

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Zjišťování druhového původu masa hmotnostní spektrometrií

Determination of meat origin by mass spectrometry

Marcela Horníková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor B BI-CH

Praha 2019

Odevzdáním této bakalářské práce na téma „Zjišťování druhového původu masa hmotnostní spektrometrií“ potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucí práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 8. 4. 2019

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za cenné rady, odborné konzultace a trpělivost.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zjišťováním druhového původu masa pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) s následným vyhodnocením analýzou hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis). V dnešní době je tato metoda využívána spíše pro mikrobiologické účely nežli pro ověřování autenticity potravin. A i když je to technika velice rychlá, a tím by byla vhodná i pro analýzu podezřelých potravin, její pořizovací náklady jsou vysoké a dosud se v tomto oboru příliš neuplatňuje.

Pro tuto práci bylo připraveno jedenáct druhů masa v syrové a následně usušené podobě (daňčí, hovězí, kachní, kozí, králičí, kuřecí, nutrie, rybí, srnčí, vepřové a zaječí maso). Všechny druhy masa pocházely ze zvířat z domácího chovu či z ulovené divoké zvěře. Proteiny, které byly obsaženy v uvedených vzorcích, byly nejprve štěpeny enzymaticky pomocí trypsinu. Všechna spektra získaná z měření hmotnostní spektrometrií byla extrahována do počítačového programu R, ve kterém probíhalo vyhodnocování. V tomto programu byly vygenerovány jednotlivé grafy (např. trojrozměrný graf, kumulativní graf a graf variability). Na základě těchto výsledků mohlo být rozhodnuto, zda je či není možné rozlišení jednotlivých mas. Všechny vzorky byly hodnoceny nejdříve mezi sebou a následně byly porovnávány ve dvou menších skupinách. Vzorky, které nebylo možné odlišit ani v menších skupinách, byly dále porovnávány s vybranými druhy masa. Deset z jedenácti vzorků se podařilo rozlišit, a proto můžeme hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF pro druhové rozpoznání původu mas označit za úspěšnou.

KLÍČOVÁ SLOVA

maso, zvířecí druhy, enzymové štěpení, hmotnostní spektrometrie, analýza hlavních komponent

ABSTRACT

This thesis focuses on determination of meat origins based on mass spectrometry MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) followed by principal components analysis (PCA). Today, this method is mainly used for microbiological purposes and not used often for verification of food authenticity. Although the technique is very fast and suitable for analysis of suspicious products, the investment costs are high which probably leads to the fact that the technique remain not well known in the food industry.

Eleven types of raw meat (fallow deer, beef, duck, goat, rabbit, chicken, coypu, fish, roe, pork and hare) were prepared as samples and dried out. All types of meat came from home-grown free-range animals or animals that were hunted in the wild. Proteins within the listed meats were enzymatically cleaved by trypsin. All mass spectra obtained by mass spectrometry were extracted and evaluated in computer program R. Same program was used for generating graphs (e.g. 3-D graph, cumulative graph and graph of variability). Based on these results it was decided if it is possible to differentiate between different types of meat. At first, all the samples were compared between each other and then were separated into two smaller groups and compared again. The samples that were not possible to differentiate even in the small groups were isolated and then compared with selected types of meat.

Ten of the eleven meat samples were successfully distinguished, which confirms that MALDI-TOF mass spectrometry is suitable for recognition of raw meat animal species origin.

KEYWORDS

meat, animal species, enzyme digestion, mass spectrometry, Principal Component Analysis

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Maso	9
2.2 Maso jako svalová tkáň	9
2.2.1 Hladká svalovina	10
2.2.2 Příčně pruhovaná svalovina.....	10
2.3 Chemické složení masa	10
2.3.1 Bílkoviny.....	11
2.3.2 Tuky	16
2.3.3 Vitamíny.....	17
2.3.4 Minerální látky	17
2.4 Kvalita masa	18
2.4.1 pH masa.....	18
2.4.2 Schopnost zadržet vodu.....	19
2.4.3 Barva, šťavnatost, konzistence, tuhost, chuť.....	19
2.5 Faktory ovlivňující kvalitu masa	19
2.5.1 Plemeno zvířete	19
2.5.2 Věk	20
2.5.3 Pohlaví.....	20
2.5.4 Výživa	20
2.6 Postmortální změny v mase.....	21
2.6.1 Autolýza masa	21
2.6.2 Proteolýza masa.....	21
2.7 Charakteristika zkoumaných druhů mas.....	22
2.7.1 Hovězí maso	22
2.7.2 Vepřové maso.....	22
2.7.3 Drůbeží maso.....	22
2.7.4 Králičí maso	22
2.7.5 Zvěřina	23
2.7.6 Maso nutrie.....	23
2.7.7 Kozí maso.....	23
2.7.8 Rybí maso.....	23
2.8 Falšování masa	24
2.9 Analýza hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.....	27
2.9.1 Princip MALDI-TOF MS.....	27
2.9.2 Vyhodnocení výsledků pomocí PCA (Principal Component Analysis)	27
2.9.3 Enzymatické štěpení trypsinem.....	28
2.9.4 ZipTip – reverzní fáze C ₁₈	28
3. Experimentální část.....	29
3.1 Použité chemikálie při experimentu	29
3.2 Zpracování vzorku	29
3.3 Vážení vzorku.....	30
3.4 Enzymatické štěpení vzorků	30
3.5 Přečišťování vzorků.....	30
3.6 Příprava vzorků na měření.....	31
3.7 Měření na MALDI-TOF MS	32
3.8 Vyhodnocení vzorků metodou PCA.....	32
4. Výsledky a diskuze	33
4.1 Rozlišení všech vzorků.....	33

4.2	Rozlišení první skupiny vzorků	35
4.3	Rozlišení srnčího masa	37
4.4	Rozlišení druhé skupiny vzorků	44
4.5	Rozlišení daňčího masa	48
4.6	Rozlišení rybího masa	50
5.	Závěr	52
6.	Seznam použité literatury.....	54
7.	Seznam použitých zkratk	57

1. Úvod

Maso je základní potravinou lidstva už od pravěku. Je to bohatý zdroj především bílkovin, ale také tuků, vitamínů i minerálních látek. V dnešní době stále narůstá konzumace živočišné stravy a spotřeba rostlinné potravy klesá. Při této vyšší spotřebě masa dochází k tomu, že většina výrobců masných produktů a jiné živočišné stravy se snaží na prodeji těchto produktů co nejvíce utřít. Z tohoto důvodu dochází k tzv. falšování masa. Tento pojem vznikl v době, kdy byly veškeré masné výrobky vyráběné za účelem prodeje. Za zakladatele analytických metod pro odhalování falšování potravin je Fridrich Accum. Analytické metody, které lze použít pro zjištění autenticity potravin, jsou metody založené na analýze DNA a metody založené na proteinové analýze, do nichž patří technika proteomika, která je založená na hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením.

Do skupiny proteomických metod patří i metoda, kterou se zabývám v této bakalářské práci – metoda hmotnostní spektrometrie pracující na principu MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight). Tato technika je založená na ionizaci iontů za pomoci laseru a matrice. Součástí je detektor, který zaznamenává dobu letu iontů. Metoda MALDI-TOF je velice moderní, ale pro zjištění pravosti potravin není tak často využívána. Z tohoto důvodu jsem si metodu MALDI-TOF MS zvolila pro zjišťování druhového původu masa s následným vyhodnocením analýzy hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis). Pro tuto analýzu je důležité přesné navážení vzorků, jejich rozštěpení specifickým enzymem a příprava vzorků pro samotné měření. Všechna získaná masa byla pořízena z domácího chovu a z ulovené divoké zvěře.

Cílem této práce je prokázat, že za pomoci hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF s vyhodnocením PCA lze určit druhový původ mas, což by mohlo být využíváno pro odhalování falšovaných živočišných potravin. Pomocí dat získaných z tohoto měření lze určovat druhový původ pouze ze syrového masa.

2. Současný stav řešené problematiky

V dnešní době je falšování masa jedním ze způsobů, jak výrobce masných produktů může oklamat spotřebitele. Pro odhalení falšování masa a masných výrobků existuje několik metod. V metodách pro identifikaci druhového původu masa jsou zahrnuty i proteomické metody, které jsou velice moderní a z důvodu vysokých nákladů ne tak často využívané. Do tzv. proteomik patří i mnou vybraná metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

2.1 Maso

V době kamenné bylo maso ulovené zvěře hlavním zdrojem potravy. Rostlinné produkty sloužily pouze jako doplněk stravy, ale i tak byly pro lovce hlavní výživou v zimním období obiloviny. Důvodem nebyl odpor k požívání masa, ale nedostatek lovené zvěře, jako byl mamut, jelen nebo zubr (Dvořák, 1987). V dnešní době vzrůstá konzumace masa a klesá spotřeba rostlinné potravy. Podle ČSÚ se v roce 1950 spotřebovalo 155 kg obilovin a v roce 2016 pouhých 115 kg. Zároveň se v roce 1950 spotřebovalo 49 kg živočišné stravy a v roce 2016 téměř o polovinu více. Nejvíce je konzumováno vepřové maso a v minulých letech výrazně stoupla spotřeba drůbežního masa (Hrbek, 2017). Steinhauser (1995, s. 11) ve své knize definuje maso, jako všechny části těla živočichů v čerstvém nebo upraveném stavu, které se hodí k lidské výživě. Někdy se tato definice omezuje jen na maso z těl teplokrevných živočichů. Maso je tedy kosterní sval a další přidružené tkáně z různých druhů zvířat (savci, ptáci), které jsou vhodné ke konzumaci. Často se používá klasifikace červené a bílé maso a to na základě druhů zvířat, barvy masa a obsahu tuků ve svalovině. Červené maso je nejčastěji spojováno s hovězím, jehněčím nebo vepřovým masem, kdežto bílé maso je spojováno s kuřecím nebo krůtím masem (Seman, Boler, Carr, Dikeman, Owens, Keeton, & Powell, 2018).

2.2 Maso jako svalová tkáň

Svalová tkáň patří mezi čtyři základní tkáně¹ v živočišném těle. Svalová tkáň je schopna se smršťovat díky přítomnosti proteinů aktinu a myosinu. Molekuly těchto dvou látek tvoří tenká vlákna, která se nazývají aktinová a myosinová filamenta (Vacek, 1996). Rozeznáváme dva druhy svalové tkáně, příčně pruhovaná svalovina a hladká svalovina, které se liší stavbou a inervací. My, jako konzumenti masa, nejčastěji využíváme příčně pruhovaný sval (Steinhauser, 1995).

¹ výstelková tkáň, pojivová tkáň, svalová tkáň, nervová tkáň

2.2.1 Hladká svalovina

Hladká svalovina je tvořena protáhlými buňkami, které se seskupují ve snopečky. Tato svalovina je prostoupena autonomními nervy, což znamená, že stahy svaloviny neřídíme naší vůlí (Vacek, 1996). Tato svalovina se nejčastěji vyskytuje v trubcovitých a dutých orgánech jako je jícen, žaludek, střeva nebo močový měchýř (Machová, 2016).

2.2.2 Příčně pruhovaná svalovina

Příčně pruhovaná svalovina je charakteristická výskytem myofibril. Rozeznáváme dva druhy příčně pruhovaného svalu – kosterní, srdeční (Vacek, 1996).

Kosterní svalstvo

Kosterní svalstvo je tvořeno svalovým vláknem. Toto vlákno je tvořeno skupinou buněk, které spolu tvoří soubuní a jsou pokryté blánou, která se nazývá sarkolema. Uvnitř tohoto soubuní se nachází cytoplasma neboli sarkoplasma. Jako v každé buňce, tak i zde je spousta organel, z nichž nejdůležitější jsou myofibrily. Díky těmto myofibrilám má sval schopnost kontrakce (Steinhauser, 1995). Kosterní svalovina je inervována mozkomíšními nervy, je tedy ovládána naší vůlí. Tato svalovina tvoří všechny kosterní svaly, svaly hltanu, jazyka a také okohybné svaly (Vacek, 1996).

Srdeční svalstvo

Srdeční svalstvo, které se často označuje jako myokard, se od kosterního svalu liší svou buněčnou stavbou. Je tvořeno protáhlými buňkami neboli kardiomyocyty, které se spojují a vytvářejí tak síť buněk. Tato síť zajišťuje výborné krevní zásobení, jež tento sval potřebuje, protože neustále pracuje. Buňka (kardiomyocyt) je tvořena jádrem, které je ohraničeno membránou (sarkolemou) a zbytek buňky je vyplněn myofibrilami. Stahy myokardu jsou samovolné a pravidelné (Vacek, 1996). Srdeční svalovina se vyskytuje pouze v srdci. Její regenerační schopnost je velice malá, a proto se po každém poranění vytvoří vazivová jizva (Machová, 2016).

2.3 Chemické složení masa

Chemické složení masa je individuální pro jednotlivé druhy. Mezi faktory, které ovlivňují jeho složení, se řadí zpracování či úprava masa. V živočišné tkáni je největší zastoupení vody a proteinů. Další látky, které se vyskytují ve zvýšeném množství, jsou tuky, minerální látky a také vitamíny. Na rozdíl od jiných potravin maso obsahuje malé množství sacharidů. Nejčastěji maso obsahuje polysacharid glykogen, který se vyskytuje hlavně v játrech. Ve svalech má důležitou funkci jako energetický zdroj (Steinhauser, 1995). Z dusíkatých sloučenin jsou

v mase zastoupeny volné aminokyseliny (alanin, kyselina glutamová), purinové a pyrimidinové nukleotidy, nukleosidy a volné báze. Další látky přítomné v mase jsou organické kyseliny. Hlavním zástupcem je kyselina mléčná a kyselina glykolová (Velíšek, 2002a). Látky jako sacharidy a dusíkaté sloučeniny jsou řazeny mezi extraktivní látky, protože jsou extrahovatelné vodou. Většinou jsou součástí enzymů, anebo mají různé specifické funkce. Tato skupina velice často tvoří chuť a aroma masa (Steinhauser, 1995).

2.3.1 Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny vznikají proteosyntézou z aminokyselin. V molekule proteinu je více než sto aminokyselin a vzájemně jsou vázány peptidovou vazbou (Velíšek, 2002a). Bílkoviny v živočišné stravě jsou tzv. plnohodnotné, což znamená, že obsahují všechny esenciální aminokyseliny, které člověk potřebuje (Steinhauser, 1995).

Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základem všech bílkovin a peptidů, ale mohou se vyskytovat i volně. Ve vzorci každé aminokyseliny se nachází aminoskupina ($-NH_2$) a karboxylová skupina ($-COOH$). V proteinech různých organismů se nejčastěji vyskytuje 20 aminokyselin. Kromě glycinu jsou všechny aminokyseliny opticky aktivní, což znamená, že jsou schopné stáčet rovinu polarizovaného světla a tyto látky poznáme tak, že ve své struktuře mají chirální uhlík. Nejčastěji využívané aminokyseliny jsou nazývány triviálními názvy, které jsou odvozené od jejich funkcí, vlastností, či od místa izolace. V těle živočichů jsou nejdůležitější esenciální aminokyseliny, které si tělo samo neumí vyrobit a musí je přijímat potravou. Do skupiny těchto aminokyselin patří valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin, a tryptofan (Velíšek, 2002a).

Proteosyntéza

Proteosyntéza je děj, při kterém dochází ke vzniku proteinů. První fáze syntézy proteinů se nazývá transkripce (přepis). Tento děj zahrnuje proces syntézy molekuly RNA podle DNA, která nese kódovanou informaci. Molekula RNA, jež určuje sekvence aminokyselin, se nazývá messenger neboli informační RNA. Po transkripci dále probíhají tzv. posttranskripční úpravy molekuly messenger RNA. Tato molekula se po těchto úpravách v cytoplazmě váže na ribozom (Widmaier, Raff, & Strang, 2006). Druhá fáze zahrnuje proces translace, kdy je na transferovou RNA připojena aminokyselina, která se nazývá methionin. Jakmile transferová RNA najde sekvenci AUG, zahájí se translace. Tento děj je ukončen hned po té, co se objeví sekvence UAA, UAG, UGA, neboli stop-kodony. Tímto dějem vznikne tzv. polypeptidové vlákno, které se dále upravuje v buňce na určitou bílkovinu (Šípek, 2015).

Struktura bílkovin

Struktura bílkovin se dělí na primární, sekundární, terciální a kvartérní. Do primární struktury patří pouze sekvence aminokyselin vázaných peptidovou vazbou (-CO-NH-). Sekundární struktura je charakteristická točením a sklápěním primární struktury. Do této struktury se řadí šroubovice, neboli α -helix a β -struktura skládaného listu (Barrett, Barman, Boitano, & Brooks, 2009). Spojováním a skládáním sekundární struktury vzniká terciální struktura. Příkladem terciální struktury je např. kolagen. Kvartérní struktura je tvořena spojenými polypeptidy terciální struktury. Tato struktura je tvořena buď stejnými, nebo odlišnými podjednotkami. Tyto podjednotky jsou vázané kovalentními nebo nekovalentními vazbami. Některé z proteinů mající tuto strukturu obsahují ve své molekule nepeptidovou část. Nejčastěji ji tvoří kovové ionty nebo organické molekuly. Příkladem bílkoviny kvartérní struktury je hemoglobin (Žídek, 2010).

Denaturace

Denaturace je děj, při kterém dochází k narušení sekundární, terciální nebo kvartérní struktury bílkovin. Tyto změny struktury bývají velice často nevratné. Bílkovina také ztrácí biologickou aktivitu a svou funkci. K tomuto narušení dochází díky působení tepla, či chemických činidel (ireverzibilní – nevratná denaturace) (Velíšek, 2002a).

Při tepelném zpracování masa dochází už při 35 °C k prvním změnám prostorového uspořádání bílkovin a při této teplotě masa ztrácí schopnost vázat vodu, čímž se zvyšuje tuhost masa. Při 45 °C dochází k prvním viditelným změnám – zkrácení svalů denaturací myosinu. Průměrná teplota 60 °C způsobuje denaturaci všech myofibrilárních bílkovin (např. aktinu, myosinu, tropomyosinu) a sarkoplazmatických bílkovin (např. myoglobinu, hemoglobinu). Vařením masa (100 °C) dochází hlavně ke ztrátám aminokyselin – cysteinu a lysinu. Viditelná je změna barvy masa, kdy dochází k oxidaci myoglobinu a oxyhemoglobinu na metmyoglobin. Pečením masa (150 °C) dochází ke vzniku vonných a chuťových látek. Při vyšších teplotách než je 200 °C dochází k izomerizaci aminokyselin. L-aminokyseliny přechází na D-aminokyseliny. Při této teplotě může také dojít k připálení masa, kdy mohou vznikat toxické látky. Další proces, při kterém je denaturována molekula aktomyosinu se nazývá sušení. Při zmrazování masa také může docházet k denaturaci, a to molekuly myosinu, která se poté spojuje s aktinem (Odstrčil & Odstrčilová, 2006).

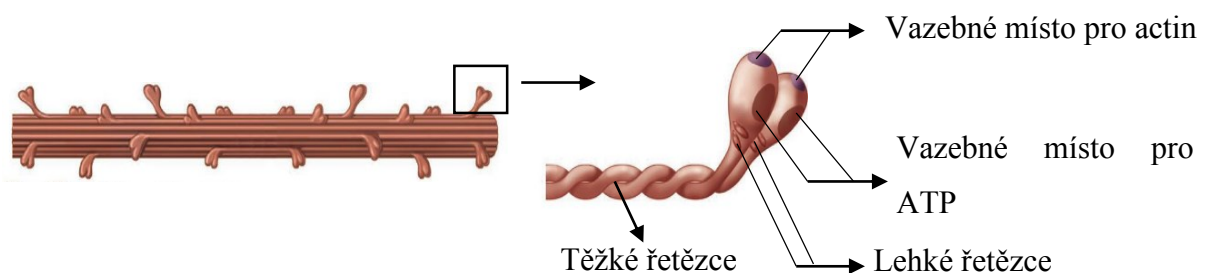
Bílkoviny tvoří nejdůležitější složku masa, hlavně z výživového hlediska. Obsah proteinů v libovém mase je 18–22 %. Bílkoviny se v mase rozdělují na základě jejich rozpustnosti ve vodě a v solných roztocích (Steinhauser, 1995).

Myofibrilární proteiny

Myofibrilární proteiny se nacházejí v myofibrilách příčně pruhované svaloviny. V podstatě jsou myofibrily svazky proteinů, které se vyskytují v cytoplasmě, neboli v sarkoplasmě (Velíšek, 2002a). Hlavním úkolem těchto proteinů není jen práce při činnosti svalu, ale také hrají důležitou roli při změnách masa po smrti. Při porušení svalového vlákna na sebe tyto bílkoviny vážou vodu, tudíž nejsou rozpustné ve vodě, ale pouze v solných roztocích. Asi 90 % bílkovin v myofibrilách tvoří 6 druhů – myosin, aktin, titin, tropomyosin, troponin a nebulin. Tyto bílkoviny se dělí na základě jejich funkce – kontraktilní (aktin, myosin), regulační (tropomyosin, troponin, actinin) a podpůrné (titin, nebulin, C-protein) (Steinhauser, 1995).

- **Myosin**

Myosin je základem myofibrilárních bílkovin a jeho obsah ve svalu je asi 45 %. Tvoří silná mikrofilamenta (Steinhauser, 1995). Struktura myosinu je tvořena dvěma velkými, těžkými polypeptidovými řetězci a čtyřmi menšími a lehčími polypeptidovými řetězci (**obr. 1**). Kombinací těchto řetězců vznikají dvě globulární hlavy a tzv. ocas. Každá hlavička obsahuje dvě vazebná místa, první pro vazbu s tenkým vláknem a druhé pro vazbu ATP (Widmaier a kol., 2006).



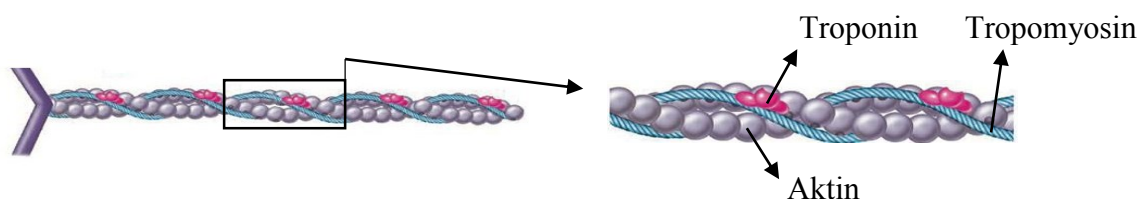
Obrázek 1 – Struktura myosinu tvořící těžké vlákno (Widmaier a kol., 2006)

- **Aktin**

Aktin je globulární molekula tvořena jedním polypeptidem (G-aktin). Tato molekula polymeruje na vláknitou formu (F-aktin) (Velíšek, 2002a). Vzniká polymer, který je tvořen dvěma propletenými spirálovitými řetězci, jež tvoří jádro tenkého vlákna. Každá molekula aktinu má vazebné místo pro myosin (Widmaier a kol., 2006).

- **Tropomyosin**

Tropomyosin se vazbou s Ca^{2+} ionty podílí na spouštění kontrakce svalu a také se podílí na relaxaci svalu (Steinhauser, 1995). Spolu s troponinem a aktinem tvoří tenké vlákno (**obr. 2**) (Widmaier a kol., 2006).



Obrázek 2 – Tenké vlákno tropomyosinu (Widmaier a kol., 2006)

Sarkoplazmatické bílkoviny

Sarkoplazmatické bílkoviny se převážně vyskytují v sarkoplazmě, jsou rozpustné ve vodě i v solných roztocích. Hlavními proteiny této skupiny jsou myogen, myoalbumin, globulin X a myoglobin, které se řadí do skupiny albuminů. Největší význam mají barviva hemoglobin a myoglobin, které způsobují červenou barvu masa a krve. Jsou složeny z globinu a hemu (barevná skupina). Ve své struktuře mají barviva centrální atom železa. Železo je schopné vázat plyny, a to zejména kyslík (Steinhauser, 1995). Zastoupení hemových barviv v jednotlivých druzích masa je uvedeno v **tabulce 1**.

- **Myoglobin**

Myoglobin je svalové barvivo, které zodpovídá za červenou barvu masa. Ve svalech slouží jako zásobárna kyslíku, a to jak u suchozemských, tak i u vodních savců (Velíšek, 2002a). Molekula myoglobinu je tvořena jedním peptidovým řetězcem s jednou hemovou skupinou. Jeho afinita ke kyslíku je na rozdíl od hemoglobinu větší (Steinhauser, 1995).

- **Hemoglobin**

Hemoglobin je krevní barvivo, které se nachází v erytrocytech, a tak zodpovídá za červenou barvu krve. Hlavní funkcí hemoglobinu je přenos kyslíku z plic do tkání a přenos oxidu uhličitého z tkání do plic (Pizingerová, Fremuth, Šašek, Sýkora, Černá, & Hrušková, 2011). Při porážce zvíře se může nacházet i ve svalech, a to v případě, když lovená zvíře nebyla dostatečně vykřvena. Obsah hemoglobinu závisí na obsahu myoglobinu. Při sníženém množství myoglobinu je obsah hemoglobinu větší (Steinhauser, 1995). Hemoglobin je složen z globinu a hemu, který ve své molekule obsahuje centrální atom železa. Při intoxikaci dusitany nebo dusičnany se dvojmocné železo oxiduje na trojmocnou formu. Tento derivát se nazývá methemoglobin a není schopen přenášet kyslík. (Pizingerová a kol., 2011).

Tabulka 1 – Obsah hemových barviv v hovězím, vepřovém a kuřecím masu v mg/kg (Steinhauser, 1995)

Druh masa	Obsah hemových barviv v mg/kg
Hovězí maso	1700–7500
Vepřové maso	254–3500
Kuřecí maso	126

Stromatické bílkoviny

Stromatické bílkoviny se nejčastěji nachází v pojivových tkáních jako je vazivo, kost a chrupavka (Steinhauser, 1995). Funkce těchto bílkovin je především ochranná či podpůrná. Hlavní bílkoviny, které do této skupiny patří, jsou tzv. fibrilární proteiny, z nichž nejdůležitější je kolagen, elastin a keratin (Velíšek, 2002a). Všechny tyto bílkoviny jsou nerozpustné ve vodě a solných roztocích. Z výživového hlediska jsou neadekvátní, protože neobsahují esenciální aminokyseliny, které jsou pro tělo důležité (Steinhauser, 1995).

- **Kolagen**

Kolagen je nejdůležitější vláknitá bílkovina, která se nachází ve všech živočišných říších, kromě jednobuněčných organismů. Díky své specifické struktuře zajišťuje správné mechanické vlastnosti pojivových tkání. Charakteristickou vlastností kolagenu je jeho pevnost (Peterková & Lapčík, 2000). Po zahřátí kolagenu dochází k deformaci a ohybu vláken a tím se kolagen stává elastickým. Teplota, při níž dochází k tomuto ději, se nazývá teplota smrštění (Steinhauser, 1995). Kolagen se může přeměnit na želatinu při vaření, pečení, nebo při jiné tepelné úpravě masa. Při vzniku želatiny dochází k porušení struktury molekuly kolagenu, neboli přerušeni vazeb mezi polypeptidovými řetězci. Proto při tomto ději závisí na množství vazeb v kolagenu a tím i na stáří zvěře (Velíšek, 2002a).

- **Elastin**

Elastin je velice pružný, a tak se může až dvakrát zvětšit. Jeho důležitou vlastností je, že je chemicky velice odolný. Nerozpouští se ve vodě ani v solných roztocích. Odlišuje se od kolagenu tím, že nemění svou strukturu ani při varu (Steinhauser, 1995).

- **Keratiny**

Keratiny jsou hlavními strukturálními proteiny pokožky obratlovců. Společně s aktinovými mikrofilamenty a mikrotubuly tvoří cytoskelet buněk krycí tkáň (Fuchs, 1995). Keratiny se vyskytují také v derivátech kůže, jako jsou rohy a kopyta (Velíšek, 2002a).

2.3.2 Tuky

Tuky neboli lipidy jsou složené z esteru mastné kyseliny a glycerolu. Jsou důležitou součástí všech potravin. V maso tvoří tyto lipidy největší část a v menší míře se zde objevují fosfolipidy a doprovodné látky. Lipidy se v maso vyskytují hlavně ve svalovině a v tukové tkáni. Hlavní úloha tuku v maso je sensorická, protože přenáší mnoho aromatických a chuťových látek. Tuk, které se jak ve svalovině, tak v tukové tkáni vyskytují, se nazývají triacylglyceroly vyšších mastných kyselin. Mastné kyseliny, které v maso nacházíme, jsou palmitová, stearová a olejová a jejich procentuální zastoupení je uvedeno v **tabulce 2** (Steinhauser, 1995). Lipidy dělíme do třech základních skupin – homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy (Velíšek, 2002a).

Tabulka 2 – Obsah mastných kyselin ve vepřovém a hovězím maso v % (Steinhauser, 1995)

Maso / Vyšší mastná kyselina	olejová	palmitová	stearová
Hovězí maso	39–58	24–32	14–29
Vepřové maso	41–58	25–32	13–18

- **Homolipidy**

Homolipidy jsou lipidy, které jsou tvořené pouze mastnou kyselinou a alkoholem, jímž je nejčastěji glycerol. Homolipidy, které jsou v potravinářství nejvíce využívány, jsou estery glycerolu, které se rozdělují podle skupenství na tuky a oleje. Ze skupiny tuků jsou nejznámější triacylglyceroly. Tyto tuky se v tkáních rozdělují na tuky suchozemských zvířat a mořských zvířat. Nejvíce tuku v maso má vepřové maso, kde se hodnota pohybuje okolo 41 %. V dnešní době už existují speciálně vyšlechtěná plemena živočichů, např. některé druhy vepřů, které obsahují pouze 2 % tuku (Velíšek, 2002a).

- **Heterolipidy**

Heterolipidy jsou odlišné od homolipidů tím, že obsahují ve své molekule také další složky. Na základě této složky se pak dále dělí na fosfolipidy, glykolipidy, sulfolipidy (Steinhauser, 1995). Z heterolipidů nás nejvíce zajímají fosfolipidy, které se v živočišné tkáni objevují jen v malé míře. V maso působí jako emulgátory tuků a při jeho skladování se oxidují. Méně důležitou součástí masa neboli živočišné tkáně jsou doprovodné látky. Do těchto látek se řadí hlavně cholesterol, který patří do skupiny sterolů (Steinhauser, 1995). Zdrojem cholesterolu je především živočišná strava (hlavně vnitřnosti), ale také dochází k syntéze cholesterolu v lidském těle (např. v kůře nadledvin, játrech) (Martínková, 2007). Cholesterol přijatý v potravě je enzymaticky štěpen žaludeční, pankreatickou a střevní lipázou (Duchoň, 1985). Hladina cholesterolu v krvi je označována jako cholesterolémie a její hodnota závisí na pohlaví, věku, genetických dispozicích, stravě a životním stylu. Cholesterol je transportován krevním

řečištěm za pomoci bílkovin. Celá molekula sestavená z cholesterolu, bílkoviny, triacylglycerolu a fosfolipidu se nazývá lipoproteinová částice. Nejdůležitější jsou tzv. lipoproteinové částice s nízkou hustotou (LDL, Low Density Lipoproteins) a lipoproteinové částice s vysokou hustotou (HDL, High Density Lipoproteins). LDL částice slouží především pro transport cholesterolu v krvi. Usazováním těchto částic dochází k zužování cév a tím je větší riziko vzniku aterosklerózy. Částice HDL naopak nadbytečný cholesterol odvádí z krve pryč do jater (Novák, 2002).

2.3.3 Vitamíny

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které jsou produkovány autotrofními organismy, což jsou organismy, které si samy vytváří uhlík z anorganických látek. Vitamíny jsou významné pro látkovou výměnu, regulaci metabolismu a jsou součástí katalyzátorů biochemických reakcí (Velíšek, 2002b). Maso obsahuje mnoho vitamínů, a tento obsah závisí na skladování a zpracování masa. Největší zastoupení vitamínů je ze skupiny B (Steinhauser, 1995). Thiamin neboli vitamín B₁ je v mase v hojném zastoupení a to 80–90 %. Nejbohatší maso na tento vitamín je vepřové, které obsahuje asi desetkrát více vitamínů než ostatní druhy mas. Ke ztrátám tohoto vitamínu nejčastěji dochází při smažení, vaření a dušení. Při nakládání masa také dochází k neúplnému rozkladu thiaminu a naopak mražení vůbec neovlivňuje strukturu daného vitamínu. Pyridoxin neboli vitamín B₆ se v živočišných tkáních vyskytuje také ve velkém množství. Nejčastěji se však vyskytuje jako pyridoxal a pyridoxamin. Konkrétně se v syrovém mase nachází pyridoxal-5'-fosfát a ve vařeném mase je pyridoxaminfosfát. Množství vitamínu v pečeném mase je 45–65 %. Korinoidy, což jsou vitamíny skupiny B₁₂ mají nejsložitější strukturu. Tyto vitamíny se vyskytují u býložravých zvířat, které korinoidy vstřebávají od bakterií. Ztráta těchto vitamínů závisí na zpracování masa, ale může to být až 70 % (Velíšek, 2002b). Zastoupení vitamínu B₁, B₆, B₁₂ v hovězím, vepřovém a kuřecím mase je uvedeno v **tabulce 3**.

Tabulka 3 – Obsah vitamínů v hovězím, vepřovém a kuřecím mase v % (Steinhauser, 1995)

Druha masa / vitamín	B₁	B₆	B₁₂
Hovězí maso	1–2,3	4	0,02–0,04
Vepřové maso	2,8–14	5–6	0,01–0,04
Kuřecí maso	0,8–1	–	–

2.3.4 Minerální látky

Minerální látky jsou prvky, které zůstávají v potravinách po úplné oxidaci organických látek na oxid uhličitý a vodu (Velíšek, 2002b). V mase jsou minerální látky zastoupeny jedním procentem. Ve svalovině se nejčastěji vyskytují ve formě iontů, protože jsou rozpustné ve vodě.

Dále mohou být vázány na bílkoviny, což je nejčastěji fosfor, vápník a hořčík. V tkáních se také vyskytují anionty, v největším zastoupení hydrogenuhličitanu a fosforečnanu, které jsou v těle důležité, protože tvoří pufrční systém neboli se podílí na udržení homeostázy (Steinhauser, 1995). Maso je důležitým zdrojem draslíku, který je důležitý pro udržení osmotického tlaku v buňkách. Dalším zdrojem je hořčík, který je důležitý pro řadu metabolických dějů, při nichž se účastní ATP (Velíšek, 2002b). Významnou roli v maso má také vápník, který je důležitý při stažení svalu, je přítomen při srážení krve a má stavební funkci, protože je to důležitá součást kostí. Železo, které v tabulce uvedené není, je také nedílnou součástí, je obsaženo v hemových barvivech a jeho hlavní funkce ve svalové tkáni je zásoba kyslíku. Po smrti zvíře dochází ke změnám vazeb anorganických látek na organické látky, a tím se uvolňují některé látky, např. fosfáty. Někdy se obsah iontů v maso může zvýšit a to například nakládáním (NaCl) (Steinhauser, 1995). Zastoupení nejdůležitějších minerálů v základních druzích mas je uvedeno v **tabulce 4**.

Tabulka 4 – Obsah minerálů v hovězím, vepřovém a kuřecím maso v mg/kg (Steinhauser, 1995)

Druh masa / Obsah iontů	Na⁺	K⁺	Ca²⁺	Cl⁻
Vepřové maso	600	4000	100	500
Hovězí maso	400	4000	100	500
Kuřecí maso	800–1000	3400–4700	100–200	–

2.4 Kvalita masa

Pojem „kvalita masa“ vypovídá o vlastnostech masa, které by maso označené jako kvalitní mělo mít. Do skupiny těchto vlastností je zahrnuta barva, tuhost, křehkost, chuť a také schopnost zadržet vodu, konzistence a pH (Šubrt, Filipčík, Bjelka, Dračková, Dufek, Nováková, & Homola, 2009). Všechny tyto vlastnosti mohou ovlivnit různé faktory, jako např. plemeno zvířete, jeho pohlaví, stáří, zdravotní stav, druh krmiva či způsob porážky (*Bezpečnost potravin A-Z*, ©2018). Další roli hrají také posmrtné změny, pokles pH nebo teploty, shromažďování laktátu a uvolňování vápenatých iontů (Mohanty, Park, Pramod, Kim, Choe, & Hwang, 2010).

2.4.1 pH masa

Důležitou vlastností masa je pH, na základě kterého se odlišují vadná masa. Tato masa se rozlišují nejčastěji do dvou skupin: PSE a DFD. Zkratka PSE znamená - pale (bledý), soft (měkký) a exudative (vodnatý). U tohoto druhu masa dochází při porážce ke glykogenolýze, neboli odštěpení molekuly glukózy z glykogenu a k hromadění kyseliny mléčné. Tím se sníží hodnota pH (pod 5,8) a zároveň se zvýší teplota (nad 42 °C), čímž dochází k denuraci

bílkovin. Zkratka DFD znamená - dark (tmavý), firm (tuhý) a dry (suchý). Tento druh masa je od zvířete, které bylo před porážkou vyčerpané. Zvíře spotřebovalo všechny glykolytické zásoby, tudíž se v mase nevyskytuje žádná kyselina mléčná, která je důležitá pro zrání masa. Toto maso se velice rychle kazí. Hodnota pH je zvýšená (nad 6,2) (Ministerstvo zemědělství, 2004).

2.4.2 Schopnost zadržet vodu

Schopnost zadržet vodu, neboli WHC (Watter Holding Capacity) je vlastnost, která je popisována jako schopnost masa zadržet vodu i při působení vnějších sil (např. řezání, vaření). Maso, jemuž tato vlastnost chybí, produkuje více tzv. načervenalé vodnaté kapaliny, která je viditelná u baleného masa. Při zvýšené ztrátě vody dochází k úbytku na váze a maso se smršťuje. Také může dojít ke ztrátě vody při vaření a tím je maso ve výsledku suché a málo šťavnaté (Hui, 2012).

2.4.3 Barva, šťavnatost, konzistence, tuhost, chuť

Tyto vlastnosti určují spokojenost a potěšení spotřebitelů masa při konzumování. Pro konzumenty je při výběru masa důležitá jeho barva. Barva může být hodnocena u kůže a také u vařeného masa. Spotřebitelé také posuzují vady vzhledu, do těchto vad patří např. modřiny (Fletcher, 2002).

2.5 Faktory ovlivňující kvalitu masa

Kvalitní maso je maso, které má určité vlastnosti. Všechny tyto vlastnosti pro označení „kvalitní maso“ jsou popsány výše v **kapitole 2.4**. Některé z těchto vlastností (pH, barva, tuhost, šťavnatost a WHC) mohou být ovlivněné různými faktory. K těmto faktorům může být přiřazován vliv plemene, výživy, stáří, či vliv pohlaví.

2.5.1 Plemeno zvířete

U různých plemen stejného druhu zvířete se liší kvalita masa. Plemena Hereford a Aberdeen Angus jsou známá tím, že mají nejkvalitnější hovězí maso. Tato plemena brzy dospívají a na rozdíl od mléčných plemen skotu (např. Holstein Jersey) ukládají podkožní a intramuskulární tuk, který vytváří mramorování masa. Díky tomuto tuku je maso více chutné, šťavnaté a křehké (Kerry, Kerry, & Ledward, 2002). Kuchtík a Horák (2014) zkoumali vliv plemene na jakost masa. Porovnávali čistokrevná plemena (Německá dlouhovlnná ovce) a křížence (Německá dlouhovlnná ovce, Merino a Oxford down). Tyto ovce byly chovány ve stejných podmínkách prostředí a měly stejnou výživu. Vzorky byly odebrány z trojhlavého svalu pažního a následně

vyhodnoceny laboratorní analýzou. Ta prokázala vliv plemene na obsah intramuskulárního tuku, popelovin, remisí, pH a na vaznost masa.

2.5.2 Věk

Při porážce zvířete je nejčastěji věk analyzován spolu s hmotností zvířete, protože vyšší váha zvířete znamená vyšší věk (Guerrero, Velandia Valero, Campo, & Sañudo, 2013). Byla provedena studie, ve které se zkoumaly dvě skupiny buvolů. Jedna skupina byla tvořena mladými buvolky (ve věku 8–12 měsíců) a druhou skupinu tvořili dospělí jedinci (3 roky). Tato studie prokázala, že masa mladých buvolů měla vyšší WHC (schopnost zadržet vodu), lehkost a vlhkost, měla vyšší hodnoty esenciálních aminokyselin a větší obsah kyselin, např. kyselinu linolovou a další nenasycené mastné kyseliny. Tato studie došla k závěru, že maso mladých buvolů je mnohem kvalitnější než maso dospělých buvolů (Ilavarasan, Abraham, Rao, Ruban, & Ramani, 2016).

2.5.3 Pohlaví

Důležitým faktorem, který ovlivňuje kvalitu masa, je také pohlaví. Tento faktor určuje, jak rychle a jak hodně bude docházet k ukládání tuků a také určuje rychlost růstu. Je známo, že samci mají méně intramuskulárního tuku než samice, a také, že všechna kastrovaná zvířata jakéhokoliv pohlaví mají tohoto tuku více (Kerry a kol., 2002). Vliv pohlaví na kvalitu masa byl studován na španělských jehňatech. U samic byla prokázána vyšší hodnota intramuskulárního tuku než u samců. Nebylo prokázáno, že by pohlaví mělo vliv na hodnotu pH, WHC nebo na koncentraci myoglobinu či barevné parametry, ale u samic se objevil vyšší obsah mastných kyselin, např. kyselina pentadekanová nebo palmitová (Horcada, Beriain, Purroy, Lizaso, & Chasco, 1998).

2.5.4 Výživa

Vliv výživy na kvalitu masa se projevuje kvalitativně nebo kvantitativně. Je důležité, aby potrava obsahovala stejné množství energie i dusíkatých látek. Při snížení bílkovin a zároveň při zvýšení energie v krmné stravě dojde ke zvýšení tuku v těle. Na kvalitu drůbežního masa působí kladně např. kukuřice a jiné obiloviny. Naopak negativní účinky mají krmiva s oxidačními změnami lipidů. Některé maso může díky krmivu zapáchat a stravou může být ovlivněna i barva masa (Simeonovová, Míková, Kubišová, & Ingr, 1999). Byl studován vliv krmení na kvalitu masa na 64 kusech dobytka ve věku pět až šest měsíců. Tento dobytek byl rozdělen do dvou skupin. První skupina byla krmena podle své libosti siláží, koncentráty (ozimý ječmen, melasa, sója), senem, slámou a směsí minerálních látek a vitamínů.

Druhá skupina byla v letním období pouze na pastvě. V zimním období byli býci ustájeni a krmeni siláží, senem, granulovanou stravou (ječmen, lněná semena) a směsí minerálů a vitamínů. Obě skupiny býků byly poraženy se stejnou hmotností 620 kg. Bylo zjištěno, že denní přírůstek býků, kteří byli na pastvě, byl nižší. U býků krmených koncentráty od začátku, bylo zjištěno, že mají vyšší podíl intramuskulárního tuku. Naopak býci, kteří byli na pastvě, měli vyšší pH svalů, tmavší barvu masa, a proto bylo jejich maso tvrdší (Nuernberg, Dannenberger, Nuernberg, Ender, Voigt, & Richardson, 2005).

2.6 Postmortální změny v mase

Termín „postmortální změny“ znamená změny zahájené po usmrcení zvířete. Někdy je také používán termín zrání masa. Změny v mase zahrnují biochemické procesy, kdy je svalovina přeměněna na maso a zároveň získává požadované vlastnosti. Hlavním procesem je rozklad sacharidů a proteinů, přičemž jsou tyto procesy ireverzibilní, neboli nevratné. Tyto změny masa mají dvě hlavní fáze – autolýza, neboli samovolný rozklad, za pomoci enzymů, které se vyskytují v tkáních a proteolýza, neboli hnití masa, která je katalyzovaná mikrobiálními enzymy (Steinhauser, 1995).

2.6.1 Autolýza masa

Autolýza masa je tedy samovolný rozklad tkání, kdy za pomoci nativních enzymů dochází ke vzniku masa. Prvním krokem autolýzy je posmrtné ztuhnutí. Než dojde ke ztuhnutí svalové tkáně, probíhají zde dva základní procesy – odbourávání energetických složek a okyselení s následnou změnou prostorového uspořádání proteinu. Druhým krokem je tzv. zrání masa. V tomto kroku dochází k rozkladu kyseliny mléčné, čímž se zvyšuje pH. Dále je disociován aktinomyosinový komplex. Díky těmto procesům je maso křehčí a má mnohem větší schopnost vázat vodu. Doba zrání závisí na druhu a teplotě uskladnění, např. hovězí maso v chladničce dozraje za 10–14 dní. Posledním krokem je hluboká autolýza. Tento proces je u masa nežádoucí. Dochází k dalšímu odbourávání, kdy vznikají konečné produkty (amoniak, aminy, sirovodík). Tyto látky způsobují nežádoucí vlastnosti masa (Steinhauser, 1995).

2.6.2 Proteolýza masa

Proteolýza masa neboli hniloba je také postmortální změnou, ale její intenzita se zvyšuje s ubývajícím aktivitou nativních enzymů. Tento proces způsobují mikrobiální enzymy vyprodukované mikroorganismy. Ke kontaminaci masa dochází exogenně, neboli zvenčí. Hladina mikroorganismů závisí na hygieně porážení, zpracování, chlazení a bourání masa (Steinhauser, 1995).

2.7 Charakteristika zkoumaných druhů mas

2.7.1 Hovězí maso

Hovězí maso patří k druhům masa, která jsou nejvíce spotřebovávána. V minulých letech byla konzumace hovězího masa mnohem vyšší, než je tomu nyní (Jůzl & Müllerová, 2017). Jednotlivé charakteristické znaky tohoto druhu masa, závisí na různých faktorech, a tím je například věk dobytka. Maso mladých býčků má jemná vlákna a jeho barva je bledě červená. U býků je tomu naopak, tkáň je silně vláknitá a barva je tmavě červená. Starší býci i mladí jedinci nemají tkáň prostoupenou tukem. Maso prorostlé tukem, které vykazuje známky mramorování, je maso vykastrovaných býků (Steinhauser, 1995).

2.7.2 Vepřové maso

Spotřeba vepřového masa od minulých let výrazně vzrostla. V roce 2015 byla spotřeba 42,9 kg na jednoho obyvatele. Vepřové maso je tedy nejvíce konzumované maso v České republice (Vališ, 2017). Prasata, která jsou mladá a obsahují správné množství tuku, mají maso jemně vláknité a bledě červené. Toto maso je hodně prorostlé tukem. Naopak u starších kusů je maso tmavě červené a není tak prorostlé (Steinhauser, 1995).

2.7.3 Drůbeží maso

Spotřeba drůbežího masa byla v minulých letech nižší, než je tomu v dnešní době. V roce 2013 byla konzumace tohoto masa vyšší než konzumace hovězího masa (Mates, 2015). Drůbeží maso se získává především z kura domácího, krůty, kachny a husy. Svalovina drůbeže je bledá až světle růžová a převládají zde svalová vlákna, která jsou rovnoměrně uspořádána. V mase drůbeže jsou obsažena vlákna bílá a červená. Větší část tvoří bílá vlákna, ty obsahují více bílkovin a glykogenu. Hlavní složky drůbežího masa jsou voda, bílkoviny a tuky. Na rozdíl od jiných druhů např. jatečné zvěře je toto maso bohatší na plnohodnotné bílkoviny, ale chudší na tuky. Tuk u drůbeže je zcela jiný než u jatečných zvířat, a to tím, že obsahuje především esenciální mastné kyseliny (drůbež 20 %, jatečná zvířata 2–7 %). Energetická hodnota tohoto masa je nízká oproti jiným druhům (Simeonovová a kol., 1999).

2.7.4 Králičí maso

Ke konzumaci králičího masa jsou vhodná masná plemena či jejich hybridy. Tento druh patří k nejhodnotnějším druhům, protože obsahuje velice dobře stravitelné bílkoviny. Ze skupiny lipidů jsou nejvíce obsaženy esenciální mastné kyseliny. Svalovina králíků obsahuje vyšší podíl vitamínů skupiny B a zároveň nižší množství cholesterolu. Energeticky se králičí maso řadí k masům s nízkým energetickým obsahem (Simeonovová a kol., 1999).

2.7.5 Zvěřina

Pod pojmem zvěřina je v této práci myšleno maso zajíce, srnce či daňka. Složení tohoto masa je velice podobné ostatním druhům mas jatečných zvířat, ale odlišuje se tím, že má vysoký obsah vody, bílkovin a nízký podíl tuků (Simeonovová a kol., 1999). Následkem nízkého tuku v maso je nízký podíl cholesterolu, což je hodnoceno kladně. Barva masa je mnohem tmavší než u ostatních zvířat, a to je způsobeno tím, že tato zvěř je lovena, a tím je v maso mnohem více krve. Celkově maso zvěřiny je mnohem jemnější nežli maso hospodářských zvířat (Forejtek, Vodňanský, Winkelmayr, Paulsen, Rajský, Malena, & Zedka, 2009).

2.7.6 Maso nutrie

V dřívějších dobách byly nutrie využívány hlavně pro svou kůži. V dnešní době už tomu tak není a nutrie jsou využívány spíše pro své maso (Tůmová, Chodová, & Hrstka, 2013). Toto maso je dietní a má vysokou nutriční hodnotu, stejně jako maso králíků. Nejčastěji jsou využívána stehna nutrií, která obsahují nejvíce bílkovin a malé množství tuků a tím i cholesterolu. Ve srovnání s králičím masem má maso nutrií tmavší barvu (Tůmová, Hrstka, & Chodová, 2013).

2.7.7 Kozí maso

Spotřeba kozího masa je v České republice velice nízká, nejvyšší spotřeba a poptávka po kůzlotech je v období Velikonoc. Z údajů z Českého statistického úřadu vyplývá, že spotřeba kozího masa od roku 2002 do roku 2006 klesla o 60 %. Produkce a konzumace kozího masa bývá nejčastěji formou domácích porážek (Bucek, Kölbl, Milerski, Pindák, Mareš, Wolf, & Kuchtík, 2007). Kozí maso je světlejší oproti masu skopovému. Jak v podkoží, tak i ve svalovině je malé množství tuku. Toto maso má charakteristický zápach jako pach žijících koz (Steinhauser, 1995).

2.7.8 Rybí maso

Spotřeba sladkovodních ryb je v České republice mnohem nižší než spotřeba mořských ryb. Důvodem toho je menší výběr v českých řetězcích či vyšší cena. Nejvyšší poptávka po sladkovodních rybách, nejčastěji kapru obecném, je v období Vánoc (Ženíšková & Gall, 2007). Množství bílkovin v rybím maso tvoří až 80 % energetické hodnoty. Rybí maso je lehce stravitelné a vysokým množstvím esenciálních mastných kyselin je rovno maso hovězímu, králičímu či kozímu (Souci, Fachmann, & Kraut, 2000).

2.8 Falšování masa

S falšováním masa jsme se mohli setkat už v době, kdy se maso i jiné potraviny začaly vyrábět za účelem prodeje. Za zakladatele analytických metod, které odhalovaly zfalšované potraviny je považován Fridrich Accum (Čížková, Ševčík, Rajchl, Pivoňka, & Voldřich, 2012). Falšování masa je nejčastějším problémem, a to proto, že maso je v současnosti jeden z nejdražších produktů na trhu. Někteří výrobci toho zneužívají a snaží se utržit na zfalšovaném výrobku větší výnos. Nejčastěji dochází k náhradě jakostního masa za maso méně hodnotné nebo uvádějí špatné množství určitého druhu masa na etiketě. Konkrétním případem je, když se objevila „nemoc šílených krav“. To vedlo ke snížené spotřebě hovězího masa, a tím výrobci začali falšovat potraviny, které tento druh masa obsahoval. Tyto produkty měly na svém balení klamavou etiketu (Akhatova, Zdeňková, Koncošová, & Demnerová, 2018).

Identifikační metody

Metody pro identifikaci falšování masa můžeme rozdělit do dvou skupin. Metody založené na proteinové analýze, do nichž patří skupina proteomických metod a metody založené na analýze DNA (Akhatova a kol., 2018).

Metody založené na proteinové analýze

- **Imunologické metody**

Tyto metody jsou založené na kontaktu antigenu s protilátkou. Mohou být využívány pro stanovení určitého druhu masa. Hlavní imunologickou metodou je metoda ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Tato metoda se používá pro ověření složek masa a jiných potravin. ELISA je velice citlivá, specifická a její provedení je jednoduché (Akhatova a kol., 2018). Ayaz, Ayaz a Erol (2006) provedli studii, kdy k detekci falšování masa použili metodu ELISA. Zkoumali klobásy, salám, párky, syrové maso, syrové mleté maso, masové kuličky, šunku, slaninu, vařené maso a konzervované výrobky. Tyto produkty detekovali pomocí monoklonálních protilátek². Tato analýza prokázala, že některé klobásy, salámy, párky, syrové maso, mleté syrové maso i masové kuličky obsahovaly látky, které na etiketě nebyly zmíněny. Dále bylo prokázáno, že salám, klobásy a párky obsahovaly pouze drůbeží maso, i když byly prohlášeny za hovězí produkty. Syrové maso bylo uvedeno jako hovězí, ale tato analýza prokázala, že maso obsahovalo koňské a jelení maso. Metoda ELISA není tak využívána jako jiné metody. Její využití je spíše pro specifické případy (Čížková a kol., 2012).

² Specifická protilátka z jedné plazmatické buňky, která se specificky váže na substrát – antigen.

- **Spektroskopické metody**

Spektroskopické metody jsou založené na interakci látek s elektromagnetickým zářením. Elektromagnetické záření je infračervené, ultrafialové a viditelné. Tato záření mají rozdílnou vlnovou délku. Pro odhalení falšování potravin jsou nejčastěji využívány metody NIR (blízká infračervená spektroskopie) a MIR (střední infračervená spektroskopie). Princip metody NIR je absorpce záření o vlnové délce 800–2500 nm, které prochází vzorkem. Metoda je využívána k rozpoznání druhu masa na základě jeho pigmentu a dalších složek, např. mastné kyseliny (Akhatova a kol., 2018). Alamprese, Amigo, Casiraghi a Engelsen (2016) provedli studii, kdy za použití metody NIR rozpoznávali a určovali množství krutího masa, které bylo obsaženo v mletém hovězím mase. Vzorky falšovaného mletého masa měli ve formě syrové, zmražené, rozmražené a vařené. Tato studie prokázala, že metodou NIR lze odhalit zfalšování mletého hovězího masa nejen v čerstvé syrové podobě, ale i v zmražených, rozmražených a vařených vzorcích. Studie je považována za významnou, protože narůstá počet zfalšovaných produktů, které se schovávají za různá technická ošetření. U metody MIR dochází k absorpci záření o vlnové délce 2500–25000 nm (Akhatova a kol., 2018). Z tohoto typu infračervené spektroskopie se dovídáme informace o chemických vazbách, které jsou v molekule, a tím o určitém typu molekuly, která je v mase obsažena (Čížková a kol., 2012).

- **Chromatografické metody**

Chromatografické metody jsou separační, neboli dělicí metody. Principem těchto metod je ustálení rovnovážné distribuce analytu mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází (Sklenák, 2005). Tyto metody jsou také využívány k ověřování potravin, nejčastěji je využívána kapalinová chromatografie (Čížková a kol., 2012). Pomocí těchto metod může být provedena analýza dipeptidů – karnosin, anserin, balenin. Tyto dipeptidy se vyskytují v kosterní svalovině ve vysokém množství u většiny živočichů (Akhatova a kol., 2018). Na základě analýzy těchto dipeptidů byla provedena studie vepřového, hovězího a kuřecího masa. Bylo zjištěno, že poměr obsahu anserinu a karnosinu u vepřového masa je mezi 0,02–0,1, u hovězího masa 0,06–0,2 a u kuřecího masa je obsah mezi 2,2–5,5. Hodnota poměru anserinu a karnosinu v kuřecím mase je dostatečná pro prokázání jejího přídatku ve vařeném vepřovém i ve směsi vepřového a hovězího masa (Tinbergen & Slump, 1976).

Proteomika

V současné době, jsou za účelem detekce falšování potravin, vyvíjeny stále nové metody. Tyto moderní metody pro ověření pravosti potravin jsou metody spojené s hmotnostní spektrometrií

s vysokým rozlišením. Tyto spektrometrické metody jsou díky své citlivosti a snazší kalibraci vhodné pro posouzení pravosti potravin (Rubert, Zachariasova, & Hajslova, 2015). Tyto tzv. proteomické metody využívají jako hlavní složky pro identifikaci typu masa sekvence aminokyselin (Akhatova a kol., 2018).

- **Dvoudimenzionální elektroforéza**

Pomocí této analýzy provedli Montowska a Pospiech (2013) analýzu proteinů ze syrového masa, klobás a salámů. Byly identifikovány regulační proteiny, bílkoviny krevní plazmy a myofibril a také enzymy účastníci se metabolismu, které měly pro každý druh specifickou elektroforetickou pohyblivost. Také byly u některých proteinů nalezeny značné rozdíly ve struktuře, tudíž by mohly být využity jako hlavní složky pro ověřování druhové pravosti potravin.

- **MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS neboli Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry je tandemová hmotnostní spektrometrie pro sekvenování peptidů. Tato analýza je vysoce citlivá a poskytuje komplexní informace o fragmentaci (Medzihradszky, Campbell, Baldwin, Falick, Juhasz, Vestal, & Burlingame, 2000). Byla provedena studie za účelem zjištění druhového původu masa (vepřové, hovězí, koňské, kuřecí a telecí). Vzorkeem pro tuto studii bylo syrové a zpracované maso. Po extrakci peptidů byly vzorky analyzovány a následně byla jednotlivá spektra vyhodnocena klastrovou analýzou. Bylo prokázáno, že touto metodou lze odlišit jednotlivé druhy mas, jelikož se jednotlivé vzorky rozdělily do odlišných shluků spekter (Flaudrops, Armstrong, Raoult, & Chabrière, 2015). V naší práci se zabýváme podobnou tématikou, ale s využitím analýzy hlavních komponent (PCA).

Metody založené na analýze DNA

Metody založené na analýze DNA jsou vhodnější než analýza proteinů. Důvodem je, že bílkoviny ztratí svou aktivitu ihned po té, co zvíře zemře, a také to, že většina z proteinů je termolabilní (Calvo, Zaragoza, & Osta, 2001). Pomocí analýzy DNA je možné rozlišit blízké příbuzné druhy, nebo dokonce i poddruhy (Lees, 2003).

- **Metoda založená na polymerázové řetězcové reakci (PCR)**

Metoda založená na polymerázové řetězcové reakci (PCR, Polymerase Chain Reaction) je založena na plánovaném zmnožení určitých úseků DNA. Nejpoužívanějšími typy těchto reakcí je PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) či kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) (Akhatova a kol., 2018). Wolf, Jürg a Hübner

(1999) využili metodu PCR-RFLP pro mitochondriální DNA. Typ živočišného druhu masa byl identifikován na základě amplifikace určité části mitochondriální DNA. Po té byly amplikony štěpeny restrikcí endonukleázami. Touto analýzou došlo k úspěšnému rozdělení prasete domácího a divokého, buvola, ovce, koně, krůty a také kuřete. Metodu qPCR, pro odhalení falšování nesprávného podílu hovězího v mletém mase, použil Iwobi, Sebah, Kraemer, Loshner, Fischer, Busch, & Huber (2015). Analýzou byla provedena kvantifikace hovězí a vepřové frakce pomocí primerů a sond. Touto metodou byl úspěšně rozpoznán poměr hovězího a vepřového v mletém mase.

- **Hybridizační metody**

U těchto metod dochází k hybridizaci DNA pomocí značených sond (Akhatova a kol., 2018). Pomocí těchto metod byla provedena studie analýzy jakosti tepelně zpracovaných masných výrobků. Analýza zahrnovala izolaci DNA ze vzorku, stanovení velikostí fragmentů DNA, imobilizaci DNA na nylonových membránách a následná hybridizace s ³²P sondou. Tato studie dokázala, že je možné využít hybridizační metody u tepelně opracovaných vzorků (Ebbehøj & Thomsen, 1991).

2.9 Analýza hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF

Tato bakalářská práce se zabývá druhovým rozpoznáním mas pomocí metody MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie, Mass Spectrometry). Jednotlivá získaná spektra byla vyhodnocena za pomoci metody PCA (Principal Analysis Component).

2.9.1 Princip MALDI-TOF MS

Vzorek v analyzátoru je nejprve ionizován. U této metody dochází k ionizaci za pomoci laseru a přítomnosti pomocné látky neboli matrice, s kterou je vzorek smíchán. Na molekuly vzorku tato matrice přenáší energii z laserového záření. Tento přenos energie následuje desorpce a ionizace (přenos protonu z matrice na analyt). Výsledkem ionizace jsou ionty, které mají vysokou molekulovou hmotnost a vstupují do separátoru. Při této metodě je využíván separátor průletový neboli TOF (Time-of-Flight), který odděluje ionty na základě odlišné rychlosti iontů s odlišným poměrem m/z . (hmotnost/náboj). Poté dochází u dopadajících iontů k přeměně energie na elektrický signál, který je zaznamenáván a zpracován počítačem (Záruba, 2016).

2.9.2 Vyhodnocení výsledků pomocí PCA (Principal Component Analysis)

Principem PCA neboli analýzy hlavních komponent je zmenšit rozsah dat, která obsahují veliké množství proměnných a zároveň u těchto dat zachovat co největší množství odchylek. Tento

princip je zachován přeměnou na nové proměnné, neboli hlavní komponenta, která nejsou ve vzájemném vztahu a jsou uspořádána tak, aby první z těchto proměnných měly zachované původní odchylky (Jolliffe, 2011).

2.9.3 Enzymatické štěpení trypsinem

Trypsin je enzym, který patří do skupiny proteáz a vyskytuje se u všech obratlovců ve dvanáctníku. Jeho neaktivní forma trypsinogen je do dvanáctníku uvolňována ze slinivky břišní. Tento enzym je mnohem specifičtější než např. pepsin, protože štěpí peptidovou vazbu na karboxylovém konci lysinu a argininu. Také na rozdíl od pepsinu je jeho aktivita nejvyšší v mírně zásaditém prostředí (Kodíček, 2004).

2.9.4 ZipTip – reverzní fáze C₁₈

Peptidy rozštěpené ze vzorků byly následně izolovány za pomoci pipetovací špičky ZipTip o maximálním objemu 10 µl. Tyto špičky mají na hrotu vložené chromatické médium, kterým je reverzní fáze C₁₈. Na tuto reverzní fázi se navážou peptidy rozštěpené ve vzorku hydrofobními interakcemi a zbylé anorganické látky a jiné „nečistoty“ zůstanou v roztoku vzorku, který je následně vymyt. Po promytí špičky elučním roztokem, dojde k uvolnění peptidů z reverzní fáze (Millipore, 2005).

3. Experimentální část

V této části bakalářské práce se zaměřuji na vlastní měření, které bylo provedeno v Laboratoři aplikované proteomiky na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. V této laboratoři bylo prováděno komplexní měření vzorků, které provázelo zpracování vzorku, vážení, enzymatické štěpení vzorku, přečišťování, vlastní měření na přístroji MALDI-TOF MS a vyhodnocování výsledků.

3.1 Použité chemikálie při experimentu

- Acetonitril (Sigma)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma)
- Hydrogenuhličitan amonný (Fluka)
- Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics)
- Trifluoroctová kyselina (Sigma)
- Trypsin (Pierce™ Trypsin Protease, MS-Grade)

3.2 Zpracování vzorku

Pro tento experiment bylo odebráno 11 vzorků masa od různých druhů zvířat. Jednotlivé vzorky byly odebrány ze syrového masa. Velikost odebraného vzorku byla 1 cm x 1 cm x 1 cm. Ke každému vzorku bylo přiřazeno číslo, které ho doprovázelo po celou dobu měření (**tab. 5 a obr. 3**). Všechny vzorky byly po odebrání usušeny a následně zmrazeny.

Tabulka 5 – Označení vzorku pro měření na MALDI-TOF MS

Označení vzorků	
vzorek	druh zvířete
1P	prase domácí
2R	králík domácí
3C	tur domácí
4CH	kur domácí
5S	srnec obecný
6K	koza domácí
7D	daněk evropský
8Z	zajíc polní
9N	nutrie říční
10A	kachna domácí
11F	kapr obecný



Obrázek 3 – Reálné označení vzorků ve zkumavkách eppendorf

3.3 Vážení vzorku

Jednotlivé vzorky byly váženy na analytických váhách. Pro tento typ měření byla navážka vzorku stanovena v rozmezí 0,25–0,30 mg (**tab. 6**). Každý vzorek byl navážen třikrát, tudíž bylo pro samotné měření připraveno 33 vzorků. U některých vzorků je v tabulce uvedeno vícero navážek, a to z důvodu opakování měření.

Tabulka 6 – Navážky vzorků mas v miligramech

Navážky vzorků					
Vzorek	1. vzorek	2. vzorek	3. vzorek	opakování měření	
1P	0,25	0,26	0,28		
2R	0,29	0,29	0,30	0,25	
3C	0,29	0,30	0,29	0,29	0,30
4CH	0,26	0,25	0,25	0,25	0,30
5S	0,27	0,25	0,26	0,25	0,25
6K	0,27	0,28	0,30	0,30	0,25
7D	0,28	0,26	0,28	0,27	0,26
8Z	0,29	0,28	0,30	0,25	
9N	0,28	0,30	0,30	0,25	0,29
10A	0,30	0,30	0,28	0,30	0,30
11F	0,26	0,30	0,30	0,25	0,26

3.4 Enzymatické štěpení vzorků

Jednotlivé druhy masa byly štěpeny trypsinem, jehož zásobní roztok obsahoval 1 mg/ml. Trypsin byl následně zředěn 50 mM roztokem hydrogenuhličitanu amonného. Pro zředění byly použity 4 μ l trypsinu a 200 μ l 50mM NH_4HCO_3 . K jednotlivým vzorkům bylo přidáno 10 μ l zředěného trypsinu, a to tak, aby navážené vzorky byly zcela ponořené v roztoku. Enzymatické štěpení probíhalo dvě hodiny při laboratorní teplotě.

3.5 Přečišťování vzorků

Po enzymatickém štěpení vzorků následovalo jejich přečišťování. Přečišťování vzorků probíhalo v několika fázích za pomoci špičky Zip-Tip s reverzní fází C_{18} . První fází přečišťování bylo navlhčení (wetting) reverzní fáze 50% acetonitrem. Druhá fáze zahrnovala ekvilibraci reverzní fáze. Ekvilibrační roztok obsahoval 20 μ l kyseliny trifluoroctové a 1000 μ l destilované vody. Třetí fáze byla tzv. eluce, kdy došlo k uvolnění peptidů, které byly navázané na reverzní fázi. Eluční roztok obsahoval 500 μ l ekvilibračního roztoku smíchaného s 500 μ l 50% acetonitrem.

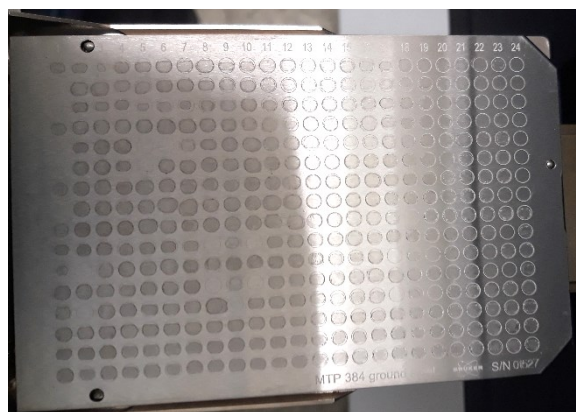
Celý proces přečišťování byl prováděn za pomoci mikropipet se špičkou Zip-Tip. V prvním kroku přečištění bylo odpipetováno desetkrát 10 μ l acetonitrilu do odpadu (wetting). Poté bylo odpipetováno pětkrát 10 μ l ekvilibračního roztoku do odpadu (ekvilibrace). Dalším krokem byl proplach vzorku v reverzní fázi – desetkrát 10 μ l. Poté se opět odpipetovalo pětkrát 10 μ l ekvilibračního roztoku do odpadu. Posledním krokem přečišťování bylo odpipetování 8 μ l elučního roztoku do zkumavky mikro-ependorf, ve které byl proveden proplach reverzní fáze s elučním roztokem.

Pro přečištění dalšího vzorku se použila stejná špička Zip-Tip, pomocí které se odpipetovalo desetkrát 10 μ l elučního roztoku, čímž se tato špička propláchla. Celý postup byl pro další vzorky opakován, bez prvního kroku, který nebyl potřebný, protože špička již byla navlhčena.

3.6 Příprava vzorků na měření

Pro stanovení vzorků byla připravena matrice přibližně s 9 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) rozpuštěné ve 150 μ l 30% acetonitrilu, 250 μ l ekvilibračního roztoku a ve 100 μ l destilované vody.

Přečištěné vzorky byly připravené ve zkumavce mikro-ependorf pro přidání matrice. Ke každému vzorku (o objemu 8 μ l), bylo přidáno 10 μ l matrice. Na MALDI destičku z nerezové oceli (**obr. 4**) bylo dávkováno 2,2 μ l vzorku s matricí. Každý vzorek byl nanesen na tři pozice. Po nanesení všech vzorků, byla destička nechána na vzduchu při laboratorní teplotě, aby vzorky vykrytalizovaly. Na destičku byl také nanesen peptidový kalibrační standard II.



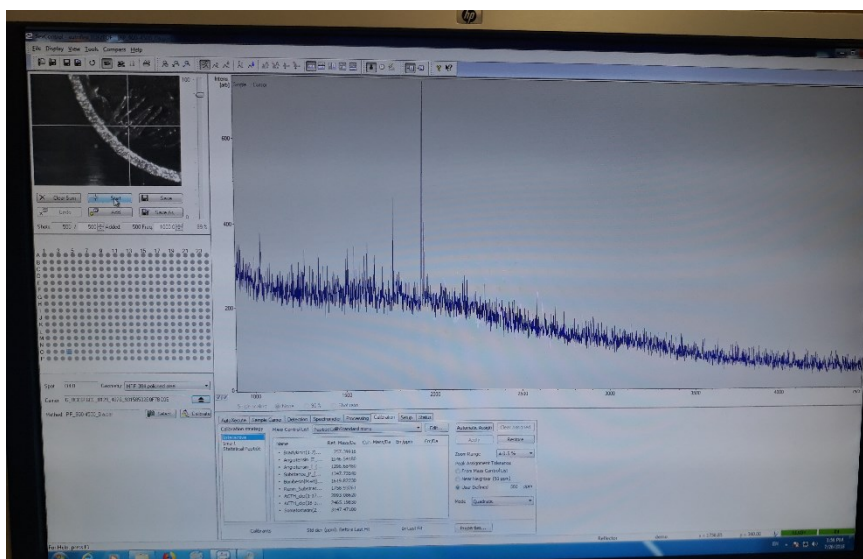
Obrázek 4 – MALDI destička z nerezové oceli s nanesenými vzorky

3.7 Měření na MALDI-TOF MS

Destička s vykrystalizovanými vzorky byla vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS (**obr. 5**). Nejprve byla provedena kalibrace kalibračním standardem II, kde došlo k přiřazení kalibračních píků ke konkrétním naměřeným hmotnostem. Při vlastní analýze vzorků, bylo mířeno laserem na jednotlivé krystaly vzorku, čímž došlo k ionizaci vzorku a pomocí detektoru byla měřena rychlost pohybu iontů. Analýza hmotnostním spektrometrem probíhala v rozsahu 900–4500 Da a intenzita laseru byla 75 %. Z každé pozice na MALDI destičce bylo uloženo spektrum konkrétního vzorku o počtu laserových zásahů 3000 (**obr. 6**).



Obrázek 5 – Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF



Obrázek 6 – Ukázka hmotnostního spektra získaného technikou MALDI-TOF

3.8 Vyhodnocení vzorků metodou PCA

Veškeré vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody PCA (Principal Component Analysis), neboli metodou analýzy hlavních komponent. Zpracování dat z přístroje proběhlo pomocí počítačového programu R, ve kterém je možné i 3D zobrazení grafu s hlavními komponenty. Jednotlivé vzorky byly porovnávány mezi sebou na třech hlavních komponentách, na kterých se vzorky nejvíce lišily. Pomocí PCA byla zjištěna variabilita vzorků na jednotlivých komponentách a také variabilita porovnávaných vzorků při určité hmotnosti peptidu.

4. Výsledky a diskuze

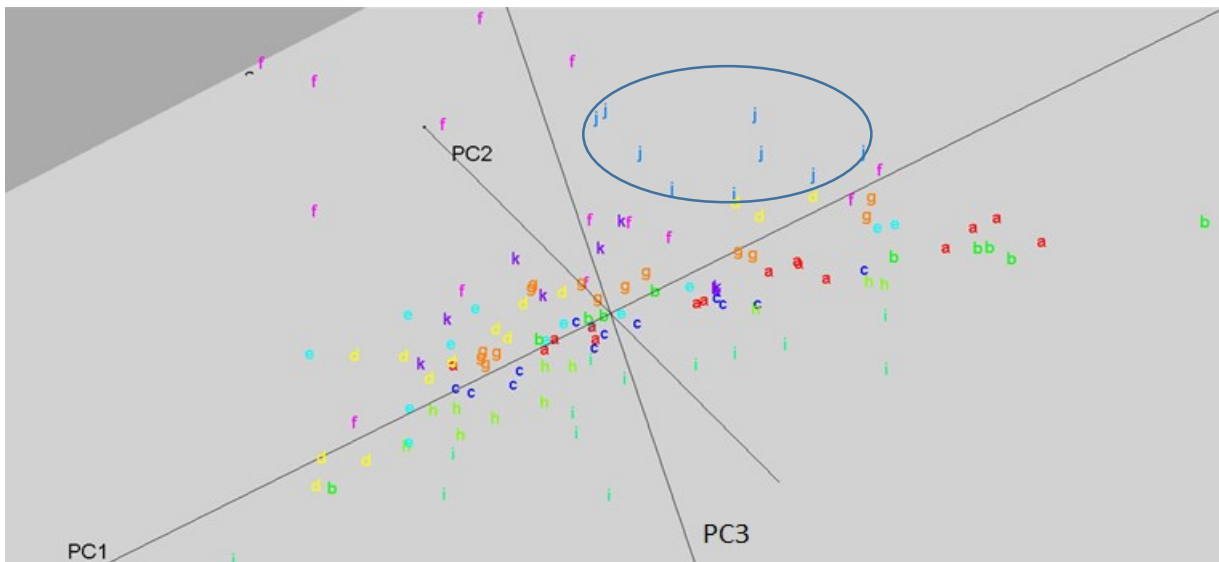
V této bakalářské práci bylo zkoumáno, zda je možné využít metodu MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry) s následným vyhodnocením PCA (Principal Component Analysis) pro druhové rozeznání masa.

Vzorky z jedenácti druhů mas byly usušeny a následně v laboratoři zpracovávány. Po přípravě vzorků v podobě navažování bylo získáno 33 vzorků, které byly rozštěpeny trypsinem, přečištěny za pomoci reverzní fáze ZipTip C₁₈ a nakonec smíchány s maticí. Vzorky s maticí byly nanесeny na ocelovou destičku a analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF. Po změření spekter u všech vzorků (daňčí, hovězí, kachní, kozí, králičí, kuřecí, nutrie, srnčí, rybí, vepřové, zaječí) byla všechna data extrahována do programu R, ve kterém byly prováděny veškeré další operace se získanými spektry. Tato spektra byla v počítačovém programu porovnávána na třech hlavních komponentách.

Za pomoci počítačového programu R bylo nejprve porovnáno všech jedenáct vzorků mezi sebou, ale toto řešení nemělo kladný výsledek (**obr. 7**). Poté byly vytvořeny dvě pomyslné skupiny. První skupina obsahovala vzorky králičího, zaječího, vepřového, kuřecího, srnčího a hovězího masa. Po extrahování dat do počítačového programu bylo značně vidět, že srnčí maso nelze odlišit od hovězího. Z tohoto důvodu bylo dále srnčí maso porovnáváno jednotlivě s ostatními druhy mas. Druhá skupina byla tvořena vzorky daňčího, kachního, rybího, kozího masa a masa nutrie. Maso nutrie bylo ihned odlišeno od ostatních, ale rybí maso bylo stále neodlišitelné. Po dalším porovnávání rybího masa s jinými vzorky bylo po konzultaci se školitelkou rozhodnuto, že toto maso bude označeno jako neidentifikovatelné. U ostatních vzorků bylo prokázáno, že za pomoci této metody je možné dané druhy mas od sebe odlišit.

4.1 Rozlišení všech vzorků

První krok pro rozlišení druhového původu masa bylo porovnání všech dat získaných z měření všech vzorků mezi sebou. Na **obrázku 7** je obrázek získaný z trojrozměrného (3D) grafu se zobrazenými výsledky všech vzorků (hovězí, vepřové, králičí, zaječí, srnčí, daňčí, kuřecí, rybí, kachní, kozí maso a maso nutrie), které jsou rozmístěny mezi třemi hlavními komponentami – PC1, PC2, PC3. Jednotlivá barevná písmena označují výsledek měření určitého druhu masa, jejichž značení je uvedené v **kapitole 3.2**.

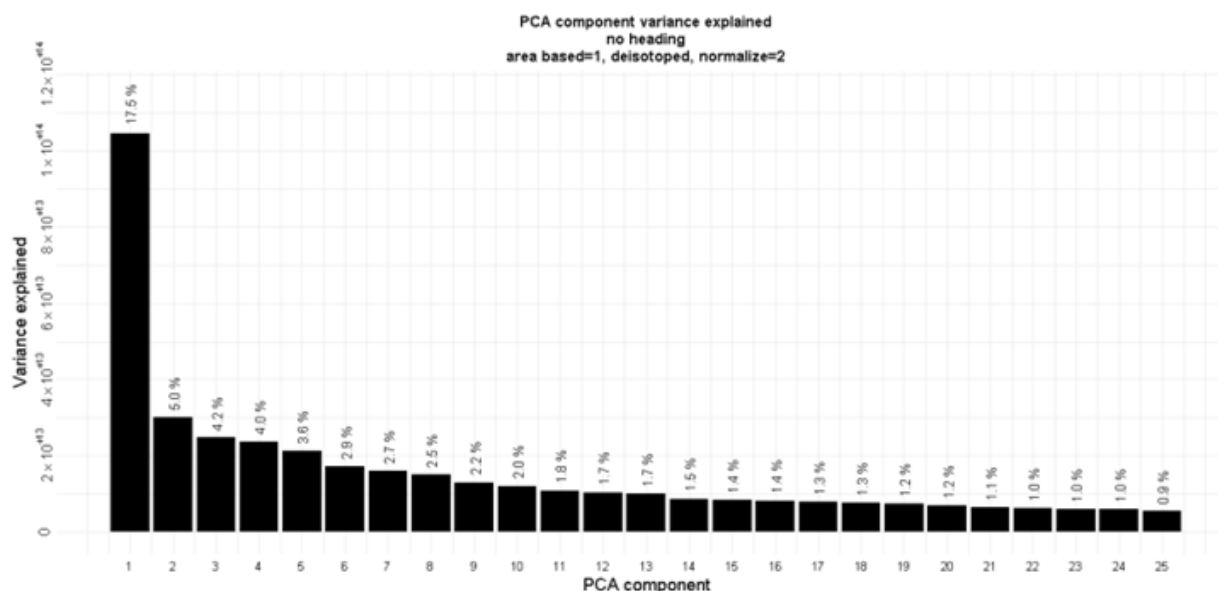


Obrázek 7 – Trojrozměrný graf – rozlišení všech druhů mas mezi sebou. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – rybí maso, c – králičí maso, d – hovězí maso, e – srnčí maso, f – kozí maso, g – daňčí maso, h – zaječí maso, i – maso nutrie, j – vepřové maso, k – kuřecí maso

Z **obrázku 7** je patrné, že z porovnání dat z měření všech vzorků nezískáme pozitivní výsledek. V grafu by měly být jednotlivé shluky barevných písmen oddělené mezi hlavními komponentami, ale v tomto případě tomu tak není. Shluky většiny vzorků se překrývají. Kdybychom je porovnávali mezi sebou, nebylo by možné je od sebe rozeznat. Jediný druh, který je od ostatních rozlišitelný, je vepřové maso, jež má v grafu písmeno „j“ značené modrou barvou. I když shluk dat získaných z vepřového masa není ideálně oddělen od ostatních vzorků, přesto bychom ho dokázali rozeznat od ostatních.

Hypotézu, že není možné veškeré vzorky porovnávat mezi sebou, potvrzuje i **graf 1**, kde je v procentech nad jednotlivými sloupci vyjádřena míra variability všech měřených vzorků na třech hlavních komponentách – PC1, PC2, PC3. Čím větší by bylo uvedeno procento variability, tím by vzorky byly natolik odlišné, že by se jednotlivá spektra rozdělila do oddělených shluků.

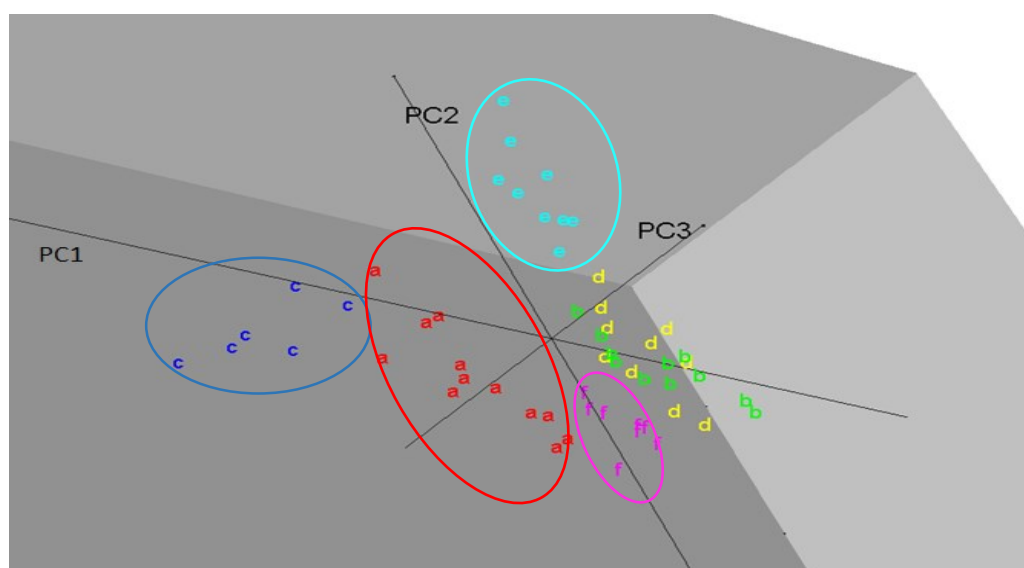
Z **grafu 1** lze vyčíst, že variabilita všech měřených vzorků dosahuje pouze 17,5 % na PC1, 5 % na PC2 a 4,2 % na PC3. Uvedené hodnoty jsou velice nízké a vypovídají o tom, že spektra měřených vzorků od sebe nejsou natolik rozdílná, aby se vytvořil graf s oddělenými shluky dat jednotlivých druhů mas.



Graf 1 – Míra variability na PC1, PC2 a PC3 v procentech

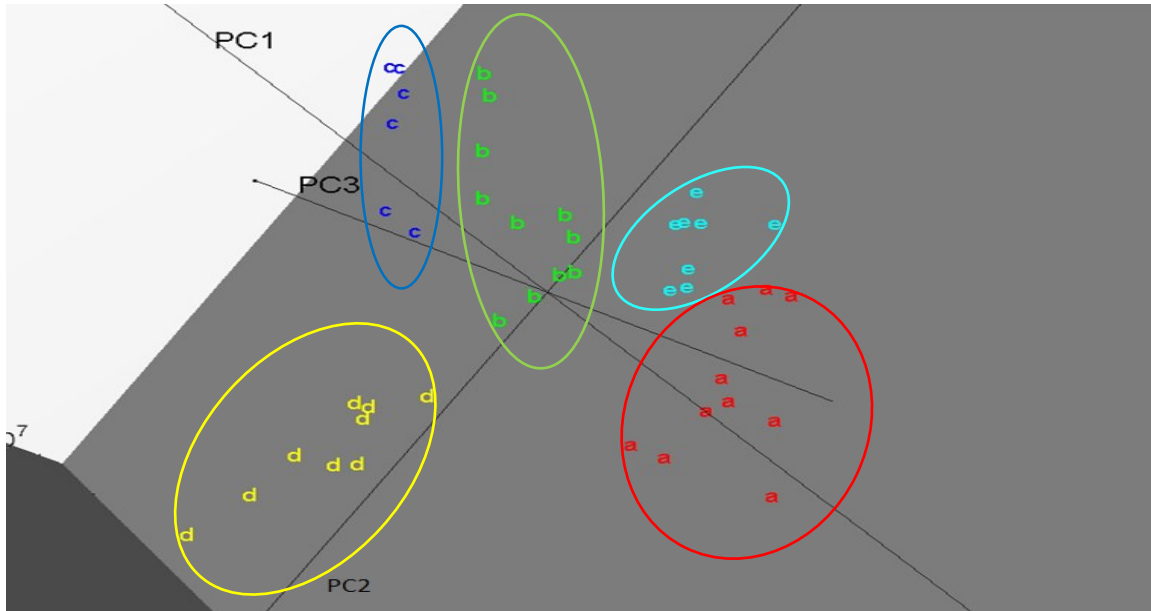
4.2 Rozlišení první skupiny vzorků

Po zjištění, že všechny vzorky nelze porovnávat mezi sebou, bylo rozhodnuto, že se vytvoří dvě pomyslné skupiny. Tato kapitola se zaměřuje na první skupinu, která obsahovala vzorky králičího, zaječího, vepřového, kuřecího, srnčího a hovězího masa. Po extrahování dat do počítačového programu byl vygenerován trojrozměrný graf s daty vzorků mezi třemi hlavními komponentami (obr. 8).



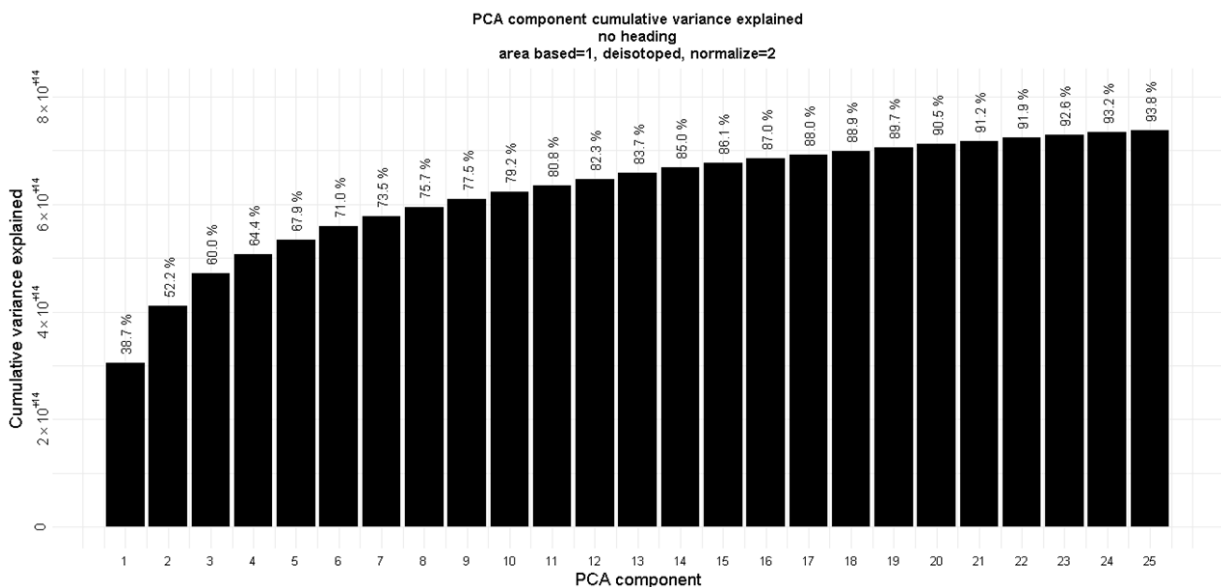
Obrázek 8 – Trojrozměrný graf – rozlišení první skupiny vzorků. Legenda k obrázku: a – králičí maso, b – hovězí maso, c – kuřecí maso, d – srnčí maso, e – vepřové maso, f – zaječí maso

Na **obrázku 8** je vidět, že vzorky z králičího, zaječího, vepřového a kuřecího masa vytvořily skupiny, které se navzájem oddělily, a proto je lze od sebe rozeznat. Pouze srnčí a hovězí maso zůstalo promísené. Proto byla v dalším kroku data z měření srnčího masa odebrána (**obr. 9**) a tento vzorek byl porovnáván zvlášť s ostatními druhy v další kapitole.



Obrázek 9 – Trojrozměrný graf – rozlišení první skupiny vzorků bez srnčího masa. Legenda k obrázku: a – králičí maso, b – hovězí maso, c – kuřecí maso, d – vepřové maso, e – zaječí maso

Na **obrázku 9** je zobrazený trojrozměrný graf po odebrání srnčího masa. Můžeme pozorovat správné oddělení zbylých vzorků do jednotlivých shluků. Každý shluk je tvořen daty z měření jednoho druhu masa. Po vyhodnocení tohoto grafu lze říci, že tyto druhy mas od sebe spolehlivě rozeznáme. Toto vyhodnocení potvrzuje i **graf 2**, který zobrazuje kumulativní variabilitu vzorků první skupiny bez vzorku srnčího masa.

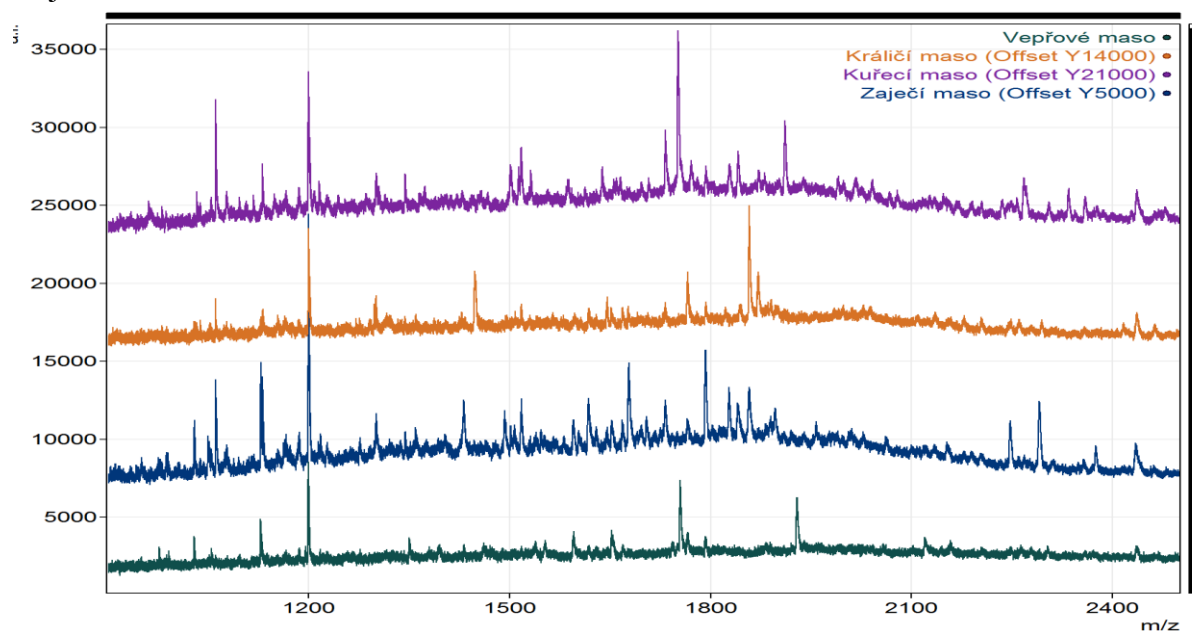


Graf 2 – Kumulativní variabilita první skupiny vzorků bez srnčího masa na hlavních komponentách – PC1, PC2, PC3

Na **grafu 2** jsou zobrazené jednotlivé sloupce, které představují spojené komponenty. První sloupec zobrazuje procentuální variabilitu pouze na první komponentě, druhý sloupec představuje variabilitu na první a druhé komponentě a třetí sloupec vyobrazuje procentuální variabilitu na první, druhé i třetí komponentě.

Můžeme tedy z grafu vyčíst, že variabilita pouze na první komponentě je 38,7 %, což je několikanásobně více než u porovnávání všech vzorků. Celková variabilita na všech třech hlavních komponentách je 60 %. Tato procentuální variabilita vypovídá o tom, že vzorky vyobrazené v grafu se lépe rozdělily do shluků, což můžeme vidět na **obrázku 9**.

Na **obrázku 10** jsou zobrazená spektra vzorku vepřového masa, králičího masa, kuřecího masa a zaječího masa.



Obrázek 10 – Spektra z měření vzorků vepřového, králičího, zaječího a kuřecího masa

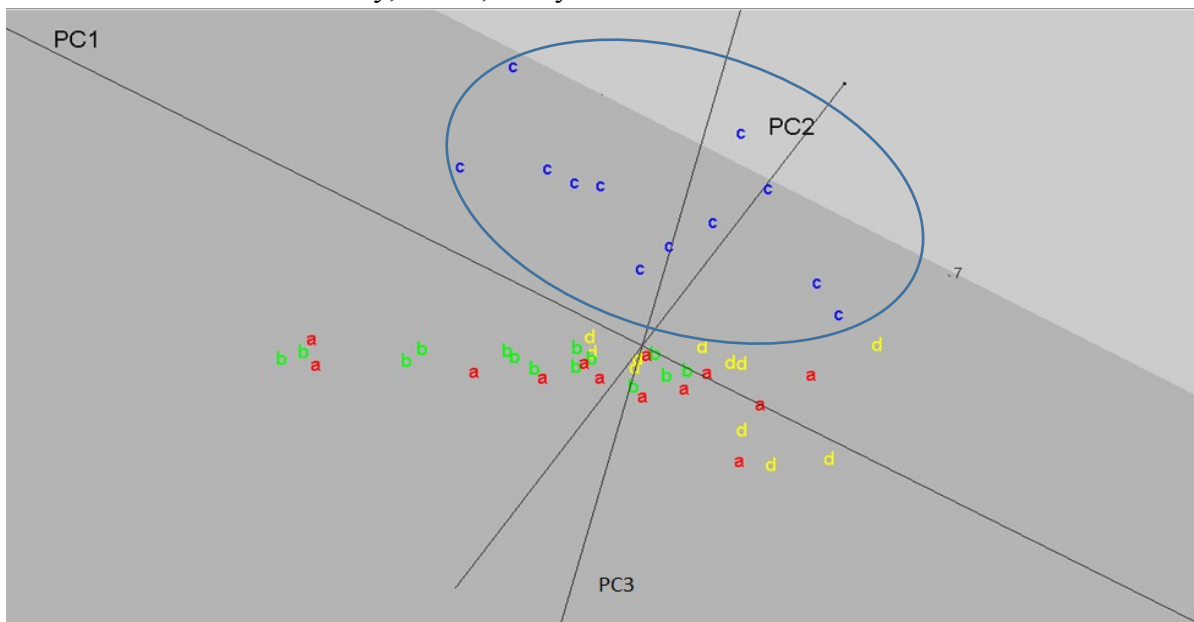
Je důležité poukázat na spektrum zaječího a králičího masa, kde by se dalo očekávat, že si budou velice podobné. Tato hypotéza byla ale vyvrácena, protože spektrum králičího masa (oranžové) má mnohem méně píků než spektrum zaječího masa (modré). Podobnost, co se počtu píků týče, je spíše mezi spektry zaječího a kuřecího masa.

4.3 Rozlišení srnčího masa

Srnčí maso bylo nejprve zařazeno do první skupiny vyhodnocovaných výsledků, ale nebylo možné jej oddělit od hovězího masa. Proto bylo rozhodnuto, že se srnčí maso bude vyhodnocovat jednotlivě s vybranými druhy mas. Nejprve byl porovnáván společně s masem nutrie, daňčím a hovězím masem, ale výsledek nebyl uspokojivý (**obr. 11**). Poté byl vzorek srnčího masa porovnáván s daňčím a hovězím masem (**obr. 12**), dále s masem nutrie a

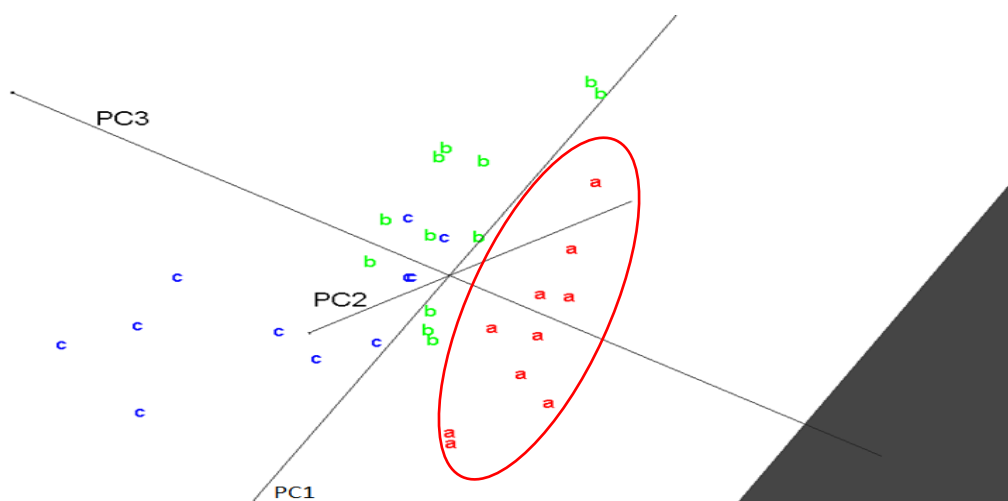
daňčím masem (**obr. 13**) a nakonec samostatně s daňčím masem (**obr. 14**), hovězím masem (**obr. 16**) a masem nutrie (**obr. 17**).

Na **obrázku 11** je zobrazený snímek z trojrozměrného grafu, kde jsou porovnávány výsledky získané ze vzorků masa srnky, daňka, krávy a nutrie.



Obrázek 11 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku srnčího masa s ostatními druh. Legenda k obrázku: a – srnčí maso, b – daňčí maso, c – maso nutrie, d – hovězí maso

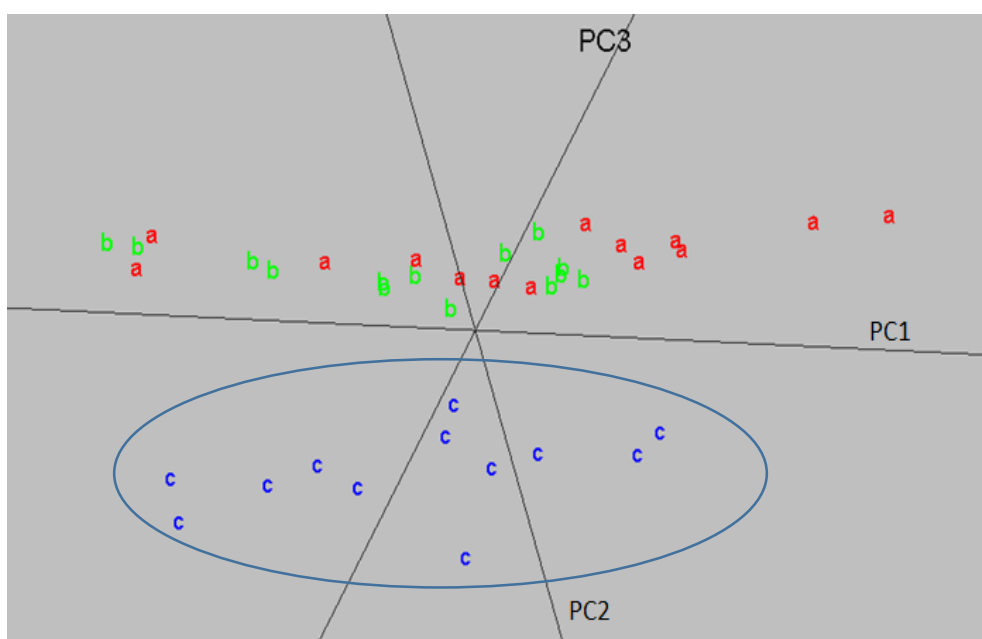
Na **obrázku 11** je vzorek masa nutrie označen písmenem „c“ modré barvy a jako jediný je od ostatních rozlišený. Shluk dat není ideálně oddělen od ostatních mas, ale i tak lze říci, že je jako jediný rozeznatelný. Spektra/shluky bodů z masa srnky, daňka a krávy jsou propojené, proto je tímto způsobem nelze rozeznat. Z tohoto důvodu byl vzorek (všechny naměřené body) masa nutrie odebrán z grafu. Po odebrání všech naměřených bodů masa nutrie došlo k dalšímu úspěšnému vytvoření shluku dat, který lze pozorovat na **obrázku 12**.



Obrázek 12 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku srnčího masa s ostatními druhy. Legenda k obrázku: a – srnčí maso, b – daňčí maso, c – hovězí maso

Na **obrázku 12** je červeně označený shluk bodů získaných z měření masa srnky. Tento vzorek je správně oddělen od vzorku masa krávy a daňka, a proto je možné ho i při společném vyhodnocování rozeznat. Daňčí a hovězí maso je promíseno, a proto bylo později provedeno i rozdělení těchto dvou vzorků (**kapitola 4. 5., obr. 22**).

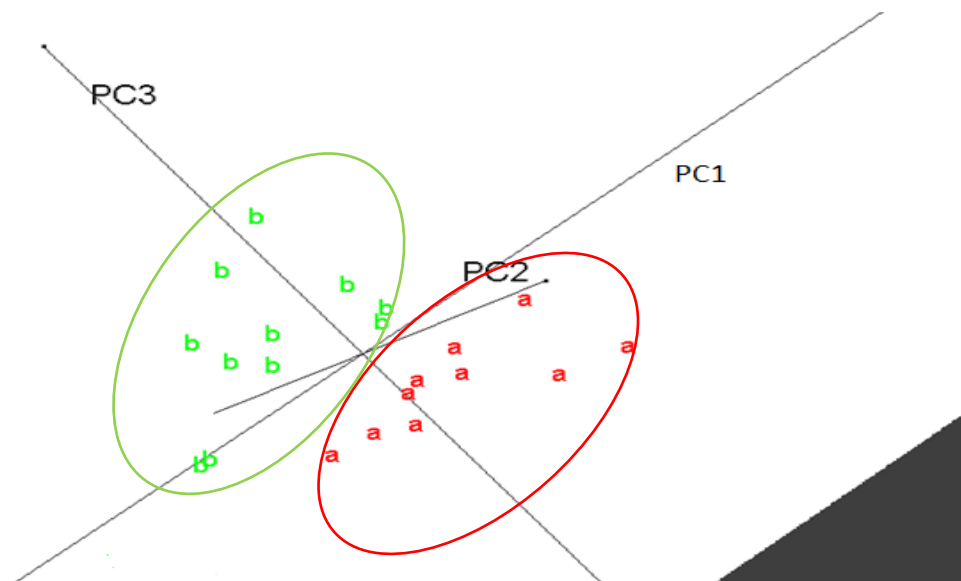
Dalšími vzorky, které byly porovnávány se vzorkem srnčího masa, byly vzorky daňčího masa a masa nutrie. Při prvním stanovení (**obr. 11**) byly vzorky srnčího, daňčího a hovězího masa promísené a maso nutrie oddělené. Z tohoto důvodu bylo provedeno další měření (**obr. 13**), které mělo potvrdit, že vzorek nutrie je natolik odlišný, že i při stanovení pouze se srnčím a daňčím masem bude nadále tvořit jako jediný samostatný shluk bodů.



Obrázek 13 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku srnčího masa s dalšími druhy.
 Legenda k obrázku: a – srnčí maso, b – daňčí maso, c – maso nutrie

Na **obrázku 13** je potvrzený výsledek, který byl očekáván. Maso nutrie je svým peptidovým složením natolik rozdílné, že opět jako jediný druh vytvořil shluk bodů. Naopak srnčí a daňčí maso má podobné hodnoty, a proto došlo ke spojení bodů. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že se v dalším kroku budou porovnávat pouze výsledky měření srnčího a daňčího masa mezi sebou, zda je dokážeme rozlišit.

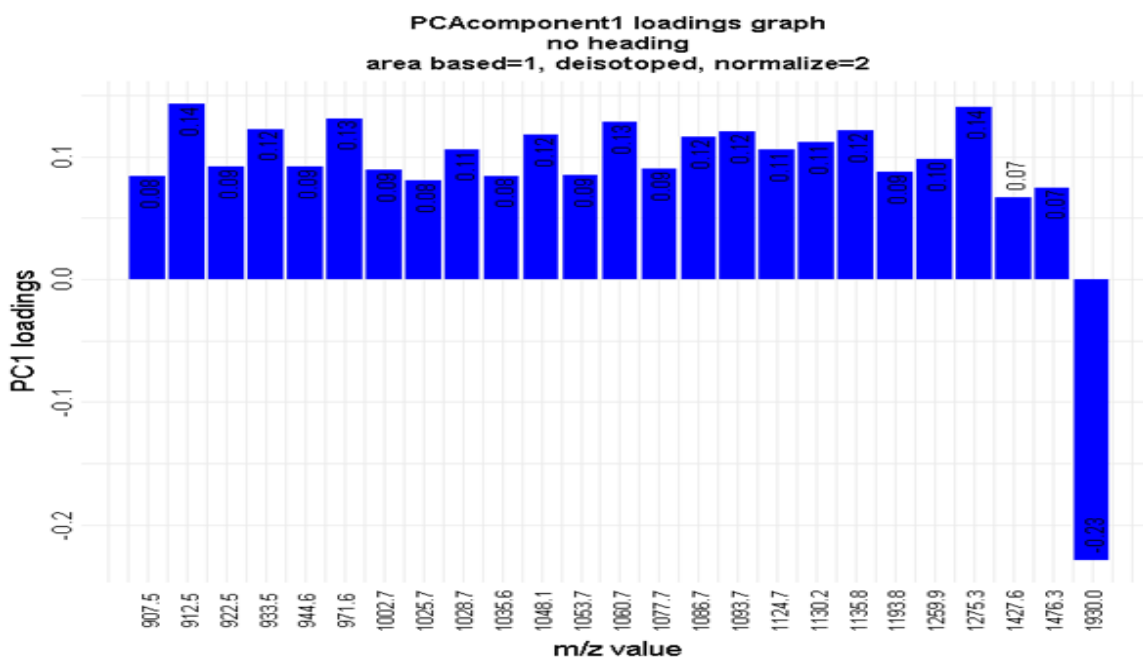
Předpokladem pro následující stanovení (**obr. 14**) bylo, že maso srnky a daňka má podobné proteinové složení, protože se jedná o divokou zvěř. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že hodnoty získané z měření masa srnky a daňka budou na trojrozměrném grafu promísené.



Obrázek 14 – Trojrozměrný graf – rozlišení srnčího masa s dalšími druhy. Legenda k obrázku: a – srnčí maso, b – daňčí maso

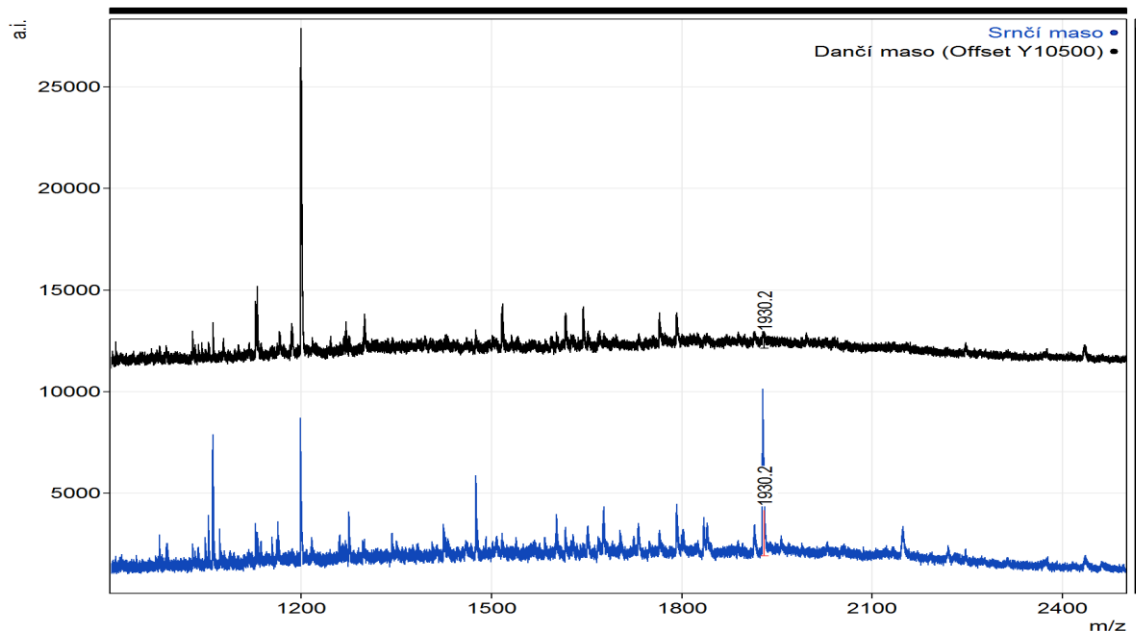
Po vygenerování trojrozměrného grafu s naměřenými hodnotami srnčího a daňčího masa, který je zobrazený na **obrázku 14**, byla hypotéza o podobnosti hodnot vyvrácena. Graf prokázal, že maso srnky je odlišné od masa daňka. Odlišnost těchto dvou vzorků byla potvrzena i mírou variability, která byla na PC1 33,8 %.

V počítačovém programu R, ve kterém byly generovány tyto grafy, byl vytvořen i graf, který popisuje variabilitu přímo na komponentě PC1. Tento graf popisuje variabilitu vzorku při určité hmotnosti peptidu (**graf. 3**).



Graf 3 – Variabilita vzorků srnčího a daňčího masa při určité hmotnosti peptidu

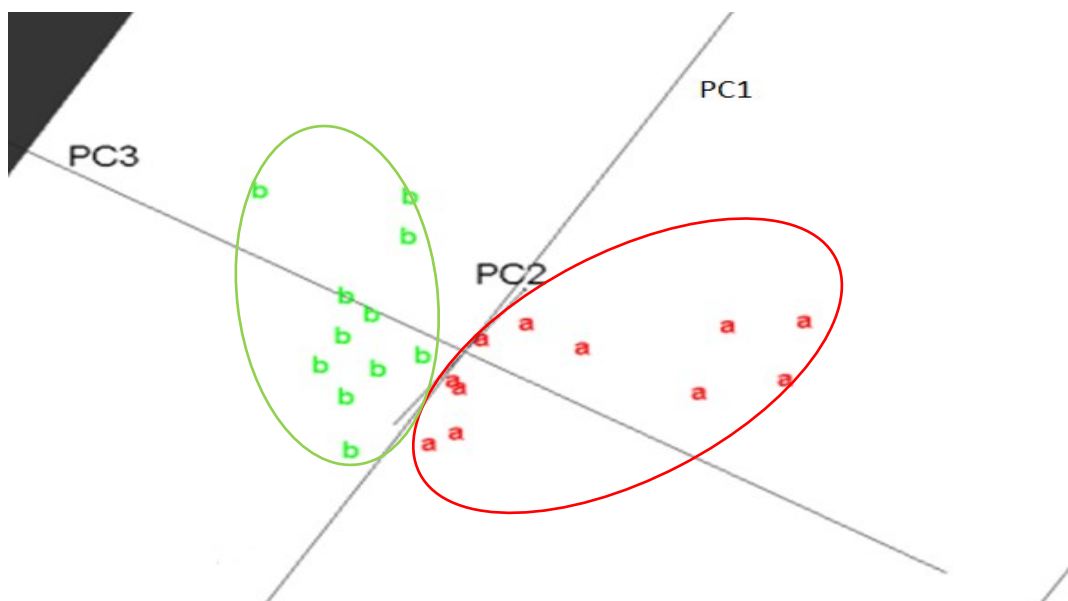
Na **grafu 3** jsou jednotlivé sloupce konkrétních hmotností, které vyjadřují míru variability vzorku srnčího masa a masa daňka. Tento graf určuje variabilitu těchto dvou vzorků při hmotnosti 1930 m/z . Daná hmotnost variability byla potvrzena i po přezkoumání spekter, které byly vybrány při měření na přístroji MALDI-TOF (**obr. 15**).



Obrázek 15 – Spektra získaná z měření vzorků srnčího a daňčího masa. Pík o hmotnostní 1930 m/z představuje hlavní rozdíl mezi naměřenými spektry srnčího a daňčího masa

Na **obrázku 15** jsou zobrazena spektra z měření srnčího a daňčího masa. U těchto spekter je vyznačena hmotnost peptidu (**graf 3**), ve které měly vzorky největší variabilitu. Jedná se o pík s hmotností 1930 m/z . Spektrum získané při měření vzorku srnčího masa má při této hmotnosti patrný pík, kdežto u spektra daňčího masa je tento pík téměř neznatelný. Pomocí dané metody by tedy alespoň teoreticky bylo možné odhalit falšované maso, na kterém by byl uvedený původ pouze od jednoho z těchto dvou zvířat.

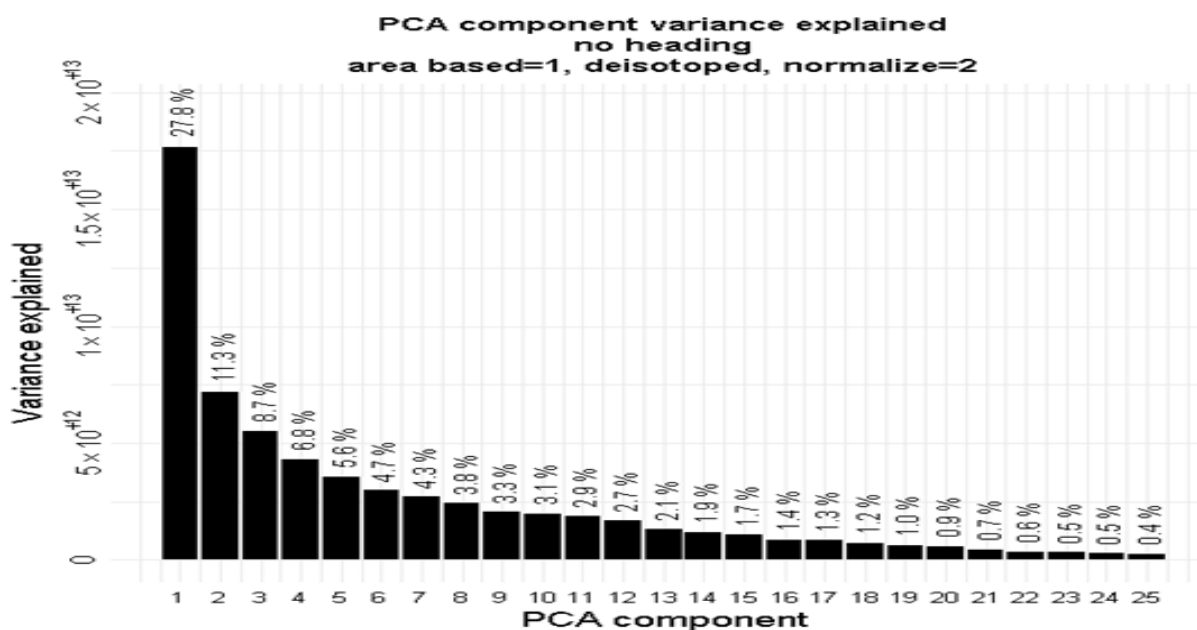
Další porovnávání srnčího masa bylo provedeno s hovězím masem (**obr. 16**). Toto rozlišení bylo provedeno proto, že hodnoty těchto druhů mas byly při prvním stanovení promísené (**obr. 11**) a pro potvrzení rozlišení, které bylo prokázáno u stanovení srnčího masa s daňčím a hovězím masem (**obr. 12**).



Obrázek 16 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku srnčího masa s ostatními druhy. Legenda k obrázku: a – hovězí maso, b – srnčí maso

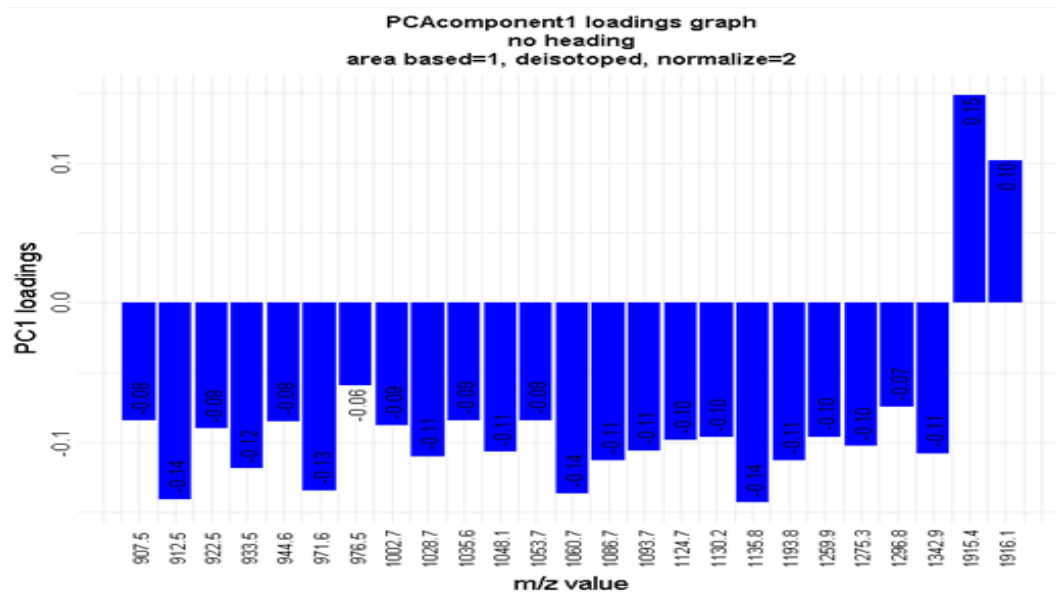
Na **obrázku 16** je zobrazený trojrozměrný graf, který potvrzuje rozlišení masa srnčího a hovězího. Tyto dva druhy masa vytvořili oddělené shluky komponentou PC1.

Variabilita zobrazená na **grafu 4** je u těchto vzorků na komponentě PC1 27,8 %, což je zajímavé, protože variabilita u vzorku srnčího a daňčího masa na té samé komponentě byla 33,8 %. Tato hodnota vypovídá o tom, že srnčí a hovězí maso mají mnohem podobnější složení bílkovin nežli srnčí a daňčí maso.



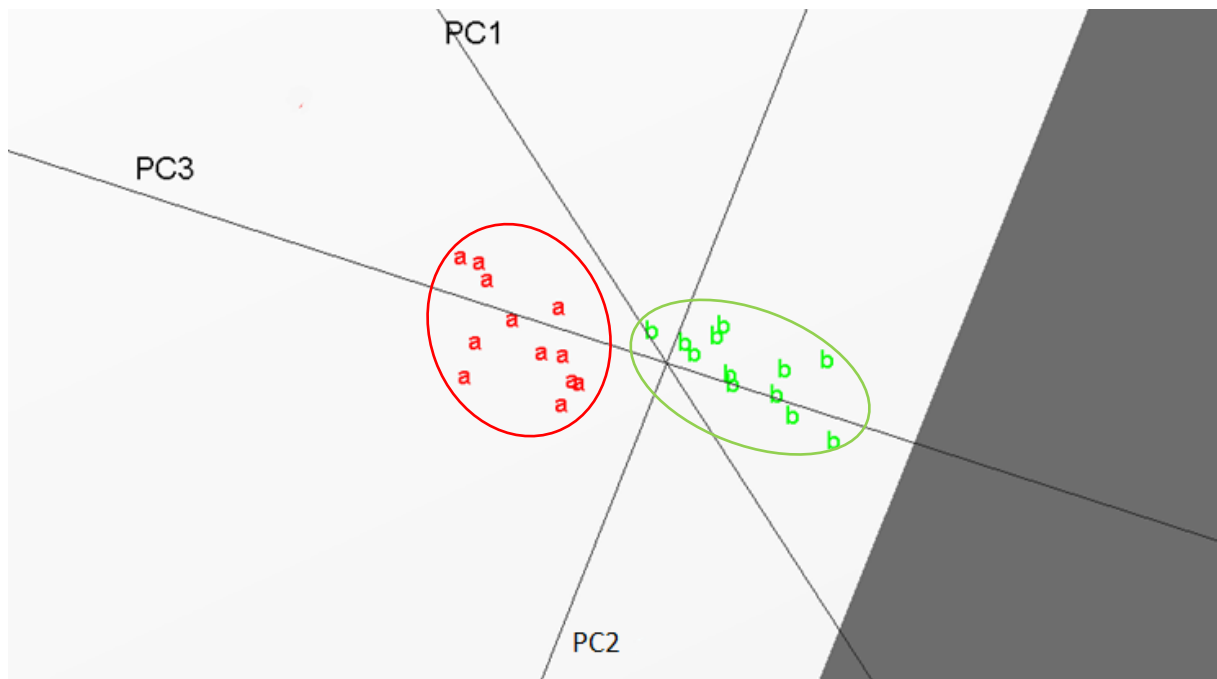
Graf 4 – Variabilita vzorku hovězího a srnčího masa na třech hlavních komponentách

Vzorky srnčího a hovězího masa měly podle **grafu 5** největší variabilitu při hmotnosti peptidu 1915,4 m/z , ale tato variabilita nebyla jednoznačná, jelikož se ony vzorky lišily při více hmotnostech, ale ne v takové míře. Spektra porovnávaných vzorků jsou si velice podobná, ale i v tomto případě můžeme říci, že vzorky srnčího a hovězího masa lze od sebe odlišit.



Graf 5 – Variabilita vzorku srnčího a hovězího masa při určité hmotnosti peptidu na PC1

Posledním rozlišením je porovnání vzorku srnčího masa s masem nutrie (**obr. 17**). Tyto druhy masa byly od začátku rozlišitelné, ale přesto bylo provedeno stanovení potvrzující výsledek.



Obrázek 17 – Trojrozměrný graf – rozlišení srnčího masa s masem nutrie. Legenda k obrázku: a – srnčí maso, b – maso nutrie

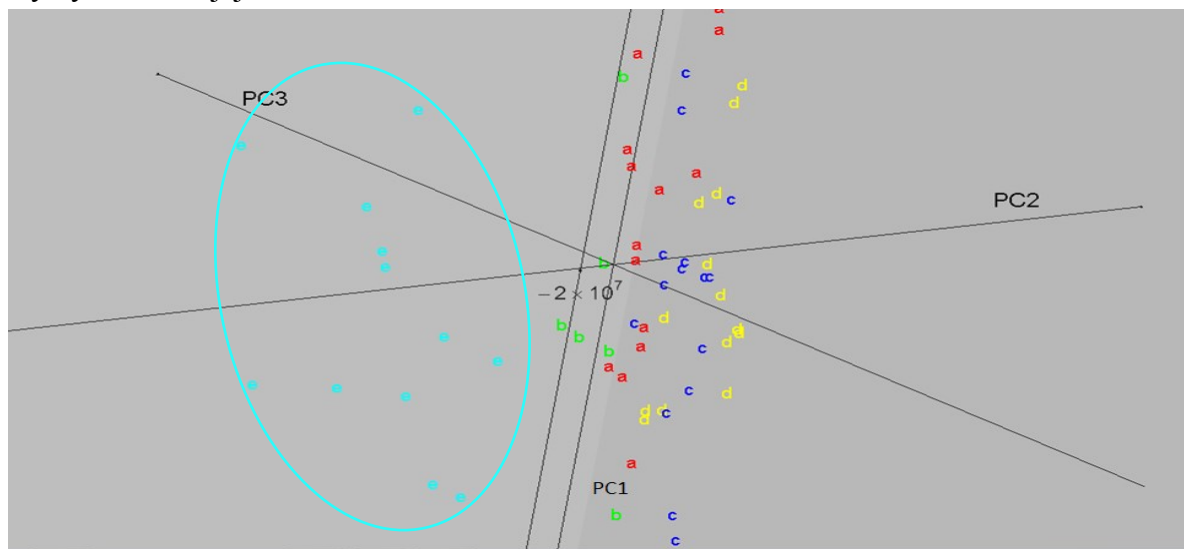
Stanovení vyhodnocené na **obrázku 17** potvrzuje výsledky z předešlých měření (**obr. 11, obr. 13**). Shluky jednotlivých dat se oddělily nejlépe ze všech stanovení.

4.4 Rozlišení druhé skupiny vzorků

Druhá pomyslná skupina obsahovala vzorky daňčího, kachního, kozího, rybího masa a masa nutrie. Všechna data získaná z měření těchto vzorků na přístroji MALDI-TOF byla extrahována do počítačového programu R a porovnávána mezi sebou.

Na **obrázku 18** je trojrozměrný graf, na němž je zobrazený výsledek porovnávání všech vzorků druhé skupiny. Můžeme vidět, že jediný vzorek masa nutrie, označený v grafu písmenem „e“ modré barvy, tvoří jako jediný shluk bodů. Všechny hodnoty tohoto vzorku jsou zakroužkované a od ostatních oddělené komponentou PC1. Všechny ostatní vzorky (daňčí, kachní, kozí a rybí maso) jsou promísené a touto cestou by nebylo možné je rozeznat.

Tyto výsledky byly potvrzené i grafem vyjadřující míru variability. Hodnota odlišnosti druhé skupiny vzorků dosahovala pouze 20,1 % na PC1, což je asi o 10 % méně než u první skupiny vzorků. Tato hodnota vypovídá o tom, že hodnoty získané z měření nebyly tak moc odlišné, aby bylo možné jejich rozdělení do shluků.

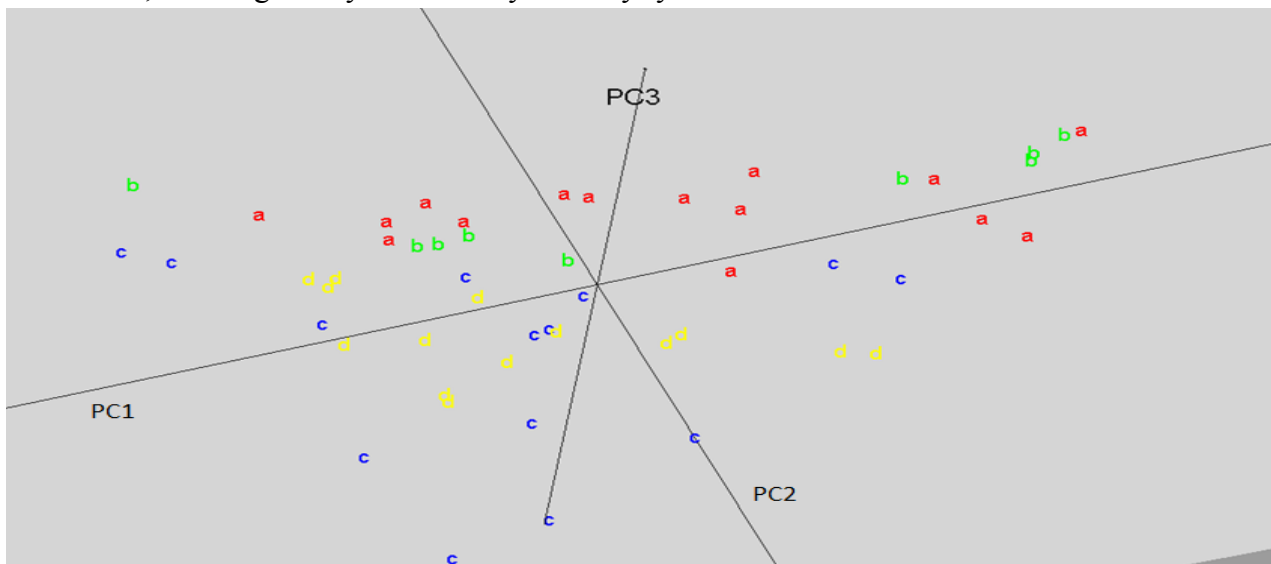


Obrázek 18 – Trojrozměrný graf – rozlišení druhé skupiny vzorků. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – rybí maso, c – kozí maso, d – daňčí maso, e – maso nutrie

Z důvodu toho, že oddělení celé skupiny najednou nebylo úspěšné, bylo rozhodnuto, že pro další vyhodnocování bude odebráno maso nutrie.

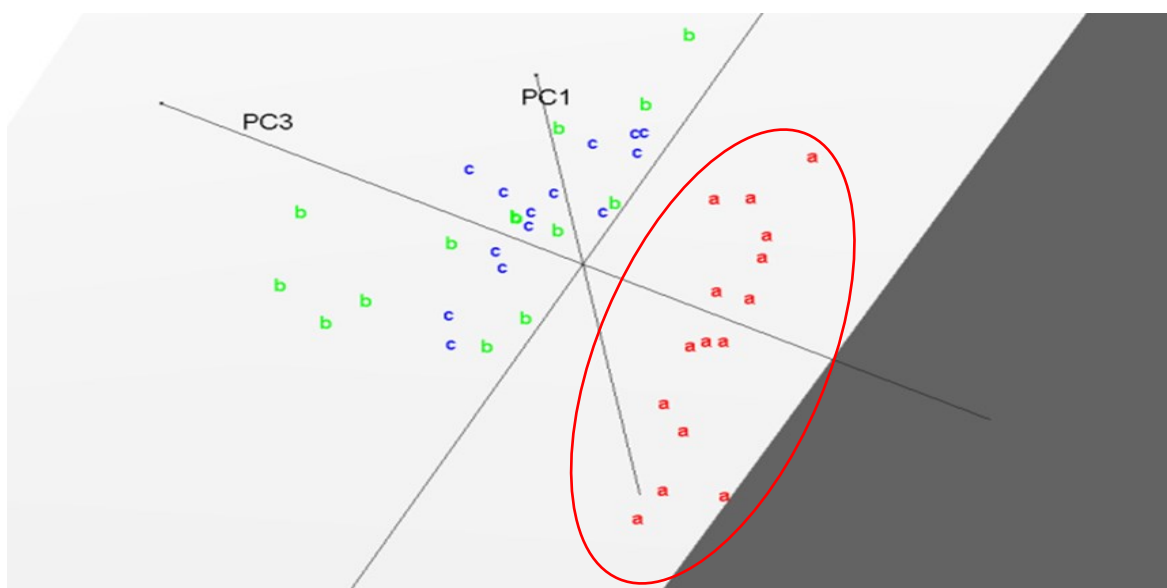
Na **obrázku 19** je zobrazený trojrozměrný graf s hodnotami zbylých čtyř vzorků (kachní, daňčí, rybí, kozí maso). Můžeme pozorovat, že tyto vzorky se chovají jako sobě podobné a mezi

komponentami jsou vzájemně promísené. Nejhůře dopadly hodnoty z měření rybího masa, které jsou na grafu značeny zeleným písmenem „b“. Tyto hodnoty jsou v malém množství (nebylo možné vybrat správné spektrum) a ani tak nevytváří shluk bodů. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že se z grafu vyřadí všechny hodnoty rybího masa.



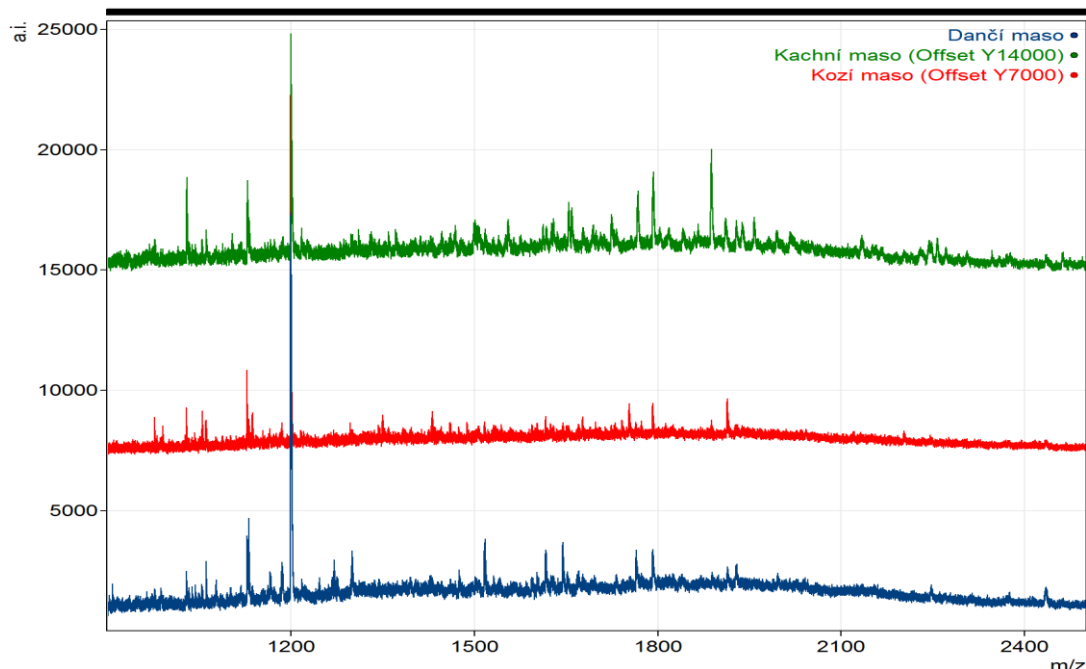
Obrázek 19 – Trojrozměrný graf – rozlišení druhé skupiny vzorků bez masa nutrie. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – rybí maso, c – kozí maso, d – daňčí maso

Po odstranění hodnot rybího masa, došlo k vygenerování nového trojrozměrného grafu, který je zobrazený na **obrázku 20**. Tento graf obsahuje pouze hodnoty z daňčího, kachního a kozího masa. Lze vidět, že u vzorku kachního masa, který je na grafu vyznačen písmenem „a“ červené barvy, došlo k oddělení od zbylých dvou vzorků. Variabilita byla o několik procent vyšší než u prvotního stanovení všech vzorků. Tato hodnota činí 23,7 % na PC1.



Obrázek 20 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku druhé skupiny bez rybího masa a masa nutrie. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – kozí maso, c – daňčí maso

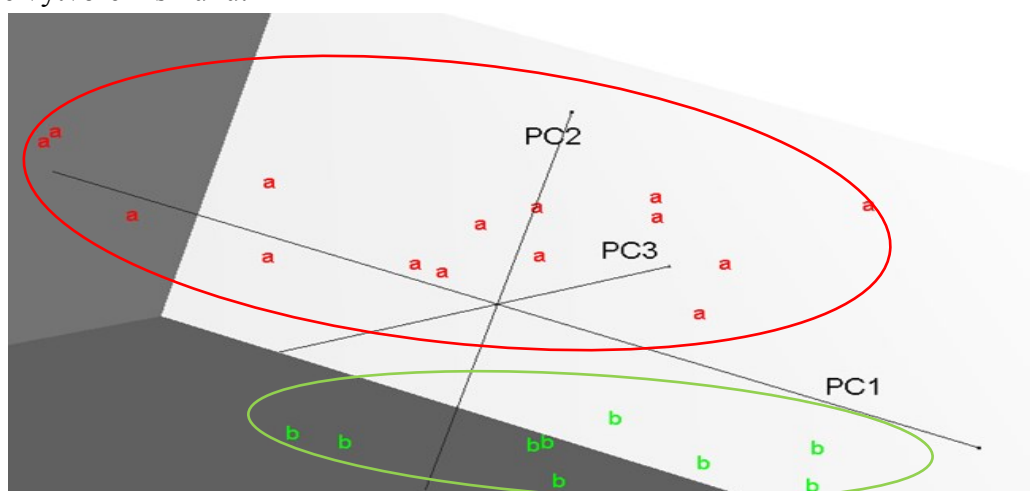
Rozlišení kachního masa od zbylých dvou vzorků (daňčí, kozí masa) potvrdilo i přezkoumání spekter. Na **obrázku 21** jsou tato spektra z měření vzorků kachního, kozího a daňčího masa zobrazena. Je patrné, že spektrum kachního masa je zcela odlišné od spektra kozího a daňčího masa co se počtu a velikosti piků týče.



Obrázek 21 – Spektra získaná z měření vzorků kachního, daňčího a kozího masa. Prokázání rozlišení kachního masa

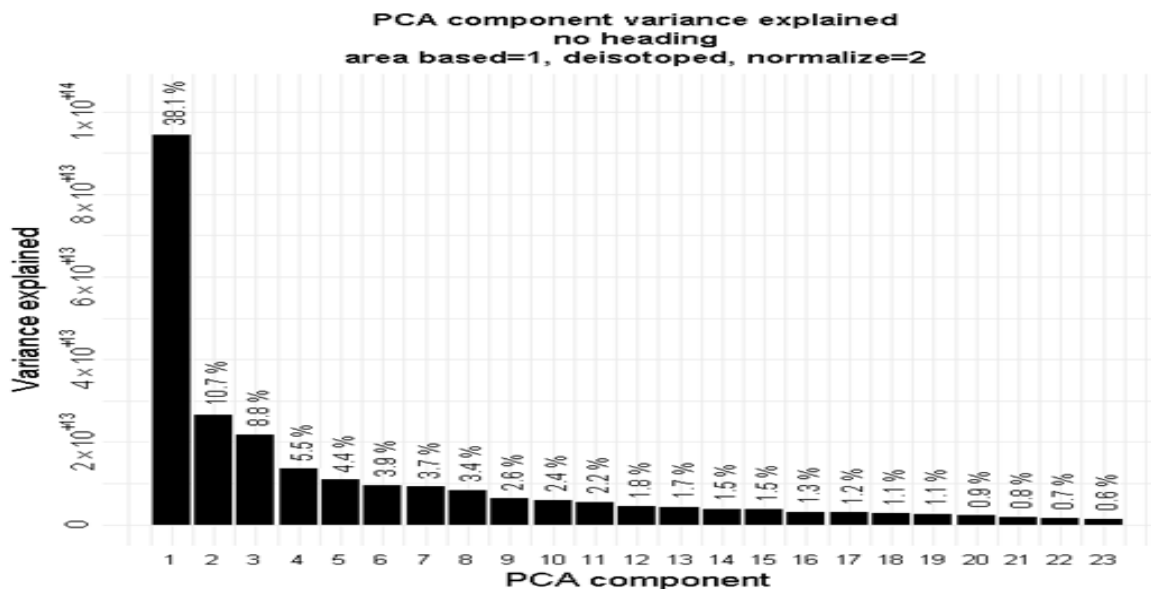
Zbylé dva vzorky (kozí a daňčí masa) nebylo možné rozeznat při porovnání mezi sebou. Proto bylo provedeno porovnání vzorku kozího masa s kachním masem a porovnání vzorku daňčího masa s vybranými druhy (**kap. 4.5**).

Porovnáním vzorku kozího masa s kachním masem došlo k úspěšnému oddělení obou vzorků a můžeme je označit za rozlišitelné (**obr. 22**). Na tomto obrázku můžeme také pozorovat správné vytvoření shluků.



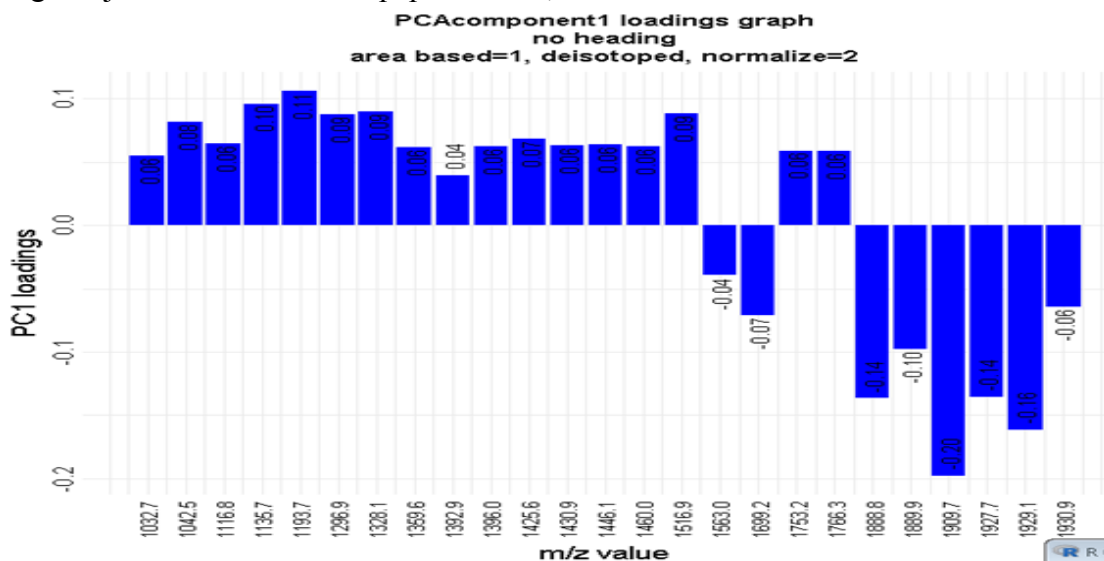
Obrázek 22 – Trojrozměrný graf – rozlišení kachního a kozího masa. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – kozí maso

Úspěšné oddělení kozího a kachního masa (**obr. 22**) potvrzuje také **graf 6**. Na tomto grafu je zobrazená míra variability na PC1, PC2, PC3 neboli třech hlavních komponentách v procentech. Variabilita těchto dvou vzorků je 38,1 % na PC1, což je nejuspěšnější oddělení vzorků na této komponentě. Pokud bychom se zaměřili na zbylé dvě komponenty, tak na PC2 je variabilita 10,7 % a na PC3 je to pouhých 8,8%. Tato procenta nejsou vysoká, ale důležité je, že procenta udaná na PC1 vysoká byla.



Graf 6 – Míra variability vzorku kachního a kozího masa udaná v procentech

Pokud bychom se zaměřili pouze na komponentu PC1, na které byla míra variability nejvyšší (**graf 6**), zjistíme, při jaké hmotnosti peptidu se vzorky kachního a kozího masa nejvíce lišily. Na tomto grafu je uvedena hmotnost peptidu 1909,7 *m/z*.



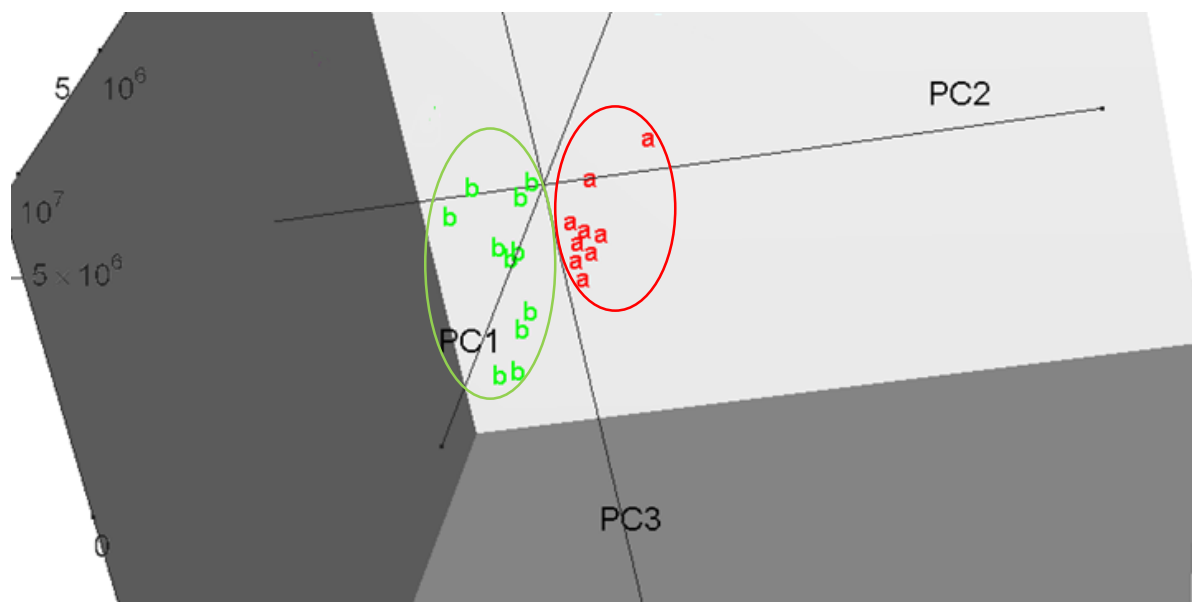
Graf 7 – Variabilita vzorků kachního a kozího masa při určité hmotnosti peptidu na PC1. Nejvyšší variabilita při hmotnosti 1909,7 *m/z*

Uvedená hodnota $1909,7 m/z$ je viditelná i na **obrázku 21**, kde jsou zobrazená spektra kachního a kozího masa. Na těchto spektrech můžeme pozorovat viditelné rozdíly mezi kozím a kachním masem při této hmotnosti. U vzorku kachního masa je v uvedené hmotnosti $1909,7 m/z$ pík, kdežto spektrum vzorku kozího masa v této oblasti pík nemá, nebo pouze minimální.

4.5 Rozlišení daňčího masa

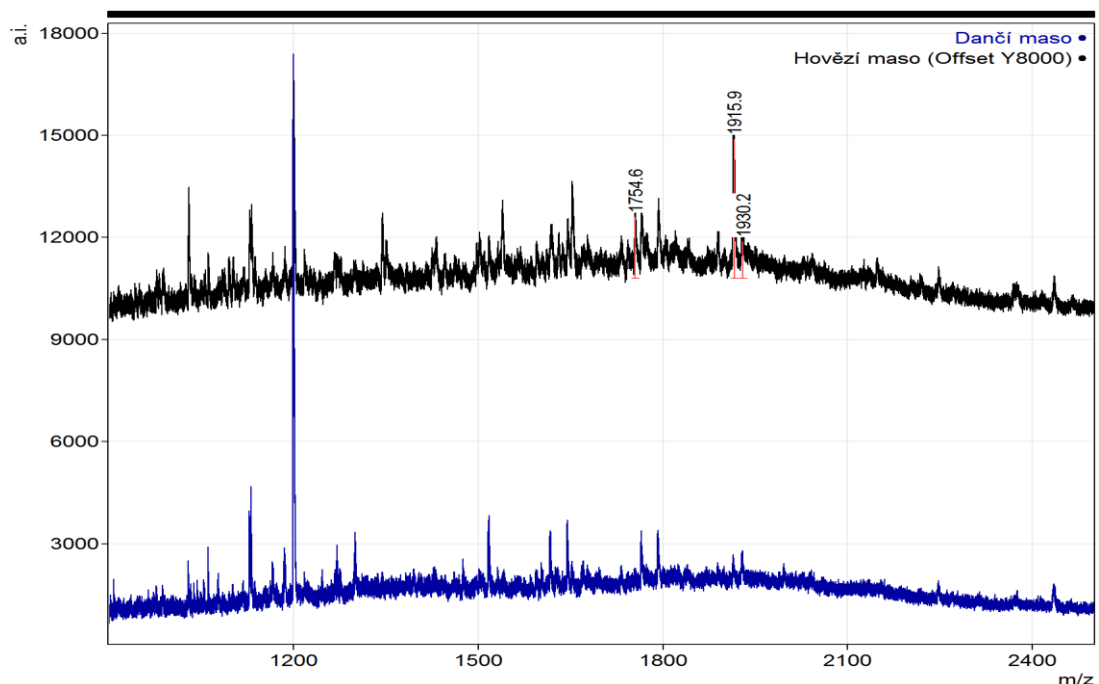
V **kapitole 4.3**, která byla zaměřená na rozlišení srnčího masa od hovězího a daňčího masa, je na **obrázku 12** zobrazený trojrozměrný graf, na kterém lze pozorovat nerozeznatelné vzorky hovězího a daňčího masa. Veškeré hodnoty hovězího a daňčího masa byly promísené, a tak můžeme předpokládat, že tyto vzorky mají podobné hodnoty. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že se provede nové stanovení, a to pouze mezi těmito dvěma vzorky.

Na **obrázku 23** je trojrozměrný graf, který zobrazuje provedení rozlišení mezi vzorky daňčího a hovězího masa. Tyto vzorky vytvořily oddělené shluky bodů. Na tomto obrázku lze pozorovat, že většina bodů (spekter) hovězího masa, označené červeným písmenem „a“, mají téměř stejné parametry, protože se nahromadily na stejném místě. Tomuto oddělení odpovídá i míra variability, jejíž hodnota je na PC1 35,5 %, což je oproti jinému rozlišení velice úspěšné.



Obrázek 23 – Trojrozměrný graf – rozlišení daňčího masa s hovězím masem. Legenda k obrázku: a – hovězí maso, b – daňčí maso

Na **obrázku 24** jsou zobrazená spektra, na kterých je vyznačená hodnota hmotnosti $1930,2\text{ m/z}$, při které měly tyto vzorky nejvyšší variabilitu. Tato hodnota tvoří u spektra hovězího masa pík, kdežto u spektra daňčího masa tento pík není nebo není příliš zřetelný. Mimo tuto hodnotu jsou tam také zvýrazněné další hmotnosti, které byly na spektrech značně odlišné. K těmto hodnotám patří hmotnost $1915,9\text{ m/z}$ a $1754,6\text{ m/z}$. Také lze na spektrech pozorovat odlišnost těchto dvou vzorků. Spektrum z měření vzorku hovězího masa má značně více píků než spektrum daňčího masa.

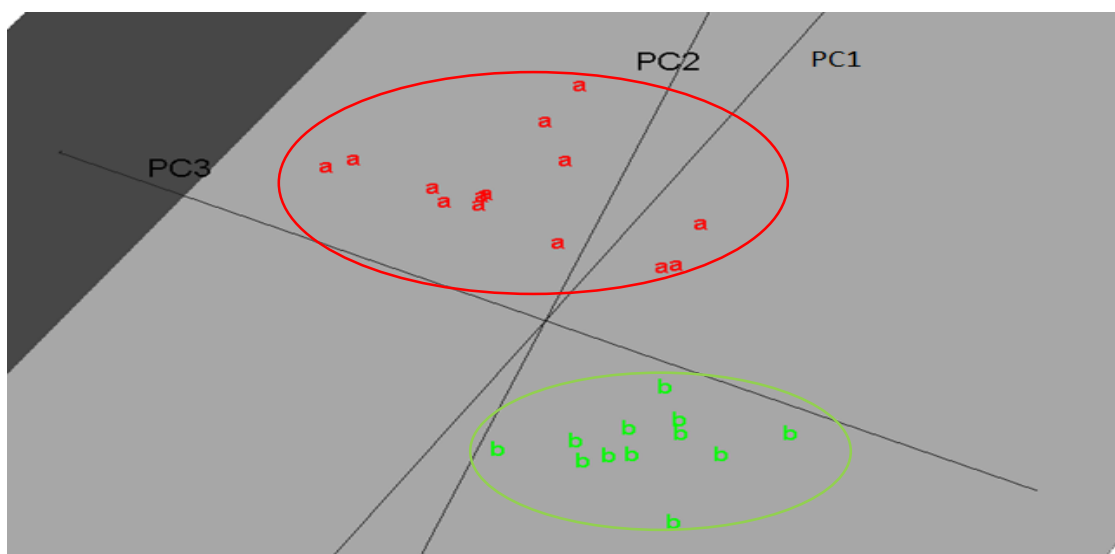


Obrázek 24 – Spektra získaná z měření vzorku hovězího a daňčího masa. Vyznačené hmotnosti $1930,2\text{ m/z}$, $1915,9\text{ m/z}$, $1754,6\text{ m/z}$, ve kterých se vzorky nejvíce lišily

Poslední porovnání daňčího masa bylo s masem nutrie. Toto stanovení bylo provedeno pro posouzení odlišnosti a pro posouzení lepšího výsledku.

Výsledek porovnávání srnčího masa a masa nutrie (**obr. 17**) byl úspěšný a vytvořené shluky byly ideální. Všechny získané body z měření nebyly roztažené po celém grafu, ale byly celistvě u sebe.

U porovnání daňčího masa s masem nutrie zobrazené na **obrázku 25**, také vznikly oddělené shluky bodů, ale ty nebyly tak kompaktní jako u porovnávání srnčího masa a masa nutrie. Můžeme tedy říct, že maso nutrie se srnčím masem je mnohem odlišnější než maso nutrie s daňčím masem.

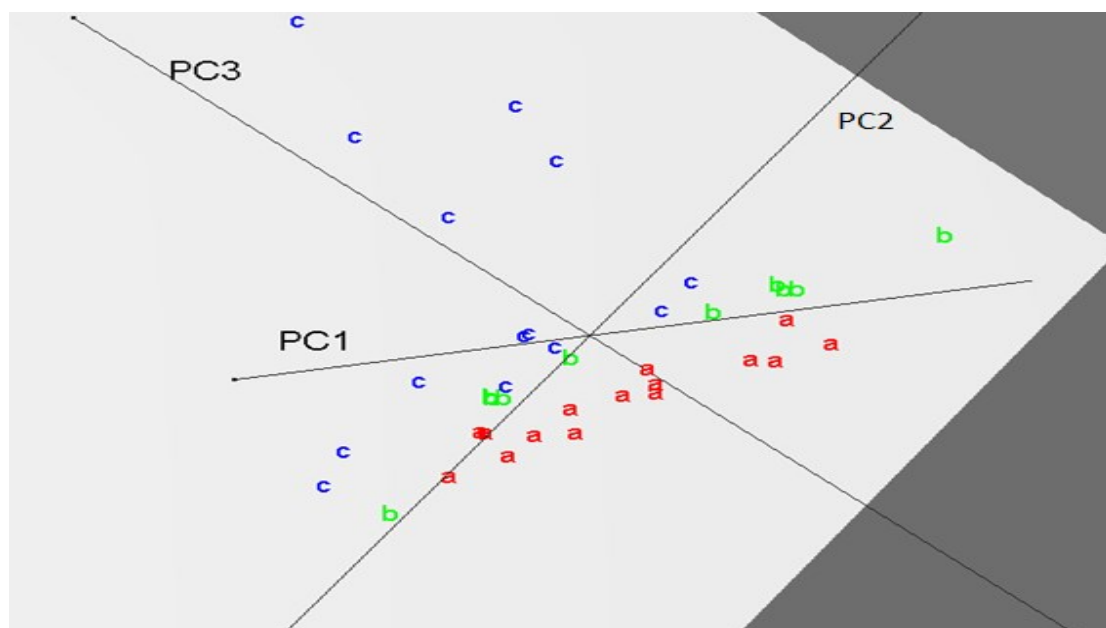


Obrázek 25 – Trojrozměrný graf – rozlišení daňčího masa a masa nutrie. Legenda k obrázku: a – daňčí maso, b – maso nutrie

4.6 Rozlišení rybího masa

Poslední vzorek, který zatím zůstal nerozlišený od ostatních, je vzorek rybího masa. Vzorek byl v prvních stanoveních porovnáván se všemi vzorky (**obr. 7**), s druhou skupinou vzorků (**obr. 18**) a také byl porovnáván s druhou skupinou vzorků bez masa nutrie (**obr. 19**). Ani jedno toto stanovení nebylo úspěšné a vzorek rybího masa byl vždy promísen s ostatními vzorky.

Tato kapitola je zaměřena na rozeznání rybího masa, které bylo porovnáno s kachním a kozím masem (**obr. 26**).



Obrázek 26 – Trojrozměrný graf – rozlišení vzorku rybího masa s ostatními druhy. Legenda k obrázku: a – kachní maso, b – rybí maso, c – kozí maso

Na **obrázku 26** je z grafu patrné, že vzorek rybího masa se rozprostírá mezi vzorky kachního a kozího masa. Jelikož nebyl vytvořen zřejmý shluk dat rybího masa, nemůže být tento vzorek označen za rozlišený.

Z důvodu toho, že veškerá vyhodnocení vycházela negativně – data rybího masa byla rozprostřena po celém grafu a spektra při měření na přístroji MALDI-TOF MS byla ve velikém šumu, bylo rozhodnuto, že vzorek rybího masa bude označen za neidentifikovatelný a nerozlišitelný od ostatních vzorků.

5. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na druhové rozpoznání mas pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF s vyhodnocením PCA. Vzorky použité v této bakalářské práci byly připravené ze syrového masa, které bylo následně zmrazeno. Bylo připraveno celkem jedenáct vzorků (daňčí, hovězí, kachní, kozí, králíčí, kuřecí, nutrie, srnčí, rybí, vepřové, zaječí), které byly zpracovávány v Laboratoři aplikované proteomiky na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.

Všechny tyto vzorky byly na analytických váhách naváženy na hmotnost 0,25–0,30 mg. Po navážení vzorků následovalo enzymatické štěpení. Štěpení vzorků jednotlivých druhů mas bylo prováděno za pomoci trypsinu, který byl připraven ve směsi s hydrogenuhličitanem amonným. Po dvouhodinovém štěpení za laboratorní teploty byly veškeré vzorky přečištěny pomocí ZipTip C₁₈ reverzní fáze. Toto přečišťování zahrnovalo několik kroků, do kterých patří wetting, ekvilibrace a eluce. Jakmile byly vzorky eluovány, následoval krok smíchání s matricí. Matricí pro toto měření byla vybrána DHB (2,5-dihydroxybenzoová kyselina). Vzorky s matricí byly připravené na ocelové destičce vždy na třech pozicích. Vlastní měření na přístroji MALDI-TOF zahrnovalo míření laseru do jednotlivých krystalů. Z tohoto měření vznikla jednotlivá spektra pro daný druh masa. Po změření všech vzorků byla data extrahována do počítačového programu R. Tento program vygeneroval trojrozměrné pohyblivé grafy se vzorky mezi třemi hlavními komponentami, graf variability vzorků na jednotlivých komponentách, kumulativní graf variability vzorků a v neposlední řadě graf variability vzorků při určité hmotnosti peptidu na PC1. Vyhodnocování vzorků bylo prováděno pomocí těchto grafů neboli analýzou hlavních komponent. Pro toto měření byly nejzajímavější tři hlavní komponenty – PC1, PC2, PC3. Tyto komponenty poskytovaly osy, ve kterých byly jednotlivé body vzorků pozorovány v prostoru. Hypotéza, že všechny vzorky mas mohou být vyhodnoceny najednou, byla zamítnuta hned po vygenerování prvního grafu, který ukázal propojenost vzorků. Proto byly vzorky rozděleny do dvou pomyslných skupin. První skupina obsahovala vzorky vepřového, hovězího, srnčího, králíčího, zaječího a kuřecího masa. Většina z těchto vzorků byla hned zpočátku oddělena. Jediné srnčí maso bylo stále spojené s hovězím, proto bylo v následujícím kroku rozhodnuto, že se srnčí maso bude hodnotit zvlášť. Vzorek srnčího masa byl porovnáván s daňčím, hovězím masem a masem nutrie. Všechna tato vyhodnocení byla úspěšná. Druhou skupinu vzorků tvořilo daňčí, kozí, rybí, kachní maso a maso nutrie. Vzorek masa nutrie byl při všech vyhodnocení pozitivní a lze jej od všech mas rozlišit. Po odebrání rybího masa z této skupiny byly i ostatní vzorky odlišeny. Bylo provedeno samostatné stanovení rybího masa s kozím a

kachním masem, ale výsledek byl negativní. Veškerá spektra rybího masa byla ve velkém šumu a nebylo možné vybrat správná spektra, tzn. minimální šum, velký počet píků, vysoké píky. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že jediné rybí maso bude označeno za neidentifikovatelné a nerozlišitelné od ostatních.

Metoda MALDI-TOF MS s vyhodnocením PCA byla pro druhové rozeznání mas úspěšná. Deset z jedenácti vzorků bylo správně rozpoznáno. Pomocí těchto dat by bylo možné ji použít pro odhalení falšování mas, zatím pouze pro syrové maso – například pro tatarský biftek či mleté maso. Další možností pro tuto metodu by bylo použití pro zpracované maso – například tepelně upravené nebo různé masné výrobky. Tato metoda je ve světě využívána hlavně v mikrobiologii, ale její využití pro identifikaci potravin je minimální.

6. Seznam použité literatury

- Akhatova, D., Zdeňková, K., Koncošová, M., & Demnerová, K. (2018). Aktuální metody používané pro odhalení falšování masa a masných výrobků. *Chemické listy*, 112(4), 207-214.
- Alamprese, C., Amigo, J. M., Casiraghi, E., & Engelsen, S. B. (2016). Identification and quantification of turkey meat adulteration in fresh, frozen-thawed and cooked minced beef by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. *Meat Science*, 121, 175-181.
- Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of muscle foods*, 17(2), 214-220.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2009). *Ganong's review of medical physiology*. New York: McGraw-Hill Education. ISBN 978-0-07-184897-8.
- Bezpečnost potravin A-Z*. (©2018). [online]. [cit. 4. 12. 2018]. Dostupnost na webu: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92263.aspx>
- Bucek, P., Kölbl, M., Milerski, M., Pindřák, A., Mareš, V., Wolf, J., & Kuchtík, J. (2007). *Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2006*. Praha: Českomoravská společnost chovatelů, a. s., SCHOK v ČR. ISBN 978-80-904131-1-5.
- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001). Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poultry Science*, 80(4), 522-524.
- Čížková, H., Ševčík, R., Rajchl, A., Pivoňka, J., & Voldřich, M. (2012). Trendy v autenticitě potravin a v přístupu k detekci falšování. *Chemické listy*, 106, 903-910.
- Duchoň, J. (1985). *Lékařská chemie a biochemie: Učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum.
- Dvořák, Z. (1987). *Nutriční hodnocení masa jatečných zvířat*. Praha: SNTL.
- Ebbehøj, K. F., & Thomsen, P. D. (1991). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science*, 30(3), 221-234.
- Flaudrops, C., Armstrong, N., Raoult, D., & Chabrière, E. (2015). Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS. *Journal of Food Composition Analysis*, 41, 104-112.
- Fletcher, D. L. (2002). Poultry meat quality. *World's Poultry Science Journal*, 58(2), 131-145.
- Forejtek, P., Vodňanský, M., Winkelmayer, R., Paulsen, P., Rajský, D., Malena, M., & Zedka, H. (2009). *Hygiena zvěřiny, příručka pro mysliveckou praxi*. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře, o. p. s., Institut ekologie zvěře Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. ISBN 80-7305-523-6.
- Fuchs, E. (1995). Keratins and the skin. *Annual review of cell developmental biology*, 11(1), 123-154.
- Guerrero, A., Velandia Valero, M., Campo, M. M., & Sañudo, C. (2013). Some factors that affect ruminant meat quality: from the farm to the fork. Review. *Animal Science*, 35(4), 335-347.
- Horcada, A., Beriain, M. J., Purroy, A., Lizaso, G., & Chasco, J. (1998). Effect of sex on meat quality of Spanish lamb breeds (Lacha and Rasa Aragonesa). *Animal Science*, 67(3), 541-547.
- Hrbek, J. (2017). *Spotřeba potravin* [online]. [cit. 20. 10. 2018]. Dostupnost na webu: <https://www.czso.cz/csu/czso/masa-jime-o-polovinu-vic-nez-drive>
- Hui, Y. H. (2012). *Handbook of meat and meat processing*. USA: CRC press. ISBN 1439836833.
- Ilavarasan, R., Abraham, R. J., Rao, V. A., Ruban, S. W., & Ramani, R. (2016). Effect of age on meat quality characteristics and nutritional composition of Toda Buffalo. *Buffalo Bulletin*, 35(2), 215-224.

- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Loshier, C., Fischer, G., Busch, U., & Huber, I. (2015). A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food chemistry*, 169, 305-313.
- Jolliffe, I. (2011). Principal component analysis. In *International encyclopedia of statistical science* (pp. 1094-1096). Berlin: Springer. ISBN 978-0-387-22440-4.
- Jůzl, M., & Müllerová, M. (2017). Hovězí maso. *Výživa a potraviny*, 100-104.
- Kerry, J. P., Kerry, J. F., & Ledward, D. (2002). *Meat processing: improving quality*. Elsevier. ISBN 1855736667.
- Kodíček, M. (2004). *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 807080551X.
- Kuchtík, J., & Horák, F. (2014). Effect of breed and different crossbreeds of lambs males on meat quality. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55(4), 37-42.
- Lees, M. (2003). *Food authenticity and traceability*. Elsevier. ISBN 1855737183.
- Machová, J. (2016). *Biologie člověka pro učitele*. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 8024633574.
- Martínková, J. (2007). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 802471356X.
- Mates, F. (2015). *Drůbeží maso a drůbeží masné výrobky*. (Jak poznáme kvalitu? ed.). Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú. a Potravinářská komora ČR v rámci priorit České technologické platformy pro potraviny. ISBN 978-80-87719-27-5.
- Medzihradzsky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L., & Burlingame, A. L. (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 72(3), 552-558.
- Millipore. (2005). *User guide reversed-phase ZipTip* [online]. [cit. 2. 1. 2019]. Dostupnost na webu: <http://personal.rhul.ac.uk/upba/211/Zip-tip.pdf>
- Ministerstvo zemědělství. (2004). *Faktory ovlivňující jakost vepřového masa* [online]. [cit. 4. 12. 2018]. Dostupnost na webu: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/faktory-ovlivnujici-jakost-veproveho-masa.aspx>
- Mohanty, T. R., Park, K. M., Pramod, A. B., Kim, J. H., Choe, H. S., & Hwang, I. H. (2010). Molecular and biological factors affecting skeletal muscle cells after slaughtering and their impact on meat quality. A mini-review. *Journal of muscle foods*, 21(1), 51-78.
- Montowska, M., & Pospiech, E. (2013). Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. *Food chemistry*, 136(3-4), 1461-1469.
- Novák, F. (2002). *Úvod do klinické biochemie*. Praha: Karolinum. ISBN 8024603667.
- Nuernberg, K., Dannenberger, D., Nuernberg, G., Ender, K., Voigt, J., & Richardson, R. I. (2005). Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science*, 94(1-2), 137-147.
- Odstrčil, J., & Odstrčilová, M. (2006). *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů.
- Peterková, P., & Lapčík, L. (2000). Kolagen-vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*, 94, 371-379.
- Pizingerová, K., Fremuth, J., Šašek, L., Sýkora, J., Černá, Z., & Hrušková, A. J. P. p. p. (2011). Akutní methemoglobinemie—závažná alimentární intoxikace zeleninou koupenou na trhu. *Pediatric pro praxi*, 12(4), 267 - 269.

- Rubert, J., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2015). Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food—a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32(10), 1685-1708.
- Seman, D. L., Boler, D. D., Carr, C. C., Dikeman, M. E., Owens, C. M., Keeton, J. T., & Powell, T. H. (2018). Meat Science Lexicon. 2(1), 127-141.
- Simeonovová, J., Míková, K., Kubišová, S., & Ingr, I. (1999). *Technologie drůbeže vajec a minoritních živočišných produktů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-405-8.
- Sklenák, L. (2005). *Preparativní a separační metody* [Studijní text]. [cit. 30.12. 2018]. Dostupnost na webu: <http://artemis.osu.cz/mbf1p/mbf1p.pdf>
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2000). *Food composition and nutrition tables*. Medpharm GmbH Scientific Publishers. ISBN 3887630769.
- Steinhauser, L. (1995). *Hygiena a technologie masa*. Brno LAST. ISBN 8090026044.
- Šípek, A. (2015). *Genetika-biologie* [online]. [cit. 20. 12. 2018]. Dostupnost na webu: <http://www.genetika-biologie.cz>
- Šubrt, J., Filipčík, R., Bjelka, M., Dračková, E., Dufek, A., Nováková, K., & Homola, M. (2009). Kvalita masa z pohledu konzumenta. *Zootechnické aspekty chovu masného skotu*, (pp. 21-32).
- Tinbergen, B. J., & Slump, P. (1976). The detection of chicken meat in meat products by means of the anserine/carnosine ratio. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 161(1), 7-11.
- Tůmová, E., Hrstka, Z., & Chodová, D. (2013). Rozdíly ve složení masa králíků a nutrií *Nové směry v intenzivních a zájmových chovech králíků*, (pp. 107-111). Praha: Česká zemědělská univerzita.
- Tůmová, E., Chodová, D., & Hrstka, Z. (2013). *Hodnocení masné užitkovosti nutrií* Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2426-8.
- Vacek, Z. (1996). *Histologie a histologická technika Díl I.* . Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví: ISBN 80-7013-201-9.
- Vališ, L. (2017). *Situační a výhledová zpráva - vepřové maso* [online]. [cit. 15. 12. 2018]. Dostupnost na webu: http://eagri.cz/public/web/file/554570/Situační_a_vyhledová_zpráva_Vepřové_maso_21017.pdf
- Velíšek, J. (2002a). *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS. ISBN 80-86659-01-1.
- Velíšek, J. (2002b). *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS. ISBN 80-86659-01-1.
- Widmaier, E. P., Raff, H., & Strang, K. T. (2006). *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-1-259-29409-9.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR– RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(4), 1350-1355.
- Záruba, K. (2016). *Analytická chemie 1. díl*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 8070809515.
- Ženíšková, H., & Gall, V. (2007). *Situační a výhledová zpráva ryby* [online]. [cit. 15. 12. 2018]. Dostupnost na webu: http://eagri.cz/public/web/file/138731/RYBY_2011.pdf
- Žídek, L. (2010). *Strukturní biochemie* [elektronická skripta]. [cit. 5. 11. 2018]. Dostupnost na webu: <http://www.ncbr.muni.cz/~lzidek/C9530/skripta.pdf>

7. Seznam použitých zkratk

ATP	Adenosin trifosfát (Adenosinetriphosphate)
DFD	Tmavé, tuhé a suché maso (dark, firm, dry)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5-dihydroxybenzoic acid)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzymový imunologický test (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě (High Density Lipoprotein)
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (Low Density Lipoprotein)
MALDI-TOF	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight)
MIR	Střední infračervená spektroskopie (Medium Infra-Red)
NIR	Blízká infračervená spektroskopie (Near Infra-Red)
PCA	Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PCR - RFLP	Polymorfismus délky řetězových fragmentů (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism)
pH	Potenciál vodíku (Potential of Hydrogen)
PSE	Bledé, měkké, vodnaté maso (Pale, soft, exudative)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

	(Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribionucleic acid)
WHC	Schopnost zadržet vodu (Water Holding Capacity)