by spolu ionty reagovaly a do detektoru by se nic nedostalo (Srbek, 2014).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Vzorky

Vzorky použité k analýze jsou běžně dostupné na trhu a byly zakoupeny v prodejně s potravinami. K analýze byly použity jak fermentované, tak nefermentované produkty či výrobky různě technologicky zpracované.

1. Sójové boby bio. Složení: sójové boby. Země původu: Čína. Výrobce: Country Life, Nenačovice 87, 266 01 Beroun 1.

2. Sojový granulát – extrudovaný. Složení: sójová mouka odtučněná, voda. Země původu: ČR. Výrobce: EKOPRODUKT spol. s.r.o., Masarykova 118, 664 42 Modřice.

3. Sójové kostky – Holandské sojové kostky růžové. Složení: sojová mouka odtučněná, fermentovaná rýže, voda. Země původu: Jižní Amerika. Výrobce: EKOPRODUKT spol. s.r.o., Masarykova 118, 664 42 Modřice.

4. BioTempeh – uzený. Složení: Sója, slunečnicový olej, shoyu. Výrobce: SUNFOOD s.r.o., Čs. odboje 800, 518 01 Dobruška.

5. Sójové párky. Složení: voda, sojová bílkovina (11%), olej rostlinný řepkový, pšeničná bílkovina, modifikovaný škrob kukuřičný, sůl, aroma, směs koření, citrusová vláknina, zahušťovadlo karagenan, přírodní extrakty koření. Výrobce: KALMA K.S., Ostravská 256, 739 25 Sviadnov.

6. Protmix. Složení: rostlinné bílkoviny – sójová odtučněná mouka, proteinová směs pro uzenářskou výrobu. Výrobce: EKOPRODUKT spol. s.r.o., Masarykova 118, 664 42 Modřice.

7. Sójový prejt – produkt k přímé spotřebě. Země původu: Česká republika. Výrobce: KALMA K.S., Ostravská 256, 739 25 Sviadnov.

8. Sojový nápoj v prášku – Soya drink. Složení: kukuřičný sirup, částečně hydrogenovaný sójový olej, kaseinát sodný, hydrogenfosforečnan draselný (E340),

emulgátory (E471), protihrudkující látky (E551), barviva (E171). Země původu: USA. Výrobce: EKOPRODUKT spol. s.r.o., Masarykova 118, 664 42 Modřice.

9. Sojový nápoj sušený – Soja creamer do kávy a čaje. Složení: sušený kukuřičný sirup, sójová složka 29,4% (částečně ztužený sójový olej, sójová bílkovina), regulátor kyselosti fosforečnan draselný, emulgátor E471, kaseinát sodný, protispékavá látka oxid křemičitý, sůl, barvivo karoten. Výrobce: Mogador s.r.o., Tř. Tomáše Bati 1664, Otrokovice 765 02.

10. Sojová mouka – hladká, plnotučná. Složení: sojové boby. Země původu: ČR. Výroba, balení a distribuce: Natural Jihlava JK s.r.o., Na dolech 10, 586 01 Jihlava

5.1.2 Chemikálie

- 80 % methanol
- 2 M HCl
- acetonitril
- 0,2 % kyselina octová
- destilovaná voda

Všechny chemikálie byly dodány firmou Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika.

5.1.3 Přístroje a pomůcky

- laboratorní mlýnek IKA A11 basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- analytické váhy Precisa 240 A (Německo)
- třepačka IKA KS 4000 i control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- extraktor fex IKA KHS 1 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- lyofilizátor Labconco FreeZone 2,5 (Labconco, USA)
- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1200 Series (USA), který se skládá z vakuového degaséru, binární pumpy, autosampleru, termostatu kolon, detektoru diodového pole (DAD) a hmotnostního spektrometru (MS), typu trojitý kvadrupól Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS.
- kolona Zorbax Poroshell 120 EC-18 (USA)
- ostatní pomůcky: navažovací lodička, kádinky, nálevky, odměrné válce, vialky, stříkačkové filtry, parafilm.

5.1.4 Software

Pro zpracování naměřených dat byl použit software MassHunter B.03. Data byla převedena do textového editoru MS Word a následně podrobena statistickému zpracování v programu STATISTICA 12.

5.2 Metodika

5.2.1 Příprava vzorků

Vzorky bobů, granulátu a kostek byly pomlety na laboratorním mlýnku a zhomogenizovány. Ze vzorků tempehu a párků byla před extrakcí odstraněna voda na lyofilizátoru a následně byly pomlety a zhomogenizovány. Vzorky prejtu a protmixu byly extrahovány hexanem k odstranění tuku a následně upraveny jako vzorky ostatní. Vzorky sojového drinku, soya creameru a mouky již byly v sypkém, suchém stavu, takže nepotřebovaly žádnou úpravu.

Následně byl ze všech vzorků odebrán 1 g a vzorek byl převeden do extraktoru. Extrakce v extraktoru probíhala ve 40 ml 80 % methanolu ve dvou cyklech (při 150°C/ 1 hod). Vzorky byly následně přefiltrovány a doplněny do odměrné baňky na 50 ml 80 % methanolem. Takto připravené extrakty byly přefiltrovány a převedeny do vialek a podrobeny samotné analýze.

Při extrakci na třepačce byl 1 g vzorku rozpuštěn v 50 ml 80 % methanolu a extrahován při 50°C/1 hod. Vzorky byly poté přefiltrovány a doplněny do odměrné baňky na 50 ml 80 % methanolem. Extrakty byly přefiltrovány a převedeny do vialek v objemu 200 µl a podrobeny měření.

5.2.2 Podmínky HPLC

Separace isoflavonů probíhala na kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1200 Series. Byla použita kolona Zorbax Poroshell 120 EC-18 o rozměrech 3.0 x 50 mm a velikosti částic 2,7 µm. Složení mobilní fáze bylo následující: solvent A = acetonitril, solvent B = 0,2 % kyselina octová (v/v). Byl zvolen lineární gradient se složením mobilní fáze v čase 0 minut $t_0 = 85 \% B$, $t_{0,30} = 40 \% B$, $t_{1,40} = 0 \% B$, $t_{1,8} = 85 \% B$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml/min. Teplota na termostatu kolon byla 60°C. U parametrů hmotnostního detektoru (MS) byla zvolena teplota sušícího plynu 350 °C, průtok sušícího

plynu 13 l/min, nebulizační tlak 50 psi, teplota zaostřovacího plynu 400 °C a průtok tohoto plynu byl 12 l/min. Napětí na kapiláře bylo 4000 V. Hmotnostní spektra byla snímána v negativním módu.

5.2.3 Laboratorní měření

Vialky se vzorky byly podrobeny analýze v kapalinovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem. Parametry pro identifikaci isoflavonů v hmotnostním spektrometru jsou uvedeny v tabulce č. 2. Kvalitativní vyhodnocení bylo provedeno na základě srovnání retenčních časů analyzovaných vzorků s retenčními časy standardů. Kvantitativní vyhodnocení bylo vypočítáno z plochy píku pomocí softwaru MassHunter a přečítáno na jednotku mg / 100g. Kalibrační údaje pro stanovované látky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tab. 2: Parametry hmotnostního spektrometru

název sloučeniny	prekurzorový ion	produktový ion	fragmentační napětí	kolizní energie
ononin	465	267	110	8
glycitin	445	283	100	8
sissotrin	445	283	164	4
genistin	431	268	120	5
daidzin	415	252	120	10
glycitein	283	268	110	8
biochanin A	283	268	122	14
genistein	269	133	135	25
formononetin	267	252	120	13
daidzein	253	208	145	21

Tab. 3: Kalibrační údaje

	Retenční čas r_t (min)	Regresní rovnice	R^2
daidzein	1,53	$y = 1344,582x + 1205,968$	0,998
daidzin	0,81	$y = 2621,032x + 385,278$	0,997
genistein	1,64	$y = 2156,084x + 288,428$	0,996
genistin	1,33	$y = 4216,823x + 1321,640$	0,999
glycitein	1,56	$y = 12278,053x + 2359,774$	0,991
glycitin	0,87	$y = 3566,400x + 419,105$	0,997

5.2.4 Statistické zpracování výsledků

Každý vzorek byl měřen třikrát a výsledky byly podrobeny následné statistické analýze. Naměřená data byla zprůměrována a byla určena směrodatná odchylka, veškeré výsledky jsou uvedeny v příloze 2. Výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce č. 4. Následně byly hodnoty otestovány jednofaktorovou analýzou rozptylu ANOVA (Analysis of Variance). Nulová hypotéza zněla „Obsah daného isoflavonu se v jednotlivých produktech shoduje“. Analýza rozptylu pro každý isoflavon zamítla tuto nulovou hypotézu a proto mě zajímalo, v kterých produktech se obsah isoflavonů statisticky významně liší. Analýza byla provedena Tukeyho metodou mnohonásobného porovnávání. Výsledky mnohonásobného porovnání jsou uvedeny v příloze 3. Obsah jednotlivých isoflavonů ve zkoumaných vzorcích byl většinou velmi rozdílný (červená barva v tabulkách). Dvojice, u kterých nebyl prokázán statisticky významný rozdíl a jejichž obsah ve výrobku byl podobný, jsou znázorněny barvou černou. Jednotlivé komentáře jsou pak uvedeny ve výsledcích

(Ad 5.3)

Tab. 4: Obsah všech isoflavonů ve vzorcích v mg/ 100 g (n=3)

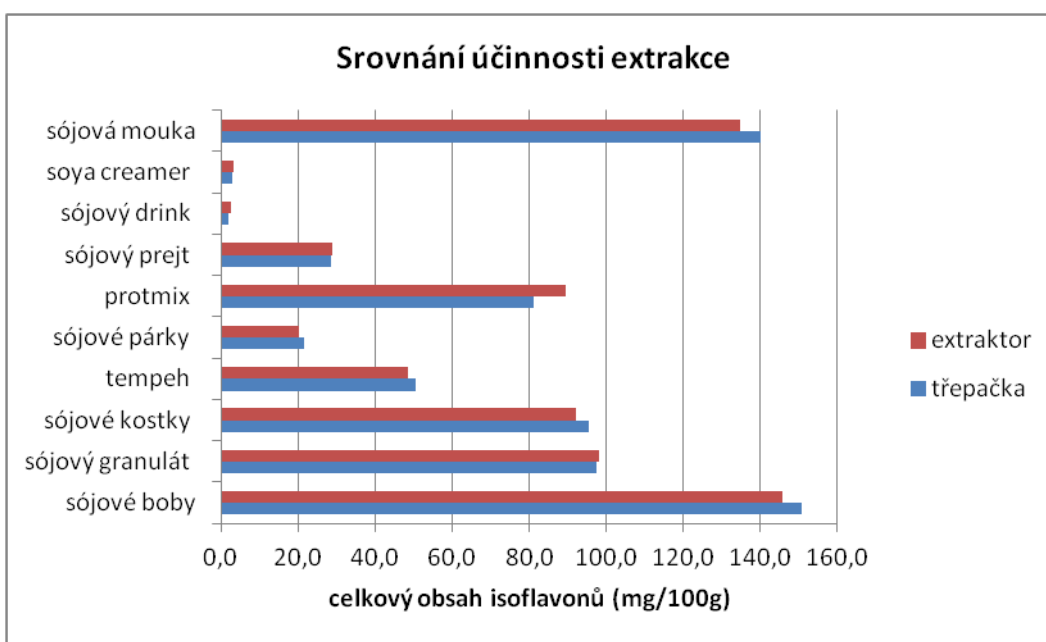
Isoflavon	Vzorek									
	sójové boby	sójový granulát	sójové kostky	tempeh	sójové párky	protmix	sójový prejt	sójový drink	soya creamer	sójová mouka
daidzin	59,12 ± 0,66	34,6 ± 1,12	37,19 ± 0,79	11,11 ± 0,26	12,24 ± 0,29	45,26 ± 0,81	22,63 ± 0,03	0,72 ± 0,004	0,91 ± 0,03	64,96 ± 0,4
genistin	41,47 ± 1,16	38,94 ± 0,12	30,1 ± 1,08	10,95 ± 0,25	3,69 ± 0,2	27,65 ± 0,61	4,34 ± 0,07	1,18 ± 0,01	1,54 ± 0,03	43,76 ± 1,25
glycitin	34,18 ± 0,86	15,77 ± 0,6	21,99 ± 0,21	2,31 ± 0,08	1,41 ± 0,07	11,64 ± 0,66	0,32 ± 0,008	0,2 ± 0,003	0,16 ± 0,004	11,08 ± 0,55
daidzein	5,85 ± 0,15	1,89 ± 0,04	1,59 ± 0,09	9,55 ± 0,1	1,66 ± 0,02	1,46 ± 0,02	0,78 ± 0,06	0,19 ± 0,007	0,35 ± 0,01	4,98 ± 0,03
genistein	3,83 ± 0,03	3,98 ± 0,14	0,97 ± 0,07	13,75 ± 0,24	1,16 ± 0,06	2,81 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,009	5,03 ± 0,07
glycitein	5,04 ± 0,07	2,64 ± 0,13	2,21 ± 0,002	1,22 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,14 ± 0,003	0,04 ± 0,008	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,001	6,18 ± 0,008
celkem	149,48 ± 1,13	97,81 ± 0,51	94,06 ± 1,66	48,88 ± 0,34	20,49 ± 0,62	88,95 ± 0,68	28,9 ± 0,03	2,57 ± 0,02	3,19 ± 0,07	136,01 ± 1,4

Vysvětlivky: výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze třech měření ± směrodatná odchylka, celkem – celkový obsah všech isoflavonů

5.3 Výsledky

Pro stanovení isoflavonů byly použity 2 extrakční techniky, extrakce na třepačce a v Soxhletově extraktoru. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí jednovýběrového Wilcoxonova testu, kdy P-hodnota vyšla 0,44. Nulová hypotéza ve znění „Metody se neliší na hladině významnosti 0,05“ nebyla zamítnuta a bylo dokázáno, že metody tedy fungují stejně.

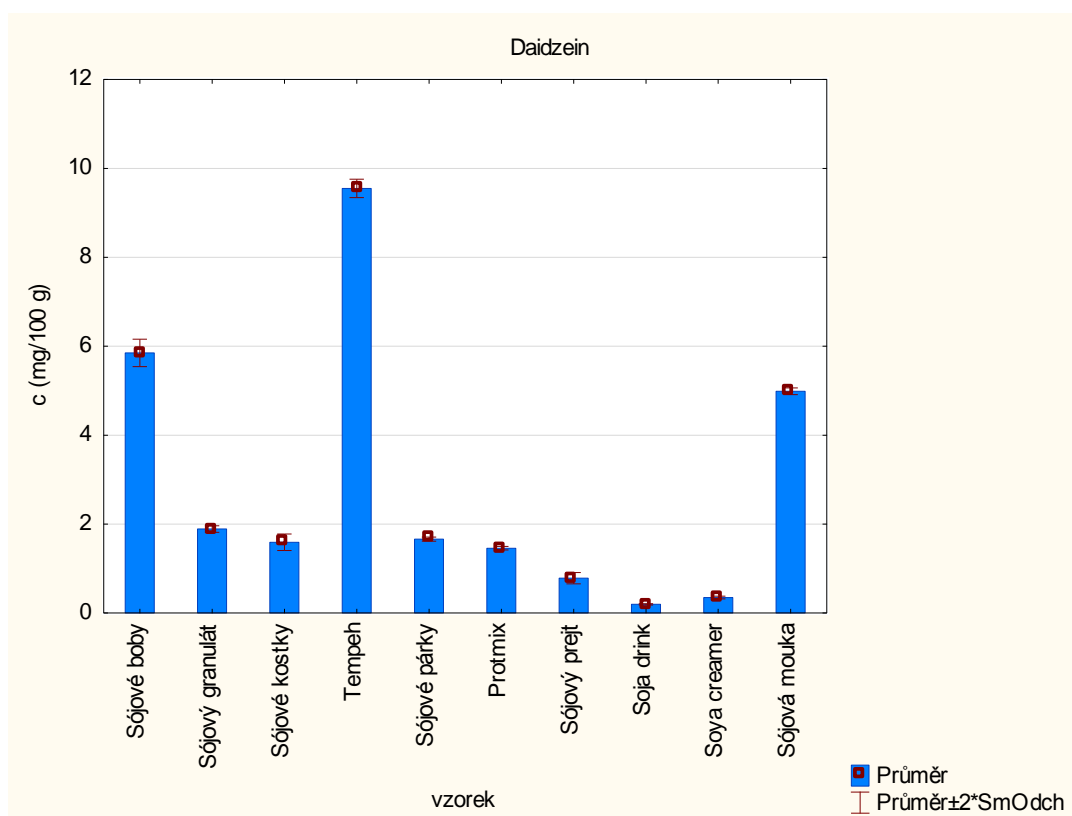
Mezi extrakcemi nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, pouze u některých vzorků byla účinnost nepatrně vyšší při extrakci v extraktoru, u jiných vzorků na třepačce. Z výsledků lze usuzovat, že závisí na typu matrice. U sypkých vzorků v suchém stavu, které nebyly většinou nijak upravovány nebo byl zásah při výrobě minimální, stačila pro extrakci látek pouze třepačka. Naopak vzorky, které prošly výrobou s různými technologickými postupy a před extrakcí byly lyofilizovány či došlo k odstranění tuku hexanem, potřebovaly na extrahování látek do roztoku delší časový úsek i teplotu a jako účinnější se jevila metoda extrakce v Soxhletově extraktoru. Srovnání účinnosti obou metod je znázorněno na obrázku č. 6.



Obr. 6: Srovnání extrakčních technik

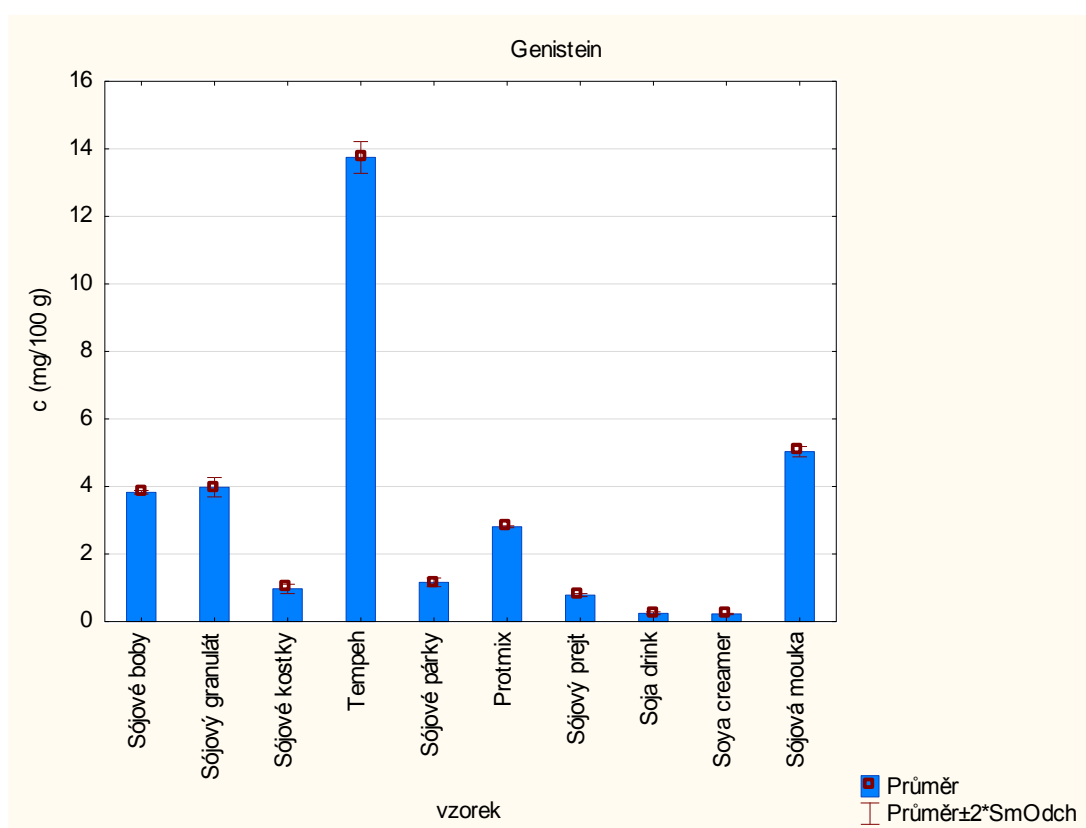
U vzorků sóji a sójových produktů byly sledovány isoflavony daidzein, genistein, glycitein (aglykony) a jejich β – glykosidy genistin, daidzin a glycitin. Ostatní isoflavony jako ononin, formononetin, sissotrin a biochanin A nebyly detekovány.

Obsah daidzeinu byl nejvyšší v tempehu a to v množství 9,55 mg/100 g výrobku. Dále se vyšší množství nacházelo ve vzorku sójových bobů (5,85 mg/100 g) a sójové mouky (4,99 mg/100 g). V sójových kostkách, párcích a protmixu se nacházelo množství, které se statisticky průkazně nelišilo (od 1,46 do 1,66 mg/100 g). Nejmenší množství se nacházelo ve vzorcích instantních sójových nápojů- soja creamer (0,35 mg/100 g) a soya drink (0,2 mg/100 g), mezi těmito vzorky také nebyl zjištěn rozdíl. Zastoupení daidzeinu je znázorněno na obrázku č. 7.



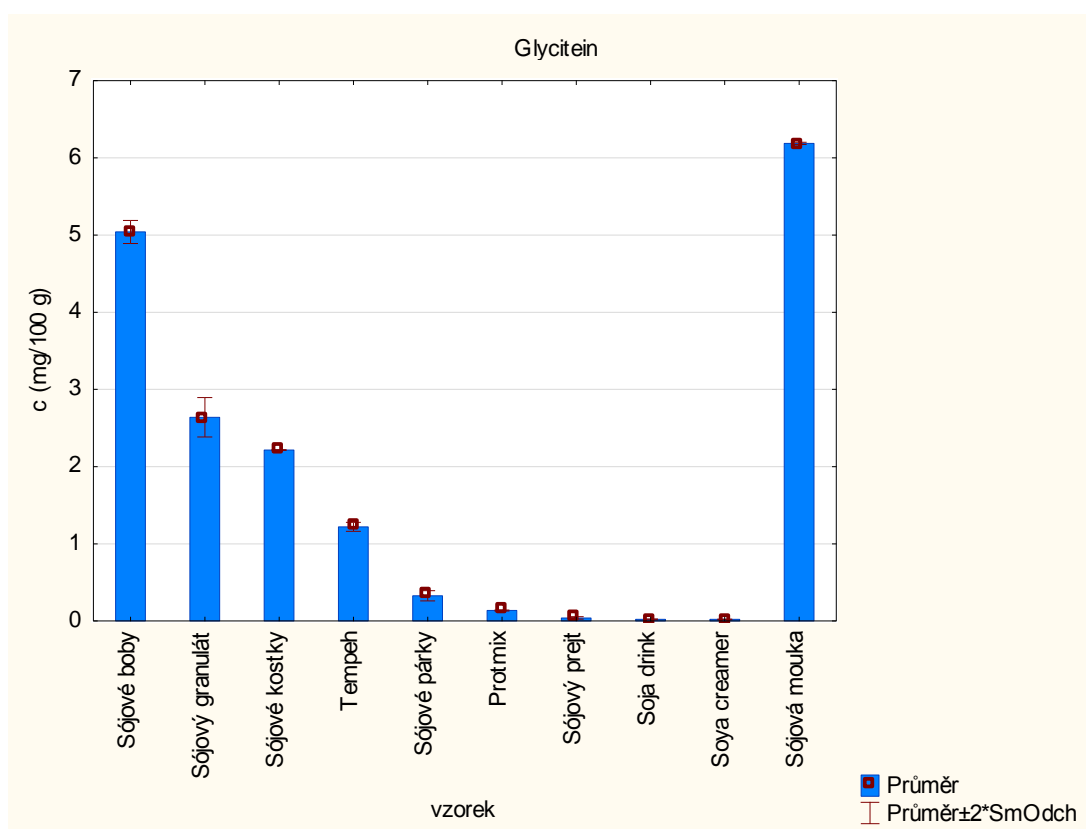
Obr. 7: Obsah daidzeinu v sójových výrobcích

Genistein se opět nacházel v nejvyšším množství v tempehu (13,75 mg/100 g). Množství 5,03 mg/100 g bylo detekováno ve vzorku sójové mouky. Statisticky průkazný rozdíl nebyl prokázán mezi vzorky sójového granulátu (3,98 mg/100 g) a sójových bobů (3,83 mg/100 g). V protmixu bylo tohoto isoflavonu 2,81 mg/100 g, sójové párky obsahovaly 1,16 mg/100 g, sójové kostky 0,97 mg/100 g a sójový prejt 0,78 mg/100 g. Dvojice párky – kostky a prejt – kostky se významně nelišily. Nejnižší obsah genisteinu byl ve vzorcích soya drinku (0,25 mg/100 g) a soja creameru (0,23 mg/100 g). Množství genisteinu v sójových výrobcích je graficky vyjádřeno na obrázku č. 8.



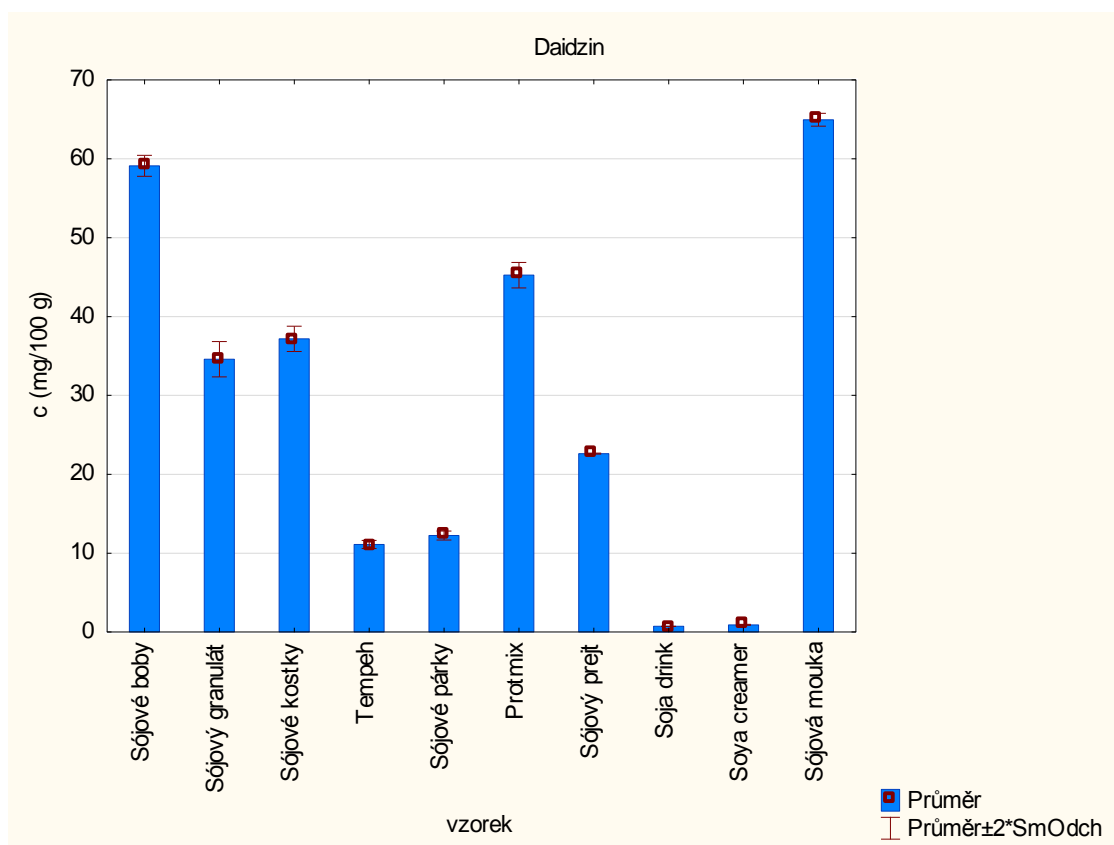
Obr 8: Zastoupení genisteinu v sójových výrobcích

Aglykon glycitein byl nejvíce obsažen ve vzorku sójové mouky (6,19 mg/100 g) a v sójových bobech (5,04 mg/100 g). U vzorků sójového granulátu (2,64 mg/100 g) a sójových kostek (2,22 mg/100 g) byl obsah glyciteinu nižší. V tempehu se glycitein nacházel v množství 1,22 mg/100 g. V malém množství byl tento aglykon obsažen v sójových párcích (0,33 mg/100 g) a protmixu (0,14 mg/100 g). Na hranici detekovatelnosti bylo zjištěno i minimální množství ve vzorcích sójového prejtu (0,04 mg/100 g), soya drinku (0,02 mg/100 g) a soya creameru (0,02 mg/100 g). Vzorky protmixu, prejtu, drinku a creameru se statisticky průkazně nelišily. Vyobrazení zastoupení glyciteinu ve vzorcích je na obrázku č. 9.



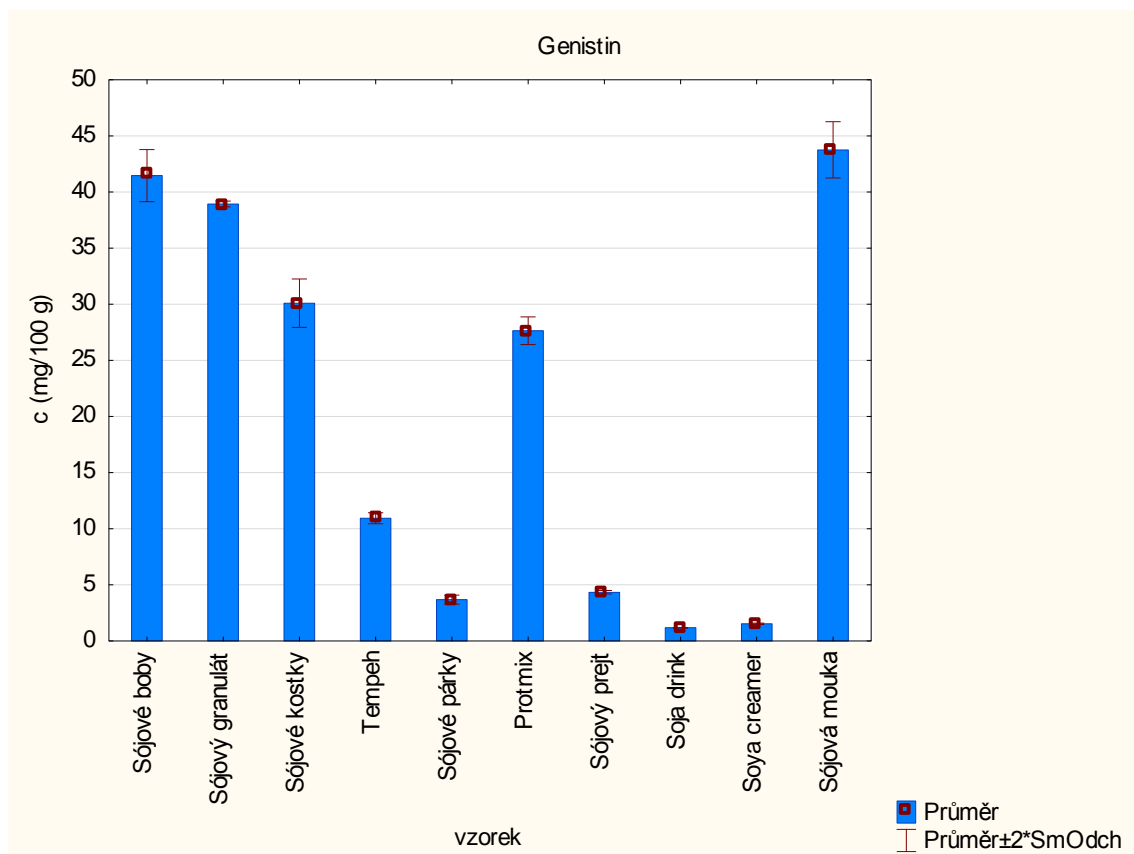
Obr. 9: Zastoupení glyciteinu ve vzorcích

Daidzin, který je β -glykosidem daidzeinu, byl ve vzorcích zastoupen v různém množství. Nejvyšší obsah byl stanoven ve vzorku sójové mouky (64,96 mg/100 g). V sójových bobech byl obsah o něco nižší 59,12 mg/100 g bobů. Dále byl vyšší obsah detekován v protmixu (45,26 mg/100 g), sójových kostkách (37,19 mg/100 g) a sójovém granulátu (34,6 mg/100 g). Statisticky průkazně se nelišil obsah ve vzorcích sójových párků (12,24 mg/100 g) a tempehu (11,11 mg/100 g). Nejméně β -glykosidu se nacházelo opět ve vzorcích soya drinku (0,72 mg/100 g) a soya creameru (0,91 mg/100 g). V obsahu daidzinu se tyto 2 vzorky od sebe významně nelišily. Grafické znázornění obsahu daidzinu je na obrázku č. 10.



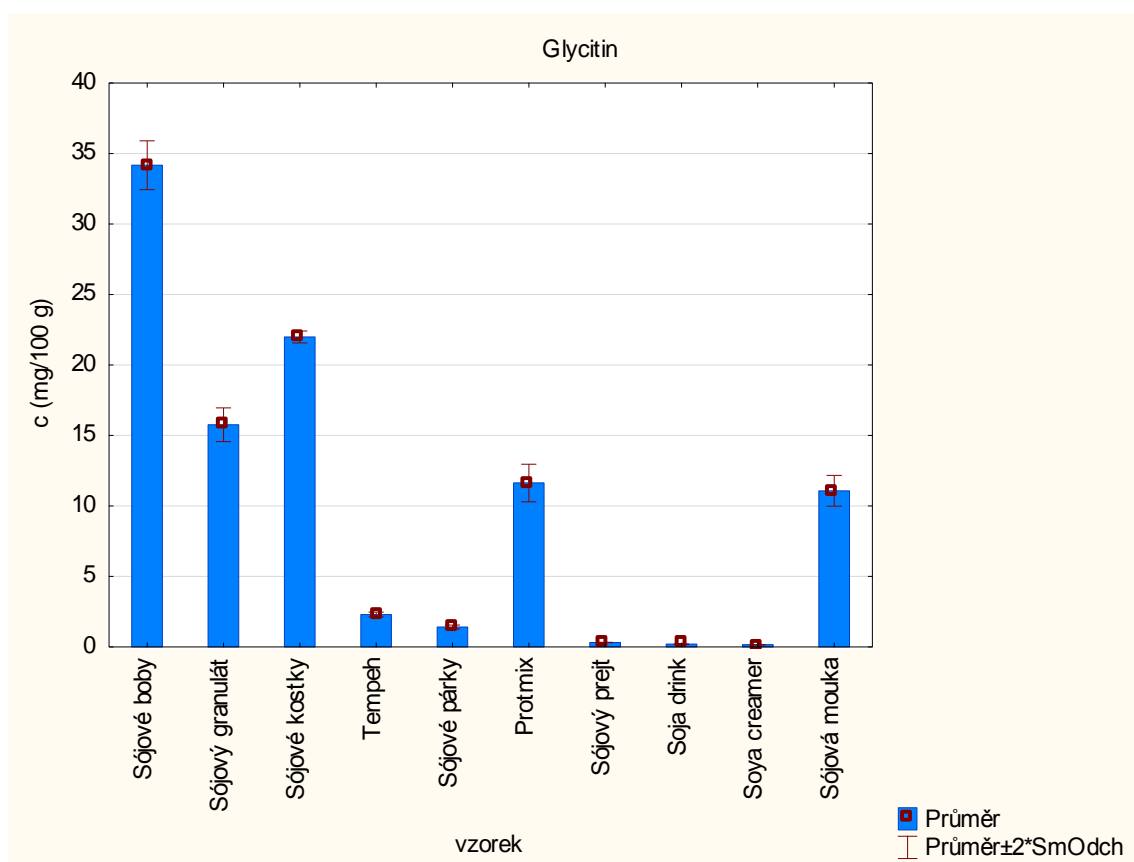
Obr. 10: Zastoupení daidzinu ve vzorcích sójových výrobků

Dalším zástupcem je genistin, který se v největším množství nacházel ve vzorku sójové mouky (43,76 mg/100 g), sójových bobů (41,47 mg/100 g) a sójového granulátu (38,94 mg/100 g). Nižší byl obsah u vzorků sójových kostek (30,1 mg/100 g) a protmixu (27,65 mg/100 g). V tzv. „masných“ sójových výrobcích, párcích a prejtu, byl obsah podobný (párky 3,69 mg/100 g a prejt 4,34 mg/100 g) a statisticky významně se nelišil. Nejméně tohoto isoflavonu opět obsahovaly instantní nápoje soya drink (1,18 mg/100 g) a soya creamer (1,54 mg/100 g). Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku č. 11.



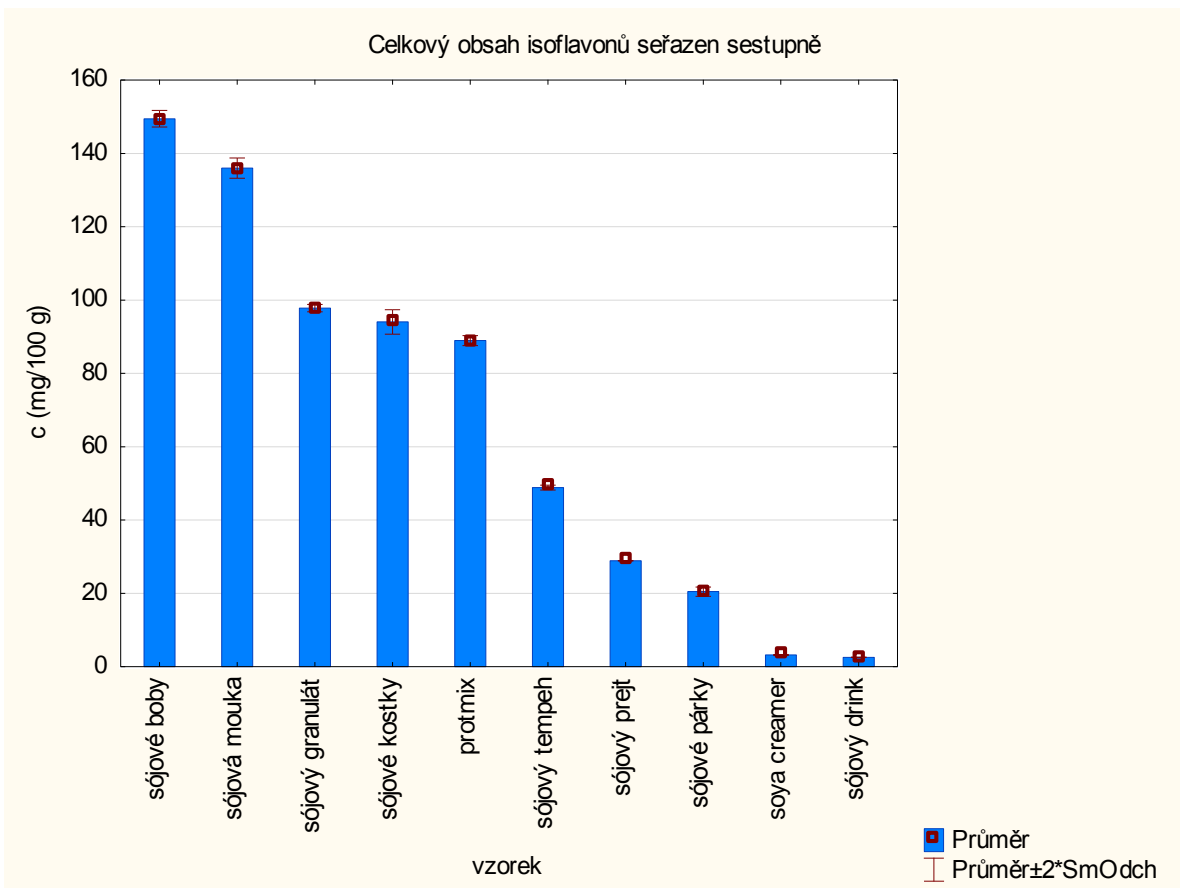
Obr. 11: Grafické znázornění obsahu genistinu ve vzorcích

Posledním z měřených isoflavonů byl glycitin, který byl nejvíce zastoupen v sójových bobech (34,18 mg/100 g). Vyšší obsah byl také stanoven v sójových kostkách (21,99 mg/100 g) a granulátu (15,77 mg/100 g). Statisticky podobných výsledků bylo dosaženo u protmixu (11,64 mg/100 g) a sójové mouky (11,09 mg/100 g). Statisticky průkazně se výsledky nelišily u tempehu (2,31 mg/100 g) a párků (1,42 mg/100 g). Malé množství glycitinu bylo detekováno u vzorků sójového prejtu (0,32 mg/100 g), soya drinku (0,20 mg/100 g) a soya creameru (0,16 mg/100 g), jejichž množství se v těchto 3 výrobcích také statisticky nelišilo. Zastoupení glycitinu ve vzorcích je na obrázku č. 12.

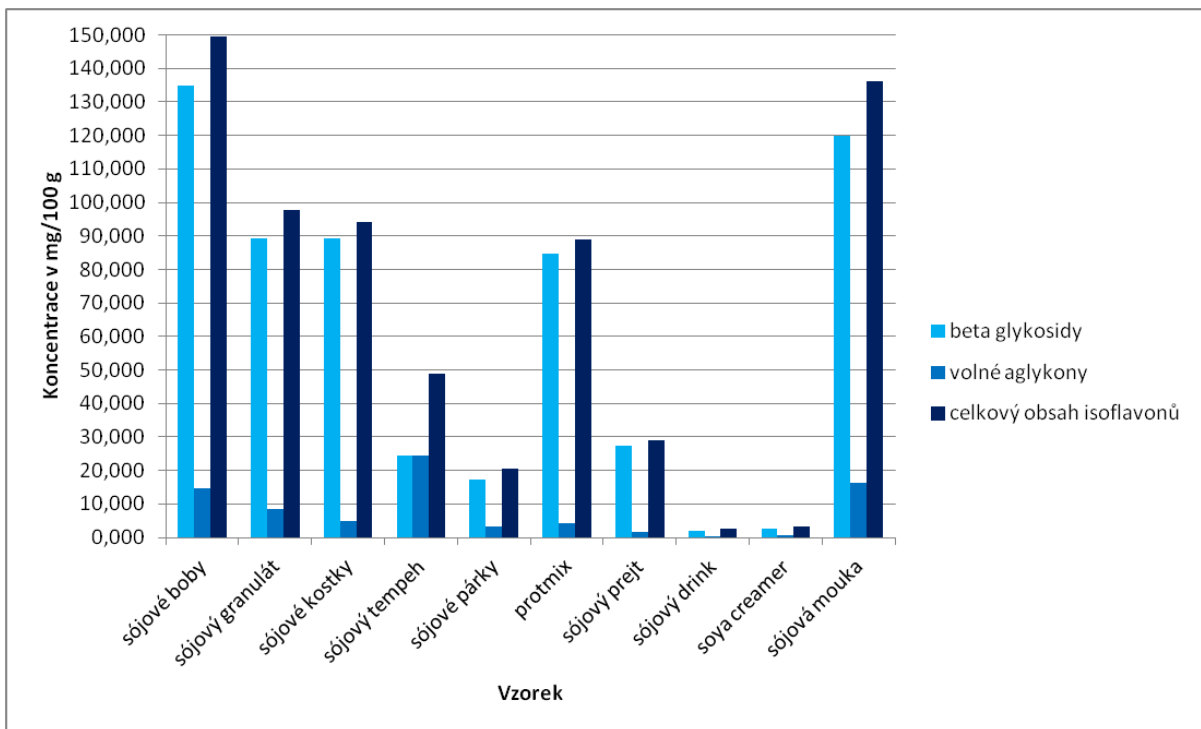


Obr. 12: Zastoupení glycitinu ve vzorcích sójových výrobků

Celkově se nejvíce isoflavonů nacházelo ve vzorku čistých neupravených sójových bobů (149,48 mg/100 g), z toho byly ve větší míře zastoupeny β -glykosidy (134,76 mg/100 g). Aglykony, tedy volné isoflavony, se nacházely ve vzorku méně (14,72 mg/100 g). V sójové mouce byl celkový obsah isoflavonů 136,01 mg/100 g výrobku, z toho β -glykosidy tvořily celých 88% (tj. 119,81 mg/100 g). Podobné množství se nacházelo v extrudovaných sójových výrobcích, tedy sójovém granulátu a sójových kostkách. Obsah konjugovaných isoflavonů se téměř nelišil a pohyboval se okolo 89,3 mg/100 g produktu. Aglykony se však lišily o něco víc, kdy u granulí byl obsah 8,51 mg/100 g a u kostek 4,78 mg/100 g. Větší množství isoflavonů se také nacházelo v protmixu, tedy směsi do masných výrobků, která je tvořena zejména rostlinnými a tedy i sójovými bílkovinami. Celkový obsah isoflavonů v tomto výrobku byl 88,95 mg/100 g a konjugáty tvořily 90 % z tohoto množství (84,55 mg/100 g). U tempehu byl obsah β -glykosidů i aglykonů totožný, činil 50 % a celkový obsah isoflavonů byl 48,88 mg/100 g výrobku. V tzv. náhražkách masa se isoflavony nacházely v menším množství, z velké části ve formě β -glykosidů. U prejtu byl celkový obsah 28,9 mg/100 g a glykosidy tvořily celých 94,4 %. Párky obsahovaly 20,5 mg isoflavonů na 100 g výrobku a jejich konjugáty odpovídaly 84,6 %. Nejméně isoflavonů se nacházelo v instantních sójových nápojích, kdy byly porovnány 2 vzorky od jiných společností a mezi těmito vzorky nebyl statisticky průkazný rozdíl. V soja creameru byl celkový obsah isoflavonů 3,2 mg/100 g a v soya drinku 2,57 mg/100 g. Konjugáty u obou výrobků představovaly 81 % z celkového množství isoflavonů. Zastoupení celkového obsahu isoflavonů od nejvíce koncentrovaných vzorků po nejméně je znázorněno na obrázku č. 13. Obsah volných a vázaných fytoestrogenů v každém vzorku je pak znázorněn na obrázku č. 14.



Obr. 13: Celkový obsah isoflavonů ve vzorcích seřazen sestupně



Obr. 14: Obsah konjugovaných, volných a celkových isoflavonů ve vzorcích

Z výsledků je patrné, že obsah vázaných isoflavonů je mnohem vyšší než volných aglykonů. U téměř všech vzorků představují β -glykosidy okolo 80-90 % a zbytek tvoří aglykony. Výjimku představuje tempeh, jehož obsah aglykonů a β -glykosidů je v poměru 50:50. Zvýšený obsah aglykonů je připočítáván fermentaci, kterou výrobek prošel. Mikroorganismy jsou zodpovědné za přerušení vazeb mezi glykosidickou jednotkou a dojde k uvolnění aglykonu z vazby.

Nejvíce zastoupeným β -glykosidem byl daidzin, pouze u sójových nápojů a granulátu převažoval genistin. Nejméně byl zastoupen β -glykosid glycitin. Nejvíce zastoupeným aglykonem byl genistein, vzorky se však značně lišily. Nejvíce genisteinu bylo v tempehu (13,75 mg/100 g), stejně tak daidzeinu (9,55 mg/100 g). Nejvyšší obsah glyciteinu byl v sójové mouce (6,19 mg/100 g), glycitein byl však zároveň nejméně se vyskytujícím aglykonem.

6 DISKUZE

Isoflavony jsou v sóji a sójových výrobcích přítomny ve významném množství. Obsah těchto fytochemických látek se může značně lišit podle oblastí, podmínek pěstování a zpracování bobů (Mandelová, 2005). Genistin, daidzin, a glycitin jsou hlavními isoflavony v sóji. Jsou to konjugované sloučeniny, vázané na cukerné jednotky, a pro jejich aktivaci jsou potřebné enzymy střevních bakterií, které je hydrolyzují na volné aglykony, aby mohly být absorbovány ze zažívacího traktu (Xiao, 2008).

Lze potvrdit, že sója a výrobky ze sóji mají vysoký obsah daidzeinu a genisteinu, zejména jejich β -glykosidů a nižší obsah glyciteinu. Celkový obsah isoflavonů ve vzorku samotných sójových bobů byl 149,48 mg/ 100 g. Obecně se udává, že sója a sójové výrobky obsahují 100 – 420 mg isoflavonů/100 g (Xiao, 2008). Tyto hodnoty také potvrzují studie, které stanovily obsah isoflavonů v sójových bobech v rozmezí hodnot 77,02 - 543,83 mg/ 100 g (Chen *et al.*, 2008), 69,97 - 258,16 mg /100 g (Kim *et al.*, 2005) či 120 – 140 mg/ 100 g (Rostagno *et al.*, 2004).

Sójová mouka obsahovala 134,76 mg isoflavonů na 100 g. Tento vzorek měl vysoký obsah daidzinu a genistinu, který se statisticky průkazně nelišil od vzorku sójových bobů. Nižší byl pouze obsah glycitinu. Dle USDA, kdy bylo analyzováno 60 vzorků plnotučné sójové mouky, vyšel obsah 59,80 – 264,84 mg/100g (USDA, 2008). Z výsledků lze pozorovat různý obsah celkových isoflavonoidů. Jelikož vliv zpracování při výrobě sójové mouky je minimální (pomletí sójových bobů), záleží zejména na obsahu fytoestrogenů v použité surovině.

V sójových produktech jsou hlavními isoflavony β -glykosidy. V menším množství jsou přítomny konjugované formy acetylglykosidy a malonyglykosidy. Dle López-Gutiérrez *et al.* se celkový obsah isoflavonů ve výrobcích ze sóji pohybuje od 40 – 365 mg/100 g výrobku. Těmto požadavkům by vyhověli výrobky: sójový granulát, sójové kostky a protmix.

Texturované sójové bílkoviny, také označovány jako sójové maso, jsou vyráběny extruzí sójové mouky (50 % bílkovin) v extrudéru. Podmínky extruze ovlivňují vlastnosti finálního výrobku, a také parametry jako je vysoká teplota a tlak zajišťují přeměnu hůře stravitelných složek na látky lépe stravitelné (Hanzelková, 2010). Tyto poznatky vysvětlují

vyšší obsah některých isoflavonů, zejména glycitinu v granulátu a kostkách než ve vzorku sójové mouky. Při extruzi dochází k přeměně jednotlivých forem isoflavonů což ve svých pracích uvádí i autoři Chien *et al.* (2005), Genovese *et al.* (2007) a Shao (2009). V porovnání s americkou databází USDA, kde při měření 35 vzorků vyšel obsah celkových isoflavonů 68,6 - 295,55 mg/100 g, vzorky sójového granulátu a sójových kostek obsahovaly celkových isoflavonů 97,81 mg/100 g a 94,06 mg/100 g.

Stejně jako granulát a kostky jsou vyrobeny ze sójové mouky, i směs protmix na výrobu masných výrobků obsahuje zejména sojovou bílkovinu. Obsah isoflavonoidů byl sice nižší než v sójové mouce, ale zastoupení jednotlivých β -glykosidů bylo téměř totožné v poměru 1 : 1,5 : 0,4 (genistin : daidzin : glycitin).

Tempeh je zástupcem fermentovaných výrobků a výsledky potvrdily, že fermentované výrobky obsahují více aglykonů než ty nefermentované. Je to způsobeno činností mikroorganismů používaných pro fermentaci, ty produkují enzym β – glukosidázu, který štěpí konjugované isoflavony na volné aglykony. Takovýto výrobek je pro lidský organismus více využitelný (Chen *et al.*, 2008). Obsah aglykonů ve vzorku byl až 50 % a statisticky průkazně se lišil od ostatních vzorků, kde byl obsah aglykonů pouze 10-20 %. USDA analyzovalo 28 vzorků, jejichž obsah celkových isoflavonů byl $60,61 \pm 27,44$ mg/100 g (USDA, 2008). Tato hodnota byla potvrzena i u sledovaného vzorku, jehož obsah celkových isoflavonů byl 48,87 mg/100 g.

Ve vzorku sójových párků a prejtu bylo zjištěno malé množství isoflavonů, které se statisticky průkazně lišilo od ostatních výrobků. Příčinou snížení obsahu isoflavonů je technologické zpracování. Důležitým krokem při zpracování je namáčení sojových bobů. Tento proces je odpovědný za změkčení zrna a má vliv na další postupy jako je mletí, vaření a extrakce sójových proteinů (Sanches de Lima, 2014a). Isoflavony ale přechází do namáčecí vody a jejich obsah ve výrobku se tak výrazně snižuje. Výrazně záleží také na namáčecím času a teplotě procesu. Vyplavování a degradace isoflavonů může nastat již při namáčecích teplotách nad 25°C (Sanches de Lima, 2014b). Ve vzorku sójových párků vyšel obsah pouze 20,49 mg/100 g. Tuto skutečnost potvrzuje i databáze amerického Ministerstva zemědělství USDA, kdy při měření 7 vzorků bezmasých párků vyšel obsah celkových isoflavonů 11,90 - 23,30 mg 100g. Prejt obsahoval 28,89 mg isoflavonů ve 100 g výrobku.

Sušení je důležitý proces pro prodloužení životnosti potravin nebo pro jejich následnou výrobu. Je dobře známo, že sušení významně ovlivňuje kvalitu a obsah živin v sušených potravinách (Niamnuy *et al.*, 2011). To se projevilo i na obsahu isoflavonů ve vzorcích sójového drinku a soya creameru. Obsahovaly minimální množství těchto látek a ze všech vzorků měly nejnižší koncentraci fytoestrogenů. Ve vzorku soya creameru bylo celkem isoflavonů 3,19 mg/100 g a ve vzorku drinku 2,57 mg/100 g. Tak nízký obsah lze předpokládat i ze složení, tyto výrobky totiž obsahovaly zejména částečně ztužený sójový olej a pouze v soya creameru byl ještě obsah sójové bílkoviny. Tyto složky však nebyly hlavní složkou výrobku, hlavní složkou byl sušený kukuřičný sirup.

7 ZÁVĚR

Funkční potraviny představují významnou oblast potravinářské výroby. V dnešní době se lidé snaží dbát o svůj zdravotní stav. Každý člověk by měl vědět, že funkční potraviny nejsou lékem, ale slouží jako prevence mnoha chronických a závažných onemocnění. Je důležité tyto potraviny konzumovat pravidelně a v dostatečné míře, aby měly očekávaný fyziologický účinek.

Cílem této práce bylo stanovit obsah isoflavonů v různých výrobcích ze sóji, které jsou běžně dostupné na českém trhu. Některé potraviny se totiž jako funkční a zdravé pouze tváří a většinou je jejich hodnota nulová, což můžeme vyčíst již z obalu potraviny. Za takové výrobky můžeme považovat instantní sójové nápoje. Obsah fytoestrogenů v těchto produktech byl minimální, okolo 3 mg/100 g.

Produkt s nejvyšším množstvím sledovaných fytoestrogenů byly samotné sójové boby. Na obsahu isoflavonů ve výrobcích se podílí několik faktorů, zejména odrůda, oblast, podmínky pěstování a zpracování. Dále byl vysoký obsah v plnotučné sójové mouce, která se vyrábí pouze rozemletím bobů.

Obecně lze říci, že nižší koncentrace isoflavonů je ve výrobcích, které jsou náročněji technologicky zpracovávány. Zejména tepelné zpracování, při němž je surovina máčena a velká část isoflavonů se tak vylouží do máčecí vody, způsobuje znatelné ztráty těchto fytochemických sloučenin. Stejně tak při sušení dochází k velkým ztrátám látek.

Nejvíce se vyskytujícími isoflavony ve výrobcích byly β – glykosidy daidzin a genistin a jejich volné formy daidzein a genistein. V menším množství pak byly přítomny isoflavony glycitin a glycitein.

Bylo potvrzeno, že fermentované výrobky, jako je např. tempeh, obsahují velké množství aglykonů. Jejich obsah v tempehu byl až 50 %. Nefermentované výrobky měly pouze okolo 10 – 20 % aglykonů. Aglykony jsou pro organismus lépe využitelné a vstřebatelné, jelikož již nejsou vázány na cukernou jednotku a není potřeba enzymů k jejich hydrolýze. Z tohoto důvodu je konzumace fermentovaných sójových produktů doporučována. Někteří jedinci totiž nemají schopnost hydrolyzovat isoflavony, např. daidzein na equol. Zaleží také z velké části na složení střevní mikroflóry.

Fyziologický účinek isoflavonů se předpokládá při příjmu 60 – 100 mg/den. Dle naměřených výsledků by takové množství odpovídalo konzumaci:

- 50 g sójových bobů (cca 75 mg isoflavonů)
- 100 g kostek (=1 balení, cca 94 mg isoflavonů)
- 300 g párků (= 6 nožiček, cca 61,5 mg isoflavonů)
- 190 g tempehu (= 1 balení, cca 93 mg isoflavonů)
- 2000 g instantního sójového nápoje (= 10 balení, cca 60 mg isoflavonů).

Z těchto výsledků vyplývá, že instantní sójové nápoje nejsou významným zdrojem isoflavonů. Je lepší dát přednost jiným druhům výrobků nebo si nápoj vyrobit doma ze sójových bobů, které obsahují nejvíce fytoestrogenů ze všech měřených produktů.

Na závěr bych chtěla citovat otce toxikologie, Paracelsuse, který řekl: „*Všechno je jed. Záleží pouze na dávce.*“ (Patočka, 2005).

8 POUŽITÁ LITERATURA

BEDELL, S., NACHTIGALL, M., NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 139, 2014, str. 225-236

BOYE, J. I., GODEFROY, S. B. Allergen management in the food industry. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010, xxvii, 593 p. ISBN 04-702-2735-4.

BULKOVÁ, V. Rostlinné potraviny. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011, 162 s. ISBN 978-80-7013-532-7.

CEDERROTH, CH. R., NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 304 (1-2), 2009, s. 30-42

DOSTÁLOVÁ, J. Nutriční hodnota sóji, Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT, Praha, 2003

DVOŘÁČKOVÁ, J., DOLEŽAL, P., HLADKÝ, J., VYSKOČIL, I.: Hodnocení výživné hodnoty krmiv – cvičebnic, Multimediální prezentace Ústavu výživy zvířat a pícninářství, 2011. Dostupné na: http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/cvicebnice/index.php

DVOŘÁK, M. Sója. SUNFOOD, 2007. Dostupné na: <http://www.sunfood.cz/soja.phtml>

GARG, M., WOOD, L. Nutrition and physical activity in inflammatory diseases. Wallingford: CABI, 2013, xi. ISBN 978-1-84593-910-6.

GENOVESE, M. I. *et al.* Commercial Soy Protein Ingredients as Isoflavone Sources for Functional Foods. *Plant Foods for Human Nutrition* 62, 2007, s. 53–58

HAMPL, J. a kol. The „age+5“ rule: comparison of dietary fiber intake among 4- to 10 year-old children. *Journal of the American Dietetic Association*, 1998, vol.98, č.12, s.1418-1423

HANZELKOVÁ, Š., SIMEONOVÁ, J. Textural properties of soy meat analogs. Konference MendelNet, 2010. Mendelova Univerzita v Brně.

HARMATHA, J. Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie, svazek 27. ÚOCHB-AVČR, Praha, 2002; kap. 4, str. 117-142.

HOLKOVÁ, I. *et al.* Lipoxygenázy a ich význam v biochemických procesoch v rastlinných organizmoch. *Chemické Listy* 103, 2009, s. 487-495

HOUBA, M., HOCHMAN, M., HOSNEDL, V. Luskoviny: pěstování a užití. 1. vyd. České Budějovice: Kurent, 2009, 133 s. ISBN 978-80-87111-19-2.

HOUBA, M. *Metodika pěstování sóji luštinaté: certifikovaná metodika*. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2011, 20 s. ISBN 978-80-87360-03-3.

CHEN, T. R., WEI, Q. K. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. *Nutrition & Food Science*, vol. 38, č. 6, 2008, s. 540-547

CHIEN J. T. *et al.*, 2005: Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, 91 (3), s. 425 – 434.

JOOYANDEH, H. Soy Products as Healthy and Functional Foods. *Middle-East Journal of Scientific Research* 7 (1): 71-80, 2011. ISSN 1990-9233

JORDÁN, V. HEMZALOVÁ, M. Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život. Vyd. 1. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 80-7217-156-9

KADLEC, P., MELZUCH K., VOLDŘICH, M. Přehled tradičních potravinářských výrobní technologie potravin. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0

KALÁČ, P. Funkční potraviny: kroky ke zdraví. České Budějovice: Dona, 2003, 130 s. ISBN 80-7322-029-6

KALÁČ, P. Soudobý pohled na vlákninu potravy. *Výživa a potraviny*. 2008, roč. 63, č. 6, s. 160-162. ISSN: 1211-846X

KALÁČ, P. Vejce jako funkční potravina. *Výživa a potraviny*. 2008, roč. 63, č. 5, s. 135-138. ISSN: 1211-846X

KIM, J. J. *et al.* Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. *Food Research International*, Volume 38, Issue 4, 2005, s. 435–444

KLEJDUS, B. *et al.* Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004. sv. 806, č. 2, s. 101--111. ISSN 1570-0232

KLEJDUS, B. *et al.* Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection. *Journal of Chromatography A*. 2005. sv. 1084, č. 1-2, s. 71--79. ISSN 0021-9673

KLEJDUS, B. *et al.* Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1195 (1 – 2), 2008, s. 52 – 59

KLEJDUS, B., LOJKOVÁ, L., PLAZA, M., ŠNÓBLOVÁ, M., ŠTĚRBOVÁ, D. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010. sv. 1217, č. 51, s. 7956--7965. ISSN 0021-9673.

KLEJDUS, B. Chemické a instrumentální analytické metody – cyklus přednášek. Mendelova univerzita v Brně, Brno, 2014.

KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

KOMPRDA, T. Funkční potraviny: Cyklus přednášek. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7375-219-4

KOMPRDA, T. Výživa člověka – cyklus přednášek, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 2014.

KOMPRDA, T. Základy výživy člověka. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 978-807-1576-556

KUNOVÁ, V. Zdravá výživa. 2., přeprac. vyd. Praha: Grada, 2011, 140 s. Zdraví. ISBN 978-802-4734-330

KWANG-Pil Ko. Isoflavones: Chemistry, Analysis, Functions and Effects on Health and Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 15, 2014. s. 7001-7010

LAGARI, V.S. LEVIS, S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 139, 2014, s. 294-301

LAPČÍK, O. SOSVOROVÁ, L. Fytoestrogeny a jejich využití v menopauze. *Interní medicína pro praxi*, vol. 13 (1), 2011, s. 38-42

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, N. *et al.* Identification and quantification of the main isoflavones and other phytochemicals in soy based nutraceutical products by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1348, 2014, s. 125–136

LUQUE DE CASTRO, M. D. *et al.* Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1217 (16), s. 2383-2389

MANDELOVÁ, L. Polyfenoly: Rozdělení a zdroje v potravě. *Výživa a potraviny*. 2005, roč. 60, č. 1, s. 11 -14. ISSN: 1211-846X

MÁSLOVÁ, H. Psychogynekoložka o neplodnosti a nemocech, za které si můžeme sami (1. část). [cit. 2015-02-18] Dostupné online: http://relax.lidovky.cz/psychogynekolozka-o-neplodnosti-a-nemocech-za-ktere-si-muzeme-sami-1-cast-1qa-zdravi.aspx?c=A150205_102359_ln-zdravi_ape

MIKELOVÁ, R., KLEJDUS, B., ZEHNÁLEK, J., VACEK J., KIZEK, R. Chromatografické stanovení isoflavonu ve vegetativních a generativních částech rostlin sóje (*Glycine max.*). *Biochemie*, vol. 14, 2004, č. 1, s. 13-15.

NAUSHAD, M. KHAN, M. R. Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry: evaluation and applications in food analysis. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2014, 461 p. ISBN 978-1-4665-9155-4.

NIAMNUY *et al.* Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. *Food Chemistry*, Volume 129, Issue 3, 2011, s. 899–906

- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. , 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- PATOČKA, J. Základy toxikologie, Jihočeská univerzita, České Budějovice, 2005. Dostupné online: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=10>
- ROSTAGNO, M. A. *et al.* Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta* 522, 2004, s. 169–177
- ROSTAGNO, M. A. *et al.* Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of chromatography A*, 2005, vol. 1076 (1-2), s. 110-117
- ROSTAGNO M. A. *et al.* Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1016 (1), s. 2 – 29.
- SABATÉ, J., RATZIN-TURNER, R. Vegetarian nutrition. Boca Raton: CRC Press, c2001, 531 p. ISBN 978-1-4200-3683-1.
- SALTER, A. M., WISEMAN H., TUCKER, G.: Phytonutrients. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2012, 294 s. ISBN 9781118253649.
- SANCHES DE LIMA, F. *et al.* Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 56, Issue 2, 2014a, s. 232–239
- SANCHES DE LIMA, F. *et al.* The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 59, Issue 2, Part 2, 2014b, s. 1274–1282
- SHAO, S. *et al.* Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. *Journal of Functional Foods*, Volume 1, Issue 1, 2009, s. 119–127
- SCHMIDT, M *et.al.* Role výživy při vzniku a průběhu onemocnění karcinomem prostaty. *Urologie pro praxi*, vol. 8(4), 2007, s. 167-169
- SINGH, G. The soybean: botany, production and uses. Wallingford, UK: CABI, c2010, xii, 494 str. ISBN 9781845936440.

SONI, M., RAHARDJO, T. B. W., SOEKARDI, R., SULISTYOWATI, Y., LESTARININGSIH, YESUFU-UDECHUKU, A., IRSAN, A., HOGERVORST, E. Phytoestrogens and cognitive function: a review. *Maturitas*, vol. 77, 2014, s. 209-220

SRBEK, J. *Advances in Separation Science*. Zentiva k.s., Department of Mass Spectrometry. Přednáška na MENDELU. Mendelova univerzita v Brně, Brno, 2014.

SUGANO, M. *Soy in health and disease prevention*. Boca Raton, FL, 2006. ISBN 08-493-3595-7.

ŠPALEK, J., CWIKOVÁ, O., DOHNAL, V. Fermentované rostlinné potraviny asijského původu na českém trhu. *Výživa a potraviny*, 2008, roč. 63, č. 2, s. 52 – 54. ISSN: 1211-846X

TRNA, J., TÁBORSKÁ E.: Přírodní polyfenolové antioxidanty. [cit. 2015-02-16] Dostupné na: www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf

UMPHRESS, S. T. *et al.* Isoflavone content of foods with soy additives. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 18, Issue 6, 2005, s. 533–550

USDA. USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2008

ÚKZUZ, 2013: Seznam doporučených odrůd 2013 – Sója. Dostupné na: eagri.cz/public/web/file/230809/SDO_soja_listovka_2013.pdf

VACEK J. *et al.* Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31 (11), 2008, s. 2054 – 2067.

VACEK, J. *et al.* Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples. *Analytical Methods*. 2010. sv. 6, č. 2, s. 604--613. ISSN 1759-9660

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J.: *Chemie potravin*, díl I, II. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.

VRÁNOVÁ, D. *Fytoestrogeny*. 2012. [cit. 2014-11-10] Dostupné na: <http://www.chempoint.cz/fytoestrogeny>

VRZÁŇOVÁ M. Fytoestrogeny , *Interní medicína pro praxi*, Solen s.r.o., 2003, str. 448-451, ISBN 1212-7299

WINKLEROVÁ, D. Funkční potraviny a legislativy. *Výživa a potraviny*. 2009, roč. 64, č. 1, s. 11-12. ISSN: 1211-846X

XIAO, CH. W. Health Effects of Soy Protein and Isoflavones in Humans. *Journal of Nutrition*, 138, 2008, s. 1244–1249

ZEDNÍČKOVÁ, P. Metody identifikace probiotických mikroorganismů. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, Brno 2013, 47 s.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura flavonoidů (Komprda, 2008)

Obr. 2: Strukturní podobnost sloučenin s hormonem estradiolem (Sugano, 2006)

Obr. 3: Schematické znázornění podtříd fytoestrogenů (Soni *et al.*, 2014)

Obr. 4: Schéma detektoru s diodovým polem. (Nováková, 2013)

Obr. 5: Schéma hmotnostního spektrometru

Obr. 6: Srovnání extrakčních technik

Obr. 7: Obsah daidzeinu v sójových výrobcích

Obr. 8: Zastoupení genisteinu v sójových výrobcích

Obr. 9: Zastoupení glyciteinu ve vzorcích

Obr. 10: Zastoupení daidzinu ve vzorcích sójových výrobků

Obr. 11: Grafické znázornění obsahu genistinu ve vzorcích

Obr. 12: Zastoupení glycitinu ve vzorcích sójových výrobků

Obr. 13: Celkový obsah isoflavonů ve vzorcích seřazen sestupně

Obr. 14: Obsah konjugovaných, volných a celkových isoflavonů ve vzorcích

10 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Vliv biologických složek sóji na zdraví člověka (Sighn, 2010)

Tab. 2: Parametry hmotnostního spektrometru

Tab. 3: Kalibrační údaje

Tab. 4: Obsah všech isoflavonů ve vzorcích v mg/ 100 g (n=3)

11 SEZNAM ZKRATEK

AK	aminokyselina
Akt	proteinkináza B, faktor přežití
ANOVA	analýza rozptylu
ASE	extrakce urychleným tokem rozpouštědla
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CP	cytoplazmatický
CVD	cardiovascular disease, kardiovaskulární choroby
DAD	diode array detector, detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	estrogenní receptor
ERE	estrogen response element, prvek odezvy na estrogen
FAK	fokální adhezivní kináza
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein vysoké hustoty
HPLC	high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSD	honestly significant difference, statisticky významný rozdíl
HT	hormonální terapie
HTS	hmotnost tisíce semen
LD	low density , nízká hustota

LDL	low density lipoprotein, lipoprotein nízké hustoty
MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MS	mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
PIE	enzymy fáze I
PIIE	enzymy fáze II
PUFA	poly unsaturated fatty acids, polynenasycené mastné kyseliny
SF	stacionární fáze
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	solid phase extraction, extrakce pevnou fází
TM	transmembránový
TOF	time of fly, detektor doby letu v MS
TPO	thyrodiální peroxidáza
UV	ultra violet, ultrafialové
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography, ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VMS	vazomotorické příznaky (symptomy)

PŘÍLOHY 1 - 3

Příloha 1

Složení sójových bobů

Tab. 5: Složení sójových bobů. USDA National Nutrient Database for Standard (Soybeans, mature seeds, dry roasted)

Živina	Jednotka	Obsah na 100g
Základní složky		
Voda	g	0,8
Energie	kcal	451
Bílkoviny	g	39,58
Lipidy	g	21,62
Sacharidy	g	32,72
Vláknina	g	8,1
Minerály		
Vápník (Ca)	mg	140
Železo (Fe)	mg	3,95
Hořčík (Mg)	mg	228
Fosfor (P)	mg	649
Draslík (K)	mg	1364
Sodík (Na)	mg	2
Zinek (Zn)	mg	4,77
Vitamíny		
Vitamín C	mg	4,6
Thiamin (B1)	mg	0,427
Riboflavin (B2)	mg	0,755
Niacin (B3)	mg	1,056
Pyridoxin (B6)	mg	0,225
Kyselina listová (B9)	μg	205
Vitamin K	μg	37
Tuky		
Nasyčené mastné kyseliny	g	3,127
Mononenasyčené mastné kyseliny	g	4,776
polynenasycené masktné kyseliny	g	12,207
Cholesterol	mg	0

Příloha 2

Statistické zpracování naměřených dat

Tab. 6: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových bobů

SÓJOVÉ BOBY	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	59,765	58,442	59,138	59,115	0,6615216	1,1190423
<i>genistin</i>	42,786	40,599	41,012	41,465	1,1617715	2,8017848
<i>glycitin</i>	33,292	35,019	34,228	34,180	0,8649053	2,53047
<i>daidzein</i>	5,979	5,891	5,679	5,850	0,1542809	2,6374062
<i>genistein</i>	3,861	3,814	3,815	3,830	0,026576	0,6939193
<i>glycitein</i>	5,099	4,957	5,067	5,041	0,0745389	1,4786691
<i>celkové isoflavony</i>	150,780	148,722	148,939	149,481	1,130935	0,7565769

Tab. 7: Obsah isoflavonů ve vzorku sójového granulátu

SÓJOVÝ GRANULÁT	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	35,885	33,901	33,996	34,594	1,119041	3,2347915
<i>genistin</i>	39,058	38,806	38,952	38,938	0,1265473	0,3249932
<i>glycitin</i>	15,125	16,317	15,861	15,768	0,6017328	3,8162398
<i>daidzein</i>	1,913	1,845	1,908	1,889	0,0377945	2,0008421
<i>genistein</i>	3,817	4,040	4,085	3,981	0,1434875	3,6045535
<i>glycitein</i>	2,564	2,787	2,567	2,640	0,1278337	4,8430209
<i>celkové isoflavony</i>	98,362	97,696	97,369	97,809	0,5061515	0,5174884

Tab. 8: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových kostek

SÓJOVÉ KOSTKY	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	38,066	36,501	36,996	37,188	0,7995158	2,1499498
<i>genistin</i>	30,475	28,886	30,952	30,104	1,0818955	3,593827
<i>glycitin</i>	22,238	21,878	21,861	21,992	0,2131515	0,9692096
<i>daidzein</i>	1,491	1,675	1,608	1,591	0,0928961	5,8378907
<i>genistein</i>	0,896	1,032	0,985	0,971	0,0690376	7,1078312
<i>glycitein</i>	2,213	2,216	2,217	2,215	0,0023595	0,1065138
<i>celkové isoflavony</i>	95,379	92,188	94,619	94,062	1,66688	1,7721086

Tab. 9: Obsah isoflavonů ve vzorku tempehu

SÓJOVÝ TEMPEH	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	11,401	10,930	10,989	11,106	0,2564624	2,3091306
<i>genistin</i>	10,730	11,212	10,893	10,945	0,245334	2,2415561
<i>glycitin</i>	2,404	2,256	2,261	2,307	0,0840031	3,6411921
<i>daidzein</i>	9,623	9,434	9,6	9,552	0,1031304	1,0796283
<i>genistein</i>	13,799	13,491	13,953	13,747	0,2353475	1,711938
<i>glycitein</i>	1,254	1,203	1,203	1,220	0,029267	2,3988781
<i>celkové isoflavony</i>	49,210	48,526	48,899	48,878	0,3423991	0,700516

Tab. 10: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových párků

SÓJOVÉ PÁRKY	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	12,572	12,050	12,098	12,240	0,2884928	2,3570076
<i>genistin</i>	3,910	3,521	3,632	3,688	0,2000499	5,424725
<i>glycitin</i>	1,496	1,385	1,364	1,415	0,0707818	5,0032703
<i>daidzein</i>	1,634	1,670	1,678	1,661	0,0232291	1,3988132
<i>genistein</i>	1,239	1,132	1,121	1,164	0,0649949	5,5837503
<i>glycitein</i>	0,363	0,300	0,317	0,327	0,0327976	10,035127
<i>celkové isoflavony</i>	21,213	20,058	20,210	20,494	0,628002	3,064366

Tab. 11: Obsah isoflavonů ve vzorku protmixu

PROTMIX	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	44,333	45,626	45,814	45,258	0,8060829	1,7810951
<i>genistin</i>	27,045	28,274	27,641	27,653	0,6145015	2,2221617
<i>glycitin</i>	12,399	11,162	11,352	11,638	0,6664277	5,7264924
<i>daidzein</i>	1,477	1,460	1,436	1,458	0,0206468	1,4164568
<i>genistein</i>	2,806	2,826	2,799	2,810	0,0143277	0,5098213
<i>glycitein</i>	0,133	0,139	0,135	0,136	0,0032164	2,3681175
<i>celkové isoflavony</i>	88,193	89,487	89,177	88,952	0,6753812	0,759261

Tab. 12: Obsah isoflavonů ve vzorku prejtu

SÓJOVÝ PREJT	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	22,664	22,602	22,61	22,625	0,0339225	0,1499318
<i>genistin</i>	4,431	4,298	4,301	4,343	0,0762269	1,7549824
<i>glycitin</i>	0,319	0,312	0,329	0,320	0,0085241	2,6636366
<i>daidzein</i>	0,710	0,826	0,814	0,783	0,0634437	8,0986426
<i>genistein</i>	0,758	0,800	0,793	0,784	0,0224934	2,8694558
<i>glycitein</i>	0,048	0,034	0,035	0,039	0,0079504	20,475108
<i>celkové isoflavony</i>	28,931	28,871	28,882	28,895	0,0320122	0,1107886

Tab. 13: Obsah isoflavonů ve vzorku sójového drinku

SOYA DRINK	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	0,718	0,725	0,719	0,721	0,0041452	0,5751727
<i>genistin</i>	1,189	1,190	1,168	1,182	0,0124211	1,050581
<i>glycitin</i>	0,199	0,201	0,206	0,202	0,0034966	1,7307974
<i>daidzein</i>	0,203	0,187	0,196	0,195	0,0077825	3,9850828
<i>genistein</i>	0,224	0,268	0,249	0,247	0,022133	8,9535833
<i>glycitein</i>	0,018	0,023	0,021	0,021	0,0023502	11,392234
<i>celkové isoflavony</i>	2,551	2,595	2,559	2,568	0,0233597	0,9095981

Tab. 14: Obsah isoflavonů ve vzorku soya creameru

SOYA CREAMER	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	0,874	0,931	0,919	0,908	0,0303278	3,3400722
<i>genistin</i>	1,505	1,566	1,546	1,539	0,0306757	1,9932317
<i>glycitin</i>	0,154	0,163	0,158	0,158	0,0044914	2,8393621
<i>daidzein</i>	0,360	0,352	0,331	0,348	0,0148798	4,2814203
<i>genistein</i>	0,215	0,235	0,227	0,226	0,0099573	4,409166
<i>glycitein</i>	0,019	0,022	0,02	0,020	0,0016915	8,261497
<i>celkové isoflavony</i>	3,127	3,269	3,201	3,199	0,0709005	2,2163118

Tab. 15: Obsah isoflavonů ve vzorku sójové mouky

SÓJOVÁ MOUKA	c1 [mg/100g]	c2 [mg/100g]	c3 [mg/100g]	cx [mg/100g]	sx	% RSD
<i>daidzin</i>	65,074	64,513	65,296	64,961	0,4037955	0,6215981
<i>genistin</i>	43,991	42,409	44,887	43,763	1,2545308	2,8666747
<i>glycitin</i>	10,500	11,587	11,164	11,084	0,5481368	4,945512
<i>daidzein</i>	4,944	5,013	5,004	4,987	0,0375203	0,7523607
<i>genistein</i>	4,982	5,119	4,993	5,032	0,0762947	1,5163127
<i>glycitein</i>	6,191	6,179	6,194	6,188	0,0079615	0,1286647
<i>celkové isoflavony</i>	135,682	134,820	137,538	136,013	1,3888745	1,021131

Příloha 3

Statistické zpracování ANOVA – Tukeyův HSD test

Tab. 16: Tukeyův HSD test pro proměnnou daidzin

Tukeyův HSD test; proměn.:Daidzin (Izoflavony_vypocty_ZP actual)	
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000	
Factor	{1} {2} {3} {4} {5} {6} {7} {8} {9} {10}
	M=59,11€ M=34,594 M=37,18€ M=11,10€ M=12,24€ M=45,25€ M=22,62€ M=,7206€ M=,9080€ M=64,961
Soj_Boby {1}	0,00017
Soj_Granulat {2}	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017
Protmix {6}	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017
Soj_Mouka {10}	0,00017

Tab. 17: Tukeyův HSD test pro proměnnou genistin

Tukeyův HSD test; proměn.:Genistin (Izoflavony_vypocty_ZP actual)	
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000	
Factor	{1} {2} {3} {4} {5} {6} {7} {8} {9} {10}
	M=41,46€ M=38,93€ M=30,104 M=10,94€ M=3,6877 M=27,65€ M=4,343€ M=1,182€ M=1,539€ M=43,76€
Soj_Boby {1}	0,00574
Soj_Granulat {2}	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017
Protmix {6}	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017
Soj_Mouka {10}	0,01399

Tab. 18: Tukeyův HSD test pro proměnnou glycitin

Tukeyův HSD test; proměn.:Glycitin (Izoflavony_vypocty_ZP actual)	
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000	
Factor	{1} {2} {3} {4} {5} {6} {7} {8} {9} {10}
	M=34,18€ M=15,76€ M=21,992 M=2,307€ M=1,4147 M=11,63€ M=,3200€ M=,2020€ M=,1581€ M=11,084
Soj_Boby {1}	0,00017
Soj_Granulat {2}	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017
Protmix {6}	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017
Soj_Mouka {10}	0,00017

Tab. 19: Tukeyův HSD test pro proměnnou daidzein

Tukeyův HSD test; proměn.:Daidzein (Izoflavony_vypocty_ZP actual)	
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000	
Factor	{1} {2} {3} {4} {5} {6} {7} {8} {9} {10}
	M=5,8497 M=1,888€ M=1,591€ M=9,5524 M=1,660€ M=1,457€ M=,7833€ M=,1952€ M=,34754 M=4,987€
Soj_Boby {1}	0,00017
Soj_Granulat {2}	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017
Protmix {6}	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017
Soj_Mouka {10}	0,00017

Tab. 20: Tukeyův HSD test pro proměnnou genistein

Tukeyův HSD test; proměnn.:Genistein (Izoflavony_vypocty_ZP actual)										
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000										
Factor	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=3,8296	M=3,9807	M=,97125	M=13,747	M=1,1640	M=2,8103	M=,78385	M=,24720	M=,22583	M=5,0316
Soj_Boby {1}		0,65824	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Granulat {2}	0,65824		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017	0,00017		0,00017	0,34949	0,00017	0,38440	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017	0,00017	0,34949	0,00017		0,00017	0,00326	0,00017	0,00017	0,00017
Protmix {6}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017	0,00017	0,38440	0,00017	0,00326	0,00017		0,00021	0,00019	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00021		1,00000	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00019	1,00000		0,00017
Soj_Mouka {10}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	

Tab. 21: Tukeyův HSD test pro proměnnou glycitein

Tukeyův HSD test; proměnn.:Glycitein (Izoflavony_vypocty_ZP actual)										
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000										
Factor	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=5,0405	M=2,6395	M=2,2152	M=1,2200	M=,32683	M=,13582	M=,03883	M=,02063	M=,02047	M=6,1878
Soj_Boby {1}		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Granulat {2}	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Kostky {3}	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_Tempeh {4}	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
Soj_parky {5}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017		0,00366	0,00019	0,00018	0,00018	0,00017
Protmix {6}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00366		0,36186	0,17550	0,17431	0,00017
Soj_Prejt {7}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00019	0,36186		0,99997	0,99997	0,00017
Soya_Drink {8}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00018	0,17550	0,99997		1,00000	0,00017
Soya_Creamer {9}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00018	0,17431	0,99997	1,00000		0,00017
Soj_Mouka {10}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	

Tab. 22: Tukeyův HSD test pro proměnnou celkový obsah isoflavonů

Tukeyův HSD test; proměnn.:celkem (Izoflavony_vypocty_ZP)										
Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000										
vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=149,48	M=97,805	M=94,062	M=48,878	M=20,494	M=88,952	M=28,895	M=2,5681	M=3,1990	M=136,01
sójové boby {1}		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
sójový granulát {2}	0,00017		0,00102	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
sójové kostky {3}	0,00017	0,00102		0,00017	0,00017	0,00019	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
sójový tempeh {4}	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
sójové párky {5}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
protmix {6}	0,00017	0,00017	0,00019	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017	0,00017
sójový prejt {7}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017		0,00017	0,00017	0,00017
sójový drink {8}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017		0,99427	0,00017
soya creamer {9}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,99427		0,00017
sójová mouka {10}	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017	

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Složení sójových bobů

Tab. 5: Složení sójových bobů. USDA National Nutrient Database for Standard (Soybeans, mature seeds, dry roasted)

Příloha 2 – Statistické zpracování naměřených dat

Tab. 6: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových bobů

Tab. 7: Obsah isoflavonů ve vzorku sójového granulátu

Tab. 8: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových kostek

Tab. 9: Obsah isoflavonů ve vzorku tempehu

Tab. 10: Obsah isoflavonů ve vzorku sójových párků

Tab. 11: Obsah isoflavonů ve vzorku protmixu

Tab. 12: Obsah isoflavonů ve vzorku prejtu

Tab. 13: Obsah isoflavonů ve vzorku sójového drinku

Tab. 14: Obsah isoflavonů ve vzorku soya creameru

Tab. 15: Obsah isoflavonů ve vzorku sójové mouky

Příloha 3 – Statistické zpracování ANOVA – Tukeyův HSD test

Tab. 16: Tukeyův HSD test pro proměnnou daidzin

Tab. 17: Tukeyův HSD test pro proměnnou genistin

Tab. 18: Tukeyův HSD test pro proměnnou glycitin

Tab. 19: Tukeyův HSD test pro proměnnou daidzein

Tab. 20: Tukeyův HSD test pro proměnnou genistein

Tab. 21: Tukeyův HSD test pro proměnnou glycitein

Tab. 22: Tukeyův HSD test pro proměnnou celkový obsah isoflavonů