



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**NUTRIČNÍ A MIKROBIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE
SOJOVÉHO SÝRU TEMPEH**

NUTRITIONAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SOYA TEMPEH CHEESE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Sobotková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1215/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Markéta Sobotková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Nutriční a mikrobiologická charakterizace sojového sýru tempeh

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Vypracování literární rešerše zabývající se charakteristikou sójových výrobků a účinných látek v nich obsažených, popisem vybraných nutričních parametrů a postupů jejich stanovení, možnostmi analýzy mikrobiálního složení výrobků pomocí různých molekulárních metod
- 2) Stanovení vybraných nutričních parametrů v různých vzorcích sýru tempeh
- 3) Izolace DNA z komplexní potravinové matrice s následnou identifikací obsažených mikroorganismů
- 4) Zhodnocení vlivu fermentace na přidanou výživovou hodnotu sýru tempeh v porovnání s klasickými sójovými boby.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Markéta Sobotková
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tempeh patří mezi fermentované probiotické sójové výrobky. Díky jeho bohatému zdroji bílkovin, přítomnosti nenasycených mastných kyselin esenciálních pro člověka a vysoké hladině antioxidantů je hodnotnou výživovou potravinou. Teoretická část práce popisuje nutriční složení tempehu a sójových bobů. Jsou diskutovány pozitivní a negativní účinky sóji na lidské zdraví. Dále byly sledovány změny výživových složek způsobené fermentačním procesem a působením mikroorganismů.

Experimentální část diplomové práce se zabývá mikrobiologickou analýzou tří druhů tempehu a využitím metody polymerázové řetězové reakce. Izolace DNA z produktů byla provedena pomocí fenolové extrakce, pomocí magnetických mikročastic F-kol 770x a magnetických nanočastic F79/L3-PLL. V rámci nutriční analýzy byly studovány změny jednotlivých nutričních složek a dalších látek v sójových bobech po fermentaci tempehu. Ve výrobcích byl stanovován celkový obsah hlavních nutričních složek – sacharidů, lipidů a bílkovin. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie bylo analyzováno množství antioxidačních látek jako polyfenoly a flavonoidy. V práci bylo také provedeno stanovení množství vitamínu E pomocí HPLC a stanovení přítomnosti mastných kyselin pomocí GC ve vzorcích tempehu a bobů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antioxidanty, fermentace, PCR, sójové boby, tempeh, výživové hodnoty

ABSTRACT

Tempeh belongs to the fermented probiotic soybean products. Tempeh is a valuable nutritional foodstuff due to its rich source of protein, content of unsaturated fatty acids essential for human and high amount of antioxidants. The theoretical part describes nutritional composition of tempeh and soybeans. In the thesis are discussed positive and negative effects of soy on human health. In the thesis were followed up changes in the nutritional components caused by the fermentation process and the action of microorganisms.

The experimental part deals with the identification of microorganisms, which are contained in three types of tempeh. Microorganisms were detected using method polymerase chain reaction. DNA was isolated from the products by use phenol extraction, using magnetic microparticles F-kol 77ox and magnetic nanoparticles F79/L3 PLL. As part of the nutritional analysis changes in individual nutrients and other substances in soybeans after tempeh fermentation have been studied. In the chosen products total content of essential nutrients – carbohydrates, lipids and proteins were analyzed. Amount of antioxidants such as phenolics and flavonoids were analysed by UV-VIS spectrophotometry. Determination of vitamin E content which was analysed by HPLC and determination presence of fatty acids which was determined by GC was incorporated to this thesis.

KEYWORDS

Antioxidants, fermentation, PCR, soybeans, tempeh, nutritional values

SOBOTKOVÁ, M. *Nutriční a mikrobiologická charakterizace sojového sýru tempeh*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

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

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Andrei Háronikové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. a Mgr. Janě Konečné za cenné rady a pomoc při měření experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Sója	10
2.1.1	Nutriční složení sóji	10
2.1.2	Prospěšné účinky sóji	11
2.1.2.1	Isoflavony	11
2.1.3	Negativní účinky sóji	12
2.1.4	Antinutriční faktory v sóji	12
2.1.5	Výrobky ze sóji	13
2.2	Fermentace sóji	13
2.2.1	Antioxidační aktivita	14
2.3	Tempeh	14
2.3.1	Proces přípravy tempehu	15
2.3.2	Nutriční charakterizace tempehu	16
2.3.2.1	Lipidy	16
2.3.2.2	Proteiny	17
2.3.2.3	Sacharidy	17
2.3.2.4	Minerály	17
2.3.2.5	Vitaminy	17
2.3.3	Mikrobiální složení tempehu	18
2.3.3.1	Bakterie mléčného kvašení	18
2.3.3.2	Plísně	19
2.3.4	Změny vlastností tempehu	19
2.4	Molekulárně diagnostické metody	19
2.4.1	Polymerázová řetězová reakce	19
2.4.2	PCR v reálném čase	20
2.4.2.1	Princip metody	21
2.4.2.2	Absolutní kvantifikace	22
2.4.2.3	Relativní kvantifikace	22
2.5	Metody stanovení nutriční hodnoty potravin	23
2.5.1	Stanovení sacharidů	23
2.5.2	Stanovení lipidů	23
2.5.3	Stanovení dusíkatých látek	23
2.5.4	Stanovení vitaminů	24
2.5.5	Stanovení polyfenolů a celkové antioxidační aktivity	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Materiál – mikrobiologická identifikace	26
4.1.1	Testovaný fermentovaný výrobek	26
4.1.2	Použité kmeny MO pro pozitivní kontroly	26
4.1.3	Bakteriální DNA	27
4.1.4	Přístroje a pomůcky	27

4.1.5	Chemikálie	27
4.1.6	Roztoky	28
4.1.7	Komponenty pro PCR v reálném čase a konvenční PCR	28
4.1.8	Magnetické nosiče.....	28
4.2	Materiál – nutriční analýza	29
4.2.1	Testovaný výrobek	29
4.2.2	Přístroje a pomůcky.....	29
4.2.2.1	Přístroje a pomůcky pro analýzu na kapalinovém chromatografu.....	30
4.2.2.2	Přístroje a pomůcky pro analýzu na plynovém chromatografu	30
4.2.3	Chemikálie	30
4.2.4	Roztoky	30
4.3	Metody – mikrobiologická identifikace	31
4.3.1	Izolace DNA ze vzorků	31
4.3.1.1	Příprava hrubého lyzátu buněk	31
4.3.1.2	Příprava hrubého lyzátu buněk plísní	31
4.3.1.3	Fenolová extrakce DNA	32
4.3.1.4	Srážení DNA etanolem	32
4.3.1.5	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic	32
4.3.2	Mikrobiologická kontrola.....	33
4.3.2.1	Kultivace MO.....	33
4.3.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin.....	34
4.3.4	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	34
4.3.5	Konvenční polymerázová řetězová reakce.....	35
4.3.6	PCR primery.....	36
4.3.7	Amplifikační programy qPCR a konvenční PCR	37
4.3.8	Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy	38
4.4	Metody – nutriční analýza	38
4.4.1	Analýza sacharidů	39
4.4.1.1	Stanovení celkových sacharidů podle Duboise.....	39
4.4.1.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona	39
4.4.2	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS*	40
4.4.3	Stanovení celkových polyfenolů	40
4.4.4	Stanovení celkových flavonoidů	41
4.4.5	Stanovení obsahu lipidů extrakcí podle Folche.....	41
4.4.6	Stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie.....	41
4.4.7	Stanovení hrubých bílkovin metodou podle Kjeldahla	42
4.4.8	Stanovení vitamínu E metodou kapalinové chromatografie	43
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	44
5.1	Mikrobiologická kontrola	44
5.2	Mikrobiologická identifikace	45
5.2.1	Izolace DNA.....	45
5.2.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin.....	45
5.2.3	PCR v reálném čase.....	47

5.2.3.1	qPCR s primery specifickými pro doménu Bacteria.....	48
5.2.3.2	qPCR s primery specifickými pro rod Lactobacillus	50
5.2.3.3	qPCR s primery specifickými pro oddělení Zygomycetes.....	54
5.2.4	Konvenční PCR.....	54
5.2.4.1	PCR s primery specifickými pro kvasinky	54
5.2.4.2	PCR s primery specifickými pro druh Lactobacillus fermentum	56
5.3	Nutriční analýza.....	59
5.3.1	Stanovení celkových sacharidů podle Duboise	59
5.3.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona.....	60
5.3.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS*	60
5.3.4	Stanovení celkových polyfenolů	61
5.3.5	Stanovení celkových flavonoidů	62
5.3.6	Stanovení obsahu lipidů extrakcí podle Folche.....	63
5.3.7	Stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie.....	64
5.3.8	Stanovení hrubých bílkovin metodou podle Kjeldahla	66
5.3.9	Stanovení vitamínu E metodou kapalinové chromatografie	66
6	ZÁVĚR.....	67
7	SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ	69
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	76
9	PŘÍLOHY	77

1 ÚVOD

V minulosti patřila sója po dlouhou dobu k tzv. módním potravinám. Dnes je obsažena v mnoha výrobcích a v produktech zdravé výživy. Sója má tedy široké uplatnění, včetně náhrady masa pro vegetariány a sójového mléka při intoleranci mléka kravského. Sójové boby jsou nejvíce uznávaným zdrojem rostlinných bílkovin, které také přispívají k široké škále pozitivních účinků na zdraví. Nevýhodou sóji je vysoký obsah antinutričních látek, které omezují využití živin. Tyto antinutriční faktory lze snadno odstranit během procesů při výrobě fermentovaných potravin.

Dnes se fermentace používá především ke zvýšení bioaktivních látek (vitaminy, minerály, isoflavony) zodpovědných za zdraví prospěšné vlastnosti a z důvodu snížení antinutričních faktorů (inhibitory proteináz, kyselina fytová, ureáza, kyselina šťavelová) [1].

Sójové boby a sójové produkty obsahují vysoký obsah nenasycených lipidů, vlákniny, vitamínů a minerálů a nízké množství nasycených lipidů [2]. Mezi tradiční fermentované sójové výrobky patří miso, sójová omáčka, natto a tempeh. V asijských zemích jsou tyto produkty velmi populární, nejsou pouze potravinami tradičními, ale i funkčními, a díky tomu se staly populárními po celém světě. Jsou řazeny mezi produkty zdravé výživy, obsahují probiotické bakterie. Potraviny ze sóji se vyznačují vlastnostmi zlepšujícími zdraví jako zmírnění příznaků menopauzy, snížení rizika osteoporózy, prevence rakoviny, pozitivními účinky na metabolická onemocnění a na imunitu [3, 4].

V práci se zaměřuji na jeden z výše uvedených výrobků, a to na tempeh, který je oblíbenou potravinou v jihovýchodní Asii. Tempeh je populární zejména mezi vegetariány jak v České republice, tak na celém světě. Mikrobiální společenství přítomné v tempehu vede ke změnám jeho fyzikálních a chemických vlastností [1]. Fermentace tempehu příznivě ovlivňuje jeho nutriční složení, a to hlavně díky působení mikroorganismů buď přirozeně se vyskytujících, nebo přidaných v průběhu výrobního procesu. Během fermentace dochází ke zvýšení antioxidační aktivity, a tudíž fermentované sójové produkty jako tempeh, miso a natto jsou více odolné k oxidaci lipidů než nefermentované sójové boby [5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sója

Sója luštinatá (*Glycine max*) je luštěnina a olejnina pocházející ze severní a střední Číny. V USA se objevila v roce 1765 a do Evropy se dostala až koncem 20. století. Název rodu *Glycine* byl poprvé představen Karlem Linnaeusem. Slovo *glycine*, odvozené od řeckého slova „glykys“ (sladký), odkazuje na sladkost hruškovitých jedlých hlíz produkovaných původními americkými luštěninami.

Nejvyužitelnější částí sóji jsou semena (boby) existující v různých barevných variantách - žluté, hnědé, zelené a černé. Sójové boby jsou jednou z nejcennějších plodin na světě. Využívají se nejen jako základní potravina většiny asijských zemí poskytující bohatý zdroj proteinů v lidské stravě, ale také jako olejnina, krmivo pro hospodářská zvířata a surovina pro biopaliva. Největšími producenty sóji jsou USA, Brazílie, Argentina, Čína a Indie [4, 6].

Dnes už je sója důležitou globální plodinou a jednou z „biotechnologických potravin“, která je geneticky modifikována a používána ve stále větším množství potravin. V roce 1995 firma Monsanto poprvé představila Roundup Ready sóju, která vykazuje odolnost vůči herbicidům a byla navržena tak, aby umožnila plodinám odolat vysokým dávkám herbicidů, které by je jinak usmrtily. Většina spotřebitelů konzumaci produktů obsahujících GM sóju odmítá. V EU je pěstování GM sóji zakázáno [4].

2.1.1 Nutriční složení sóji

Sójové boby jsou bohatým zdrojem proteinů (37 hm. %), lipidů (20 % hmotnosti, z toho asi 60 % polynenasycené tuky, 25 % mononenasycené tuky a 15 % nasycené) a sacharidů (21 hm. %). Dále obsahují rozpustnou (7 hm. %) a nerozpustnou vlákninu (10 hm. %) [16]. Sójové boby obsahují vitaminy A, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, K a E, dále prvky jako vápník, hořčík, fosfor, draslík, zinek, železo [4, 7, 8].

Sója neobsahuje cholesterol. Sójové boby jsou rostlinnou potravinou, která obsahuje všech 8 esenciálních aminokyselin.

Nerozpustné sacharidy v sóji tvoří komplex polysacharidů celulózy, hemicelulóz a pektinu, a bývají označovány jako vláknina. Ve vodě rozpustné oligosacharidy (stachyóza, rafinóza) podporují růst endogenních bifidobakterií v tlustém střevě, které tyto oligosacharidy využívají. Bifidobakterie se podílejí na zlepšení střevního prostředí [2, 4].

Sójové boby jsou výborným zdrojem kompletních proteinů obsahujících významné množství esenciálních aminokyselin. 65–85 % celkových sójových proteinů tvoří glycinin a beta-konglycinin, které jsou prekursory většiny izolovaných bioaktivních peptidů. Sójové proteiny nemusí být dobře stravitelné díky přítomnosti vysokého množství inhibitorů enzymů jako inhibitor proteáz a trypsinu.

Hlavní mastnou kyselinou (MK) je esenciální kyselina linolová. V surových sójových bobech je 6krát více nenasycených MK než nasycených [9].

Aby sójové boby byly požitelné, zahrnuje výrobní proces sójových produktů kroky máčení a vaření, které zlepšují stravitelnost a nutriční hodnotu luštěnin. Máčení anebo vaření může vést ke značným ztrátám některých esenciálních živin jako ve vodě rozpustné minerály

(K, Mg, P, Fe) a vitaminy (riboflavin, niacin, pyridoxin, kyselina askorbová) vzhledem k jejich výluhu do máčecí popř. vařící vody.

Máčení snižuje množství celkových rozpustných sacharidů v bobech o 17 % a redukujících sacharidů asi o 23 %. Vaření máčených bobů vedlo k nárůstu cukrů o 34 až 44 % pro redukující cukry a o 2 až 10 % pro celkové rozpustné cukry. Zvýšení koncentrace cukrů při vaření je nejspíš způsobeno hydrolýzou škrobu na oligosacharidy a poté na monosacharidy [7].

Obsah lipidů se po máčení a vaření bobů nemění. Odslupkované sójové boby obsahují po máčení a vaření uvedené množství mastných kyselin v acylglycerolech: kyselina palmitová (11,2 % z celkového množství MK vázaných v glyceridech), kyselina stearová (3,3 %), kyselina olejová (23,0 %), kyselina linolová (55,6 %) a kyselina linolenová (7,0 %) [10].

2.1.2 Prospěšné účinky sóji

Za pozitivní účinky sóji na zdraví člověka zodpovídají především isoflavony. Epidemiologické studie dokazují, že isoflavony daidzein a genistein nalezené v sóji snižují riziko rakoviny prsu a prostaty. Příjem isoflavonů také vede k redukcí oxidace lipidů v potravíně a působí jako ochrana našeho těla proti UV záření a patogenům [4].

Další složkou, která přispívá ke správné funkci střev je vláknina. Vláknina váže v trávicím systému vodu, usnadňuje vyprazdňování, a tím snižuje riziko rakoviny tlustého střeva [2].

Bylo dokázáno, že dlouhodobý příjem sójových proteinů (i sójových isoflavonů) napomáhá snížení hladiny celkového cholesterolu v krvi a LDL cholesterolu, který hraje klíčovou roli ve zvyšování rizika srdečních onemocnění.

Vysoký příjem sójových potravin a isoflavonů je také spojen se zmírněním příznaků alergické rýmy a se zlepšením funkce plic u pacientů s astmatem [11].

Antinutriční faktory (např. inhibitory proteáz, kyselina fytová) mohou mít pozitivní účinky na zdraví jako potlačení karcinogeneze [12].

2.1.2.1 Isoflavony

Isoflavony patří mezi polyfenoly do skupiny flavonoidů. Isoflavony jsou jedním z nejdůležitějších sloučenin hojně obsažených v sóji, hlavně z důvodu jejich pozitivních účinků na zdraví, jak je uvedeno výše. Nejvíce zastoupenými isoflavony v sóji jsou genistein a daidzein. Tyto dva isoflavony jsou nejsilnějšími antioxidanty, co se týče sójových isoflavonů. A navíc jsou nejvíce účinnými fytoestrogeny v sóji.

Biologicky aktivní jsou především isoflavony ve formě aglykonů. Aglykony jsou v lidském střevě absorbovány rychleji a ve větším množství než glykosidy isoflavonů. K deglykosylaci isoflavonů může docházet během fermentace několika kmeny jako bakterie mléčného kvašení (laktobacily, bifidobakterie), basidiomycetes, vláknité houby a *Bacillus subtilis*. Tyto kmeny se vyznačují vysokou aktivitou beta-glukosidázy.

Isoflavony mají podobnou chemickou strukturu jako lidský hormon estrogen. Jsou schopny vázat se na estrogení receptory a projevovat se některými estrogeny podobnými účinky. Proto jsou klasifikovány jako fytoestrogeny [4, 13].

Isoflavony v sóji mají potenciální vlastnosti zlepšující zdraví jako zmírnění příznaků menopauzy u žen, prevence kardiovaskulárních onemocnění, antimutagení a antirakovinné účinky. Genistein blokuje rozvoj rakoviny tím, že zabrání tvorbě cév, které by poskytly

výživu pro růst nádoru. Sójové isoflavony také zabraňují ztrátám kostní hmoty, a to zejména u žen v menopauze, kdy dochází ke snížení hladiny estrogenu.

Isoflavony působí také antioxidačně, tj. vychytávají volné radikály v těle, které mohou způsobit poškození DNA, membrán a proteinů, a tím vyvolat život ohrožující onemocnění. Glyceollin, metabolit sójového isoflavonu daidzeinu, je jedním z hlavních fytoalexinů a fytoestrogenů. Jeho biologická aktivita zahrnuje antiproliferační působení vůči rakovinným buňkám prostaty a vaječníků, dále antibakteriální a protiplísňový účinek [4, 11].

2.1.3 Negativní účinky sóji

Výsledky některých studií uvádějí, že konzumace sóji nemá významný vliv na hladinu progesteronu. Jiné studie zase ukazují na snížení hladiny estradiolu po podání produktů ze sóji, další studie odhalily zvýšení nebo žádnou změnu hladiny uvedeného hormonu. Rovněž studie ukazují významné snížení, zvýšení nebo žádnou změnu v hladině testosteronu po požití sójových potravin [14].

Bylo dokázáno, že sójový protein ani isoflavony neovlivňují koncentraci reprodukčních hormonů u mužů bez ohledu na věk a na stav rakoviny. Studie ukázala, že byl pozorován zpožděný vývoj prsu u dívek s vysokým příjmem daidzeinu a genisteinu. Naproti tomu, jiné studie dokazují, že tyto fytoestrogeny mohou vyvolat předčasný pubertální vývoj dívek, u chlapců se neprokázal vliv fytoestrogenů na nástup puberty [15].

Alergie na sóju je běžná a obvykle se objevuje u mladších dětí, zvláště nemluvňat. Sója patří mezi osm nejčastějších alergenů. Hlavními proteiny v sóji způsobující alergii jsou Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Gly m 5 a Gly m 6 [16]. Alergie se projevuje kopřivkou a otokem na různých místech organismu včetně sliznice dýchacího a trávicího ústrojí. Sójové produkty jsou rozšířeně používány při přípravě jídel a není snadné se sóji vyhnout. Pozitivní je, že většina batolat trpících alergií na sóju z ní vyrostou do věku 3 let. Ačkoli jsou sójové proteiny používány do kojeneckých výživ více než 100 let, popularita sójové kojenecké výživy se významně liší v různých částech světa. Důvody k odmítání sóji se týkají nežádoucích účinků souvisejících převážně s obsahem fytátů, hliníku, stachyózy, rafinózy, a zvláště fytoestrogenů [4].

2.1.4 Antinutriční faktory v sóji

Mezi antinutriční faktory spojené s luštěninami patří inhibitory proteáz, taniny, kyselina fytová, goitrogeny, lipoxygenáza atd. Tyto antinutriční látky snižují nutriční hodnotu luštěnin. Syrové sójové boby jsou goitrogenní, protože narušují metabolismus jódu a funkci štítné žlázy, a to vede ke vzniku strumy. Kyselina fytová může blokovat sorpci minerálů jako vápník, železo a zinek.

Snížení antinutričních faktorů (ANF) se provádí pro ně specifickými metodami. Snížení faktorů způsobujících nadýmání se dosáhne pomocí máčení a vaření bobů. Aktivita inhibitorů proteáz (trypsinu) se výrazně snižuje při vaření bobů a s časem inkubace při fermentaci bobů. Taniny nacházející se převážně v obalových vrstvách bobů se odstraňují v rámci předběžných úprav hlavně loupáním. V loupáných, vařených a fermentovaných bobech nebyly detekovány žádné taniny. Obsah kyseliny fytové se snižuje loupáním, během máčení a fermentace bobů [3, 17].

2.1.5 Výrobky ze sóji

Sójových produktů je celá řada. Lze je rozdělit do dvou skupin, a to na nefermentované (čerstvé nebo dehydratované sójové boby, sójové klíčky, sójová mouka, sójové mléko a jejich produkty, tofu, pečené a smažené sójové boby, sójový prášek, sójové máslo a olej) a fermentované výrobky (japonské miso a natto, sójová omáčka, tempeh a fermentované tofu). Na Obr. 1 je schéma znázorňující postupy při zpracování sóji na různé sójové produkty [4].

Fermentované sójové produkty a sójové jogurty jsou bohaté na probiotika, a tudíž lehce stravitelné [18]. Sójové mléko obsahuje 8 esenciálních aminokyselin. Kojenecká strava založená na sóji se používá pro kojence alergické na proteiny v kravském mléce.

Sójové boby jsou také využívány v mnoha průmyslových produktech včetně olejů, mýdel, kosmetiky, pryskyřice, plastů, inkoustu, rozpouštědel a oblečení. Sójový olej je základním zdrojem bionafty v USA. Sójové boby jsou také používány jako fermentační materiál při výrobě vodky.



Obr. 1: Diagram znázorňující zpracování sóji na komerční sójové produkty. Upraveno dle [4].

Produkce sójových výrobků se uskutečňuje moderními technikami ve velkých potravinářských firmách nebo tradičními postupy v malém měřítku v domácnostech [4].

2.2 Fermentace sóji

Fermentační technologie se používá již po staletí ke zpracování potravin jako konzervační metoda. Fermentace obecně přispívá ke zlepšení kvality potravin (chuti, aroma a struktury), k delší skladovatelnosti, zvýšení výživové hodnoty a bezpečnosti. Hlavním cílem fermentace obilovin a luštěnin není jejich konzervace, ale především úprava jejich organoleptických a výživových vlastností [12, 19].

Fermentace zlepšuje stravitelnost sójových proteinů. Během tohoto procesu jsou produkovány proteolytické enzymy mikroorganismy. Díky těmto enzymům dochází k hydrolýze proteinů na peptidy a volné aminokyseliny. Peptidy ve fermentovaných sójových produktech vykazují bioaktivní vlastnosti jako antioxidační, antihypertenzivní, antirakovinné, antidiabetické a antimikrobiální. Bioaktivní peptidy jsou během fermentace produkovány buď startovací kulturou, nebo vznikají hydrolýzou sójových proteinů. Specifické startovací kultury jsou zodpovědné za produkci specifických peptidů [20].

Ačkoli jsou sójové boby bohatým zdrojem rostlinných proteinů, jejich nutriční hodnoty jsou omezeny antinutričními vlastnostmi. Fermentace nejenže vede k redukci antinutričních faktorů, ale snižuje také množství toxinů.

Neméně důležitou mikroflórou při fermentačním procesu jsou bakterie mléčného kvašení (LAB). Sójové boby jsou vhodným substrátem pro LAB. Tyto bakterie upravují složení sóji během fermentace: mohou způsobit zvýšení biologické dostupnosti isoflavonů, zvýšit stravitelnost oligosacharidů [21].

2.2.1 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zachytit volné radikály uvnitř jejich struktury a zabránit tak oxidaci. Volné radikály jako superoxidy, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a peroxylový radikál způsobují mnoho poruch jako rakovina, cukrovka, ateroskleróza, artritida a mnoho neurodegenerativních onemocnění.

Většina studií zabývajících se antioxidačními vlastnostmi fermentovaných sójových bobů ukazuje, že zvýšení polyfenolů (isoflavony, fenolové kyseliny a flavanoly) je zodpovědné za zvýšení antioxidační vlastnosti. Studie ukazují i na to, že volné aminokyseliny a peptidy patří také mezi faktory zodpovědné za antioxidační aktivitu společně s polyfenoly. Během fermentace při výrobě tempehu vzrostl obsah volných aminokyselin a peptidů. Antioxidační aktivita tedy roste s dobou fermentace tempehu.

Zvýšení antioxidační vlastnosti u fermentovaných sójových bobů závisí na organismech použitých při fermentaci. Např.: bylo dokázáno, že přítomnost směsi proteolytických MO (*Bacillus* sp. a plísně) během fermentace vede ke zvýšení celkové antioxidační aktivity [20].

Zatímco v bobech jsou za zdroj antioxidantů považovány isoflavony, v tempehu byla navíc objevena další antioxidační sloučenina, a to 3-hydroxyanthranilová kyselina (HHA). Její koncentrace roste během fermentace za přítomnosti *Rhizopus oligosporus*. HAA je zodpovědná za autooxidační stabilitu tempehu [22, 23].

Antioxidanty mohou také zpomalovat oxidační žluknutí způsobené atmosférickou oxidací a tím chránit oleje, tuky a v tučích rozpustné sloučeniny jako vitaminy (vitamin E), karotenoidy, a další výživové složky potravin. Bylo sledováno, že tradiční asijské fermentované sójové produkty byly více stabilní proti oxidaci lipidů než nefermentované vařené sójové boby [4, 22].

2.3 Tempeh

Tempeh je fermentovaný produkt pocházející z Indonésie a je jedním z nejdůležitějších produktů této země. Dále je také populární v Malajsii, Japonsku, Koreji, Singapuru, Kanadě, Holandsku, Západní Indii a Spojených státech. Vyrábí se fermentací vařených sójových bobů

za použití plísně rodu *Rhizopus* jako startovací kultury. Nejčastěji se v Indonésii využívá druhu *Rhizopus oligosporus* [1, 3, 5]. Mycelium plísně lemuje sójové boby za vzniku bílého kompaktního koláče (viz. Obr. 2), který se vyznačuje čerstvou vůní a kvasnicovým aroma [12].



Obr. 2: Tempeh [24]

Tempeh si svou oblíbenost získal nejen díky jeho vysoké nutriční hodnotě, ale také kvůli chuti, stravitelnosti a jako vysoce kvalitní náhražka masa pro vegetariány po celém světě. Díky svým nutričním vlastnostem je tempeh součástí zdravé výživy [12, 25].

Na rozdíl od jiných regionálních fermentovaných produktů jako miso, sójová omáčka a natto, které jsou hlavně používány jako ochucovadla, barviva, přílohy a koření, tempeh je konzumován jako hlavní jídlo [3]. Tempeh je obvykle podáván smažený, vařený (v polévce), pečený nebo dušený. Tempeh má při přípravě pokrmů všestranné použití. Může být servírován s obilninami a vejci jako snídaně nebo do salátů, sendvičů, hamburgerů, omáček nebo polévek [12].

Existuje několik druhů tempehu v závislosti na výchozím surovém materiálu, nejznámější je tempeh ze sójových bobů. Kromě sójových bobů lze použít další substráty pro fermentaci: cizrna, ječmen, fazole, kukuřice [19, 26].

2.3.1 Proces přípravy tempehu

Tradiční tempeh se vyrábí z vařených a loupaných sójových bobů, které jsou fermentovány za přítomnosti startovací kultury plísně *Rhizopus* sp. Po fermentaci je tempeh stlačován do bloků, které mají buď žlutou nebo tmavou (černou) barvu. Barva závisí na druhu sóji a na použité plísni [27].

Tradiční výroba tempehu se skládá ze dvou hlavních kroků, prvním je máčecí proces a druhý je plísňová fermentace.

Sójové boby se musí zbavit slupek, protože *Rhizopus* sp. není schopen růst na celých bobech. Loupání se provádí za mokra nebo za sucha. Loupání za mokra se uskutečňuje po částečném vaření, které umožní hydrataci sóji. Tento proces se provádí manuálně, tudíž není

vhodný při výrobě tempehu ve velkém měřítku. Při procesu suchého loupání je sója zahřáta na 93 °C po dobu 10 min, dojde ke svaštění vnitřku bobu a slupka se uvolní. Po suchém odslupkování následuje oddělení slupek od zbytku bobů, to se provádí pomocí gravitačního separátoru nebo prosívání. Následuje proces hydratace, při kterém jsou boby máčeny v přebytku vody po dobu 12–15 hodin při pokojové teplotě, aby se usnadnilo pronikání mycelia. Během máčení dochází k bakteriální fermentaci, což vede k okyselení. Někteří autoři udávají použití kyseliny mléčné nebo octové ke snížení pH umožňující růst plísně a zároveň potlačení růstu bakterií. Plíseň není inhibována, dokud je pH nižší než 3,5.

Dalším krokem je vaření. Dochází při něm k ničení kontaminujících bakterií, které by mohly narušit fermentaci. Dále k odstranění antinutričních faktorů jako jsou inhibitory trypsinu a chymotrypsinu a k uvolnění některých živin potřebných pro růst plísně. Var se provádí v přebytku vody, umožňuje usnadnění pronikání plísně a zlepšuje stravitelnost. Doba vaření je různá, pohybuje se mezi 10 min až 3 hodinami při teplotě 100 °C. Uvařené boby se scedí pomocí sít. Přebytková voda podporuje růst bakterií a kažení tempehu. V Malaysii se boby suší pomocí plátna, jiní výrobci zas pokrývají boby pšeničnou moukou. Před inokulací musí být boby ochlazeny na 38 °C. Jako fermentační nádoby mohou sloužit banánové listy, listy tropických mandlí, dále nádoby ze dřeva nebo nerezové oceli.

V Indonésii se tradičně k zaočkování sójových bobů používají malé kousky tempehu z předchozí inokulace. Ve Spojených státech se k inokulaci používají spory plísně *R. oligosporus*. Nejrozšířenějším používaným kmenem je *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. K výrobě sójového tempehu lze použít i další druhy rodu *Rhizopus*: *R. oryzae*, *R. chinensis* a *R. arrhizus*.

Podmínky inkubace jako je teplota, doba trvání a relativní vlhkost ovlivňují kvalitu výsledného produktu. Teplota inkubace se pohybuje v rozmezí od 25 do 37 °C a doba trvání od 20 do 80 hod. Doba fermentace je nepřímě úměrná zvýšení teploty. Stabilita při skladování tempehu může být prodloužena sušením, smažením, dehydratací, zmražením nebo vařením v páře [3].

Metody produkce tempehu se liší v závislosti na oblasti výroby i jednotlivých výrobců. Složení bakteriálního společenství a druh plísně je u jednotlivých výrobců různé. Např. v Indonésii se tempeh vyrábí za přítomnosti vzduchu, při fermentaci rostou přirozeně se vyskytující bakterie, které přispívají k rozdílu v senzorické kvalitě tempehu [1].

2.3.2 Nutriční charakterizace tempehu

Kromě toho, že je tempeh bohatým zdrojem proteinů a lipidů ve vegetariánské stravě, stal se předmětem zájmu díky jeho pozoruhodným nutričním i funkčním vlastnostem. Sójový tempeh obsahuje 19,5 % proteinů, z toho 56 % jsou využitelné bílkoviny. Co se týče sušiny, složení tempehu je následující: asi 55 % hrubých bílkovin, 14 % lipidů, 28 % sacharidů, 3 % vlákniny a 3 % popela [3, 4].

2.3.2.1 Lipidy

Rhizopus sp. produkuje různé enzymy včetně karbohydráz, lipáz, proteáz a fytáz. *Rhizopus oligosporus* má silnou aktivitu lipáz hydrolyzujících přes třetinu neutrálních tuků v sóji během fermentace. Množství mastných kyselin v glyceridech se snižuje s časem a s rostoucí teplotou inkubace. Během fermentace se tedy zvyšuje množství volných MK. Majoritními

MK jsou olejová a linolové a minoritními palmitová, stearová a linolenová. Bylo zjištěno, že zastoupení MK v tempehu a sójových bobech je podobné, ale tempeh obsahuje vyšší množství olejové a linolové kyseliny a nepatrně nižší množství minoritních MK.

Během fermentace tempehu dochází v závislosti na teplotě ke snížení celkového obsahu lipidů. Lipidy slouží jako hlavní zdroj energie pro MO během fermentace. Snížení celkových lipidů závisí na růstové rychlosti MO. *R. oligosporus* má optimum růstu mezi 35 a 37 °C. Při této teplotě bylo pozorováno největší snížení celkových lipidů. Nastavením teploty inkubace a dalších podmínek při fermentaci lze ovlivnit profil MK [3, 10].

2.3.2.2 Proteiny

25 % z počátečního množství sójových proteinů podléhá hydrolýze [5]. S rostoucím časem fermentace se zvyšuje obsah volných aminokyselin a amoniaku [3]. Hydrolyzáty sójových proteinů snadněji absorbují ve střevě než intaktní proteiny a jsou tedy lépe stravitelné. Proteiny jsou hydrolyzovány enzymy MO (např. *Rhizopus* sp. a *Bacillus subtilis*). Nejjednodušším způsobem odbourávání bílkovin je využití proteolytických enzymů LAB [28]. Asi 65 % z hydrolyzovaných proteinů zůstává v tempehu jako aminokyseliny a peptidy, 25 % je asimilováno do plísňové biomasy a 10 % je oxidováno. Stupeň hydrolýzy silně závisí na plísňovém kmeni a na fermentačních podmínkách [12].

2.3.2.3 Sacharidy

Během máčení a vaření se v sójových bobech snižuje koncentrace sacharózy, stachyózy a rafinózy. Máčecí voda potom obsahuje monomerní jednotky těchto sacharidů: glukózu, fruktózu a galaktózu. Glukóza slouží jako hlavní substrát pro růst MO. Během fermentace bobů se snižuje množství škrobu a oligosacharidů způsobujících plynatost (rafinóza, stachyóza), dochází také k poklesu galaktózy, glukózy, fruktózy a maltózy [3, 17].

2.3.2.4 Minerály

Koncentrace minerálních látek jako vápník, fosfor, železo, měď, zinek, hořčík a mangan se zvyšuje s časem fermentace, ale dochází k velkému úbytku draslíku kvůli jeho unikání do vody. Zvýšení obsahu minerálů by mohlo být důsledkem poklesu hladiny kyseliny fytové během procesů máčení, vaření a fermentace, která snižuje biologickou dostupnost minerálů tím, že má silné chelatační vlastnosti. Konzumace tempehu vede ke zvýšení hladiny železa v játrech ve srovnání s nefermentovanou sójou [3].

2.3.2.5 Vitaminy

Tempeh obsahuje riboflavin, niacin, pyridoxin a pantothenovou kyselinu. Fermentace snižuje koncentraci thiaminu na nedetekovatelnou úroveň, nicméně koncentrace riboflavinu a nikotinové kyseliny významně roste díky jejich syntéze *R. oligosporus*. Tato plíseň také produkuje ergosterol, který nebyl detekován v sójových bobech. Vitamin B₁₂ je produkován bakterií *Klebsiella pneumoniae*, která je žádoucím a nezbytným MO v přirozeném fermentačním procesu. Během fermentace se tvoří v malém množství karotenoidy, obsah vitaminu K1 a E v sóji se nemění [3, 29].

2.3.3 Mikrobiální složení tempehu

Mikroflóra sójového tempehu je velmi komplexní a začíná se rozvíjet během namáčení syrového materiálu. Mikrobiologické složení tempehu je ovlivněno mnoha faktory: okyselení bakteriemi mléčného kvašení během namáčecí fáze, letální účinek vaření, kontaminace způsobená manipulací během chlazení, složení a životnost inokula, omezení přestupu tepla a hmoty během fermentace, způsob přípravy tempehu, inkubační podmínky a podmínky při skladování hotových výrobků.

Mikrobiální zastoupení se liší od výrobce k výrobcí, např. tempeh z Malajsie obsahuje vysokou hladinu LAB. Bakteriální společenství se významně liší v různě připravených tempezích ve srovnání se složením plísni. To je pravděpodobně způsobeno tím, že plísně byly použity jako startovací kultura, zatímco bakterie mohly být přirozeně získány z fermentačního prostředí. Změny v mikrobiálním složení tempehu tedy závisí na postupu a prostředí výroby a také na materiálu, který výrobci používají [1].

Složení mikroflóry se také mění během doby skladování. Čerstvý tempeh obsahuje vysoký počet mesofilních aerobních bakterií, dále enterobakterie, stafylokoky a kvasinky. Během skladování v chladničce se mohou rozvíjet psychrotrofy [12].

Kromě rodu *Rhizopus*, který se používá jako startovací kultura při výrobě tempehu, byly v tradičním tempehu nalezeny různé MO, včetně vláknitých hub, kvasinek a bakterií. Některé z přítomných bakterií vedou ke zlepšení kvality produktu, např. *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae* mohou zvyšovat obsah vitamínu B₁₂ a *Micrococcus* sp. nebo *Arthrobacter* sp. hrají roli ve vzniku isoflavonů [5, 26].

Během máčení a fermentační fáze dochází k růstu počtu kvasinek a LAB, jenž jsou běžným mikrobiálním společenstvím během produkce tempehu, a maximální množství obou těchto populací bylo nalezeno v konečném produktu [30].

2.3.3.1 Bakterie mléčného kvašení

Převládajícími MO během fáze máčení jsou bakterie mléčného kvašení. LAB se v sóji vyskytují přirozeně, ale také se může provádět naočkování tempehu LAB za účelem zvýšení bezpečnosti produktu nebo také urychlení fermentačního procesu [25, 28].

Výsledkem mléčné fermentace je zvýšení množství organických kyselin. Snížení pH přispívá k potlačení růstu nežádoucích bakterií.

LAB jsou schopny produkovat antimikrobiální sloučeniny – bakteriociny [12, 25]. Z malajského tempehu byly izolovány dva bakteriociny proteinové povahy z *Enterococcus faecium*, které vykazují inhibiční aktivitu proti *Listeria monocytogenes*. Tyto bakteriociny jsou tepelně stabilní. Antimikrobiální peptidy mohou být použity jako konzervační látky do potravin nebo mohou být alternativou antibiotik k prevenci bakteriálních či plísňových onemocnění. Lunasin (slibný antirakovinový peptid) se nachází v tempehu, ale také v tofu, sójovém mléce a sójové kojenecké výživě [17].

Většinu LAB v tempehu tvoří heterofermentativní laktobacily, které převažují v každé fázi produkce tempehu. Ve finálním produktu byl identifikován *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactaci*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* [19, 25, 28]. Všechny uvedené bakterie jsou řazeny mezi probiotika [31].

LAB byly nalezeny ve všech fázích výroby tempehu včetně finálního výrobku. Ve fázi namáčení a při plísňové fermentaci hrají důležitou roli ve snížení úrovně patogenních bakterií a bakterií způsobujících kažení tempehu [30].

2.3.3.2 Plísně

Mimo startovací kulturu *Rhizopus oligosporus* byly v tempehu identifikovány i další druhy tohoto rodu: *R. formosaensis*, *R. oryzae*. Předpokládá se, že přirozeným prostředím pro tyto druhy jsou čerstvé listy ibišku (*Hibiscus* sp.), které slouží jako obaly na vařené boby [5]. Plísně rodu *Rhizopus* produkují karbohydrázy (polygalakturonáza, endoceluláza, xylanáza, arabináza, α -D-galaktosidáza, α -D-glukosidázy), lipázy, proteázy a další enzymy. Produkce pektináz a amyláz plísněmi nejsou prokázány. Karbohydrázy degradují cukry v bobech, zejména oligosacharidy a škrob [3, 17].

2.3.4 Změny vlastností tempehu

Vlastnosti tempehu jsou především výsledkem enzymatické aktivity MO užívaných při jeho produkci a výsledkem biotransformace složek sóji. MO se podílejí na formování chuti a organoleptických vlastností výrobku. Rozkladem proteinů v sójových bobech během fermentace vytvářejí unikátní aroma fermentované sóji [5, 32].

Chuť produktu také závisí na době fermentace, použitém substrátu a na procesu smažení. Procesem smažení se chuť tempehu mění na ořechovou v důsledku přítomnosti volných mastných kyselin a zároveň dochází k úbytku těchto kyselin. Při smažení dochází k významnému snížení celkového obsahu isoflavonů, aminokyselinové složení se nemění, dochází ke snížení množství oligosacharidů [3, 17].

Přítomnost bakterií zapojených v procesu výroby ovlivňuje vznik hořkosti. Hořká chuť tempehu je ve vyšší intenzitě nežádoucí. Stupeň hořkosti se liší mezi jednotlivými výrobci, přestože používají tu samou surovinu a inokulum. Proteázy z různých druhů *Bacillus* sp. produkují odlišné volné aminokyseliny, jejichž přítomnost způsobuje odlišné sensorické vlastnosti potravin ze sóji. Mezi identifikované bakterie, které mohou způsobovat změny v chuti tempehu patří *Klebsiella* sp., *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. atd. [26].

2.4 Molekulárně diagnostické metody

Přítomnost mikroorganismů v potravinách lze prokázat pomocí molekulárně diagnostických metod. Tyto metody jsou vysoce specifické, citlivé, jednoduché a robustní. Nejrozšířenější metodou ve výzkumných a diagnostických laboratořích je polymerázová řetězová reakce (PCR) a postupy založené na této metodě. Metoda PCR umožňuje generovat dostatečné množství genetického materiálu k detekci a kvantifikaci specifických genů a skupin genů.

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Princip polymerázové řetězové reakce vychází z replikace nukleových kyselin. Podstatou této metody je cyklicky se opakující syntéza vybraného úseku dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Amplifikací vybraného úseku DNA in vitro získáme požadovanou a specifickou sekvenci DNA v mnoha identických kopiích. Vybrané úseky komplementárních vláken denaturované DNA jsou vymezeny připojením dvou

primerů, od nichž probíhá syntéza nového řetězce DNA. Na protilehlé řetězce DNA se primery vážou tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Syntéza nových vláken DNA na obou matricových řetězcích probíhá protisměrně a je katalyzována DNA-polymerázou.

DNA-polymeráza je izolována z termofilních mikroorganismů, které odolávají vysokým teplotám, při nichž dochází k denaturaci DNA. Díky tomu může syntéza DNA probíhat opakovaně formou cyklů. Kromě DNA-polymerázy obsahuje reakční směs tyto komponenty:

- PCR voda – na doplnění PCR směsi do požadovaného objemu.
- PCR pufr – zajišťuje optimální prostředí pro DNA-polymerázu; obsahuje ionty Mg^{2+} , které ovlivňují specifickou reakci.
- dNTP (2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát) – základní kameny pro syntézu nového řetězce DNA.
- Primery – synteticky připravené oligonukleotidy (10–30 nukleotidů); jsou komplementární ke krajním úsekům templátové DNA, která je určena k amplifikaci. Specifita PCR závisí na volbě primerů.
- DNA-templát – slouží jako matrice, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery.

PCR tedy probíhá v cyklech. Každý cyklus se skládá ze tří kroků, které se pravidelně střídají. Jednotlivé kroky se liší teplotami reakční směsi a probíhajícími ději:

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C)
- připojení (hybridizace) primerů k odděleným řetězcům DNA (50–65 °C)
- syntéza nových řetězců DNA katalyzovaná DNA-polymerázou (65–75 °C)

Postupným opakováním těchto tří kroků se exponenciálně (2^n ; n =počet cyklů) syntetizuje až 10^9 kopií vybraného úseku cílové molekuly DNA. Celkový počet cyklů závisí na výchozí koncentraci templátové (matricové) DNA a pohybuje se nejčastěji v rozmezí 25–35 cyklů. Polymerázová řetězová reakce se provádí v termocykleru, ve kterém se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech.

Zdrojem DNA pro polymerázovou řetězovou reakci mohou být různé biologické materiály např. buňky z tkáňových kultur, kultury mikroorganismů, hrubé extrakty z krve, tělní tekutiny atd.

Produktem PCR jsou úseky DNA o definované délce (obvykle desítky až tisíce párů bází) označované jako amplikony. Přítomnost specifických amplikonů v reakční směsi se prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforetickou separací na agarózovém gelu, Southernovou hybridizací, stanovením sekvence DNA nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (qPCR) [33].

2.4.2 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase (qPCR) je jednou z modifikací polymerázové řetězové reakce. Na rozdíl od konvenční polymerázové řetězové reakce qPCR umožňuje přímou kvantifikaci specifického úseku DNA v průběhu reakce. V případě konvenční PCR je množství PCR produktu detekováno až po skončení amplifikace elektroforeticky. Zatímco metoda qPCR umožňuje změřit množství PCR produktu po každém amplifikačním cyklu.

2.4.2.1 Princip metody

Podstatou qPCR je stejně jako u konvenční PCR cyklicky se opakující syntéza nových řetězců specifických úseků dsDNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím enzymu DNA-polymerázy. Složení PCR směsi je obdobné s konvenční PCR, ale je zde navíc obsažena jedna z fluorescenčních látek (viz. dále). Během amplifikace se fluorescenční barvivo váže, buď přímo nebo nepřímo prostřednictvím značené hybridizační sondy, ke vznikajícím molekulám dsDNA. Fluorescenční barvivo umožňuje detekovat množství vznikajícího produktu PCR během reakce zvýšením hodnoty fluorescence. Intenzita fluorescenčního signálu je přímo úměrná koncentraci DNA.

Výhodou této metody je možnost stanovení výchozího počtu kopií templátové sekvence DNA čili schopnost kvantifikace. Kvantifikace se provádí prostřednictvím analýzy tzv. amplifikačních křivek, které vzniknou vynesáním naměřené fluorescence oproti příslušnému cyklu. Amplifikační křivka je esovitě zakřivená (Obr. 3 vlevo). Průběh křivky lze rozdělit na tři části, které znázorňují fáze amplifikace PCR:

1. Fáze pozadí – baseline

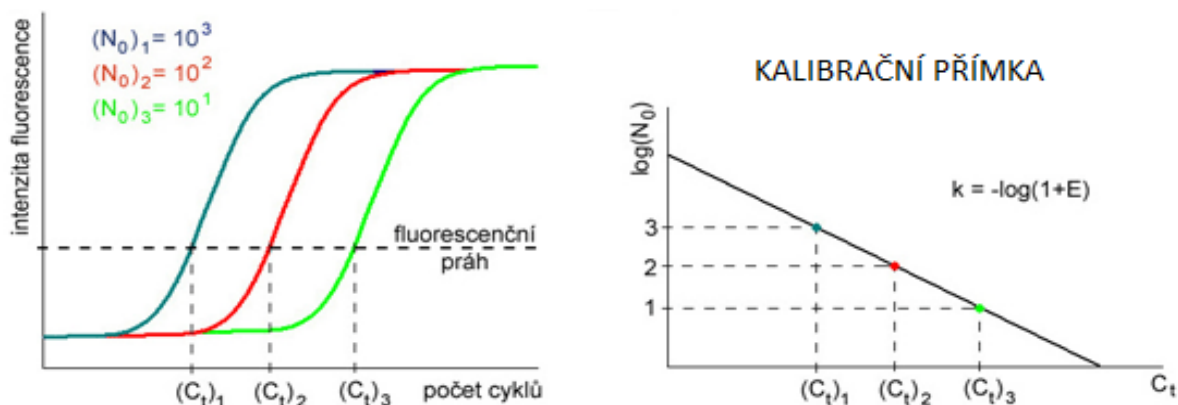
V této fázi není fluorescence zatím detekována, protože množství PCR produktu je nízké.

2. Exponenciální fáze

Na počátku této fáze bylo dosaženo prahu detekce. Množství produktu PCR roste exponenciálně a tím dochází i k růstu fluorescence. Tato fáze trvá asi 4–8 cyklů.

3. „Plató“ fáze

Nastává při saturaci systému (např. dojde-li ke spotřebování některých komponentů reakce); množství naamplifikovaného produktu se nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.



Obr. 3: Amplifikační a kalibrační křivka [34]

Jak již bylo uvedeno výše, pro kvantitativní detekci produktu během PCR se používají fluorescenční látky. Jedná se o tři metody založené na použití:

- interkalačního barviva (např. SYBR Green I, SYTO-9)
- fluorescenčně značených sond (např. TagManTM sondy, molekulární majáky)
- fluorescenčně značených primerů (např. AmpliFluorTM, technologie LUX)

V případě interkalačního barviva je detekce založená na začlenění barviva do dvoušroubovice DNA, která vzniká po připojení primeru na ssDNA matrici a syntéze nového řetězce DNA (produktu PCR). Během amplifikace se barvivo váže k postupně vznikajícím produktům PCR. Signál fluorescence se tedy zvyšuje s rostoucí koncentrací amplikonů. Nevýhodou této metody je, že barviva se váží na jakoukoli dsDNA vznikající během amplifikace, včetně dimerů primerů. Nelze tedy rozlišit nespecifické produkty PCR od specifických.

PCR v reálném čase se provádí v termocyklerech, které mimo provádění amplifikace umožňují také detekci fluorescence.

Jelikož jsou interkalační barviva nespecifická, provádí se po ukončení qPCR metoda analýzy křivek tání. Tato kvalitativní analýza produktů PCR umožňuje zjistit, zda jsou produkty specifické nebo nespecifické. Analýza tání se provádí za využití fluorescenčního barviva. S rostoucí teplotou dochází k denaturaci dsDNA, v důsledku toho se uvolňuje fluorescenční barvivo a dochází k poklesu intenzity fluorescence. Vynesením klesající intenzity fluorescence v závislosti na teplotě do grafu se získá křivka tání. Po derivaci křivky tání se stanoví teplota tání daného amplikonu. Na základě teploty tání lze ověřit, zda je produkt PCR specifický. Nespecifické produkty mají odlišnou hodnotu teploty tání (obvykle nižší) než specifické produkty, tím je lze detekovat [35, 36].

Nejdůležitějším parametrem qPCR je hodnota nazývaná „threshold cycle“ nebo hodnota C_t . Je to bod, ve kterém je fluorescence poprvé detekována jako statisticky významná hodnota nad fází pozadí (baseline). Čím dříve dojde k překročení limitu detekce fluorescence, tím vyšší je výchozí počet molekul DNA ve vzorku. Pro kvantifikaci množství DNA ve vzorcích se využívá nepřímo úměrná závislost logaritmu počátečního počtu templátových kopií (N_0) na C_t hodnotě (Obr. 3 vpravo). Jedná se o metodu absolutní kvantifikace.

2.4.2.2 Absolutní kvantifikace

Metoda absolutní kvantifikace spočívá v dodání série standardů o známé koncentraci u každé reakce, aby bylo možné stanovit absolutní množství cílové nukleové kyseliny. Se sérií roztoků standardů se provede qPCR a získáme kalibrační přímku, která se použije ke stanovení výchozí koncentrace DNA analyzovaného vzorku ze známé hodnoty C_t .

Kalibrační přímku je charakterizována parametry (reakční účinnost, korelační koeficient, sklon kalibrační křivky), ze kterých lze zjistit, do jaké míry je kvantifikace účinná. Reakční účinnost (E) se vypočítá ze sklonu kalibrační křivky. Sklon kalibrační křivky (M) je obecně přijatelný v rozmezí hodnot $-3,9$ až $-3,0$ a to odpovídá účinnosti 80–110 %. Korelační koeficient (R^2) je ukazatelem přesnosti reakce a jeho hodnota má být $\geq 0,985$. Při splnění optimálních parametrů charakterizujících kalibrační křivku je dosaženo účinnosti kvantifikace.

2.4.2.3 Relativní kvantifikace

Dalším vyhodnocením množství templátové DNA je relativní kvantifikace, která udává poměr mezi množstvím výchozí DNA ve vzorku a množstvím kontrolního vzorku [35, 36].

2.5 Metody stanovení nutriční hodnoty potravin

Chemické složení potravin se stanovuje pomocí analytických metod. Při nutriční analýze se využívá nejčastěji chromatografických a spektrofotometrických metod [37].

2.5.1 Stanovení sacharidů

Sacharidy se z potravinářských surovin a potravin izolují většinou extrakcí. Cukry jsou spolu s dalšími látkami rozpustné ve vodě, jako extrakční činidlo se tedy používá voda nebo vodné roztoky alkoholů. Aby došlo k dokonalé extrakci, musí být materiál jemně rozemlet pomocí mlýnků a homogenizátorů. Získané cukerné extrakty se pro další stanovení musí upravit, aby došlo k odstranění opticky aktivních látek, bílkovin a k odbarvení roztoků cukrů.

K tomu se používají chemická a fyzikální činidla např. octan olovnatý, dusičnan olovnatý, Carrezovy roztoky. Vyčiřený roztok se potom dále použije pro jednotlivá stanovení sacharidů.

V potravinářství se sacharidy často stanovují pomocí spektrálních metod ve viditelné oblasti spektra – metoda stanovení redukujících sacharidů podle Nelson-Somogyiho, metoda podle Duboise, metoda s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou.

Stanovení redukujících cukrů je nejčastěji založeno na jejich schopnosti redukovat v alkalickém prostředí měďnaté sloučeniny na oxid měďný. Metody stanovení celkového obsahu cukrů jsou založeny na rozkladu cukrů v silně kyselém prostředí za vyšší teploty, poté následuje reakce, která se projeví zabarvením reakčního roztoku. Sacharidy lze dále analyzovat pomocí chromatografických metod (kapalinová a plynová chromatografie), volumetrických metod (Bertrandova metoda, Ofnerova metoda, Luffova-Schoorlova metoda), pomocí polarimetrie, kapilární elektroforézy nebo gravimetrie [38, 39, 40].

2.5.2 Stanovení lipidů

V analýze potravin se jako lipidy označují všechny látky, které se v podmínkách analýzy extrahují lipofilními rozpouštědly (např. diethylether, petrolether, chlorované uhlovodíky). K těmto látkám patří acylglyceroly neboli tuky, vosky, složené lipidy (fosfolipidy, glykolipidy), lipoproteiny, steroidy, terpeny, vitaminy rozpustné v tucích, mastné kyseliny atd. V potravinářské praxi se nejčastěji stanovuje celkový obsah lipidů nebo obsah a složení tuků v potravině. Stanovení celkových lipidů se provádí extrakcí dle Soxhleta, Folche, Grossfelda atd. Dříve spočívala analýza tuků a olejů ve stanovení tzv. tukových čísel, která jsou měřítkem obsahů různých funkčních skupin. Dnes se stanovení složení lipidů provádí chromatografickými metodami, které podávají přesnější informace o analyzovaném materiálu. Např. stanovení mastných kyselin se provádí metodou plynové chromatografie [37].

2.5.3 Stanovení dusíkatých látek

Dusíkaté látky vyskytující se v potravinách jsou anorganické (amonné soli, dusitany, dusičnany, amoniak) nebo organické (bílkoviny, aminokyseliny, purinové a pyrimidinové báze atd.). Z hlediska analýzy potravin jsou důležité především výživové složky, a to bílkoviny. Obsah bílkovin v potravinách lze zjistit stanovením celkového obsahu dusíku vyjádřeného tzv. hrubou bílkovinou. Hrubou bílkovinu lze stanovit po mineralizaci vzorku na amoniakální formu Kjeldahlovou, Winklerovou nebo Dumasovou metodou, popř. spektrofotometrickým stanovením Nesslerovým činidlem. Bílkoviny, které jsou rozpustné

v roztoku, můžeme stanovit spektrofotometricky dle Folina-Ciocalteua, biuretovou reakcí, metodou dle Bradfordové aj. Nevýhodou těchto metod je, že hodnota hrubé bílkoviny v sobě zahrnuje i dusíkaté látky nebílkovinné povahy a neříká tedy nic o nutriční hodnotě analyzovaného vzorku. Přesnější údaje o nutriční hodnotě bílkoviny poskytuje aminokyselinové složení bílkovin. Po hydrolýze bílkovin jsou jednotlivé aminokyseliny analyzovány chromatograficky [40].

2.5.4 Stanovení vitaminů

Neexistuje jednotná metoda pro stanovení celé skupiny vitaminů, protože vitaminy mají heterotrofní chemické struktury. Vitaminy se v potravinách vyskytují v malých koncentracích, a proto je jejich analýza náročná. Vitaminy rozpustné ve vodě se z potravin extrahují pomocí vody, zředěných kyselin nebo pufrů. K extrakci vitaminů rozpustných v tucích se používají některá organická rozpouštědla, vitaminy se stanovují po jejich zmýdelnění. Vitaminy lze stanovit např. spektrofotometricky, kapalinovou a plynovou chromatografií [37].

2.5.5 Stanovení polyfenolů a celkové antioxidační aktivity

Metody stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin a posouzení jejich antioxidační aktivity jsou založeny na dvou principech, buď se jedná o metodu sledující inaktivaci volných radikálů, nebo o metodu měřící redukční schopnost antioxidantů. Příkladem metod měřících redukční schopnost je metoda založená na schopnosti antioxidantů redukovat železitě ionty nazývaná FRAP nebo stanovení celkových fenolů pomocí Folinova-Ciocalteuova činidla.

Někdy je obtížné odlišit, zda reakce probíhá jako reakce redukční nebo na základě předání vodíkového atomu, a často oba tyto mechanismy probíhají současně. Metody, u nichž se mohou uplatňovat oba reakční mechanismy, jsou založené na inaktivaci DPPH a ABTS radikálů. Tyto dvě metody spočívají v reakci činidel (DPPH, ABTS) s jinou látkou (peroxid vodíku, ferrokyanid nebo persíran). Činidla poté přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku se redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení je přímo úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem antioxidační aktivita v přítomnosti samotného askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů [41].

Společně s určením celkové antioxidační aktivity se většinou provádí stanovení specifických antioxidantů ve vzorcích. Analyzuje se obsah vitaminů C a E, celkový obsah karotenoidů a celkový obsah fenolických látek, event. jednotlivě obsah flavonoidů. Celkové polyfenoly se většinou určují spektrofotometricky s využitím tzv. Folin-Ciocalteuova činidla, lze využít také PBM (metoda Price a Butlera) nebo AAPM (s 4-aminoantipyrinem) metody. Ke stanovení celkového obsahu flavonoidů lze použít metodu s hlinitou solí a dusitanem. Identifikaci a kvantifikaci jednotlivých fenolických látek lze provést pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [42, 43].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla charakterizace a identifikace přítomných mikroorganismů obsažených v komplexní potravinové matrici, konkrétně ve fermentovaném sójovém sýru tempeh s následným zhodnocením vlivu fermentace jako přidané nutriční hodnotě potravinového výrobku.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Vypracování literární rešerše zabývající se charakteristikou sójových výrobků a účinných látek v nich obsažených, dále popisem vybraných nutričních parametrů a postupů jejich stanovení a možnostmi analýzy mikrobiálního složení výrobků pomocí různých molekulárních metod.
- 2) Stanovení vybraných nutričních parametrů v různých vzorcích sýru tempeh.
- 3) Izolace DNA z komplexní potravinové matrice s následnou identifikací obsažených mikroorganismů.
- 4) Zhodnocení vlivu fermentace na přidanou výživovou hodnotu sýru tempeh v porovnání s klasickými sójovými boby.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál – mikrobiologická identifikace

4.1.1 Testovaný fermentovaný výrobek

•Bio-Tempeh Natural

Výrobce: Sunfood s. r. o.

Složení: BIO sójové boby, fermentační kultura.

Použití: smažení, pečení, dušení, fritování.

Ve 100 g výrobku průměrně: Energie 656 kJ/143 kcal; tuky 8,3 g; z toho nasycené mastné kyseliny 1,6 g; sacharidy 3,8 g; z toho cukry 1,7 g; bílkoviny 16,7 g; sůl 0,0 g.

Uchovejte v chladu při 2-8 °C.

Datum spotřeby: 22.6. 2017

Sójový výrobek

•TEMPEH marinovaný

Výrobce: NATURAL WAY- Oldřich Plšek

Složení: sójové boby 60 %, slunečnicový olej, pitná voda, sójová omáčka (sójové boby, pitná voda, jedlá sůl, pšeničná mouka, sorban draselný), *Rhizopus oligosporus*. Výživové údaje na 100 g výrobku: energie 1350 kJ/321 kcal, tuky 26,9 g z toho nasycené mastné kyseliny 4,8 g, sacharidy: 0,2 g z toho cukry 0,19 g, vláknina 6,9 g, sůl 0,5 g, bílkoviny 17,3 g.

Vyrobeno z geneticky nemodifikovaných surovin.

Uchovejte při teplotě 1–6 °C.

Datum spotřeby: 1. 7. 2017

Sójový výrobek

•Bio-Tempeh Uzený

Výrobce: Sunfood s. r. o.

Složení: BIO sójové boby, BIO slunečnicový olej, BIO shoyu (sója).

Použití: za studena nebo dusit se zeleninou.

Výživové hodnoty ve 100 g: Energie 1356 kJ/326 kcal; tuky 24,9 g; z toho nasycené mastné kyseliny 2,3 g; sacharidy 8,8 g; z toho cukry 1,5 g; bílkoviny 17,2 g; sůl 0,8 g.

Uchovejte při teplotě 2–8 °C.

Datum spotřeby: 5. 7. 2017

Sójový výrobek

4.1.2 Použité kmeny MO pro pozitivní kontroly

Vzorky DNA pro pozitivní kontroly byly izolovány z bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus fermentum* získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně (ČR). Tyto kontrolní vzorky byly poskytnuty Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Vzorek pozitivní kontroly pro stanovení kvasinek označený jako *Sporidiobolus 20* byl získán od Mgr. Dany Vránové, Ph.D. Vzorek pozitivní kontroly pro stanovení oddělení *Zygomycetes* byl vyizolován z kmene *Rhizopus stolonifer* získaného z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně.

- *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T
- *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T
- *Sporidiobolus* 20
- *Rhizopus stolonifer* CCM F-445

4.1.3 Bakteriální DNA

Jako templátová DNA pro sestavení kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci pomocí qPCR byla použita komerční DNA *Escherichia coli* (D4889, Sigma-Aldrich, USA). Pomocí desítkového ředění byla připravena série pěti standardů v rozsahu 100 ng/μl až 10 pg/μl.

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- BagSystem® (Interscience, Saint Nom la Breteche, Francie)
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot·min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor (KIF LAB)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL různých objemů (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipety Finnpipette F2 různých objemů (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- MiniIncubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Petriho misky
- Stomacher BagMix (Interscience, Francie)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Běžné laboratorní sklo a umělohmotné laboratorní pomůcky

4.1.5 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (100 bp), (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný – SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)

- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol – PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.6 Roztoky

- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- Roztok A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)
- Roztok B (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; 3 mg/ml lysozymu)
- TBE pufr (54 g Tris-báze; 27,5 g H₃BO₃; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; doplněno na 1 l destilovanou vodou, před použitím 20krát naředěno)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), destilovaná voda)
- Tris-HCl (1 M: 12,1 g Tris-báze; doplněno na 100 ml destilovanou vodou; upraveno HCl na pH 7,8)
- Lyzační roztok (5 ml Tris-HCl pH 7,8; 0,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,00; doplněno do celkového objemu 50 ml sterilní vodou)

4.1.7 Komponenty pro PCR v reálném čase a konvenční PCR

- Primery specifické pro doménu *Bacteria* [44]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [44]
- Primery specifické pro kvasinky [45]
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus fermentum* [44]
- Primery specifické pro plísň [46]
- SYTO-9 qPCR 2× Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10x reakční pufr kompletní
- směs dNTP (10mM)
- DNA-polymeráza Top-Bio 1.1 (1 U/μl)

4.1.8 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byly použity magnetické nosiče F-kol 77ox (2 mg/ml) a F79/L3-PLL (0,1 mg/ml), které byly připraveny Ing. D. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Vlastnosti magnetických nosičů jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Přehled vlastností magnetických nosičů

označení	polymer	Fe (%)	-COOH (mM/g)	-NH ₂ (mmol/g)	průměr částice	PDI
F-kol 77ox	P(HEMA-co-GMA)	10,02	0,764	–	2,23 μm	1,81
F79/L3-PLL	–	69,80	–	0,28	6,20 nm	1,37

Pozn.: P(HEMA-co-GMA) – poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát); Fe (%) – hmotnostní obsah železa v magnetickém jádru nosiče; PDI (index polydispersity) – poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti;

4.2 Materiál – nutriční analýza

4.2.1 Testovaný výrobek

- **Sójové boby bio**

Výrobce: Country Life

Složení: Sójové boby – produkt kontrolovaného ekologického zemědělství

Použití: pro teplou i studenou kuchyni.

Výživové údaje na 100 g výrobku: Energetická hodnota 1792 kJ/428 kcal; tuky 20 g z toho nasycené mastné kyseliny 3 g; sacharidy 21 g z toho cukry 7,3 g; bílkoviny 36 g; sůl 0,02 g.

Skladování: při relativní vlhkosti do 70 %

Datum min. trvanlivosti: 16. 06. 2018

Pro analýzu byly dále použity stejné druhy tempehu jako u mikrobiologické identifikace viz. kap. 4.1.1.

4.2.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Automatické pipety – Discovery (SRN) a Biohit (SRN)
- Centrifuga Sigma 3k15 (SRN)
- Centrifuga U-32 R, Boeco (SRN)
- Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)
- Spektrofotometr – Helios γ, Unicam (VB)
- Třepačka Yellow line RS 10 basic, Labicom s.r.o. (SR)
- Ultrazvuk PS 02000 Ultrasonic compact cleaner 1,25 L, PowerSonic (SR)
- Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (SRN)
- Vortex Genius 3, IKA Vortex (SRN)
- Vortex Genie 2, Scientitic Industries (USA)
- Mineralizační trubice
- Destilační přístroj podle Parnase-Wagnera
- Mineralizační blok Kjeldatherm KT, Gerhardt (SRN)
- Termoblok Block heater, Stuart (VB)

4.2.2.1 *Přístroje a pomůcky pro analýzu na kapalinovém chromatografu*

- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (VB)
- HPLC/PDA sestava: sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)
 - Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
 - Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR (Thermo Finnigan, USA)
 - Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR (Thermo Finnigan, USA)
 - Vyhodnocovací systém Xcalibur (Thermo Finnigan, USA)
 - Kolona Kinetex C18, 4,6 mm x 150 mm x 2,6 µm, Phenomenex
 - Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
 - Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

4.2.2.2 *Přístroje a pomůcky pro analýzu na plynovém chromatografu*

TRACE GC/FID (ThermoQuest S.p.A., Itálie)

- Kapilární kolona DB-WAX o rozměrech 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm

4.2.3 Chemikálie

- Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
- D-Glukosa, LachNer (ČR)
- Chloroform, LachNer (ČR)
- Metanol p.a., LachNer (ČR)
- Metanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
- Etanol pro UV-VIS, LachNer (ČR)
- Etanol 96%, Penta (ČR)
- Fenol, Lachema (ČR)
- Kyselina sírová konc., Penta (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., LachNer (ČR)
- Uhličitan sodný, LachNer (ČR)
- Vinan sodno-draselný, Lachema (ČR)
- Dusitan sodný, Penta (ČR)
- Chlorid hlinitý, Penta (ČR)
- Síran měďnatý pentahydrát, Sigma-Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný, LachNer (ČR)
- Kyselina chlorovodíková p.a., 35%, Lachema (ČR)

Ostatní chemikálie byly získány od běžných distributorů.

4.2.4 Roztoky

- Transesterifikační směs (15% v/v H₂SO₄ v MeOH s 0,5 mg/ml kyseliny heptadekanové)

4.3 Metody – mikrobiologická identifikace

Postupy práce byly převzaty ze skript doc. Španové a doc. Ritticha [47] s mírnými úpravami podle Ing. Štěpánky Trachtové, Ph.D.

4.3.1 Izolace DNA ze vzorků

4.3.1.1 Příprava hrubého lyzátu buněk

- Sterilně bylo odebráno dvakrát z každého ze tří výrobků po 10 g a tento obsah byl vložen do sterilního sáčku s membránou BagFilter. Bylo přidáno 100 ml sterilní vody.
- BagFilter byl vložen do přístroje BagMixer (stomacher) a vzorek byl homogenizován po dobu 10 minut. Poté bylo z vnější části BagFilteru pipetováno z každého odběru jednotlivých výrobků do desíti Eppendorfových zkumavek po 1 ml suspenze.
- Vždy jedna Eppendorfova zkumavka z 10 identických zkumavek byla použita na mikrobiologickou kontrolu.
- Suspenze v Eppendorfových zkumavkách byla centrifugována po dobu 3 min (15 000 ot/min). Poté byl slit supernatant a sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A.
- Suspenze byla centrifugována po dobu 3 min (15 000 ot/min). Supernatant byl slit a k sedimentu byl přidán 1 ml roztoku B o koncentraci lysozymu 3 mg/ml a bylo resuspendováno.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- Poté bylo k suspenzi přidáno 25 µl 10% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml) a suspenze byla promíchána.
- Vzorky byly inkubovány 1 hod při teplotě 55 °C.
- Vzorky byly uchovávány v mrazáku při –20 °C, aby nedošlo k degradaci DNA.

4.3.1.2 Příprava hrubého lyzátu buněk plísní

- Sterilně bylo odebráno dvakrát z každého ze tří výrobků po 10 g a tento obsah byl vložen do sterilního sáčku s membránou BagFilter. Bylo přidáno 100 ml sterilní vody. Homogenizace vzorku probíhala v přístroji BagMixer (stomacher) po dobu 10 min.
- Do 6 Eppendorfových zkumavek bylo pipetováno po 500 µl lyzačního roztoku, bylo přidáno 150 µl homogenátu z jednotlivých připravených vzorků. Dále bylo do každé zkumavky pipetováno 100 µl 1 M NaOH a směs byla krátce zvortexována. Nakonec byly zkumavky stočeny na minicentrifuze při 15 000 ot/min po dobu 10 min a vloženy do mrazáku (–20 °C).
- V případě pozitivní kontroly byla asepticky odebrána část mycelia pomocí sterilní preparační jehly z narostlé kultury *Rhizopus stolonifer* na Petriho misce. Mycelium bylo přeneseno do mikrozkušavky, která obsahovala 30 µl sterilní vody. Při přípravě hrubého lyzátu bylo postupováno stejně jako u vzorků tempehu (viz. předchozí dva body v této kapitole).

4.3.1.3 Fenolová extrakce DNA

- K lyzátu buněk (500 µl) byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 min. Poté byla směs centrifugována (15 000 ot/min po dobu 3 min).
- Byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky. Vodní fáze s DNA byla doplněna roztokem CIZ (700 µl) na celkový objem 1 ml a směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 min. Poté byla směs centrifugována (15 000 ot/min po dobu 3 min).
- Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla odebrána horní vodní fáze s DNA.
- Extrakce byla provedena vždy pro dva identické odběry vzorku pro vzorky hrubých lyzátů z marinovaného, uzeneho a natural tempehu.
- Tato metoda byla použita také k extrakci DNA plísni, stejně tak byla DNA plísni srážena etanolem dle postupu v následující kapitole.

4.3.1.4 Srážení DNA etanolem

- Ke vzorku DNA o objemu 200 µl bylo přidáno 10 µl 3 M octanu sodného. Dále bylo přidáno 800 µl 96 % ethanolu p.a. a obsah zkumavky byl promíchán.
- DNA byla ponechána k vysrážení při –20 °C po dobu 20 min.
- Směs byla centrifugována (15 000 ot./min po dobu 15 min). Opatrně byl slit supernatant, dále bylo pracováno pouze se sedimentem. Sediment DNA byl vysušen v exsikátoru po dobu 15 minut a poté bylo DNA rozpuštěno ve 100 µl TE pufru přes noc. DNA byla uchovávána při teplotě 4 °C.

4.3.1.5 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic

- Do sterilních Eppendorfových zkumavek byla připravena separační směs, přičemž bylo nutné dodržet pořadí přidávání jednotlivých komponent do zkumavek (viz. Tab. 2).

Tab. 2: Komponenty separační směsi

Pořadí komponent	Komponenta	Objem jednotlivých komponent (µl)
1.	5 M NaCl	400
2.	hrubý lyzát buněk	100
3.	40% PEG 6000	400
4.	částice	100
výsledný objem (µl)		1000

- Připravená separační směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Poté byly částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě. Po 5 minutách separace byl odpipetován supernatant.
- Zkumavky obsahující částice s navázanou DNA byly umístěny mimo separátor, promyty 70% etanolem (1000 µl) a krátce stočeny na minicentrifuze.
- Částice byly odseparovány pomocí magnetu 2 min při laboratorní teplotě. Roztok ethanolu byl odpipetován.

- Zkumavky byly ponechány v horizontální poloze a vysušeny v exsikátoru 15 min.
- DNA, která se adsorbovala na magnetické částice, byla eluována do 50 µl TE pufru. Zkumavky byly krátce stočeny na minicentrifuze a uloženy do chladničky (4 °C).
- Druhý den byly částice odseparovány pomocí magnetu po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Eluovaná DNA byla pipetována do čisté Eppendorfové zkumavky.
- Izolace DNA byla provedena pomocí částic F-kol 770x (2 mg/ml) a částic F79/L3-PLL (0,1 mg/ml). Izolace za využití každého typu magnetických částic byla provedena vždy pro dva identické odběry vzorku pro vzorky hrubých lyzátů z marinovaného, uzeného a natural tempehu.

4.3.2 Mikrobiologická kontrola

Byla provedena kultivace na univerzálním masopeptonovém agaru (MPA) pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a Chloramphenicol Yeast Glucose agaru (YGC) pro kvasinky a plísňe, dále kultivace na selektivním MRS agaru (de Mann, Rogosa, Sharpe) pro stanovení bakterií mléčného kvašení.

Jednotlivá kultivační média byla připravena dle pokynu výrobce uvedeného na obale. Média byla následně sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

4.3.2.1 Kultivace MO

Zaočkování Petriho misek bylo provedeno metodou výsevu za pomoci sterilní mikrobiologické hokejky. Objem použitého vzorku o vybrané koncentraci 10^{-2} byl 0,1 ml. Na pevné médium v Petriho miskách bylo napipetováno 0,1 ml suspenze a rozetřeno sterilní hokejkou. Kultivace probíhala v termostatu. Složení jednotlivých médií jsou uvedena v Tab. 3, Tab. 4 a Tab. 5. Podmínky kultivace pro jednotlivé skupiny MO jsou v Tab. 6. Po ukončení kultivace byly narostlé kolonie zhodnoceny a vyfotografovány.

Tab. 3: Složení pevného média MPA o pH 7,2

Složka	množství
Masový extrakt	10 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 4: Složení pevného média MRS o pH po sterilaci 6,2–6,4

Složení	množství
Pepton1	10,00 g
Masový extrakt	10,00 g
Kvasničný extrakt	5,00 g
Glukosa	20,00 g
Tween 80	1,00 ml
K ₂ HPO ₄	2,00 g
CH ₃ CO ₂ Na · 3H ₂ O	5,00 g

Citrát diamonium	2,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05 g
Agar	12,00 g
Voda	1000 ml

Tab. 5: Složení pevného média YGC o pH 6,6

Složení	množství
Kvasniční extrakt	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Chloramfenikol	0,1 g
Agar	14,9 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 6: Podmínky kultivace pro jednotlivé skupiny MO

Podmínky kultivace	kultivační médium		
	MPA	MRS	YGC
Teplota [°C]	30	37	30
Doba [dny]	5	2	5

4.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin

- Za využití přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) byla stanovena koncentrace a čistota izolovaných nukleových kyselin.
- Přístroj byl kalibrován za použití TE pufru. Objem vzorku DNA použitého pro měření byl 2 µl.
- Byla proměřena absorbance a koncentrace vzorků izolované DNA.
- Absorbance byla měřena při vlnových délkách 230 nm (vysoká hodnota absorbance při této vlnové délce značí znečištění fenolem), 260 nm (vlnová délka, při které nukleové kyseliny maximálně absorbují záření) a při 280 nm (odpovídá maximu absorpce záření proteiny).

4.3.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

- Byla provedena qPCR specifická pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a pro oddělení *Zygomycetes*, mezi které řadíme plísň rodu *Rhizopus*.
- Všechny vzorky obsahující izolovanou DNA byly zředěny na koncentraci 10 ng/µl kromě vzorků DNA izolovaných pomocí magnetických částic F79/L3-PLL. Tyto vzorky byly pro další postupy použity nezředěné.
- Komponenty PCR reakce byly rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- PCR směs byla připravována v boxu vyzářeném UV lampou. Jednotlivé komponenty byly přidávány v pořadí a objemech podle Tab. 7. Složení qPCR směsi pro specifické qPCR je uvedeno v Tab. 7.
- Takto připravený Master-mix byl po 22 µl (pro doménu *Bacteria*) a po 24 µl (pro rod *Lactobacillus* a pro *Zygomycetes*) pipetován do speciálních mikrozkmavek pro

qPCR. K Master-mixu byla poté přidána naředěná templátová DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů F-kol 77ox a pomocí fenolové extrakce. V případě DNA izolované pomocí částic F79/L3-PLL byla přidána neředěná DNA. Množství přidané templátové DNA je uvedeno v Tab. 7. Celkový objem qPCR směsi byl 25 µl.

Tab. 7: Složení PCR směsi pro qPCR specifickou pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a pro oddělení *Zygomycetes*

Pořadí	Komponenta	Objemy (µl)	
		Doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i> <i>Zygomycetes</i>
1.	PCR voda	7,5	9,5
2.	SYTO-9 qPCR 2× Master Mix	12,5	12,5
3.	primer F (10 pmol/µl)	1,0	1,0
4.	primer R (10 pmol/µl)	1,0	1,0
5.	templátová DNA	3,0	1,0

- Pro jednotlivé qPCR byly použity pro ně specifické primery (viz. Tab. 9).
- Stejně jako u vzorků templátové DNA, byla připravena i negativní kontrola (kontrola kontaminace složek PCR), kde nebyla přidána templátová DNA. Při přípravě pozitivní kontroly byl místo templátové DNA přidán stejný objem DNA z určité kontrolní kultury o koncentraci 10 ng/µl. V PCR specifické pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus* byla použita DNA bakterií *Lactobacillus gasseri*, v PCR specifické pro *Zygomycetes* byla použita DNA *Rhizopus stolonifer*.
- Vzorky obsahující všechny komponenty PCR směsi byly promíchány a umístěny do cykleru Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). Cykler byl naprogramován na příslušný amplifikační program společně s Melt analýzou dle Tab. 10. Ke snímání fluorescence docházelo vždy ve třetím kroku cyklu.
- Výsledky qPCR byly vyhodnoceny pomocí softwaru použitého cykleru Rotor-Gene 6000 (verze 1.7.87).
- Ke kvantifikaci množství DNA domény *Bacteria* byla použita metoda absolutní kvantifikace. S využitím kalibrační křivky byla zjištěna koncentrace bakteriální DNA ve směsi pro PCR. Množství DNA laktobacilů a DNA plísní bylo stanoveno pomocí relativní kvantifikace.
- K ověření specifity PCR produktů byla použita Melt analýza.
- Specifita produktů PCR byla potvrzena pomocí agarózové gelové elektroforézy.

4.3.5 Konvenční polymerázová řetězová reakce

- Byla provedena PCR specifická pro kvasinky a pro druh *Lactobacillus fermentum*.
- Při přípravě PCR směsi bylo postupováno obdobně jako u qPCR. Složení PCR směsi pro specifické PCR je uvedeno v Tab. 8.
- Jako templátová DNA byla použita DNA izolovaná pomocí mikročástic F-kol 77ox a pomocí fenolové extrakce po zředění na koncentraci 10 ng/µl a neředěná DNA izolovaná za využití nanočástic F79/L3-PLL.

- Připravený Master-mix byl po 24 μl pipetován do mikrozkušavek. K Master-mixu byla poté přidána templátová DNA jednotlivých vzorků o objemu 1 μl . Celkový objem PCR směsi byl 25 μl .

Tab. 8: Složení PCR směsi pro PCR specifickou pro kvasinky a pro druh *Lactobacillus fermentum*

Pořadí	Komponenta	Objemy (μl)	
		kvasinky	<i>Lactobacillus fermentum</i>
1.	PCR voda	17,5	19,0
2.	10x reakční pufr kompletní	2,5	2,5
3.	směs dNTP (10mM)	1,0	0,5
4.	primer F (10 pmol/ μl)	1,0	0,5
5.	primer R (10 pmol/ μl)	1,0	0,5
6.	DNA polymeráza Top-Bio 1.1 (1 U/ μl)	1,0	1,0
7.	templátová DNA	1,0	1,0

- Pro jednotlivé PCR byly použity pro ně specifické primery (viz. Tab. 9).
- Stejně jako u qPCR byla připravena pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla v PCR specifické pro kvasinky použita kontrolní kultura *Sporidiobolus* 20 o koncentraci 10 ng/ μl a u druhu *Lactobacillus fermentum* byla použita DNA příslušné kontrolní kultury.
- Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly promíchány a umístěny do cykleru Thermal DNA Engine (BIO-RAD Lab). Cykler byl naprogramován na příslušný amplifikační program dle Tab. 11.
- Ověření přítomnosti specifických produktů PCR bylo provedeno pomocí agarózové gelové elektroforézy.

4.3.6 PCR primery

Byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub a R_eub) [44], primery specifické pro rod *Lactobacillus* (F_alllact_IS, R_alllact_IS) [44], primery specifické pro kvasinky (Oli-F, Oli-R) [45], primery specifické pro *Lactobacillus fermentum* (F_ferm_IS, R_ferm_IS) [44] a primery specifické pro oddělení *Zygomycetes*, mezi které řadíme plísň rodu *Rhizopus* [46]. Sekvence jednotlivých primerů společně s velikostí PCR produktů jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Názvy a sekvence primerů specifických pro určité skupiny MO, velikost PCR produktů a reference použitých primerů

Specifická PCR	Primer	Sekvence (5'-3')	Produkt PCR	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	[44]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_alllact_IS	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp	[44]
	R_alllact_IS	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		
Kvasinky	Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152 bp	[45]
	Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	F_ferm_IS	AAC CGA GAA CAC CGC GTT AT	88 bp	[44]
	R_ferm_IS	ACT TAA CCT TAC TGA TCG TAG ATC AGT CA		
<i>Zygomycetes</i>	Forward	TAG GAA TTA CAG CAA AT	167 bp	[46]
	Reverse	CCA ATG CAA ACT CC		

4.3.7 Amplifikační programy qPCR a konvenční PCR

Amplifikace izolované DNA byla provedena při různě nastavených teplotních programech uvedených v Tab. 10 a v Tab. 11.

Tab. 10: Teplotní programy pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* včetně Melt analýzy

Číslo kroku	Krok	Amplifikační program		
		Doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	<i>Zygomycetes</i>
1	Prodloužená denaturace DNA	95 °C /5 min	95 °C /5 min	95 °C/10 min
2	Denaturace DNA	95 °C /30 s	95 °C /30 s	95 °C/10 s
3	Připojení primerů	55 °C/30 s	55 °C/30 s	48 °C/15 s
4	Syntéza DNA	72 °C /30 s	72 °C /1 min	72 °C/15 s
5	Prodloužená syntéza DNA	72 °C /5 min	72 °C /5 min	72 °C/10 min
Počet cyklů (krok 2–4)		35	35	45
6	Melt analýza	95 °C /1 s	95 °C /1 s	95 °C/0 s
		55 °C/5 s	55 °C/5 s	59 °C/20 s
		72 °C /5 s	72 °C /5 s	85 °C/0 s

Tab. 11: Teplotní programy pro kvasinky a pro druh *Lactobacillus fermentum*

Číslo kroku	Krok	Amplifikační program	
		Kvasinky	<i>Lactobacillus fermentum</i>
1	Prodloužená denaturace DNA	94 °C / 5 min	95 °C / 10 min
2	Denaturace DNA	94 °C / 1 min	95 °C / 30 s
3	Připojení primerů	51 °C / 30 s	50 °C / 30 s
4	Syntéza DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min
5	Prodloužená syntéza DNA	72 °C / 5 min	72 °C / 10 min
Počet cyklů (krok 2–4)		30	35

4.3.8 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

- Tato metoda byla použita k ověření specifity produktů qPCR specifické pro rod *Lactobacillus*. Agarózovou elektroforézou byla dále provedena detekce produktů PCR specifické pro kvasinky a pro *Lactobacillus fermentum*. Produkty PCR byly získány po amplifikaci DNA, která byla izolovaná ze třech různých druhů tempehu (natural, marinovaný a uzený).
- V Erlenmeyerově baňce byl připraven 1,8 % agarózový gel. Směs byla přerušovaně přivedena 5krát k varu v mikrovlnné troubě a poté nalita do vaničky s hřebínkem. Směs byla ponechána asi 30 minut ztuhnout, a poté byl vyjmut hřebínek.
- Ke vzorkům (produktům PCR) byl přidán 6× koncentrovaný nanášecí pufr, tj. 25 µl vzorku a 5 µl nanášecího pufru.
- Směs (PCR produkt a nanášecí pufr) byla nanášena do vzniklých komůrek. Kromě vzorků obsahujících izolovanou DNA byl dále nanesen DNA standard Malamité (100 bp žebříček) o objemu 5 µl (dle doporučení výrobce) a pozitivní a negativní kontrola.
- Poté byla vanička s gelem umístěna do elektroforetické vany a gel byl převrstven 0,5× TBE pufrem. Elektroforéza probíhala 1,5 hodiny při napětí 80 V.
- Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen do roztoku ethidium bromidu (500 ml vody + 100 µl ethidium bromidu) po dobu 20 minut.
- Obarvený gel byl ozářen UV světlem o vlnové délce 305 nm a vyfotografován mobilním telefonem.

4.4 Metody – nutriční analýza

Pokud není uvedeno jinak, byly postupy provedeny podle skript prof. Márové a doc. Obruči [48] s mírnými úpravami Ing. Andrei Háronikové, Ph.D.

Pro vlastní stanovení testovaného produktu bylo odebráno ze třech různých míst vybraných druhů tempehu (natural, uzený a marinovaný). Odebrané vzorky byly zhomogenizovány pomocí třecí misky s tloučkem. Od každého reálného vzorku byly naváženy dva vzorky. Bylo odebráno 10 g zhomogenizovaného materiálu do Erlenmayerových baněk, přidáno 100 ml destilované vody a extrahováno na třepačce po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla

směs centrifugována při 5000 ot./min po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Dále filtrována přes gázu. Přefiltrovaná vodní fáze byla použita ke stanovení celkových polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity.

Stejným postupem byly připraveny vzorky z vařených loupaných sójových bobů. Sójové boby byly 24 hodin máčeny ve vodě a poté 1,5 hodiny vařeny.

4.4.1 Analýza sacharidů

Pro analýzu sacharidů bylo odebráno 10 ml přefiltrované vodní fáze a zkontrolováno pH ($\text{pH} \approx 6$). Dále bylo provedeno číření za použití Carrezových roztoků. K 10 ml vodné fáze ($\text{pH} \approx 6$) bylo přidáno 0,5 ml Carrezova roztoku I (15% roztok hexakyanoželeznatanu draselného), poté za stálého míchání postupně přidáváno 0,5 ml Carrezova roztoku II (30% síran zinečnatý), tak aby se vytvořila sraženina kyanoželeznatanu zinečnatého, která na svůj povrch adsorbuje nežádoucí sloučeniny nebo také částice. Centrifugace při 5000 ot/min po dobu 5 min při 20 °C. Odebrání vyčiřené fáze do nové zkumavky a uchování při teplotě -20 °C. Tato fáze se dále použije ke stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho a Nelsona a celkových sacharidů podle Duboise.

4.4.1.1 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Neutrální sacharidy byly stanoveny spektrofotometricky podle Duboise. Principem metody je rozklad cukrů kyselinou sírovou, vznikající deriváty furfuralu kondenzují s fenoly za vzniku barevných produktů.

Pro kalibraci byl připraven standardní vodný roztok glukózy o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a z něj bylo pipetováno 1; 3; 5; 7 a 9 ml a doplněno destilovanou vodou do 10 ml. K vlastnímu stanovení byl pipetován 1 ml 100x zředěných vyčiřených vzorků ze všech druhů tempehu a 1 ml 1000x zředěných vzorků ze sójových bobů. K 1 ml všech vyčiřených vzorků a k 1 ml všech standardů byl přidán 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla promíchána na vortexu a ponechána volně po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru ve skleněných kyvetách při 490 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven obdobně, jen místo analyzovaného vzorku byl přidán 1 ml destilované vody.

4.4.1.2 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona

Principem metody je reakce redukujících sacharidů s měďnatými ionty, kdy dochází k vyredukování oxidu měďnatého, který je pomocí hydrogenarseničnanu převeden do modrozeleného komplexu, jenž lze stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 720 nm.

Jako činidla se používají Somogyi-Nelsonova činidla I, II a III:

- Roztok I: 24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 144 g bezvodého Na_2SO_4 a 12 g vinanu sodno-draselného (Seignettova sůl, tetrahydrát) v 800 ml destilované vody.
- Roztok II: 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 24 g bezvodého Na_2SO_4 v 200 ml destilované vody.
- Roztok III: 25 g molybdenanu amonného v 450 ml destilované vody (26,55 g tetrahydrátu) a 21 ml koncentrované H_2SO_4 , poté přidat 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 25 ml destilované vody. Roztok se nechá stát 48 hodin při laboratorní teplotě.

K 1 ml 100x zředěných vyčiřených vzorků ze všech druhů tempehu a k 1 ml 1000x zředěných vyčiřených vzorků ze sójových bobů bylo přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Zkumavky byly umístěny na vroucí vodní lázeň a byly vařeny 10 min. Poté byly zkumavky ochlazený vodou, bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a dobře promícháno na vortexu, až se vzniklý Cu_2O nerozpustil. Destilovanou vodou bylo doplněno na celkový objem 10 ml. Poté byla měřena absorbance proti slepému vzorku při 720 nm. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, akorát na místo vzorku byl přidán 1 ml destilované vody.

Ke stanovení množství redukujících sacharidů ve vzorcích je nutné sestavit kalibrační závislost absorbance barevného produktu v závislosti na koncentraci glukózy jako standardu. Ze zásobního roztoku glukózy (0,2 g/l) bylo do 6 zkumavek napipetováno 1; 3; 5; 7; 9 a 10 ml a doplněno vodou na 10 ml. Z takto připravených koncentračních roztoků byl odpipetován vždy 1 ml, ke kterému byl přidán 1 ml směsi Somogyi–Nelsonových činidel I a II. A dále bylo postupováno stejně jako u testovaných vzorků.

4.4.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS*

Metoda spočívá ve sledování schopnosti analyzovaného vzorku zhaset kation-radikál $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou standardu, kterým je Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman - 2-karboxylová). Zhasení radikálu $\text{ABTS}^{+\cdot}$ antioxidanty se pozoruje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra kation-radikálu při vlnové délce 734 nm v čase nula a deset minut.

ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) byla rozpuštěna v destilované vodě na koncentraci $c = 7 \text{ mM}$ (0,036 g v 10 ml vody). Radikálový kation $\text{ABTS}^{+\cdot}$ byl získán reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok byl ponechán ve tmě při laboratorní teplotě po dobu nejméně 12 hodin. Před použitím byl $\text{ABTS}^{+\cdot}$ zředěn etanolem pro UV-VIS na absorbanci $0,7 \pm 0,2$ při 734 nm (měřeno proti ethanolu pro UV-VIS). Do skleněné kyvety byly napipetovány 2 ml $\text{ABTS}^{+\cdot}$, bylo přidáno 20 μl vzorku a promícháno. Byla měřena absorbance v čase 10 min (A_1). Hodnota, od které se pokles absorbance odečítá, je hodnota substrátu: 2 ml $\text{ABTS}^{+\cdot}$ + 20 μl destilované vody, měřeno v čase 0 min (A_0).

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační křivka standardu Troloxu v rozmezí koncentrací 50–400 $\mu\text{g/ml}$. Standard Trolox byl rozpuštěn v 60% ethanolu. Do kyvety byly pipetovány 2 ml $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a 20 μl roztoku standardu. Jako blank byl použit 60% ethanol.

Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních.

4.4.3 Stanovení celkových polyfenolů

Obsah celkových polyfenolů se stanovuje spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Nejdříve byl připraven roztok nasyceného uhličitanu sodného (7,5 g Na_2CO_3 a 95 ml destilované vody) a zředěný vodný roztok Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9.

Do zkumavky byl napipetován vždy 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 1 ml destilované vody. Bylo přidáno 50 μl vzorku, promícháno a ponecháno stát po dobu 5 min. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 , promícháno a ponecháno stát 15 min. Poté

byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku. V případě slepého vzorku bylo místo analyzovaného vzorku přidáno 50 µl destilované vody.

Ze zásobního roztoku kyseliny gallové byla připravena koncentrační řada v rozsahu koncentrací 0,1–0,5 mg/ml. Koncentrace celkových polyfenolů ve vzorcích byla vypočtena na základě kalibrační křivky sestavené za využití standardu kyseliny gallové.

4.4.4 Stanovení celkových flavonoidů

Celkové množství flavonoidů se stanovuje spektrofotometricky po reakci s 10% roztokem chloridu hlinitého a 5% roztokem dusitanu sodného.

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO₂. Obsah zkumavek byl promíchán a ponechán stát 5 min. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku AlCl₃, promícháno a ponecháno stát 5 min. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml 1 M roztoku NaOH a 1 ml destilované vody a promícháno. Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 510 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. Jako standard byl použit roztok katechinu v rozsahu koncentrací 0,05–0,3 mg/ml. Množství celkových flavonoidů ve vzorku bylo stanoveno na základě kalibrační křivky standardu katechinu.

4.4.5 Stanovení obsahu lipidů extrakcí podle Folche

Principem metody je extrakce lipidů směsí chloroformu a metanolu. Přídavek metanolu k extrakčnímu rozpouštědлу umožní kvantitativní extrakci lipidů, které jsou vázány na bílkovinné složky výrobku. Zhomogenizovaný materiál se extrahuje směsí chloroformu a metanolu, nelipidické podíly se vyextrahují vodou [37].

Ze dvou různých míst každého analyzovaného vzorku bylo odebráno určité množství a rozmělněno v třecí misce. Byl odebrán 1 g zhomogenizovaného vzorku do centrifugační zkumavky a bylo přidáno 20 ml směsi rozpouštědel chloroformu a metanolu v poměru 2:1. Dále byly přidány 2 lžičky skleněných kuliček a extrakce probíhala na vortexu po dobu 40 min. Poté byly přidány 3 ml destilované vody a obsah zkumavky byl promíchán, vytvořily se tři fáze. Do baňky s kulatým dnem byla odebrána spodní fáze, která obsahuje lipidy, a na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C bylo oddestilováno rozpouštědlo. Poté byla baňka vložena do exsikátoru a po vysušení zvážena na analytických vahách [37].

Vyextrahované lipidy v baňce byly rozpuštěny v chloroformu a kvantitativně převedeny do odměrné baňky na 10 ml a bylo doplněno chloroformem po rysku. Takto připravený roztok extrahovaných lipidů byl využit k další analýze (viz. následující kapitola).

4.4.6 Stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie

Mastné kyseliny se převedou na methylestery transesterifikací. Transesterifikace se provádí za použití metanolu v přítomnosti katalyzátoru. Methylestery se rozdělí pomocí kolony, kde je jako stacionární fáze použitý polyethylen glykol. Detekce methylesterů separovaných na koloně probíhá pomocí plamenového ionizačního detektoru. Identifikace jednotlivých složek byla provedena na základě srovnání retenčních časů identických standardů [37].

Do vialek byly napipetovány neředěné vzorky chloroformových extraktů připravených v předchozí kapitole z uzeného a natural tempehu, vzorky marinovaného tempehu a sójových bobů byly z důvodu vyššího obsahu tuku 10x naředěny. Celkový objem pipetovaného chloroformového extraktu byl u všech vzorků 1 ml. Dále bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi (15% v/v H₂SO₄ v MeOH s 0,5 mg/ml kyseliny heptadekanové (interní standard)). Transesterifikace probíhala v termobloku po dobu 3 hodin při teplotě 90 °C. Poté byly vialky ochlazeny a jejich obsah byl přelit do vialky, která obsahovala 0,5 ml 0,05 M NaOH. Vialky byly protřepány a 0,2 ml spodní fáze obsahující methylestery mastných kyselin bylo přepipetováno do šroubovacích vialek a doplněno chloroformem do celkového objemu 1 ml.

Pro analýzu methylesterů byl použit plynový chromatograf TRACE GC s automatickým dávkovačem AI 3000 a plamenově ionizačním detektorem. Chromatografická analýza probíhala na koloně DB-WAX o rozměrech 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm za podmínek uvedených v Tab. 12. K vyhodnocení získaných dat byl použit software Trace. Jednotlivé methylestery mastných kyselin ve vzorcích se identifikují na základě retenčních časů a z plochy píku se vypočítá zastoupení jednotlivých kyselin ve směsi v hmotnostních procentech. Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel.

Tab. 12: Podmínky chromatografické analýzy na plynovém chromatografu

nosný plyn	dusík s průtokem 1 ml/min
teplotní program	50 °C 1 minuta; 25 °C/min do 200 °C; 3 °C/min do 230 °C po 30 min
průtoky plynů	vodík 35 ml/min; vzduch 350 ml/min; make up dusíku 30 ml/min
dávkování vzorku	1 µl
teplota injektoru	250 °C
detektor	FID, teplota 250 °C
čas analýzy	47 min

4.4.7 Stanovení hrubých bílkovin metodou podle Kjeldahla

Vzorek potravin se mineralizuje varem v koncentrované kyselině sírové za přídavku katalyzátoru. Dusík, který byl obsažen v bílkovinách nebo aminokyselinách, se mineralizací převede na síran amonný. Ze síranu amonného se potom v alkalickém prostředí uvolní amoniak, který se předestiluje vodní parou a stanoví se titračně [40].

Nejprve byla provedena mineralizace: do mineralizačních trubic bylo naváženo vždy po 1 g zhomogenizovaného výrobku (tempeh natural, uzený, marinovaný a sójové boby). Každý ze vzorků byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních a poté byly výsledné hodnoty zprůměrovány. Ke každému vzorku v mineralizační trubici bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 2 g Weiningerova katalyzátoru (90 g síranu sodného, 7 g síranu rtuťnatého, 1,5 g síranu měďnatého a 1,5 g selenu). Trubice byly vloženy do mineralizačního bloku a ponechány mineralizovat 24 hodin.

Mineralizát byl 10x zředěn (obsah mineralizační trubice byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml, bylo doplněno po značku). Bylo pipetováno 10 ml zředěného mineralizátu, přidáno několik kapek fenolftaleinu a směs byla kvantitativně převedena do

destilační baňky. Pomocí nálevky bylo přidáno asi 40 ml 33% roztoku hydroxidu sodného. Uvolněný amoniak byl predestilován s vodní parou do předlohy s 25 ml standardizovaného roztoku kyseliny sírové. Po 25 minutách destilace byla předloha snížena tak, aby konec chladiče nezasahoval do roztoku a bylo destilováno ještě 5 minut. Po ukončení destilace byly do předlohy s destilátem přidány 3 kapky Tashirova indikátoru a bylo titrováno odměrným roztokem hydroxidu sodného do žlutého zbarvení [40].

4.4.8 Stanovení vitamínu E metodou kapalinové chromatografie

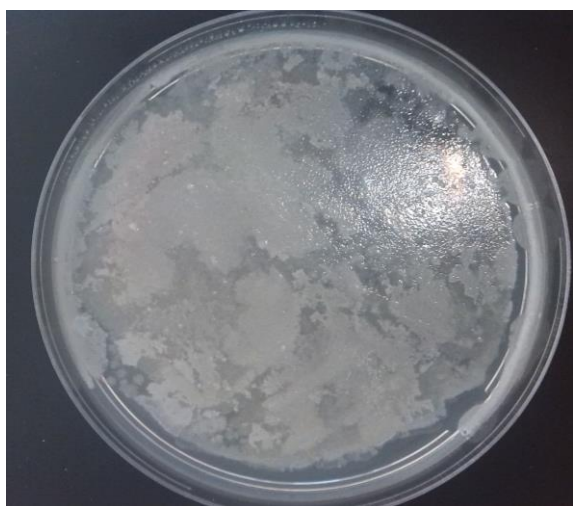
Byla provedena extrakce vzorku metanolem. Z každého vzorku byl navážen 1 g, byl přidán mořský písek a v třecí misce s tloučkem byl vzorek zhomogenizován. Obsah misky byl převeden do centrifugační zkumavky, bylo přidáno 10 ml metanolu a zkumavky byly umístěny na vortex. Extrakce probíhala 20 minut. Poté byl z horní fáze pipetován 1 ml vzorku a přes filtr pro HPLC pomocí injekční stříkačky převeden do Eppendorfovy zkumavky. Takto připravený vzorek byl použit pro analýzu na kapalinovém chromatografu.

Analýza vitamínu E byla provedena pomocí HPLC sestavy s PDA detektorem. Průtok mobilní fáze, kterou byl metanol pro HPLC, byl zvolen na 1 ml/min. Eluce byla izokratická, separace probíhala na nepolární koloně Kinetex C18 s předkolonou. Kolona byla nahřata na teplotu 30 °C. Vzorek byl na kolonu dávkován ventilem s dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Detekce vzorků byla prováděna pomocí detektoru diodového pole pro vlnovou délku 295 nm. Naměřená data byla zpracována v programu Xcalibur na základě porovnání s retenčním časem proměřeného standardu. S využitím kalibrační křivky standardu vitamínu E byla stanovena celková koncentrace vitamínu E ve vzorcích.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Mikrobiologická kontrola

Literární zdroje udávají, že mikrobiální složení tempehu je velmi komplexní. Přítomnost určitých skupin MO byla zjišťována kultivací suspenze (homogenátu z výrobků) na vybraných médiích. Stanovení celkového počtu mikroorganismů na MPA médiu je standardně považováno za základní stanovení při jakémkoli mikrobiologickém rozboru. Udává celkový počet mikroorganismů přítomných v daném vzorku bez jejich bližšího určení (zařazení). Pomocí kultivace na tomto médiu bylo zjištěno, že všechny vzorky obsahují živé mikroorganismy. Kultivací na selektivních médiích YGA a MRS byla zjišťována přítomnost kvasinek, plísní a bakterií mléčného kvašení. Tyto selektivní media slouží k identifikaci mikroorganismů v mléce a mléčných výrobcích. Mikrobiologická kontrola byla provedena ve třech opakováních a výsledky jsou zaznamenány v Tab. 13 a na přiložených fotografiích (Obr. 4, Obr. 5 a Obr. 6).



Obr. 4: Kultivace na MPA médiu



Obr. 5: Kultivace na MRS médiu



Obr. 6: Kultivace na YGC médiu

Tab. 13: Výsledky kultivací na vybraných médiích

tempeh	MPA			MRS			YGC		
	počet kolonií			počet kolonií			počet kolonií		
marinovaný	N	N	N	160	210	N	20	15	1
natural	N	N	N	N	N	N	N	N	N
uzený	0	0	N	N	N	0	0	0	0

pozn. N nepočítatelně

5.2 Mikrobiologická identifikace

V rámci identifikace mikroorganismů byla provedena izolace DNA ze třech druhů tempehu. Přítomnost DNA byla spektrofotometricky potvrzena ve všech vybraných vzorcích. Získaná DNA byla použita k provedení qPCR specifické pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a pro oddělení *Zygomycetes*. Dále byla pomocí konvenční PCR testována přítomnost kvasinkové DNA a DNA druhu *Lactobacillus fermentum*.

5.2.1 Izolace DNA

Ze třech druhů tempehu (natural, uzený a marinovaný) byly připraveny hrubé lyzáty buněk. DNA byla izolována fenolovou extrakcí z 500 µl hrubého lyzátu a magnetickými částicemi F-kol 77ox a magnetickými částicemi F79/L3-PLL ze 100 µl hrubého lyzátu. Z každého ze tří výrobků byly provedeny 2 odběry vzorku a z každého odběru byly zpracovány dva paralelní vzorky, ze kterých byla izolována DNA třemi různými metodami, které jsou uvedeny výše.

Bylo pozorováno, že hrubé lyzáty z tempehu natural obsahovaly nejvíce sedimentu (suspenze).

5.2.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin

Spektrofotometricky za pomoci přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) byla proměřena absorbance vzorků DNA v rozmezí vlnových délek 230–280 nm, na jejímž základě byla stanovena koncentrace vzorků nukleových kyselin (NK). Stanovené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 14, Tab. 15 a Tab. 16. Množství NK bylo v jednotlivých vzorcích různé, koncentrace se pohybovaly v rozmezí 1,7–145,2 ng/µl.

Při izolaci DNA pomocí fenolové extrakce bylo použito 500 µl hrubého lyzátu a následná eluce DNA byla provedena do 100 µl TE pufru. V případě použití magnetických částic bylo pro izolaci použito 100 µl hrubého lyzátu a eluce byla provedena do 50 µl TE pufru. Z důvodu různých objemů použitých při jednotlivých metodách izolace byly hodnoty koncentrací přepočteny na stejný objem. Výpočty nejsou v práci uvedeny.

Tab. 14: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných pomocí fenolové extrakce

Označení vzorku	Koncentrace NK [ng/µl]	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{230 nm}
n11F	19,28	0,965	0,496	1,94	0,96
n12F	24,36	1,217	0,678	1,8	0,9
n21F	38,24	1,911	1,053	1,81	1,15
n22F	40,56	2,028	1,133	1,79	1,2
u11F	22,68	1,134	0,651	1,74	0,83

Označení vzorku	Koncentrace NK [ng/μl]	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{230 nm}
u12F	43,00	2,15	1,213	1,77	1,27
u21F	22,76	1,137	0,64	1,78	1,21
u22F	15,04	0,753	0,418	1,8	1
m11F	27,56	1,377	0,75	1,84	1,55
m12F	28,44	1,422	0,756	1,88	1,59
m21F	14,16	0,707	0,397	1,78	1,25
m22F	18,80	0,939	0,614	1,53	1,33

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh

Tab. 15: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných pomocí magnetických částic F-kol 77ox

Označení vzorku	Koncentrace NK [ng/μl]	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{230 nm}
u11č	16,1	0,322	0,222	1,45	1,16
u12č	29,4	0,589	0,457	1,29	0,84
n21č	69,4	1,388	1,069	1,3	1,28
n22č	57,7	1,154	0,873	1,32	1,58
n11č	38	0,76	0,609	1,25	1,17
n12č	59,7	1,194	0,916	1,3	1,2
m11č	66,4	1,328	1,047	1,27	0,99
m12č	35,4	0,707	0,539	1,31	1,25
m21č	24,5	0,49	0,372	1,32	1,15
m22č	145,2	2,904	2,191	1,33	1,57
u21č	52	1,04	0,818	1,27	1,2
u22č	48,2	0,963	0,738	1,31	1,3

Pozn. n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh

Tab. 16: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných pomocí magnetických částic F79/F3-PLL

Označení vzorku	Koncentrace NK [ng/μl]	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{280 nm}	A _{260 nm} /A _{230 nm}
m11čL	1,7	0,033	0,025	1,35	0,52
m12čL	7,5	0,15	0,093	1,6	0,49
m21čL	2,3	0,045	0,047	0,96	0,47
m22čL	2,4	0,048	0,043	1,13	0,36
u11čL	2,8	0,055	0,048	1,16	0,41
u12čL	1,9	0,039	0,045	0,86	0,4
u21čL	2,8	0,055	0,043	1,28	0,42
u22čL	2,4	0,047	0,048	0,98	0,29
n21čL	4	0,08	0,054	1,46	0,52
n22čL	10,1	0,202	0,146	1,39	0,35
n11čL	5,9	0,118	0,129	0,91	0,32
n12čL	4,9	0,098	0,074	1,31	0,47

Pozn. n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh

Stanovený poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ vypovídá o čistotě izolované DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se má pohybovat v rozmezí 1,8–2,0.

U vzorků izolovaných metodou fenolové extrakce se poměr pohybuje kolem hodnoty 1,8, lze tedy říci, že izolovaná DNA je čistá. Pouze u vzorku izolovaného z marinovaného tempehu (m22F) je poměr absorbancí nižší a to 1,53, což ukazuje na přítomnost proteinů. Z poměru $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ lze zjistit možné znečištění fenolem. Fenol absorbuje při vlnové délce 230 nm, a proto při této hodnotě musí být absorbance nižší než při hodnotě vlnové délky 260 nm (maximální absorbance nukleové kyseliny). Tato podmínka je splněna u všech ze vzorků DNA izolovaných pomocí fenolové extrakce. Došlo tedy k dostatečnému odstranění fenolu.

U vzorků DNA izolovaných pomocí magnetických mikročástic F-kol 77ox a F79/L3-PLL je poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ menší než 1,8, to vypovídá o přítomnosti proteinů. Lze tedy předpokládat, že došlo k nedostatečnému odstranění bílkovin.

NK izolované pomocí magnetických nanočástic F79/L3-PLL měly nejnižší koncentrace v porovnání s dalšími dvěma metodami izolace, a to v rozmezí hodnot 1,7–10,1 ng/ μ l. Nejvyšší koncentrace NK byla naměřena ve vzorku tempehu natural. Nižší hodnoty koncentrací mohou být ovlivněny velikostí částic, přesto je koncentrace DNA dostačující pro PCR. Tyto částice jsou méně vhodné pro izolaci DNA z tohoto typu výrobku.

Ve vzorcích izolovaných pomocí fenolové extrakce a magnetických částic F-kol 77ox byly stanoveny srovnatelné hodnoty koncentrací.

Srovnáním čistoty vzorků izolovaných třemi různými metodami (fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi F-kol 77ox a F79/L3-PLL) bylo zjištěno, že vzorky DNA izolované fenolovou extrakcí jsou podstatně čistější než vzorky DNA izolované oběma typy magnetických částic.

Touto metodou byla prokázána přítomnost DNA ve všech vzorcích. Ze všech vybraných produktů se podařilo vyizolovat nukleové kyseliny.

DNA získaná z reálných vzorků třemi různými metodami izolace má koncentraci a čistotu vhodnou pro PCR.

5.2.3 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase byla použita ke stanovení množství DNA pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a pro oddělení *Zygomycetes*, mezi které patří plísně rodu *Rhizopus*. Pro qPCR byly použity všechny vzorky DNA izolované z různých druhů tempehu.

Směs PCR byla připravena s použitím mastermixu dle postupu v kap. 4.3.4. Ke směsi pro PCR byla do 36 různých mikrozkušavek postupně přidána DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce, DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů F-kol 77ox a DNA izolovaná magnetickými částicemi F79/L3-PLL.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí softwaru cyklu Rotor-Gene 6000 (verze 1.7.87).

Separaci produktů qPCR specifické pro rod *Lactobacillus* na gelu byly potvrzeny výsledky Melt analýzy stanovené softwarem.

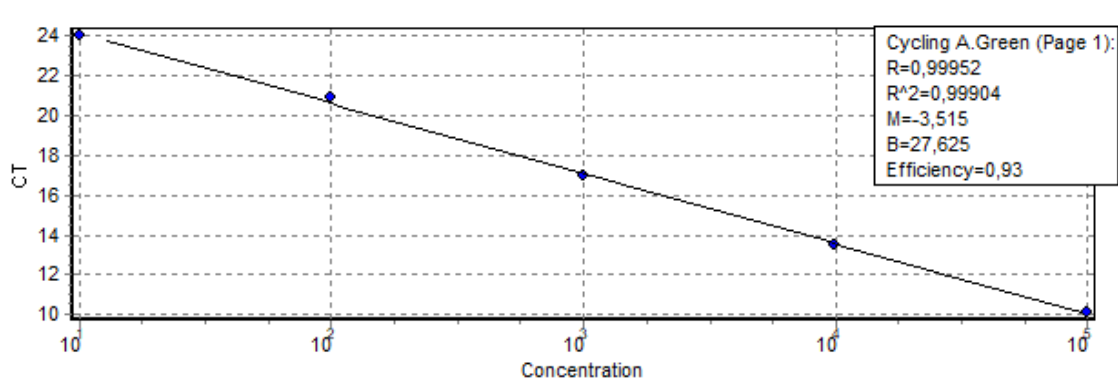
5.2.3.1 qPCR s primery specifickými pro doménu Bacteria

Pro qPCR byla použita izolovaná DNA o koncentraci 10 ng/μl v množství 3 μl. Ke stanovení koncentrace výchozí DNA ve vzorcích byla využita kalibrační křivka (Obr. 7) sestavená za použití série pěti standardů v rozsahu 100 ng/μl až 10 pg/μl připravených z komerční DNA *Escherichia coli* (D4889, Sigma-Aldrich, USA).

Získané hodnoty parametrů kalibrační křivky slouží k posouzení účinnosti amplifikace. Tyto údaje jsou uvedeny v Tab. 17. Reakční účinnost byla stanovena ze sklonu kalibrační křivky (M). Spolehlivost reakce se zjišťuje z korelačního koeficientu lineární regrese (R^2). Parametry kalibrační křivky se pohybují v optimálním rozmezí (viz kap. 2.4.2.2). Výsledky kvantifikace tedy lze považovat za spolehlivé.

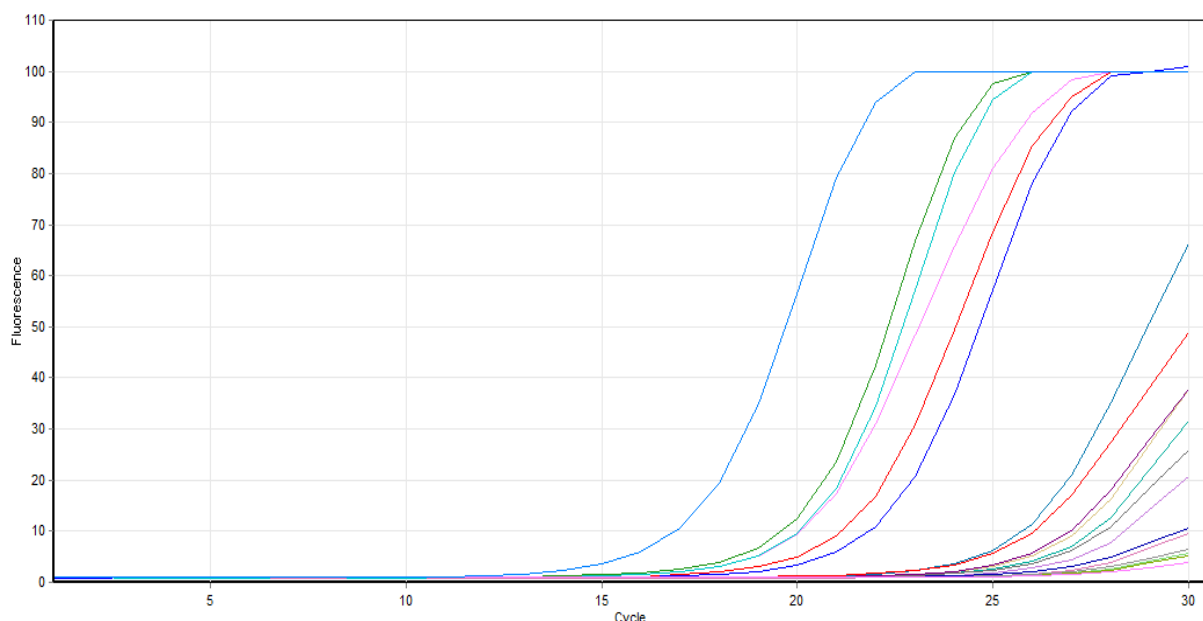
Tab. 17: Parametry charakterizující kalibrační křivku

Parametr charakterizující kalibrační křivku	Hodnoty kalibrační křivky
Korelační koeficient R^2	0,999
Sklon kalibrační křivky (M)	-3,515
Účinnost reakce	0,930



Obr. 7: Kalibrační křivka – Závislost hodnoty C_t na koncentraci bakteriální DNA

Závislost množství fluorescence na počtu cyklů pro analyzované vzorky je znázorněna na Obr. 8.



Obr. 8: Amplifikační křivky (závislost množství fluorescence na počtu cyklů)

Z důvodu přehlednosti jsou v grafu a v následné tabulce uvedeny pouze vybrané vzorky.

Tab. 18: Výsledky absolutní kvantifikace a Melt analýzy produktů PCR specifických pro doménu Bacteria

Označení vzorku	Barva	C_t	c [ng/μl]	T_m [°C]
n11F		18,11	1,109	87,0
n21F		18,82	0,792	87,0
u11F		17,14	1,753	87,8
m11F		16,77	2,084	88,0
m22F		17,02	1,854	88,0
u1lč		24,02	0,067	88,0
u12č		28,22	0,009	88,0
n12č		25,29	0,037	87,3
m1lč		26,73	0,019	88,5
m22č		28,60	0,008	88,7
u2lč		24,49	0,054	88,0
u22č		22,71	0,126	87,8
m1lčL		26,47	0,021	88,7
u12čL		27,86	0,011	88,2
u2lčL		24,77	0,047	87,7
n2lčL		23,08	0,105	87,0
n12čL		23,87	0,072	87,8
negativní kontrola		—	—	—
pozitivní kontrola		13,99	7,781	87,3

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh; F – izolované fenolem; č – izolované magnetickými částicemi F-kol 77ox; L – izolované magnetickými částicemi F79/L3-PLL

Byly stanoveny hodnoty C_t jednotlivých vzorků udávající, kdy došlo k překročení limitu detekce fluorescence. S využitím kalibrační křivky byly z hodnot C_t analyzovaných vzorků určeny výchozí koncentrace bakteriální DNA. V testovaných vzorcích byla prokázána přítomnost bakteriální DNA o koncentraci v rozsahu 2,084 až 0,008 ng/μl (Tab. 18). Z tabulky je patrné, že koncentrace u vzorků DNA izolovaných pomocí fenolové extrakce je vyšší než u vzorků izolovaných s využitím magnetických částic obou typů. Metodou fenolové extrakce se tedy vyizolovalo vyšší množství bakteriální DNA. Fenolová extrakce je standardní metodou používanou dlouhou dobu a je všeobecně vyzkoušená jako účinná. Její nevýhodou je využívání dráždivých látek (fenol, chloroform, isoamylalkohol). Naměřené koncentrace bakteriální DNA u magnetických částic jsou sice nižší než u fenolové extrakce, ale toto množství je dostačující pro PCR. Tato metoda izolace je šetrnější a rychlejší.

Produkty qPCR byly podrobeny Melt analýze. Hodnoty teplot tání analyzovaných vzorků se pohybují v rozmezí 87,0–88,7 °C (hodnoty T_m jsou uvedeny v Tab. 18). Teplota tání produktů qPCR provedené na základě DNA *Lactobacillus gasseri* (pozitivní kontrola) je 87,3 °C, tato hodnota leží v rozmezí teplot tání analyzovaných vzorků.

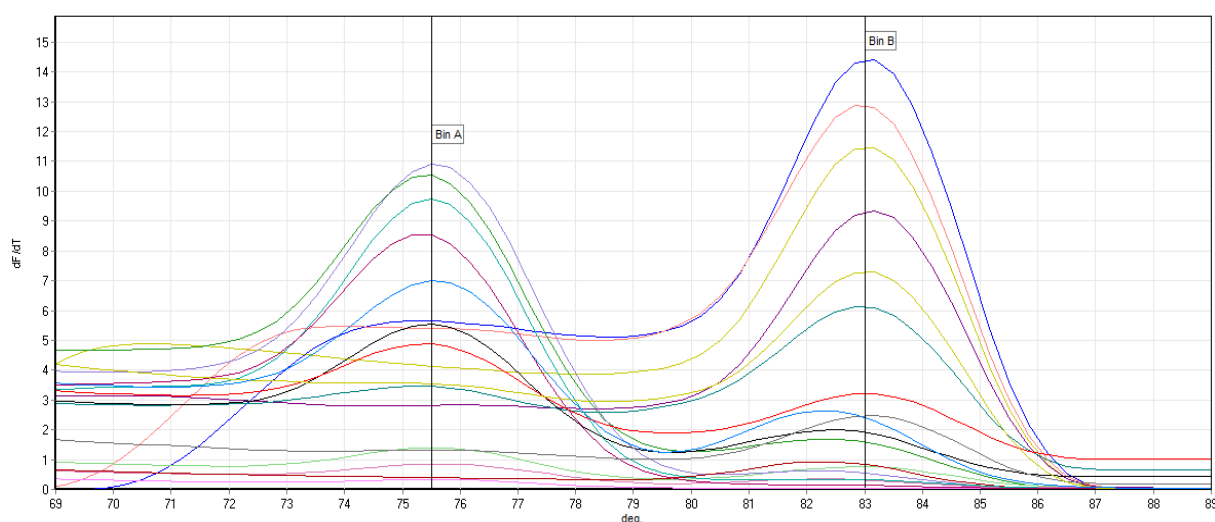
Pomocí qPCR specifické pro doménu *Bacteria* za použití primerů F_eub a R_eub byla ve všech vzorcích prokázána přítomnost bakteriální DNA.

5.2.3.2 qPCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Pro prokázání přítomnosti DNA laktobacilů byla využita qPCR specifická pro rod *Lactobacillus* za použití primerů F_alllact a R_alllact. Pro amplifikaci byla použita templátová DNA izolovaná ze třech druhů tempehu o objemu 1 μl a koncentraci 10 ng/μl. Množství DNA laktobacilů bylo vyhodnoceno metodou relativní kvantifikace. Pomocí softwaru byl vypočten poměr mezi množstvím výchozího templátu DNA a referenčního vzorku (zde pozitivní kontrola – *Lactobacillus gasseri*, 10 ng/μl) viz Tab. 19. Z výsledků relativní kvantifikace lze říci, že nejvyšší množství cílové DNA rodu *Lactobacillus* bylo přítomné ve vzorku DNA izolovaného metodou fenolové extrakce z tempehu natural a stejné množství DNA bylo detekováno také ve vzorku DNA izolovaného fenolovou extrakcí ze vzorku uzeného tempehu.

Ověření přítomnosti specifického produktu PCR bylo provedeno s využitím Melt analýzy (Obr. 9). Hodnota teploty tání (T_m) produktů PCR pozitivní kontroly (*Lactobacillus gasseri*) je 75,5 °C. Blízkých teplot tání dosahují vrcholy křivek tání patřící produktům PCR vzorků DNA izolovaných z jednotlivých druhů tempehu, a to v rozmezí 74,0–76,0 °C (viz. Tab. 19). Můžeme tedy říci, že byly naamplifikovány specifické produkty PCR.

Z grafu na Obr. 9 (a také z Tab. 19) je patrné, že se zde vyskytují dvě významné hodnoty teplot tání pro každý vzorek. Dvě různé hodnoty teplot tání vzorků mohou poukazovat na přítomnost dvou převažujících druhů rodu *Lactobacillus*. Z výsledků gelové elektroforézy (Obr. 10 viz. dále) lze vidět, že při porovnání jednotlivých fragmentů vzorků se standardem neodpovídají všechny fragmenty vzorků velikosti 92 bp, ale jsou zde i fragmenty větší pohybující se v úrovni 100 bp standardu a výše.



Obr. 9: Melt analýza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* – Závislost množství fluorescence na teplotě

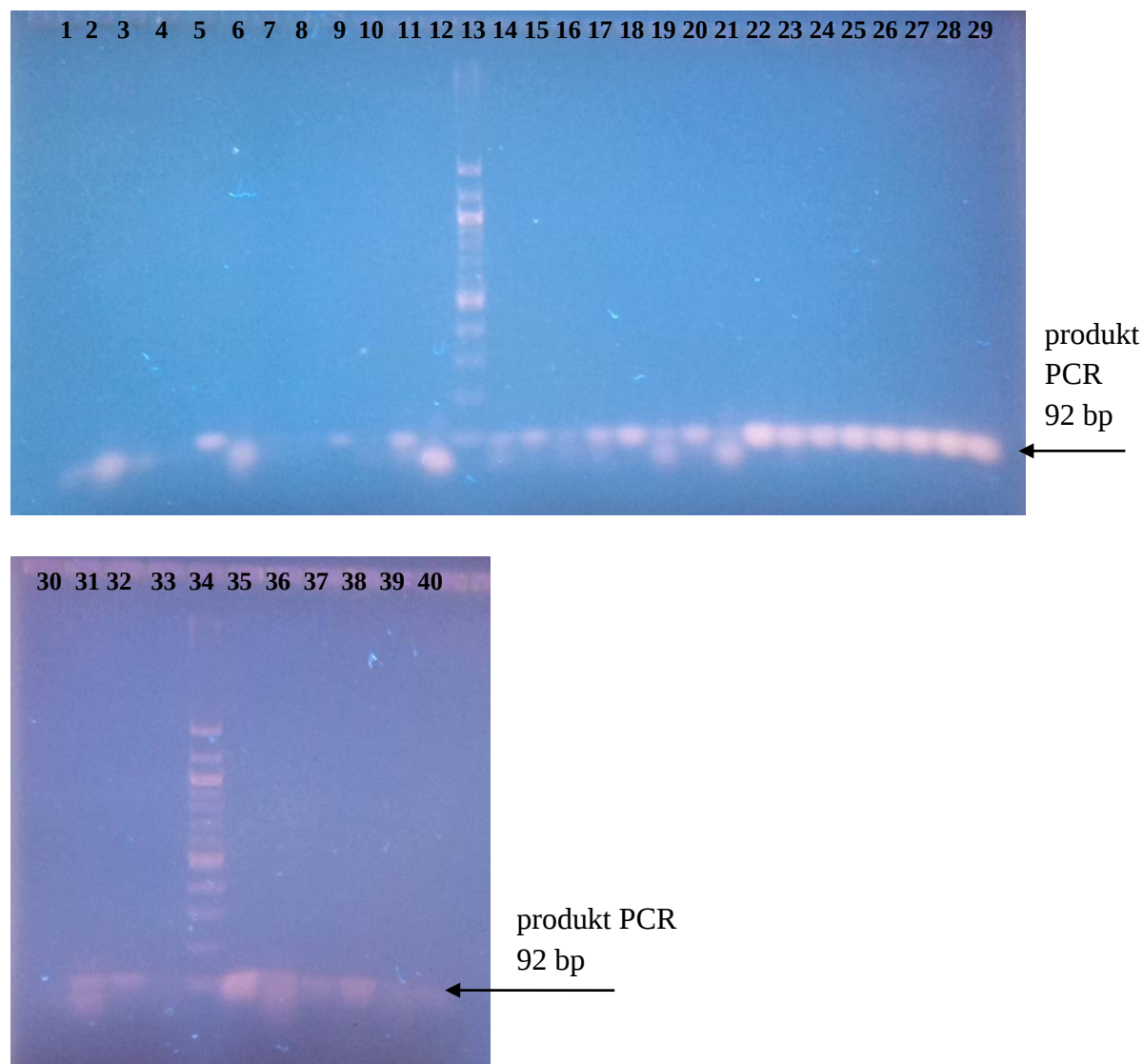
Z důvodu přehlednosti jsou v grafu a v tabulce uvedeny pouze vybrané analyzované vzorky.

Tab. 19: Výsledky relativní kvantifikace a Melt analýzy produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*

Označení vzorku	Barva	C _t	Relativní kvantifikace	T _m [°C] Bin A	T _m [°C] Bin B
n12F		24,7	7,68	70,5	83,0
n21F		24,7	7,68	75,3	83,0
n22F		23,1	$1,95 \cdot 10^1$	76,0	83,2
u21F		24,7	7,68	75,2	83,0
u22F		25,2	5,74	74,0	83,0
m11F		27,6	1,42	75,5	82,3
m21F		28,5	$8,40 \cdot 10^{-1}$	75,5	82,5
u12č		28,8	$7,05 \cdot 10^{-1}$	75,5	82,8
n11č		26,7	2,40	75,5	82,0
m11č		29,0	$6,28 \cdot 10^{-1}$	75,7	–
m12č		28,9	$6,65 \cdot 10^{-1}$	–	82,3
u21č		25,2	5,74	75,5	–
m21čL		27,6	1,42	75,3	–
u21čL		28,5	$8,40 \cdot 10^{-1}$	75,5	83,0
n21čL		28,4	$8,90 \cdot 10^{-1}$	75,5	83,0
n22čL		27,4	1,59	74,8	83,0
negativní kontrola		29,0	$6,28 \cdot 10^{-1}$	–	–
pozitivní kontrola		28,2	1,00	75,5	82,3

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh; F – izolované fenolem; č – izolované magnetickými částicemi F-kol 77ox; L – izolované magnetickými částicemi F79/L3-PLL

Produkty qPCR o velikosti fragmentů 92 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledek je uveden na Obr. 10.



Obr. 10: Agarózová gelová elektroforéza produktů qPCR specifických pro rod *Lactobacillus*. Velikost PCR produktu je 92 bp.

Běh č.	vzorek DNA	Množství DNA v PCR směsi [ng]	Detekce PCR produktu
1	m22čL	10,0	+
2	m21čL	10,0	++
3	m12čL	10,0	+
4	m11čL	10,0	–
5	u22č	10,0	++
6	u21č	10,0	++
7	m22č	10,0	–

8	m21č	10,0	–
9	m12č	10,0	+
10	m11č	10,0	–
11	n12č	10,0	+
12	n11č	10,0	++
13	Standard Malamité (100 bp)		
14	n22č	10,0	+
15	n21č	10,0	+
16	u12č	10,0	+
17	u11č	10,0	++
18	m22F	10,0	++
19	m21F	10,0	+
20	m12F	10,0	++
21	m11F	10,0	+
22	u22F	10,0	+++
23	u21F	10,0	+++
24	u12F	10,0	+++
25	u11F	10,0	+++
26	n22F	10,0	+++
27	n21F	10,0	+++
28	n12F	10,0	+++
29	n11F	10,0	+++
30	negativní kontrola		–
31	pozitivní kontrola	10,0	+
32	n12čL	10,0	+
33	n11čL	10,0	–
34	Standard Malamité (100 bp)		
35	n22čL	10,0	++
36	n21čL	10,0	+
37	u22čL	10,0	+
38	u21čL	10,0	+
39	u12čL	10,0	–
40	u11čL	10,0	–

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh; F – izolované fenolem; č – izolované magnetickými částicemi F-kol 77ox; L – izolované magnetickými částicemi F79/L3-PLL; +, ++, +++ produkty PCR o různé intenzitě; – produkty PCR nebyly detekovány

Z vyhodnocení výsledků na gelu lze říct, že pomocí metody gelové elektroforézy nebyla ve všech vzorcích prokázána přítomnost DNA laktobacilů. Gelovou elektroforézou nebyly detekovány produkty PCR vzorků izolovaných pomocí magnetických částic F-kol 77ox z marinovaného tempehu (m22č, m21č, m11č), dále produkty PCR vzorků izolovaných pomocí magnetických částic F79/L3-PLL z marinovaného tempehu (m11čL), uzeného

tempehu (u12čL, u11čL) a tempehu natural (n11čL). Uvedené nedetekované produkty byly ve velmi nízké hodnotě detekovány v qPCR. V největší intenzitě byly na gelu detekovány produkty PCR vzorků DNA izolovaných pomocí fenolové extrakce.

Detekci specifických produktů qPCR gelovou elektroforézou byly potvrzeny výsledky Melt analýzy získané softwarem cycleru Rotor-Gene 6000.

Z vyhodnocení Melt analýzy a následné gelové elektroforézy vyplývá, že naamplifikovaná DNA je specifická pro rod *Lactobacillus* a ve vzorcích byla tedy prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*.

5.2.3.3 qPCR s primery specifickými pro oddělení *Zygomycetes*

Pro qPCR byla použita izolovaná DNA o koncentraci 10 ng/μl v množství 1 μl. Pro prokázání přítomnosti DNA plísni byla využita qPCR s primery specifickými pro oddělení *Zygomycetes*.

Přítomnost DNA plísni nebyla prokázána v žádném z analyzovaných výrobků. Důvodem může být použití nových primerů, u kterých je nutné provést optimalizaci, která je však časově náročná.

5.2.4 Konvenční PCR

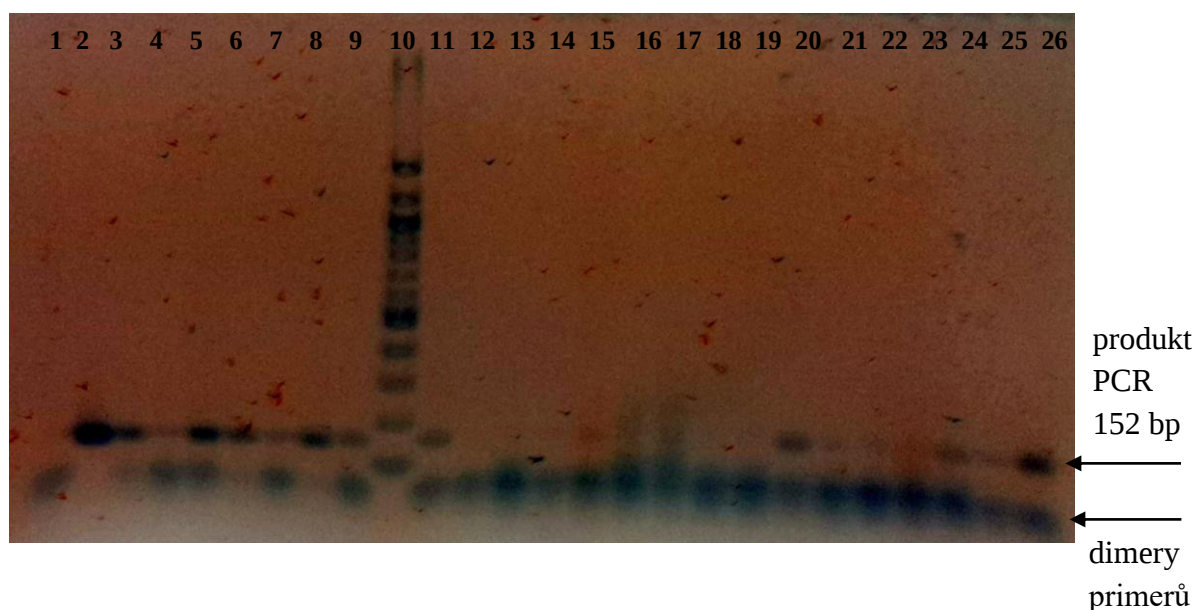
Konvenční PCR byla použita ke stanovení přítomnosti DNA pro kvasinky a pro druh *Lactobacillus fermentum*. Pro PCR byly použity všechny vzorky DNA izolované ze třech druhů tempehu.

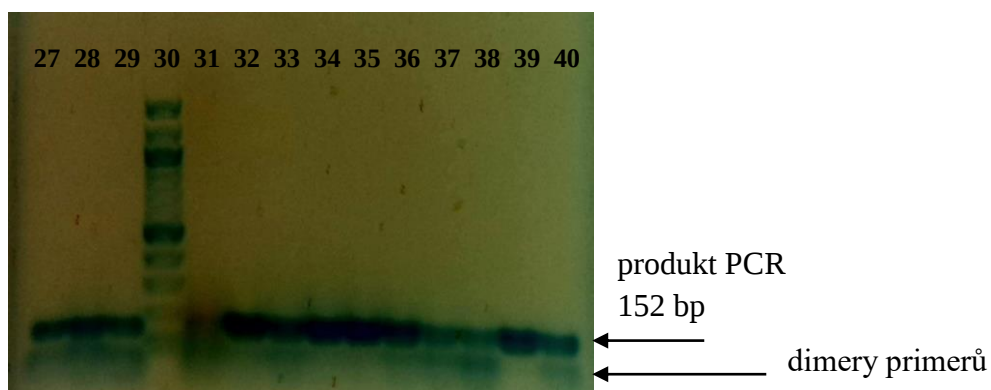
Směs PCR byla připravena podle postupů uvedených v kapitole 4.3.5

5.2.4.1 PCR s primery specifickými pro kvasinky

Pro konvenční PCR byla použita izolovaná DNA o koncentraci 10 ng/μl a objemu 1 μl. Jako pozitivní kontrola byla použita kontrolní DNA *Sporidiobolus* 20.

Přítomnost specifického produktu PCR o velikosti fragmentu 152 bp byla potvrzena pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledek je uveden na Obr. 11.





Obr. 11: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro kvasinky. Velikost PCR produktu je 152 bp.

Běh č.	vzorek DNA	Množství DNA v PCR směsi [ng]	Detekce PCR produktu
1	negativní kontrola		–
2	pozitivní kontrola	10,0	++
3	n12čL	10,0	+
4	n11čL	10,0	–
5	n22čL	10,0	+
6	n21čL	10,0	+
7	u22čL	10,0	+
8	u21čL	10,0	+
9	u12čL	10,0	+
10	Standard Malamité (100 bp)		
11	u11čL	10,0	+
12	m22čL	10,0	–
13	m21čL	10,0	–
14	m12čL	10,0	–
15	m11čL	10,0	–
16	u22č	10,0	–
17	u21č	10,0	–
18	m22č	10,0	–
19	m21č	10,0	–
20	m12č	10,0	+
21	m11č	10,0	–
22	n12č	10,0	–
23	n11č	10,0	–
24	n22č	10,0	+
25	n21č	10,0	–
26	u12č	10,0	+
27	u11č	10,0	+++
28	m22F	10,0	+++
29	m21F	10,0	+++

30	Standard Malamité (100 bp)		
31	m12F	10,0	–
32	m11F	10,0	+++
33	u22F	10,0	+++
34	u21F	10,0	+++
35	u12F	10,0	+++
36	u11F	10,0	+++
37	n22F	10,0	++
38	n21F	10,0	++
39	n12F	10,0	+++
40	n11F	10,0	+++

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh; F – izolované fenolem; č – izolované magnetickými částicemi F-kol 77ox; L – izolované magnetickými částicemi L79/L3-PLL; +, ++, +++ produkty PCR o různé intenzitě; – produkty PCR nebyly detekovány

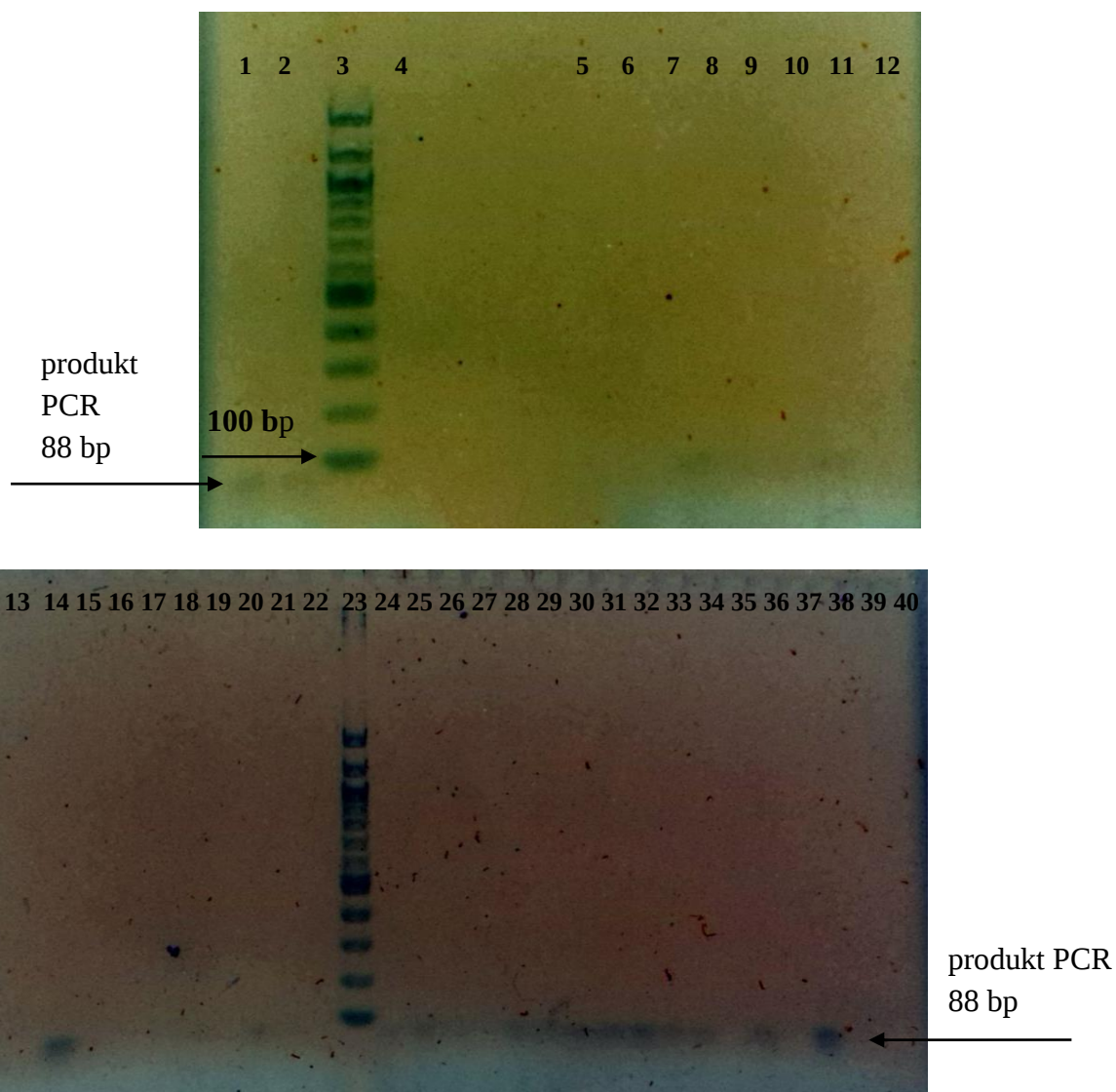
Přítomnost kvasinkové DNA nebyla prokázána ve vzorcích izolovaných pomocí magnetických částic F79/F3-PLL a magnetických částic F-kol 77ox z marinovaného tempehu, dále ve vzorcích izolovaných pomocí magnetických částic F-kol 77ox z tempehu natural (n11č, n12č, n21č), z uzeného tempehu (u22č, u21č) a ze vzorku izolovaného pomocí fenolu z marinovaného tempehu (m12F). Produkty byly detekovány v různé intenzitě, přičemž nejintenzivněji byly detekovány produkty PCR s DNA izolovanou pomocí metody fenolové extrakce. Produkty vzorků izolovaných pomocí magnetických částic obou typů byly detekovány velmi slabě nebo nebyly detekovány vůbec.

Pomocí PCR specifické pro kvasinky byla za použití primerů Oli-F a Oli-R dokázána přítomnost kvasinkové DNA ve vzorcích.

5.2.4.2 PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus fermentum*

Pro amplifikaci byla použita templátová DNA izolovaná ze třech druhů tempehu o objemu 1 µl a koncentraci 10 ng/µl. Jako pozitivní kontrola byla použita kontrolní DNA *Lactobacillus fermentum*.

Specifické produkty PCR byly detekovány pomocí gelové agarózové elektroforézy (Obr. 12).



Obr. 12: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus fermentum*. Velikost PCR produktu je 88 bp.

Běh č.	vzorek DNA	Množství DNA v PCR směsi [ng]	Detekce PCR produktu
1	m21F	10,0	+
2	m12F	10,0	+
3	Standard Malamité (100 bp)		
4	m11F	10,0	–
5	u22F	10,0	–
6	u21F	10,0	–
7	u12F	10,0	–
8	u11F	10,0	+
9	n22F	10,0	–
10	n21F	10,0	–
11	n12F	10,0	+
12	n11F	10,0	–
13	negativní kontrola		–

14	pozitivní kontrola	10,0	++
15	n12čL	10,0	–
16	n11čL	10,0	–
17	n22čL	10,0	–
18	n21čL	10,0	–
19	u22čL	10,0	–
20	u21čL	10,0	–
21	u12čL	10,0	–
22	u11čL	10,0	–
23	Standard Malamité (100 bp)		
24	m22čL	10,0	–
25	m21čL	10,0	–
26	m12čL	10,0	–
27	m11čL	10,0	–
28	u22č	10,0	–
29	u21č	10,0	+
30	m22č	10,0	+
31	m21č	10,0	+
32	m12č	10,0	+
33	m11č	10,0	+
34	n12č	10,0	+
35	n11č	10,0	–
36	n22č	10,0	+
37	n21č	10,0	–
38	u12č	10,0	++
39	u11č	10,0	–
40	m22F	10,0	–

Pozn.: n – tempeh natural; u – uzený tempeh; m – marinovaný tempeh; F – izolované fenolem; č – izolované magnetickými částicemi F-kol 77ox; L – izolované magnetickými částicemi F79/L3-PLL; +, ++, +++ produkty PCR o různé intenzitě; – produkty PCR nebyly detekovány

Přítomnost produktů PCR o velikosti fragmentů 88 bp nebyla potvrzena ve vzorcích DNA izolovaných pomocí fenolové extrakce (m11F, m22F, u22F, u21F, u12F, n11F, n22F, n21F), izolovaných magnetickými částicemi F-kol 77ox (n11č, n21č, u11č, u22č). U vzorků izolovaných pomocí magnetických částic F79/L3-PLL nebyla prokázána přítomnost produktů PCR. Produkty PCR, u nichž byla prokázána přítomnost, byly detekovány ve velmi nízké intenzitě. Velmi nízká intenzita detekovaných produktů může poukazovat na nízkou koncentraci DNA druhu *Lactobacillus fermentum*. Bylo by vhodné použít PCR v reálném čase, která se vyznačuje citlivější detekcí.

Pomocí PCR specifické pro druh *Lactobacillus fermentum* s primery R_ferm a F_ferm byla potvrzena přítomnost specifického produktu o velikosti (88 bp) získaného amplifikací DNA izolované ze vzorků.

5.3 Nutriční analýza

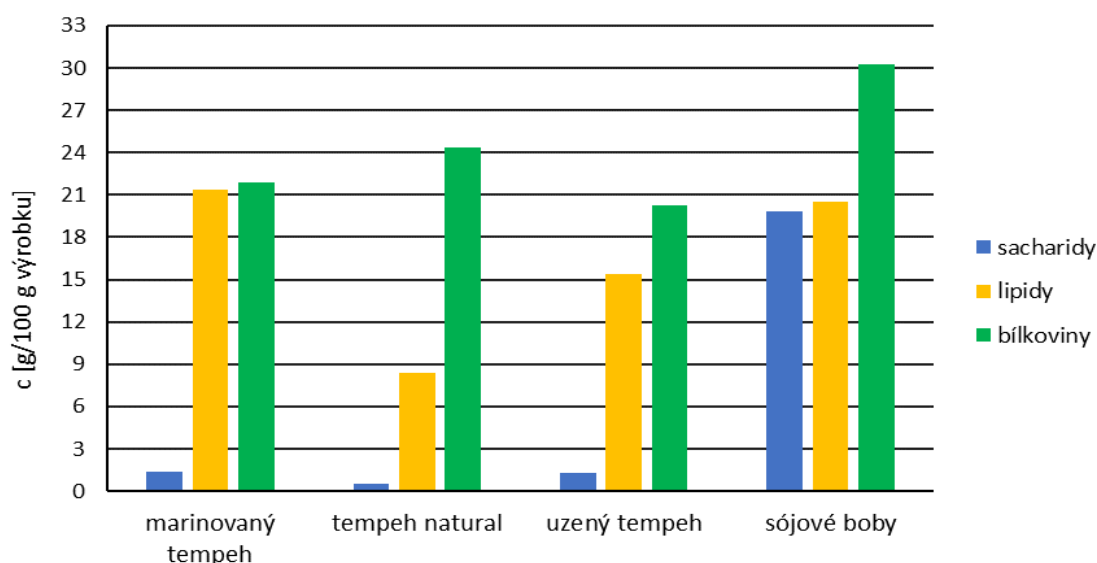
V práci bylo prováděno stanovení obsahu jednotlivých nutričních složek tří druhů tempehu a sójových bobů. Cílem práce je bylo porovnat rozdíl v množství těchto složek v tempehu a sójových bobech, který je ovlivněn především fermentací bobů.

Od každého reálného vzorku byly naváženy vždy dva paralelní vzorky, které byly podrobeny jednotlivým analýzám. Ve výsledcích jsou uvedeny průměrné hodnoty dvou paralelních vzorků.

5.3.1 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Celkový obsah sacharidů byl stanoven spektrofotometricky ve všech testovaných vzorcích. Postup měření je uveden v kap. 4.4.1.1. Z důvodu vysokého obsahu sacharidů ve vzorcích musely být vzorky tempehu 100krát zředěny a vzorky sójových bobů 1000krát zředěny. Jako standard byl použit vodný roztok glukózy (kalibrační křivka glukózy je v Příloze č. 1). Dosazením naměřených hodnot testovaných vzorků do rovnice kalibrace byly vypočteny koncentrace celkových sacharidů ve vzorcích. Kalibrační rovnice byla $A = 11,235 \cdot c + 0,0412$. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (viz Příloha č. 6). Obsah celkových sacharidů v jednotlivých vzorcích byl přepočten na 100 g výrobku.

Zjištěné koncentrace celkových sacharidů se pohybovaly v rozsahu 0,49–19,83 g/100 g výrobku. Obsahy celkových sacharidů v jednotlivých vzorcích jsou znázorněny graficky (viz. Obr. 13).



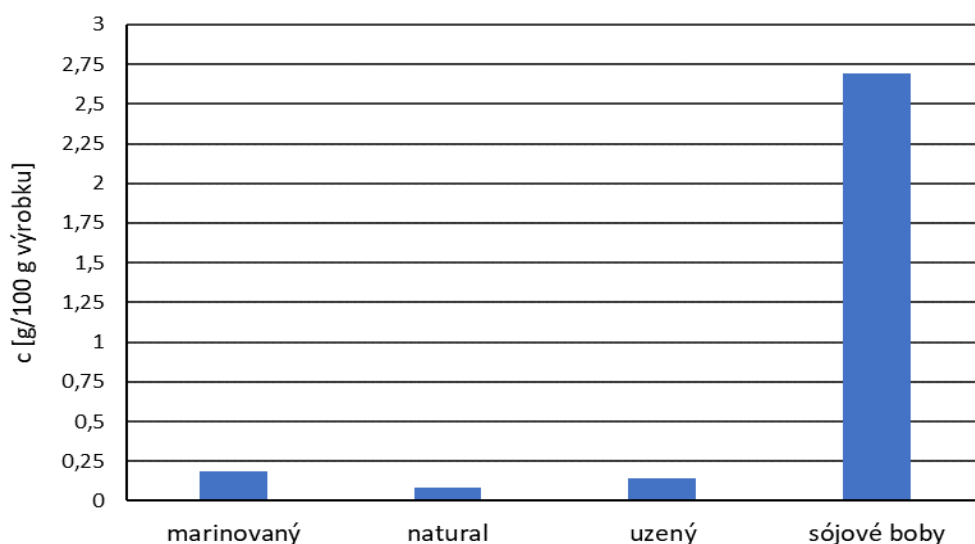
Obr. 13: Přehled obsahu hlavních nutričních složek v jednotlivých vzorcích

Nejvyšší množství sacharidů bylo stanoveno v bobech. Sójové boby podle údajů deklarovaných na obale obsahují vyšší množství sacharidů ve srovnání s tempehy. Naměřené hodnoty celkových sacharidů u všech druhů tempehu neodpovídají hodnotám deklarovaným na obalu výrobků, u sójových bobů množství sacharidů přibližně odpovídá. Důvodem odlišností může být různá spotřeba sacharidů MO. Každý výrobek má trochu jiné nutriční složení z důvodu odlišného chování a zastoupení mikrobiálního společenství.

5.3.2 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona

Množství redukujících sacharidů ve vzorcích bylo zjištěno spektrofotometricky po reakci se Somogyi-Nelsonovými činidly.

Z kalibrační závislosti absorpance barevného produktu na koncentraci standardu glukózy byly vypočteny koncentrace redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích (výsledky viz. tabulka v příloze č. 6). Kalibrační křivka glukózy je uvedena v příloze č. 2. Kalibrační rovnice byla $A = 17,777 \cdot c - 0,0039$.

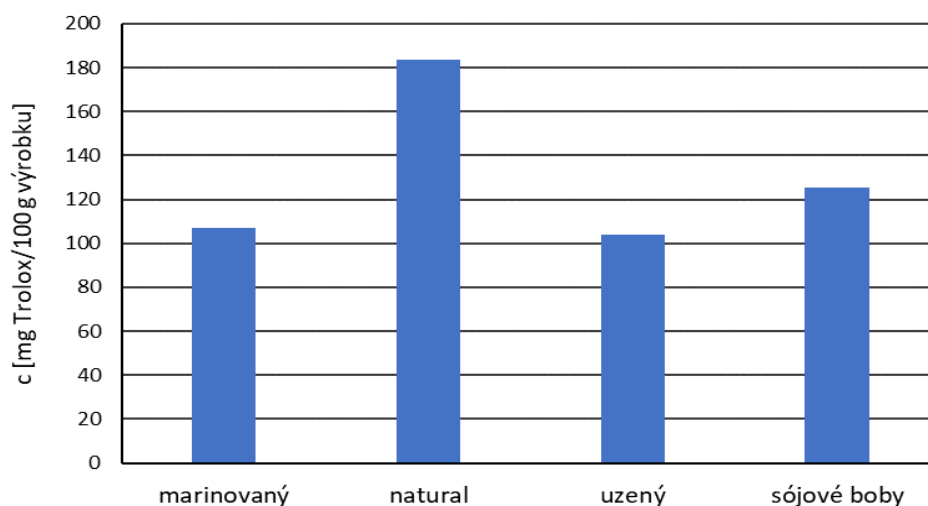


Obr. 14: Obsah redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích přepočítaný na 100 g výrobku

Obsah redukujících sacharidů ve vzorcích je uveden v grafu (Obr. 14). Hodnoty koncentrací redukujících sacharidů se pohybovaly v rozmezí 0,081–2,694 g/100 g produktu. Největší množství redukujících sacharidů bylo stanoveno v sójových bobech. Pro analýzu byly použity vařené boby. Vyšší množství redukujících sacharidů je způsobeno hydrolýzou škrobu při procesu vaření. Snížení redukujících sacharidů po fermentaci odpovídá následujícímu mínění o chování MO. V průběhu fermentace dochází k úbytku monosacharidů (hlavně glukózy) z důvodu jejich spotřeby jako zdroj energie pro růst MO. Určité MO jsou schopny svými enzymy štěpit oligosacharidy (maltóza, rafinóza, stachyóza) na monosacharidy, které jsou dále využívány MO.

5.3.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS*

Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků byla stanovena na základě schopnosti vzorku zhaset radikál ABTS*. Toto zhasení bylo pozorováno spektrofotometricky. Absorbance je měřena po 10 minutách a její pokles se odečítá od hodnoty substrátu (ABTS* + destilovaná voda) měřené v čase 0 minut. Celková antioxidační aktivita byla vypočtena za využití kalibrační křivky standardu Troloxu (viz. příloha č. 3.). Rovnice kalibrace byla $A = 1,3761 \cdot c + 0,0145$. Výsledky jsou uvedeny v tabulce v příloze č. 7.

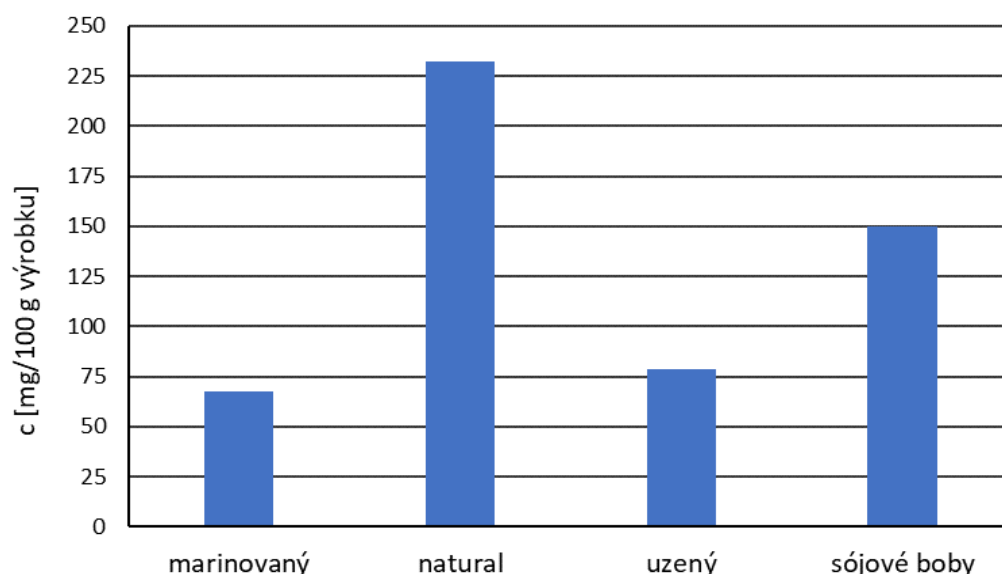


Obr. 15: Celková antioxidační aktivita v jednotlivých vzorcích přepočítaná na 100 g výrobku

V grafickém znázornění jsou uvedeny hodnoty koncentrací antioxidační aktivity v jednotlivých vzorcích (Obr. 15). Zjištěná koncentrace antioxidační aktivity v testovaných produktech se pohybovala v rozmezí 103,92–183,85 mg Trolox/100 g výrobku. Z grafu je vidět, že nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena v tempehu natural. Podle výsledků studií uvedených v literatuře antioxidační aktivita roste během fermentace [23]. To potvrzuje vyšší antioxidační aktivita v tempehu natural ve srovnání s boby (125,35 mg Trolox/100 g). Naměřené údaje neodpovídají údajům uvedeným v literatuře [49]. To může být způsobeno použitím mexických sójových bobů, zatímco v této práci byly k analýze použity sójové boby pocházející z Číny.

5.3.4 Stanovení celkových polyfenolů

Celkové polyfenoly u všech vybraných vzorků byly stanoveny spektrofotometricky. Postup je uveden v kap. 4.4.3. Jako standard byl použit vodný roztok kyseliny gallové. Kalibrační křivka kyseliny gallové je v příloze č. 4. Koncentrace celkových polyfenolů ve vzorcích byla vypočtena dosazením změřených hodnot absorbancí do kalibrační rovnice: $A = 1,4648 \cdot c - 0,0125$. Výsledky jsou uvedeny v tabulce v příloze č. 7.

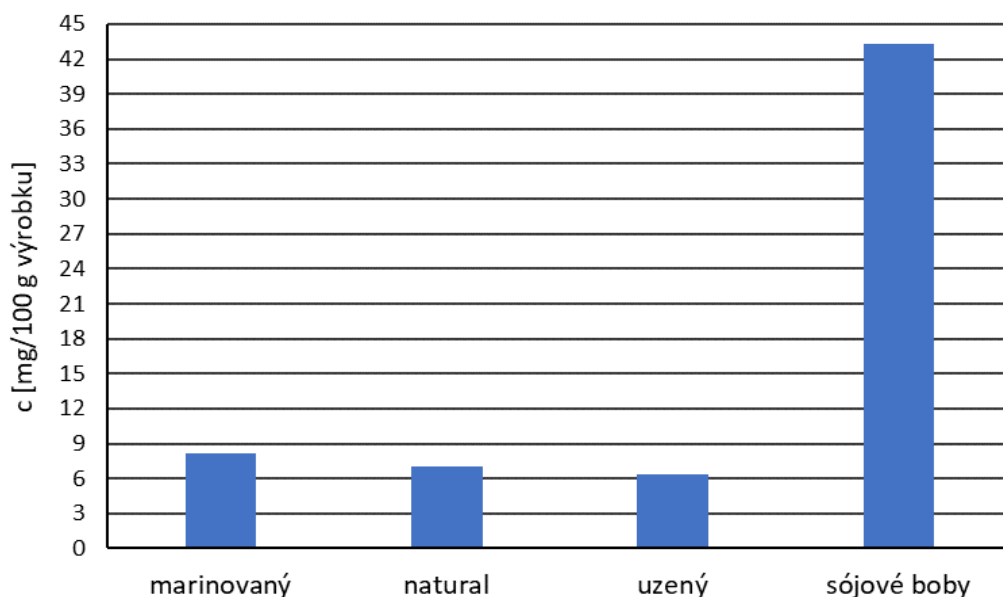


Obr. 16: Koncentrace celkových polyfenolů v jednotlivých vzorcích přepočítané na 100 g výrobku

V grafu na Obr. 16 jsou uvedeny výsledky obsahu polyfenolů ve vzorcích. Naměřené hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozmezí 67,59–232,45 mg/100 g výrobku. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů v analyzovaných vzorcích byl naměřen u vzorku získaného extrakcí z tempehu natural. Podle údajů v literatuře se má množství polyfenolů po fermentaci zvýšit. To bylo dokázáno pouze v případě tempehu natural, kde byla naměřena vyšší koncentrace celkových polyfenolů než v sójových bobech (150,19 mg/100 g). Rozdíly v obsahu fenolických sloučenin v různých studiích mohou být způsobeny vybranou chemickou metodou a extrakcí, genetikou rostlin, podmínkami při pěstování sóji, stářím plodiny, dobou skladování bobů atd. Naměřená data byla porovnána s údaji uváděnými v literatuře. V případě tempehu natural naměřené výsledky odpovídají literárním údajům [50], u sójových bobů nikoliv [49]. Důvodem neshodných údajů může být jiný původ sóji. V literatuře k analýze používali sójové boby z Mexika.

5.3.5 Stanovení celkových flavonoidů

Po reakci s chloridem hlinitým a dusitanem sodným bylo spektrofotometricky proměřeno množství celkových flavonoidů ve všech vzorcích. Na základě kalibrační křivky standardu katechinu (Příloha č. 5) byla vypočtena koncentrace celkových flavonoidů ve vzorcích. Výsledky jsou uvedeny v tabulce v Příloze č. 7. Rovnice kalibrace byla $A = 3,3511 \cdot c + 0,0063$.



Obr. 17: Koncentrace celkových flavonoidů v jednotlivých vzorcích přepočítané na 100 g výrobku

Hodnoty koncentrací celkových flavonoidů se pohybují v rozsahu od 6,33 do 43,33 mg/100 g výrobku. Z grafu (Obr. 17) je patrné, že největší množství celkových flavonoidů bylo naměřeno ve vzorku ze sójových bobů. Všechny testované druhy tempehů obsahují podstatně menší množství flavonoidů ve srovnání se sójovými boby. Výsledky neodpovídají údajům v literatuře, která uvádí, že během fermentace se množství flavonoidů zvyšuje. To může být způsobeno působením odlišným MO, které fermentační proces ovlivňují. Stejně jako v případě polyfenolů (viz. předchozí kapitola) to může být způsobeno také použitou chemickou metodou, podmínkami při pěstování sóji atd. Pro přesnější stanovení by se měla provést HPLC analýza pro stanovení hlavních isoflavonů – aglykony isoflavonů (daidzeinu a genisteinu), jejichž množství se především zvyšuje v průběhu fermentace podle literárních zdrojů.

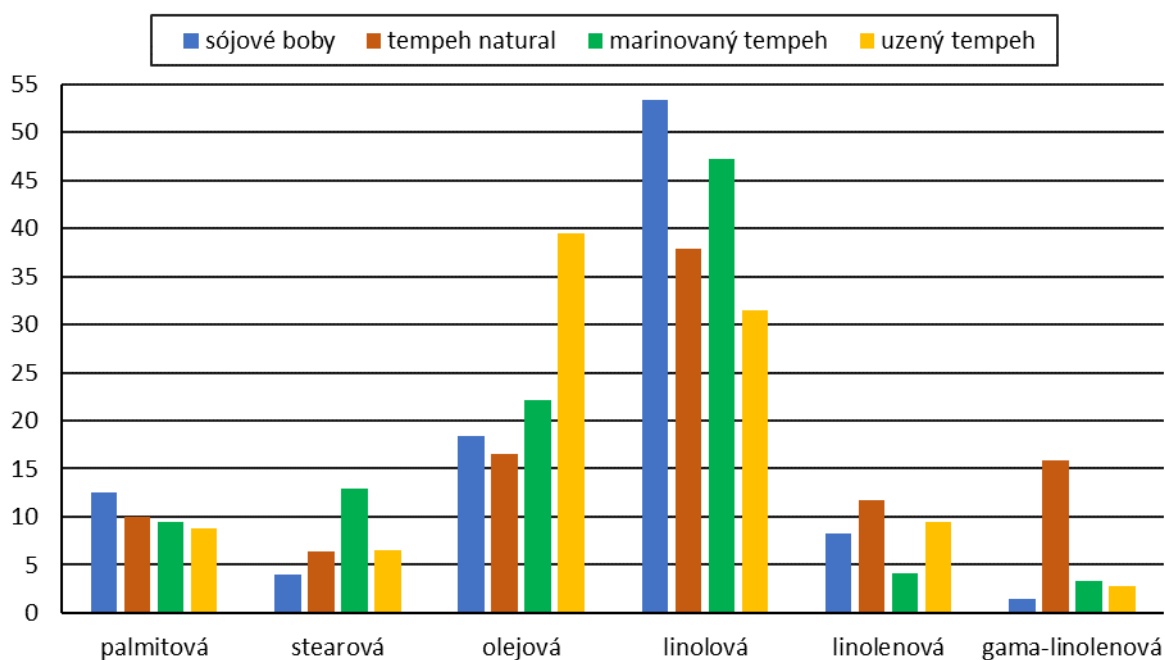
5.3.6 Stanovení obsahu lipidů extrakcí podle Folche

Obsah lipidů ve vzorcích byl po extrakci směsí rozpouštědel chloroformu a metanolu a odpaření na vakuové odparce stanoven gravimetricky. Výsledky jsou uvedeny v Příloze č. 8, hmotnost lipidů je uvedena v gramech na 100 g výrobku. Přehled obsahu lipidů v jednotlivých vzorcích je graficky znázorněn na Obr. 13.

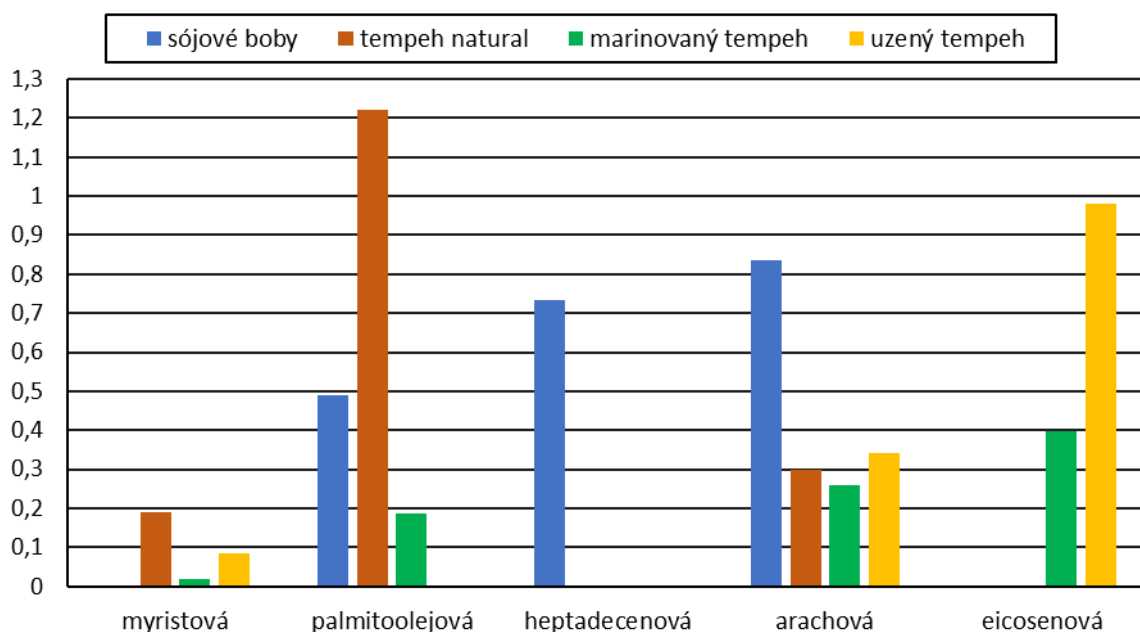
Nejvyšší obsah lipidů byl stanoven v marinovaném tempehu (21,3 g/100 g výrobku) a v sójových bobech (20,5 g/100 g výrobku). Nejméně lipidů obsahuje tempeh natural. Množství lipidů ve všech analyzovaných vzorcích odpovídá výživovým údajům uvedených na obale produktů. Literatura udává, že během fermentace tempehu dochází ke snížení obsahu celkových lipidů. Z grafu je patrné, že u natural a uzeného tempehu tento údaj souhlasí. Marinovaný tempeh obsahuje více tuků než sójové boby, to je ovšem způsobeno přidavkem slunečnicového oleje při jeho přípravě.

5.3.7 Stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie

Profilové zastoupení mastných kyselin ve vzorku sójových bobů a třech druhů tempehu bylo stanoveno s využitím plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (Trace/GC). Vzorky pro analýzu byly připraveny dle kap. 4.4.6. Mastné kyseliny byly převedeny na methylestery, které jsou těkavé. Identifikace jednotlivých mastných kyselin byla provedena na základě srovnání elučních časů identických standardů a z plochy píku bylo vypočteno zastoupení jednotlivých mastných kyselin v hmotnostních procentech. Výsledky kvalitativního stanovení mastných kyselin v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v grafech na Obr. 18 a Obr. 19.



Obr. 18: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin převažujících ve vzorcích



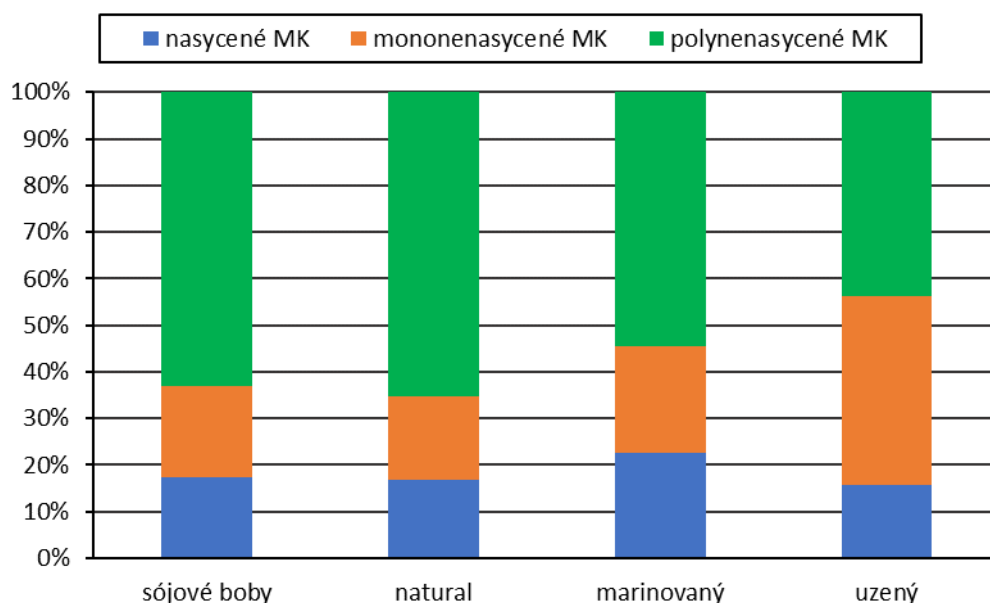
Obr. 19: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin obsažených ve vzorcích v menším množství

Ve vzorku sójových bobů bylo identifikováno celkem 9 mastných kyselin. Mezi nejdůležitější mastné kyseliny v sójových bobech patří kyselina linolová, která tvoří 53 % všech MK. Dále kyselina olejová (18 %), palmitová (12 %) a linolenová (8 %). V menší míře jsou zde zastoupeny také kyseliny stearová a gama-linolenová. Procentuální zastoupení jednotlivých MK ve vařených bobech odpovídá údajům uvedeným v literatuře (viz. kap. 2.1.1). Kyselina heptadecenová byla identifikována pouze v bobech, ve vzorcích tempehu nikoliv.

Ve všech vzorcích tempehu bylo identifikováno dohromady 8 mastných kyselin. Stejně jako u sójových bobů zde převažuje kyselina linolová a olejová. V tempehu natural je nejvyšší množství kyseliny linolenové, gama-linolenové, myristové a palmitoolejové v porovnání se všemi analyzovanými vzorky, naopak zde nebyla detekována přítomnost kyseliny eicosenové.

V sójových bobech bylo vyšší množství kyseliny linolové a palmitové ve srovnání se všemi druhy analyzovaných tempehů. Naopak, na rozdíl od tempehů, v sójových bobech nebyla vůbec detekována kyselina myristová. Z grafů je patrné, že po fermentaci došlo ke zvýšení množství kyseliny stearové a gama-linolenové a ke snížení množství kyseliny palmitové a arachové.

Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin z hlediska nasycenosti je graficky znázorněno na Obr. 20. Ve všech vzorcích kromě uzeného tempehu převažují polynenasycené mastné kyseliny tvořící kolem 60 % všech MK. Po fermentaci tedy nedošlo k výrazné změně v rozložení skupin nasycenosti MK. V uzeném tempehu je zastoupení mononenasycených a polynenasycených MK téměř vyrovnané.



Obr. 20: Procentuální zastoupení skupin mastných kyselin ve vzorcích

5.3.8 Stanovení hrubých bílkovin metodou podle Kjeldahla

Ke stanovení hrubých bílkovin ve vybraných produktech byla použita metoda založená na stanovení množství přítomného dusíku podle Kjeldahla. Byl vypočítán obsah celkového dusíku ve vzorku a poté přepočten na obsah hrubé bílkoviny ve třech druzích tempehu a sójových bobech. Výsledky jsou uvedeny v Příloze č. 8. Obsah celkového dusíku ve vzorku se přepočte na obsah hrubé bílkoviny vynásobením faktorem 5,7 uvedeným v literatuře [49]. Obsahy hrubé bílkoviny v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v grafu na Obr. 13.

5.3.9 Stanovení vitamínu E metodou kapalinové chromatografie

Před vlastní analýzou byl vitamin E ze vzorků extrahován metanolem. Koncentrace vitamínu E v jednotlivých vzorcích byla stanovena z kalibrační závislosti, rovnice kalibrace byla $A = 24222 \cdot c$. Při výpočtech byla zohledněna navážka i ředění. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 20.

Tab. 20: Vypočtené koncentrace vitamínu E ve vzorcích

vzorek	c [$\mu\text{g}/1 \text{ g}$ výrobku]
marinovaný tempeh	4,075
tempeh natural	0,038
uzený tempeh	0,108
sójové boby	0,764

Z tabulky je vidět, že nejvyšší koncentrace vitamínu E byla zaznamenána v marinovaném tempehu, což je pochopitelné vzhledem k lipofilní povaze vitamínu. Literatura udává, že obsah vitamínu se po fermentaci bobů výrazně nemění. Tento údaj neodpovídá naměřeným datům, což může být způsobeno odlišnými podmínkami při přípravě tempehu, jakožto i při pěstování sóji, dále působením plísní, které vitamin používají ke stabilizaci membrán a jako ochranu proti oxidaci.

6 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce uvádí přehled sójových výrobků se zaměřením na fermentovaný sýr tempeh. Dále je zde diskutován vliv mikroorganismů na složení, strukturu, senzorické a jiné vlastnosti tempehu během fermentace. V závěru teoretické části jsou popsány použité metody pro identifikaci mikroorganismů a pro stanovení jednotlivých nutričních složek.

V experimentální části práce byla studována nutriční hodnota třech druhů sójového výrobku tempeh a sójových bobů, dále byla provedena mikrobiologická charakterizace stejných druhů tempehu jako u nutriční analýzy. Nutriční analýza zahrnuje také srovnání nutriční hodnoty vybraných druhů tempehu a sójových bobů. Byl studován vliv fermentace na změnu antioxidační aktivity a dalších nutričních hodnot.

V rámci mikrobiologické identifikace byla provedena optimalizace izolace DNA z hrubého lyzátu. DNA byla z hrubých lyzátů izolována fenolovou extrakcí, dále pomocí magnetických mikročástic F-kol 77-ox a pomocí magnetických nanočástic F79/L3-PLL. Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky, a poté byly provedeny specifické qPCR s využitím primerů specifických pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a pro oddělení *Zygomycetes*, mezi které patří plíseň rodu *Rhizopus*. Jako interkalační barvivo bylo využito fluorescenční barvivo SYTO-9. S využitím konvenční PCR byla studována přítomnost kvasinkové DNA a byla provedena druhově specifická PCR pro *Lactobacillus fermentum*.

Při výrobě tempehu se využívá startovací kultury plísně *Rhizopus* sp. Výrobce udává, že vybraný produkt obsahuje druh *Rhizopus oligosporus*. Literární zdroje uvádí, že v tempehu jsou přítomny i jiné MO, které se přirozeně vyskytují v sóji nebo jsou záměrně přidávány za účelem přispívání k procesu fermentace. Pomocí molekulárně diagnostické metody PCR byla prokázána přítomnost DNA domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus*, celková DNA kvasinek a DNA druhu *Lactobacillus fermentum*. Přítomnost DNA plísní prokázána nebyla. Důvodem může být použití nových primerů, u kterých je třeba provést optimalizaci.

Mikroorganismy působící během fermentace vedou k nutričním změnám. V důsledku produkce enzymů dochází ke snížení celkového množství lipidů, sacharidů a bílkovin. Nárůst polyfenolů po fermentaci značí vyšší antioxidační aktivitu. Ve vybraných produktech bylo stanoveno celkové množství sacharidů, lipidů a bílkovin. Dále byla testována antioxidační aktivita, v případě tempehu natural bylo potvrzeno, že se její hodnota během fermentace sóji zvyšuje. Stejně tak dochází ke zvýšení koncentrace polyfenolů po fermentaci. Další antioxidační látkou stanovenou ve vybraných produktech byl vitamin E. Metodou plynové chromatografie byl zjištěn profil mastných kyselin ve vzorcích. V tempezích i sójových bobech převažovala kyselina linolová a olejová. Z hlediska nasycenosti mastných kyselin ve všech vzorcích kromě uzeného tempehu převažují polynenasycené mastné kyseliny.

Naměřené výsledky ukazují, že během fermentace dochází ke zvýšení množství antioxidačních látek působících proti škodlivým volným radikálům v našem těle. Dále bylo zjištěno, že tempeh i sójové boby jsou bohatým zdrojem polynenasycených mastných kyselin (omega 3 a omega 6). Tyto kyseliny jsou pro člověka esenciální a podílí se na snížení hladiny celkového cholesterolu. Fermentace vede k lepší stravitelnosti sójových bobů. V průběhu

jednotlivých procesů výroby tempehu dochází v sóji ke snížení antinutričních látek, jako například kyselina fytová, která snižuje dostupnost minerálů nezbytných pro metabolické procesy. Z uvedených údajů vyplývá, že fermentace způsobuje pozitivní změny v sójových bobech a výsledný produkt – tempeh je ze zdravotního hlediska vhodnější ke konzumaci než samotná vařená sója.

7 SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] SEUMAHU, CECILIA ANNA, ANTONIUS SUWANTO, IMAN RUSMANA a DEDY DURYADI SOLIHIN. *Bacterial and Fungal Communities in Tempeh as Reveal by Amplified Ribosomal Intergenic Sequence Analysis*. HAYATI Journal of Biosciences[online]. 2013, **20**(2), 65-71 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.4308/hjb.20.2.65. ISSN 19783019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S197830191630105X>
- [2] ASIF, Mohammad a Mrityunjoy ACHARYA. *Phytochemicals and nutritional health benefits of soy plant* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.4103/2231-0738.106998. ISBN 10.4103/2231-0738.106998. Dostupné z: <http://www.ijnpnd.com/text.asp?2013/3/1/64/106998>
- [3] FARNWORTH, Edward R., ed. *Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition* [online]. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008 [cit. 2018-04-26]. ISBN 978-1-4200-5326-5. Dostupné z: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Fermented-Functional-Foods-Second-Edition/Farnworth/p/book/9781420053265#googlePreviewContainer>
- [4] CHEN, Kuan-I, Mei-Hui ERH, Nan-Wei SU, Wen-Hsiung LIU, Cheng-Chun CHOU a Kuan-Chen CHENG. *Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s00253-012-4330-7. ISBN 10.1007/s00253-012-4330-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4330-7>
- [5] JELEŇ, Henryk, Małgorzata MAJCHER, Alexandra GINJA a Maciej KULIGOWSKI. *Determination of compounds responsible for tempeh aroma* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.047. ISBN 10.1016/j.foodchem.2013.03.047. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613003506>
- [6] OŠŤÁDALOVÁ, Martina a Jana POKORNÁ. *Hygiena a technologie brambor, škrobu, luštěnin, olejnatých semen a tuků*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2014, 106 s. ISBN 978-80-7305-709-1.
- [7] KAUSHIK, Geetanjali, Santosh SATYA a S.N. NAIK. *Effect of domestic processing techniques on the nutritional quality of the soybean* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s12349-009-0079-7. ISBN 10.1007/s12349-009-0079-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12349-009-0079-7>
- [8] SCILEWSKI DA COSTA ZANATTA, Tatiane, Roberta MANICA-BERTO, Cristiano Dietrich FERREIRA, Michele Maciel Crizel CARDOZO, Cesar Valmor ROMBALDI,

- Rui Carlos ZAMBLAZI a Álvaro Renato Guerra DIAS. *Phosphate Fertilizer and Growing Environment Change the Phytochemicals, Oil Quality, and Nutritional Composition of Roundup Ready Genetically Modified and Conventional Soybean* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05499. ISBN 10.1021/acs.jafc.6b05499. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b05499>
- [9] SARKAR, Prabir K, Linda J JONES, Willy GORE, Graham S CRAVEN a Shawn M SOMERSET. Changes in Soya Bean Lipid Profiles during Kinema Production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 1996, July 1996, **71**(3), 321-328 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199607%2971%3A%3C321%3A%3AAID-JSFA587%3E3.0.CO%3B2-J>
- [10] DE REU, J.C., D. RAMDARAS, F.M. ROMBOUTS a M.J.R. NOUT. *Changes in soya bean lipids during tempe fermentation* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/0308-8146(94)90116-3. ISBN 10.1016/0308-8146(94)90116-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814694901163>
- [11] MASILAMANI, Madhan, John WEI a Hugh A. SAMPSON. *Regulation of the immune response by soybean isoflavones* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s12026-012-8331-5. ISBN 10.1007/s12026-012-8331-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-012-8331-5>
- [12] NOUT, M.J.R. a J.L. KIERS. *Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x. ISBN 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x>
- [13] KIM, Shin Hye a Mi Jung PARK. *Effects of phytoestrogen on sexual development* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.3345/kjp.2012.55.8.265. ISBN 10.3345/kjp.2012.55.8.265.
- [14] FOROUHARI, S., Zh. HEIDARI, Z. TAVANA, M. SALEHI a M. SAYAD. The Effect of Soya on some Hormone levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome (balance diet): a cross over Randomized clinical trial. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* [online]. 2013, December 2013, **3**(1), 246-250 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <http://www.beppls.com/dec2013/42f.pdf>
- [15] HAMILTON-REEVES, Jill M., Gabriela VAZQUEZ, Sue J. DUVAL, William R. PHIPPS, Mindy S. KURZER a Mark J. MESSINA. *Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.038. ISBN

- [16] JULKA, Samir, Krishna KUPPANNAN, Anton KARNOUP, Demetrius DIELMAN, Barry SCHAFER a Scott A. YOUNG. *Quantification of Gly m 4 Protein, A Major Soybean Allergen, By Two-Dimensional Liquid Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometry Detection* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1021/ac3024685. ISBN 10.1021/ac3024685. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac3024685>
- [17] EGOUNLETY, M a O.C AWORH. *Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with Rhizopus oligosporus on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (Glycine max Merr.), cowpea (Vigna unguiculata L. Walp) and groundbean (Macrotyloma geocarpa Harms)* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/S0260-8774(02)00262-5. ISBN 10.1016/S0260-8774(02)00262-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877402002625>
- [18] SHIVDASANI, Vishakha. Soya-a wonder food or not?. In: *Livemint* [online]. Indie, 2018, 23 September 2013 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.livemint.com/Leisure/n0l8obiKteDk1skl7sa1VL/Soyaa-wonder-food-or-not.html>
- [19] PISOL, Balqis, Lilis NURAIDA, Noriham ABDULLAH, SULIANTARI a Khalilah Abdul KHALIL. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Soybean Tempe. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering* [online]. Copyright©2008-2015, April 2013, **58**(7), 32-36 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.7763. Dostupné z: <http://www.ipcbee.com/vol58/007-ICBEC2013-H016.pdf>
- [20] BARTKIENE, Elena, Vita KRUNGLEVICIUTE, Grazina JUODEIKIENE, Daiva VIDMANTIENE a Zita MAKNICKIENE. *Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/jsfa.6827. ISBN 10.1002/jsfa.6827. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6827>
- [21] LIN, Qiuye, Olivier MATHIEU, Thomas A. TOMPKINS, Nicole D. BUCKLEY a Julia M. GREEN-JOHNSON. *Modulation of the TNF α -induced gene expression profile of intestinal epithelial cells by soy fermented with lactic acid bacteria* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.jff.2016.02.047. ISBN 10.1016/j.jff.2016.02.047. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464616300111>
- [22] ESAKI, Hideo, Hiromichi ONOZAKI, Shunro KAWAKISHI, Toshihiko OSAWA a Julia M. GREEN-JOHNSON. *New Antioxidant Isolated from Tempeh* [online]. [cit.

- 2018-04-26]. DOI: 10.1021/jf950454t. ISBN 10.1021/jf950454t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950454t>
- [23] CHANG, Chen-Tien, Cheng-Kuang HSU, Su-Tze CHOU, Ya-Chen CHEN, Feng-Sheng HUANG a Yun-Chin CHUNG. *Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using Rhizopus oligosporus* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.01907.x. ISBN 10.1111/j.1365-2621.2009.01907.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2009.01907.x>
- [24] FotoosVanRobin on Flickr. Black-Eyed Pea and Tempeh Beanballs. In: *Seriouseats* [online]. Washington, D.C.: © 2018 Serious Eats, 2010 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.seriouseats.com/recipes/2011/01/black-eyed-pea-and-tempeh-beanballs-recipe.html>
- [25] PISOL, B., ABDULLAH, N., KHALIL, K. A. a NURAIDA, L. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different stages of traditional Malaysian tempeh production. *Malaysian Journal of Microbiology* [online]. **11**(4), 358-364 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.21161/mjm.71415. ISBN 10.21161/mjm.71415. Dostupné z: [http://mjm.usm.my/uploads/issues/448/5-Corrected%20proof%20mjm-714-15%20\(FINAL\).pdf](http://mjm.usm.my/uploads/issues/448/5-Corrected%20proof%20mjm-714-15%20(FINAL).pdf)
- [26] BARUS, TATI, ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI a HANNY WIJAYA. *Role of Bacteria in Tempe Bitter Taste Formation: Microbiological and Molecular Biological Analysis Based on 16S rRNA Gene* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.5454/mi.2.1.4. ISBN 10.5454/mi.2.1.4. Dostupné z: <http://jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/26>
- [27] MUROOKA, Yoshikatsu, Mitsuo YAMSHITA, ARIS TRI WAHYUDI a HANNY WIJAYA. *Traditional healthful fermented products of Japan: Microbiological and Molecular Biological Analysis Based on 16S rRNA Gene* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s10295-008-0362-5. ISBN 10.1007/s10295-008-0362-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0362-5>
- [28] AGUIRRE, Laura, Marisa S. GARRO, Graciela SAVOY DE GIORI a HANNY WIJAYA. *Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria: Microbiological and Molecular Biological Analysis Based on 16S rRNA Gene* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.018. ISBN 10.1016/j.foodchem.2008.05.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608005736>
- [29] DENTER, Jutta, Hans-Jürgen REHM, Bernward BISPING a HANNY WIJAYA. *Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe*

- fermentation: Microbiological and Molecular Biological Analysis Based on 16S rRNA Gene* [online]. [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00155-X. ISBN 10.1016/S0168-1605(98)00155-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816059800155X>
- [30] EFRIWATI, ANTONIUS SUWANTO, GAYUH RAHAYU a LILIS NURAIDA. Population Dynamics of Yeasts and Lactic Acid Bacteria (LAB) During Tempeh Production. *HAYATI Journal of Biosciences* [online]. 2013, **20**(2), 57-64 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.4308/hjb.20.2.57. ISSN 19783019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1978301916301048>
- [31] Seznam probiotických a prebiotických výrobků na českém trhu. *Společnost pro probiotika a prebiotika* [online]. ©2007-2018 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <http://www.probiotika-prebiotika.cz/cs/dokumenty/>
- [32] KIM, Min Jung, Han Sub KWAK, Hee Yeon JUNG a Sang Sook KIM. *Microbial communities related to sensory attributes in Korean fermented soy bean paste (doenjang)* [online]. [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.09.032. ISBN 10.1016/j.foodres.2016.09.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916304239>
- [33] ŠMARDA, J., J.DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [34] *Techniky testů – Real-time PCR. Generi biotech* [online]. © 2009–2016 [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://www.gyn-test.cz/metody-provadeni-testu/>
- [35] SIGMA-ALDRICH CO. qPCR Technical Guide. In: Sigma-Aldrich® [online]. © 2008 [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/qpcr_technical_guide.pdf
- [36] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – Úloha č. 3*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚCHBPT, ZS 2015–2016.
- [37] HÁLKOVÁ, Jana, Marie Rumíšková a Jana Rieglová. *Analýza potravin*. 2. Vyd. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2001. 101 s. ISBN 80-86494-02-0
- [38] KOPLÍK, Richard. *Sacharidy*. In: *VŠCHT Praha* [online]. 2018 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Sacharidy.pdf>

- [39] ČOPÍKOVÁ, Jana. Chemie a analytika sacharidů. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1997. 104 s. ISBN 80-7080-306-1
- [40] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. Praktikum z analytické chemie potravin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. Nepublikováno.
- [41] RÉBLOVÁ, Zuzana. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chemické listy* [online]. ©2018, 31. března 2011, **105**, 667-673 [cit. 2018-04-27]. ISSN 1213-710. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2011_09_667-673.pdf
- [42] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. *Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals* [online]. [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.08.012. ISBN 10.1016/j.talanta.2006.08.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006005741>
- [43] ZLOCH, Zdeněk, J. ČELAKOVSKÝ a A. AUJEZDSKÁ. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Ústav hygieny Lékařské fakulty UK* [online]. Plzeň, 2004, 1 April 2015. 1-35 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Zdenk_Zloch/publication/268049143-Stanoveni_obsahu_polyfenolu_a_celkove_antioxidacni_kapacity_v_potravinach_rostlinneho_puvodu/links/551bc570cf2fe6cbf75e6ae/Stanoveni-obsahu-polyfenolu-a-celkove-antioxidacni-kapacity-v-potravinach-rostlinneho-puvodu.pdf
- [44] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2018-05-01]. DOI:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 1098-5336. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [45] TOFALO, R., et al. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* [online]. 2012, **23**(2), 356-362 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.07.032. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511003057>
- [46] HATA, D. J., S. P. BUCKWALTER, B. S. PRITT, G. D. ROBERTS a N. L. WENGENACK. *Real-Time PCR Method for Detection of Zygomycetes* [online]. [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1128/JCM.02331-07. ISBN 10.1128/JCM.02331-07. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02331-07>

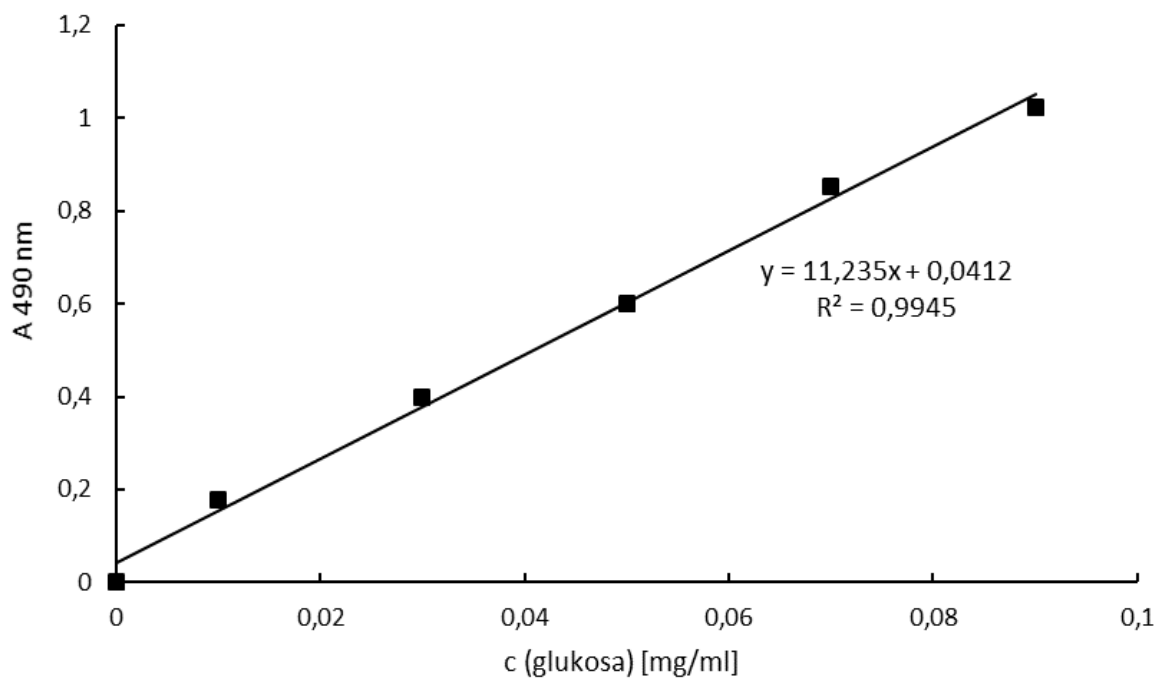
- [47] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [48] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 9788021447882.
- [49] GUZMÁN-ORTIZ, Fabiola A., Eduardo SAN MARTÍN-MARTÍNEZ, María E. VALVERDE, Yolanda RODRÍGUEZ-AZA, José De J BERRÍOS a Rosalva MORA-ESCOBEDO. *Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (Glycine max L.)* [online]. [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1080/19476337.2017.1302995. ISBN 10.1080/19476337.2017.1302995. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1302995>
- [50] CHENG, Kuan-Chen, Jiun-Yi WU, Jiun-Tsai LIN a Wen-Hsiung LIU. *Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with Rhizopus spp* [online]. [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1007/s00217-013-1936-7. ISBN 10.1007/s00217-013-1936-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-013-1936-7>
- [51] LIVESEY, G, D BUSS, P COUSSEMENT, et al. *Suitability of traditional energy values for novel foods and food ingredients* [online]. [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/S0956-7135(99)00108-5. ISBN 10.1016/S0956-7135(99)00108-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713599001085>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

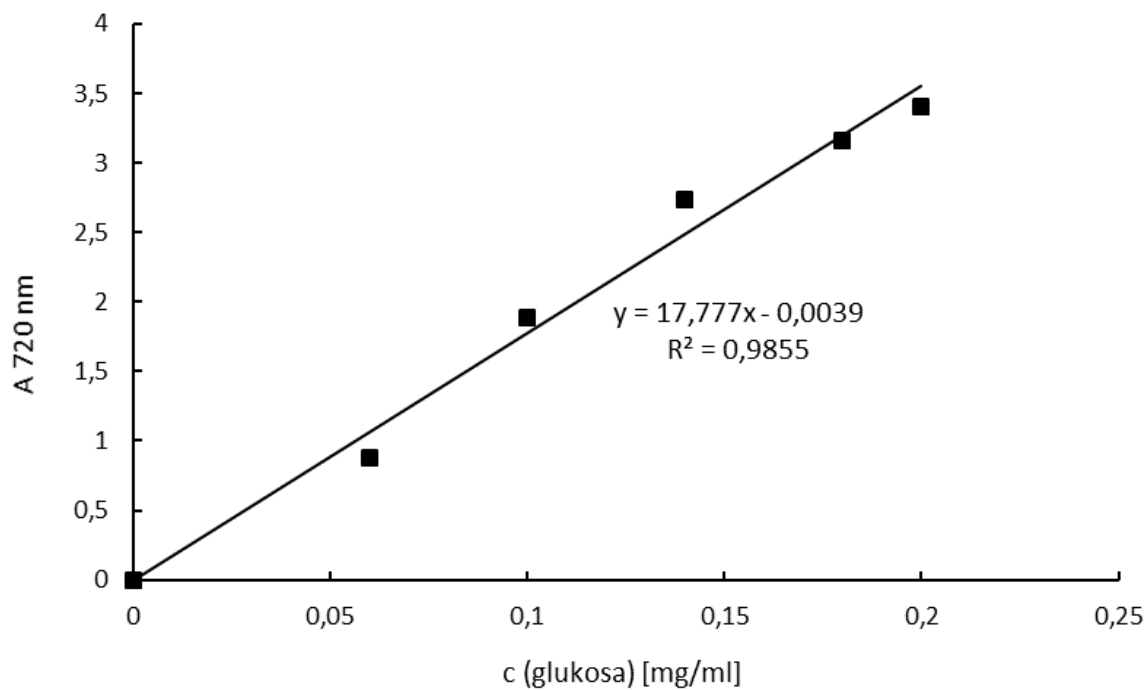
ABTS	2,2'-azinobis.(3- ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát
ANF	antinutriční faktor
bp	(base pair) pár bází
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CIZ	chloroform-izoamylalkohol (24:1)
c _t	prahový cyklus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
dsDNA	dvouřetězcová DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FID	plamenově ionizační detektor
FRAP	ferric reducing antioxidant potential
GC	plynová chromatografie
GM	geneticky modifikovaný
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LAB	bakterie mléčného kvašení
MK	mastná kyselina
MO	mikroorganismy
NaCl	chlorid sodný
NK	nukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDA	detektor s diodovým polem
PEG	polyethylen glykol
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
R ²	korelační koeficient
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
Tag DNA	termostabilní enzym izolovaný z termofilní bakterie <i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA

9 PŘÍLOHY

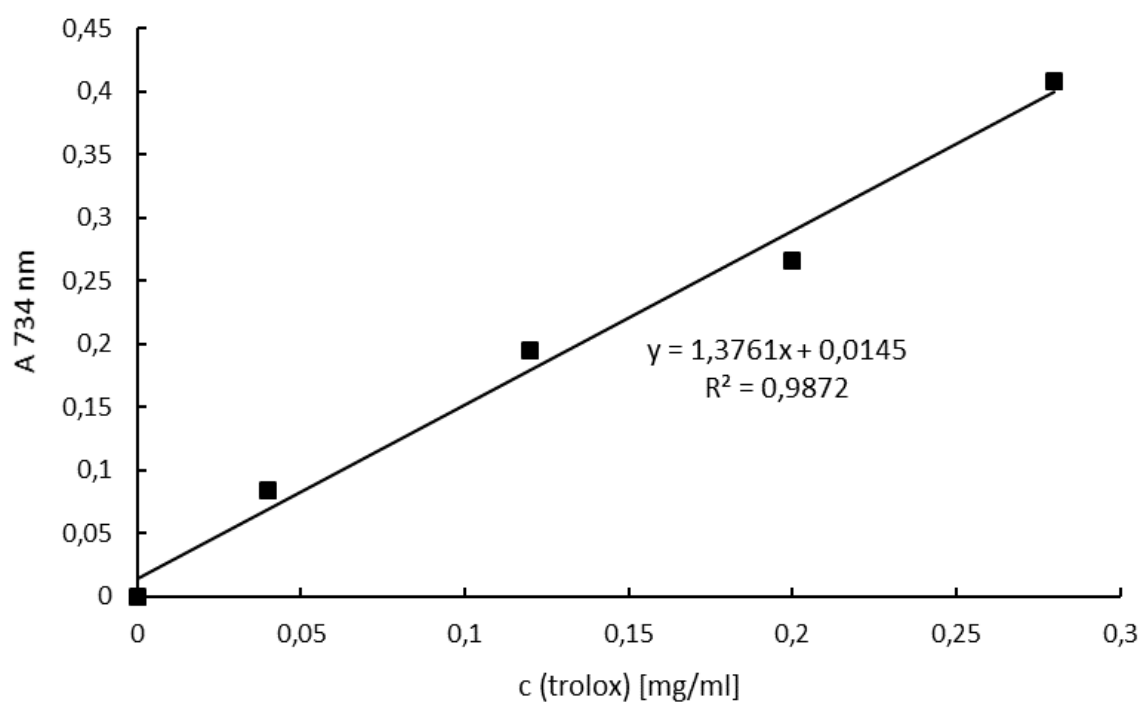
Příloha č. 1: Kalibrační křivka glukózy pro stanovení celkových sacharidů



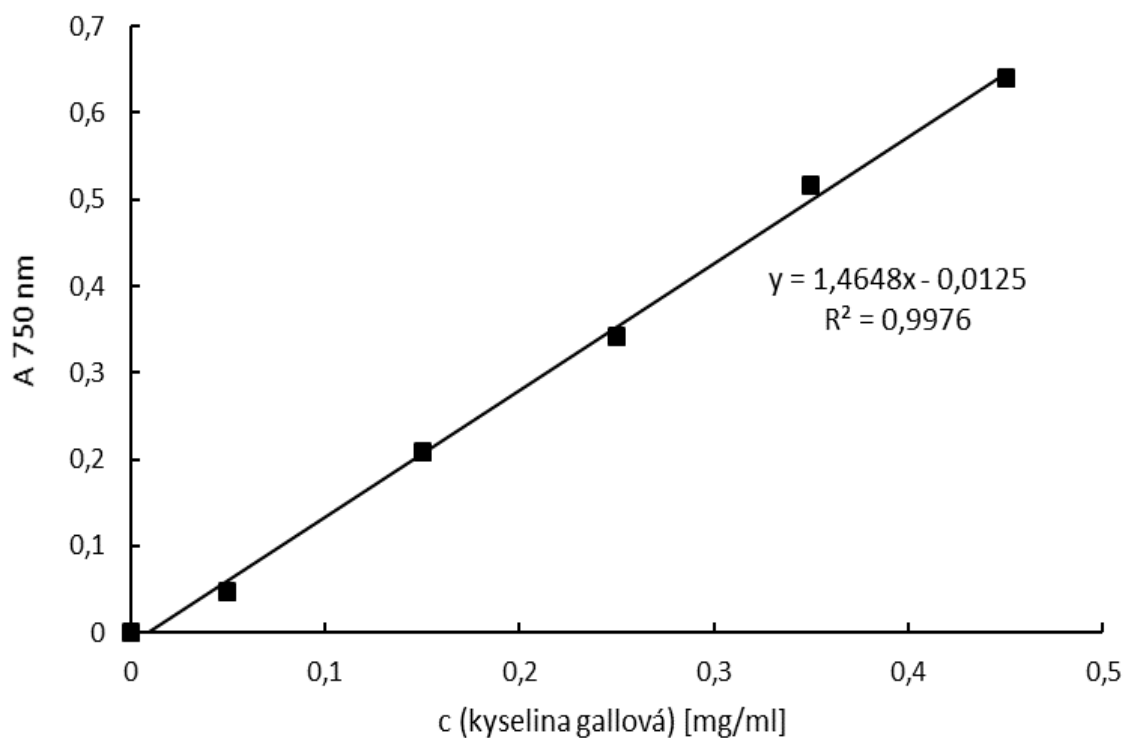
Příloha č. 2: Kalibrační křivka glukózy pro stanovení redukujících sacharidů



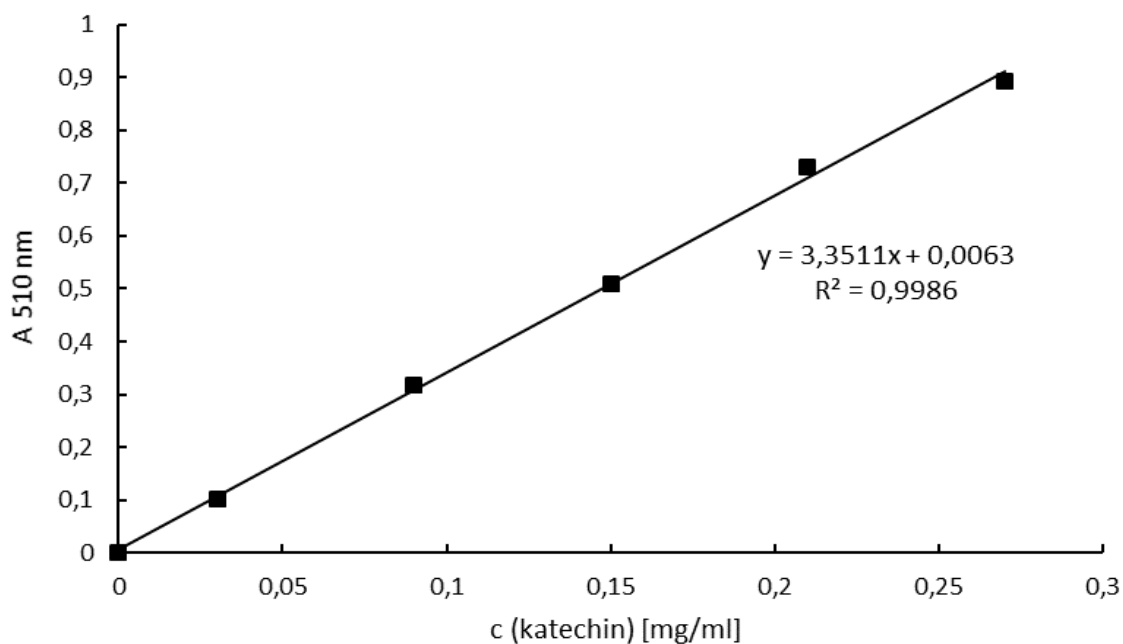
Příloha č. 3: Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity



Příloha č. 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů



Příloha č. 5: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů



Příloha č. 6: Vypočtené koncentrace celkových sacharidů a redukujících sacharidů ve vzorcích (koncentrace jsou vztaženy na 100 g výrobku)

stanovení	dle Duboise		dle Somogyi-Nelsona	
	A 490 nm	c [g/100 g]	A 720 nm	c [g/100 g]
marinovaný	0,194	1,360	0,030	0,188
natural	0,096	0,488	0,011	0,081
uzený	0,187	1,293	0,022	0,143
sójové boby	0,264	19,831	0,044	2,694

Příloha č. 7: Vypočtené koncentrace antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a celkových flavonoidů ve vzorcích (koncentrace jsou vztaženy na 100 g výrobku)

stanovení	antioxidační aktivity pomocí ABTS*		celkových polyfenolů		celkových flavonoidů	
	A 734 nm	c [mg Trolox/100 g]	A 750 nm	c [mg/100 g]	A 510 nm	c [mg/100 g]
marinovaný	0,162	106,824	0,087	67,586	0,034	8,117
natural	0,268	183,853	0,328	232,455	0,030	7,072
uzený	0,158	103,917	0,103	78,850	0,028	6,326
sójové boby	0,187	125,354	0,208	150,191	0,152	43,329

Příloha č. 8: Stanovená množství lipidů a bílkovin ve vzorcích

vzorek	c [g/100 g výrobku]	
	lipidy	bílkoviny
marinovaný	21,34	21,89
natural	8,39	24,39
uzený	15,41	20,24
sójové boby	20,51	30,22

Příloha č. 9: Výživové údaje deklarované na obalech vybraných vzorků (uvedená množství jsou obsažena ve 100 g výrobku)

vzorek	c [g/100 g výrobku]		
	sacharidy	lipidy	bílkoviny
marinovaný	0,2	26,9	17,3
natural	3,8	8,3	16,7
uzený	8,8	25,0	17,2
sójové boby	21,0	20,0	36,0