



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**KOMPLEXNÍ STUDIUM BIOLOGICKÝCH ÚČINKŮ  
VYBRANÝCH TYPŮ SOJOVÝCH VÝROBKŮ**

A COMPLEX STUDY OF BIOLOGICAL EFFECTS OF SOME SOYA PRODUCTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Mgr. et Bc. Michaela Ručková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

**BRNO 2020**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1313/2018 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Mgr. et Bc. Michaela Ručková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název diplomové práce:

Komplexní studium biologických účinků vybraných typů sojových výrobků

### Zadání diplomové práce:

V rámci diplomové práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše a screening vybraných typů obsahových látek v sojových produktech
- 2) příprava a charakterizace extraktů z různých typů sojových produktů
- 3) testování antioxidačního a antimikrobiálního účinku sojových extraktů
- 4) testování účinku sojových extraktů na buněčné kultury – imortalizované keratinocyty a buňky melanomu
- 5) vyhodnocení a diskuse výsledků.

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Mgr. et Bc. Michaela Ručková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Sója luštinatá a výrobky z ní je napříč laickými i odbornými názory velmi rozporuplnou luštěninou. Jedni ji označují téměř za „superpotravinu“, druzí se jí obloukem vyhýbají kvůli obsahu biologicky aktivních látek s nejasným účinkem na organismus. Jelikož již byly na sóji luštinaté provedeny mnohé, často se mezi sebou značně lišící studie, není snadné její problematiku jednoduše uchopit. Cílem teoretické části této diplomové práce je proto utřídění již publikovaných vědeckých poznatků do přehledné rešerše a ujasnění současného stavu řešené problematiky. Experimentální část se pak zaměřuje na charakterizaci sóji a produktů z ní jak z hlediska analýzy obsahu účinných složek a určení antioxidačního a antimikrobiálního účinku, tak stanovení cytotoxického účinku na buněčné linie humánního heterogenního epitelu kolorektálního adenokarcinomu a myšího melanomu pomocí *in vitro* testování. Všechny získané informace a výsledky experimentů by mohly sloužit jako výchozí podklady pro další potenciální studium sóji a sójových produktů ať už v rámci disertační práce, tak při podávání grantového projektu.

## **ABSTRACT**

Soybeans and products thereof are considered as a very contradictory legume across layman and expert opinions. Some see it almost as a “superfood” while others avoid it due to its biologically active content with an unclear effect on the organism. As a lot of research on soybeans was already performed the content varies considerably and it is not easy to grasp the issue correctly. The objective of the research part of the thesis is a structuralized study of already published scientific knowledge to clarify the current state of the art. Experimental part of the thesis focuses on characterisation of soy and its products in terms of active ingredients content and determination of antioxidants and antimicrobial effect. After that, the cytotoxic effect on human heterogeneous colorectal adenocarcinoma epithelial cell line and mouse melanoma cell line is determined by *in vitro* testing. All obtained information and results of experimental part could possibly serve as a starting point for further study of soy and soy products, both in the dissertation and in the submission of a grant project.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

sója, sójové boby, isoflavony, daidzein, genistein

## **KEYWORDS**

soy, soybean, isoflavones, daidzein, genistein

RUČKOVÁ, Michaela. *Komplexní studium biologických účinků vybraných typů sojových výrobků* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116106>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Své první obrovské díky bych chtěla směřovat k prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., vedoucí této diplomové práce, za trpělivost, pochopení, lidský přístup, a především za příležitost od začátku pracovat v jejích laboratořích, v nichž jsem se opravdu mnohé naučila. Stejně tak bych chtěla upřímně poděkovat své konzultantce Ing. Renatě Pavelkové za její ochotný přístup a velmi cenné rady. Obrovské díky patří také Ing. Martinu Szotkowskému za přátelskou podporu a nemenší ochotu mi pomoci, kdykoliv bylo potřeba. Ráda bych hromadně poděkovala i všem kolegům z laboratoří za utváření příjemné a přátelské atmosféry, je Vás tak moc, že byste se sem všichni ani nevešli.

Poslední obrovské díky bych ráda poslala samozřejmě své rodině, příteli a všem lidským i zvířecím přátelům, kteří mě udržují v duševní pohodě a radosti, bez níž by má (další) diplomová práce nemohla vůbec vzniknout.

# OBSAH

Obsah.....	5
Úvod.....	8
Teoretická část.....	9
1 Sója luštinatá.....	9
1.1 Složky obsažené v sójových bobech .....	10
1.1.1 Sójový protein celkový.....	10
1.1.2 Lektiny .....	11
1.1.3 Fytoestrogeny .....	12
1.1.4 Kyselina fytová .....	14
1.1.5 Inhibitory proteáz .....	15
1.1.6 Sójový olej, mastné kyseliny a fytoosteroly.....	16
1.1.7 Sacharidy .....	17
1.1.8 Vitaminy a minerály .....	18
2 Vybrané sójové produkty .....	19
2.1 Původ sójových bobů pro další výrobu .....	19
2.2 Fermentované produkty na bázi sóji.....	19
2.2.1 Miso.....	19
2.2.2 Natto .....	19
2.2.3 Tempeh.....	20
2.2.4 Sójová omáčka .....	20
2.3 Nefermentované produkty na bázi sóji .....	20
2.3.1 Sójová mouka.....	20
2.3.2 Sójové maso .....	21
2.3.3 Tofu .....	21
3 Sója a lidský organismus .....	22
3.1 Vliv příjmu sóji na nádorová onemocnění .....	22
3.2 Role sóji při onemocnění srdce a cév .....	22
3.2.1 Snížení rizika tvorby krevních sraženin .....	23
3.2.2 Účinek konzumace sóji na hypertenzi.....	23
3.3 Obezita a diabetes v souvislosti s příjmem sójových produktů.....	23
3.4 Působení sójových fytoestrogenů na hladiny testosteronu .....	23
Cíle práce.....	25
Experimentální část.....	26
4 Materiál a metody .....	26

4.1	Seznam použitých přístrojů a laboratorního vybavení .....	26
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	26
4.2.1	Chemikálie použité pro extrakci a přípravu lipozomů .....	26
4.2.2	Chemikálie použité pro spektrofotometrická stanovení .....	26
4.2.3	Chemikálie použité pro transesterifikaci a GC a HPLC analýzu .....	27
4.2.4	Chemikálie použité pro kultivace mikroorganismů .....	27
4.2.5	Chemikálie použité pro kultivaci buněčných linií a <i>in vitro</i> testy.....	27
4.3	Seznam použitých mikroorganismů .....	27
4.4	Seznam použitých sójových produktů .....	27
4.5	Buněčné linie .....	28
4.6	Příprava extraktů.....	28
4.6.1	Extrakce vodných vzorků .....	28
4.6.2	Extrakce olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm .....	28
4.7	Spektrofotometrické metody pro charakterizaci extraktů.....	29
4.7.1	Stanovení celkových fenolických látek .....	29
4.7.2	Stanovení flavonoidů.....	29
4.7.3	Stanovení antioxidační aktivity .....	29
4.8	Kultivace mikroorganismů .....	30
4.9	Antimikrobiální testy .....	30
4.9.1	Bujónová diluční metoda .....	30
4.10	Chromatografické metody .....	30
4.10.1	Transesterifikace a stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých skupin MK pomocí plynové chromatografie (GC).....	31
4.10.2	Stanovení obsahu isoflavonů genisteinu a daidzeinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).....	32
4.11	Příprava lipozomů metodou sonikace.....	33
4.12	Charakterizace lipozomů .....	33
4.12.1	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	33
4.12.2	Stanovení dlouhodobé stability .....	33
4.12.3	Stanovení velikosti lipozomů pomocí principu dynamického rozptylu světla a stanovení jejich stability .....	34
4.12.4	Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartovy metody .....	34
4.13	Kultivace buněčných kultur.....	34
4.13.1	Výměna živného média .....	34
4.13.2	Pasážování buněk .....	34
4.14	Stanovení růstové křivky buněčných linií .....	35

4.15 Stanovení cytotoxického účinku vybraných extraktů.....	35
Výsledky a diskuze.....	37
5 Charakterizace aktivních látek v extraktech ze sóji a sójových produktů .....	37
5.1 Stanovení obsahu celkových fenolických látek a flavonoidů v extraktech .....	37
5.2 HPLC analýza pro stanovení obsahu isoflavonů genisteinu a daidzein .....	38
5.3 GC analýza pro stanovení procentuálního obsahu jednotlivých skupin mastných kyselin.....	40
6 Stanovení antioxidačního a antimikrobiálního účinku jednotlivých extraktů .....	41
6.1 Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů .....	41
6.2 Antimikrobiální účinek jednotlivých extraktů.....	41
7 Charakterizace připravených lipozomů .....	42
7.1 Velikost, stabilita a distribuce velikosti částic.....	42
7.2 Stanovení enkapsulační účinnosti připravených lipozomů .....	44
7.3 Stanovení dlouhodobé stability lipozomů .....	45
8 Stanovení cytotoxického účinku jednotlivých extraktů .....	46
Závěr.....	54
9 Seznam použitých zdrojů .....	55
Seznam použitých zkratk.....	68

# ÚVOD

Sója luštinatá (*Glycine max*) je jedna z celosvětově nejčastěji pěstovaných plodin a od počátku svého pěstování ve starověké Číně až po současnou celosvětovou produkci přes 300 milionů tun (MT) ročně hraje velmi důležitou roli ve výživě zvířat i člověka [1]. V posledních dekadách bylo dosaženo také výrazného pokroku v mnoha aktuálních oblastech výzkumu této plodiny – od řízení její produkce, přes mapování genomu, šlechtění nových odrůd, identifikaci účinných složek, modifikaci složení, pozorování vlivu na organismus jak člověka, tak zvířat, až po nová potenciální využití v průmyslu i medicíně. Tato luštěnina je nejvíce konzumována právě v asijských státech ve formě zralých sójových bobů typicky světle hnědé barvy, ale také kvalitního sójového mléka, edamame (nezralých sójových lusků), sójové mouky, sójových klíčků, tofu a fermentovaných sójových produktů jako je tempeh, natto, miso a sójová omáčka. V současnosti se její spotřeba výrazně zvyšuje také napříč západní populací, která se však ve způsobu konzumace sóji od té východní značně liší. Průměrná spotřeba je asi 10krát až 20krát nižší, navíc častěji ve formě průmyslově zpracovaných potravin jako jsou sójové nápoje, snídaňové cereálie, energetické tyčinky, sójové „burgery“ a „párky“, tofu zmrzlina, nekvalitní sójové omáčky a další [2–5]. Sójové produkty jsou tedy v dnešní době již běžným sortimentem nejen ve zdravých výživách, názory na zdravotní benefity či rizika spojená s jejich konzumací se ovšem liší napříč mnohými studii. Některými je sója nejen pro obsah vysoce kvalitního proteinu, ale také dalších nutrientů jako například vitaminů B, vlákniny, draslíku a hořčíku, považována téměř za „superpotravinu“. Do značné míry však budí kontroverzi vysoký obsah isoflavonů genisteinu a daidzeinu, tedy fytoestrogenů, jejichž účinek na lidský organismus dosud není jednoznačný, společně s některými antinutrienty jako jsou kyselina fytová nebo lektiny. Za vznik nesrovnalostí napříč mnohými publikovanými studii a rozchodných názorů vědců na sóju a sójové produkty a jejich zdraví prospěšnost či škodlivost může z velké části právě značně rozdílné množství a způsob její konzumace napříč populacemi, stejně tak jako typ konzumované sóji, možné odlišné metabolizování sóji člověkem oproti zvířecím modelům, rozdílné hladiny hormonů pozorovaných subjektů, jejich etnikum, a nakonec samozřejmě také typ metabolismu daného jedince.

Tato práce je zaměřena na utřídění dostupných informací o sóji, a především jejich účincích na lidský organismus a charakterizaci aktivních látek v ní obsažených pomocí laboratorních stanovení jejich obsahu a antimikrobiálního, antioxidačního a cytotoxického účinku.



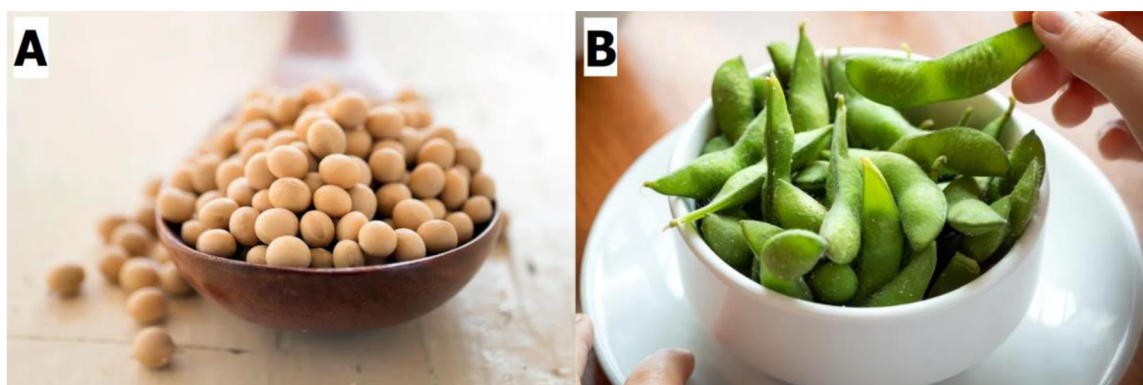
# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 Sója luštinatá

Sója luštinatá (*Glycine max*) je druh luštěniny původem z východní Asie náležící do rodu *Glycine*, který je rozdělen do dvou podrodů, *Glycine* a *Soja*. Podrod *Soja* zahrnuje dva druhy jednoletek: kultivované sójové boby, tedy *Glycine max*, a jejich divokého předka, *Glycine soja*, rostoucího ve volné přírodě Japonska, Koreji, Číny a Ruska [6]. Podrod *Glycine* oproti tomu čítá přes dvacet vytrvalých druhů, z nichž jsou některé používány například jako pastva pro dobytek.

Sója luštinatá (dále jen sója či sójové boby) je jednou z celosvětově nejdůležitějších a nejčastěji pěstovaných plodin, přičemž její celková produkce se každoročně stabilně navyšuje. Od roku 1955, kdy se celkově vyprodukované množství sóji pohybovalo jen kolem 20 MT, se celosvětová produkce této plodiny v letech 2018–2019 dostala až nad 350 MT. Podle statistických dat ze stejného období jsou největšími současnými producenty USA (120,52 MT) a Brazílie (199 MT), dále za nimi je Argentina (55,3 MT), Čína (15,97 MT), Indie (10,93 MT), Paraguay (8,85 MT), Kanada (7,27 MT) a další státy (dohromady 22,43 MT) [7]. Valná většina z tohoto množství je využita na výrobu krmiv pro hospodářská zvířata, pouze minoritní část je určena pro lidskou spotřebu [8]

Nejvíce je sója konzumována v asijských státech – nejen v Číně, odkud také pravděpodobně původně pochází, ale i v Japonsku, Koreji, Taiwanu nebo Indonésii. Obyvatelé těchto zemí denně konzumují průměrně 20–80 g sóji přímo ve formě zralých sójových bobů typicky světle hnědé barvy (Obrázek 1A), ale také sójového mléka, edamame (Obrázek 1B), sójové mouky, sójových klíčků, tofu a fermentovaných sójových produktů jako je tempeh, natto, miso a sójová omáčka [2, 3]. Oproti tomu množství konzumované sóji se v západní populaci pohybuje mnohem níže, průměrně 1–3 g sóji za den, a k tomu z větší části ve formě průmyslově zpracovaných potravin jako jsou sójové nápoje, snídaňové cereálie, energetické tyčinky, sójové „burgery“ a „párky“, tofu zmrzlina a další [4, 5]



Obrázek 1: A-Světle hnědé, suché, zralé boby, neznámější podoba sóji, z níž se dále vyrábí tofu, sójové mléko, miso a další; B-Edamame, jasně zelené lusky, ve kterých zrají sójové boby; (převzato z [9, 10]).

Tato plodina má také schopnost vázat vzdušný dusík pomocí bakterií rodu *Rhizobium* přítomných na jejích kořenech [11]. Mezi luštěninami sója zároveň drží prvenství

v procentuálním obsahu proteinů, které jsou její nejzastoupenější složkou a dosahují až 50 %. Lipidy dále zaujmají 20–30 % a sacharidy 25–30 %. I když je tedy sója klasicky uváděna jako luštěnina, díky vysokému obsahu tuků je zároveň olejninou [8]. Ačkoliv použití sójového oleje při vaření není v České republice příliš obvyklé, mezi lety 2018 a 2019 bylo globálně vyprodukováno přes 60 MT sójového oleje, což z něj dělá jeden z nejběžnějších dostupných stolních olejů [12].

## **1.1 Složky obsažené v sójových bobech**

V sójových bobech se přirozeně vyskytuje řada tepelně stabilních i tepelně labilních biologicky aktivních složek. Některé tyto látky, ačkoliv mohou být obsaženy pouze ve velmi malém množství, jsou schopny vyvolávat různorodé nutriční, biologické a fyziologické odpovědi u lidí i zvířat. Sója také představuje kvalitní zdroj bílkovin; výhodou je nízký obsah nasycených tuků i velké množství vlákniny. V porovnání s jinými luštěninami má jedinečně vysoký obsah isoflavonů, na které se však názory různí [13]. Jednotlivé nejdůležitější složky sójových bobů a jejich účinky na lidský organismus jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

### **1.1.1 Sójový protein celkový**

Sójový protein je znám jako vysoce stravitelný, vyznačující se svým relativně vyváženým profilem téměř všech obsažených aminokyselin (AMK). Dle FAO/WHO (Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization) metody hodnocení kvality proteinů PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) založené jak na potřebě konkrétních AMK v lidské výživě, tak na schopnosti člověka daný protein trávit [14], dosahuje sójový protein hodnoty 1,0, tedy maximálního skóre. Stejnou hodnotu mají dle tohoto systému také vaječné či mléčné proteiny [15]. V různých koncentracích lze v sóji nalézt veškeré esenciální AMK, což je samo o sobě v souladu s výživovými potřebami člověka i zvířat [16]. Na druhou stranu ale tento fakt někdy zastiňuje skutečnost, že esenciální methionin a tryptofan jsou v sójových bobech obsaženy pouze v deficitním množství [17, 18]. Kritické množství methioninu a tryptofanu v sóji je problém především v oblasti chovu hospodářských zvířat, který je třeba řešit přidělem i jiných zdrojů krmiva jako je obilí či například suplementací krmiv syntetickými AMK. S takovým postupem se ovšem značně zvyšuje cena provozu chovu, například průměrné náklady na řádné doplnění AMK v USA pro chovatele skotu v mléčném průmyslu jsou 20 centů na hlavu denně [19]. Vystávají zde také některé ekologické otázky, jelikož při produkci syntetických AMK může vznikat odpad nebezpečný pro životní prostředí. Použití syntetického methioninu, jehož nedostatek v sóji je nejvíce omezující pro drůbež, byl například v ekologické produkci v některých zemích zakázán úplně [18, 20]. Současné tendence k udržitelnému zemědělství tak tlačí na chovatele a samotné výrobce krmiv a do budoucna požadují změnu způsobu, jakým je sójová moučka obohacována o dané AMK. Rostoucí popularita bezmasých diet navíc vytváří tržní prostor pro nové sójové produkty s vyváženým profilem AMK.

Dostatek neesenciálních AMK ve stravě také nelze brát jako druhořadý, syntéza některých z nich je přímo ovlivněna přítomností a množstvím určitých esenciálních AMK. Například pokud není v potravě dostatečně přijímán cystein, je syntetizován z methioninu pomocí procesu transsulfurace [21]. V tomto případě pak musí být ve stravě takové množství methioninu, které

vykompenzuje požadavky daného organismu na příjem obou AMK. Methionin i cystein jsou v sóji přítomny, jejich hladiny ale pro potřeby spotřebitele nedosahují požadovaných hodnot [18, 22]. Hlavním zdrojem proteinů člověka praktikujícího vegetariánský či veganský způsob stravování tedy v žádném případě nemůže být pouze sója a sójové výrobky.

Jako slibná cesta pro zlepšení profilu AMK v sóji může být považováno genetické inženýrství. Jeho přístupy mají obecně za cíl jeden ze těchto tří: navyšování genů souvisejících s biosyntézou, řízení regulace biosyntézy a modifikace zásobních proteinů. Jeden z historicky prvních příkladů aplikace tohoto přístupu je přenos genu ořechu v roce 1992. Tento zásah úspěšně navýšil obsah proteinů a syntézu methioninu, byl však také přenesen i hlavní alergen, což znemožnilo komercializaci [23]. Ukázalo se také, že přenesením a expresí genu pro zein (kukuřiční protein) jsou v sóji zvyšovány hladiny AMK obsahujících síru [24]. Ve srovnání s konvenčně vyšlechtěnými odrůdami je na transgenní sóju ovšem nahlíženo většinou populace velmi negativně a kvůli neúměrně přísné evropské legislativě je navíc, navzdory požadavkům vědců [25], složité její pěstování schválné.

Většina zpracovaných sójových bílkovin se vyrábí z loupaných sójových bobů, které jsou mechanicky zpracovány a odtučněny pomocí hexanové extrakce za vzniku sójových vloček. Ty pak mohou být buďto namlety na odtučněnou mouku obsahující 50–54 % bílkovin, dále pomocí extrakce ethanolem může být získán sójový koncentrát s podílem bílkovin kolem 65–70 % nebo v neposlední řadě lze alkalickou extrakcí s následným odstředěním vlákniny, opětovným vysrážením a vysušením proteinu získat sójový izolát s obsahem přes 90 % bílkovin [26, 27]. Nejčastěji se můžeme setkat právě s posledním uvedeným produktem, který drží prvenství v podílu bílkovin mezi všemi sójovými výrobky a je ho značně využíváno v potravinářském průmyslu například pro zlepšení textury masa, zvýšení retence vlhkosti, samotné navýšení celkového podílu bílkovin v dané potravine či zlepšení podílu obsažených AMK [27]. Mimo jiné je ale také užíván některými sportovci a lidmi vyhýbajícím se mléčným produktům jako potravinový doplněk.

### **1.1.2 Lektiny**

Lektiny jsou třídou bioaktivních proteinů a glykoproteinů známou již stovku let, široce se vyskytující v přírodě jako ochrana rostlin před predátory. Nejvíce výzkumu lektinů se vždy zaměřovalo spíše na lektiny původem ze zeleniny, přičemž se ale hojně vyskytují v celé rostlinné říši [28]. Lektiny v sójových bobech byly objeveny v padesátých letech minulého století [29].

Lektiny nejspíše zastupují v rostlinách úlohu zásobáren dusíku, stejně tak ale hrají roli v obraně rostlin před škůdci a predátory [30]. Jsou známy svou neenzymatickou, reverzibilní vazbou na sacharidy, z čehož vyplývá schopnost aglutinace buněk, například erytrocytů, právě díky specifické vazbě konkrétních lektinů s povrchovými antigeny rozdílně glykosylovaných erytrocytů napříč systémem ABO, čehož je využíváno na odděleních transfúzního lékařství při stanovení krevních skupin. Tato schopnost byla poprvé popsána již kolem roku 1950 [31] a v literatuře mohou být označeny historickými názvy jako „aglutininy“, „fytohemaglutininy“ nebo „hemoaglutininy“, ačkoliv se dnes upřednostňuje přesnější označení „lektiny“. Názory na lektiny, včetně toho sójového, se velmi různí. Obecně je spíše považován za antinutrient, ale

přibývá stále více studií zastávajících protichůdný názor, tedy lektiny vyzdvihují za jejich antimikrobiální [32, 33], antivirové [34] a protinádorové [35] vlastnosti.

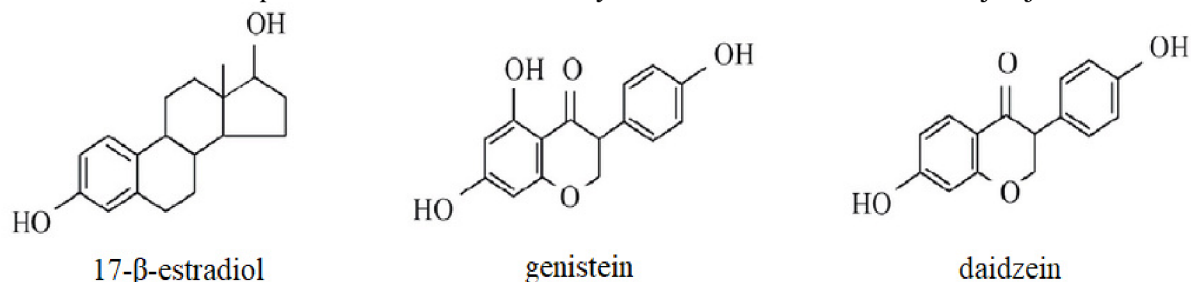
Za špatnou pověst lektinů může především fakt, že se ve střevě mohou vázat na širokou škálu molekul buněčných membrán střevní sliznice, což může vést k patologickým změnám na ní samotné, případně k negativnímu účinku na střevní mikroflóru [36, 37]. Závažnost takových důsledků se ve finále může lišit dle lokalizace vazby lektinu v konkrétní oblasti střeva [38], bylo i popsáno několik případů otravy lektinem kvůli konzumaci syrových nebo nedostatečně zpracovaných fazolí [39, 40].

Různé odrůdy sóji se navzájem v obsahu lektinu liší až pětinasobně [41]. Co je však důležité z hlediska výživy člověka, je množství lektinu až ve správně zpracovaných potravinách. Tato rezidua jsou dále snadno inaktivována v žaludku pepsinem, či následně hydrolázami tenkého střeva [42, 43]. Na druhou stranu existují studie, které naopak tvrdí, že lektin prochází tenkým střevem nezměněn, a může tak působit na organismus negativně [44, 45]. Zcela odstranit aktivitu lektinu lze povařením dané potraviny do měkka, což je u luštěnin běžný způsob přípravy [46, 47]. Nedávná studie zjistila, že namáčení a vaření sójových bobů zničí více než 99,6 % obsaženého lektinu [48], což odpovídá také dřívější studii Paredes-Lopez a Harryho [49].

Obvyklé nežádoucí účinky spojené s toxicitou lektinu se však neobjevují v žádné ze stovek provedených klinických studií na velké škále sójových produktů. Důkazy vycházející z těchto výsledků tedy v žádném případě nenaznačují, že by možný zbytkový obsah lektinu v sóji byl důvodem k obavám. Není proto divu, že i Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration; FDA) označil sójový protein (včetně lektinu) relativně nedávno za bezpečný [50].

### 1.1.3 Phytoestrogeny

Pozorované antioxidační účinky sóji jsou zásluhou vysokého obsahu isoflavonů, které jsou v této luštěnině obsaženy ve vyšších množstvích než v jiných běžných potravinách [51]. Nejzastoupenější z nich jsou genistein (50 %), daidzein (40 %) a glycitein (nečelých 10 %) [52]. Tyto látky jsou unikátní fytonutrienty, svou strukturou se velmi podobají ženskému pohlavnímu hormonu primárnímu estrogeneru, konkrétně 17- $\beta$ -estradiolu (E2), jak lze vidět na Obrázku 2. Jsou proto také označovány jako phytoestrogeny [53]. Tato skutečnost z nich dělá pravděpodobně nejkontroverznější biologicky aktivní látku obsaženou v sóji a je hlavním důvodem velkého počtu diametrálně odlišných názorů odborníků na sóju jako takovou.



Obrázek 2: Strukturální vzorce molekul 17- $\beta$ -estradiolu, genisteinu a daidzeinu (převzato z [54])

Fytoestrogeny jsou obecně přírodní látky vyskytující se v různých hladinách v pestrém spektru rostlin, v nichž zastávají různorodé funkce. Mnoho z nich má silné antioxidační vlastnosti a některé mohou hrát roli v obraně rostlin vůči infekcím [55, 56]. Hormon E2 je zodpovědný za plodnost žen stejně tak jako za udržování znaků ženského těla, má vliv na růst ženských reprodukčních orgánů, zaujímá ale také důležitou roli i v těle mužském. Strukturní podobnost fytoestrogenů s E2 znamená, že mohou interagovat s buněčnými estrogenovými receptory (ER), které zprostředkovávají funkce tohoto hormonu [57]. Je však známo, že účinky fytoestrogenů jsou oproti účinkům E2 mnohem slabší [58]. Fytoestrogeny se v různém množství vyskytují ve většině potravin vyrobených z rostlin. Všechny tyto molekuly patří do velké skupiny sloučenin známých jako polyfenoly [59–62].

Sójové fytoestrogeny jsou často spojovány s benefity pro lidské zdraví. Byl již popsán jejich příznivý účinek na metabolismus glukózy [63], snížení rizika vzniku karcinomu prostaty [64–67], snížení hladiny LDL-cholesterolu v krvi [68]. Byla také popsána spojitost mezi výrazným snížením hladiny C-reaktivního proteinu v krvi u žen po menopauze a příjmem sójových isoflavonů [69]. V žádné z těchto studií nebylo uvedeno, že by podávané isoflavony vykazovaly významnější vedlejší účinky. Často jsou také studovány účinky sójových fytoestrogenů na karcinom prsu a jeho prevenci. Konzumace sóji je občas spojována s nárůstem prsní tkáně, hypoteticky tedy i s vyšším rizikem karcinomu prsu [70–72]. Na druhou stranu, z výsledků mnoha observačních studií jsou z velké většiny při konzumaci sóji a sójových produktů u pacientek s karcinomem prsu dokázány účinky spíše protinádorové [73, 74]. Dále je již běžnou praxí, že je ženám procházejícím menopauzou doporučováno konzumovat sóju či sójové výrobky, případně užívat suplementy obsahující právě sójové fytoestrogeny [75]. Je totiž dokázáno, že zmírňují nepříjemné, menopauzu provázející projevy jako jsou návaly horka, pocení a výkyvy nálad, které souvisí s poklesem hladiny estrogenů v těle. Je také zajímavé, že ženy západní populace tyto příznaky při menopauze prožívají mnohem častěji a intenzivněji než ženy populace asijské, ačkoliv tento fakt je zřejmě způsoben rozdílnými stravovacími návyky [76, 77]. Ne všem ženám ovšem konzumace sóji od těchto příznaků dokáže ulevit. Ve střevě některých lidí je přítomen speciální druh bakterií (konkrétně byly identifikovány grampozitivní kmeny *Streptococcus intermedius* spp., *Ruminococcus productus* spp., a gramnegativní *Bacteroides ovatus* spp.), které jsou schopny přeměnit daidzein na ekvol, což je látka pravděpodobně související s mnoha prospěšnými zdravotními účinky sóji. Předpokládá se tedy, že lidé schopni této přeměny budou ze zdraví prospěšných účinků sóji těžit mnohem více než ti, v jejichž střevě se dané bakterie nenalézají [78]. Podle důkazů vycházejících z dalších odborných studií je tedy i účinek fytoestrogenů v pomoci proti syndromům menopauzy mnohem efektivnější právě u tzv. producentek ekvolu. Procento producentů ekvolu je vyšší mezi asijskou populací a lidmi na vegetariánské dietě než u západní populace celkově [79, 80].

Ačkoliv vědeckých studií, které by hovořily v neprospěch fytoestrogenů neexistuje mnoho [81], pár jich již opublikováno bylo. Nejčastěji je zmiňováno riziko potlačení funkce štítné žlázy a možné vyústění tohoto účinku až v hypotyreózu [82, 83], případně již zmíněné potenciálně vyšší riziko karcinomu prsu.

Velmi diskutabilní je používání sóji v dětské výživě. Několik studií naznačilo, že vysoký příjem isoflavonů takových produktů vyrobených ze sóji může přispívat k potlačení funkce

štítné žlázy, především pokud je ve stravě kojence insuficientní množství jódu [84, 85] (což už je v dnešní době ošetřeno), nebo pokud je dítě narozeno s deficiencí tyroidních hormonů [86]. Pro upřesnění je vhodné uvést, že kvůli této skutečnosti jsou fytoestrogeny někdy označovány jako strumigenní látky (goitrogeny). Název vychází z anglického termínu „goiter“, tedy „struma“, což je označení pro onemocnění štítné žlázy, při němž dochází k její hypertrofii. V minulosti byla zaznamenána řada případů strumy u dětí, jimž byly podávány právě formule na bázi sóji [87–89]. Aby se takovým případům předcházelo, je v dnešní době taková výživa již obohacována jódem.

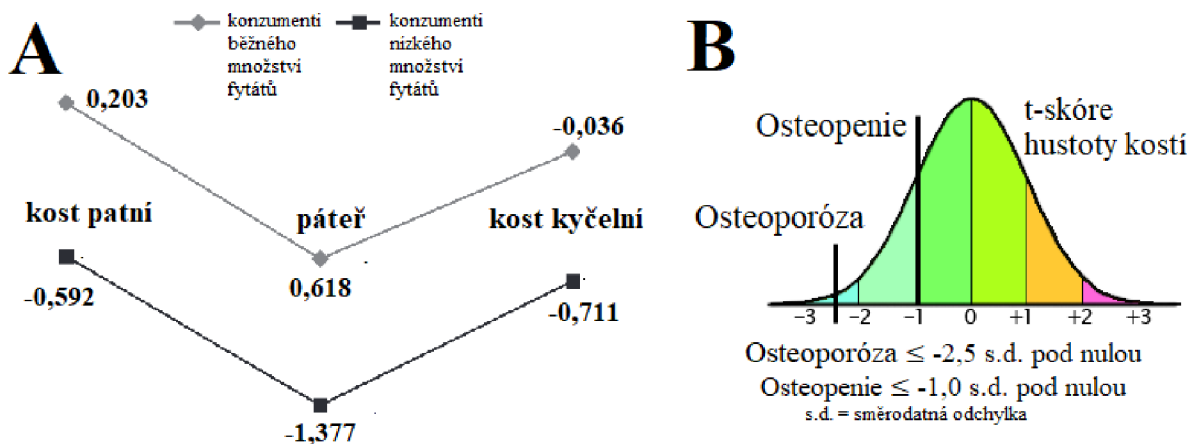
Americká akademie pediatriů zpracovala zprávu zabývající se právě použitím sóji v oblasti dětské výživy. V ní uvádí, že sójové mléko není o nic lepší (ani horší) než kojenecká mléka se základem z kravského mléka. V některých případech je substituce mateřského mléka sójovým vyloženě doporučena, a to pro kojence s galaktosémií, vzácným dědičným deficitem laktázy či při zjištění sekundární intolerance laktózy. Vůbec se naopak nedoporučuje jeho použití pro předčasně narozené děti [90]. Dalším faktem je, že v Asii se sója bez jakýchkoliv problémů používá naprosto běžně i ve výživě malých dětí, zde ovšem bude figurovat právě výše zmíněná hladina ekvolu. Ačkoliv se mnozí rodičové dnes vyhýbají krmení svých dětí produkty na bázi sóji a vidí tuto luštěninu jako vyloženě škodlivou, tato otázka patří mezi velmi kontroverzní a prozatím nebylo dosaženo vědeckého konsenzu.

#### 1.1.4 Kyselina fytová

Všechna rostlinná semena, konkrétně tedy ořechy, semínka, luštěniny a zrna, ukládají fosfor ve formě kyseliny fytové (známé také jako isotol hexafosfát, zkráceně I6P) tvořící s ionty kovů soli fytáty [91]. Po desetiletí označovali výživoví odborníci fytát jako inhibitor absorpce minerálů v těle (např. vápníku), což mu vyneslo nechvalné zařazení mezi antinutrienty. Tento názor pramení z celé řady vědeckých prací, počínaje rokem 1949, kdy byly publikovány výsledky studie provedené na štěňatech zabývající se právě inhibičním působením fytátu na kalcifikaci, které naznačovaly, že vysoký příjem fytátů v potravě „změkčuje“ a odvápnjuje kosti [92]. Studie z roku 1982, v rámci které byli potkani denně krmeni dávkou fytátu odpovídající množství obsaženém v deseti bochnících pšeničného chleba zahrnutí fytátů mezi antinutrienty potvrdila [93].

Nicméně ve světle studií provedených na lidech prošla reputace fytátů postupně značnou proměnou. Když byla účastníkům studie z roku 1948 nasazena dieta s vysokým podílem fytátů a nižším příjmem vápníku ve srovnání s jejich běžným stylem stravování a měřena vápníková rovnováha v krvi, bylo zjištěno, že okamžitým účinkem je vychýlení této rovnováhy směrem k negativní vápníkové bilanci. Pozdější měření ale ukázalo, že si tělo účastníků studie časem na vysoký příjem fytátů dokázalo navyknout a hladiny vápníku se po nějaké době dostaly opět do rovnováhy [94]. Experimenty v této práci byly však provedeny pouze na třech lidských subjektech. López-González *et al.* si v relativně nedávné studii dali za úkol odhalit, zda mají lidé, kteří se vyhýbají vysokému příjmu ořechů, luštěnin či celozrnných potravin, vyšší minerální hustotu kostí. Výsledkem bylo zjištění, že mají právě naopak tuto hodnotu nižší oproti lidem konzumujícím více potravin bohatých na fytáty, jak je zjevné z Obrázku 3. Tato studie také naznačila, že fytáty mohou působit podobně jako léky obsahující účinnou látku kyselinu alendronovou používané při osteoporóze, tedy v určité koncentraci inhibovat rozpouštění

kostního hydroxyapatitu [95]. Totožné výsledky o dva roky později shrnovala další práce stejných autorů [96].



Obrázek 3: A-Střední hodnota T-skóre vyjadřující počet směrodatných odchylek nad nebo pod průměrnou hodnotou zdravého 30letého dospělého člověka stejného pohlaví a etnicity jako vyšetřovaný pacient (dle WHO); měření provedena na kosti patní, páteři a kosti kyčelní; B-vysvětlení interpretace hodnot T-skóre, přičemž osteopenie je brána jako předstupeň osteoporózy, což je kostní onemocnění projevující se redukcí zdravé kostní hmoty, kvůli které pak častěji dochází k frakturám (převzato z [95])

Poslední a nejpřesvědčivější studie z roku 2013 měřila hladiny fytátů v krvi 157 žen v delším období a stejně tak sledovala i hustotu jejich kostí. Výsledky této práce jasně ukazují, že vysoká hladina fytátů v krvi byla zároveň spojena s nejnižší ztrátou kostní hmoty, což dále korespondovalo také s nižším rizikem vzniku fraktur. Z největší části za to pravděpodobně může fakt, že fytáty inhibují osteoklastogenezi a již vyžralým osteoklastům brání v jejich činnosti [97].

V posledních letech byly navíc pozorovány i jiné prospěšné vlastnosti fytátu jako antioxidační aktivita, protizánětlivý a protinádorový účinek [98, 99]. Byla také popsána schopnost inhibice tvorby vápenatých solí a prevence tvorby ledvinových kamenů [100], dále zpomalení trávení škrobu, a tím snižování glykemického indexu přijímaných potravin [101], [102]. Všechna tato zjištění v současnosti oživila diskuzi o významu fytátů a dalších inositolfosfátů ve výživě člověka.

### 1.1.5 Inhibitory proteáz

Jako další složku sójových bobů je třeba zmínit také inhibitory proteáz. Obecně jsou v rostlinách syntetizovány jako obranné molekuly, přičemž v sóji se vyskytují převážně ve dvou typech – Bowman-Birk a Kunitz-inhibitor trypsinu (BBI a KTI). S ohledem na výživu je jejich působením snižována stravitelnost proteinů, tepelnou úpravou jsou však tyto proteázy inaktivovány [8, 103].

V minulosti bylo na rostlinné inhibitory proteáz (PI) pohlíženo především jako na molekuly, které pouze degradují proteiny a nebyla jim věnována velká pozornost. Tento stav se ovšem významně změnil a dnes se již ví, že jsou velmi důležitými signálními molekulami figurujícími v mnoha biologických procesech jako jsou zánět, apoptóza, hemostáza a zpracovávání hormonů. Inhibitory serinové proteázy BBI a KTI byly rozsáhle studovány v porovnání

s dalšími PI ostatních luštěnin [104]. Tyto dvě rodiny enzymů se od sebe liší svou hmotností, obsahem cysteinu a počtem reaktivních míst [105]. BBI, jejichž molekulová hmotnost leží v rozmezí 8–10 kDa, jsou enzymy obsahující 7 bisulfidických můstků a jsou složeny ze 71 AMK [106]. Každý BBI má 2 aktivní místa na opačných stranách molekuly, která dokáží inhibovat jak trypsin, tak chymotrypsin [107]. KTI oproti tomu mohou být velké 8–22 kDa, obsahují 2 bisulfidické můstky a jediné aktivní místo pro trypsin [108]. Přirozeně se v rostlinách vyskytující BBI vykazující se značnou stabilitou vůči mnoha fyzikálním i chemickým faktorům je v současné době považován za slibného kandidáta v terapii některých onemocnění, především ale v oblasti prevence nádorových onemocnění [109]. Jako jednu z nejdůležitějších studií lze označit práci Wattenberga *et al.*, v níž byla odhalena schopnost BBI ireverzibilně potlačit karcinogenezi dokonce během její rané fáze [110]. Je také povzbuzující, že dle dalších publikovaných prací množství BBI, které se dostane do vnitřních orgánů člověka po perorálním podání, dosahuje takových hodnot, které zabraňují maligní transformaci *in vitro* [109, 111]

### 1.1.6 Sójový olej, mastné kyseliny a fytosteroly

Sójový olej se pyšní relativně vysokým kouřovým bodem asi 230 °C, což je teplota, při které se tuky začnou štěpit a oxidovat. Pro lepší představu: kouřový bod nerafinovaného panenského olivového oleje se pohybuje kolem 191 °C, u řepkového oleje se tato hodnota pohybuje v rozmezí 220–230 °C [112, 113]. Do jídla jsou po jejím překročení uvolňovány volné radikály působící v těle oxidační stres, který přispívá ke vzniku různých onemocnění včetně těch nádorových [114]. Tento fakt dělá ze sójového oleje cenného pomocníka při přípravě jídla za vysoké teploty.

Ve složení spektra mastných kyselin (MK) obsažených v sójových bobech (a sójovém oleji) zastupují největší podíl polynenasycené MK, jichž je zde obsaženo až čtyřikrát více než v rybím tuku. Z hlediska výživy je příznivé velké množství kyseliny  $\alpha$ -linolenové (ALA), jejíž konzumace je u naší populace nedostatečná [115]. Tato látka spadá do omega-3 MK, které jsou spojovány s řadou pozitivních účinků na zdraví srdce, vývoje plodu, mozkových funkcí a posílení imunity [116]. Dále bylo dokázáno, že se mohou podílet na zmírnění chronického zánětu, o němž se předpokládá, že figuruje v rozvoji patologických stavů jako jsou srdeční choroby, rakovina a cukrovka [117, 118].

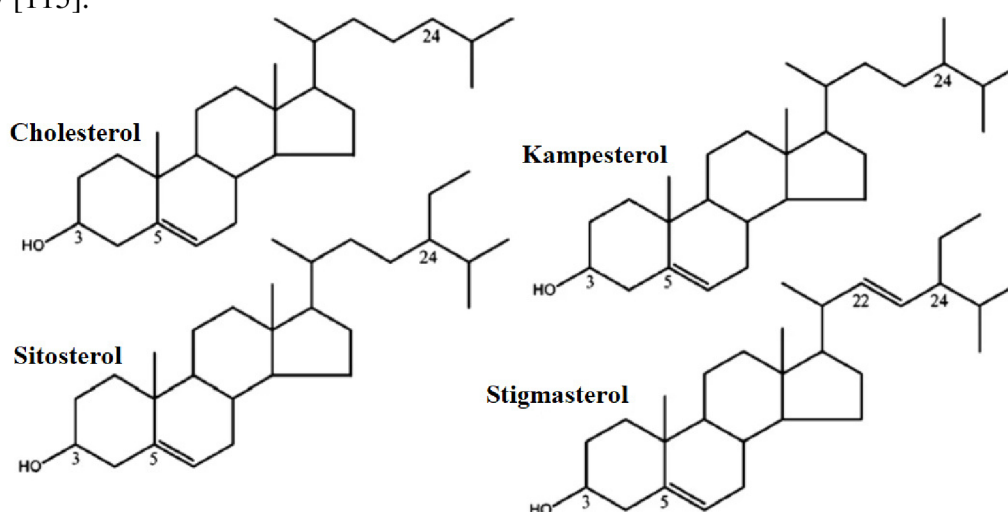
Opět je ale třeba pohlížet i na možná negativa spojená s konzumací sójového oleje. Jako první z nich lze uvést, že přeměna ALA na esenciální MK eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA) je značně neefektivní. Výzkum ukazuje, že pouze <0,7–7,9 % ALA je převedeno na EPA a <0,1–3,8 % na DHA. Z tohoto důvodu není sója považována za spolehlivý zdroj DHA ani EPA, což jsou základní tuky potřebné pro správný chod buněčných funkcí [119]. Dalším negativem je obsah omega-6 MK, mnohem vyšší než obsah omega-3 MK [120]. Ačkoliv potřebné jsou oba typy, většina populace přijímá nadbytek právě omega-6 MK, a naopak nedostatek omega-3 MK. Tato skutečnost může poté naopak přispívat k zánětu a rozvoji chronických onemocnění [121].

Sójové boby průměrně obsahují velké množství fytosterolů (250 mg/100 g), které jsou svou strukturou podobné živočišnému cholesterolu a liší se v uspořádání postranního řetězce (Obrázek 4). Nejčastěji se vyskytující fytosteroly jsou sitosterol, kampesterol a stigmasterol



[122]. Stejně jako cholesterol hrají důležitou úlohu ve struktuře biomembrán, v tomto případě ale rostlinných [115]. Naše tělo preferuje spíše cholesterol, i když umí fungovat i s fytosteroly [123]. Průchod sterolů z trávicího traktu dále do těla regulují dva enzymy zvané steroliny. Oproti cholesterolu se fytosterolů do těla dostane pouze malé množství [124]. Názory na fytosteroly se opět různí. Byly publikovány odborné práce, jejichž výsledky ukazují, že příjem 2–3 g fytosterolů za den po dobu 3–4 týdnů vedl k redukci LDL-cholesterolu asi o 10 % [125, 126], což samo o sobě ale nemusí mít na zdraví člověka vliv. Existuje také velké množství studií, které naznačují, že fytosteroly zvyšují riziko srdeční příhody či mrtvice [127–133]. Fytosteroly jsou však pro zlepšení zdravotního stavu srdce stále doporučovány mnohými autoritami jako je Americká kardiologická asociace. Naopak instituce, které v prevenci srdečních onemocnění doporučují se jim vyhnout, jsou například Německá komise pro léky, Francouzský úřad pro potraviny (ANSES) či Britský národní institut zdraví (NICE) [123].

Za zmínku rozhodně stojí také sójový lecitin – přesněji sójové fosfolipidy, jelikož se většinou nejedná pouze o lecitin. Fosfolipidy jsou základní stavební jednotkou biomembrán, figurují v řadě metabolických procesů, zlepšují trávení tuků a optimalizují poměr LDL a HDL cholesterolu. Lecitin jako takový je důležitý například pro činnost nervové soustavy [115].



Obrázek 4: Struktury běžně známých fytosterolů a cholesterolu (převzato z [122])

### 1.1.7 Sacharidy

Sója obsahuje asi 25–30 % sacharidů. Ty jsou asi z 10 % tvořeny sacharózou a z 5 % nestravitelnými oligosacharidy jako je rafinóza a stachyóza. Člověk ani monogastriční zvířata nemohou tyto molekuly strávit kvůli nedostatku specifické endogenní  $\alpha$ -galaktosidázy. Tento fakt pravděpodobně vede ke vzniku nadýmání a plynatosti, ke kterým může stejně tak dojít i po konzumaci jiných luštěnin, ačkoliv přímé důkazy tohoto tvrzení v literatuře chybí [134]. Na rozdíl od ostatních luštěnin obsahuje sója velmi malé množství škrobu. Polovina celkového obsahu sacharidů v sójových bobech tvoří zdraví prospěšná vláknina (celulóza, pektiny a další) [115, 135].

Je dále známo, že nestravitelné oligosacharidy mohou sloužit jako prebiotika, tedy jako substrát pro „přátelské“ bakterie (probiotika), a mít tak pozitivní účinek na zažívací trakt lidí i zvířat. Příjem prebiotik zvyšuje počet specifických bakterií ve střevní mikrobiotě, čímž může

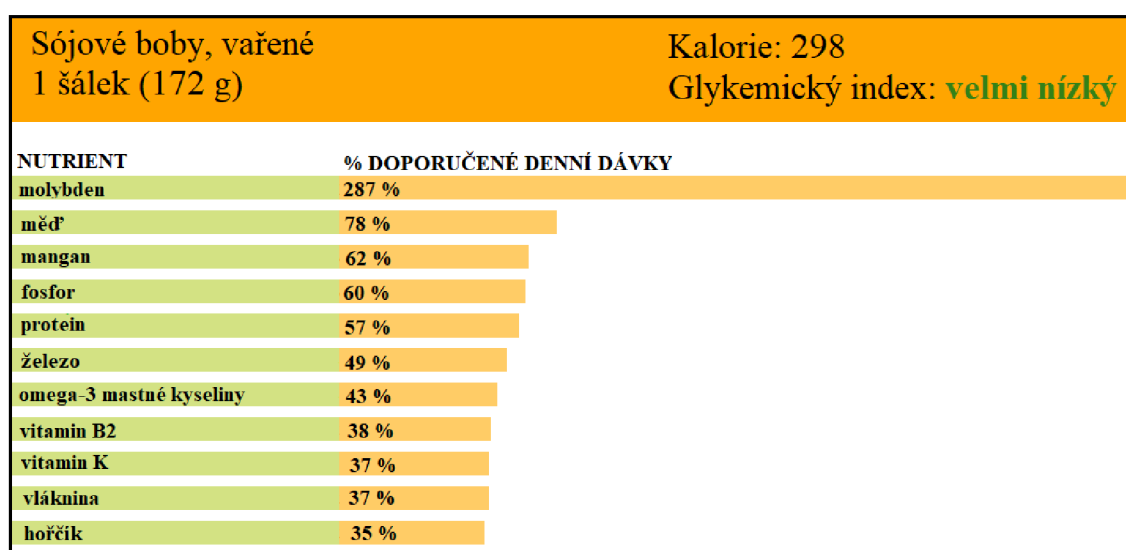
dokonce měnit její složení [136, 137]. Oligosacharidy izolované ze sóji jsou nyní již zavedená prebiotika uznaná FDA jako bezpečná, tedy GRAS („generally recognized as safe“) [138]. Například v relativně nedávné studii Ma *et al.* provedli *in vitro* a *in vivo* experimenty, jejichž výsledky potvrzují, že sójové oligosacharidy pozitivně ovlivňují střevní mikroflóru, a navíc přispívají ke zlepšení různých imunologických parametrů [139].

### 1.1.8 Vitaminy a minerály

Sójové boby jsou bohatým zdrojem vitaminů a minerálů, nicméně právě v případě minerálů je třeba myslet na jejich nízkou biodostupnost kvůli obsahu fytátu či oxalátu, k nimž mají vysokou vazebnou afinitu, čímž jejich nutriční potenciál zůstává z velké části nevyužit a je třeba tyto prvky přijímat i v jiných potravinách [115]. Obrázek 5 zobrazuje obsah vybraných vitaminů a minerálů v sójových bobech.

Z minerálů obsažených v sóji ve vyšší koncentraci lze uvést například molybden, který je nepostradatelným stopovým prvkem nejen v lidském těle. Jakmile je z potravy v žaludku a střevě vstřebán do krve, je přenášen do jater, ledvin a dalších orgánů, případný přebytek je vyloučen močí [140]. Určitá část molybdenu však zůstává v játrech a ledvinách uložena, převážná většina z něj je využita jako kofaktor enzymů sulfitoxidázy [141], xantinoxidázy, xantindehydrogenázy [142] a aldehydoxidázy [143]. Dalšími velmi důležitými prvky v sójových bobech jsou například měď [144], mangan [145] či fosfor [146].

Jak bylo výše zmíněno, sójové boby jsou také skvělým zdrojem některých vitaminů jako je například vitamin K1 známý jako fylochinon, hrající klíčovou roli v hemokoagulačním procesu [147]. Dalším vitaminem obsaženým v sójových bobech (a sójovém oleji) je vitamin E, který působí protizánětlivě a podporuje zdraví pokožky [148]. Studie dále ukazují, že vitamin E může také chránit kůži před poškozením a pomáhat v terapii akné nebo při atopické dermatitidě [148, 149]. Za zmínku rozhodně stojí také obsah vitaminů skupiny B, například vitaminu B2 (riboflavinu) [150] nebo B9 (folátu), jenž zaujímá v organismu mnohé důležité úlohy, zvláště je pak důležitý při těhotenství [151].



Obrázek 5: Procentuální množství doporučené denní dávky jednotlivých vybraných nutrientů obsažených v porci 172 g vařených sójových bobů (převzato z [152])

## 2 Vybrané sójové produkty

S obrovskou stále vzrůstající poptávkou západní populace je v dnešní době na pultech obchodů již dostupné nepřeberné množství sójových produktů, které se mezi sebou značně liší jak chutí, tak především obsahem zdraví prospěšných, neprospěšných či dokonce škodlivých látek. Tato práce se zabývá spíše minimálně zpracovanými sójovými potravinami, jejichž konzumace s sebou může obnášet značné zdravotní benefity. Proto dále nejsou rozebírány pro zdraví nepřínosné průmyslově zpracované sójové polotovary jako jsou sójové „párky“, „burgery“ a podobně. Ne zcela vypovídající je obecně také členění sójových produktů pouze na fermentované a nefermentované, jelikož obě tyto skupiny pak obsahují obrovské množství produktů diametrálně odlišných svým charakterem i využitím. Pro účely této diplomové práce je takové dělení však dostačující.

### 2.1 Původ sójových bobů pro další výrobu

Většina sójových bobů je pěstována v USA a velká část z nich je geneticky modifikována. Ačkoliv výzkum dosud nezjistil, že by geneticky modifikované plodiny byly pro lidské zdraví jakkoliv škodlivé [153], mnoho lidí se jim ze strachu vyhýbá. Dnes jsou ale v obchodech běžně dostupné i produkty (včetně tofu) vyrobené ze sóji pěstované u nás, na Slovensku, či v jiné zemi Evropské unie, které geneticky modifikované nejsou.

### 2.2 Fermentované produkty na bázi sóji

#### 2.2.1 Miso

Miso (Obrázek 6A) je tradiční asijskou potravinou, v dnešní době je však dostupná i v západních zemích. Ačkoliv mnoho jedinců tuto potravinu podle názvu nezná, je pravděpodobné, že ji v japonské restauraci již konzumovali například v polévce či omáčce. Miso pasta je totiž nositelem chuti umami a používá se k dochucování pokrmů. Je vyráběna z vařených, rozmačkaných sójových bobů fermentací ve slané vodě s takzvaným koji, které nejčastěji obsahuje plíseň *Aspergillus oryzae*. Dozrává dlouhým procesem v cedrových kádích, přičemž jeho výroba trvá obvykle 1–3 roky. Podle druhu může mít miso od bílé, přes žlutou, červenou až po hnědou barvu [115, 154].

#### 2.2.2 Natto

Natto je tradiční japonský pokrm vyráběný z fermentovaných sójových bobů, charakteristický svou lepkavou texturou (Obrázek 6B). Je velmi snadno rozpoznatelný podle svého štiplavého pachu, přičemž chuť je popisována jako ořechová. V Japonsku je natto podáváno obvykle se sójovou omáčkou, hořčicí, pažitkou nebo s dalšími dochucovadly a s vařenou rýží. Tradiční výroba spočívala v zabalení vařených sójových bobů do vláken rýžové slámy, na jejímž povrchu se přirozeně vyskytují bakterie *Bacillus subtilis*. Tyto bakterie pak fermentovaly sójové boby na natto. Nicméně na začátku 20. století vědci bakterie *B. subtilis* identifikovali a izolovali, což umožnilo výrobu modernizovat. V současnosti je rýžová sláma nahrazena polystyrenovými boxy, v nichž probíhá fermentace [155].

Natto je díky fermentačnímu procesu, který vytváří vhodné podmínky pro růst probiotik, obzvláště výživné. Tím pádem přispívá také ke zvýšení stravitelnosti obsažených živin, navíc

je fermentací razantně snížen podíl antinutrientů [156–159]. Z těchto důvodů je natto jasně zdravější než nefermentované sójové boby, nicméně jeho chuť a vůně jsou značně specifické, a ne každému příjemná.

### 2.2.3 Tempeh

Tempeh (Obrázek 6C) je považován za pravděpodobně nejzdravější sójový produkt. Je často používán jako náhrada masa a oproti jiným náhražkám jako je tofu, seitan či sójové maso obsahuje nesrovnatelně větší množství zdraví prospěšných látek. Přípravuje se z vařených sójových bobů inokulovaných plísní, nejčastěji rodu *Rhizopus*, přičemž je tato směs stlačována. Poté vzniká kompaktní „koláč“ obalený hustým myceliem ušlechtilé plísně. Důležitou funkcí plísně v tomto fermentačním procesu je i syntéza enzymů, které hydrolyzují složky sójových bobů a přispívají ke vzniku požadované textury, chuti a aroma. Enzymatická hydrolyza pak také snižuje nebo úplně ruší účinky některých sójových antinutrientů [160]. Komerčně prodáváný tempeh na rozdíl například od miso pasty neobsahuje probiotika, jelikož je ošetřen pasterizací [161]. Je nicméně kvalitním zdrojem prebiotik [162].

### 2.2.4 Sójová omáčka

Ačkoliv sójová omáčka nebyla v této práci dále zkoumána, zaslouží si být zmíněna alespoň teoreticky. Pravou sójovou omáčku nalezneme v obchodech pod označení shoyu (Obrázek 6D) či tamari. Shoyu je tradiční japonské tekuté koření vyrobené z odtučněných sójových bobů a pšenice. *Aspergillus oryzae* či *Aspergillus sojae* je naočkován na podušené sójové boby a praženou pšenici za účelem vzniku koji. To se dál mísí s vodou a solí (cca 17 % hm./obj.). Společně je vše fermentováno 6–12 měsíců. Kvasný produkt se pak lisuje a je tak získána tekutina – shoyu. Bakterie mléčného kvašení (především *Tetragenococcus halophilus*) a kvasinky (*Zygosaccharomyces rouxii* a *Candida ssp.*) produkt konzervují a vytváří jeho jedinečnou chuť [163]. Oproti shoyu se tamari liší především tím, že při její výrobě není používána pšenice, výsledná sójová omáčka je tedy bezlepková. Nejčastěji je získávána jako vedlejší produkt při výrobě miso pasty [164]. Díky vyššímu podílu sójových bobů je tak její chuť popisována jako více umami, zatímco pšenice v shoyu vytváří chuť spíše sladší [165]. V obchodech je pak třeba rozlišovat mezi těmito kvalitními fermentovanými omáčkami a levnými sójovými omáčkami, které procesem fermentace neprochází a obsahují glutaman, cukr, barviva či dokonce živočišné složky.

## 2.3 Nefermentované produkty na bázi sóji

### 2.3.1 Sójová mouka

Sójová mouka je produkt získaný jemným mletím plnotučných loupaných sójových bobů či odtučněných sójových vloček. Aby splňovala požadavky na označení „mouka“, musí alespoň 97 % produktu projít sítím o velikosti ok 100 mesh (asi 152  $\mu\text{m}$ ) [166]. Jak již bylo zmíněno, sójové mouky typicky obsahují alespoň 50 % proteinů. Jsou používány převážně při výrobě pečiva, kvůli vysokému obsahu sójové proteinu mohou mít ale pro některé jedince relativně vysoký alergenní potenciál [167].

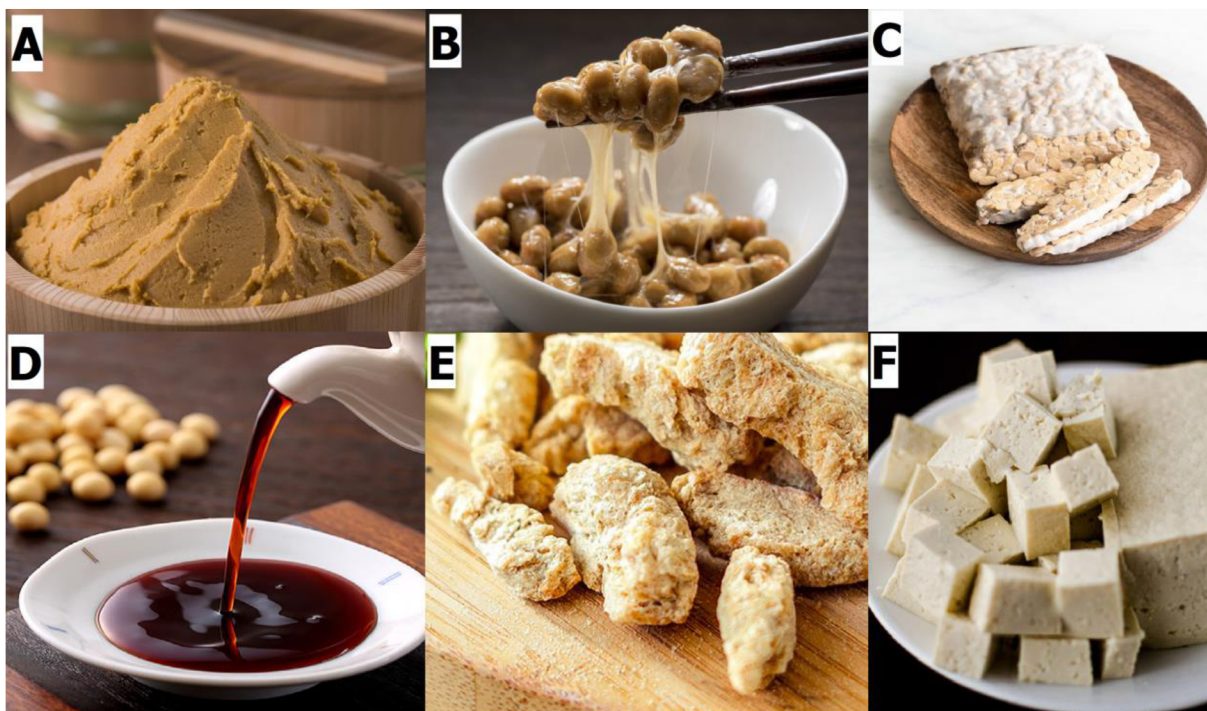
### 2.3.2 Sójové maso

Sójové maso (Obrázek 6E) je produkt vyráběný z odtučněné sójové moučky. Je také vedlejším produktem extrakce sójového oleje [168]. Je prodáváno v různých tvarech jako sójový granulát, nudličky, kostky, plátky a podobně. Lze ho rychle uvařit do změknutí, a poté se dá připravovat jako klasické maso, s nímž má společný vysoký obsah proteinů [169].

### 2.3.3 Tofu

Setkání s tofu (Obrázek 6F) je dnes již naprosto běžné, mnoho lidí ho pravidelně zahrnuje do svého jídelníčku a upravuje na rozličné způsoby, někdo si ho dopřává například restované ve vietnamských restauracích. Kvůli své relativně nevýrazné chuti a houbovitě struktuře má ale také své odpůrce. Na druhou stranu tuto potravinu původem z Číny lze díky chuťově neutrálním vlastnostem jednoduše dochucovat a dá se také udit či lisovat.

Tofu se vyrábí z kondenzovaného sójového mléka, které je lisováno do pevných bílých bloků způsobem podobným výrobě klasického sýra. Říká se, že bylo objeveno náhodně před více než 2 000 lety, když bylo sójové mléko omylem smícháno s krystalizovanou mořskou solí bohatou na minerály zvanou nigari, která ze sójového mléka vysrážela proteiny [170].



Obrázek 6: Sójové produkty: A-Miso; B-Natto; C-Tempeh; D-Shoyu (sójová omáčka); E-Sójové maso (hydrolyzované); F-Tofu (převzato z [171–176])

## 3 Sója a lidský organismus

### 3.1 Vliv příjmu sóji na nádorová onemocnění

Mnohé odborné publikace tvrdí, že bioaktivní sójové látky, především isoflavony, mohou pomoci snížit riziko vzniku některých druhů nádorových onemocnění jako je karcinom prsu nebo prostaty [177]. Například genistein pravděpodobně blokuje rozvoj nádoru tím, že brání angiogenezi, tedy růstu nových cév, které se tvoří za účelem vyživování nádorové tkáně [177, 178]. Zahrnutí sóji do jídelníčku může být také faktorem přispívajícím ke snížení úmrtnosti při karcinomu prostaty [179]. Studie na potkanech ukázala, že genistein redukuje syntézu DNA v lidských buňkách prostaty *in vitro* a inhibuje účinek testosteronu ve vývoji rakoviny prostaty [180, 181]. Existují také určité epidemiologické důkazy o ochranných účincích sójových výrobků na karcinom tlustého střeva, na druhou stranu mnoho studií žádný účinek neprokázala. S jistotou však lze říct, že příjem vlákniny, které sója obsahuje relativně vysoké množství (asi 15 % celkové hmotnosti), je prospěšný a sám o sobě snižuje riziko karcinomu tlustého střeva i dalších chronických onemocnění trávicího traktu [182]. Výsledky dalších epidemiologických a experimentálních studií často naznačují, že právě sója se svým vysokým obsahem isoflavonů genisteinu a daidzeinu, může figurovat v prevenci karcinomu prsu a dokonce i inhibici jeho karcinogeneze [183], přičemž karcinom prsu je mezi ženami nádorové onemocnění s nejvyšší prevalencí, a zároveň je to celosvětově druhá nejčastější příčina smrti žen [184]. Stručně shrnuto sójové isoflavony, především genistein, mohou nepřímým působením zastavovat buněčný cyklus některých nádorových buněk, dále působí proti určitým patologickým epigenetickým změnám zdravých buněk, angiogenezi, tvorbě metastáz a mohou fungovat také jako induktory apoptózy. Tyto účinky jsou zprostředkovány různými signálními drahami. Všechny tyto funkce dokazují, že tato molekula působí silně protinádorově. Většina studií však ve svých experimentech používá mnohem vyšší dávku sójových isoflavonů, než se nachází v běžně konzumované potravě [185].

### 3.2 Role sóji při onemocnění srdce a cév

Ve většině rozvinutých zemí jsou kardiovaskulární onemocnění jednou z hlavních příčin úmrtí celkově, přitom většině takových případů lze předejít životním stylem založeným na zdravé a vyvážené stravě, cvičení a nekuřáctví [186]. Právě s ohledem na kardiovaskulární choroby bylo zjištěno, že je konzumace sóji ve srovnání s živočišnými proteiny spojena se snížením celkového cholesterolu v krvi a LDL-cholesterolu [178]. Vysoká hladina LDL („špatného“) cholesterolu v krvi hraje významnou roli při vzniku ischemické choroby srdeční a oxidovaný způsobuje poškození tepen. Bylo zjištěno, že isoflavon genistein dokáže pravděpodobně inhibovat oxidaci LDL-cholesterolu, což může vést ke zlepšení zdraví. Sójový protein může mít také vliv na zvýšení HDL („dobrého“) cholesterolu [187]. Jak již bylo avizováno, fytoestrogeny jsou schopny vazby na estrogenové receptory a mohou vyvolávat podobné účinky včetně právě redukce LDL-cholesterolu a zvyšování hladiny lipoproteinů o vysoké hustotě, tvořící s cholesterolem HDL-cholesterol [188]. Zdá se, že tyto účinky sóji jsou nejvýraznější právě u jedinců s vyšší hladinou cholesterolu oproti těm s hladinou cholesterolu ležící ve fyziologickém rozmezí [189], přičemž je třeba denního příjmu alespoň kolem 25 g sóji, aby se dostavily požadované výsledky [177]. Nedávná studie Sathyapalana *et al.* odhalila,

že příjem sójových isoflavonů u žen v raném období menopauzy snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění [190].

### **3.2.1 Snížení rizika tvorby krevních sraženin**

Je častou praxí, že je krevní sraženina zodpovědná za úplnou stenózu tepny již zúžené v důsledku aterosklerózy. Studie Polini *et al.* ukázala, že právě sójové isoflavony, zejména genistein, působí antagonicky na tvorbu krevních sraženin. Jako modulátor estrogenového receptoru je schopen ovlivnit agregaci trombocytů při tvorbě primární krevní zátky skrz jejich přímý efekt na cévní tkáň regulací syntézy vazoaktivních sloučenin. Toto potlačování agregace je zprostředkováno uvolňováním oxidu dusnatého z tkáně cévy [191].

### **3.2.2 Účinek konzumace sóji na hypertenzi**

Neléčená hypertenze může vést k mozkové mrtvici, infarktu myokardu, srdečnímu nebo renálnímu selhání. Konzumace sóji je některými vědci spojována s nižším krevním tlakem, přičemž byl studován dopad nahrazení části zdrojů energie jako jsou sacharidy a lipidy ve stravě za sójové nebo jiné rostlinné proteiny v souvislosti s prevencí a léčbou vysokého tlaku. V randomizované studii provedené na pacientech s prehypertenzí a hypertenzí v prvním stádiu bylo zjištěno, že strava s příjmem sójového (ale i mléčného) proteinu snížila systolický krevní tlak ve srovnání se stravou s příjmem rafinovaných sacharidů s vysokým glykemickým indexem. Na základě těchto výsledků bylo naznačeno, že takové dietní opatření mohlo být součástí prevence a léčby hypertenze [192].

### **3.3 Obezita a diabetes v souvislosti s příjmem sójových produktů**

Konzumace sójových bílkovin je spojována s pozitivním působením na hyperglykémii, redukcí tělesné hmotnosti a na hyperinzulinémii [193]. Tato fakta mohou být důležitá jak pro osoby trpící diabetem, tak i osoby bez diabetu při udržování štíhlé linie a fyziologické hodnoty glykémie. Účinek sóji při diabetu však závisí na mnoha faktorech jako je typ diabetu, životní styl pacienta a jejich metabolické potřeby. Strava s podílem sójových potravin může být přínosná především pro pacienty s diabetem 2. typu kvůli jejich sklonu k rozvoji hypertenze, hypercholesterolemie, aterosklerózy a obezity [194]. Nahrazení živočišných proteinů sójovými či jinými rostlinnými je zase spojováno s redukcí hyperfiltrace, proteinurie a zatížení ledvin, a tím snížení rizika vzniku renálních onemocnění diabetes mellitus 2. typu často doprovázejících. V krátkodobých i dlouhodobých experimentech bylo dokázáno, že sójová vláknina působí příznivě na udržování hladiny glukózy v krvi [195, 196]. Kromě toho je sója spojována s přínosem pro zdraví pacientů se žlučovými kameny, mechanismus tohoto účinku zatím ovšem není dobře popsán [194]. Výzkumy prováděné na pacientech s diabetem ukazují několik výhod příjmu stravy založené na sóji, do budoucna je ale třeba dalších studií pro potvrzení těchto poznatků.

### **3.4 Působení sójových fytoestrogenů na hladiny testosteronu**

Častou obavou při konzumaci sóji je její vliv na mužské tělo, konkrétně například na hladiny testosteronu, ale i na takové jevy jako je gynekomastie. Nízké hladiny testosteronu mohou vést ke snížení libida, erektilní dysfunkci, ztrátě svalové hmoty, depresi, únavě a osteoporóze.

V roce 2010 analyzovala skupina amerických vědců 47 studií, které zkoumaly právě vztah mezi příjmem sójových potravin a mužskými pohlavními hormony včetně testosteronu. Ti dospěli k závěru, že konzumace sóji ani doplňků stravy na bázi sóji významně neovlivnila hladiny testosteronu v krvi. Syntéza testosteronu v těle navíc začíná cholesterolem, který ale pochází z vnitřních tělesných zdrojů a není stejný jako cholesterol přijímaný potravou. Léky snižující hladinu cholesterolu v krvi ani dietní návyky by proto na produkci testosteronu neměly mít žádný vliv [197, 198].

Gynekomastie znamená zvětšení prsní žlázy u mužů a obava z ní je častým důvodem, proč se někteří muži vyhýbají sójovým výrobkům. Ačkoliv byl popsán jeden případ gynekomastie údajně spojené s konzumací sóji [199], obrovské množství studií takovou souvislost nikdy neprokázalo [200, 201]. Mnohokrát byl naopak popsán vztah mezi vznikem gynekomastie a příjmem různých xenoestrogenů v masu, mléce, sýru, rybách a vejcích [202, 203]. Je také prokázáno, že gynekomastie může vzniknout v důsledku obezity [204].



## **CÍLE PRÁCE**

V rámci diplomové práce budou řešeny dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše a screening vybraných typů obsahových látek v sójových produktech
- 2) příprava a charakterizace extraktů z různých typů sójových produktů
- 3) testování antioxidačního a antimikrobiálního účinku sójových extraktů
- 4) testování účinku sójových extraktů na buněčné kultury – imortalizované keratinocyty a buňky melanomu
- 5) vyhodnocení a diskuze výsledků.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Seznam použitých přístrojů a laboratorního vybavení

- Analytické váhy, Boeco (DE)
- Automatické pipety, různý rozsah objemu, Discovery, Biohit a Eppendorf (vše DE)
- Biohazard box, model Airstream, třída II-ESCO, Biotech (ČR)
- CellCulture CO<sub>2</sub> Inkubátor, ESCO (SRN)
- Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
- Exsikátor, Kavalier (ČR)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (SRN)
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)
- Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat –Verkon (ČR)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DE)
- Soxtherm, SOX 412, Gerhardt (DE)
- Spektrofotometr –Helios  $\gamma$ , Unicam (UK)
- Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
- Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)
- Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (DE)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)
- HPLC sestava Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - Autosampler Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - Detektor DAD Vanquish series, optická cela 50 mm, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - Kolona Kinetex F5 150 mm x 4,6 mm x 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA)
  - Pumpa Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (USA)
- TRACE<sup>TM</sup> 1300 Gas Chromatograph, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - AI 1310 Autosampler, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - Detektor FID, Thermo Fischer Scientific (USA)
  - Kolona Zebron ZB-FAME, 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,20  $\mu$ m, Phenomenex (USA)

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

#### 4.2.1 Chemikálie použité pro extrakci a přípravu lipozomů

- Destilovaná voda
- Hexan, Lach-Ner (ČR)
- Chloroform pro HPLC, Lach-Ner (ČR)
- Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 $\beta$ -olu –Serva (SRN)
- Lecithin from soy bean –Serva (SRN)

#### 4.2.2 Chemikálie použité pro spektrofotometrická stanovení

- ABTS, Sigma-Aldrich (DE)
- Ethanol pro UV/VIS 99%, Lach-Ner (ČR)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DE)

- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)
- Uhličitan sodný, Lach-Ner (ČR)

#### 4.2.3 Chemikálie použité pro transesterifikaci a GC a HPLC analýzu

- Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
- Chloroform pro HPLC, Lach-Ner (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina trifluoroctová, Merck (DE)
- Milli-Q voda
- Transesterifikační směs – 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v MeOH (p.a.), 0,5 mg/ml C17 interní standard

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

#### 4.2.4 Chemikálie použité pro kultivace mikroorganismů

- BHI medium, Himedia (India)
- LB medium, Sigma-Aldrich (DE)
- Nutrient Broth (NB), Himedia (India)

#### 4.2.5 Chemikálie použité pro kultivaci buněčných linií a *in vitro* testy

- Antibiotic-Antomycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- DMEM medium, Sigma-Aldrich (UK)
- Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
- FBS fetální bovinní sérum, HyClone (USA)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- MEM medium, Sigma-Aldrich (UK)
- MTT, Duchefa Biochemie (NL)
- NEAA (non-essential amino acids, Thermo Fischer Scientific (USA)
- Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)

### 4.3 Seznam použitých mikroorganismů

Kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v brně:

- *Escherichia coli*, CCM 3954
- *Micrococcus luteus*, CCM 1569
- *Serratia marcescens*, CCM 8587
- *Staphylococcus epidermidis*, CC 4418

### 4.4 Seznam použitých sójových produktů

- Miso, Country Life (ČR)
- Natto, Sunfood (ČR)
- Tempeh Bio, Sunfood (ČR)
- Tofu, Sunfood (ČR)
- Sójové boby, země původu Kanda, GMO negativní, Zdraví z přírody (ČR)
- Sójové kostky, Natural Jihlava (ČR)
- Sójová mouka hladká, Natural Jihlava (ČR)

## 4.5 Buněčné linie

V experimentální části byly použity dvě stabilní buněčné linie – buněčná linie kolorektálního adenokarcinomu CaCo-2 a myšního melanomu B16-F1. Jejich stručnou charakteristiku lze vidět v Tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika použitých buněčných linií

b. linie	morfologie	adheze	tumorigenní	původ
CaCo-2	epiteliální	ano	ano	muž, 72 let, kavkazská popul.
B16-F1	epiteliální, vřetenovité	ano	ano	<i>mus musculus</i>

## 4.6 Příprava extraktů

Ze sójových produktů uvedených v kapitole 4.4 byly následně připraveny dva druhy extraktů, vodné a olejové, které byly dále charakterizovány.

### 4.6.1 Extrakce vodných vzorků

Pro přípravu vodných extraktů byl do plastové zkumavky s víčkem navážen 1 g jednotlivých sójových produktů, které byly předtím mechanicky rozmělněny v tloučku pro efektivnější extrakci aktivních látek do vody. K danému množství bylo přidáno 10 ml destilované vody a obsah každé zkumavky byl 30 s vortexován na maximální intenzitě. Po 24 hodinách louhování byly vzorky stočeny po dobu 10 minut při otáčkách 12 000 rcf. Nakonec byly z každého vzorku odebrány 3 ml a s touto částí dále pracováno, přičemž aktuálně nepotřebný zbývající objem byl vždy uschován při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další použití.

### 4.6.2 Extrakce olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm

Oleje ze sójových produktů byly připraveny hexanovou extrakcí pomocí přístroje Soxtherm. Pro extrakci bylo naváženo 10 g každého produktu do celulózové extrakční patrony s kulatým dnem a navážka v ní byla utěsněna vatou. Takto byla patrona dále umístěna do skleněné extrakční baňky přístroje, na jejíž dno byl přidán varný kamínek, a vata byla přelita 100 ml hexanu. To celé bylo vsunuto do držáku přístroje a v příslušném softwaru přístroje byl spuštěn program pro extrakci (viz Tabulka 2). Po skončení programu byl olej se zbytky hexanu přelit do předem zvážené odpařovací baňky a zbývající hexan poté odpařen pomocí vakuové rotační odparky. Poté byla baňka s olejem ještě přes noc ponechána v exikátoru. Druhý den byly oleje zváženy a uskladněny při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabulka 2: Nastavení programu přístroje Soxtherm pro extrakci olejů pomocí hexanu

Parametr programu	Hodnota
T-Klasifikace	200 °C
Extrakční teplota	170 °C
Redukční interval	3 min 3 s
Redukční puls	3 s
Horká extrakce	1 h 30 min
Evaporace A	5x interval
Extrakční čas	1 h
Evaporace B	2x interval
Evaporace C	10 min
Délka programu	3 h 4 min

## 4.7 Spektrofotometrické metody pro charakterizaci extraktů

Pro všechny získané extrakty byla provedena základní charakterizace. U jednotlivých extraktů byla pomocí spektrofotometrických metod stanovena koncentrace celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivita.

### 4.7.1 Stanovení celkových fenolických látek

Do zkumavky byl postupně pipetován 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml vody a 50  $\mu$ l vzorku. Obsah zkumavky byl promíchán pomocí vortexu a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , vzorek znovu promíchán a 15 minut inkubován. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Všechny reakce byly připraveny v triplicátu. Blank byl připraven obdobným způsobem, pouze místo vzorku byla přidána voda. Jako standard pro získání kalibrační závislosti byla použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml.

### 4.7.2 Stanovení flavonoidů

Do zkumavky bylo napipetováno 1,5 ml vody, 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného a 0,5 ml vzorku. Takto připravená směs byla promíchána na vortexu, a po 5 minutách byl přidán 10% roztok chloridu hlinitého. Obsah zkumavky byl opět promíchán a inkubován 5 minut. Následně bylo do zkumavek přidáno 1,5 ml 5% roztoku hydroxidu sodného a 1 ml vody. Naposledy byly vzorky promíchány, a po 15 minutách byla změřena absorbance při 510 nm. Všechny reakce byly připraveny v triplicátu. Blank obsahoval místo vzorku vodu. Jako standard pro získání kalibrační závislosti byl použit katechin v koncentračním rozmezí od 0,05 do 0,30 mg/ml.

### 4.7.3 Stanovení antioxidační aktivity

Základem použité metody ABTS pro stanovení antioxidační aktivity vzorků je generování radikálového kationtu  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a je měřena relativní zhášecí schopnost antioxidantů ve srovnání s kyselinou 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou (Trolox).

Smícháním 7 mM roztoku ABTS s 2,45 mM roztokem peroxosíranu draselného a 12hodinovou inkubací ve tmě byl nejdříve připraven roztok radikálového kationtu  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

Před měřením absorbance pro dané vzorky byl tento roztok ještě naředěn ethanolem pro UV/VIS metody na absorbanci  $0,70 \pm 0,02$  při vlnové délce 734 nm proti ethanolu.

Pro stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů byl do zúžené kyvety pipetován 1 ml roztoku ABTS<sup>•+</sup>, ke kterému bylo přidáno 10  $\mu$ l vzorku. V 10. minutě byla změřena absorbance při vlnové délce 734 nm. Jako blank byl použit 1 ml roztoku ABTS<sup>•+</sup> buď s 10  $\mu$ l destilované vody pro vodné extrakty nebo 10  $\mu$ l UV-VIS ethanolu pro vzorky olejů. Jako standard pro získání kalibrační závislosti byl použit roztok Troloxu v koncentračním rozmezí od 50 do 400  $\mu$ g/ml.

## 4.8 Kultivace mikroorganismů

Pro splnění dalšího cíle diplomové práce bylo využito celkově čtyř bakteriálních mikroorganismů, jmenovitě *Micrococcus luteus* (G+), *Serratia marcescens* (G-), *Escherichia coli* (G-) a *Staphylococcus epidermidis* (G+). Kultivace probíhala ve vhodně zvoleném médiu (viz Tabulka 3). Do 50 ml sterilního média v Erlenmeyerově baňce byla naočkována kultura pomocí kličky stěrem z pevného média, případně odebráním 1 ml inokula z tekutého média. Kultivace dále probíhala 24 hodin v inkubačním boxu s třepáním při teplotě 37 °C, poté byly mikroorganismy přeočkovány a využity.

Tabulka 3: Přehled médií použitých pro kultivaci daných mikroorganismů

Bakterie	Médium	Navážka média na 100 ml [g]
<i>Escherichia coli</i>	LB medium	20
<i>Micrococcus luteus</i>	NB medium	25
<i>Serratia marcescens</i>	NB medium	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI medium	37

## 4.9 Antimikrobiální testy

U všech získaných vodných a olejových extraktů byl otestován antimikrobiální účinek na dříve zmíněných bakteriích. Účinek byl určen pomocí bujónové diluční metody s využitím 96 jamkových destiček.

### 4.9.1 Bujónová diluční metoda

Jako první byla připravená kultura pro účely testu vhodně naředěna. Z připravené bakteriální kultury po 24hodinové inkubaci byl 1 ml přepipetován do 50 ml nového sterilního média. Naředěná kultura byla následně pipetována po 150  $\mu$ l na jamku do 96 jamkové destičky. K tomuto množství bylo poté jednotlivě přidáno 50  $\mu$ l vzorku. jako blank byla místo vzorku pipetována voda. Dále byla změřena absorbance pomocí ELISA readeru při 630 nm. Následná inkubace probíhala 24 hodin v inkubačním boxu. Nakonec byla opět změřena absorbance při stejné vlnové délce (t=24 hod).

## 4.10 Chromatografické metody

Pomocí chromatografie bylo stanoveno jak procentuální zastoupení jednotlivých skupin MK, tak obsah isoflavonů genisteinu a daidzeinu, které jsou v sóji hojně obsaženy (viz kapitoly 1.1.6 a 1.1.3).

#### 4.10.1 Transesterifikace a stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých skupin MK pomocí plynové chromatografie (GC)

Olejové vzorky byly připraveny na transesterifikaci tak, že čisté oleje s dokonale odpařeným rozpouštědlem byly zváženy a rozpuštěny v HPLC chloroformu tak, aby se jejich hmotnostní koncentrace pohybovala v rozmezí 5–12 mg/ml. Do krimpovací vialky byl napipetován 1 ml takto rozpuštěného vzorku a k tomu bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi již předem připravené z 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v methanolu HPLC kvality a 0,5 mg/ml interního standardu kyseliny heptadekanové (C17:0). Připravené vzorky byly zakrimповány, promíchány a inkubovány v termobloku po dobu 3 hodin při teplotě 90 °C. Po ukončení inkubace byly vialky ponechány na pokojové teplotě k pozvolnému vychladnutí. Do dalších vialek o objemu 5 ml bylo napipetováno 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH a k tomu byl přidán celý obsah vialek po transesterifikaci. Směs byla uzavřena a intenzivně protřepávána. Po dokonalém oddělení fází bylo ze spodní chloroformové fáze s methylestery MK 0,5 ml, a to převedeno do čisté vialky se závitkem pro GC. Objem je nakonec doplněn 0,5 ml chloroformu a analyzován pomocí GC. Chromatografická analýza probíhala na kapilární koloně Zebron ZB-FAME. Analyty byly detekovány pomocí plamenově ionizačního detektoru. Podmínky chromatografické analýzy jsou vypsány v Tabulce 4 a Tabulce 5.

Tabulka 4: Teplotní program chromatografické analýzy

Retenční čas [min]	Gradient teploty [°C/min]	Cílová teplota [°C]	Čas zdržení teploty [min]
0,0	-	-	-
1,0	0	80	1
5,0	15	140	0
21,7	3	190	0
25,5	25	260	1
25,5	STOP	-	-

Tabulka 5: Technické parametry chromatografické analýzy

<b>Kapilární kolona</b>	Zebron ZB-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm
<b>Dávkování</b>	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
<b>Objem nástřiku vzorku</b>	1 µl
<b>Poměr nástřiku děliče toku</b>	10
<b>Konstantní průtok nosného plynu H<sub>2</sub></b>	1 ml/min
<b>Detektor</b>	Plamenově ionizační
<b>Teplota</b>	250 °C
<b>Průtok</b>	Vzduch 350 ml/min, make-up N <sub>2</sub> 30 ml/min, H <sub>2</sub> 35 ml/min

#### 4.10.2 Stanovení obsahu isoflavonů genisteinu a daidzeinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vodné extrakty byly pro provedení HPLC analýzy připraveny naředěním 2x a 5x pomocí methanolu HPLC kvality. Takto připravené vzorky byly ještě přefiltrovány pomocí nylonového filtru. Následně byly analyzovány pomocí metody HPLC.

Olejové vzorky byly zváženy a participovány ve směsi methanolu s hexanem (1:1). Dále byly intenzivně promíchány, a poté centrifugovány 1 minutu při otáčkách 1 000 rcf. Po rozdělní fázi byl ze spodní methanolové fáze odebrán vzorek, který byl 5x a 10x zředěn methanolem. Poté byly naředěné vzorky přetaženy přes PTFE filtr, a nakonec nastříknuty na kolonu a analyzovány pomocí metody HPLC.

Složení mobilní fáze (MF) v průběhu analýzy a technické parametry jsou uvedeny v Tabulce 6 a Tabulce 7.

Tabulka 6: Technické parametry HPLC analýzy

<b>Kolona</b>	Kinetex F5, 150 mm x 4,6 mm x 2,6 mm
<b>Termostat</b>	35 °C
<b>Autosampler</b>	35 °C
<b>Průtok MF</b>	0,4 ml/min
<b>Objem nástřiku vzorku</b>	20 µl
<b>MF A</b>	0,1% kyselina trifluoroctová v Milli-Q vodě
<b>MF B</b>	acetonitril
<b>Detekce</b>	PDA 260, 280, 300 nm
<b>Doba analýzy</b>	30 min



Tabulka 7: Složení mobilní fáze (metoda pro stanovení fenolických látek)

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	90	10
1	90	10
5	88	12
10	75	25
15	60	40
20	45	55
22	30	70
30	90	10

#### 4.11 Příprava lipozomů metodou sonikace

Vybrané vodné i olejové extrakty byly enkapsulovány do lipozomů především za účelem lepšího prostupování k buňkám při stanovení cytotoxického účinku.

Pro přípravu lipozomů s vodnými vzorky byl nejprve připraven zásobní roztok lecitinu a cholesterolu v chloroformu. Ze zásobního roztoku lecitinu bylo do 2 ml zkumavky odpipetováno množství odpovídající 90 mg lecitinu, a ze zásobního roztoku cholesterolu množství odpovídající 10 mg cholesterolu. K tomu bylo přidáno 20  $\mu$ l oleje a 1 ml chloroformu. Obsah této zkumavky byl vylit do kádinky s 10 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl sonikován pomocí tyčového ultrazvuku po dobu 4krát 15 s a chlazen vodou. Po sonikaci byla kádinka položena na magnetickou míchačku s ohřevem na 40 °C za účelem odpaření chloroformu.

Pro přípravu lipozomů s enkapsulovanými vodnými vzorky (z 30  $\mu$ l extraktu) bylo naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu pomocí analytických vah do 2 ml zkumavky. Navážené množství bylo nejdříve rozpuštěno v menším množství destilované vody s pomocí vortexu. Poté bylo kvantitativně převedeno do kádinky s 8 ml vodného extraktu a celkový objem destilované vody byl doplněn na 10 ml.

#### 4.12 Charakterizace lipozomů

##### 4.12.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Část lipozomální suspenze byla odebrána do 1,5 ml zkumavky a centrifugována 1 hodinu při otáčkách 14 000 rcf. Ze supernatantu bylo odebráno množství potřebné pro stanovení celkových fenolických látek. Enkapsulační účinnost byla stanovena jako procentuální podíl koncentrace fenolických látek enkapsulovaných do lipozomů k celkové koncentraci fenolických látek v původním extraktu.

##### 4.12.2 Stanovení dlouhodobé stability

Po 30 dnech bylo z roztoku vodných i olejových lipozomů do zkumavky odebrána část objemu a stočena v centrifuze na 1 hodinu při otáčkách 14 000 rcf. Supernatant byl slit a zbytek byl ponechán přes noc v sušárně při teplotě 70°C. Lipozomální film byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a bylo odebráno množství potřebné pro spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek (obdobný postup jako v kapitole 4.7.1).

### **4.12.3 Stanovení velikosti lipozomů pomocí principu dynamického rozptylu světla a stanovení jejich stability**

Všechny vzorky lipozomů byly vhodně zředěny destilovanou vodou a byla proměřena jejich velikost a koloidní stabilita pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS.

### **4.12.4 Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartovy metody**

Pro stanovení koncentrace fosfolipidů, které při testu cytotoxicity působí na buněčné linie, byla použita Stewartova metoda [205]. Nejdříve bylo připraveno činidlo rozpuštěním 2,7 g hexahydrátu chloridu železitého a 3,05 g thiokyanátu amonného ve 100 ml destilované vody. Do 15 ml centrifugačních zkumavek bylo jednotlivě napipetováno 50  $\mu$ l každé lipozomální suspenze, 450  $\mu$ l destilované vody, 2 ml roztoku činidla a 3 ml chloroformu. Následně byl vzorek vortexován po dobu 20 s. Poté byly vzorky centrifugovány 5 minut při otáčkách 1 000 ref. Takto připravené vzorky byly měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Obsah fosfolipidů byl vypočítán pomocí kalibrační závislosti pro sójový lecitin.

## **4.13 Kultivace buněčných kultur**

Práce s buněčnými kulturami a jejich kultivace jsou specifické svými vysokými nároky. Žádají si preciznost, určitou zkušenost pracovníků a sterilitu veškerého laboratorního vybavení i laboratoře. Buněčné kultury mají řadu využití a ve výzkumu slouží především jako zdroj biologického materiálu pro experimenty.

Jednotlivé buněčné linie (pro účely této diplomové práce jmenovitě CaCo-2 a B16-F1) byly kultivovány ve sterilním inkubačním boxu při teplotě 37 °C, obsahu CO<sub>2</sub> 5 % a relativní vlhkosti 90 %. Jako kultivační médium pro B16-F1 bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium obohacené 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % antibiotik (ATB). Pro buněčnou linii CaCo-2 bylo použito médium Minimum Essential Medium Eagle (MEM) obohacené kromě stejného množství FBS a ATB také 1 % neesenciálních AMK. Média byla uchovávána při 4 °C v lednici, přičemž před vlastní prací bylo třeba je ohřát na laboratorní teplotu. Každý den je nutné buněčné kultury kontrolovat pod mikroskopem, sledovat jejich růst, morfologii, barvu média a případné kontaminace. Podle výsledného nárůstu buněk byl vždy zvolen další postup.

### **4.13.1 Výměna živného média**

Při změně barvy média z červené na oranžovou bylo třeba ho vyměnit. Z kultivační lahvičky bylo médium vždy slito do odpadní nádoby, přičemž buňky, díky svému adherentnímu růstu, zůstaly v souvislé vrstvě na speciálně upraveném povrchu kultivační lahve. Serologickou pipetou byl v závislosti na velikosti kultivační lahve nadávkován objem nového média o pokojové teplotě dle velikosti lahve. Médium bylo měněno průměrně asi dvakrát za týden.

### **4.13.2 Pasážování buněk**

Pasážování buněk je důležitou součástí starosti o buněčné kultury. Při jejich každodenní kontrole bylo třeba také posuzovat míru konfluency, což vyjadřuje procento plochy porostlé souvislou vrstvou buněk. Při konfluenci 70-80 % je ideální buňky tzv. „zpasážovat“, což znamená za použití proteázy trypsinu enzymaticky narušit vazby mezi buňkami a povrchem

kultivační lahve i mezi buňkami navzájem a jejich vhodné nařazení do kultivačních nádob s čerstvým médiem.

Pasáž začínala vylitím starého média do odpadní nádoby stejně jako při běžné výměně média, další postup byl ovšem již odlišný. Nejméně dvakrát byla lahev propláchnuta PBS pufrem, aby byly odstraněny vápenaté ionty. Jako další krok následovalo napipetování trypsinu (0,5 ml menší lahev, 1 ml větší lahev), se kterým byly buňky inkubovány 10 minut při 37 °C v inkubačním boxu. Po 10 minutách bylo zkontrolováno pod mikroskopem, zda byly vazby přerušeny a zda buňky „plavou“ v médiu. Pokud nebyly všechny buňky ode dna odloučeny, bylo v této fázi možné pomoci si opatrným ale důrazným úderem na kultivační láhev z boku. Po tomto kroku byly již všechny buňky ode dna většinou odloučeny, pokud tomu tak ale nebylo, další možností bylo ještě použití speciální sterilní škrabky na buňky. Následně byla lahvička důsledně opláchnuta 5 ml PBS a celý její obsah vylit do centrifugační zkumavky. Suspenze buněk byla centrifugována 5 minut při otáčkách 320-360 rcf při teplotě 25 °C. Po stočení byl slit supernatant a pelet rozsuspendován v 1 ml média a posléze doplněn do požadovaného objemu, který byl rozpipetován do jednotlivých nových kultivačních lahví s předpřipraveným novým médiem. Na závěr byly buněčné kultury opět zkontrolovány pod mikroskopem a vloženy do vhodných podmínek inkubačního boxu.

#### **4.14 Stanovení růstové křivky buněčných linií**

Postup stanovení růstové křivky buněčných linií byl ze začátku totožný s postupem pasáže popsaným v předchozí kapitole (4.13.2). Po centrifugaci, slítí supernatantu a rozsuspendování buněčného peletu v médiu byla pomocí Bürkerovy komůrky určena koncentrace buněk. Dle jejich počtu byla suspenze vhodně naředěna médiem a rozpipetována do 6 jamkové destičky po 2 ml. Po každých 24 hodinách byl spočítán počet živých buněk v jediné jamce destičky. Po každém počítání byla destička vrácena do inkubačního boxu. Ze zjištěného počtu buněk v jamkách byla sestavena růstová křivka používaných kultur. Růstová křivka se používá především pro stanovení časového plánu experimentu (zde konkrétně MTT testu). Započít experiment se doporučuje v tzv. log fázi růstové křivky, tedy ve fázi, kdy počet buněk exponenciálně roste, buňky pro svůj metabolismus využívají všechny živiny a jsou vhodnými objekty právě pro testování.

#### **4.15 Stanovení cytotoxického účinku vybraných extraktů**

Cytotoxický účinek vybraných vodných extraktů i olejů enkapsulovaných v lipozomech byl sledován pomocí MTT testu cytotoxicity [206].

Počáteční postup prvního dne MTT testu byl obdobný jako při pasáži buněk (viz kapitola 4.13.2). Po centrifugaci, slítí supernatantu a rozsuspendování buněčného peletu v 1 ml média, byla stanovena koncentrace buněk v suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky barvením trypanovou modří. Vhodně naředěná suspenze ( $2-5 \cdot 10^5$  buněk na ml) byla pipetována do 96 jamkových destiček po 100  $\mu$ l. Destičky byly inkubovány 24 hodin v inkubačním boxu při teplotě 37 °C za účelem adheze buněk k povrchu jamek.

Na začátku druhého dne byly s časovým předstihem vzorky centrifugovány 5 minut při 10 000 rcf. Ze supernatantu bylo odebráno 0,5 ml a zředěno sterilní vodou 1:1. Toto množství bylo přefiltrováno přes sterilní filtr a byla vytvořena koncentrační řada každého

vzorku od 2 do 14 % pomocí ředění s kultivačním médiem v různém poměru. Byly připraveny také kontroly: „cell control“ – kontrola obsahující pouze kultivační médium (100% viabilita); ethanol ředěný kultivačním médiem v poměru 2:3 (0% viabilita); „vehicle control“ (kontrola rozpouštědla) – obsah maximálního množství vody, které bylo použito při ředění vzorků, ředěno kultivačním médiem v poměru 7:18.

Dále bylo multikanálovou pipetou z každé jamky odpipetováno maximální množství média. Poté bylo do jednotlivých jamek ve stanoveném pořadí přidáno 100  $\mu$ l médiem předem naředěných vzorků o různých koncentracích, případně stejný objem příslušné kontroly. Destičky byly vráceny do inkubačního boxu ke 24hodinové inkubaci.

Třetí den byl ze všech jamek odpipetován maximální objem a do každé pak přidáno 20  $\mu$ l sterilního MTT s výslednou koncentrací 2,5 mg/ml rozpuštěného v PBS pufru. Destičky byly vloženy zpět do inkubačního boxu a inkubovány 3 hodiny. Po uplynutí této doby bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu$ l 10 % SDS v PBS pufru pro rozpuštění tmavě fialových krystalků formazanu. Následně byly destičky uloženy do tmy na nejméně 24 hodin.

Stanovení absorbance v jednotlivých jamkách bylo poté provedeno pomocí ELISA readeru měřením při vlnové délce 562 nm.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

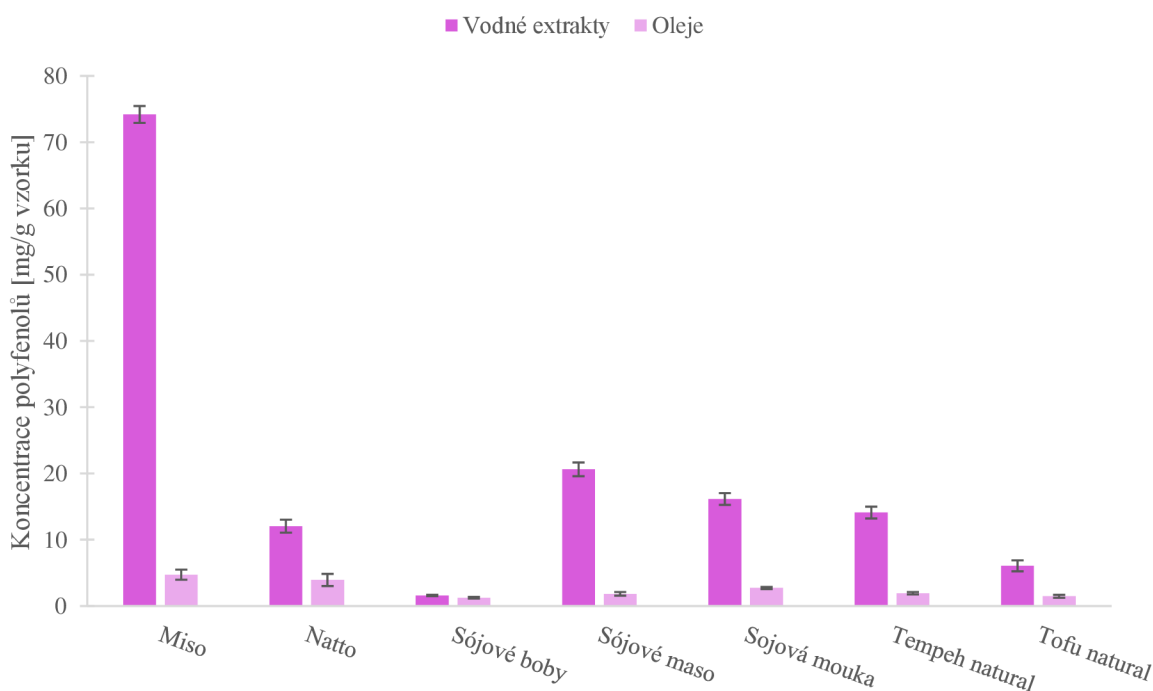
Tato práce se zabývala screeningem a charakterizací vybraných typů obsahových látek ve vodných extraktech a olejích ze sóji a sójových produktů. U všech vzorků byl stanoven antioxidační účinek a u vybraných extraktů enkapsulovaných v lipozomech byl dále zjištěn i jejich antimikrobiální účinek. Stejně vodné extrakty a oleje byly potom v lipozomech aplikovány na buněčné linie CaCo-2 a B16-F1 a byl *in vitro* určen jejich cytotoxický účinek.

### 5 Charakterizace aktivních látek v extraktech ze sóji a sójových produktů

#### 5.1 Stanovení obsahu celkových fenolických látek a flavonoidů v extraktech

Zjištěný obsah fenolických látek vyjádřený jako hmotnost obsažených fenolických látek na 1 g navážené potraviny, z níž byla provedena daná extrakce, pro jednotlivé vodné extrakty a oleje je zobrazen na Obrázku 7. Nejvyšší množství fenolických látek obsahoval vodný extrakt miso pasty ( $74,18 \pm 1,28$  mg/g). Koncentrace fenolických látek ve všech ostatních vzorcích se pohyboval od  $1,24 \pm 0,13$  mg/g do  $20,63 \pm 1,04$  mg/g. Pro výpočet obsahu fenolických látek byla použita získaná kalibrační závislost  $y = 1,5934x$ .

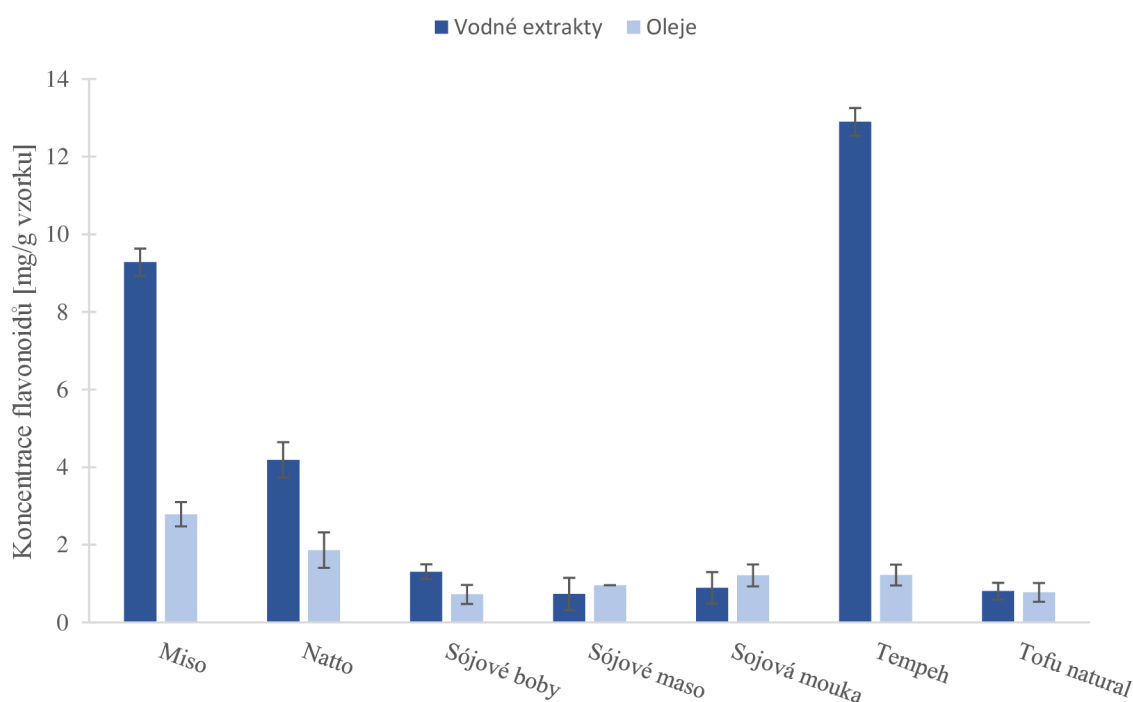
Nízká množství fenolických látek (především u extraktů sójových bobů) mohou být dána nízkou účinností extrakce, což by mohlo souviset s nedostatečnou homogenizací vzorku či použitým typem extrahovadla. Fenolické látky jsou často nejlépe rozpustitelné v organických rozpouštědlech méně polárních než voda, především alkoholech [207]. Bylo by tedy v rámci další práce vhodné optimalizovat extrakci těchto látek pro jejich vyšší výtěžnost.



Obrázek 7: Obsah fenolických látek v olejích a vodných extraktech

Flavonoidy (včetně isoflavonů) jsou podskupinou fenolických látek [208], do které spadají i sójové isoflavony genistein a daidzein. Sloupcový graf vyjadřující obsah flavonoidů v extraktech lze vidět na Obrázku 8. Největší množství flavonoidů obsahoval vodný extrakt tempehu ( $12,90 \pm 0,36$  mg/g) a miso pasty ( $9,28 \pm 0,36$  mg/g). Koncentrace flavonoidů u ostatní extraktů se pohybovala od  $0,72 \pm 0,24$  mg/g do  $4,19 \pm 0,46$  mg/g. Pro stanovení obsahu flavonoidů v jednotlivých extraktech byla použita získaná kalibrační závislost  $y = 3,8259x$ .

U vodného extraktu tempehu je zajímavé, že dle tohoto spektrofotometrického stanovení spadá přes 90 % jeho fenolických látek do skupiny flavonoidů, což může značit vysoký obsah fytoestrogenů. Ty jsou pro mnoho odborníků i laiků kontroverzní, přičemž tempeh je ale obecně považován za jednu z nejzdravějších forem sójových potravin [209].



Obrázek 8: Obsah flavonoidů v olejích a vodných extraktech

## 5.2 HPLC analýza pro stanovení obsahu isoflavonů genisteinu a daidzein

Na základě výsledků spektrofotometrických stanovení obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity (výsledky budou zmíněny dále) jednotlivých extraktů, bylo dále pracováno pouze se vzorky miso pasty, natto, sójového masa a tempehu. Tento postup neplatil pouze pro GC analýzu spektra mastných kyselin, která byla provedena u všech získaných olejů.

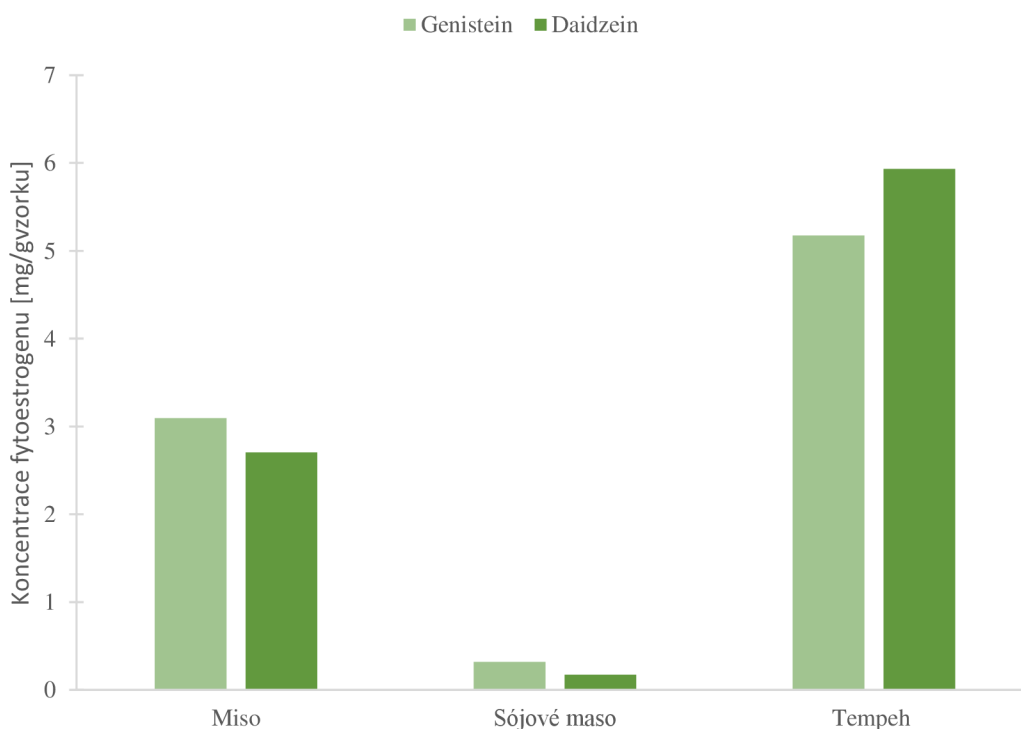
Kvůli poznatků z vypracované rešerše (1.1.3) byly stanovovány isoflavony genistein a daidzein i v našich vzorcích za účelem dání do souvislosti obsahu těchto biologicky aktivních látek s výsledky stanovení antioxidační aktivity, antimikrobiálních testů a testů cytotoxického účinku. V grafickém zobrazení výsledků HPLC analýzy (Obrázek 9) lze vidět, že se podařilo naměřit obsah genisteinu a daidzeinu pouze ve třech vodných extraktech z celkových osmi vzorků (vodné extrakty a oleje z miso pasty, natto, sójového masa a tempehu). Nejvyšší obsah genisteinu ( $5,17$  mg/g vzorku) i daidzeinu ( $5,93$  mg/g vzorku) byl detekován ve vodném extraktu tempehu, což s ohledem na rozdílné postupy a pravděpodobně nedostatečnou

homogenizací vzorku před extrakcí relativně odpovídá i publikovaným studiím [210]. Celkově se tedy obsah genisteinu pohyboval v rozmezí od 0,32 mg/g do 5,17 mg/g a obsah daidzeinu v rozmezí od 0,17 mg/g do 5,93 mg/g.

Vodný extrakt natto byl ředěn jako ostatní vodné vzorky nejdříve 2x, a poté 5x. Kvůli jeho táhlé konzistenci však nebylo možné tento extrakt přetáhnout přes filtr, proto byl dále ředěn 10x, což pravděpodobně způsobilo ztrátu isoflavonů a nebylo proto možné je detekovat.

Obsah isoflavonů se vůbec nepodařilo naměřit v olejích, přičemž tato skutečnost může mít několik důvodů. Jak bylo již zmíněno, polární prostředí je pro extrakci fenolických látek vhodnější, přičemž při extrakci olejů pomocí přístroje Soxtherm byl použit nepolární hexan. Pro další práci by tedy bylo vhodné vyzkoušet extrakci jiným způsobem, například použít místo samotného hexanu jeho směs s některým z polárních alkoholů, případně pouze polární rozpouštědlo s vodou jako bylo avizováno v již zmíněných studiích [207]. Při opětovném použití přístroje Soxtherm by bylo možné použít například aceton. Kvůli bezpečnosti se totiž alkoholová extrakce tímto přístrojem neprovádí. Další možností je opět nedostatečná homogenizace vzorků před samotnou extrakcí. Pro účely této diplomové práce byly vzorky pouze rozmělněny pomocí tloučku v keramické misce. Do budoucna by mohlo pomoci přidání písku či kuliček při rozrušování struktury vzorku, případně by bylo možné využít kuchyňský mixér či speciální laboratorní homogenizátor. Posledním důvodem může být také rozpad fenolických látek během skladování extraktů.

Kromě genisteinu a daidzeinu se ve vodných vzorcích (včetně natto) v menším množství objevil také glycitein, což je další ze sójových isoflavonů zmiňovaný již v teoretické části práce. Dalším detekovaným analytem byla také kyselina gallová, která je mimo jiné silným antioxidantem s protivirovými a antibakteriálními účinky [211].



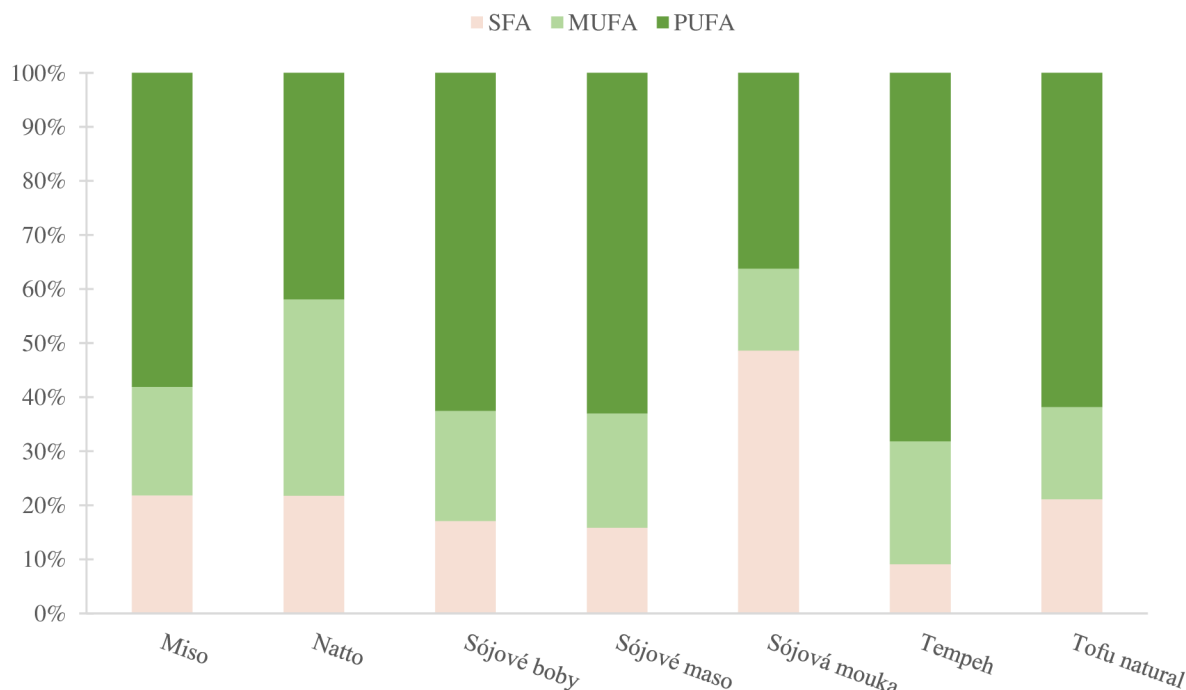
Obrázek 9: Obsah isoflavonů genisteinu a daidzeinu ve vybraných vodných extraktech stanovený HPLC analýzou

### 5.3 GC analýza pro stanovení procentuálního obsahu jednotlivých skupin mastných kyselin

GC analýzou všech získaných olejů byl zjištěn procentuální obsah jednotlivých skupin MK dle jejich saturace, tedy nasycené (SFA), mononenasyčené (MUFA) a polynenasycené MK (PUFA). Grafické znázornění výsledků analýzy lze vidět na Obrázku 10. Největší podíl u všech vzorků kromě sójové mouky zaujímaly PUFA; 41,89 % (natto) až 68,13 % (tempeh). Sójová mouka obsahovala nejvíce SFA (48,67 %), což se zčásti liší od nutričních údajů deklarovaných výrobcem (max 34 % SFA). Tento fakt může být způsoben například rozdílným postupem při extrakci tuku.

Ačkoliv se v poslední době objevovaly informace, že dělení mastných kyselin na „dobré“ a „špatné“ je již zastaralé, PUFA a MUFA jsou stále považovány za tu zdravější formu MK, jejichž příjem ve stravě by měl převládat [212]. Na základě tohoto faktu lze tvrdit, že sójové produkty s ohledem na obsah MK mohou být pro naše zdraví příznivé. Nejvyšší obsah PUFA a zároveň nejnižší obsah SFA (9,13 %) ze všech měřených vzorků u tempehu zde hovoří ve prospěch jeho pověsti zdravé sójové potraviny.

Jak bylo již referováno v rešerši (1.1.6), ačkoliv sójové potraviny mohou být také zdrojem omega-3-MK, zcela určitě v nich převládá obsah omega-6-MK. Tomu odpovídají i výsledky GC analýzy, kdy nejvíce obsažená PUFA napříč všemi vzorky, byla kyselina linolová (C18:2) spadající právě do skupiny omega-6-MK. Tyto výsledky lze tedy shrnout tak, že sójové potraviny s ohledem na složení typu MK mohou být pro naše zdraví benefitem, je ale dobré jejich konzumaci kombinovat i s jinými potravinami v pestrém jídelníčku kvůli vyváženému poměru omega-3 a omega-6 MK.



Obrázek 10: Grafické znázornění procentuálního zastoupení jednotlivých skupin MK dle stupně saturace; SFA-nasycené MK, MUFA-mononenasyčené MK; PUFA-polynenasycené MK

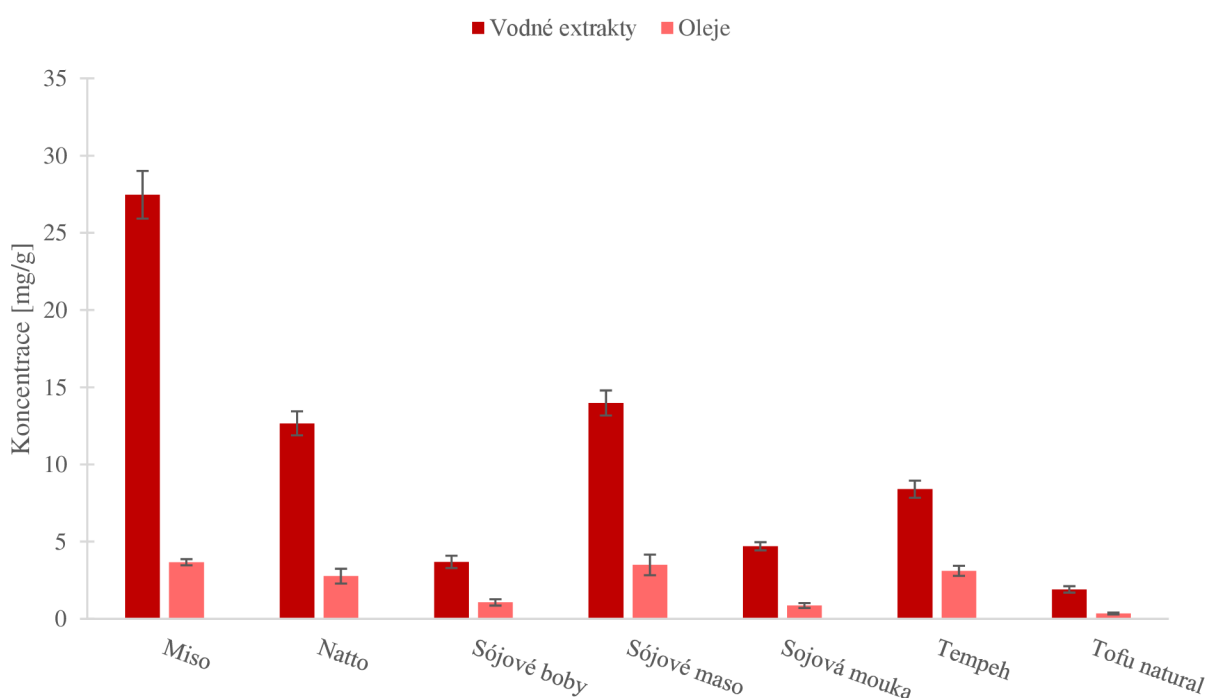


## 6 Stanovení antioxidačního a antimikrobiálního účinku jednotlivých extraktů

### 6.1 Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů

Jak bylo zmíněno v teoretické části (1.1.3), díky vysokému obsahu isoflavonů s sebou konzumace sójových bobů a sójových výrobků přináší také žádoucí antioxidační účinky. Výsledky ze stanovení antioxidační aktivity extraktů lze vidět v grafu na Obrázku 11. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vodný extrakt miso pasty ( $27,46 \pm 1,55$  mg/g), dále extrakt sójového masa ( $13,98 \pm 0,81$  mg/g), natto ( $12,66 \pm 0,78$  mg/g) a tempehu ( $8,40 \pm 0,55$  mg/g).

Antioxidační aktivita olejů byla značně nižší, což může mít ale za následek výše popsané důvody spojené s extrakcí, homogenizací vzorku či s dlouhodobějším skladováním olejů v laboratoři. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí od  $0,35 \pm 0,06$  mg/g do  $3,67 \pm 0,20$  mg/g. Pro výpočet koncentrace byla použita získaná kalibrační závislost  $y = 1,1823x$ . Ačkoliv nebyla pozorována tak vysoká antioxidační aktivita, jak byla avizována v některých výše zmíněných studiích, antioxidační aktivita jako taková prokázána rozhodně byla. Pro budoucí práci by bylo ale vhodné optimalizovat extrakci a homogenizaci vzorků, jak bylo výše navrženo, a měření opakovat.



Obrázek 11: Grafické znázornění antioxidační aktivity vodných extraktů a olejů vyjádřené jako množství zhaseného radikálového kationtu ABTS<sup>•+</sup> na g vzorku

### 6.2 Antimikrobiální účinek jednotlivých extraktů

Průkaznost antimikrobiálního účinku byla přehledně shrnuta v Tabulce 8. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě skóre užitím symbolu „+“, přičemž „+“ značí inhibiční účinek do 20 %, pro účinek v rozmezí 20-40 % je užito „++“, pro rozmezí 40-60 % „+++“ a pro účinek vyšší než 80 % „++++“. Nebyl-li pozorován žádný inhibiční účinek, je použito znaménko mínus.

Slabý inhibiční účinek na bakterii *E. coli* byl pozorován u vodného extraktu natto a velmi silný u vodného extraktu tempehu, kde byla inhibice 100 %, a oleje z tempehu, kde se inhibice pohybovala kolem 85 %. Pro oba typy extraktů z tempehu byl takový výsledek pozorován i na všechny ostatní použité mikroorganismy. Dále byl pozorován inhibiční účinek kolem 50 % vodného extraktu miso na bakterie *M. luteus* a *S. marcescens*.

Pozorovaná antimikrobiální aktivita je zřejmě důsledkem aktivních látek obsažených v sóji, které byly podrobně popsány v teoretické části práce. Jsou to převážně antioxidanty jako fenolické látky včetně fytoestrogenů a vitaminy. Tento výsledek je dalším argumentem v prospěšnosti sójových produktů, zde tedy především tempehu, což opět koresponduje s publikovanou literaturou.

Tabulka 8: Výsledky antimikrobiálního testu; MO-mikroorganismus; EC-*Escherichia coli*; ML-*Micrococcus luteus*; SM-*Serratia marcescens*; SE-*Staphylococcus epidermidis*.

MO	EC		ML		SM		SE	
	Voda	Olej	Voda	Olej	Voda	Olej	Voda	Olej
Extrakt								
Miso	–	–	+++	–	+++	–	–	–
Natto	+	–	–	–	–	–	–	–
Sójové maso	–	–	–	–	–	–	–	–
Tempeh	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++

## 7 Charakterizace připravených lipozomů

### 7.1 Velikost, stabilita a distribuce velikosti částic

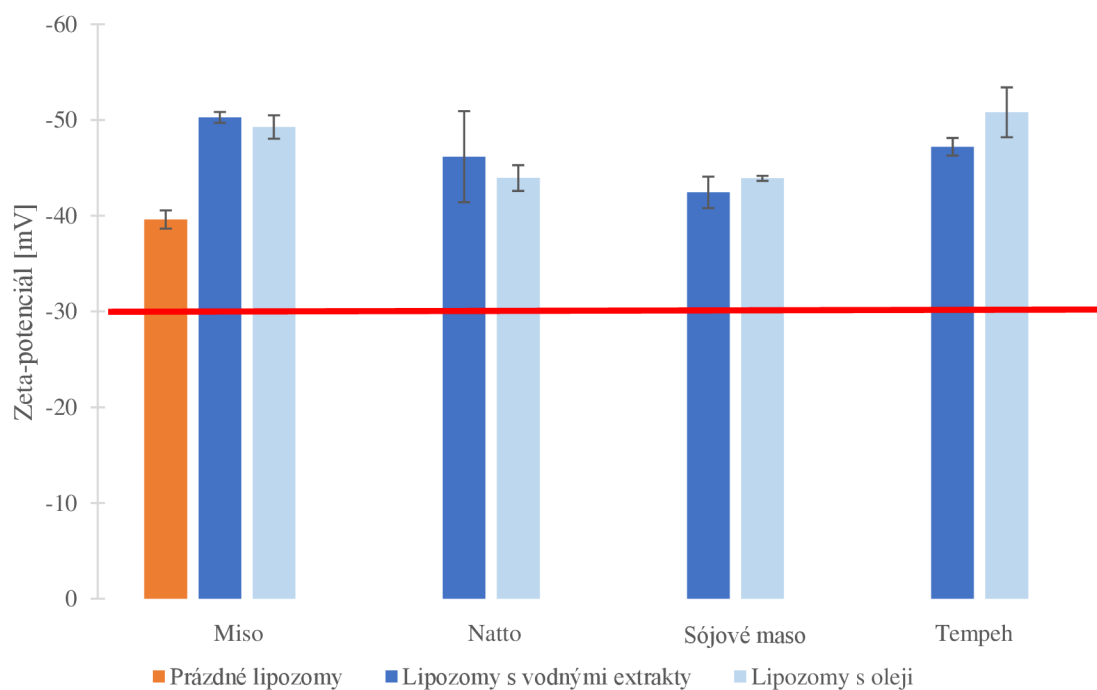
Po přípravě lipozomů bylo třeba vyhodnotit jejich kvalitu, což bylo provedeno pomocí přístroje ZetaSizer Nano. Základní charakteristiku připravených lipozomů lze vidět v Tabulce 9. Průměrná velikost lipozomů s vodnými extrakty se pohybovala od  $157,5 \pm 1,4$  nm do  $254,4 \pm 2,9$  nm. Pro lipozomy s enkapsulovanými oleji bylo toto rozmezí od  $152,5 \pm 1,6$  nm do  $280,9 \pm 3,4$  nm. Polydisperzní index se napříč částicemi pohyboval od  $0,235 \pm 0,020$  do  $0,460 \pm 0,014$ . Připravené lipozomy svým průměrem i distribucí velikosti odpovídaly požadovaným standardům.

Podle zeta-potenciálu lze vyhodnotit stabilitu lipozomů – stabilní lipozomy jsou takové, jejichž zeta-potenciál má hodnotu nižší než  $-30$  mV nebo vyšší než  $30$  mV. Odpudivé síly částic, jejichž zeta-potenciál náleží do intervalu od  $-30$  mV do  $30$  mV na sebe působí natolik nízkými odpudivými silami, že se po chvíli začnou přitahovat, a nakonec agregují, což je nežádoucí [213]. Jiné znázornění stability lipozomů s hranicí stability  $-30$  mV lze vidět v grafu na Obrázku 12. Z naměřených výsledků lze usuzovat, že všechny připravené částice byly stabilní.

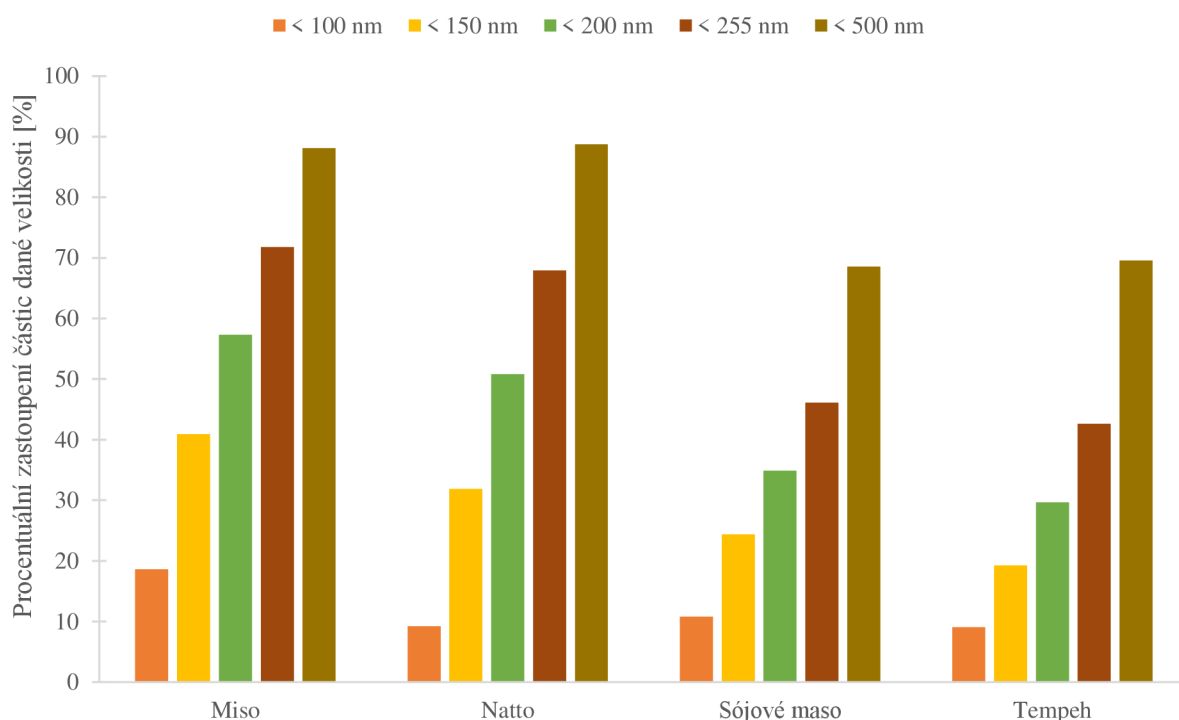
Na Obrázku 13 a Obrázku 14 lze vidět také znázornění procentuální distribuce částic v určitých velikostních rozmezích pro lipozomy s vodnými extrakty v prvním grafu a pro lipozomy s oleji v druhém grafu. Nejvyšší podíl menších částic ( $<200$  nm), které jsou brány jako lipozomy s vhodnou výslednou velikostí, byl pozorován u vodného extraktu (64,2 %) i oleje (57,3 %) miso pasty. Nejnižší podíl těchto částí byl naopak zaznamenán u vodného extraktu (29,7 %) a oleje (26,4 %) tempehu.

Tabulka 9: Vlastnosti připravených lipozomů, *d*-průměr lipozomů; *PdI*-polydisperzitní index; *ZP*-zeta-potenciál

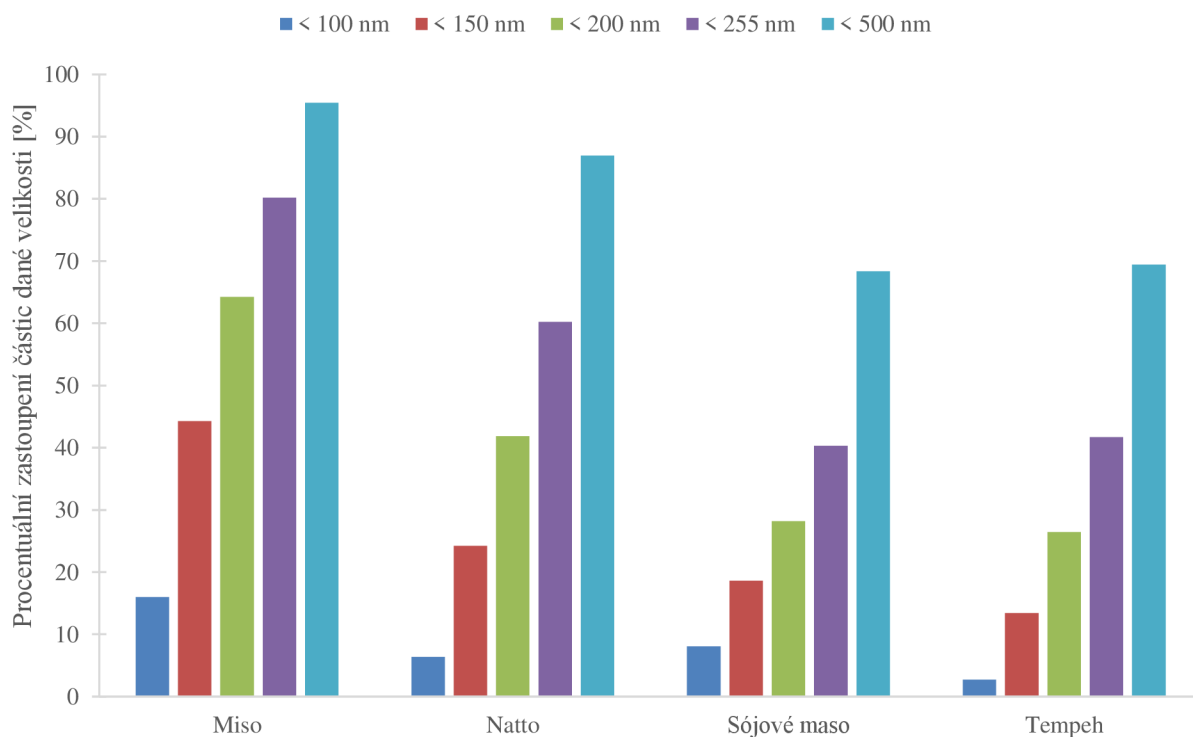
vzorek	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i> [-]	<i>ZP</i> [mV]
lipozomy prázdné	186,5 ± 2,0	0,288 ± 0,005	-39,6 ± 1,0
miso (olej)	152,5 ± 1,6	0,235 ± 0,020	-49,3 ± 1,2
tempeh (olej)	280,9 ± 3,4	0,368 ± 0,007	-50,8 ± 2,6
sójové maso (olej)	260,4 ± 3,5	0,425 ± 0,041	-43,9 ± 0,3
natto (olej)	209,7 ± 1,0	0,282 ± 0,047	-43,9 ± 1,3
miso (vodný extrakt)	157,5 ± 1,4	0,358 ± 0,008	-50,3 ± 0,6
tempeh (vodný extrakt)	254,4 ± 2,9	0,436 ± 0,003	-47,2 ± 0,9
sójové maso (vodný extrakt)	230,6 ± 1,4	0,460 ± 0,014	-42,4 ± 1,6
natto (vodný extrakt)	186,8 ± 7,2	0,311 ± 0,064	-46,2 ± 4,8



Obrázek 12: Průměrný zeta-potenciál připravených lipozomů; červenou čarou znázorněna hranice stability (nad ní jsou částice stabilní)



Obrázek 13: Procentuální zastoupení částic v určitých rozmezích velikostí (vodné extrakty)

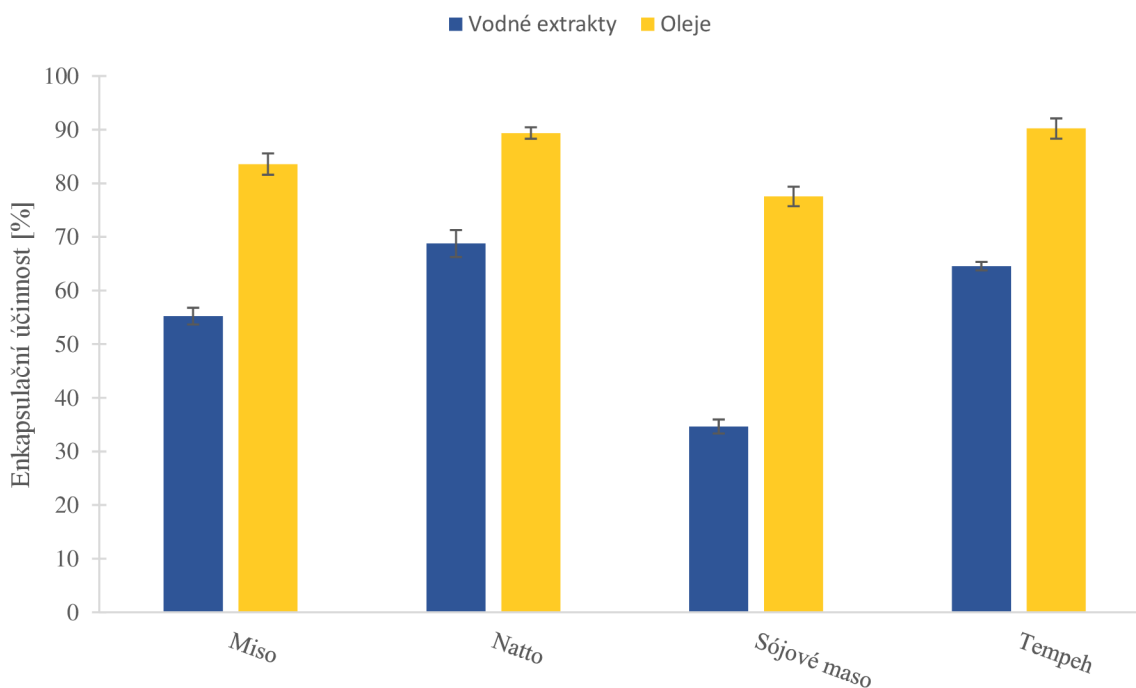


Obrázek 14: Procentuální zastoupení částic v určitých rozmezích velikostí (oleje)

## 7.2 Stanovení enkapsulační účinnosti připravených lipozomů

Enkapsulační účinnost při enkapsulaci olejových extraktů byla pro každý vzorek více než 70 %, konkrétně se pohybovala v rozmezí od  $77,54 \pm 1,82$  % (pro sójové maso)

až  $90,21 \pm 1,89 \%$  (tempeh). Pro vodné extrakty to bylo většinou více než 50 % (kromě sójového masa), žádný však nepřesáhl 70 %. Enkapsulační účinnost pro vodné extrakty se tedy pohybovala v rozmezí od  $34,65 \pm 1,82 \%$  (sójové maso) až  $68,76 \%$  (natto). Výsledný graf lze vidět na Obrázku 15. Lepší průnik olejových extraktů do lipozomů může být dán jejich hydrofobní povahou, a tím lepším průnikem do fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů.

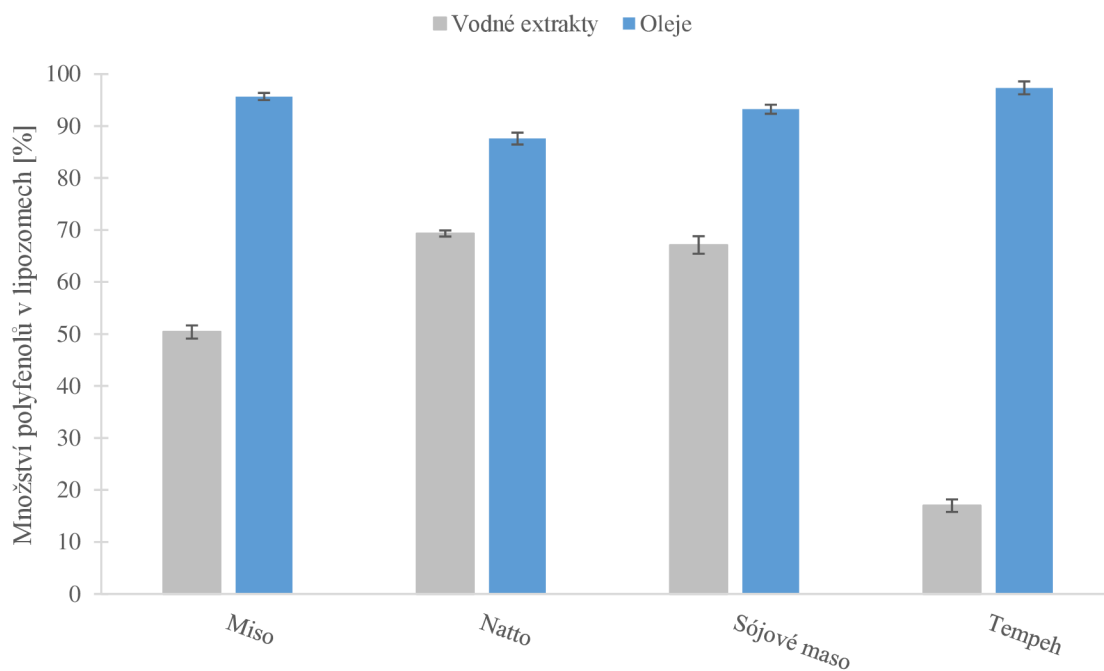


Obrázek 15: Grafické znázornění enkapsulační účinnosti pro připravené lipozomy

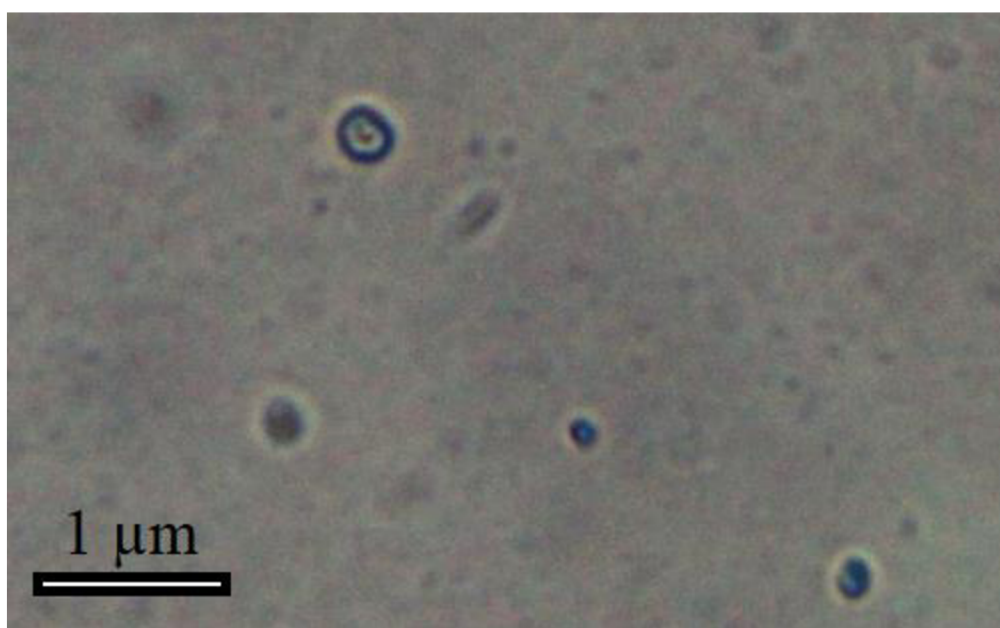
### 7.3 Stanovení dlouhodobé stability lipozomů

Další sledovanou charakteristikou lipozomů byla jejich dlouhodobá (30denní) stabilita. Na Obrázku 16 lze vidět výsledky tohoto stanovení. Ačkoliv absolutní množství aktivních látek i antioxidační aktivita byly většinou vyšší u vodných extraktů oproti olejům, z dlouhodobějšího hlediska byly lipozomy s enkapsulovanými oleji stabilnější až o cca 80 % (v případě tempehu). Zbylé množství fenolických látek v lipozomech s vodnými extrakty oproti původnímu množství kleslo na  $50,39 \pm 1,26 \%$  až  $16,98 \pm 1,20 \%$ . Zbylé množství fenolických látek v lipozomech s oleji oproti původnímu množství kleslo pouze na  $97,34 \pm 1,24 \%$  až  $87,59 \pm 1,14 \%$ . Tento rozdíl mezi lipozomy s vodnými extrakty a oleji je zřejmě opět dán jejich rozdílnou hydrofobní a hydrofilní povahou. Úbytek fenolických látek byl způsoben jejich průchodem zpět do roztoku, případně jejich degradací.

Dále na Obrázku 17 lze vidět fotografii lipozomu po přípravě, sledovaného pomocí světelného mikroskopu a zachyceného zrcadlovým fotoaparátem. V obrázku je znázorněno také měřítko odpovídající  $1 \mu\text{m}$  pro srovnání.



Obrázek 16: Grafické znázornění zůstatku enkapsulovaných fenolických látek v lipozomech po 30 dnech



Obrázek 17: Ilustrační foto připraveného lipozomu (zde konkrétně vodný extrakt tempehu) pořízené pomocí světelného mikroskopu

## 8 Stanovení cytotoxického účinku jednotlivých extraktů

MTT test cytotoxicity byl proveden na dvou buněčných liniích – CaCo-2 a B16-F1. Buněčná linie CaCo-2, ačkoliv původně derivovaná z adenokarcinomu tlustého střeva, je již dlouhou dobu hojně používána jako simulace intestinální epiteliální bariéry [214]. Buněčná linie B16-F1 oproti tomu pochází z myšího melanomu, používá se ale stejně často. Tyto buňky tvoří

melanin, proto se médium, v němž jsou kultivovány může jevit tmavěji než původní [215]. Na Obrázku 18 lze vidět barvu čerstvého média a barvu média po dvoudenní kultivaci.



Obrázek 18: Srovnání čerstvého kultivačního média a po dvou dnech kultivace

Výsledný cytotoxický účinek na linii CaCo-2 lze vidět na Obrázku 19 a Obrázku 20, kde je znázorněna také stanovená hranice míry viability 60 % [216], nad kterou účinek daného extraktu nepůsobí na buňky toxicky. Toxického účinku dosáhly lipozomy s vodnými extrakty sójového masa (od 8 % výš), natto (od 10 % výš) a miso (14 %). Z lipozomů s olejovými extrakty dosáhly cytotoxického účinku miso (14 %), tempeh (12 % a 14 %) a natto (14 %). Relativně silně toxický účinek vodného extraktu sójového masa bude pravděpodobně zapříčiněn vnějšími faktory, či nízkou senzitivitou použité metody, jelikož je nepravděpodobné, že by schválená potravinu mohla takto působit na intestinální epitel, navíc v množství mnohem nižším, než je běžně konzumováno. Bylo by tedy vhodné tento vzorek zopakovat, z časových i technických důvodů nebylo již bohužel možné uskutečnit opakování experimentu v rámci této práce.

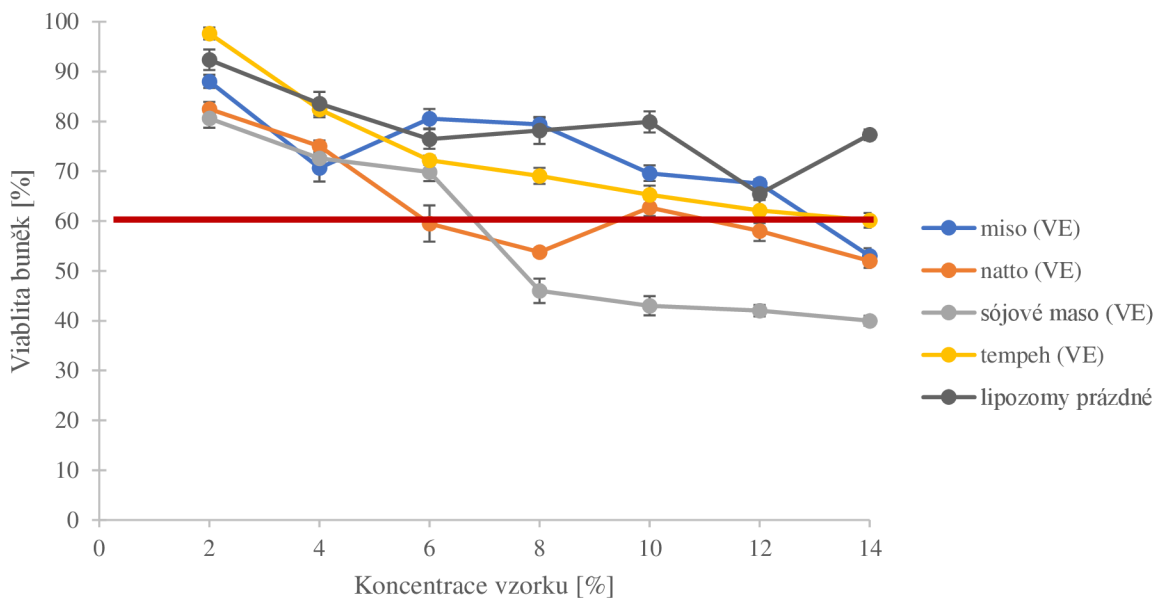
Výsledný cytotoxický účinek na linii B16-F1 lze vyčíst na Obrázku 21 a Obrázku 22, kde je opět znázorněna hranice míry viability 60 %, nad kterou účinek daného extraktu nepůsobí na buňky toxicky. Toxického účinku nedosáhl žádný extrakt v žádné aplikované koncentraci. Tato skutečnost odpovídá také tvrzením různých studií citovaných v rešerši této práce, že protinádorový účinek *in vitro* nastává až při vyšších koncentracích fytoestrogenů než lze běžně v potravě přijmout. Jako další pokračování práce by bylo zajímavé vyzkoušet i účinek vyšších koncentrací na tuto i jinou buněčnou linii, případně účinek dlouhodobějšího vystavování buněk různým hladinám fytoestrogenů.

Otázkou tedy zůstává míra senzitivity MTT testu. Ačkoliv je stále běžně používán, některé laboratoře od něj dnes již ustupují. Důvodem jsou analytické parametry jako je právě nízká senzitivita, zapříčiněna mnohými aspekty jako například možnou chemickou interferencí, jelikož je známa velká škála sloučenin interferujících při postupu, a hlavně při konečném měření absorbance. Většinou jsou to sloučeniny způsobující neenzymatickou redukci MTT na formazan jako například kyselina askorbová nebo vitamin A. Další limitací je také metoda detekce, jelikož měření absorbance je obecně mnohem méně senzitivní, než jsou metody

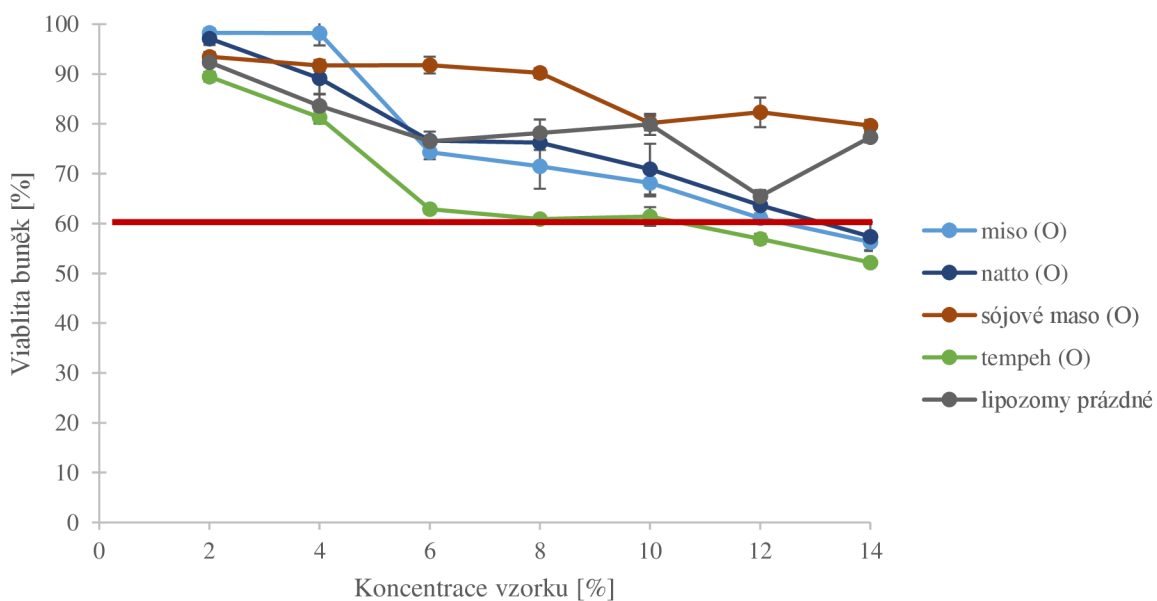
fluorescenční a luminiscenční, používané v jiných metodách detekujících počet viabilních buněk. MTT testu je také vytýkáno, že spíše než počet buněk, reflektuje metabolismus dané kultury, přičemž se v něm buňka od buňky může značně lišit, což nepříznivě ovlivňuje výsledek [217]. I přes některé nevýhody však používaná metoda zůstává užitečným a relativně nenákladným pomocníkem při stanovení cytotoxického účinku, při hodnocení dat je však třeba myslet i na tyto aspekty. V případě další práce na tomto tématu například v rámci dizertační práce či projektu by bylo možné zkusit zavést i jiné metody testování cytotoxicity a výsledky mezi sebou porovnávat.

Celkové výsledky MTT testu jsou dále shrnuty v Tabulce 10 a Tabulce 11.

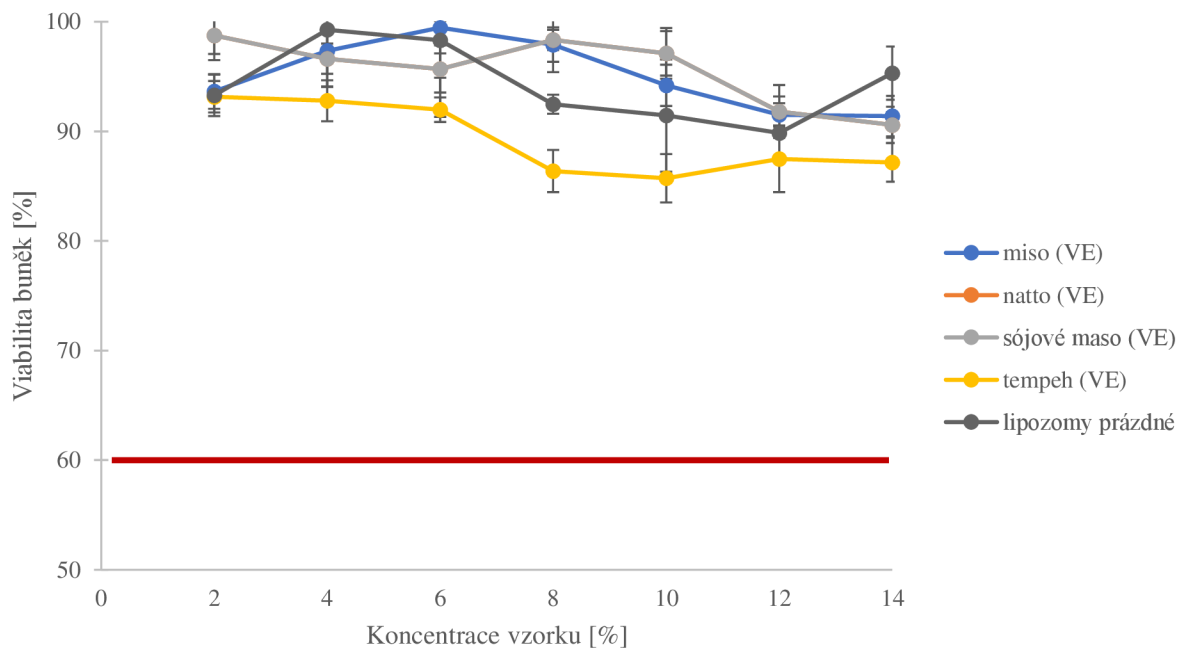




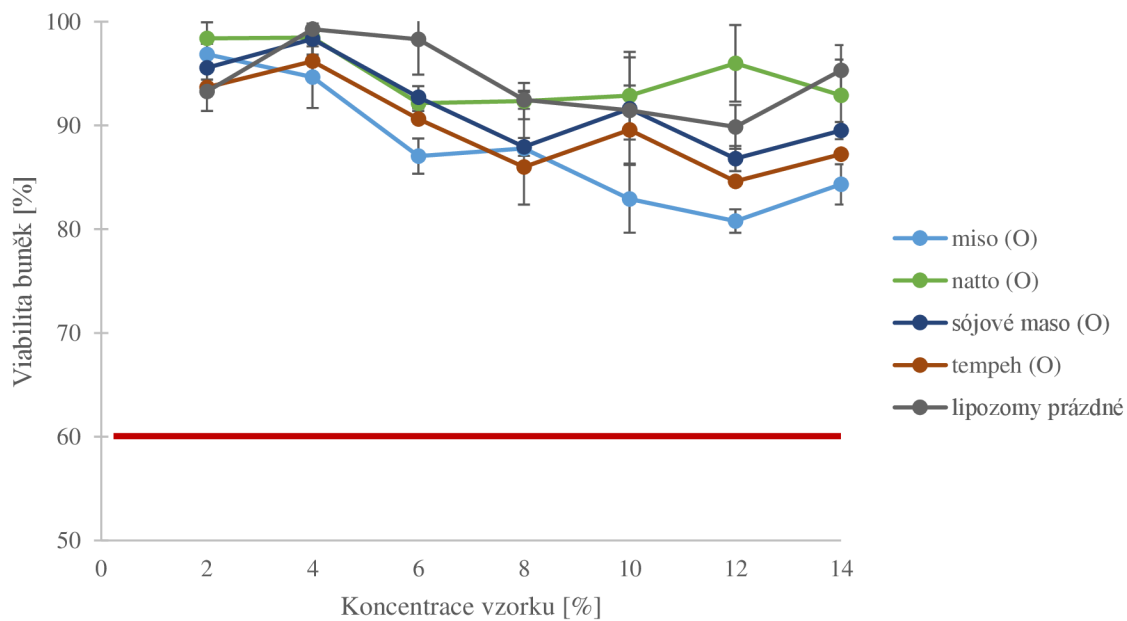
Obrázek 19: Závislosti viability buněk linie CaCo-2 na koncentraci aplikovaných lipozomů s vybranými vodnými extrakty; červenou čarou znázorněna hranice viability, nad kterou daný vzorek nepůsobí na buňky toxicky



Obrázek 20: Závislosti viability buněk linie CaCo-2 na koncentraci aplikovaných lipozomů s vybranými olejovými extrakty; červenou čarou znázorněna hranice viability, nad kterou daný vzorek nepůsobí na buňky toxicky



Obrázek 21: Závislosti viability buněk linie B16-F1 na koncentraci aplikovaných lipozomů s vybranými vodními extrakty; červenou čarou znázorněna hranice viability, nad kterou daný vzorek nepůsobí na buňky toxicky



Obrázek 22: Závislosti viability buněk linie B16-F1 na koncentraci aplikovaných lipozomů s vybranými olejovými extrakty; červenou čarou znázorněna hranice viability, nad kterou daný vzorek nepůsobí na buňky toxicky

Tabulka 10: Koncentrace lecitinu v připravených prázdných lipozomech a výsledky MTT testů s buněčnými liniemi CaCo-2 a B16-F1

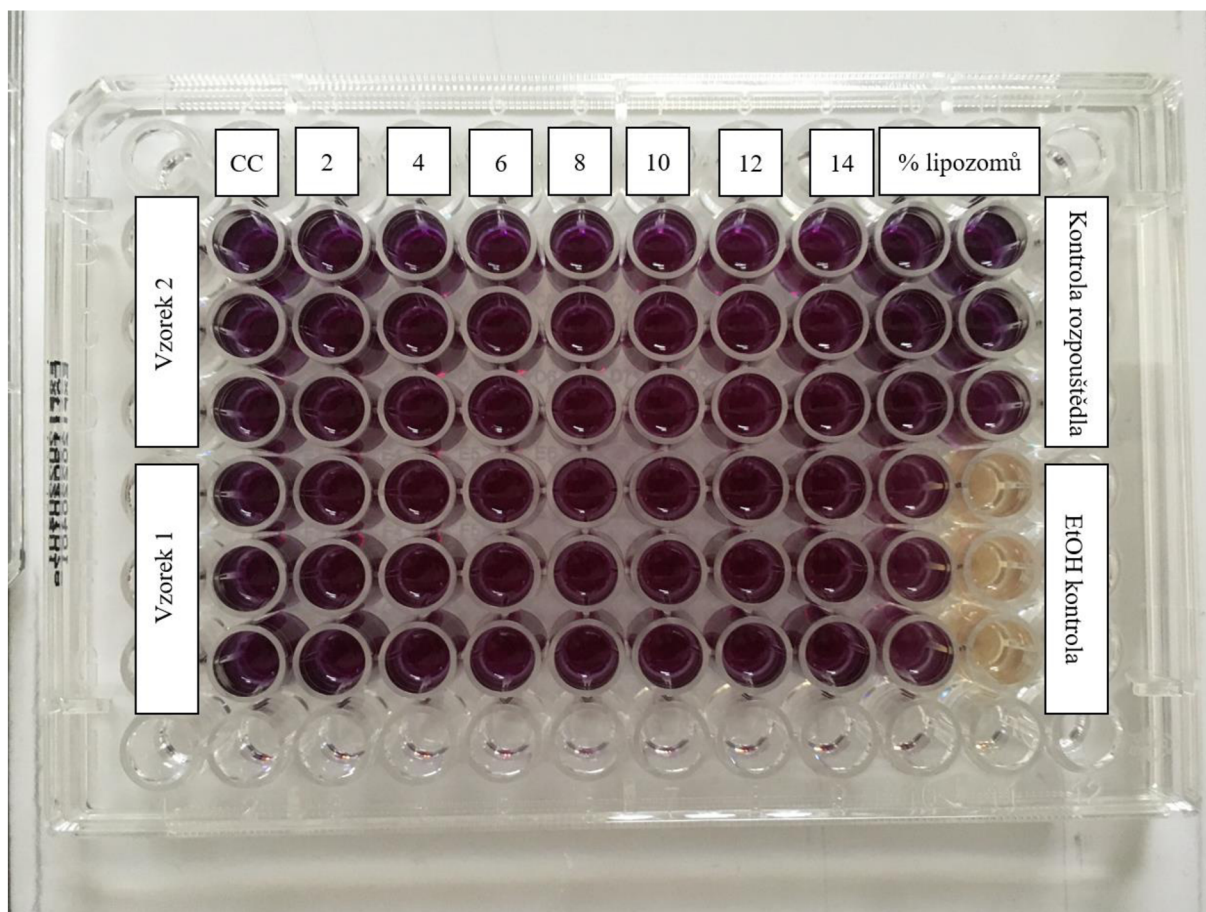
	$C_{\text{roztok lipoz.}} [\%]$	$C_{\text{lecitin}} [\text{mg/ml}]$	viabilita [%] CaCo-2	viabilita [%] B16-F1
prázdné lipozomy	2	$2,55 \pm 0,18$	$92,36 \pm 2,07$	$93,28 \pm 1,89$
	4	$6,93 \pm 0,37$	$83,59 \pm 2,32$	$99,27 \pm 2,68$
	6	$11,25 \pm 0,55$	$76,47 \pm 1,97$	$98,30 \pm 3,41$
	8	$14,65 \pm 0,74$	$78,17 \pm 2,70$	$92,47 \pm 0,87$
	10	$18,67 \pm 0,92$	$79,89 \pm 2,12$	$91,44 \pm 5,12$
	12	$25,66 \pm 1,11$	$65,47 \pm 1,25$	$89,85 \pm 2,11$
	14	$28,02 \pm 1,29$	$77,31 \pm 1,08$	$95,31 \pm 2,43$

Tabulka 11: Koncentrace lecitinu v připravených lipozomech s jednotlivými vzorky a výsledky MTT testů s buněčnými liniemi CaCo-2 a B16-F1

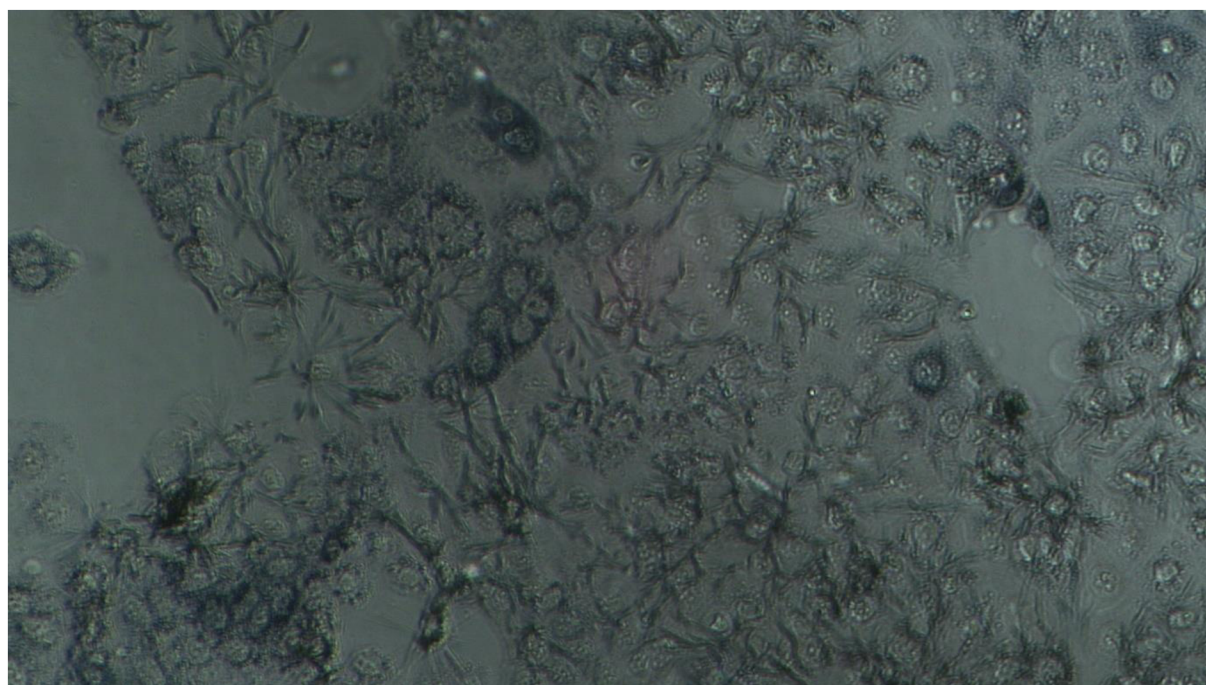
	VODNÉ EXTRAKTY				OLEJE	
	Croztok lipoz. [%]	Clecitin [mg/ml]	viabilita [%] CaCo-2	viabilita [%] B16-F1	viabilita [%] CaCo-2	viabilita [%] B16-F1
miso	2	3,95 ± 0,20	88,02 ± 1,32	93,64 ± 1,58	98,27 ± 0,84	96,86 ± 1,01
	4	7,42 ± 0,46	70,66 ± 2,74	97,33 ± 3,28	98,21 ± 2,48	94,64 ± 2,97
	6	12,69 ± 0,60	80,54 ± 1,96	99,46 ± 2,35	74,29 ± 1,42	87,04 ± 1,70
	8	15,74 ± 0,82	79,40 ± 1,31	97,91 ± 1,57	71,49 ± 4,52	87,79 ± 5,42
	10	18,12 ± 0,98	69,60 ± 1,57	94,19 ± 1,88	68,17 ± 2,72	82,92 ± 3,26
	12	24,59 ± 1,14	57,50 ± 0,89	91,50 ± 1,07	61,07 ± 0,94	80,78 ± 1,13
	14	27,45 ± 0,96	52,99 ± 1,54	91,39 ± 1,84	56,28 ± 1,61	84,32 ± 1,94
natto	2	4,45 ± 0,35	82,50 ± 1,41	99,68 ± 1,69	97,13 ± 1,29	98,38 ± 1,55
	4	9,41 ± 0,44	75,00 ± 1,15	98,91 ± 1,38	89,14 ± 3,12	98,46 ± 3,74
	6	15,1 ± 0,85	59,52 ± 3,64	96,61 ± 4,37	76,64 ± 0,62	92,14 ± 0,75
	8	19,23 ± 0,98	53,75 ± 0,77	95,76 ± 0,92	76,23 ± 1,46	92,34 ± 1,75
	10	24,12 ± 0,96	62,69 ± 1,69	90,39 ± 2,03	70,90 ± 5,10	92,86 ± 4,22
	12	27,96 ± 1,01	58,00 ± 2,01	89,44 ± 2,41	63,63 ± 0,83	95,98 ± 3,69
	14	32,99 ± 1,45	52,23 ± 1,38	92,09 ± 1,66	57,38 ± 2,88	92,89 ± 3,46
sójové maso	2	3,50 ± 0,69	80,60 ± 1,88	98,75 ± 2,26	93,47 ± 0,75	95,56 ± 0,90
	4	7,20 ± 0,85	72,60 ± 2,11	96,63 ± 2,53	91,73 ± 1,10	98,32 ± 1,32
	6	10,59 ± 0,92	69,80 ± 1,79	95,69 ± 2,15	91,78 ± 1,69	92,71 ± 2,03
	8	14,01 ± 0,69	46,03 ± 2,45	98,34 ± 2,94	90,20 ± 0,99	87,93 ± 1,19
	10	17,89 ± 0,85	43,36 ± 1,93	97,12 ± 2,32	80,13 ± 1,45	91,60 ± 1,74
	12	22,00 ± 1,45	42,09 ± 1,14	91,81 ± 1,37	82,30 ± 2,97	86,80 ± 3,56
	14	24,88 ± 1,86	40,98 ± 0,98	90,59 ± 1,18	79,65 ± 1,14	89,49 ± 1,37
tempeh	2	2,88 ± 0,11	97,64 ± 1,20	93,15 ± 1,44	89,46 ± 0,96	93,67 ± 1,15
	4	5,69 ± 0,31	82,39 ± 1,56	92,79 ± 1,87	81,31 ± 1,25	96,18 ± 1,50
	6	9,02 ± 0,52	72,21 ± 0,94	91,97 ± 1,12	62,88 ± 0,89	90,60 ± 1,07
	8	12,34 ± 0,89	69,07 ± 1,60	86,38 ± 1,92	60,89 ± 0,72	86,00 ± 0,86
	10	14,45 ± 1,02	65,28 ± 1,84	85,72 ± 2,20	61,41 ± 1,87	98,58 ± 2,24
	12	17,20 ± 1,96	62,14 ± 2,53	87,49 ± 3,04	56,92 ± 1,01	94,61 ± 1,21
	14	19,85 ± 2,01	37,45 ± 1,47	87,17 ± 1,76	52,18 ± 0,69	87,22 ± 0,83

Na Obrázku 23 je zobrazena destička po dokončení MTT testu na buněčné linii B16-F1. Z obrázku lze vidět tmavě fialovou barvu, která značí živé buňky, tedy žádný cytotoxický účinek. Vpravo dole je pak kontrola 40% ethanolu, který usmrtil 100 % buněk.

Obrázek 24 zobrazuje buněčnou linii CaCo-2 v průběhu MTT testu. Lze si povšimnout morfologii těchto buněk, která připomíná morfologii epitelu.



Obrázek 23: 96 jamková destička po ukončení MTT testu s buněčnou linií B16-F1



Obrázek 24: Ilustrační fotografie buněčné linie CaCo-2 při testování cytotoxicity pomocí MTT testu

## ZÁVĚR

Tato práce se zaměřuje na charakterizaci sóji a sójových produktů jak z hlediska teoretického, tak i praktického. Cílem teoretické části práce bylo utřídění již publikovaných vědeckých poznatků do přehledné rešerše a ujasnění současného stavu problematiky týkající se sóji a sójových produktů, a především biologicky aktivních látek v nich obsažených. Z experimentálního hlediska se předložená práce zabývá charakterizací sóji a produktů z ní jak z hlediska analýzy obsahu účinných složek a určení antioxidačního a antimikrobiálního účinku, tak stanovení cytotoxického účinku na buněčné linie humánního heterogenního epitelu kolorektálního adenokarcinomu a myšího melanomu pomocí *in vitro* testování.

V teoretické rešerši bylo potvrzeno, že názory na sóju se liší především kvůli porovnávání odlišně postavených studií. Je zřejmé, že velké rozdíly existují ve výsledcích podobných studií prováděných na zvířatech a na lidech, případně na různých populacích, kvůli možnému odlišnému typu metabolismu. Značné odlišnosti jsou také mezi sójovými produkty, které prošly fermentačním procesem a které tímto procesem neprošly. Z rešerše dále také vyplývá, že ačkoliv v sóji obsažené látky (včetně fytoestrogenů), mohou v některých ojedinělých případech působit i škodlivě, drtivá většina studií hovoří o převažujících příznivých účincích na lidský organismus.

Experimentální část této práce pomocí spektrofotometrických stanovení potvrdila obsah celkových fenolických látek i flavonoidů v jednotlivých vodných i olejových extraktech z miso, natto, sójových bobů, sójového masa, sójové mouky, tempehu i tofu. Nejvyšší koncentrace celkových fenolických látek byla pozorována u vodného extraktu miso (kolem 75 mg/g). Obsah isoflavonů genisteinu a daidzeinu, nebyl ovšem pomocí HPLC analýzy ve všech úže vybraných extraktech (miso, natto, sójové maso, tempeh) potvrzen, ačkoliv je jejich obsah v sóji znám [185]. Tyto látky byly identifikovány a kvantifikovány pouze ve vodných extraktech miso, sójového masa a tempehu, což bylo ale pravděpodobně dáno nedostatečnou homogenizací potravin a neoptimální extrakcí. Z tohoto důvodu byla pro budoucí práci navržena její možná optimalizace. Pomocí GC analýzy byl potvrzen vysoký obsah PUFA v sójových výrobcích, což koresponduje s tvrzením v teoretické části této práce. Jejich nejvyšší obsah byl pozorován u oleje z tempehu. Antioxidační aktivita byla prokázána u všech extraktů, nejvyšší hodnota byla pozorována u vodného extraktu miso, což koresponduje se zjištěným nejvyšším obsahem celkových fenolických látek, které často působí právě antioxidačně. Silný antimikrobiální účinek na všechny použité mikroorganismy byl pozorován pro extrakty z tempehu. Určitý cytotoxický účinek především vodných extraktů miso, natto, sójového masa a tempehu na buněčnou linii CaCo-2 byl pozorován, je však důvod se domnívat o nespolehlivosti provedeného testu, který z časových a technických důvodů již nemohl být opakován. Cytotoxický účinek extraktů na buňky myšího melanomu nebyl prokázán. Bylo ale navrženo vyzkoušení nového způsobu testování cytotoxického účinku.

Závěrem lze tedy říct, že všechny vytyčené cíle diplomové práce byly splněny. Sója luštinatá a produkty z ní jsou aktuálním tématem běžného života, a ačkoliv je plodinou značně kontroverzní, nabízí její konzumace například ve formě miso nebo tempehu v kombinaci s vyváženým a pestrým jídelníčkem mnohé cenné zdravotní benefity. Pokud tedy jedinec netrpí potravinovou alergií na sójové boby nebo mu konzumace sóji nečiní žádné jiné obtíže, nebyl zjištěn žádný závažný důvod, proč se této plodině zcela vyhýbat.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] C.-C. Hsieh, S. Fernández-Tomé, a B. Hernández-Ledesma, „Chapter 27 - Functionality of Soybean Compounds in the Oxidative Stress-Related Disorders”, in *Gastrointestinal Tissue*, J. Gracia-Sancho a J. Salvadó, Ed. Academic Press, 2017, s. 339–353.
- [2] L. Coward, N. Barnes, K. Setchell, a S. Barnes, „Genistein, Daidzein, and Their Beta-Glycoside Conjugates - Antitumor Isoflavones in Soybean Foods from American and Asian Diets”, *J. Agric. Food Chem.*, roč. 41, č. 11, s. 1961–1967, lis. 1993, doi: 10.1021/jf00035a027.
- [3] H. Wang a P. A. Murphy, „Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods”, *J. Agric. Food Chem.*, roč. 42, č. 8, s. 1666–1673, srp. 1994, doi: 10.1021/jf00044a016.
- [4] A. O. Omoni a R. E. Aluko, „Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action”, *Nutr. Rev.*, roč. 63, č. 8, s. 272–283, srp. 2005, doi: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00141.x.
- [5] M. Lokuruka, „Soybean nutritional properties: The good and the bad about soy foods consumption-A review.”, *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.*, roč. 10, kvě. 2010, doi: 10.4314/ajfand.v10i4.55335.
- [6] R. Singh, *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series Oilseed Crops Volume 4*. 2007.
- [7] „Production of soybeans in leading countries worldwide, 2012-2020”, *Statista*. <https://www.statista.com/statistics/263926/soybean-production-in-selected-countries-since-1980/> (viděno čvc. 10, 2020).
- [8] K. Liu, „Soybean: Overview”, in *Reference Module in Food Science*, 2016.
- [9] „Edamame: Nutritional content, health benefits, and diet tips”, lis. 04, 2019. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/280285> (viděno čvc. 10, 2020).
- [10] „Soy: Types, benefits, and nutrition”, říj. 22, 2019. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320472> (viděno čvc. 10, 2020).
- [11] J. Deacon, „Nitrogen fixation”, *Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh*. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/nitrogen.htm> (viděno čvc. 10, 2020).
- [12] „World Soy Oil Production | SOPA”. <http://www.sopa.org/world-soy-oil-production/> (viděno čvc. 10, 2020).
- [13] M. Asif a M. Acharya, „Phytochemicals and nutritional health benefits of soy plant”, *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.*, roč. 3, s. 64, led. 2013, doi: 10.4103/2231-0738.106998.
- [14] E. Boutrif, „Recent developments in protein quality evaluation”. <http://www.fao.org/3/U5900t/u5900t07.htm> (viděno čvc. 18, 2020).
- [15] J. R. Hoffman a M. J. Falvo, „Protein – Which is Best?”, *J. Sports Sci. Med.*, roč. 3, č. 3, s. 118–130, zář. 2004.
- [16] T. B. Osborne a L. B. Mendel, „Amino-acids in nutrition and growth. 1914”, *J. Am. Coll. Nutr.*, roč. 12, č. 5, s. 484–485, říj. 1993, doi: 10.1080/07315724.1993.10718340.
- [17] K. A. Kuiken a C. M. Lyman, „Essential amino acid composition of soy bean meals prepared from 20 strains of soy beans”, *J. Biol. Chem.*, roč. 177, č. 1, s. 29–36, led. 1949.
- [18] S. R. Fernandez, S. Aoyagi, Y. Han, C. M. Parsons, a D. H. Baker, „Limiting order of amino acids in corn and soybean meal for growth of the chick”, *Poult. Sci.*, roč. 73, č. 12, s. 1887–1896, pro. 1994, doi: 10.3382/ps.0731887.
- [19] „Control Feed Costs with Amino Acids”, *Drovers*. <https://www.drovers.com/article/control-feed-costs-amino-acids> (viděno čvc. 15, 2020).
- [20] T. Willke, „Methionine production--a critical review”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 98, č. 24, s. 9893–9914, pro. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6156-y.

- [21] J. T. Brosnan a M. E. Brosnan, „The sulfur-containing amino acids: an overview", *J. Nutr.*, roč. 136, č. 6 Suppl, s. 1636S-1640S, 2006, doi: 10.1093/jn/136.6.1636S.
- [22] T. H. Berry, D. E. Becker, O. G. Rasmussen, A. H. Jensen, a H. W. Norton, „The Limiting Amino Acids in Soybean Protein", *J. Anim. Sci.*, roč. 21, č. 3, s. 558–561, srp. 1962, doi: 10.2527/jas1962.213558x.
- [23] W. M. Singer, B. Zhang, M. A. R. Mian, a H. Huang, „Soybean Amino Acids in Health, Genetics, and Evaluation", *Soybean Hum. Consum. Anim. Feed*, říj. 2019, doi: 10.5772/intechopen.89497.
- [24] W.-S. Kim a H. B. Krishnan, „Impact of co-expression of maize 11 and 18 kDa  $\delta$ -zeins and 27 kDa  $\gamma$ -zein in transgenic soybeans on protein body structure and sulfur amino acid content", *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.*, roč. 280, s. 340–347, bře. 2019, doi: 10.1016/j.plantsci.2018.12.016.
- [25] Z. Keményová, „Usnadněte povolení GMO v Evropě, žádají čeští vědci", *Universitas, magazín vysokých škol*. <https://www.universitas.cz/tema/2356-usnadnete-povolovani-gmo-v-evrope-zadaji-cesti-vedci> (viděno čvc. 19, 2020).
- [26] P. Singh, R. Kumar, S. N. Sabapathy, a A. Bawa, „Functional and Edible Uses of Soy Protein Products", *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, roč. 7, s. 14–28, led. 2008, doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x.
- [27] E. W. Lusas a M. N. Riaz, „Soy protein products: processing and use", *J. Nutr.*, roč. 125, č. 3 Suppl, s. 573S-580S, 1995, doi: 10.1093/jn/125.3\_Suppl.573S.
- [28] E. R. Gold a Balding, „Receptor-Specific Proteins. Plant and Animal Lectins", *Q. Rev. Biol.*, roč. 51, č. 4, s. 527–527, pro. 1976, doi: 10.1086/409617.
- [29] I. E. Liener, „Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth", *J. Nutr.*, roč. 49, č. 3, s. 527–539, bře. 1953, doi: 10.1093/jn/49.3.527.
- [30] W. J. Peumans a E. J. Van Damme, „Lectins as plant defense proteins.", *Plant Physiol.*, roč. 109, č. 2, s. 347–352, říj. 1995.
- [31] W. C. Boyd a E. Shapleigh, „Separation of Individuals of Any Blood Group into Secretors and Non-Secretors by Use of a Plant Agglutinin (Lectin)", *Blood*, roč. 9, č. 12, s. 1195–1198, pro. 1954, doi: 10.1182/blood.V9.12.1195.1195.
- [32] M. M. El-Araby, E. H. El-Shatoury, M. M. Soliman, a H. F. Shaaban, „Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds", *AMB Express*, roč. 10, č. 1, s. 90, kvě. 2020, doi: 10.1186/s13568-020-01024-4.
- [33] K. Y. Hiremath, N. Jagadeesh, S. Belur, S. S. Kulkarni, a S. R. Inamdar, „A lectin with anti-microbial and anti proliferative activities from Lantana camara, a medicinal plant", *Protein Expr. Purif.*, roč. 170, s. 105574, čer. 2020, doi: 10.1016/j.pep.2020.105574.
- [34] C. A. Mitchell, K. Ramessar, a B. R. O'Keefe, „Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry", *Antiviral Res.*, roč. 142, s. 37–54, čer. 2017, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.007.
- [35] M. Mazalovska a J. C. Kouokam, „Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools", *BioMed Res. Int.*, roč. 2020, s. 1631394, 2020, doi: 10.1155/2020/1631394.
- [36] H. Rüdiger, „Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins", *Acta Anat. (Basel)*, roč. 161, č. 1–4, s. 130–152, 1998, doi: 10.1159/000046454.
- [37] J. G. Banwell, R. Howard, D. Cooper, a J. W. Costerton, „Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin lectins (*Phaseolus vulgaris*) to rats.", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 50, č. 1, s. 68–80, čvc. 1985.
- [38] K. Baintner, G. Jakab, Z. Gyôri, a P. Kiss, „Binding of FITC-labelled lectins to the gastrointestinal epithelium of the rat", *Pathol. Oncol. Res. POR*, roč. 6, č. 3, s. 179–183, 2000, doi: 10.1007/BF03032370.



- [39] N. D. Noah, A. E. Bender, G. B. Reaidi, a R. J. Gilbert, „Food poisoning from raw red kidney beans", *Br. Med. J.*, roč. 281, č. 6234, s. 236–237, čvc. 1980.
- [40] A. E. Bender a G. B. Reaidi, „Toxicity of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) with particular reference to lectins", prezentováno v *Physiological effects of legumes in the human diet* (1982 August 18 : San Diego, Calif.), 1982, Viděno: čvc. 14, 2020. [Online]. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302531814>.
- [41] S. P. Pull, S. G. Pueppke, T. Hymowitz, a J. H. Orf, „Soybean lines lacking the 120,000-dalton seed lectin", *Science*, roč. 200, č. 4347, s. 1277–1279, čer. 1978, doi: 10.1126/science.200.4347.1277.
- [42] I. E. Liener, „Inactivation studies on the soybean hemagglutinin", *J. Biol. Chem.*, roč. 233, č. 2, s. 401–405, srp. 1958.
- [43] M. Higuchi, M. Suga, a K. Iwai, „Participation of Lectin in Biological Effects of Raw Winged Bean Seeds on Rats", s. 8.
- [44] G. Hajos, E. Gelencser, A. Pusztai, G. Grant, M. Sakhri, a S. Bardocz, „Biological Effects and Survival of Trypsin Inhibitors and the Agglutinin from Soybean in the Small Intestine of the Rat", *J. Agric. Food Chem. - J AGR FOOD CHEM*, roč. 43, led. 1995, doi: 10.1021/jf00049a030.
- [45] A. Pusztai, G. Grant, S. Bardocz, E. Gelencser, a G. Hajos, „Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soyabean whey of high agglutinin content", *Br. J. Nutr.*, roč. 77, č. 6, s. 933–945, čer. 1997, doi: 10.1079/bjn19970091.
- [46] G. Grant, L. J. More, N. H. McKenzie, a A. Pusztai, „The effect of heating on the haemagglutinating activity and nutritional properties of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds", *J. Sci. Food Agric.*, roč. 33, č. 12, s. 1324–1326, 1982, doi: 10.1002/jsfa.2740331220.
- [47] L. Thompson, R. Rea, a D. JENKINS, „Effect of Heat Processing on Hemagglutinin Activity in Red Kidney Beans", *J. Food Sci.*, roč. 48, s. 235–236, srp. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb14831.x.
- [48] L. Shi, S. D. Arntfield, a M. Nickerson, „Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses", *Food Res. Int. Ott. Ont*, roč. 107, s. 660–668, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.056.
- [49] O. Paredes-Lopez a G. I. HARRY, „Changes in Selected Chemical and Antinutritional Components during Tempeh Preparation Using Fresh and Hardened Common Beans", *J. Food Sci.*, roč. 54, s. 968–970, srp. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb07923.x.
- [50] „Food Labeling: Health Claims; Soy Protein and Coronary Heart Disease", *Federal Register*, řij. 31, 2017. <https://www.federalregister.gov/documents/2017/10/31/2017-23629/food-labeling-health-claims-soy-protein-and-coronary-heart-disease> (viděno čvc. 14, 2020).
- [51] A. A. Franke, L. J. Custer, W. Wang, a C. Y. Shi, „HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, roč. 217, č. 3, s. 263–273, bře. 1998, doi: 10.3181/00379727-217-44231.
- [52] P. A. Murphy, K. Barua, a C. C. Hauck, „Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods", *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, roč. 777, č. 1–2, s. 129–138, zář. 2002, doi: 10.1016/s1570-0232(02)00342-2.
- [53] I. M. C. M. Rietjens, J. Louisse, a K. Beekmann, „The potential health effects of dietary phytoestrogens", *Br. J. Pharmacol.*, roč. 174, č. 11, s. 1263–1280, čer. 2017, doi: 10.1111/bph.13622.
- [54] L. Pilšáková, I. Riečansky, a F. Jagla, „The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens", *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, roč. 59, s. 651–64, led. 2010.

- [55] T. Iwashina, „Flavonoid function and activity to plants and other organisms", *Uchu Seibutsu Kagaku*, roč. 17, č. 1, s. 24–44, čer. 2003, doi: 10.2187/bss.17.24.
- [56] D. Treutter, „Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis", *Plant Biol. Stuttg. Ger.*, roč. 7, č. 6, s. 581–591, lis. 2005, doi: 10.1055/s-2005-873009.
- [57] G. G. Kuiper *et al.*, „Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta", *Endocrinology*, roč. 139, č. 10, s. 4252–4263, říj. 1998, doi: 10.1210/endo.139.10.6216.
- [58] P. Moutsatsou, „The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding", *Horm. Athens Greece*, roč. 6, č. 3, s. 173–193, zář. 2007.
- [59] G. G. C. Kuhnle, C. Dell'Aquila, S. M. Aspinall, S. A. Runswick, A. A. Mulligan, a S. A. Bingham, „Phytoestrogen content of beverages, nuts, seeds, and oils", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 56, č. 16, s. 7311–7315, srp. 2008, doi: 10.1021/jf801534g.
- [60] W. Mazur, „Phytoestrogen content in foods", *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, roč. 12, č. 4, s. 729–742, pro. 1998, doi: 10.1016/s0950-351x(98)80013-x.
- [61] M. S. Kurzer a X. Xu, „Dietary phytoestrogens", *Annu. Rev. Nutr.*, roč. 17, s. 353–381, 1997, doi: 10.1146/annurev.nutr.17.1.353.
- [62] H. Schwartz, G. Sontag, a J. Plumb, „Inventory of phytoestrogen databases", *Food Chem.*, roč. 113, č. 3, s. 736–747, dub. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.051.
- [63] E. Ricci, S. Cipriani, F. Chiaffarino, M. Malvezzi, a F. Parazzini, „Effects of soy isoflavones and genistein on glucose metabolism in perimenopausal and postmenopausal non-Asian women: a meta-analysis of randomized controlled trials", *Menopause N. Y. N.*, roč. 17, č. 5, s. 1080–1086, říj. 2010, doi: 10.1097/gme.0b013e3181dd05a9.
- [64] M. D. van Die, K. M. Bone, S. G. Williams, a M. V. Pirotta, „Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *BJU Int.*, roč. 113, č. 5b, s. E119-130, kvě. 2014, doi: 10.1111/bju.12435.
- [65] L. Yan a E. L. Spitznagel, „Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 89, č. 4, s. 1155–1163, dub. 2009, doi: 10.3945/ajcn.2008.27029.
- [66] C. C. Applegate, J. L. Rowles, K. M. Ranard, S. Jeon, a J. W. Erdman, „Soy Consumption and the Risk of Prostate Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis", *Nutrients*, roč. 10, č. 1, led. 2018, doi: 10.3390/nu10010040.
- [67] Y. Nagata *et al.*, „Dietary isoflavones may protect against prostate cancer in Japanese men", *J. Nutr.*, roč. 137, č. 8, s. 1974–1979, srp. 2007, doi: 10.1093/jn/137.8.1974.
- [68] K. Taku, K. Umegaki, Y. Sato, Y. Taki, K. Endoh, a S. Watanabe, „Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 85, č. 4, s. 1148–1156, dub. 2007, doi: 10.1093/ajcn/85.4.1148.
- [69] J.-Y. Dong, P. Wang, K. He, a L.-Q. Qin, „Effect of soy isoflavones on circulating C-reactive protein in postmenopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials", *Menopause N. Y. N.*, roč. 18, č. 11, s. 1256–1262, lis. 2011, doi: 10.1097/gme.0b013e31821bfa24.
- [70] D. F. McMichael-Phillips *et al.*, „Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 68, č. 6 Suppl, s. 1431S-1435S, 1998, doi: 10.1093/ajcn/68.6.1431S.
- [71] N. L. Petrakis *et al.*, „Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women", *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, roč. 5, č. 10, s. 785–794, říj. 1996.

- [72] A. Zung, T. Glaser, Z. Kerem, a Z. Zadik, „Breast development in the first 2 years of life: an association with soy-based infant formulas", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, roč. 46, č. 2, s. 191–195, úno. 2008, doi: 10.1097/MPG.0b013e318159e6ae.
- [73] A. H. Wu, P. Wan, J. Hankin, C.-C. Tseng, M. C. Yu, a M. C. Pike, „Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans", *Carcinogenesis*, roč. 23, č. 9, s. 1491–1496, zář. 2002, doi: 10.1093/carcin/23.9.1491.
- [74] D. Ingram, K. Sanders, M. Kolybaba, a D. Lopez, „Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer", *Lancet Lond. Engl.*, roč. 350, č. 9083, s. 990–994, říj. 1997, doi: 10.1016/S0140-6736(97)01339-1.
- [75] J. A. Tice, B. Ettinger, K. Ensrud, R. Wallace, T. Blackwell, a S. R. Cummings, „Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study: a randomized controlled trial", *JAMA*, roč. 290, č. 2, s. 207–214, čvc. 2003, doi: 10.1001/jama.290.2.207.
- [76] H. Adlercreutz, E. Hämäläinen, S. Gorbach, a B. Goldin, „Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan", *Lancet Lond. Engl.*, roč. 339, č. 8803, s. 1233, kvě. 1992, doi: 10.1016/0140-6736(92)91174-7.
- [77] L. G. Howes, J. B. Howes, a D. C. Knight, „Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis", *Maturitas*, roč. 55, č. 3, s. 203–211, říj. 2006, doi: 10.1016/j.maturitas.2006.03.008.
- [78] K. D. R. Setchell, N. M. Brown, a E. Lydeking-Olsen, „The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones", *J. Nutr.*, roč. 132, č. 12, s. 3577–3584, pro. 2002, doi: 10.1093/jn/132.12.3577.
- [79] K. D. R. Setchell a S. J. Cole, „Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians", *J. Nutr.*, roč. 136, č. 8, s. 2188–2193, srp. 2006, doi: 10.1093/jn/136.8.2188.
- [80] K. B. Song *et al.*, „Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls", *J. Nutr.*, roč. 136, č. 5, s. 1347–1351, kvě. 2006, doi: 10.1093/jn/136.5.1347.
- [81] H. B. Patisaul a W. Jefferson, „The pros and cons of phytoestrogens", *Front. Neuroendocrinol.*, roč. 31, č. 4, s. 400–419, říj. 2010, doi: 10.1016/j.yfrne.2010.03.003.
- [82] A. G. Fruzza, C. Demeterco-Berggren, a K. L. Jones, „Unawareness of the effects of soy intake on the management of congenital hypothyroidism", *Pediatrics*, roč. 130, č. 3, s. e699-702, zář. 2012, doi: 10.1542/peds.2011-3350.
- [83] T. Sathyapalan *et al.*, „The effect of soy phytoestrogen supplementation on thyroid status and cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism: a randomized, double-blind, crossover study", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, roč. 96, č. 5, s. 1442–1449, kvě. 2011, doi: 10.1210/jc.2010-2255.
- [84] P. A. Chorazy, S. Himelhoch, N. J. Hopwood, N. G. Greger, a D. C. Postellon, „Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature", *Pediatrics*, roč. 96, č. 1 Pt 1, s. 148–150, čvc. 1995.
- [85] R. L. Divi, H. C. Chang, a D. R. Doerge, „Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action", *Biochem. Pharmacol.*, roč. 54, č. 10, s. 1087–1096, lis. 1997, doi: 10.1016/s0006-2952(97)00301-8.
- [86] M. Messina a G. Redmond, „Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature", *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.*, roč. 16, č. 3, s. 249–258, bre. 2006, doi: 10.1089/thy.2006.16.249.
- [87] J. D. Hydovitz, „Occurrence of goiter in an infant on a soy diet", *N. Engl. J. Med.*, roč. 262, s. 351–353, úno. 1960, doi: 10.1056/NEJM196002182620707.

- [88] J. A. Ripp, „Soybean-induced goiter", *Am. J. Dis. Child.* 1960, roč. 102, s. 106–109, čvc. 1961, doi: 10.1001/archpedi.1961.02080010108017.
- [89] T. H. Shepard, G. E. Pyne, J. F. Kirschvink, a M. McLean, „Soybean Goiter", *N. Engl. J. Med.*, roč. 262, č. 22, s. 1099–1103, čer. 1960, doi: 10.1056/NEJM196006022622201.
- [90] J. Bhatia a F. Greer, „Use of Soy Protein-Based Formulas in Infant Feeding", *Pediatrics*, roč. 121, č. 5, s. 1062–1068, kvě. 2008, doi: 10.1542/peds.2008-0564.
- [91] G. Urbano, M. López-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio, a J. Porres, „The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?", *J. Physiol. Biochem.*, roč. 56, č. 3, s. 283–294, zář. 2000, doi: 10.1007/BF03179796.
- [92] E. Mellanby, „The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate", *J. Physiol.*, roč. 109, č. 3–4, s. 488–533, zář. 1949.
- [93] N. T. Davies, „Anti-nutrient factors affecting mineral utilization", *Proc. Nutr. Soc.*, roč. 38, č. 1, s. 121–128, kvě. 1979, doi: 10.1079/pns19790016.
- [94] A. R. P. Walker, F. W. Fox, a J. T. Irving, „Studies in human mineral metabolism", *Biochem. J.*, roč. 42, č. 3, s. 452–462, 1948.
- [95] A. A. López-González, F. Grases, P. Roca, B. Mari, M. T. Vicente-Herrero, a A. Costa-Bauzá, „Phytate (myo-inositol hexaphosphate) and risk factors for osteoporosis", *J. Med. Food*, roč. 11, č. 4, s. 747–752, pro. 2008, doi: 10.1089/jmf.2008.0087.
- [96] A. A. Lopez-Gonzalez *et al.*, „Phytate levels and bone parameters: a retrospective pilot clinical trial", *Front. Biosci. Elite Ed.*, roč. 2, s. 1093–1098, čer. 2010, doi: 10.2741/e167.
- [97] A. A. López-González *et al.*, „Protective effect of myo-inositol hexaphosphate (phytate) on bone mass loss in postmenopausal women", *Eur. J. Nutr.*, roč. 52, č. 2, s. 717–726, bře. 2013, doi: 10.1007/s00394-012-0377-6.
- [98] E. Graf a J. W. Eaton, „Antioxidant functions of phytic acid", *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 8, č. 1, s. 61–69, led. 1990, doi: 10.1016/0891-5849(90)90146-A.
- [99] E. Graf, K. L. Empson, a J. W. Eaton, „Phytic acid. A natural antioxidant.", *J. Biol. Chem.*, roč. 262, č. 24, s. 11647–11650, srp. 1987.
- [100] F. Grases a A. Costa-Bauzá, „Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment", *Anticancer Res.*, roč. 19, č. 5A, s. 3717–3722, říj. 1999.
- [101] L. U. Thompson, C. L. Button, a D. J. Jenkins, „Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 46, č. 3, s. 467–473, zář. 1987, doi: 10.1093/ajcn/46.3.467.
- [102] S.-H. Lee, H.-J. Park, H.-K. Chun, S.-Y. Cho, S.-M. Cho, a H. S. Lillehoj, „Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice", *Nutr. Res.*, roč. 26, č. 9, s. 474–479, zář. 2006, doi: 10.1016/j.nutres.2006.06.017.
- [103] „Trypsin Inhibitors", *Sigma-Aldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/trypsin-inhibitors.html> (viděno čvc. 21, 2020).
- [104] C. A. Ryan, „Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens", *Annu. Rev. Phytopathol.*, roč. 28, č. 1, s. 425–449, zář. 1990, doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233.
- [105] L. M H a R. Gowda, „A Kunitz trypsin inhibitor of Entada scandens seeds: Another member with single disulfide bridge", *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 1784, s. 850–5, čer. 2008, doi: 10.1016/j.bbapap.2008.02.013.
- [106] S. Odani a T. Ikenaka, „Studies on soybean trypsin inhibitors. 8. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor", *J. Biochem. (Tokyo)*, roč. 74, č. 4, s. 697–715, říj. 1973, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130295.

- [107] A. Clemente, G. Sonnante, a C. Domoney, „Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives", *Curr. Protein Pept. Sci.*, roč. 12, č. 5, s. 358–373, srp. 2011, doi: 10.2174/138920311796391133.
- [108] M. Laskowski a M. A. Qasim, „What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?", *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 1477, č. 1–2, s. 324–337, bř. 2000, doi: 10.1016/s0167-4838(99)00284-8.
- [109] C. Fields, P. Mallee, J. Muzard, a G. U. Lee, „Isolation of Bowman-Birk-Inhibitor from soybean extracts using novel peptide probes and high gradient magnetic separation", *Food Chem.*, roč. 134, č. 4, s. 1831–1838, říj. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.085.
- [110] L. W. Wattenberg, „Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents", *Cancer Res.*, roč. 52, č. 7 Suppl, s. 2085s–2091s, dub. 1992.
- [111] J. Yavelow, M. Collins, Y. Birk, W. Troll, a A. R. Kennedy, „Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 82, č. 16, s. 5395–5399, srp. 1985, doi: 10.1073/pnas.82.16.5395.
- [112] S. A. Vieira, D. J. McClements, a E. A. Decker, „Challenges of Utilizing Healthy Fats in Foods123", *Adv. Nutr.*, roč. 6, č. 3, s. 309S-317S, kvě. 2015, doi: 10.3945/an.114.006965.
- [113] M. Saleem a N. Ahmad, „Characterization of canola oil extracted by different methods using fluorescence spectroscopy", *PLoS ONE*, roč. 13, č. 12, pro. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0208640.
- [114] R. Perumalla Venkata a R. Subramanyam, „Evaluation of the deleterious health effects of consumption of repeatedly heated vegetable oil", *Toxicol. Rep.*, roč. 3, s. 636–643, srp. 2016, doi: 10.1016/j.toxrep.2016.08.003.
- [115] R. Dostálová a Česká technologická platforma pro potraviny, *Sója a výrobky ze sóji*. 2017.
- [116] D. Swanson, R. Block, a S. A. Mousa, „Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life", *Adv. Nutr. Bethesda Md*, roč. 3, č. 1, s. 1–7, led. 2012, doi: 10.3945/an.111.000893.
- [117] P. C. Calder, „Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man", *Biochem. Soc. Trans.*, roč. 45, č. 5, s. 1105–1115, říj. 2017, doi: 10.1042/BST20160474.
- [118] P. Hunter, „The inflammation theory of disease", *EMBO Rep.*, roč. 13, č. 11, s. 968–970, lis. 2012, doi: 10.1038/embor.2012.142.
- [119] K. J. Bowen, W. S. Harris, a P. M. Kris-Etherton, „Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Are There Benefits?", *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, roč. 18, č. 11, 2016, doi: 10.1007/s11936-016-0487-1.
- [120] P. Deol *et al.*, „Omega-6 and omega-3 oxylipins are implicated in soybean oil-induced obesity in mice", *Sci. Rep.*, roč. 7, říj. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12624-9.
- [121] J. J. DiNicolantonio a J. H. O’Keefe, „Importance of maintaining a low omega–6/omega–3 ratio for reducing inflammation", *Open Heart*, roč. 5, č. 2, lis. 2018, doi: 10.1136/openhrt-2018-000946.
- [122] T. A. Woyengo, V. R. Ramprasath, a P. J. H. Jones, „Anticancer effects of phytosterols", *Eur. J. Clin. Nutr.*, roč. 63, č. 7, Art. č. 7, čvc. 2009, doi: 10.1038/ejcn.2009.29.
- [123] O. Weingärtner, M. Böhm, a U. Laufs, „Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia", *Eur. Heart J.*, roč. 30, č. 4, s. 404–409, úno. 2009, doi: 10.1093/eurheartj/ehn580.

- [124] E. L. Klett a S. Patel, „Genetic defenses against noncholesterol sterols", *Curr. Opin. Lipidol.*, roč. 14, č. 4, s. 341–345, srp. 2003, doi: 10.1097/01.mol.0000083763.66245.18.
- [125] M. B. Katan *et al.*, „Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels", *Mayo Clin. Proc.*, roč. 78, č. 8, s. 965–978, srp. 2003, doi: 10.4065/78.8.965.
- [126] S. S. AbuMweis, R. Barake, a P. J. H. Jones, „Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials", *Food Nutr. Res.*, roč. 52, srp. 2008, doi: 10.3402/fnr.v52i0.1811.
- [127] C. J. Glueck, J. Speirs, T. Tracy, P. Streicher, E. Illig, a J. Vandegrift, „Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives", *Metabolism.*, roč. 40, č. 8, s. 842–848, srp. 1991, doi: 10.1016/0026-0495(91)90013-m.
- [128] R. A. Rajaratnam, H. Gylling, a T. A. Miettinen, „Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women", *J. Am. Coll. Cardiol.*, roč. 35, č. 5, s. 1185–1191, dub. 2000, doi: 10.1016/s0735-1097(00)00527-1.
- [129] T. Sudhop, B. M. Gottwald, a K. von Bergmann, „Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease", *Metabolism.*, roč. 51, č. 12, s. 1519–1521, pro. 2002, doi: 10.1053/meta.2002.36298.
- [130] T. A. Miettinen, H. Gylling, T. Strandberg, a S. Sarna, „Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study", *BMJ*, roč. 316, č. 7138, s. 1127–1130, dub. 1998.
- [131] G. Assmann, P. Cullen, J. Erbey, D. R. Ramey, F. Kannenberg, a H. Schulte, „Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study", *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, roč. 16, č. 1, s. 13–21, led. 2006, doi: 10.1016/j.numecd.2005.04.001.
- [132] O. Weingärtner *et al.*, „Vascular effects of diet supplementation with plant sterols", *J. Am. Coll. Cardiol.*, roč. 51, č. 16, s. 1553–1561, dub. 2008, doi: 10.1016/j.jacc.2007.09.074.
- [133] W. M. Ratnayake *et al.*, „Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats", *J. Nutr.*, roč. 130, č. 5, s. 1166–1178, kvě. 2000, doi: 10.1093/jn/130.5.1166.
- [134] S. K. Johnson, J. Clements, C. B. J. Villarino, a R. Coorey, „Chapter 8 - Lupins: Their Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes", in *Gluten-Free Ancient Grains*, J. R. N. Taylor a J. M. Awika, Ed. Woodhead Publishing, 2017, s. 179–221.
- [135] G. S. Lo, A. P. Goldberg, A. Lim, J. J. Grundhauser, C. Anderson, a G. Schonfeld, „Soy fiber improves lipid and carbohydrate metabolism in primary hyperlipidemic subjects", *Atherosclerosis*, roč. 62, č. 3, s. 239–248, pro. 1986, doi: 10.1016/0021-9150(86)90098-5.
- [136] G. R. Gibson a M. B. Roberfroid, „Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics", *J. Nutr.*, roč. 125, č. 6, s. 1401–1412, čer. 1995, doi: 10.1093/jn/125.6.1401.
- [137] E. A. Flickinger a G. C. Fahey, „Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides", *Br. J. Nutr.*, roč. 87 Suppl 2, s. S297-300, kvě. 2002, doi: 10.1079/BJNBJN/2002552.
- [138] H. Chen, L. Li-Jun, Z. Jian-Jun, X. Bo, a L. Rui, „Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effect on ATPase activities in hyperlipidemic rats", *Int.*

- J. Biol. Macromol.*, roč. 46, č. 2, s. 229–231, bře. 2010, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2009.12.005.
- [139] Y. Ma, X. Wu, V. Giovanni, a X. Meng, „Effects of soybean oligosaccharides on intestinal microbial communities and immune modulation in mice“, *Saudi J. Biol. Sci.*, roč. 24, č. 1, s. 114–121, led. 2017, doi: 10.1016/j.sjbs.2016.09.004.
- [140] J. R. Turnlund, W. R. Keyes, a G. L. Peiffer, „Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum“, *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 62, č. 4, s. 790–796, říj. 1995, doi: 10.1093/ajcn/62.4.790.
- [141] R. R. Mendel a F. Bittner, „Cell biology of molybdenum“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, roč. 1763, č. 7, s. 621–635, čvc. 2006, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.013.
- [142] J. Dawson a M. Walters, „Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease?“, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, roč. 62, č. 6, s. 633–644, pro. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2125.2006.02785.x.
- [143] J. F. Alfaro a J. P. Jones, „Studies on the Mechanism of Aldehyde Oxidase and Xanthine Oxidase“, *J. Org. Chem.*, roč. 73, č. 23, s. 9469–9472, pro. 2008, doi: 10.1021/jo801053u.
- [144] R. Nath, „Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, roč. 29, č. 11, s. 1245–1254, lis. 1997, doi: 10.1016/s1357-2725(97)00060-5.
- [145] L. Davidsson, A. Almgren, M. A. Juillerat, a R. F. Hurrell, „Manganese absorption in humans: the effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula“, *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 62, č. 5, s. 984–987, lis. 1995, doi: 10.1093/ajcn/62.5.984.
- [146] V. Lacerda Sanches, R. R. Alves Peixoto, a S. Cadore, „Phosphorus and zinc are less bioaccessible in soy-based beverages in comparison to bovine milk“, *J. Funct. Foods*, roč. 65, s. 103728, úno. 2020, doi: 10.1016/j.jff.2019.103728.
- [147] M. K. Shea a S. L. Booth, „Update on the role of vitamin K in skeletal health“, *Nutr. Rev.*, roč. 66, č. 10, s. 549–557, říj. 2008, doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00106.x.
- [148] M. A. Keen a I. Hassan, „Vitamin E in dermatology“, *Indian Dermatol. Online J.*, roč. 7, č. 4, s. 311–315, 2016, doi: 10.4103/2229-5178.185494.
- [149] E. Tsourelis-Nikita, J. Hercogova, T. Lotti, a G. Menchini, „Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels“, *Int. J. Dermatol.*, roč. 41, č. 3, s. 146–150, bře. 2002, doi: 10.1046/j.1365-4362.2002.01423.x.
- [150] „Office of Dietary Supplements - Riboflavin“.  
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/> (viděno čvc. 22, 2020).
- [151] K. Fekete *et al.*, „Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation“, *Nutr. J.*, roč. 11, s. 75, zář. 2012, doi: 10.1186/1475-2891-11-75.
- [152] „What’s New and Beneficial About Soybeans“, *The World’s Healthiest Foods*.  
<http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=79>.
- [153] A. Nicolia, A. Manzo, F. Veronesi, a D. Rosellini, „An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research“, *Crit. Rev. Biotechnol.*, roč. 34, č. 1, s. 77–88, bře. 2014, doi: 10.3109/07388551.2013.823595.
- [154] D. R. Erickson, *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. AOCS Press, 1995.
- [155] K. Steinkraus, *Industrialization of Indigenous Fermented Foods, Revised and Expanded*. CRC Press, 2004.

- [156] M. R. Swain, M. Anandharaj, R. C. Ray, a R. Parveen Rani, „Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics”, *Biotechnol. Res. Int.*, roč. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/250424.
- [157] M. Gillooly *et al.*, „The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables”, *Br. J. Nutr.*, roč. 49, č. 3, s. 331–342, kvě. 1983, doi: 10.1079/bjn19830042.
- [158] M.-J. Park, T. General, a S.-P. Lee, „Physicochemical Properties of Roasted Soybean Flour Bioconverted by Solid-State Fermentation Using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*”, *Prev. Nutr. Food Sci.*, roč. 17, č. 1, s. 36–45, bře. 2012, doi: 10.3746/pnf.2012.17.1.036.
- [159] J. P. Tamang, D.-H. Shin, S.-J. Jung, a S.-W. Chae, „Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods”, *Front. Microbiol.*, roč. 7, dub. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00578.
- [160] K. A. Hachmeister a D. Y. Fung, „Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains”, *Crit. Rev. Microbiol.*, roč. 19, č. 3, s. 137–188, 1993, doi: 10.3109/10408419309113527.
- [161] S. E. Griese *et al.*, „Gastroenteritis Outbreak Associated with Unpasteurized Tempeh, North Carolina, USA”, *Emerg. Infect. Dis.*, roč. 19, č. 9, s. 1514–1517, zář. 2013, doi: 10.3201/eid1909.130334.
- [162] M. Kuligowski, I. Jasińska-Kuligowska, a J. Nowak, „Evaluation of bean and soy tempeh influence on intestinal bacteria and estimation of antibacterial properties of bean tempeh”, *Pol. J. Microbiol.*, roč. 62, č. 2, s. 189–194, 2013.
- [163] A. Endo, T. Irisawa, L. Dicks, a S. Tanasupawat, „Fermented Foods: Fermentations of East and Southeast Asia”, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2014, s. 846–851.
- [164] H. N. Lioe, K. Wada, T. Aoki, a M. Yasuda, „Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu) -- Koikuchi, tamari and shiro shoyu”, 2007, Viděno: čvc. 25, 2020. [Online]. Dostupné z: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/697266>.
- [165] G. Zhao, L.-L. Ding, Y. Yao, Y. Cao, Z.-H. Pan, a D.-H. Kong, „Extracellular Proteome Analysis and Flavor Formation During Soy Sauce Fermentation”, *Front. Microbiol.*, roč. 9, srp. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01872.
- [166] „Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Chapter 4.” <http://www.fao.org/3/t0532e/t0532e05.htm> (viděno čvc. 25, 2020).
- [167] S. L. Taylor, B. C. Remington, R. Panda, R. E. Goodman, a J. L. Baumert, „18 - Detection and control of soybeans as a food allergen”, in *Handbook of Food Allergen Detection and Control*, S. Flanagan, Ed. Woodhead Publishing, 2015, s. 341–366.
- [168] M. N. Riaz, *Soy Applications in Food*, roč. 1. CRC Press, 2005.
- [169] V. K.j, L. L, a C. J.p, „Food processing operations and scale-up.”, *Food Sci. Technol. USA No 42*, 1991, Viděno: čvc. 25, 2020. [Online]. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19920017798>.
- [170] W. Shurtleff a A. Aoyagi, „History of Fermented Tofu - page 1”. [https://www.soyinfocenter.com/HSS/fermented\\_tofu1.php](https://www.soyinfocenter.com/HSS/fermented_tofu1.php) (viděno čvc. 25, 2020).
- [171] „Japanese Miso Paste - Information, Varieties and Uses”, *The Spruce Eats*. <https://www.thespruceeats.com/introduction-to-miso-2031389> (viděno čvc. 24, 2020).
- [172] D. Monson, „Natto industry members meet for annual Natto Summit”, *Specialty Soy and Grains Alliance*, zář. 10, 2019. <https://soygrainsalliance.org/2019/09/10/natto-industry-members-meet-for-annual-natto-summit/> (viděno čvc. 22, 2020).
- [173] „Tempeh”, *Simple Vegan Blog*, čvc. 02, 2020. <https://simpleveganblog.com/tempeh/> (viděno čvc. 24, 2020).
- [174] „Shoyu”. <https://www.marukai.com/t-shoyu.aspx> (viděno čvc. 24, 2020).



- [175] „The best SOY CHUNKS with the highest protein scores (70%)", *EissBV*, lis. 25, 2019. <https://eissbv.com/soy-chunks/> (viděno čvc. 24, 2020).
- [176] „What Is Regular Block Tofu? How to Press, Cook, Store It", *Garlic Delight*, led. 29, 2020. <https://garlicdelight.com/regular-brick-tofu/> (viděno čvc. 24, 2020).
- [177] G. M. Wardlaw, A. Smith, a A. L. Collene, *Contemporary Nutrition: A Functional Approach*, 4. vyd. BostonqMcGraw Hill, 2000.
- [178] R. M. Arliss a C. A. Biermann, „Do soy isoflavones lower cholesterol, inhibit atherosclerosis, and play a role in cancer prevention?", *Holist. Nurs. Pract.*, roč. 16, č. 5, s. 40–48, říj. 2002, doi: 10.1097/00004650-200210000-00009.
- [179] H. Adlercreutz, „Phyto-oestrogens and cancer", *Lancet Oncol.*, roč. 3, č. 6, s. 364–373, čer. 2002, doi: 10.1016/s1470-2045(02)00777-5.
- [180] D. J. A. Jenkins *et al.*, „Soy consumption and phytoestrogens: effect on serum prostate specific antigen when blood lipids and oxidized low-density lipoprotein are reduced in hyperlipidemic men", *J. Urol.*, roč. 169, č. 2, s. 507–511, úno. 2003, doi: 10.1097/01.ju.0000046060.59113.57.
- [181] H. Adlercreutz *et al.*, „Phytoestrogens and Prostate Disease", *J. Nutr.*, roč. 130, č. 3, s. 658S-659S, bře. 2000, doi: 10.1093/jn/130.3.658S.
- [182] L. H. Kushi, K. A. Meyer, a D. R. Jacobs, „Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 70, č. 3 Suppl, s. 451S-458S, 1999, doi: 10.1093/ajcn/70.3.451s.
- [183] M.-H. Pan, Y.-S. Chiou, L.-H. Chen, a C.-T. Ho, „Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: specific epigenetic related molecular targets", *Mol. Nutr. Food Res.*, roč. 59, č. 1, s. 21–35, led. 2015, doi: 10.1002/mnfr.201400515.
- [184] J. Ferlay *et al.*, „Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012", *Int. J. Cancer*, roč. 136, č. 5, s. E359-386, bře. 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [185] M. Adjakly, M. Ngollo, J.-P. Boiteux, Y.-J. Bignon, L. Guy, a D. Bernard-Gallon, „Genistein and Daidzein: Different Molecular Effects on Prostate Cancer", *Anticancer Res.*, roč. 33, č. 1, s. 39–44, led. 2013.
- [186] J. W. Anderson a A. W. Major, „Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease", *Br. J. Nutr.*, roč. 88 Suppl 3, s. S263-271, pro. 2002, doi: 10.1079/BJN2002716.
- [187] F. M. Sacks *et al.*, „Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee", *Circulation*, roč. 113, č. 7, s. 1034–1044, úno. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171052.
- [188] S. G. Dudek, *Nutrition essentials for nursing practice*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- [189] C. M. Hasler, „The cardiovascular effects of soy products", *J. Cardiovasc. Nurs.*, roč. 16, č. 4, s. 50–63; quiz 75–76, čvc. 2002, doi: 10.1097/00005082-200207000-00006.
- [190] T. Sathyapalan *et al.*, „Soy isoflavones improve cardiovascular disease risk markers in women during the early menopause", *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, roč. 28, č. 7, s. 691–697, čvc. 2018, doi: 10.1016/j.numecd.2018.03.007.
- [191] N. Polini, M. B. Rauschemberger, J. Mendiberri, J. Selles, a V. Massheimer, „Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation", *Mol. Cell. Endocrinol.*, roč. 267, č. 1, s. 55–62, bře. 2007, doi: 10.1016/j.mce.2006.12.037.
- [192] J. He *et al.*, „Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial", *Circulation*, roč. 124, č. 5, s. 589–595, srp. 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009159.

- [193] S. J. Bhathena a M. T. Velasquez, „Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 76, č. 6, s. 1191–1201, pro. 2002, doi: 10.1093/ajcn/76.6.1191.
- [194] S. Holt, I. Muntyan, a L. Likver, „Soya-Based Diets for Diabetes Mellitus", *Altern. Complement. Ther.*, roč. 2, č. 2, s. 79–82, bř. 1996, doi: 10.1089/act.1996.2.79.
- [195] F. Guillon a M. M.-J. Champ, „Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health", *Br. J. Nutr.*, roč. 88 Suppl 3, s. S293-306, pro. 2002, doi: 10.1079/BJN2002720.
- [196] M. Chandalia, A. Garg, D. Lutjohann, K. von Bergmann, S. M. Grundy, a L. J. Brinkley, „Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus", *N. Engl. J. Med.*, roč. 342, č. 19, s. 1392–1398, kvě. 2000, doi: 10.1056/NEJM200005113421903.
- [197] J. M. Hamilton-Reeves, G. Vazquez, S. J. Duval, W. R. Phipps, M. S. Kurzer, a M. J. Messina, „Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis", *Fertil. Steril.*, roč. 94, č. 3, s. 997–1007, srp. 2010, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.038.
- [198] C. T. Haun *et al.*, „Soy protein supplementation is not androgenic or estrogenic in college-aged men when combined with resistance exercise training", *Sci. Rep.*, roč. 8, čvc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29591-4.
- [199] J. Martinez a J. E. Lewi, „An unusual case of gynecomastia associated with soy product consumption", *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.*, roč. 14, č. 4, s. 415–418, čer. 2008, doi: 10.4158/EP.14.4.415.
- [200] G. A. Kanakis *et al.*, „EAA clinical practice guidelines—gynecomastia evaluation and management", *Andrology*, roč. 7, č. 6, s. 778–793, 2019, doi: 10.1111/andr.12636.
- [201] P. G. Giampietro *et al.*, „Soy protein formulas in children: no hormonal effects in long-term feeding", *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM*, roč. 17, č. 2, s. 191–196, úno. 2004, doi: 10.1515/jpem.2004.17.2.191.
- [202] S. E. Serrano, J. Braun, L. Trasande, R. Dills, a S. Sathyanarayana, „Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data", *Environ. Health*, roč. 13, s. 43, čer. 2014, doi: 10.1186/1476-069X-13-43.
- [203] A. Fucic *et al.*, „Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain", *Environ. Health*, roč. 11, č. Suppl 1, s. S8, čer. 2012, doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S8.
- [204] H.-K. Lee, J. K. Lee, a B. Cho, „The Role of Androgen in the Adipose Tissue of Males", *World J. Mens Health*, roč. 31, č. 2, s. 136–140, srp. 2013, doi: 10.5534/wjmh.2013.31.2.136.
- [205] J. C. M. Stewart, „Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate", *Anal. Biochem.*, roč. 104, č. 1, s. 10–14, kvě. 1980, doi: 10.1016/0003-2697(80)90269-9.
- [206] X. Li *et al.*, „Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, roč. 73, č. 1, s. 65–74, říj. 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.04.023.
- [207] C. W. I. Haminiuk, M. S. V. Plata-Oviedo, G. de Mattos, S. T. Carpes, a I. G. Branco, „Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents", *J. Food Sci. Technol.*, roč. 51, č. 10, s. 2862–2866, říj. 2014, doi: 10.1007/s13197-012-0759-z.
- [208] R. González *et al.*, „Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, roč. 51, č. 4, s. 331–362, dub. 2011, doi: 10.1080/10408390903584094.

- [209] K. H. Steinkraus, Y. B. Hwa, J. P. Van Buren, M. I. Provvidenti, a D. B. Hand, „Studies on tempeh. An Indonesian fermented soybean food.", *Food Res.*, roč. 25, s. 777–788, 1960.
- [210] H. Haron, I. A. Azlan, S. Shahar, a S. Loh, „Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products", *Food Chem.*, roč. 115, s. 1350–1356, srp. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.053.
- [211] G.-C. Yen, P.-D. Duh, a H.-L. Tsai, „Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid", *Food Chem.*, roč. 79, č. 3, s. 307–313, lis. 2002, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00145-0.
- [212] J. J. DiNicolantonio a J. H. O’Keefe, „Good Fats versus Bad Fats: A Comparison of Fatty Acids in the Promotion of Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity", *Mo. Med.*, roč. 114, č. 4, s. 303–307, 2017.
- [213] K. Pate a P. Saftier, „12 - Chemical metrology methods for CMP quality", in *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*, S. Babu, Ed. Woodhead Publishing, 2016, s. 299–325.
- [214] T. Lea, „Caco-2 Cell Line", in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, a H. Wichers, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 103–111.
- [215] E. Sanz-Navares, N. Fernandez, M. Kazanietz, a S. Rotenberg, „Atypical protein kinase C $\zeta$  suppresses migration of mouse melanoma cells", *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, roč. 12, s. 517–24, lis. 2001.
- [216] S. Sabudin, M. A. Derman, I. Zainol, a K. Noorsal, „In Vitro Cytotoxicity and Cell Seeding Studies of a Chitosan-silver Composite for Potential Wound Management Applications", 2012. /paper/In-Vitro-Cytotoxicity-and-Cell-Seeding-Studies-of-a-Sabudin-Derman/61bff5c6a6dfe4f5e700c34470d95e10257e21b7 (viděno čvc. 29, 2020).
- [217] T. Riss, „Is Your MTT Assay the Right Choice?" <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/> (viděno čvc. 29, 2020).

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina)
ALA	kyselina $\alpha$ -linolenová ( $\alpha$ -linolenic acid)
AMK	aminokyseliny
ANSES	Francouzský úřad pro potraviny (Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail)
ATB	antibiotika
BBI	Bowman-Birk inhibitor
BHI	brain heart infusion
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DHA	kyselina dokosahexaenová
E2	17- $\beta$ -estradiol
EC	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	kyselina dokosahexaenová
ER	estrogenový receptor
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
GC	plynová chromatografie (gass) chromatography
GRAS	generally recognized as safe
G+/G-	grampozitivní/gramnegativní
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoproteins)
I6P	inositol hexafosfát (inositol hexaphosphate)
KTI	Kunitz inhibitor
LB	lyzogyne broth
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low-density lipoproteins)
MF	mobilní fáze
MK	mastné kyseliny
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
MO	mikroorganismus
MT	milion tun
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NB	nutrient broth
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
NICE	Národní institut pro zdraví (The National Institute for Health)
PDCCAS	protein digestibility-corrected amino acid score
PI	inhibitor proteáz
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
SM	<i>Serratia marcescens</i>
USA	Spojené státy americké (United States of America)

WHO

Světová zdravotnická organizace World Health Organization