

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Využití hmotnostní spektrometrie při proteinové analýze vybraných
skořápkových plodů

Protein analysis of selected nuts by mass spectrometry

Lucie Kadeřábková

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

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor: B BI-CH

Odevzdáním této bakalářské práce na téma *Využití hmotnostní spektrometrie při proteinové analýze vybraných skořápkových plodů* 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. 2022

.....
Podpis autorky práce

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala paní doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za její odborné vedení, vstřícnost a cenné rady, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Mé poděkování také patří paní Ing. Tatianě Smirnové za její ochotu, čas a pomoc s převedením souborů do vhodného formátu pro následné vyhodnocení. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D., za provedení analýzy proteinového složení pomocí LC-MS/MS. Poděkování rovněž patří panu Ing. Romanu Kirgovi za technickou podporu a pomoc při zpracování dat v prostředí databázového systému. Nakonec děkuji svým nejbližším, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zdali je možné odlišit od sebe vybrané skořápkové plody za pomoci hmotnostně spektrometrických technik využívaných při proteinové analýze. Teoretická část shrnuje dostupné poznatky týkající se tématu skořápkových plodů počínaje rostlinnou morfologií, systematikou a výživovým složením. Dále jsou uváděny benefity a rizika konzumace, přičemž je tato část zakončena obecněji analytickými metodami používanými pro identifikaci proteinů, doplněné o konkrétní studie z oblasti výzkumu skořápkových plodů.

Experimentální část již výhradně reflektuje proteinové složení skořápkových plodů. Pro tuto bakalářskou práci bylo připraveno jedenáct druhů různých skořápkových plodů. Ty byly přichystány pro analýzu v jemně mleté podobě a proteiny v nich byly ponechány štěpit enzymem trypsinem. Pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) byla získána spektra jednotlivých vzorků. Data byla poté vyhodnocována pomocí PCA (Principal Component Analysis), jejímž cílem bylo zjednodušit pohled na získaná spektra a umožnit snazší porovnání mezi sebou. Rozlišení na základě PCA analýzy bylo úspěšné, proto byla spektra dále posuzována s cílem získat unikátní hodnoty m/z pro každý plod, což se rovněž podařilo. Následně byly tyto výsledky doplněny o specifitější metodu hmotnostní spektrometrie LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight). Ta umožnila nalezení typických peptidů a určit tak proteiny obsažené ve vzorcích skořápkových plodů.

Získané výsledky by mohly posloužit při bližším studiu rostlinných proteinů v botanice, potenciál by mohl mít výzkum nalezených proteinů jakožto alergenů. Dále by mohly být získané výsledky využity pro identifikaci proteinů rostlinného původu obsažených v některých průmyslově zpracovaných potravinách a napomoci i při odhalování falšování potravin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hmotnostní spektrometrie, skořápkové plody, proteiny, analýza hlavních komponent

ABSTRACT

This bachelor thesis investigates the possibility of differentiation of certain kinds of nuts with the help of mass spectrometry used in protein analysis. The theoretical part provides an overview of nuts – their morphology, systematics, and their nutritional value. It also reports on the benefits and risks of their consumption. The theoretical part concludes with analytic methods for protein analysis in general and touches on specific studies related to the research of nuts.

The experimental part solely reflects on the protein composition of nuts. Eleven different samples of nuts were used, the specimens were very finely ground, and their proteins were broken down by the enzyme trypsin. Afterwards with the use of mass spectrometry MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) mass spectrum of each sample was obtained. These spectra were later analysed with the use of PCA (Principal Component Analysis) to simplify them for easier comparison. The PCA based comparison was successful, therefore further evaluation was conducted. A next goal was to obtain unique m/z values for each nut that was also successful. In addition, a more specific method of mass spectrometry LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight) was able to identify typical peptides. These peptides determined proteins contained in samples.

All findings are applicable for further research into plant proteins in botany. There is also a potential for a study of found proteins as possible allergens. All outcomes of this thesis could be used for the identification of plant-based proteins in certain processed food and possible exposure of counterfeit food.

KEYWORDS

Mass spectrometry, nuts, proteins, principal component analysis

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	9
1.1 Semenné rostliny	9
1.1.1 Evoluce semenných rostlin	9
1.1.2 Typické znaky semenných rostlin	10
1.2 Skořápkové plody	12
1.3 Charakteristika a zařazení zkoumaných skořápkových plodů	13
1.3.1 Arašídny (burské oříšky)	14
1.3.2 Kešu ořechy	14
1.3.3 Kokosový ořech	15
1.3.4 Lískové ořechy	16
1.3.5 Makadamové ořechy	16
1.3.6 Mandle	17
1.3.7 Para ořechy	18
1.3.8 Pekanové ořechy	19
1.3.9 Piniové oříšky	20
1.3.10 Pistácie	21
1.3.11 Vlašské ořechy	21
1.4 Chemické složení skořápkových plodů	22
1.4.1 Bílkoviny	25
1.4.2 Lipidy	26
1.4.3 Sacharidy	26
1.4.4 Vitamíny a minerální látky	27
1.5 Postavení skořápkových plodů ve výživě a zdravotní benefity	29

1.6	Rizika spojená s konzumací.....	31
1.7	Rizika spojená s nevhodným uchováváním a zpracováním	34
1.8	Analytické metody vyžívané k identifikaci bílkovin ve skořápkových plodech ..	37
1.8.1	Enzymová imunoanalýza (ELISA).....	38
1.8.2	Dvoudimenzionální elektroforéza (2D-PAGE).....	39
1.8.3	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)	39
1.8.4	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	40
1.9	Analýza hlavních komponent (PCA).....	42
2	Experimentální část	43
2.1	Používané chemikálie a vybavení.....	43
2.2	Příprava plodů a jejich zpracování.....	44
2.3	Vážení vzorků	46
2.4	Příprava roztoků potřebných k analýze	47
2.5	Enzymatické štěpení trypsinem	48
2.6	Purifikace na reverzní fázi	49
2.7	Měření na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF	49
2.8	Vyhodnocení hmotnostních spekter.....	51
3	Výsledky a diskuze.....	52
3.1	Rozlišení skořápkových plodů na základě vyhodnocení z PCA.....	53
3.2	Vyhodnocení dat v mMass s následným databázovým zpracováním.....	60
3.3	Výsledky vyplývající z měření pomocí metody LC-MS/MS	69
	Závěr.....	75
	Seznam použitých zkratk	77
	Seznam použité literatury	79
	Přílohy	I

Úvod

Skořápkové plody jsou v naprosté většině semena odpovídajících rostlin. Ta jsou důležitým prostředkem pro rozmnožování, následné klíčení a růst rostliny. Semena jsou mimo jiné velmi energeticky bohatá, přičemž největší podíl tvoří lipidy. Tuky jsou metabolicky odbourávány za vzniku energie, jež umožní ono klíčení a následný růst rostliny. Jelikož jsou semena energeticky, a tedy i nutričně vydatná, tak mají své důležité místo ve výživě člověka. Skořápkové plody představují potraviny obsahující veliké množství esenciálních mastných kyselin, aminokyselin, celou řadu minerálů a vitamínů. V návaznosti na to se lze někdy setkat s termínem „superpotravina“. Označení pochází spíše z marketingového světa, ale z výživového hlediska s tím lze skořápkové plody do určité míry ztotožnit. Ačkoli mohou být takto označovány, s jejich konzumací souvisí i určitá rizika, z nichž největší význam mají alergické reakce.

S ohledem na rostoucí počty pacientů trpících alergiemi, které vyvolávají alergeny proteinového původu, je experimentální část této práce věnována výhradně proteinům. Hlavním cílem práce je zjistit, zda mohou být skořápkové plody od sebe rozlišeny na základě proteinového složení. Při řešení tohoto problému bylo zkoumáno celkem jedenáct skořápkových plodů (arašídů, kešu, kokos, lískové ořechy, makadamové ořechy, mandle, para ořechy, pekanové ořechy, piniové oříšky, pistácie a vlašské ořechy) pomocí dvou technik hmotnostní spektrometrie. První zvolenou technikou je hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) s následným vyhodnocením pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Druhá technika je charakteru kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS (Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry), jež je citlivější metodou s možností poskytnout detailnější data. Zjištění by mohla být využita v případě analýzy výrobků ze skořápkových plodů, s možností zaměřit se na alergeny.

Cílem této práce je tedy ověřit, zda je možné provést analýzu proteinů zvolenými metodami, eventuálně navrhnout její úpravy či zvolit postup zcela odlišný. Při řešení by mohla nastat komplikace z hlediska hydrofobního charakteru vzorků. Vysoký obsah lipidů by teoreticky mohl bránit ve štěpení proteinů, s ohledem na používaný štěpící enzym trypsin, jenž je rozpustný ve vodném prostředí.

1 Teoretická část

1.1 Semenné rostliny

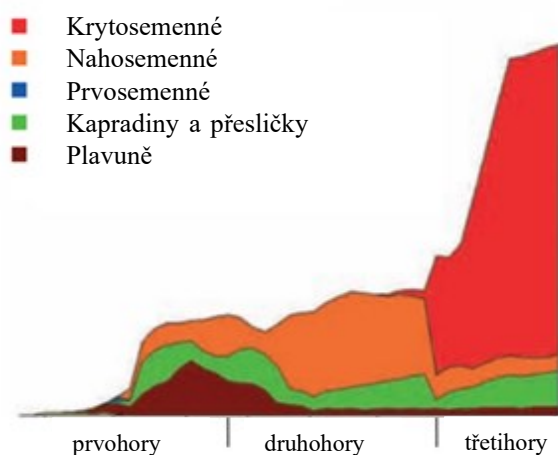
Semenné rostliny (*Spermatophyta*) představují nejpočetnější skupinu v systému vyšších rostlin (*Embryophyta*), pro něž je charakteristické tělo diferencované v jednotlivé rostlinné orgány (Hendrych, 1986). Ačkoli rostlinná taxonomie stále podléhá změnám, kladistickým a molekulárním výzkumům, tak některá členění na nejvyšších úrovních začínají mít svá jasnější postavení (Hrouda, 2007). Jeden z novějších a plně dostupných pohledů na systematiku je k dispozici ve zpracované klasifikaci organismů od kolektivu autorů Ruggiero *et al.* (2015). Zde jsou zpracována jednotlivá taxonomická zařazení pouze do úrovně řádů. Nižší klasifikační kategorie nejsou uváděny, poněvadž například určování příbuznosti na úrovni rodu nemusí být jednoznačné a dostatečně objektivní (Hrouda, 2007). Výzkumy probíhají nadále zejména v oblasti genetických analýz a jejím účelem je postupně vytvářet dostupnou a přehlednou taxonomickou databázi, která by lépe ukotvila moderní biologii s novými možnostmi bádání (Koch *et al.*, 2018).

Název semenné rostliny pramení ze schopnosti produkovat semena tzn., že vykazují nový znak v porovnání s evolučně původnějšími rostlinami, jež se rozmnožují pouze výtrusy (Hendrych, 1986). O tuto skutečnost se postaraly první semenné rostliny přibližně před 300 miliony lety. Na základě toho začal rozvoj rostlinných ekosystémů tak, jak jsou známe v současnosti (Ziegler, 2001).

1.1.1 Evoluce semenných rostlin

Předpokládanými předky semenných rostlin jsou tzv. prvosemenné rostliny (*Progymnospermophyta*). Skupina těchto rostlin i přes svůj název ještě nebyla schopna rozmnožování semeny, ale představují určitý mezník mezi výtrusnými a semennými rostlinami (Willis & McElwain, 2014; Ziegler, 2001). S největší pravděpodobností z nich vzniklo oddělení kapradosemenné rostliny (*Lyginodendrophyta*), které je možné považovat za nejstarší semenné rostliny vůbec. Ačkoli se jedná již o vyhynulou skupinu, tak fosilní nálezy potvrzují tvorbu primitivních semen a vzhled podobající se kapradinám. Tyto rostliny tak pomyslně stojí mezi kapradorosty a nahosemennými rostlinami. (Ziegler, 2001).

Vyhynutí prvosemenných rostlin se událo současně s tzv. velkým vymíráním zemské bioty na konci druhohor. Paleobotanické studie dokonce prokázaly, že vymizela více než polovina tehdejších rostlinných druhů (McElwain & Punyasena, 2007). K této události došlo přibližně před 66 miliony lety (Hashim-Jones, 2020). Následkem toho byla obrovská obměna fauny a flory v třetihorách, přičemž v oblasti flory došlo k nárůstu počtu krytosemenných rostlin (obr. 1) až na 90 % tehdejšího zastoupení rostlin ve veškerých ekosystémech (Ziegler, 2001). Tento trend přetrvává a v současnosti představují evolučně nejpokročilejší krytosemenné rostliny přibližně 97 % veškerých rostlinných druhů (Štech, 2016).



Obrázek 1: Zastoupení jednotlivých skupin cévnatých rostlin v průběhu geologického času (upraveno podle: Štech, 2016, s. 71).

1.1.2 Typické znaky semenných rostlin

Nejdůležitější znak semenných rostlin je patrný již ze samotného názvu, tedy schopnost produkovat semena, která jsou určena k rozmnožování. V souvislosti s tím se hovoří o ještě jedné podstatné události, tj. oplození bez nutnosti vazby na vodní prostředí (Kalina & Váňa, 2005). Dalším charakteristickým znakem semenných (respektive cévnatých) rostlin je přítomnost pokročilejších typů pletiv, zejména pletiv vodivých (Dostál, 2009). S ohledem na postavení semenných rostlin v taxonomii je možné za zásadní znak považovat i plně diferencované tělo (Hendrych, 1986). To je členěno v rostlinné orgány, čímž se odlišují od nižších rostlin a zelených řas, jejichž tělo tvoří obvykle jen stélka (Lewis & McCourt, 2004).

Semenné rostliny se standardně člení na nahosemenné a krytosemenné rostliny (Štech, 2016). Nahosemenné představují většinou dřeviny, jejich tělo je členěno na kořeny, stonek (respektive kmen), listy a šišťice (reprodukční orgány), vajíčka se nachází volně na plodolistech. Krytosemenné rostliny zahrnují dřevinné i bylinné zástupce s závislostí na konkrétním zařazení. Jejich tělo je členěno „klasicky“ na kořeny, stonek (kmen), listy, květy a plody. Vajíčka jsou uložena v pestíku a jsou v něm takříkajíc krytá, odtud pramení název krytosemenné rostliny (Kavina, 1950).

Již výše bylo zmíněno, že se za jeden z charakteristických znaků dá považovat plně diferencované rostlinné tělo. Velmi funkčně důležitou částí těla rostliny je **kořen**, který upevňuje rostlinu v substrátu, přijímá a rozvádí vodu s minerálními látkami, plní zásobní funkci a dále také umožňuje vegetativní rozmnožování (Dostál, 2009). Ve své podstatě je velmi specifický, poněvadž roste pozitivně geotropicky, a zároveň tento růst není omezen. Kořenové systémy tak mohou narůstat do obrovských délek (Slavíková, 2002). Na kořen navazuje **stonek**, který je již nadzemní částí (Kavina, 1950). Mezi jeho hlavní funkce patří zejména vedení živin a vody rostlinným tělem do dalších orgánů. Dřeviny se vyznačují tím, že jejich stonek dřevnatí, nejčastěji jsou v podobě stromu nebo keře, případně polokeře (Dostál, 2009).

Dalším nadzemním orgánem je **list**, jenž vyrůstá ze stonku. Jedná se o část rostliny s nejrozmanitější morfologií, typy a tvary listů se liší čeled' od čeledi (Slavíková, 2002). Největší část listu tvoří listová čepel, jež je potřebná k osvitě a výměně plynů (Kavina, 1950). Nejdůležitější funkcí listu je zajištění fotosyntézy a transpirace (Dostál, 2009). U krytosemenných rostlin jsou některé listy přeměněny v **květ** (Weberling, 1992), který představuje specifický generativní orgán. Na rostlině se častěji však setkáváme s tzv. květenstvím, tedy souborem několika květů (Kavina, 1950). Z květních částí vzniká nakonec **plod**, jehož funkcí je ochrana, dozrávání a rozšiřování semen, tzn. dokončení reprodukce (Dostál, 2009). Plody se s ohledem na vznik z konkrétní květní části dělí na pravé a nepravé. Mezi pravé plody patří mimo jiné peckovice a oříšky (Kavina, 1950), které jsou částečně reprezentovány tzv. skořápkovými plody, jež bývají laicky označovány jako ořechy.

1.2 Skořápkové plody

Skořápkové plody, nepřesně označované jako ořechy, jsou v širším pojetí suché plody nebo semena konkrétních druhů semenných rostlin (Kavina, 1950). Z potravinářského hlediska jsou řazeny k ovoci, jež společně se zeleninou tvoří základní pilíř potravinářského zboží. Pojetí ovoce jakožto potravin se opírá o botanické členění, které je rozšířené například o klimatický aspekt. Mimo základní kategorie (malvice, peckové ovoce, bobuloviny) má samostatnou kategorii např. tropické ovoce anebo tzv. **skořápkové ovoce**, kam patří většina ořechů, respektive skořápkových plodů (Dostálová & Kadlec, 2014).

Suché skořápkové plody bývají ve vyloupaném stavu, případně ještě ve skořápce. Vyloupaná jádra mohou být dále upravována různými způsoby, například pražením (Kadlec *et al.*, 2012). Jednotlivá zařazení skořápkových plodů včetně podoby a požadavků na jakost produktů upravuje vyhláška č. 397/2021 Sb., §11. Dle této vyhlášky by plody neměly být poškozeny bez ohledu na to, zda jsou ještě ve skořápce či ve vyloupaném stavu. Co se skořápkových plodů a výrobků z nich týče, tak nejsou žádoucí mechanická poškození, napadení škůdci ani plísněmi. Zároveň by neměla být přítomna ani povrchová vlhkost, která naznačuje nevhodné uchovávání. Skořápkové plody by taktéž měly vykazovat i adekvátní senzoryckou kvalitu, tj. neměly by zapáchat, a naopak by měly mít svou odpovídající chuť (Dostálová & Kadlec, 2014).

Za velkou vadu produktu jsou považovány chemické změny (zejména žluknutí). U všech skořápkových plodů platí, že jsou velice bohaté na oleje (tuky), které po určitém čase velice snadno a ochotně podléhají chemickým změnám, konkrétně oxidaci (kapitola 1.7 Rizika spojená s nevhodným uchováváním a zpracováním). Z tohoto důvodu je nezbytné při balení skořápkových plodů používat inertní atmosféru nebo tzv. vakuování. Z hlediska obalových materiálů je doporučeno používat fólie obsahující polyamidy nebo obaly s hliníkovou fólií. Používání specifických obalů i ochranných atmosfér při balení zabraňuje pronikání kyslíku k plodům a tím samozřejmě i následné oxidaci (Kadlec *et al.*, 2012).

1.3 Charakteristika a zařazení zkoumaných skořápkových plodů

Skořápkové plody mohou být z potravinářského hlediska řazena velmi různě, většinou se alespoň částečně ctí jejich botanické řazení. Pouze některé skořápkové plody představují skutečně oříšky, většina z nich jsou však jádra peckovin anebo semena odpovídajících rostlin. I přesto bývají skořápkové plody velmi často nepřesně označovány jako ořechy. Z klimatického hlediska se jedná převážně o plody (respektive semena) tropických anebo subtropických druhů rostlin (Valíček, 2002). Následujících jedenáct podkapitol podtrhuje botanické zařazení a rozdíly vybraných skořápkových plodů. Vizuální porovnání zkoumaných skořápkových plodů je zobrazeno na obr. 2. Zároveň jsou plody v podkapitolách 1.3.1 až 1.3.11 charakterizovány po zdravotní a výživové (chemické) stránce. Souhrnný pohled týkající se nutričního hlediska je rovněž zpracován v tab. 1 a 2 (kapitola 1.4 Chemické složení skořápkových plodů).



Obrázek 2: Porovnání tvaru, velikosti a barvy vybraných skořápkových plodů; a – vlašské ořechy, b – kešu ořechy, c – lískové ořechy, d – mandle, e – pistácie, f – arašídy, g – para ořechy, h – pekanové ořechy, i – makadamové ořechy, j – piniové oříšky, k – kokos (foto autor, 2.9.2021).

1.3.1 Arašídny (burské oříšky)

Arašídny představují velmi výjimečné skořápkové plody (obr. 2f), poněvadž spíše připomínají luštěninu. Z výživového hlediska se ale semena podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) více podobají některým ořechům, proto jsou arašídny přiřazovány ke skořápkovým plodům. Podzemnice olejná je rostlinou patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a výjimečnost této rostliny tkví zejména v tom, že její plody včetně semen dozrávají v půdě. Semeník podzemnice nejprve roste vzhůru, ale po několika dnech se jeho směr růstu obrací a postupně prorůstá substrátem (Valíček, 2002). Takto rostoucí semeník se vyvíjí v několikacentimetrové hloubce a tvoří pevný lusk (Moctezuma & Feldman, 1998; Valíček, 2002). Lusk obvykle obsahuje dvě semena, která jsou již známá jako arašídny případně burské oříšky (Valíček, 2002).

Burské oříšky jsou z nutričního hlediska velmi bohaté na tuky (cca polovina hmotnosti) a proteiny, těch obsahuje přibližně 25,8 g na 100 g arašídů (Brufau *et al.*, 2006). Z vitamínů v arašídách nacházíme B₁, B₂, B₃ a B₁₁, dále vitamín C a E, z minerálních látek obsahují vápník a hořčík (Li *et al.*, 2014). Ačkoli se řadí k velmi hodnotným potravinám, částečně se jedná o kontroverzní tvrzení. Arašídny s sebou totiž nesou poměrně vysoké riziko vzniku alergické reakce a bohužel je v tomto případě patrný zvyšující se trend nárůstu alergií v populaci (Burks, 2008). Alergie na arašídny se rozvíjí zejména u dětí a mladistvých (Vander Leek *et al.*, 2000), silné alergické projevy se navíc nevyhýbají ani těm nejmenším dětem. Například kolektivem Keet *et al.* (2021) bylo zjištěno, že rozvoj alergie na arašídny je silná již v kojeneckém věku, přičemž významně souvisí s výskytem ekzémů.

1.3.2 Kešu ořechy

Kešu ořechy jsou plody (nažky) ledvinovitého tvaru (obr. 2b), jedná se o plody ledvinovníku západního (*Anacardium occidentale*). Ten reprezentuje stálezelený strom z čeledi ledviníkovité (*Anacardiaceae*), který průměrně dorůstá až 12 metrů (Ross, 2001; Valíček, 2002). Ledvinovník pochází z polosuchého prostředí Karibiku a severní části Jižní Ameriky (Brazílie), v současnosti je rozšířen napříč tropickým pásem a pěstuje se například i v Asii (Ross, 2001).

Kešu případně kašu ořechy se prezentují jako nutričně bohatá potravina (Valíček, 2002), což samozřejmě souvisí s přirozeností semen, kdy je dostatečné množství zásobních tuků a živin důležité pro klíčení nové rostliny (Kavina, 1950). Kešu tvoří přibližně 46 % své hmotnosti tuky, následují je sacharidy, které zaujímají přibližně třetinu hmotnosti a nejmenší část z makroživin tvoří proteiny v množství cca 18,2 g na 100 g kešu ořechů (Brufau *et al.*, 2006). Dále obsahují vitamíny B₃, C, E a v nižším množství i naprostou většinu ostatních vitamínů řady B. Z minerálů obsahují draslík, hořčík, fosfor, vápník a v nižších koncentracích například i železo nebo zinek (Rico *et al.*, 2016).

1.3.3 Kokosový ořech

Kokosový ořech představuje výjimku mezi skořápkovými plody s ohledem na svou velikost, poněvadž dosahuje průměrně velikosti kolem 20 cm (obr. 2k). Kokos je plodem kulturně významné plodiny palmy kokosové (*Cocos nucifera*), v české systematice se lze také setkat s označením rostliny jako kokosovník ořechoplodý (Kulhavý, 1993; Valíček, 2002). Kokosovník zastupuje tropickou rostlinu z čeledi arekovité (*Areceaceae*) pocházející z oblasti jihovýchodní Asie, odkud byla rozšířena napříč celým tropickým pásem. V některých oblastech (např. Filipíny, Indonésie) jsou palmy pěstovány především z důvodu vývozu do celého světa a výroby dalších kokosových produktů (Valíček, 2002).

Kokos lze zcela jistě také řadit mezi nutričně zajímavé plody. Zralý kokosový ořech je bohatý především na tuky. Z hlediska složení zastupují lipidy přibližně jednu třetinu hmotnosti, sacharidy tvoří pak cca 15 %. Naopak množství proteinů (průměrně 3 g na 100 g kokosu) není příliš vysoké (Agyemang-Yeboah, 2011) a ze všech zkoumaných plodů je dokonce nejnižší. Z mikroživin kokos obsahuje většinu vitamínů řady B a vitamín C, přičemž jsou doplněny minerálními látky. Z těch jsou nejvíce zastoupeny draslík, fosfor, železo, hořčík, vápník a zinek (Agyemang-Yeboah, 2011).

Přestože je kokos podobně jako další ovoce zdraví prospěšný, tak má ze zdravotního hlediska i opačnou stranu. Ačkoli obsahuje poměrně nízké množství proteinů, byl pozorován relativně častý výskyt alergií u malých dětí a kojenců (Vajravijayan *et al.*, 2017). Například v Indii se kokos řadí mezi pět nejčastějších alergenů (Agyemang-Yeboah, 2011).

1.3.4 Lískové ořechy

Lískové ořechy jsou plody lísky obecné (*Corylus avellana*), v tomto případě se jedná skutečně o oříšky (obr. 2c). Líska obecná představuje opadavý keř z čeledi lískovité (*Corylaceae*), vzácně může mít i podobu stromu (Valíček, 2002). Historicky navíc nese značný podíl na vzhledu středoevropské vegetace, kterou začala tvořit po poslední době ledové (Hejný & Slavík, 2003).

Ořechy lísky, naše původní skořápkové plody, netvoří výjimku a patří též mezi nutričně vydatné potraviny. Ty obsahují veliké množství tuků, cca 61 % hmotnosti (Brufau *et al.*, 2006), přičemž se jedná zejména o nenasycené mastné kyseliny, jež díky vyššímu obsahu HDL (High Density Lipoproteins)¹ napomáhají snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění a vzniku aterosklerózy (Alphan *et al.*, 1997; Richardson, 1996). Z hlediska proteinů činí obsah 13,7 g na 100 g plodů (Brufau *et al.*, 2006), což odpovídá průměrnému množství proteinů pro skořápkové plody. Lískové ořechy rovněž představují zdroj důležitých vitamínů, kterými jsou B₁, B₂, B₆ a E, z minerálních látek obsahují železo, draslík, vápník a zinek. S ohledem na obsah draslíku jejich konzumace přispívá k normální nervové a svalové funkci. Železo a vitamín E navíc preventivně působí vůči anemickým stavům (Alphan *et al.*, 1997).

1.3.5 Makadamové ořechy

Makadamové ořechy (obr. 2i) jsou semena plodů makadamie celolisté (*Macadamia integrifolia*). Makadamie celolistá představuje listnatý strom z čeledi proteovité (*Proteaceae*) a zároveň je jednou z mála plodin pocházející z Austrálie, jejíž semena jsou celosvětově poptávána (Stephenson, 2005).

Makadamové ořechy mají velice specifickou nasládlou chuť, čímž se trochu odlišují od ostatních ořechů a skořápkových plodů. Nicméně své místo coby nutričně vydatná potravina mezi skořápkovými plody mají taktéž. Makadamové ořechy obsahují nejvíce tuků ze všech zkoumaných skořápkových plodů (více než 75 % své hmotnosti), poměrné zastoupení

¹ HDL představuje tzv. vysokodenzitní lipoprotein (mající vysokou hustotu). HDL lipoprotein má v souvislosti s vyšší hustotou stabilnější proteinový obal, jenž neucpává cévy lipidy. Z toho důvodu má optimální koncentrace HDL preventivní charakter vůči kardiovaskulárním chorobám (Velíšek, 2002a).

proteinů je naopak jedno z nižších, a to kolem 8 % hmotnosti (Brufau *et al.*, 2006). Z hlediska obsahu bílkovin tedy nejsou makadamové ořechy nejvýznamnější, obsahují pouze menší množství některých esenciálních aminokyselin. Na druhou stranu ale obsahují celou řadu mikroživin jako draslík, fosfor, hořčík, vápník, v menším množství také železo, zinek, měď a selen (Moodley *et al.*, 2007; Wood & Garg, 2011). Z vitamínů obsahují především vitamíny řady B, dále vitamín C a E (Wood & Garg, 2011).

Vzhledem k vysokému zastoupení tuků a zejména nenasycených mastných kyselin se makadamové ořechy ukazují být příznivou potravinou v prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním (Brufau *et al.*, 2006; Garg *et al.*, 2007). V rámci studie, kterou publikoval kolektiv autorů Garg *et al.* (2007), byly účinky ořechů testovány na skupině pacientů s vyšší hodnotou cholesterolu v krvi. Pacienti konzumovali makadamové ořechy po dobu čtyř týdnů v množství odpovídající cca 15 % svého denního energetického příjmu (Garg *et al.*, 2007). Výsledek studie přinesl data, že konzumace předepsaného množství pozitivně zapůsobila na srdce, tepny a napomohla k odbourávání tzv. oxidativního stresu². Překvapujícím výsledkem této studie je také příznivý efekt na zánětlivá onemocnění v těle a snížení rizika vzniku trombózy (Garg *et al.*, 2007; Wood & Garg, 2011). I přes dobré účinky vůči některým onemocněním má konzumace, podobně jako u ostatních skořápkových plodů, určité riziko vzniku alergií zejména u dětí a mladistvých (Wood & Garg, 2011).

1.3.6 Mandle

Mandle představují poměrně velká jádra (obr. 2d) semen mandloně obecné (*Prunus dulcis*), jádra mají lehce zploštělý kuželovitý tvar. Mandloň obecná reprezentuje subtropickou dřevinu z čeledi růžovité (*Rosaceae*). Obvykle se jedná o desetimetrovou opadavou dřevinu, jež pochází ze střední Asie, ale v současnosti je pěstována i ve Středomoří (Rada & Steinbach, 1997; Valíček, 2002). Plodem mandloně je peckovice, jež má uvnitř pecku obsahující semeno a až jádra semen jsou lidmi konzumované mandle. U nás může být rovněž pěstována, většinou ale pouze pro okrasu, poněvadž je v našich zeměpisných šířkách silně

² Oxidativní stres je způsoben nerovnováhou mezi volnými radikály a antioxidanty na úrovni buňky. Buňka v takovém případě není dostatečně ochráněna a tento stav bývá často spojován s mnoha onemocněními; např. kardiovaskulárními onemocněními, rakovinou nebo diabetem (Nohel *et al.*, 2011).

ohrožena jarními mrazy (Rada & Steinbach, 1997). Mandloní existuje celá řada druhů a kultivarů, ty lze členit podle charakteru mandlí na sladké a hořké (Valíček, 2002). Sladké mandle se obvykle konzumují přímo anebo se z nich vyrábí různé sladkosti. Hořké mandle našly své využití především v průmyslu a lékařství pro svůj obsah kyanovodíku (Rada & Steinbach, 1997).

Výživově se jedná o hodnotnou potravinu, zhruba polovinu hmotnosti mandlí tvoří tuky a kolem 20 % hmotnosti bílkoviny (Rada & Steinbach, 1997). Poměr makronutrientů je samozřejmě závislý na konkrétní odrůdě mandloně. Z hlediska mikroživinového složení mandle obsahují vitamíny B₂, B₃ a E, dále pak železo, vápník, hořčík, draslík a zinek (Yada *et al.*, 2013).

Konzumace mandlí může být i tak po zdravotní stránce ambivalentní, podobně jako ostatní plody přináší prevenci v srdečních chorobách, nicméně souvisí také s rozvojem alergií. V souvislosti s jejich rozvojem je zásadní proteinové složení mandlí, to je tvořeno přibližně ze 75 % globuliny. Nejvíce je v mandlích zastoupen tzv. amandin, hlavní globulin, někdy označovaný jako „almond major protein“ (Yada *et al.*, 2011). Tento protein se skládá ze dvou hlavních polypeptidových řetězců (pruninu-1, pruninu-2), které jsou navzájem propojeny disulfidickými vazbami, a navíc doplněny několika menšími polypeptidy (Sathe *et al.*, 2002; Tengchuan *et al.*, 2009). Přestože se jedná o hodnotný protein pro rostlinu samotnou, tak pro konzumaci představuje alergen, jež patří do jedné z hlavních alergenních skupin (Tengchuan *et al.*, 2009).

1.3.7 Para ořechy

Para ořechy, někdy označovány jako brazilské ořechy, jsou jádra semen (obr. 2g) juvie ztepilé (*Bertholletia excelsa*). Juvie ztepilá reprezentuje velmi vysoký strom z čeledi hrnečnickovité (*Lecythidaceae*), vyskytující se v oblastech amazonských deštných lesů (Mori & Prance, 1990). Zajímavé je, že juvie není příliš cíleně vysazována, a tak veškerá produkce tzv. brazilských ořechů pochází z planě rostoucích stromů (Valíček, 2002). Plody juvie připomínají kokosové ořechy, ovšem uvnitř plodů jsou semena, tvarově podobající se větším mandlím. Uvnitř každého semene se nachází jádra, jež jsou konzumována právě jako para ořechy (Valíček, 2002).

Podobně jako ostatní již zmíněné skořápkové plody jsou para ořechy vysokoenergetické potraviny obsahující především velké množství tuků (Cardoso *et al.*, 2017). Procento tuků dosahuje až 70 % hmotnosti, podíl bílkovin se pohybuje běžně kolem 15 % (Valíček, 2002). Polovina obsažených tuků patří do skupiny tzv. nenasycených mastných kyselin, jež napomáhají ke zvyšování hladiny HDL, a naopak snižování LDL (Low Density Lipoproteins)³.

Kolektiv Silva *et al.* (2019) uvádí několik studií, v nichž bylo potvrzeno, že pravidelná konzumace snižuje riziko aterosklerózy např. u obézních pacientů anebo u pacientů na hemodialýze. Co se dalšího složení týče, tak para ořechy zahrnují hořčík, zinek, fosfor, vápník, měď, draslík, železo a nejvíce dominující selen. Dále obsahují vitamíny A, B₁, B₃, E a antioxidanty (Cardoso *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019).

1.3.8 Pekanové ořechy

Pekanové ořechy se lehce podobají ořechům vlašským, jsou ale menší, měkčí a trochu protáhlejší (obr. 2h). Jedná se konkrétně o jádra ořechovce pekanového (*Carya illinoensis*), tento druh reprezentuje amerického příbuzného našeho ořešáku z čeledi ořešákovité (*Juglandaceae*). Ořechovec je takéž jako ořešák mohutný strom, který dosahuje výšky až 30 metrů (Horáček, 2007; Valíček, 2002). Plody ořechovce jsou peckovice s tvrdším oplodím a někdy bývají označovány jako tzv. americké ořechy (puma ořechy). Uvnitř pecky se nachází jádra známá coby pekany (Valíček, 2002).

Z výživového hlediska jsou na tom pekany obdobně jako ostatní plody. Průměrně ořechy obsahují 70 % lipidů ze své hmotnosti (Venkatachalam *et al.*, 2007). Na základě vysokého procenta tuku již nepozorujeme příliš vysoký podíl proteinů (cca 10 %), ačkoli se zdá, jakkoliv toto číslo nízké, tak cca jedna třetina proteinů tvoří tzv. esenciální aminokyseliny, které si lidský organismus nedokáže syntetizovat sám (Svačina *et al.*, 2008; Venkatachalam *et al.*, 2008). Z hlediska proteinového složení je patrná podobnost s vlašskými ořechy,

³ LDL představuje tzv. nízkokodenzitní lipoprotein (mající nižší hustotu). Jeho vyšší hladina je zodpovědná za ukládání cholesterolu do tkání v organismu. LDL nemá kolem sebe natolik stabilní proteinový obal, a tak se z něho snadno odloučí lipidy, které jsou zodpovědné za rozvoj kardiovaskulárních problémů (Velíšek, 2002a).

největší díl zaujímají gluteliny, dále globuliny a v menším množství i albuminy (Venkatachalam *et al.*, 2008). Kromě výše uvedeného obsahují samozřejmě mikroživiny, největší zastoupení mají vápník, fosfor, hořčík, draslík, zinek nebo mangan (Gardea *et al.*, 2011; Ortiz-Quezada *et al.*, 2011). Ani z hlediska vitamínů nejsou pekanové ořechy ochuzeny, obsahují vitamín A, většinu řady vitamínů B a vitamín E (Ortiz-Quezada *et al.*, 2011).

1.3.9 Piniové oříšky

Piniové oříšky jsou velmi drobná semínka (obr. 2j) borovice pinie (*Pinus pinea*), jež představuje jehličnatý strom z čeledi borovicovité (*Pinaceae*). Jedná o středomořský druh borovice, který dorůstá průměrně 20 metrů. Habitus pinie připomíná deštník, kdy z vysokého rovného kmene vyrůstá rozsáhlá klenutá koruna (Hieke, 2008). Mimo středomoří je hojně pěstována například v Turecku, kde roste na několika tisících hektarech půdy. Kromě splnění ekologické hodnoty má zde především svůj ekonomický význam (Varol & Tatli, 2002). Poněvadž se jedná o jehličnan, tak jejím rozmnožovacím orgánem je šištice. Každá šištice po dozrání obsahuje kolem stovky semínek, která ale dozrávají přibližně tři roky od opylení (Hieke, 2008). Patrně z těchto důvodů jsou piniové oříšky v porovnání s ostatními skořápkovými plody na trhu výrazně dražší.

Přestože se jedná o semínka jehličnatého stromu, tak z nutričního pohledu nepředstavují výjimku mezi skořápkovými plody. Z hlediska složení i u piniových oříšků dominují tuky (přibližně 61 g na 100 g oříšků), proteiny tvoří asi 11 % hmotnosti semínek. Dále v rámci svého složení obsahují vitamíny A, B₁, B₂ a C. A z minerálů v piniových oříšcích dominuje vápník, zinek, draslík, železo a měď (Cabanillas & Novak, 2015; Lutz *et al.*, 2017).

Ačkoli proteinové zastoupení není nejvyšší, tak v souvislosti s piniovými oříšky se diskutují alergické projevy podobně jako u arašídů. Ve svém proteinovém složení se nachází mimo jiné 2S albuminy, což jsou velice odolné proteiny vůči extrémním podmínkám (zejména vůči teplotě a pH), proto jsou spojovány s vážnými alergickými projevy (Cabanillas & Novak, 2015).

1.3.10 Pistácie

Pistácie jsou semena (obr. 2e) rostliny pistácie pravé (*Pistacia vera*). Pistácie pravá představuje nižší strom případně větší keř z čeledi ledviníkovité (*Anacardiaceae*). Pistácii, podle autorů Rady & Steinbacha (1997) v české systematice označovanou také jako řečík pistáciový, řadíme mezi teplomilné dřeviny. Plody jsou peckovice elipsoidního tvaru a uvnitř se nachází semena pistácie. Loupané pistácie jsou příznačně zelené, proto jsou někdy nazývány coby zelené mandle (Valíček, 2002). A podobně jako mandle se konzumují přímo, pražené nebo zpracované v rámci různých pochutin (Rada & Steinbach, 1997; Valíček, 2002).

Pistácie se opět řadí k velmi výživově hodnotným potravinám, navíc s sebou nesou historickou tradici jako prevence proti celé řadě zdravotních potíží (Dreher, 2012). Tyto skořápkové plody obsahují ze své hmotnosti cca 44 % tuků a 20 % proteinů (Brufau *et al.*, 2006). Zásadnější roli mají opět tuky, a to v podobě prevence srdečních chorob. Nenasycené mastné kyseliny napomáhají ke zvýšení a udržení optimální hladiny HDL lipoproteinu (Dreher, 2012). Naopak v případě LDL bylo například v rámci studie, publikované kolektivem Baer *et al.* (2012), pozorováno jeho snížení již po třech týdnech pravidelné konzumace pistácií. Mimo jiné obsahují vitamín E a K (Dreher, 2012), minerální obsah pak tvoří měď, hořčík, sodík a draslík, který významně dominuje. Výrazný podíl draslíku může při pravidelné konzumaci přispívat k optimální hladině krevního tlaku u hypertenzních pacientů (Dreher, 2012; Küçüköner & Yurt, 2003).

1.3.11 Vlašské ořechy

Vlašské ořechy představují nejvíce světově konzumovaný druh skořápkových plodů (Hayes *et al.*, 2016). Jedná se o peckovice, nicméně konzumují se až vyloupaná jádra ze skořápky (obr. 2a) ořešáku královského (*Juglans regia*). Ořešák je mohutná dřevina z čeledi ořešákovité (*Juglandaceae*). Je především plodinou mírného pásu, ale roste i v mnoha subtropických oblastech (Valíček, 2002).

Vzhledem ke svému postavení mezi skořápkovými plody taktéž reprezentují nutričně bohatou potravinu, přibližně 65 % hmotnosti tvoří tuky (v podobě nasycených i nenasycených mastných kyselin). Vyzdvihovány jsou v jejich kontextu zejména omega-3

mastné kyseliny, jež pozitivně působí v případě neurologických onemocnění (např. Alzheimerovy choroby) a diskutují se také pozitivní účinky na projevy epilepsie. Celkově totiž zlepšují psychiku, paměť, kognitivní a motorické funkce mozku u dětí i dospělých (Hayes *et al.*, 2016). Ořechy jsou také bohaté na proteiny, jejichž množství se pohybuje kolem 26 % z celkové hmotnosti (Brufau *et al.*, 2006), přičemž proteinový profil se podobá již zmíněným pekanovým ořechům. Největší podíl zauímají gluteliny, následované albuminy a globuliny. Z hlediska mikroživin ořechy obsahují ve stopovém množství celou řadu antioxidantů a vitamínů: B₁, B₂, B₆ a E. Z minerálních látek zahrnují například hořčík, draslík, fosfor a železo (Sze-Tao & Sathe, 2000).

1.4 Chemické složení skořápkových plodů

Chemické složení skořápkových plodů je samozřejmě zcela závislé na konkrétním druhu. Složení je ale také závislé na lokalitě a kvalitě půdy, kde byla plodina pěstována, proto se mohou hodnoty s ohledem na původ či zpracovatele mírně odlišovat.

Poněvadž se jedná o plody, semena rostlin či jejich jádra, tak v jejich složení dominují zejména tuky, což je dáno tím, že ze semene by měla být schopna vyklíčit životaschopná rostlina (Kavina, 1950). Společně s nimi mají ochrannou a vyživující funkci při růstu rostliny také zásobní proteiny (Tengchuan *et al.*, 2009).

Celkový podíl tuků, bílkovin a sacharidů, jako základních makroživin, je uveden v tab. 1 pro každý druh zvlášť. Jedná se vždy o počet gramů na 100 g plodů, zbývající množství tvoří vláknina a mikroživiny (Brufau *et al.*, 2006). V případě kokosu významný podíl hmotnosti tvoří také voda (Agyemang-Yeboah, 2011).

Tabulka 1: Zastoupení základních makroživin v gramech na 100 g skořápkových plodů.

Druh skořápkového plodu	Zastoupení makroživin (v gramech na 100 g)		
	Lipidy	Bílkoviny	Sacharidy
Arašídý ^a	49,2	25,8	16,1
Kešu ořechy ^a	46,4	18,2	30,2
Kokos (čerstvý) ^b	33,5	3,0	15,2
Lískové ořechy ^a	60,8	13,7	17,0
Makadamové ořechy ^a	75,8	7,9	13,8
Mandle ^a	50,6	21,9	19,9
Para ořechy ^a	66,4	14,3	12,3
Pekanové ořechy ^a	72,0	9,2	13,9
Piniové oříšky ^a	61,0	11,6	19,3
Pistácie ^a	44,4	20,6	28,0
Vlašské ořechy ^a	65,2	26,1	9,9

(Pozn. zdroje: ^a Brufau *et al.*, 2006; ^b Agyemang-Yeboah, 2011).

Z hlediska mikroživin jsou skořápkové plody velice bohaté na vitamíny a minerální látky, přičemž výskyt jednotlivých mikroživin s ohledem na konkrétní druh je zpracován v níže uvedené tabulce 2.

Tabulka 2: Výskyt konkrétních mikroživin ve složení skořápkových plodů.

Druh skořápkového plodu	Obsah mikroživin	
	Vitamíny	Minerální látky
Arašídý ^a	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₁₁ , C a E	Ca, Mg
Kešu ořechy ^b	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₈ , B ₉ , B ₁₂ , C, E a K	Ca, Fe, K, Mg, P, Zn
Kokos ^c	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₉ a C	Ca, Fe, K, Mg, P, Zn
Lískové ořechy ^d	B ₁ , B ₂ , B ₆ a E	Ca, Fe, K, Zn
Makadamové ořechy ^{e; f}	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₉ , C a E	Ca, Cu, Fe, K, Mg, P, Se, Zn
Mandle ^g	B ₂ , B ₃ a E	Ca, Fe, K, Mg, Zn
Para ořechy ^{h; i}	A, B ₁ , B ₃ a E	Ca, Cu, Fe, K, Mg, P, Se, Zn
Pekanové ořechy ^j	A, B ₁ , B ₂ , B ₅ , B ₆ , B ₉ , C, E a K	Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, Zn
Piniové oříšky ^{k; l}	B ₁ , B ₂ a C	Ca, Cu, Fe, K, Zn
Pistácie ^{m; n}	K	Cu, K, Mg, Na
Vlašské ořechy ^o	B ₁ , B ₂ , B ₆ a E	Fe, K, Mg, P

(Pozn. zdroje: ^a Li *et al.*, 2014; ^b Rico *et al.*, 2016; ^c Agyemang-Yeboah, 2011; ^d Alphan *et al.*, 1997; ^e Moodley *et al.*, 2007; ^f Wood & Garg, 2011; ^g Yada *et al.*, 2013; ^h Cardoso *et al.*, 2017; ⁱ Silva *et al.*, 2019; ^j Gardea *et al.*, 2011; ^k Cabanillas & Novak, 2015; ^l Lutz *et al.*, 2017; ^m Dreher, 2012; ⁿ Küçüköner & Yurt, 2003; ^o Sze-Tao & Sathe, 2000).

Bližší charakteristika a význam jednotlivých makroživin jsou uvedeny v rámci podkapitol 1.4.1 až 1.4.3. Význam mikroživin je uveden v podkapitole 1.4.4.

1.4.1 Bílkoviny

Bílkoviny jsou makromolekulární látky složené z více než sta aminokyselin, které představují základní stavební jednotku molekuly bílkoviny. Aminokyseliny jsou vzájemně vázány peptidovými vazbami. V rámci molekuly bílkoviny (s ohledem na pořadí a skladbu aminokyselin v makromolekule) bývají doplněny i o disulfidické vazby, amidové a esterové vazby (Velíšek, 2002a). Bílkoviny představují podstatnou součást výživy člověka, poněvadž jsou nepostradatelným zdrojem dusíku, síry a esenciálních aminokyselin, jež si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat a je tedy nezbytné je přijímat v potravě (Svačina *et al.*, 2008). Zároveň mají bílkoviny celou řadu důležitých funkcí, v nichž jsou jedinečné – **strukturní** (opora živočišného nebo rostlinného těla), **enzymatická**, transportní, obranná, **zásobní** (semena, hlízy), **výživová** (zejména pro člověka a živočichy) a další (Klouda, 2012; Velíšek, 2002a).

Z výživového aspektu lze bílkoviny rozdělit podle zdroje na živočišné a rostlinné, kdy živočišné bílkoviny mají samozřejmě vyšší obsah esenciálních aminokyselin a mívají také vyšší tzv. AAS (Amino Acid Score) neboli aminokyselinové skóre (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002a). Hodnota AAS se udává v procentech a vyjadřuje poměr konkrétní aminokyseliny (obvykle je zkoumána esenciální aminokyselina) vůči tzv. referenčnímu proteinu, kterým je nejčastěji vaječný bílek nebo odstředěné mléko (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002a). V ideálním případě by potrava měla samozřejmě zahrnovat živočišné i rostlinné zdroje bílkovin.

Uvádí se, že rostlinné bílkoviny nejsou příliš hodnotné, protože nikdy neobsahují dostatečné množství více esenciálních aminokyselin zároveň jako živočišné zdroje (Velíšek, 2002a). Za tzv. limitující aminokyselinu u skořápkových plodů je považován threonin (Brufau *et al.*, 2006), jeho množství je v porovnání s referenčním proteinem velice nízké a celkově je v rámci AAS protein ze skořápkových plodů považován za méně hodnotný (Brufau *et al.*, 2006; Velíšek, 2002a). Ovšem například publikace věnující se rostlinným proteinům jako kvalitním zdrojům bílkovin od kolektivu Sá *et al.* (2020) uvádí kešu ořechy a mandle jako kvalitní zdroj esenciálních aminokyselin. Za naopak méně vhodný zdroj proteinů z oblasti skořápkových plodů byly uvedeny arašídy, jejichž aminokyselinové složení není hodnoceno jako kvalitní zdroj (Sá *et al.*, 2020).

Co se bílkovinného složení tedy týče, tak jednostranná rostlinná strava není nejšťastnější volbou. Proto je třeba rostlinné zdroje bílkovin vhodně kombinovat (luštěniny, cereálie, skořápkové plody), jedině tak se mohou vyrovnat živočišným zdrojům (Sá *et al.*, 2020; Svačina *et al.*, 2008).

1.4.2 Lipidy

Lipidy (tuky) tvoří chemicky homogenní skupinu na základě své struktury ani chemického složení (Klouada, 2012; Velíšek, 2002a). Přes heterogenitu skupiny představují nepolární molekuly anebo částečně nepolární molekuly. V souvislosti s nepolárním charakterem vyplývá základní vlastnost lipidů, tzn. nerozpustnost nebo velmi omezená rozpustnost ve vodě, naopak dobře se rozpouští v nepolárních rozpouštědlech (Klouada, 2012).

Tuky z rostlinných zdrojů (mj. i skořápkových plodů) jsou zastoupeny nejčastěji v podobě směsi triacylglycerolů, esterů vyšších mastných kyselin a glycerolu (Velíšek, 2002a). Mastné kyseliny mohou být nasycené (např. kyselina palmitová a stearová) anebo nenasyčené (např. kyselina olejová a linolová). Tuky pocházející z rostlinných zdrojů obecně obsahují více nenasyčených mastných kyselin (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002a). Skořápkové plody nejsou výjimkou a svým složením podporují benefity rostlinné stravy, především v oblasti prevence vůči kardiovaskulárním nemocím (Satija & Hu, 2018). Nutně to však neznamená, že by konzumace živočišných tuků obsažených například v masu byla nevhodná. Živočišné produkty z hlediska obsahu tuků mají v jídelníčku člověka taktéž svoji velmi důležitou roli (Svačina *et al.*, 2008).

Podobně jako proteiny jsou tuky rovněž nezbytnou součástí lidské stravy, fungují jako zásobárna energie, jsou potřebné pro tvorbu buněčných membrán či k syntéze hormonů. Také se uplatňují při vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích (Svačina *et al.*, 2008).

1.4.3 Sacharidy

Podobně jako proteiny se sacharidy skládají z malých jednotek, jež tvoří (makro)molekulu s určitým počtem monosacharidových (cukerných) jednotek (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002a). S ohledem na počet jednotek se sacharidy dělí na monosacharidy (jedna cukerná

jednotka, např. glukosa), oligosacharidy (dvě až deset monosacharidových jednotek v molekule), polysacharidy (více než deset cukerných jednotek) a komplexní sacharidy, jež mají v molekule i jiné než cukerné složky (Velíšek, 2002a).

Dostatečný příjem sacharidů je zajišťován zejména konzumací rostlinných zdrojů (ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin a dalších). I skořápkové plody obsahují nezanedbatelné množství sacharidů. Výhodou je, že významnou část zaujímá vláknina, jež je nezbytně nutná pro bezproblémové trávení a využívá se například při léčbě zácpy (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002a). Sacharidy primárně představují rychlý energetický zdroj, ale také jejich dostatečný příjem zabraňuje degradaci proteinů a následnou ztrátu svalové hmoty. I přestože jsou nezbytnou součástí lidského jídelníčku, analogicky jako u ostatních makroživin platí, že je důležitá skladba a rozmanitost přijatých sacharidů – největší podíl by měly zaujímat stravitelné polysacharidy a vláknina, což skořápkové plody ve své podstatě splňují (Svačina *et al.*, 2008).

1.4.4 Vitamíny a minerální látky

Vitamíny jsou velice důležité nízkomolekulární látky pro metabolismus člověka. Oproti rostlinám si lidské tělo dokáže vyrobit samo jen malou část vitamínů, a navíc velmi omezeně. Jejich funkce na rozdíl od makroživin je výhradně katalytická a biochemická (Velíšek, 2002b). Vitamíny, ač v poměrně malém množství, mají svou nezastupitelnou úlohu v rámci fyziologických procesů, a proto nedostatek kteréhokoli vitamínu může zapříčinit vážné onemocnění. Minimálně se nedostatky mohou projevit jako oslabení imunity s určitou náchylností k celé řadě onemocnění (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002b).

Skořápkové plody jsou bohaté na celou řadu vitamínů (tab. 2 na str. 24), zejména však na vitamíny ze skupiny B. Dále přibližně polovina vybraných plodů obsahuje v nižších množstvích vitamín C, který má protizánětlivé účinky a zároveň posiluje imunitu. Většina skořápkových plodů má ve svém mikroživinovém složení i vitamín E. Jedná se o vitamín rozpustný v tucích s antioxidačními účinky a vykazuje preventivní působení proti vzniku aterosklerózy (Svačina *et al.*, 2008). Společně se železem dle kolektivu Alphan *et al.* (1997) může navíc pomoci v případě nedostatku červených krvinek, tzn. být prevencí vůči anémii.

Kromě vitamínů mají svoje důležité místo i minerální látky. Minerální látky představují veškeré prvky v podobě iontů, které jsou přijímány z potravy, a zároveň se nejedná o organogenní prvky. Jedná se o látky, jež jsou v potravě přijímány ve velmi malém množství (obvykle stovky mikrogramů, maximálně desítky miligramů) stejně jako vitamíny (Pánek, 2002). Podle zastoupení v potravinách můžeme minerální látky klasifikovat na majoritní (více než stovky mg/kg – např. Ca, K, Na), minoritní (desítky až stovky mg/kg – např. Fe, Zn) a stopové (méně než desítky mg/kg – např. Cu, I, Se). Toto dělení, závislé na zastoupení jednotlivých minerálů v potravě, odpovídá i dělení minerálních látek z hlediska doporučeného denního příjmu (Svačina *et al.*, 2008; Velíšek, 2002b).

Obsah minerálních látek v potravinách je v řádu jednotek procent, u skořápkových plodů se jedná v průměru o 0,5–1,0 % (Velíšek, 2002b). V rámci jejich složení je zastoupena celá řada minerálních látek (tab. 2 na str. 24). Jsou zejména bohaté na draslík a hořčík podobně jako semínka některých druhů zeleniny či ovoce (Svačina *et al.*, 2008). Dále jsou považovány za dobrý zdroj zinku, vápníku a také mědi či selenu. Přesný minerální podíl je samozřejmě vázán na konkrétní druh plodu, ale také na kvalitu půdy, v níž byla plodina pěstována.

Poměrně velikou minerální diverzitu z vybraných skořápkových plodů vykazují makadamové ořechy a para ořechy. Konkrétní množství stěžejních minerálních látek v obou druzích je uvedeno v tab. 3.

Tabulka 3: Průměrné zastoupení klíčových minerálních látek, porovnání makadamových a para ořechů.

	Množství klíčových minerálních látek (v mg/ 100 g plodů)						
	Ca	Cu	Fe	Mg	P	Se	Zn
Makadamové ořechy ^a	85,0	0,8	3,7	130,0	188,0	0,036	1,3
Para ořechy ^{b, c}	141,8	1,8	2,1	302,9	725,0	5810	4,1

(Pozn. zdroje: ^a Wood & Garg, 2011; ^b Cardoso *et al.*, 2017; ^c Silva *et al.*, 2019).

Průměrné zastoupení jednotlivých minerálních látek u naprosté většiny plodů (za předpokladu konzumace přiměřeného množství) nijak neohrožuje doporučený denní příjem

ve stravě člověka (Svačina *et al.*, 2008). Ovšem zásadní výjimkou jsou v tab. 3 uvedené para ořechy, které vykazují výraznou specifitu ve svém minerálním složení z hlediska obsahu selenu. Brazílské ořechy totiž obsahují průměrně 290,5 µg selenu v pouhých 5 g ořechů (Silva *et al.*, 2019). Tato hmotnost odpovídá přibližně dvěma kusům para ořechů, přičemž doporučená denní dávka selenu podle kolektivu Svačina *et al.* (2008) by měla být maximálně 100 µg denně. Navíc zdroj selenu nepředstavují pouze para ořechy, ale také mořské plody, ryby, vnitřnosti nebo vejce (Velíšek, 2002b). Z čehož tedy vyplývá, že by konzumace para ořechů, byť v malém množství, neměla být rozhodně denní.

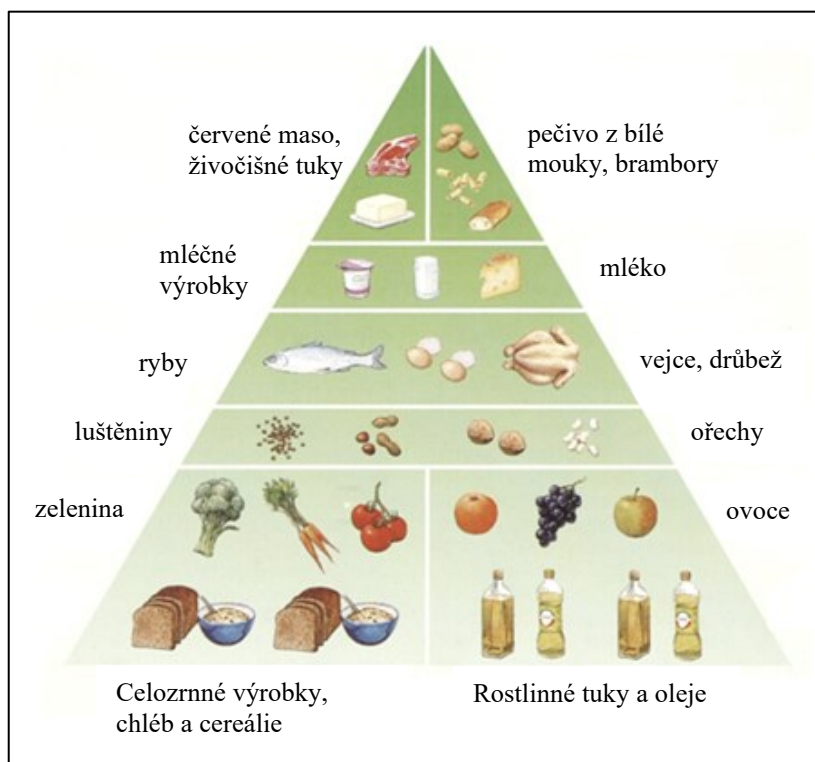
1.5 Postavení skořápkových plodů ve výživě a zdravotní benefity

Již předchozí kapitola reflektuje důležitost základních látek ve výživě člověka. Bez pochyb jsou její podstatou makroživiny, tzv. makronutrienty, které tvoří hlavní část stravy společně s vodou (Pánek, 2002). Druhou významnou skupinou živin jsou mikroživiny, kam jsou řazeny vitamíny a minerální látky. Zvláštní postavení mezi živinami má vláknina, která se sice řadí k sacharidům, ale je pro člověka nestravitelná. Většina skořápkových plodů obsahuje adekvátní množství vlákniny, nicméně lépe si v tomto případě stojí ovoce nebo zelenina. V potravě člověka má svou nezastupitelnou úlohu v rámci fungujícího zažívání a střevní mikrobioty (Pánek, 2002; Tláskal *et al.*, 2016).

Skořápkové plody veškerý tento výživový základ mají a dají se považovat za potraviny s velmi důležitým místem v lidské stravě. Jsou bohaté na zdravé tuky a bílkoviny (tab. 1 na str. 23), celou řadu vitamínů a minerálních látek (tab. 2 na str. 24). Navíc jsou dle potravinářské klasifikace přiřazovány k ovoci (Dostálová & Kadlec, 2014), jež společně se zeleninou tvoří jeden ze spodních pilířů potravinové pyramidy (obr. 3). Na druhém místě co do důležitosti stojí luštěniny a skořápkové plody, jakožto potraviny bohaté na bílkoviny a zdravé tuky. Na ně navazuje maso, mléčné výrobky a na vrcholu stojí výrobky z bílé mouky (Schlett, 2008).

Ačkoli jsou ořechy ve druhém patře potravinové pyramidy, nelze je konzumovat bez omezení. Skořápkové plody obsahují poměrně vysoké procento tuků, čímž významně zvedají svou energetickou hodnotu. Vyšší příjem tuků (i přestože se jedná o zdravé

nenasycené mastné kyseliny) není vhodný z hlediska udržování hmotnosti (Pánek, 2002). Doporučený denní příjem se proto uvádí kolem 20 gramů ořechů denně a celkově cca 150 gramů týdně (Hlavatá, 2017).



Obrázek 3: Potravinová pyramida (upraveno podle: Schlett, 2008, s. 13).

Vzhledem k obsahu nenasycených mastných kyselin, vitamínů a minerálních látek přináší skořápkové plody s sebou celou řadu benefitů (za předpokladu přiměřené konzumace). Napomáhají redukovat vyšší hladinu LDL a komplexně snižovat riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Baer *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019).

Mimo prevenci srdečních chorob patří mezi benefity konzumace ořechů například i nižší riziko projevu neurodegenerativních nemocí (nejen) ve vyšším věku (Hayes *et al.*, 2016). Uvádí se i menší riziko vzniku nádorového onemocnění zejména v oblasti zažívacího traktu (Naghshi *et al.*, 2021; Ros, 2010). S ohledem na přiměřenou konzumaci mohou být ořechy prospěšné také z hlediska prevence vzniku diabetu (Ros, 2010). Vzhledem k významnému

obsahu minerálních látek a vitamínů je konzumace užitečná také ve vztahu k pokožce, vlasům nebo nehtům. Stejně tak je pro pokožku užitečné i používání kosmetiky obsahující oleje ze skořápkových plodů (Michalak & Kiełtyka-Dadasiewicz, 2019).

1.6 Rizika spojená s konzumací

Konzumace skořápkových plodů je nejméně ze dvou hledisek považována za rizikovější. Prvním z důvodů je vyšší obsah tuků, jedná se tedy o poměrně energeticky vydatné potraviny (Pánek, 2002; Schlett, 2008). S ohledem na tuto záležitost by plody neměly být konzumovány v nepřiměřeném množství (Hlavatá, 2017). V opačném případě člověk přijímá příliš velké množství tuků, jež se při nedostatečném výdeji ukládá a časem se může projevit kupříkladu formou nadváhy (Svačina *et al.*, 2008).

Za mnohem závažnější z pohledu konzumace jsou ale považovány alergické reakce, jež se v dnešní době objevují stále častěji u dětí ale i dospělých. Alergická reakce je charakterizována jako nepřiměřená imunitní reakce vůči podnětům, na něž zdravý jedinec nijak nereaguje. Tyto podněty (antigeny) označujeme jako tzv. alergeny, které u citlivého člověka přivodí alergické projevy typu kopřivky, dýchacích potíží a dalších (Drnková, 2019; Jílek, 2019). V souvislosti se skořápkovými plody se hovoří o potravinové alergii, která může pacienta ohrozit na životě zejména, pokud neví, že je na danou potravinu citlivý. Z potravin jsou za největší alergeny považovány obiloviny, mléko, mořské plody a také skořápkové plody, z nich jsou pak velmi častým alergenem arašíd (Burks, 2008; Drnková, 2019). Přestože alergie na ořechy (respektive skořápkové plody) je zaznamenána průměrně u 1 % populace, jedná se o velmi vážný typ alergické reakce. Někdy se totiž již první setkání s alergenem může změnit v tzv. anafylaktický šok⁴ (Crespo *et al.*, 2006; Drnková, 2019).

Alergická reakce na skořápkové plody je poměrně často doprovázena anafylaktickým šokem a těžkými alergickými projevy. Obvykle ale mezi nejčastější projevy alergie na skořápkové plody patří kožní potíže, bolest na hrudi, nevolnost a ve více než 80 % dýchací potíže (Crespo *et al.*, 2006).

⁴ Anafylaktický šok je nebezpečný rychle nastupující stav při alergické reakci. Reakce je velice silná a projevuje se většinou dýchacími, trávicími a cévními potížemi současně (Drnková, 2019).

Alergické projevy při rozvinutí alergie na skořápkové plody jsou způsobeny přehnanou reakcí imunitního systému na konkrétní proteiny, jejichž základní přehled je zpracován v tabulce 4. Jedná se o seznam hlavních alergenů, které jsou zodpovědné za alergické reakce v souvislosti se skořápkovými plody.

Tabulka 4: Seznam hlavních alergenů zodpovědných za nepřiměřenou imunitní reakci a jejich systematické zařazení (zdroj: Allergen nomenclature, n.d.).

Druh skořápkového plodu	Obsah hlavních proteinů (alergenů)	
	Hlavní alergen(y)	Zařazení/typ proteinu
Arašídý	Ara h 1	7S globuliny
	Ara h 2	2S albuminy
Kešu ořechy	Ana o 2	11S globuliny
Kokos	Coc n 1	7S globuliny
Lískové ořechy	Cor a 9	11S globuliny
Makadamové ořechy	Mac i 1	7S globuliny
	Mac i 2	11S globuliny
Mandle	Pru du 6	11S globuliny
Para ořechy	Ber e 1	2S albuminy
Pekanové ořechy	Car i 1	2S albuminy
	Car i 4	11S globuliny
Piniové oříšky	Pin p 1	2S albuminy
Pistácie	Pis v 1	2S albuminy
	Pis v 2	11S globuliny
	Pis v 3	7S globuliny
Vlašské ořechy	Jug r 1	2S albuminy

Názvy proteinů (alergenů) skořápkových plodů jsou systematicky utvořeny dle latinského názvu rostliny a doplněny o číslování. Některé mají i svůj „triviální“ název; například Pru du 6 nese také označení amandin (Yada *et al.*, 2011), jeden z vedlejších alergenů kokosu se například nazývá cocosin (Vajravijayan *et al.*, 2017). Všechny tyto proteiny se pak řadí do tří hlavních skupin, spadajících pod globuliny nebo albuminy.

První skupinou jsou 2S albuminy, tyto proteiny představují skupinu hlavních potravinových alergenů. Jedná se o velmi odolné proteiny, na něž může gastrointestinální systém citlivého člověka špatně reagovat. 2S albuminy jsou tvořeny různým počtem cysteinových zbytků, tedy zbytků aminokyseliny, jež má ve své molekule –SH skupinu (Moreno & Clemente, 2008). Například jeden z nejčastějších alergenů arašídů Ara h 2 ve své molekule obsahuje osm cysteinových zbytků. Obecně platí, že je v molekule většiny 2S albuminů sudý počet cysteinových zbytků (Schmidt *et al.*, 2010). Patří mezi ně nejen alergeny arašídů, ale také například poměrně silné alergeny piniových oříšků (Burks, 2008; Cabanillas & Novak, 2015).

Druhou skupinu tvoří 7S globuliny (viciliny), které jsou dalšími potravinovými alergeny. Vykazují též vysokou odolnost a stabilitu zejména v kontextu vyšších teplot. Jedná se o tzv. termostabilní proteiny, jejichž strukturu neponičí ani například pražení. Zajímavostí této skupiny proteinů je, že větší riziko rozvinutí alergie podpoří přítomnost lipidů v potravě, proto jsou skořápkové plody typu arašídů považovány za vysoce alergenní potravinu (Breiteneder & Mills, 2005; Burks, 2008).

Třetí skupinou jsou 11S globuliny (leguminy), jež představují poměrně velkou skupinu proteinů zahrnující nejen proteiny skořápkových plodů, ale také luštěnin nebo obilovin. Taktéž se jedná o velmi odolné, a navíc termostabilní proteiny (Breiteneder & Mills, 2005).

S ohledem na poměrně velkou dominanci arašídových alergenů, jsou tyto alergeny klasifikovány samostatně od ostatních ořechů (skořápkových plodů). Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 jsou z hlediska alergenů arašídů a výrobky z nich povinně označovány číslem 5. Ostatní skořápkové plody mají číslo alergenu 8. Toto označení je velice důležitou informací pro všechny pacienty trpící alergiemi. Alergie na skořápkové plody i arašídů v průběhu života spíše nemizí (Weinberger & Sicherer, 2018). Ostatní lidé s ohledem na svůj věk a genetické dispozice jsou po celý

život jejím rozvinutím ohrožení (Burks, 2008; Jílek, 2019), proto je povinné například v restauracích informace o alergenech uvádět.

1.7 Rizika spojená s nevhodným uchováváním a zpracováním

Nejen alergické reakce představují riziko při konzumování skořápkových plodů. Podobně jako například obilí a další zemědělské plodiny, tak i skořápkové plody podléhají různým vnějším vlivům při sklizni, uchovávání, přepravě nebo později i při zpracování. Obecně se nejvíce hovoří o posklizňové kontaminaci plodin pesticidy, dále pak o mikrobiální anebo kontaminaci mikroskopickými vláknitými houbami (Velíšek, 2002c). Poněvadž jsou skořápkové plody velice bohaté na tuky, které po určitém čase ochotně podléhají chemickým změnám, tak se k těmto rizikům řadí i tzv. žluknutí tuků (Kadlec *et al.*, 2012).

Kontaminace vláknitými houbami

V případě skořápkových plodů jsou na prvním místě kontaminace vláknitými houbami, jež sekundárním metabolismem produkují tzv. mykotoxiny (Krasauskas *et al.*, 2015). Jedná se o látky, které nepříznivě působí na zdraví člověka i zvířat, některé z nich jsou dokonce považovány za nebezpečné například z důvodu své karcinogenity (Jubeen *et al.*, 2012; Velíšek, 2002c). Mezi základní tři skupiny vláknitých hub (mikromycety) patří rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Všechny tři skupiny rodů jsou zodpovědné za produkci sekundárních metabolitů, jež představují určité riziko z hlediska konzumace čerstvých, ale i zpracovaných potravin (Velíšek, 2002c).

U skořápkových plodů dochází ke kontaminaci spíše až po sklizni, tzn. při jejich skladování nebo zpracování. Mnohdy se jedná o aflatoxiny řady B a G (produkuje rod *Aspergillus*) či ochratoxin A (produkuje rod *Penicillium*). Riziko jejich vzniku podporuje vyšší vlhkost a vyšší teplota v prostorech, kde jsou plody skladovány (Jubeen *et al.*, 2012; Velíšek, 2002c). Též velkou roli hraje doba, po kterou jsou v daných podmínkách plody skladovány. Samozřejmě platí, čím delší expozice skořápkových plodů v nevyhovujících podmínkách, tím větší podíl vytvořených mykotoxinů (Jubeen *et al.*, 2012).

Velmi vysokou toxicitu vykazují aflatoxiny, jež se mohou objevit na mnoha plodinách, poněvadž se vyskytují ve většině typů půd. Nejvíce se kontaminace objevují u arašídů, para ořechů či pistácií (z dalších plodin např. u kukuřice), v menším množství se pak aflatoxiny vyskytují u mandlí nebo vlašských ořechů. Aflatoxiny na lidský organismus působí primárně hepatotoxicky, často se ale v lidském organismu projevují i jinak například dýchacími problémy či mentální retardací u dětí. Vznik aflatoxinů může být zpomalen přítomností zinku, solemi kyseliny benzoové a samozřejmě vhodně zvolenými podmínkami pro uchovávání (Velíšek, 2002c).

Oproti tomu ochratoxiny, nejvíce pak ochratoxin A (OTA), se vyskytují v mnohem více druzích potravin. Mimo skořápkové plody jsou to například cereálie, obiloviny, produkty z oblasti kojenecké výživy, maso, sušené ovoce a další (Coronel *et al.*, 2012; Velíšek, 2002c). Producentem OTA jsou mikromycety rodu *Aspergillus* i rodu *Penicillium* (Coronel *et al.*, 2012). Působení na lidský organismus je podobně jako u aflatoxinů velmi nebezpečné. Ochratoxiny vykazují nejen toxicitu vůči játrům, ale také vzhledem k ledvinám, nervové soustavě a imunitnímu systému. V souvislosti s OTA se uvádí navíc podezření na karcinogen, připisuje se mu vznik nádorů močového ústrojí a ledvin (Coronel *et al.*, 2012; Velíšek, 2002c). Vzhledem k velikému rozšíření a perzistenci OTA jsou v rámci EU dodržovány a kontrolovány maximální povolené limity (maximálně desítky $\mu\text{g/kg}$ potravin) v jednotlivých kategoriích potravin (Velíšek, 2002c).

Bakteriální kontaminace

Kontaminace bakteriemi je u skořápkových plodů méně častá oproti kontaminaci vláknitými houbami. Suché skořápkové plody totiž neposkytují výhodné podmínky pro život bakterií. Bakterie se nemohou dobře množit, vyvíjet a růst, poněvadž skořápkové plody obsahují poměrně malé procento vody. Navzdory tomu je ale i tato kontaminace známá, nejčastěji se lze setkat s kontaminací bakteriemi *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* či bakteriemi rodu *Salmonella* (Zhang *et al.*, 2017). Podle autorů Brar *et al.* (2015) většina bakteriálních kontaminací u skořápkových plodů je způsobena bakterií rodu *Salmonella*, která se objevuje přímo na plodech či ve výrobcích z nich (např. arašídové máslo). Bakterie rodu *Salmonella*

jsou ale dokonce natolik odolné, že jsou schopny přežít při teplotách pod 0 °C až na polovině kontaminovaných ořechů po celý rok (Brar *et al.*, 2015).

Ačkoli se nejedná o příliš časté kontaminace, tak se s nimi může lidský organismus setkat. V takovém případě konzumace kontaminovaných plodů dokáže způsobit nepříjemné průjmy a v krajním případě i otravy (Velíšek, 2002c).

Žluknutí tuků

Poněvadž jsou skořápkové plody velice bohaté na tuky a oleje, tak s ohledem na vnější podmínky a samozřejmě i čas podléhají chemickým změnám, především pak oxidaci (Dostálová & Kadlec, 2014; Velíšek, 2002a). Tyto chemické změny se obecně nazývají jako tzv. žluknutí tuků. Žluknutí u potravin obsahující vysoké procento tuků je přirozený proces, kdy potravina vlivem oxidace ztrácí svou typickou chuť, vůni a živiny (Velíšek, 2002a).

Přestože je žluknutí tuků řazeno mezi rizika, oxidované tuky následkem nevhodného uchovávání většinou nepředstavují akutní hrozbu při konzumaci. Nicméně žluklé lipidy se projevují nepříjemným zápachem, horší (až nahořklou) chutí, čímž spotřebitele od konzumace obvykle odradí (Velasco *et al.*, 2010; Velíšek, 2002a). Pokud je taková potravina i tak zkonsumována, není řazena mezi apriori nebezpečné, většinou se projeví trávicími potížemi v souvislosti s horší stravitelností oxidovaných tuků (Velíšek, 2002a).

S ohledem na chemické reakce, které při žluknutí probíhají, lze rozlišovat základní dva typy: hydrolytické a oxidační (Velasco *et al.*, 2010; Velíšek, 2002a). Při hydrolytickém žluknutí vznikají mastné kyseliny, pouze v případě, kdy vznikají kyseliny s nízkým počtem (tzn. do deseti) uhlíků v řetězci, tak se obvykle objeví nepříjemný zápach a pachůť (Velíšek, 2002a). Oxidační žluknutí probíhá jako tzv. autooxidace, kdy vznikají hyperoxidy, které opakovaně reagují s alkylovými zbytky mastných kyselin. Až produkty sekundárních reakcí negativně ovlivňují chuť potraviny (Velasco *et al.*, 2010; Velíšek, 2002a). Druhou možností, jakou probíhá oxidační žluknutí je enzymatická oxidace. Například enzymy lipoxygenázy katalyzují oxidační reakci mastných kyselin. Tato oxidace se týká pouze potravin, které nebyly nijak tepelně zpracovány, poněvadž vyšší teplotou dojde ke zničení enzymů (denaturaci) a zamezení oxidace (Velasco *et al.*, 2010). Poslední typ oxidace je

tzv. fotooxidace, kdy vlivem záření vznikají volné radikály iniciující oxidaci mastné kyseliny, průběh je poté podobný jako u autooxidace (Velasco *et al.*, 2010).

1.8 Analytické metody vyžívané k identifikaci bílkovin ve skořápkových plodech

Pro identifikaci bílkovin se všeobecně využívá celá řada analytických metod. V případě skořápkových plodů a výrobků z nich jsou to především metody související s hmotnostní spektrometrií. Výzkumné skupiny jako Polenta *et al.* (2012), Sagu *et al.* (2021) nebo Li *et al.* (2016) se zabývají identifikací proteinů primárně jako alergenů ve skořápkových plodech. S ohledem na jejich publikace se velmi často jedná o metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry). Kapalinová hmotnostní spektrometrie navíc bývá často používána společně s tzv. dvoudimenzionální elektroforézou (Polenta *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že specifické proteiny skořápkových plodů představují velmi často alergeny jsou také využívány imunochemické metody, například ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) enzymová imunoanalýza (Polenta *et al.*, 2012).

Proteinové rozlišení skořápkových plodů od sebe navzájem, jako je předmětem experimentální části této práce, nebylo dosud v takové podobě provedeno. Jednotlivé výzkumné skupiny se spíše zabývají jedním konkrétním plodem. Jako například práce kolektivu Huang *et al.* (2016), kdy byla použita metoda MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight). V rámci výzkumu byla doplněna o dvoudimenzionální elektroforézu, přičemž cílem práce bylo vytvořit 2D proteomickou mapu a identifikovat proteinový profil kokosu. Dále například kolektiv Li *et al.* (2016) prováděl proteomickou analýzu mandlí za pomoci LC-MS a dvoudimenzionální elektroforézy, výsledkem byl rovněž proteinový profil daného plodu (mandlí) včetně identifikovaných alergenů ve vzorcích.

Rozlišovací analýzy mohou být také prováděny na základě genetického bádání. Primárně genetické výzkumy u rostlin (i živočichů) sloužily k přesnému zjištění mezidruhové

příbuznosti, díky čemuž molekulárně genetický přístup dává v současnosti rostlinné systematice stále novější rozměr (Hrouda, 2007).

Využití genetiky, respektive analýzy DNA, nezůstává ale pouze v oblastech evoluční biologie a taxonomie. Analýza DNA je rovněž využívána v dalších odvětvích. Z hlediska skořápkových plodů byla například provedena v Japonsku studie kolektivem Ito *et al.* (2018), kdy bylo současně detekováno osm druhů skořápkových plodů (kešu, lískových ořechů, makadamových ořechů, mandlí, para ořechů, pekanových ořechů, pistácií a vlašských ořechů) samostatně i v potravinách typu chléb, cereálie, čokoláda, zmrzlina, omáčky a další. V této studii byla po extrakci DNA využita metoda polymerázové řetězové reakce, tzv. PCR (Polymerase Chain Reaction), přičemž vždy část extrahované DNA byla využita jako primer pro syntézu delšího úseku DNA, jež může být využit k identifikaci. PCR metoda byla úspěšná hned ve dvou podobách, v tzv. tetraplexu a simplexu, nicméně tetraplex PCR pouze zužoval obsah potravin na čtyři plody (tj. polovinu detekovaných ořechů). Mnohem přesnější výsledky pak přinesla simplexová PCR, která potvrdila s daleko větší citlivostí každý plod samostatně ve zkoumaném vzorku konkrétní potravin.

Podobná studie vznikla v Číně za přispění kolektivu Ding *et al.* (2020) v záležitosti falšování ořechového mléka. V tomto případě byly identifikovány vlašské ořechy, pekanové ořechy, arašidy a sójové boby. S podezřením na falšování ořechových výrobků nastavením levnějšími sójovými boby či arašidy. U části vzorků bylo toto podezření prokázáno, mimo přítomnosti očekávaných ořechů byly totiž v obsahu identifikovány i arašidy.

Čtyři níže uvedené podkapitoly se vrací k určování proteinů a jsou v nich tedy představeny metody, jež blíže popisují možnosti identifikace proteinů obecnějšího rázu, nejen ve skořápkových plodech.

1.8.1 Enzymová imunoanalýza (ELISA)

Enzymová imunoanalýza (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) reprezentuje analytickou metodu využívanou zejména v klinické biochemii a imunologii. ELISA je velmi specifická a citlivá metoda, založena na interakci protilátky a antigenu⁵ (Bartůňková &

⁵ Antigen představuje částici (látku), která vyvolává imunitní odpověď organismu (Drnková, 2019).

Paulík, 2005; Jílek, 2019). Reakce probíhá na imunosorbentu, kde je vázána označená specifická protilátka (s enzymem katalyzující danou interakci). Pokud vložené analyzované sérum obsahuje odpovídající antigeny, tak je sorbent zachytí a mohou být na základě proběhlé reakce identifikovány (Jílek, 2019). Reakci obvykle doprovází barevná změna, jež se následně fotometricky stanovuje (Bartůňková & Paulík, 2005). Na základě této interakce je možné určit stovky antigenů určující viry (Jílek, 2019) nebo například antigeny, které odpovídají alergenům (Polenta *et al.*, 2012).

1.8.2 Dvoudimenzionální elektroforéza (2D-PAGE)

2D-PAGE (Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) elektroforéza představuje kvantitativní analytickou metodu v rámci proteinové analýzy. Je to jedna ze základních využívaných metod, která vytvoří dvourozměrný obraz o počtu proteinů obsažených ve vzorku (Magdeldin *et al.*, 2014). První rozměr představuje dělení proteinů na základě izoelektrického bodu v polyakrylamidovém gelu (Vaňková, 1999). Druhý rozměr je reprezentován pomocí SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), tedy polyakrylamidovým gelem s dodecylsíránem sodným (Polenta *et al.*, 2012). Druhá dimenze umožňuje oddělení obsažených proteinů s ohledem na jejich velikost (molekulovou hmotnost). V okamžiku, kdy částice náboj ztratí při určitém pH (tj. izoelektrický bod), tak vytvoří značku (tečku) v celkovém obraze (Magdeldin *et al.*, 2014). Značky jsou samy o sobě viditelné až po obarvení, proto se využívá barvení například tzv. Coomassie modří (Schägger *et al.*, 1988; Vaňková, 1999). Metoda může být různě kombinována a obměňována, v některých případech slouží jako doplněk kvalitativních metod (Polenta *et al.*, 2012; Vaňková, 1999).

1.8.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)

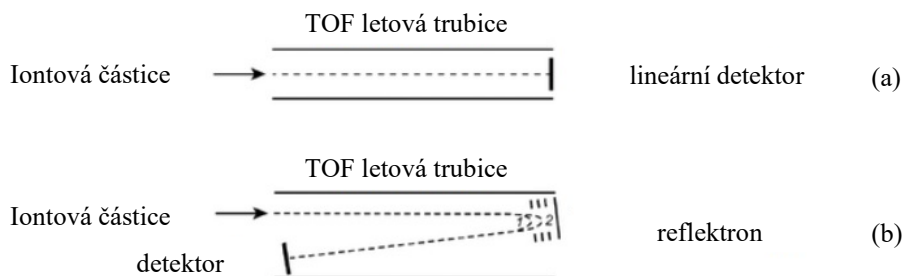
Další zmiňovanou a hojně využívanou metodou je kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Tato metoda je navíc běžně používána ve spojení s elektrosprejovou ionizací (ESI). Metoda se sestává z kapalinové chromatografie, jež patří mezi základní separační metody. Separace přitom probíhá v separační koloně obsahující

stacionární fázi. Analyty se oddělují zejména s ohledem na afinitu k sorbentu (stacionární fázi) ale i další faktory (Záruba, 2016). Dále se sestává z hmotnostní spektrometrie, která je založena na převodu molekuly analytu do stavu, kdy se z ní stává iont. Vyhodnocování probíhá na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) konkrétních iontů (Pitt, 2009). Ačkoli je v rámci této metody potřeba kapalný vzorek převést do plynné fáze a až poté ionizovat, má ve světě biochemie a organické chemie nevídané postavení. Dle autorů Müllera & Völkela (2012) existují odhady, které uvádí, že touto metodou lze analyzovat přibližně 80 % organických látek, přičemž plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí pouze 20 %.

1.8.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

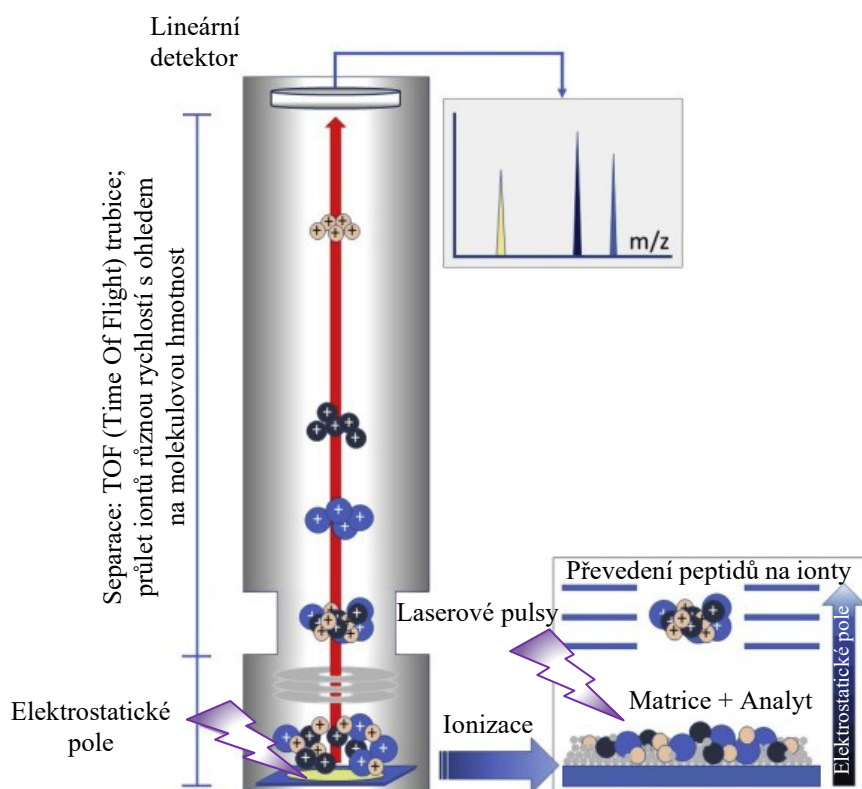
Matricí asistovaná laserová desorpce a ionizace (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) je typ hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry), jež objevil Koichi Tanaka (Hou *et al.*, 2019). Současně s MALDI se kombinuje analyzátor doby letu (TOF, Time-of-Flight), který měří dobu letu nabitě částice, z níž je následně stanovena hmotnost nabitě částice, přesněji poměr m/z (Havliš, 1999). Tato komplexní metoda je velice rychlá, přesná a poměrně citlivá, díky tomu je také často využívána i pro klinické účely. Analyt obsahující peptidy je míchán s matricí, jež je nejčastěji 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) nebo například kyselina 4-hydroxy- α -kyanoskořicová (HCCA) a další (Hou *et al.*, 2019).

Matrice ve směsi s analytem je nanášena na ocelový nosič (destičku), kde vykrytalizuje. Krystalky jsou postupně zasahovány pulzním laserem, přičemž matrice energii laseru absorbuje, sama se desorbuje a převede (ionizuje) přítomné peptidy na nabitě částice (Havliš, 1999; Záruba, 2016). Ionty jsou urychlovány elektrostatickým polem tak, že získávají stejnou hodnotu kinetické energie (Záruba, 2016). Následně letí vakuem, letovou trubicí, různými rychlostmi až k detektoru. Doba letu každé částice určuje poměr molekulové hmotnosti částice a jejího náboje (Havliš, 1999). Dráha letové trubice může být dána rozměry trubice (obr. 4a), případně může být prodloužena tak, že je místo lineárního detektoru umístěn reflektor (obr. 4b), jenž prodlouží trajektorii letu nabitých částic a zvýší tak schopnost rozlišení jednotlivých iontů mezi sebou (Záruba, 2016).



Obrázek 4: a – Schéma letové trubice s lineárním detektorem; b – schéma letové trubice s reflektorem prodlužující trajektorii letu nabitých částic (upraveno podle: Záruba, 2016, s. 210).

Celkové schéma MALDI-TOF MS s využitím lineárního detektoru je zobrazeno na obr. 5, součástí obrázku je i detail ionizace.



Obrázek 5: Schématické zobrazení MALDI-TOF/MS (upraveno podle: Hou *et al.*, 2019, s. 406).

V rámci experimentální části této práce byla využita metoda MALDI-TOF MS, kdy je v rámci letové trubice přítomen reflektrom.

1.9 Analýza hlavních komponent (PCA)

Data pocházející z měření na hmotnostním spektrometru je nutné vždy nějakým způsobem interpretovat. Jednou z možností interpretace je využití metody analýzy hlavních komponent tzv. PCA (Principal Component Analysis). Jedná se o matematickou metodu, která dokáže zpracovat velké množství dat závislých na několika proměnných tak, že počet proměnných sníží. Díky snížení počtu proměnných významně zjednoduší analýzu získaných dat, přičemž dokáže stále zachovávat relativně velké množství informací o zpracovávaných datech (Jolliffe & Cadima, 2016).

Analýza hlavních komponent je již léta využívanou metodou a v současnosti stále jednou z nejvíce užívaných metod pro zpracování dat (Jolliffe, 2022). PCA metoda přitom pracuje s daty tak, aby redukovala jejich rozsah a zároveň ponechala co možná nejvíce odchylek i dat navzájem si podobných (Bro & Smilde, 2014; Jolliffe, 2022). PCA jakožto redukční metoda vytvoří své vlastní „nové“ proměnné, s nimiž pracuje (Jolliffe & Cadima, 2016). Tyto nově vzniklé proměnné se označují jako hlavní komponenty a vznikají lineární kombinací primárních proměnných, jedná se tedy o matematickou operaci (Bro & Smilde, 2014; Jolliffe & Cadima, 2016). Výsledná grafická znázornění metody PCA mohou být trojrozměrná případně dvourozměrná s ohledem na použitý počítačový software.

V rámci experimentální části této práce byla rovněž k vyhodnocení dat uplatněna PCA metoda.

2 Experimentální část

V experimentální části této bakalářské práce jsou zpracovány veškeré pracovní úkony, jež byly provedeny na Ústavu biochemie a mikrobiologie na VŠCHT Praha, konkrétně v Laboratoři aplikované proteomiky. V laboratoři byla realizována komplexní práce s jedenácti vzorky skořápkových plodů, jež vedla k řešení stanoveného cíle tzn., zdali je možné od sebe proteomicky vybrané skořápkové plody odlišit. Celkovou práci zahrnovalo prvotní zpracování vzorků, vážení, přípravu roztoků, enzymatické štěpení vzorků, přečišťování, nanesení vzorků na speciální ocelovou destičku pro účely měření, vlastní měření na přístroji MALDI-TOF MS a počítačové vyhodnocování výsledků.

Pro určitou komplexnost výsledků práce byly vzorky také připraveny na druhé měření za pomoci metody LC-MS/MS. Vzorky byly taktéž připraveny na enzymatické štěpení, přečištěny a následně ponechány vyschnout za laboratorní teploty. Vlastní měření na přístroji LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight) provedl pan Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D., čímž mu velice děkuji. Vyhodnocení vzorků bylo rovněž provedeno počítačově (kapitola 3 Výsledky a diskuze).

2.1 Používané chemikálie a vybavení

Pro účely štěpení vzorků byl využit enzym trypsin spolu s hydrogenuhličitanem amonným. K provedení ZipTip metody byly připraveny tři druhy roztoků za použití acetonitrilu (ACN), kyseliny trifluoroctové (TFA) a destilované vody. Před měřením byla ke vzorkům připravena matrice z 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB), ACN, TFA a destilované vody. Všechny roztoky byly připraveny v přesném poměru (kapitola 2.4 Příprava roztoků potřebných k analýze).

Chemikálie

- Acetonitril; ACN (Sigma Aldrich)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina; DHB (Sigma Aldrich)
- Hydrogen uhličitan amonný; NH_4HCO_3 (Penta Chemicals)
- Kyselina trifluoroctová; TFA (Sigma Aldrich)
- Trypsin (Sigma Aldrich)

Vybavení

- Analytické váhy ABT 120-5DM (Kern)
- Automaticky nastavitelná mikropipeta; objem 0,5–10 µl (Finnpipette)
- Automaticky nastavitelná mikropipeta; objem 2–20 µl (Socorex)
- Automaticky nastavitelná mikropipeta; objem 20–200 µl (Socorex)
- Automaticky nastavitelná mikropipeta; objem 100–1000 µl (Socorex)
- Eppendorf zkumavky; objem 0,5 ml a 1,5 ml (Eppendorf)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF; Autoflex Speed (Bruker Daltonics)
- Laboratorní třepačka Vortex s kruhovým pohybem; „Lab dancer“ (IKA)
- Zip-Tip špičky s reverzní fází C₁₈ (Millipore)

2.2 Příprava plodů a jejich zpracování

K analýze bylo připraveno celkem jedenáct druhů odlišných skořápkových plodů (tab. 6). Nejprve byla zakoupena jednotlivá balení dostupných plodů v prodejních sítích Mixit.cz a Albert. Skořápkové plody byly v případě druhů č. 1–10 ve formě vyloupaných jader, z toho mandle blanširované a arašídý pražené. Pouze kokos, druh č. 11, byl zakoupen jako sušená jemně mletá kokosová dužina v prodejně Albert od firmy Nature's Promise. Sušená dužina téměř neobsahuje vodu, a navíc je částečně lisována. Z těchto důvodů se množství makroživin (především bílkovin) mírně odlišuje od hodnot pro čerstvý kokos (tab. 5).

Tabulka 5: Porovnání obsahu základních makroživin v čerstvém kokosu a sušené kokosové dužině.

Podoba kokosového ořechu	Zastoupení makroživin (v gramech na 100 g)		
	Lipidy	Bílkoviny	Sacharidy
Čerstvý kokosový ořech ^a	33,5	3,0	15,2
Sušená jemně mletá dužina ^b	26,6	14,7	17,0

(Pozn. zdroje: ^a Agyemang-Yeboah, 2011; ^b výrobce Health Link s.r.o. pro Albert, č. šarže: 05.10.2022/0280E).

Druhy č. 1–10 byly postupně namlety do jemné podoby v kuchyňském mlýnku na ořechy. Každý druh byl připravován samostatně v pečlivě omytém mlýnku tak, aby nedošlo ke kontaminaci předchozím vzorkem. Po namletí bylo vždy větší množství vzorku převedeno do uzavíratelného sáčku, jež byl opatřen číslem (obr. 6). Takto připravené vzorky byly před zahájením laboratorní práce uchovány v mrazáku při teplotě -18 °C.

Tabulka 6: Seznam analyzovaných skořápkových plodů.

Pořadí	Druh skořápkového plodu	Podoba	Prodejce
1	Vlašské ořechy	Jádra	Mixit.cz
2	Kešu ořechy	Jádra	Mixit.cz
3	Lískové ořechy	Jádra	Mixit.cz
4	Mandle	Blanširovaná jádra	Mixit.cz
5	Pistácie	Jádra	Mixit.cz
6	Arašídny	Pražená jádra	Mixit.cz
7	Para ořechy	Jádra	Mixit.cz
8	Pekanové ořechy	Jádra	Mixit.cz
9	Makadamové ořechy	Jádra	Mixit.cz
10	Piniové oříšky	Jádra	Mixit.cz
11	Kokos	Sušená, mletá dužina	Albert



Obrázek 6: Označené sáčky s připravenými namletými plody; 1 – vlašské ořechy, 2 – kešu, 3 – lískové ořechy, 4 – mandle, 5 – pistácie, 6 – arašidy, 7 – para ořechy, 8 – pekanové ořechy, 9 – makadamové ořechy, 10 – piniové oříšky, 11 – kokos (foto autor, 17.7.2021).

2.3 Vážení vzorků

Vzorky byly odvažovány na analytických vahách. S ohledem na zamýšlené měření bylo odvažované množství každého vzorku stanoveno na $0,25 \pm 0,05$ mg. Každý skořápkový plod byl odvážen celkem třikrát, aby vzniklo dostatečné množství vzorků pro následné měření. Větší množství vzorků navíc může napomoci odhalit chybu při konečném zpracování dat, tedy přispívá k co nejpřesnějším výsledkům práce. Vzhledem k velmi malému množství byl k odvažování používán skalpel, který byl pro každý druh plodu vždy pečlivě očištěn a vydezinfikován ethanolem. Pro měření bylo celkem připraveno 33 vzorků (tab. 7).

Tabulka 7: Přehled navážek jednotlivých vzorků skořápkových plodů, uvedeno v mg.

Odvážované množství na jednotlivý vzorek (uvedeno v mg)			
Č. vzorku, název plodu (označení)	Vzorek (a)	Vzorek (b)	Vzorek (c)
1, vlašské ořechy (V)	0,28	0,23	0,21
2, kešu ořechy (K)	0,30	0,27	0,21
3, lískové ořechy (L)	0,29	0,27	0,24
4, mandle (D)	0,30	0,25	0,29
5, pistácie (P)	0,25	0,27	0,20
6, arašídny (A)	0,26	0,22	0,24
7, para ořechy (R)	0,24	0,23	0,22
8, pekanové ořechy (E)	0,30	0,20	0,22
9, makadamové ořechy (M)	0,20	0,29	0,25
10, piniové oříšky (N)	0,26	0,28	0,20
11, kokos (O)	0,25	0,29	0,30

2.4 Příprava roztoků potřebných k analýze

Příprava trypsinu pro štěpení

Roztok určený pro štěpení bílkovin ve vzorcích byl připraven dle poměru: koncentrovaný trypsin a hydrogenuhličitan amonný o koncentraci 50 mM (1:50). Pro účely tohoto měření byl roztok připraven v celkovém množství 357 μ l, tzn. 7 μ l trypsinu a 350 μ l hydrogenuhličitanu amonného.

Příprava roztoků pro reverzní fázi

Tento krok zahrnuje využití ZipTip metody, tedy tzv. přečištění a zahuštění na reverzní fázi. V rámci tohoto pracovního úkonu se využívaly celkem tři roztoky: vlhčící roztok (wetting),

ekvilibrační roztok (equilibration) a eluční roztok (elution). Všechny roztoky byly promíchávány za pomoci laboratorní třepačky Vortex s kruhovým pohybem. Připravené roztoky byly používány opakovaně (kapitola 2.6 Purifikace na reverzní fázi).

Složení roztoků:

- **Vlhčící roztok** byl tvořen destilovanou vodou a acetonitrilem v poměru 1:1, připraveno bylo celkem 6 ml vlhčícího roztoku (šest Eppendorf zkumavek), na jednu zkumavku připadalo 500 μ l destilované vody a 500 μ l acetonitrilu.
- **Ekvilibrační roztok** byl tvořen 0,2% kyselinou trifluoroctovou. Přičemž byl roztok připraven v celkovém množství 6 ml (šest Eppendorf zkumavek), na jednu zkumavku tak připadalo 20 μ l 10% trifluoroctové kyseliny a 980 μ l destilované vody.
- **Eluční roztok** byl tvořen acetonitrilem a ekvilibračním roztokem v poměru 1:1, připraveny byly celkem 3 ml elučního roztoku (tři Eppendorf zkumavky), přičemž na zkumavku připadalo 500 μ l acetonitrilu, 10 μ l 10% trifluoroctové kyseliny a 490 μ l destilované vody.

Příprava matrice

Roztok matrice byl připraven po přečištění vzorků na reverzní fázi a těsně před krokem zahrnujícím měření na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Matrice byla připravena v jedné Eppendorf zkumavce tak, že bylo na analytických vahách odváženo 8,5 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB). K odváženému množství DHB bylo přidáno 100 μ l destilované vody 150 μ l ACN a 250 μ l 0,2% TFA.

2.5 Enzymatické štěpení trypsinem

Odvážené vzorky skořápkových plodů byly uzavřeny v Eppendorf zkumavkách a připraveny ke štěpení. Štěpení bylo provedeno za pomoci zředěného pracovního roztoku trypsinu (viz kapitola 2.4 Příprava roztoků potřebných k analýze). Ke každému vzorku byl přidán štěpící roztok trypsinu o objemu 10 μ l. Po přidání roztoku byl vzorek vždy zcela ponořen a ponechán štěpit v uzavřené mikrozkuavce po dobu čtyř hodin za laboratorní teploty (25 °C).

2.6 Purifikace na reverzní fázi

Purifikace neboli přečištění vzorků bylo provedeno za pomoci chromatografie na reverzní fázi C₁₈. V tomto pracovním úkonu byla využita automaticky nastavitelná mikropipeta, na níž se nasadila speciální špička obchodně označovaná jako ZipTip od společnosti Millipore. Využity byly roztoky, jejichž příprava je uvedena v kapitole 2.4.

Před samotným přečištěním byla provedena ještě aktivace reverzní fáze C₁₈ ve špičce za pomoci vlhčícího (aktivačního) roztoku. Promytí nové špičky vlhčícím roztokem o objemu 10 µl bylo provedeno desetkrát. Purifikaci zahrnují následující kroky:

- Po aktivaci byla ZipTip špička promyta taktéž desetkrát ekvilibračním roztokem o objemu 10 µl.
- Pro navázání peptidů byla špička promyta rozštěpeným vzorkem (analytem). Tento úkon byl proveden desetkrát také o objemu 10 µl.
- Poté byl zopakován pětkrát ekvilibrační krok, špička byla promyta pětkrát 10 µl ekvilibračního roztoku. Tento úkon slouží k odstranění přítomných solí a dalších polárních nečistot.
- Nakonec byl vzorek promýván za pomoci 10 µl elučního roztoku. Tento krok vytvořil vhodné podmínky k rozrušení hydrofobních vazeb a také k vymytí peptidů zachycených ve stacionární fázi. Analyt s 10 µl elučního roztoku byl desetkrát nasáván a vypouštěn ze ZipTip špičky, tj. eluován do nové mikrozkušavky.
- ZipTip špička byla opět vymyta vlhčícím roztokem (desetkrát 10 µl), následovaná opět ekvilibrací. Celý proces byl opakován stejně pro všech 33 analyzovaných vzorků. Nakonec byly přečištěné vzorky ponechány přes noc v mrazáku (při -18 °C).

2.7 Měření na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF

Příprava na měření

Přečištěné vzorky, jež byly uchovány v mrazáku (-18 °C), byly druhý den za laboratorní teploty smíchány s matricí. Matrice byla připravena jako směs DHB, ACN, TFA a destilované vody, poměry uvedeny viz výše (kapitola 2.4 Příprava roztoků potřebných k analýze).

Přidávaný objem matrice ke vzorku byl stanoven experimentálně. Na vzorcích 2a, 2b, 2c (kešu ořechy) byly vyzkoušeny celkem tři možnosti poměrů vzorku a matrice (viz tab. 8).

Tabulka 8: Testované objemové poměry vzorku a matrice.

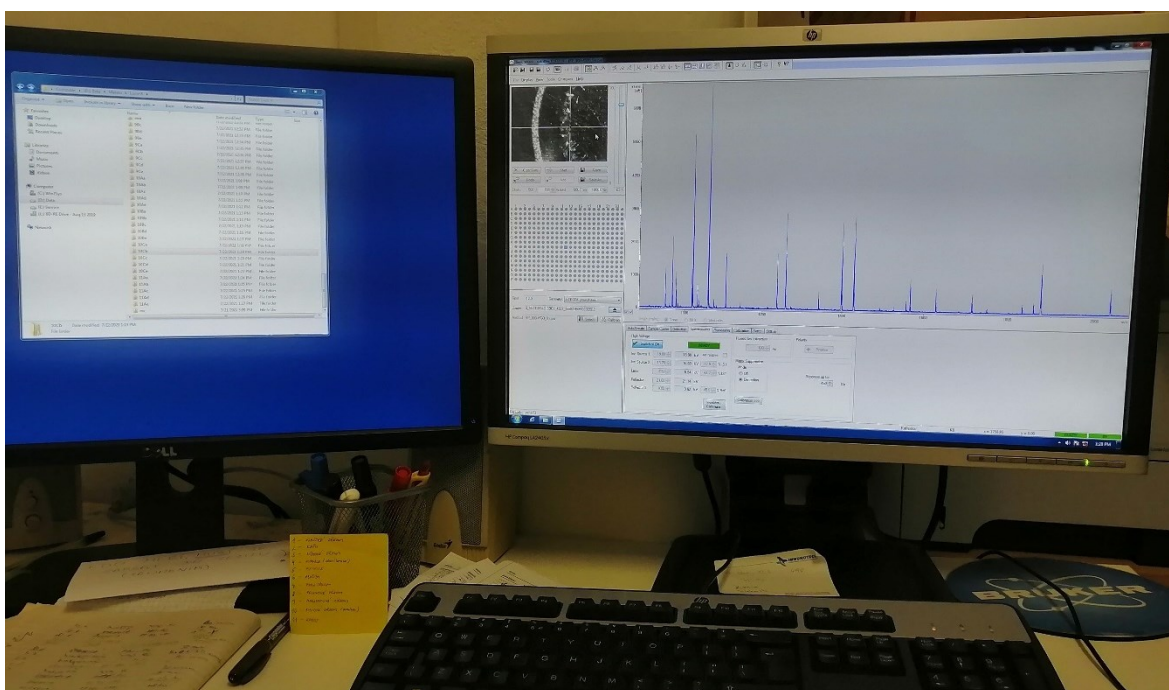
Označení vzorku	Podíl vzorku	Podíl matrice
2a	1	2
2b	2	3
2c	1	3

Na základě tohoto orientačního měření byl poměr vzorku a matrice stanoven na 1:3. Důvodem rozhodnutí bylo především to, že vzorek poskytl nejlépe vypadající spektrum, tzn. intenzivnější píky a ve spektru bylo přítomno obecně méně šumu. Na základě zvoleného poměru byl každý vzorek o objemu 3 μ l smíchán s 9 μ l matrice. Takto připravený vzorek byl opatrně promíchán a následně pipetován v množství 2 μ l na ocelovou destičku se spoty, jež se vkládá do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Každý vzorek byl takto odpipetován pětkrát, proto vždy zaujímal celkem pět spotů. Úhrnem tedy vzniklo 165 spotů z 33 připravených vzorků. Následně byla připravená spotovací destička ponechána přibližně 30 minut schnout.

Vlastní měření pomocí MALDI-TOF MS

Ocelová destička po doschnutí všech vzorků byla opatrně vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). Po vložení destičky se musel přístroj připravit na měření, tzn. nejprve se vytvořilo vakuum uvnitř letové trubice a následně byla provedena kalibrace.

Po dokončené kalibraci bylo možné přistoupit k vlastnímu měření. Analýza probíhala v tzv. reflektroновém módu, jež umožňuje vyšší rozlišení proti lineárnímu módu. Měření probíhalo v celkovém rozsahu 900–4500 Da a za intenzity laseru 82 % (o vlnové délce 337 nm). Spektrum (obr. 7) každého spotu bylo tvořeno vždy ze 3000 laserových pulsů.



Obrázek 7: Reálné získávání spektra za pomoci měření na MALDI-TOF MS. Na monitoru (vpravo) je zobrazeno spektrum složené ze 3000 laserových pulsů pro vzorek kokosu (foto autor, 22.7.2021).

2.8 Vyhodnocení hmotnostních spekter

Získaná spektra měřením na MALDI-TOF MS byla následně zpracována PCA. Ta byla využita zejména proto, aby bylo možné jednotlivé vzorky porovnávat mezi sebou. Jedná se o metodu matematickou, jež umožňuje získat velké množství grafických zobrazení dle našich potřeb a preferencí. Analýza byla provedena za pomoci počítačového programu R (verze 4.1.0), při jejím provedení byly vyhledávány jednotlivé analogie i odlišnosti napříč naměřenými spektry. Zhodnocení spekter bylo provedeno v režimu normalizace 2 a bylo získáno odpovídající grafické znázornění (kapitola 3 Výsledky a diskuze). Naměřená spektra byla také hodnocena pomocí programu mMass, (verze 5.5.0) s následným zpracováním v databázovém systému PostgreSQL (verze 14.2), díky čemuž byly rozklíčovány konkrétní charakteristické hodnoty m/z . Vyhodnocení získaných spekter podpořilo identifikovatelnost každého druhu plodu a rozklíčovat rozdíly mezi vybranými druhy skořápkových plodů.

3 Výsledky a diskuze

Pro stanovení odpovědi, zda je možné vybrané druhy skořápkových plodů od sebe rozlišit na základě jejich proteinového složení, byla primárně využita hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF s následným vyhodnocováním dat pomocí analýzy hlavních komponent (kapitola 3.1 Rozlišení vzorků na základě vyhodnocení z PCA) a hodnocením všech spekter v programu mMass (kapitola 3.2 Vyhodnocení dat v mMass s následným databázovým zpracováním). Druhou využitou metodou byla citlivější LC-MS/MS, jež doplňuje předchozí data o konkrétní nalezené proteiny (kapitola 3.3 Výsledky vyplývající z měření pomocí LC-MS/MS).

PCA umožnila každé vzniklé spektrum zjednodušit do jediného bodu. Spektra patřící jednomu konkrétnímu druhu skořápkového plodu by se měla v ideálním případě seskupovat do soudržných skupin a potvrzovat tak společné vlastnosti. Zároveň platí, že pro odlišení jednotlivých skořápkových plodů od sebe navzájem by se tyto soudržné bodové skupiny (klastry) neměly překrývat. Nejprve byly porovnány všechny skořápkové plody, poté byly postupně odstraňovány druhy, které vykazovaly velmi dobrou schopnost odlišení se od ostatních druhů. Postupně tedy vzniklo několik menších skupin plodů tak, aby byla zřetelná diference i těch na první pohled méně odlišitelných. Schopnost odlišení od sebe navzájem byla navíc zkoumána i na základě množství bílkovin ve složení jednotlivých plodů, díky čemuž vznikly dvě menší skupiny s daným kritériem pro porovnávání.

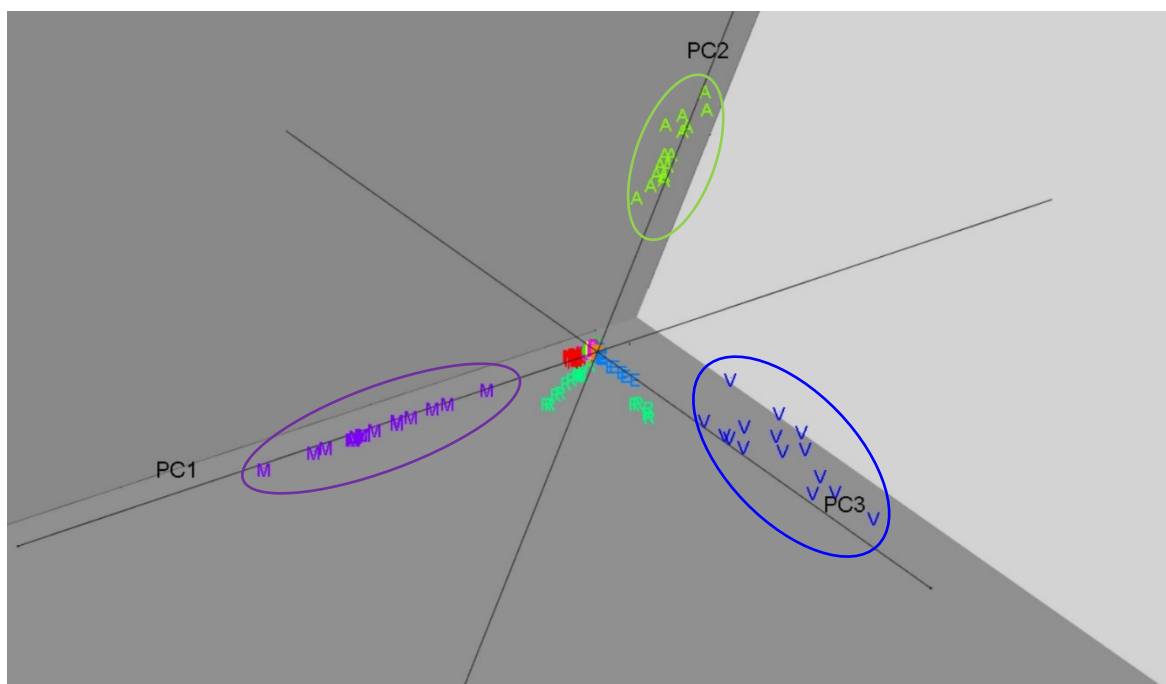
Zjednodušený pohled skrze PCA vyhodnocení otevřel otázku, zdali bude pro každý plod ve spektru existovat charakteristická hodnota hmotnosti (respektive poměru hmotnosti a náboje) nalezených peptidů. Pro zjištění odpovědi byly rozeznatelné píky u každého spektra označeny a následně všechny hodnoty poměru hmotnosti a náboje (m/z) porovnávány mezi sebou. Hodnoty byly srovnávány s ohledem na druh plodu, ale také napříč všemi ostatními plody.

Všechny plody byly rovněž analyzovány pomocí LC-MS/MS, kde získaná data přímo určují obsah konkrétních proteinů a počet peptidů, jež potvrzuje, že se skutečně jedná o určený protein. Kritériem pro potvrzení daného proteinu je minimální výskyt dva peptidy na nalezený protein. Proteiny, u nichž byl nalezen pouze jediný peptid, nejsou považovány za relevantní a byly tak pro další práci s daty vyřazeny. Výsledky této metody byly zpracovány

formou tabulkových přehledů nejčastěji zastoupených a druhově specifických proteinů. U části z nich byla pak diskutována funkce daných proteinů v semenech a rostlinném těle obecně.

3.1 Rozlišení skořápkových plodů na základě vyhodnocení z PCA

Rozlišení pomocí PCA bylo nejprve provedeno jako vyhodnocení všech vzorků najednou, tzn. v rámci jediného grafického zpracování. Na obr. 8 je toto zpracování ve formě trojrozměrného grafu, který zobrazuje každé spektrum jako jediný bod v grafu. Na obrázku jsou znázorněny všechny vzorky (arašídy, kešu, kokos, lískové ořechy, makadamové ořechy, mandle, para ořechy, pekanové ořechy, piniové oříšky, pistácie a vlašské ořechy), které jsou rozmístěné mezi třemi hlavními komponentami (PC1, PC2, PC3). Jednotlivé body jsou označeny barevným písmenem, pro větší přehlednost jsou jednotlivá označení včetně barvy uvedeny v popisku obrázků (písmenné označení je taktéž uvedeno v tab. 7 na str. 47).

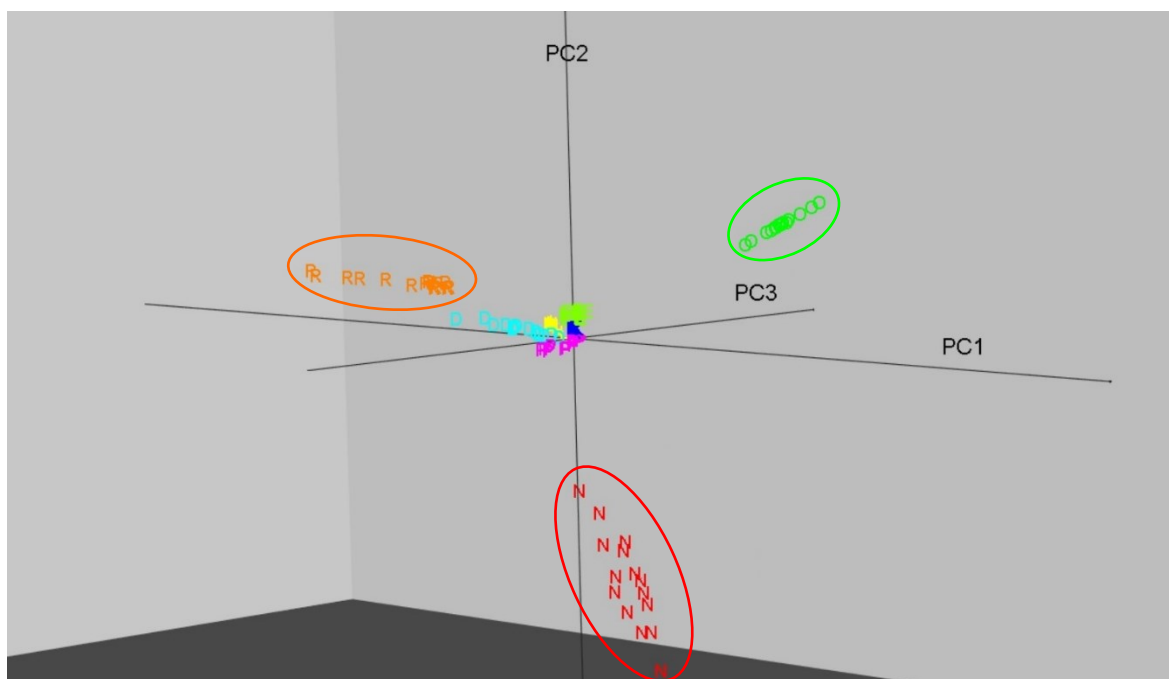


Obrázek 8: PCA vyhodnocení všech vzorků zkoumaných skořápkových plodů: arašídy (A), kešu ořechy (K), kokos (O), lískové ořechy (L), makadamové ořechy (M), mandle (D), para ořechy (R), pekanové ořechy (E), piniové oříšky (N), pistácie (P), vlašské ořechy (V).

Na první pohled je zřejmé, že jednotlivé vzorky stejných plodů jsou v určitých skupinách a jejich rozlišitelnost v určité podobě bude možná, nicméně v celkovém náhledu na obr. 8 ale není možné dobře rozlišit všechny plody. Významně se odlišují pouze arašídy (**A**), makadamové ořechy (**M**) a vlašské ořechy (**V**).

V souvislosti s hodnocením skupiny vzorků je také důležitá jejich variabilita, jejíž konkrétní hodnoty byly získány z prostředí programu R, variability na prvních třech komponentách doplňují matematický pohled na 3D zobrazení. Variabilita v rámci rozlišování všech vzorků dosahovala na PC1 29,3 %, na PC2 10,5 % a na PC3 9,7 %. Procentuální vyjádření odlišnosti jednotlivých druhů napovídá, že v rámci první komponenty jsou spektra poměrně rozdílná napříč všemi druhy, což potvrzuje i obrázek 8, kde jsou patrné shluky jednotlivých vzorků (barevných písmen).

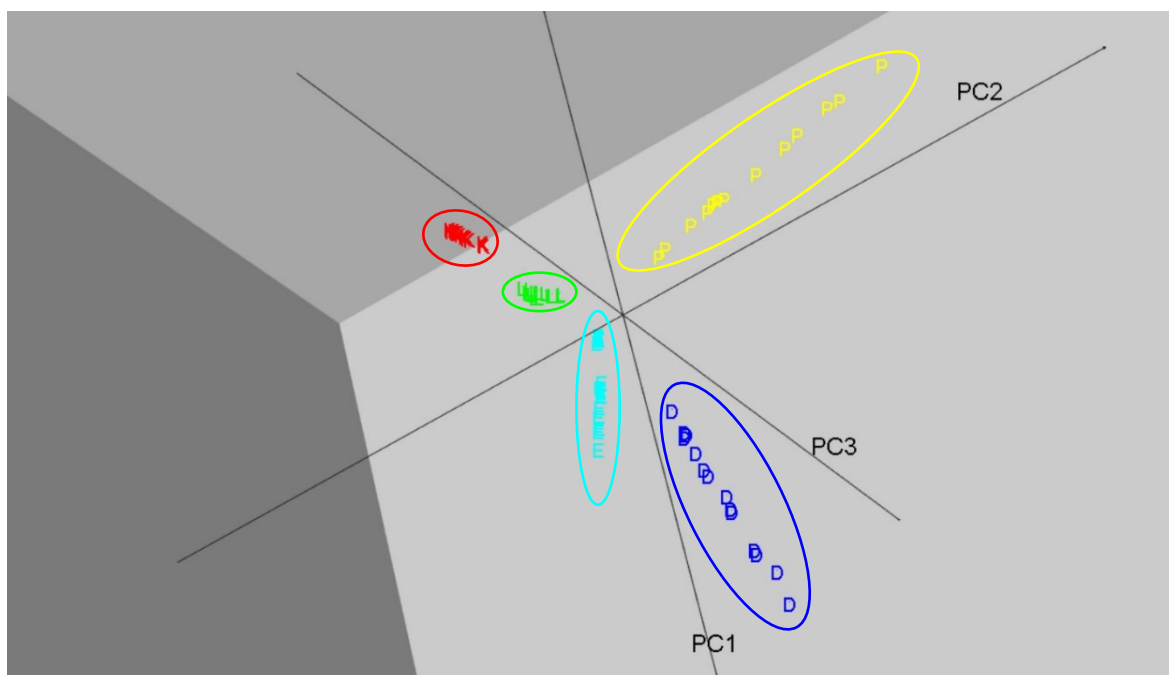
Pro další hodnocení v analýze hlavních komponent byly odebrány tři nejvíce se odlišující plody, tzn. arašídy (**A**), makadamové ořechy (**M**) a vlašské ořechy (**V**) a byla opětovně zjišťována variabilita na jednotlivých komponentách včetně celkového pohledu soudržných skupin odpovídající konkrétním zkoumaným plodům. V následujícím 3D zobrazení (obr. 9) bylo zpracováno zhodnocení tentokrát osmi druhů (kešu, lískové, mandle, pistácie, para ořechy, pekanové ořechy, piniové oříšky a kokos). Ze zobrazení je zřejmé, že podobně jako na obr. 8 ještě nebude zcela možná odlišitelnost všech plodů. Ačkoli odlišitelnost u zmenšeného penza vzorků není stoprocentní, i tak je možné již lépe odlišit některé skořápkové plody, jež na obr. 8 tvořily „neodlišitelný shluk“. Na obr. 9 je dobře rozlišitelný kokos (**O**), para ořechy (**R**) a piniové oříšky (**N**).



Obrázek 9: PCA vyhodnocení osmi skořápkových plodů v 3D zobrazení: kešu (**K**), kokos (**O**), lískové ořechy (**L**), mandle (**D**), para ořechy (**R**), pekanové ořechy (**E**), piniové oříšky (**N**), pistácie (**P**).

Při hodnocení této zmenšené skupiny byla brána také v potaz variabilita mezi zkoumanými plody. Ta v tomto případě dosahovala na komponentě PC1 16,6 %, na PC2 12,2 % a na PC3 10,7 %. Procentuální vyjádření odlišností osmi zkoumaných plodů je již nižší než v celkovém hodnocení (všech jedenácti druhů). Přesto však se jedná o přijatelnou variabilitu, díky čemuž se alespoň část plodů opět více odlišuje.

Pro získání co možná nejvíce detailního výsledku, zda je skutečně možné od sebe jednotlivé plody odlišit byly opět odebrány tři nejvíce se odlišující plody v této skupině, tzn. kokos (**O**), para ořechy (**R**) a piniové oříšky (**N**). A stejným způsobem bylo získáno 3D zobrazení zbývajících skořápkových plodů, v němž se promítly jednotlivé body zastupující konkrétní vzorky skořápkového plodu. V následujícím trojrozměrném zobrazení (obr. 10) bylo provedeno zhodnocení tentokrát pěti vzorků (kešu, lískových ořechů, mandlí, pistácií a pekanových ořechů). Ze zobrazení je již patrné, že všech pět skořápkových plodů je možné odlišit v rámci jednoho zpracování. Na obr. 10 jsou již dobře odlišeny veškeré plody: kešu (**K**), lískové ořechy (**L**), mandle (**D**), pistácie (**P**) a pekanové ořechy (**E**).



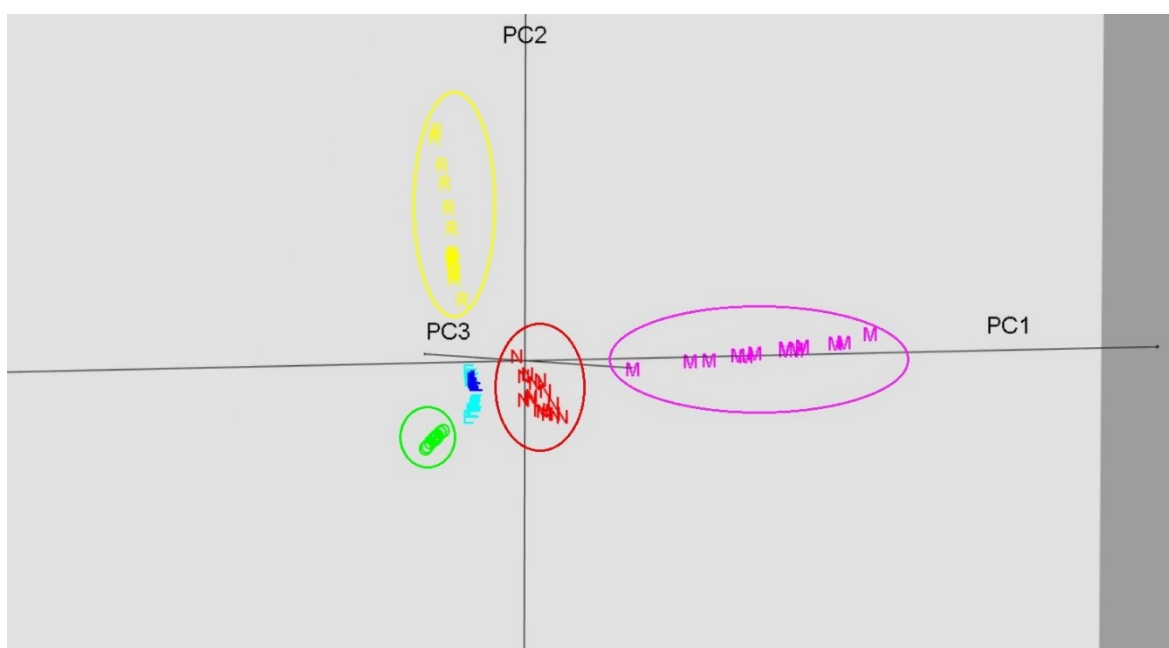
Obrázek 10: PCA vyhodnocení pěti skořápkových plodů: kešu (**K**), lískové ořechy (**L**), mandle (**D**), pekanové ořechy (**E**), pistácie (**P**).

Při hodnocení nejmenší skupiny posledních pěti plodů byla taktéž hodnocena variabilita mezi zkoumanými plody. Variabilita na komponentách dosáhla na PC1 22,0 %, na PC2 16,6 % a na PC3 16,1 %, to značí poměrně vysoké variability na druhé a třetí komponentě, díky čemuž jsou druhy plodů velmi dobře odlišitelné.

Procentuální vyjádření odlišností posledních pěti zkoumaných vzorků je poměrně vysoké v porovnání s předchozími dvěma skupinami plodů. Hodnoty jednotlivých variabilit doplňují vizuální vjem a potvrzují, že již není třeba dalšího oddělení pro odlišení plodů, jako to bylo v případech uvedených na obr. 8 a 9.

Z výše uvedených výsledků je patrné, že variabilita ve větší skupině vzorků kolísá, což je také přirozeně způsobeno možnostmi programu. Nicméně lze ale říci, že rozlišitelnost bude možná, pokud bude zvolen počet porovnávaných vzorků maximálně pět. V menších skupinách bude rozlišitelnost téměř stoprocentní, ve skupinách obsahující větší počet porovnávaných druhů již může docházet k překryvům, proto bude nutné k úplnému rozlišení vždy odebrat nejlépe odlišitelné druhy. Tato tvrzení byla ověřena na rozlišení skořápkových plodů s ohledem na množství bílkovin jakožto makroživin ve vzorku. Kritérium pro vznik

první rozlišované skupiny bylo **množství bílkovin do 15 g na 100 g plodů**, tuto skupinu zahrnuje celkem šest plodů (kokos, lískové ořechy, makadamové ořechy, para ořechy, pekanové ořechy a piniové oříšky). Na obrázku (obr. 11) je patrné dobré odlišení čtyř plodů z této skupiny. Jsou jimi kokos (**O**), makadamové ořechy (**M**), para ořechy (**R**) a piniové oříšky (**N**).

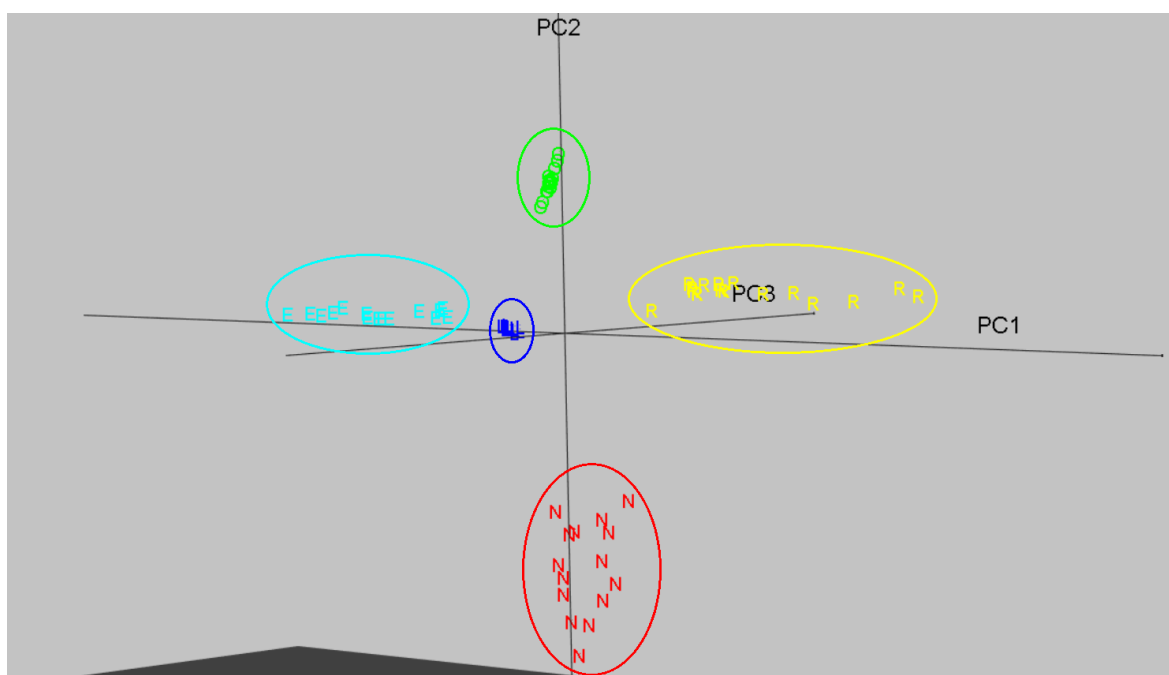


Obrázek 11: PCA vyhodnocení skořápkových plodů s ohledem na nižší zastoupení bílkovin (méně než 15 g na 100 g plodů) v 3D zobrazení, kokos (**O**), lískové ořechy (**L**), makadamové ořechy (**M**), para ořechy (**R**), pekanové ořechy (**E**) a piniové oříšky (**N**).

V rámci této skupiny dochází k mírnému překryvu lískových ořechů (**L**) a pekanových ořechů (**E**), rozlišitelnost tedy není stoprocentní. Přestože se nepodařilo v rámci této skupiny odlišit všechny plody v jednom 3D zobrazení, tak tato skupina vykazuje významně vysokou variabilitu na první komponentě PC1, která činí 45,9 %, na dalších dvou je již variabilita poměrně nízká; na PC2 13,1 % a na PC3 9,4 %, což i číselně potvrzuje neodlišitelnost veškerých porovnávaných plodů.

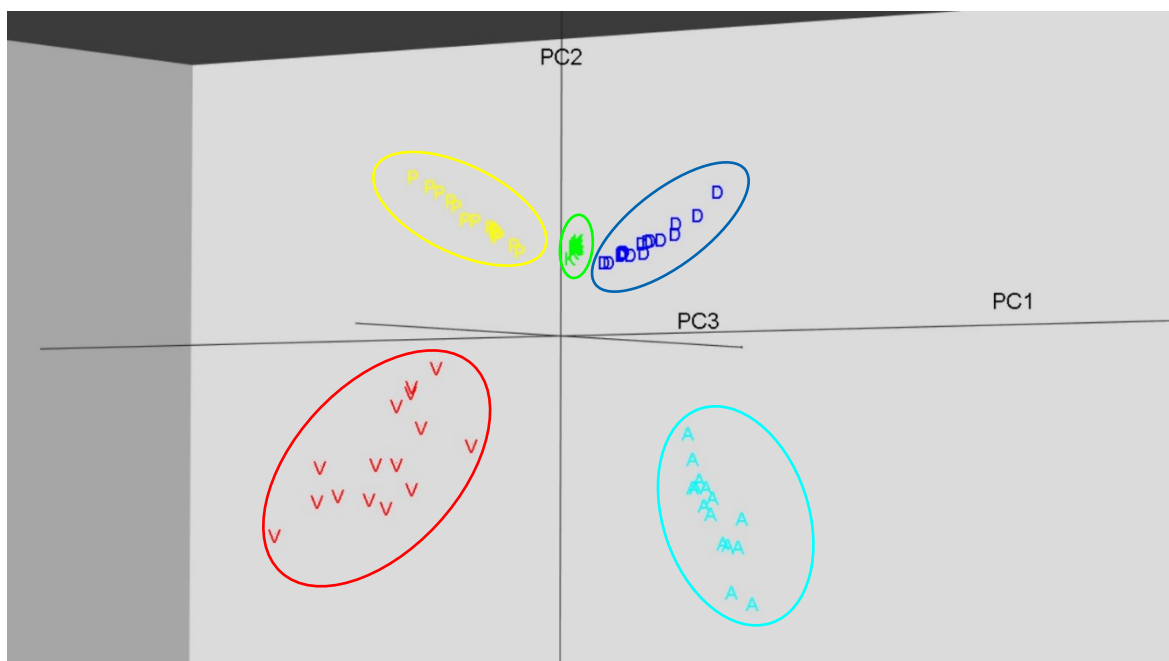
Z tohoto hlediska byly odebrány, makadamové ořechy (**M**), jako jedny z nejlépe odlišujících se plodů. Na obr. 12 je k dispozici odlišení skupiny skořápkových plodů po odebrání

makadamových ořechů se stále zvoleným kritériem, tzn. obsahují do 15 g bílkovin na 100 g plodů. Úplné rozlišení skořápkových plodů v souvislosti s vyobrazením na obr. 12 s sebou nese lehce odlišnou míru variability komponent: na PC1 25,1 %, na PC2 18,4 % a na PC3 15,1 %. Míra variability na první komponentě není tolik vysoká, ale doplňuje ji druhá a třetí komponenta s poměrně vysokou hodnotou, a je tak i matematicky podpořena dostatečně vysoká variabilita pro odlišení všech pěti druhů skořápkových plodů.



Obrázek 12: PCA vyhodnocení skořápkových plodů s ohledem na nižší zastoupení bílkovin (méně než 15 g na 100 g plodů) v 3D zobrazení, po odebrání makadamových ořechů; kokos (O), lískové ořechy (L), para ořechy (R), pekanové ořechy (E) a piniové oříšky (N).

Druhou porovnávanou skupinou plodů byla skupina s kritériem **množství bílkovin více než 15 g na 100 g plodů**, skupinu zahrnuje celkem pět plodů. V tomto případě je očekáváno úplné rozlišení již v rámci jednoho 3D zobrazení. Na obrázku (obr. 13) je toto odlišení skutečně kompletní, skupina zahrnuje následující plody: arašidy (A), kešu (K), mandle (D) pistácie (P) a vlašské ořechy (V).



Obrázek 13: PCA vyhodnocení skořápkových plodů s ohledem na vyšší zastoupení bílkovin (více než 15 g na 100 g plodů) v 3D zobrazení, arašidy (A), kešu (K), mandle (D) pistácie (P) a vlašské ořechy (V).

Odlišení patrné z obr. 13, podporují i hodnoty variabilit jednotlivých komponent, které v tomto případě činí na PC1 28,8 %, na PC2 25,2 % a na PC3 13,1 %. Komplexně je variabilita velmi vysoká pro odlišení všech pěti druhů skořápkových plodů, jež splňují kritérium množství bílkovin nad 15 g na 100 g plodů.

Celkové rozlišení skořápkových plodů pomocí analýzy hlavních komponent bylo úspěšné. Kromě toho je poměrně dobře realizovatelné prostřednictvím několika málo 3D zobrazení. Pokud se navíc jedná o menší skupinu se zadaným kritériem je velmi vysoká šance, že rozlišení bude možné za pomoci jediného maximálně však dvou 3D zobrazení v PCA.

3.2 Vyhodnocení dat v mMass s následným databázovým zpracováním

S ohledem na úspěšné rozlišení všech vzorků pomocí PCA analýzy, bylo přistoupeno k hodnocení původních (nezjednodušených) hmotnostních spekter. Cílem posuzování spekter bylo získat charakteristické hodnoty hmotností, respektive m/z pro každý skořápkový plod. Jednotlivé píky každého spektra byly v prostředí programu mMass ručně označovány, čímž vzniklo 165 seznamů vytipovaných hodnot, tj. 15 seznamů hodnot m/z pro každý druh plodu.

Seznamy byly převedeny do prostředí databázového systému PostgreSQL, který představuje systém využívaný obecně pro vyhodnocování velkých objemů dat. Pro vyfiltrování hodnot nebo získání konkrétních informací musí být stanovena určitá kritéria hodnocení dat. Na základě zadaných kritérií jsou poté do databázového systému zadávány příkazy, díky nimž systém prohledává, co je požadováno. V tomto případě se jednalo o 165 seznamů vytipovaných hodnot m/z pro každý vzorek, které byly v prostředí PostgreSQL matematicky porovnávány mezi sebou. S realizací velmi pomohl pan Ing. Roman Kirg, za což mu patří mé poděkování.

Nejprve byly v tomto prostředí vybírány charakteristické hodnoty pro každý skořápkový plod. Kritériem výběru bylo potvrzení dané hodnoty alespoň u 13 z celkového počtu 15 spekter pro každý druh, přičemž byla pro hledané hodnoty stanovena tolerance $\pm 0,3 m/z$. Tento užší výběr pro konkrétní skořápkový plod byl porovnáván s ostatními zúženými výběry charakterizující všech deset zbylých skořápkových plodů.

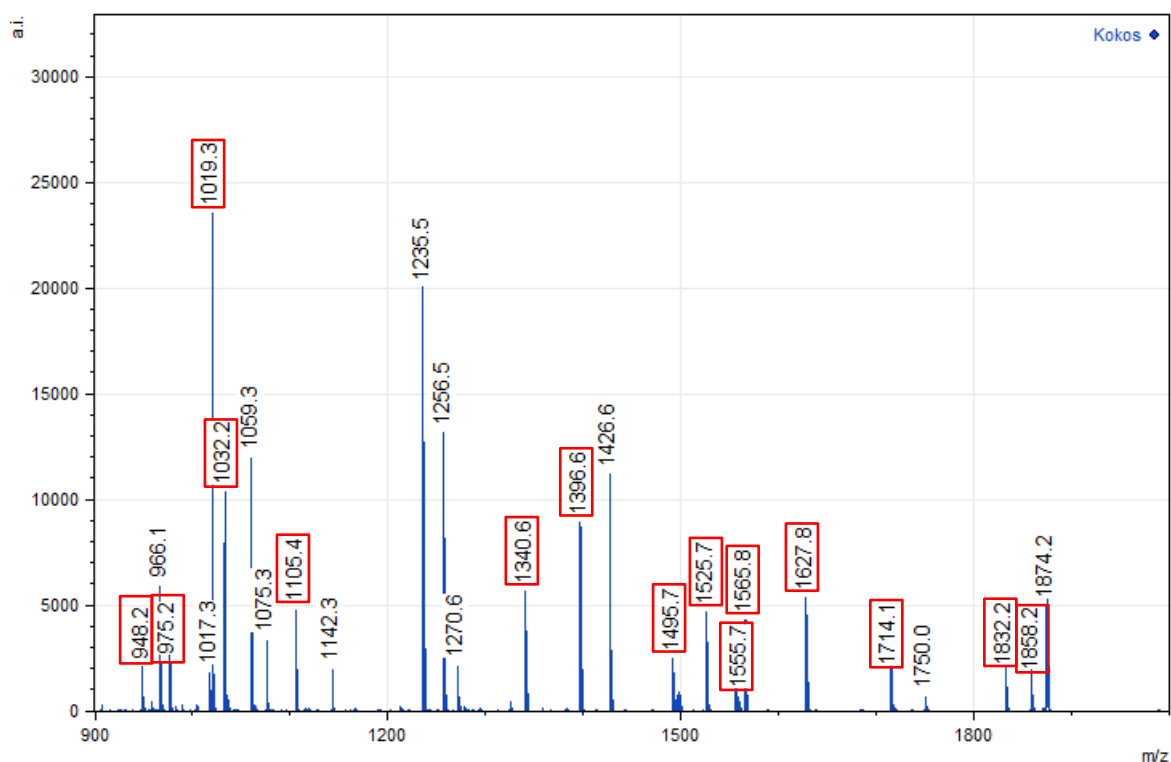
Z těchto předvýběrů byly odstraňovány hodnoty, jež se opakovaly napříč různými druhy. Nové seznamy charakteristických hodnot pro všechny skořápkové plody vznikly tedy tak, že se vždy žádná hodnota z konkrétního předvýběru nesměla opakovat v seznamu předvýběru patřící jinému druhu plodu. I v tomto případě byla stanovena tolerance pro odstranění konkrétní hodnoty ze seznamu charakteristických hodnot na $\pm 0,3 m/z$.

Přehled všech unikátních hodnot s ohledem na druh skořápkového plodu je zpracován v tabulce na následující straně (tab. 9).

Tabulka 9: Seznam unikátních hodnot *m/z* pro všechny zkoumané skořápkové plody (tolerance $\pm 0,3$ *m/z*).

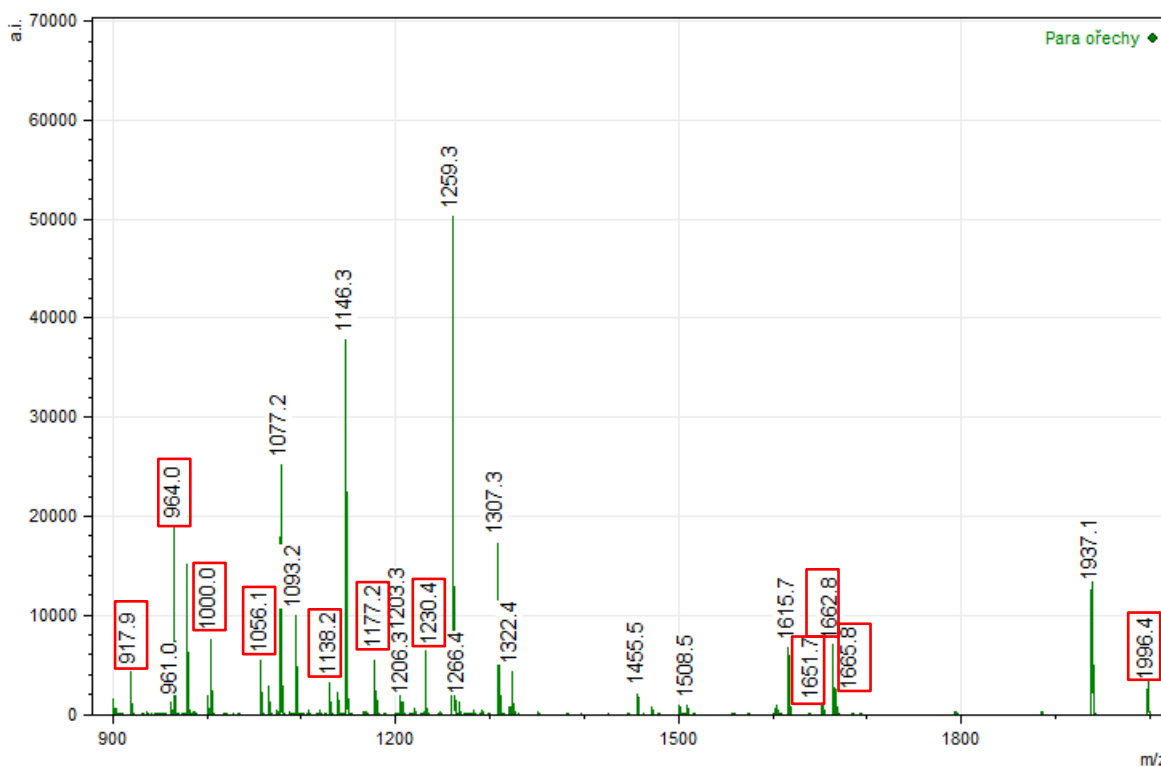
Druh plodu	Hmotnosti charakteristických peptidů, vyjádřeno jako <i>m/z</i>														
Arašidy	1185,1	1288,2	1542,2	1623,3	1895,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kešu ořechy	1160,1	1183,1	1223,1	1469,2	1541,2	1846,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kokos	948,1	975,2	1019,1	1032,1	1105,4	1340,6	1396,7	1495,6	1525,7	1555,7	1565,8	1627,8	1713,9	1832,2	1858,2
Lískové ořechy	919,5	956,5	990,7	1190,2	1438,3	1481,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Makadamové ořechy	1211,2	1520,5	1732,6	1734,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mandle	1007,0	1095,5	1225,2	1405,4	1843,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Para ořechy	918,1	964,1	1000,1	1056,1	1138,2	1177,3	1230,5	1651,7	1662,8	1665,8	1996,4	-	-	-	-
Pekanové ořechy	1004,1	1383,4	1603,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piniové oříšky	945,1	1033,2	1489,6	1546,7	1600,8	1767,2	1770,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Pistácie	1435,3	1505,3	1885,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vlašské ořechy	1064,9	1257,2	1449,3	1577,3	1749,2	1753,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nejvíce charakteristických peptidů bylo objeveno pro kokosový ořech, celkem 15 hodnot m/z , celé spektrum s vyznačenými unikátními hodnotami je zobrazeno na obr. 14.

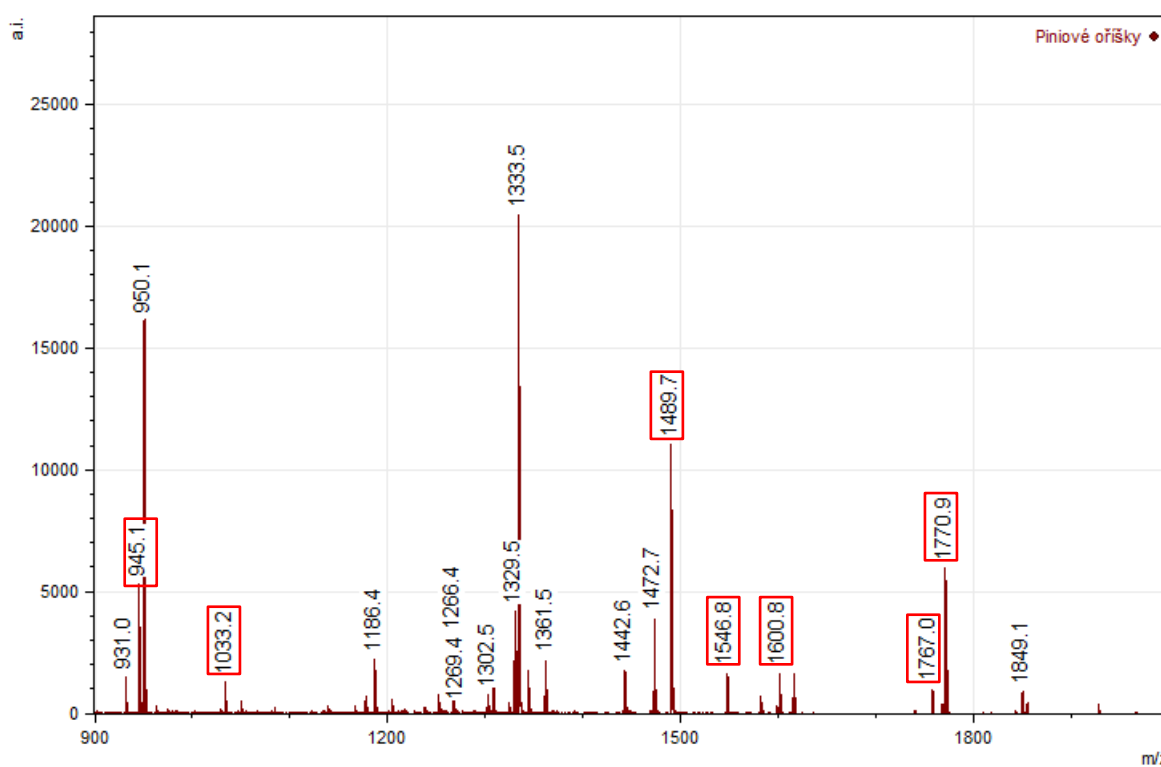


Obrázek 14: Hmotnostní spektrum pro kokos, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

Relativně dlouhý seznam vznikl také pro para ořechy (celkem jedenáct hodnot). Jejich hmotnostní spektrum s vyznačenými charakteristickými hodnotami m/z je na obr. 15. Třetí v pořadí s největším počtem unikátních hodnot m/z jsou piniové oříšky (již jen sedm hodnot), což také přibližně odpovídá průměrnému počtu mezi všemi zkoumanými druhy skořápkových plodů. Hmotnostní spektrum pinových oříšků s vyznačenými charakteristickými hodnotami m/z je na obr. 16.

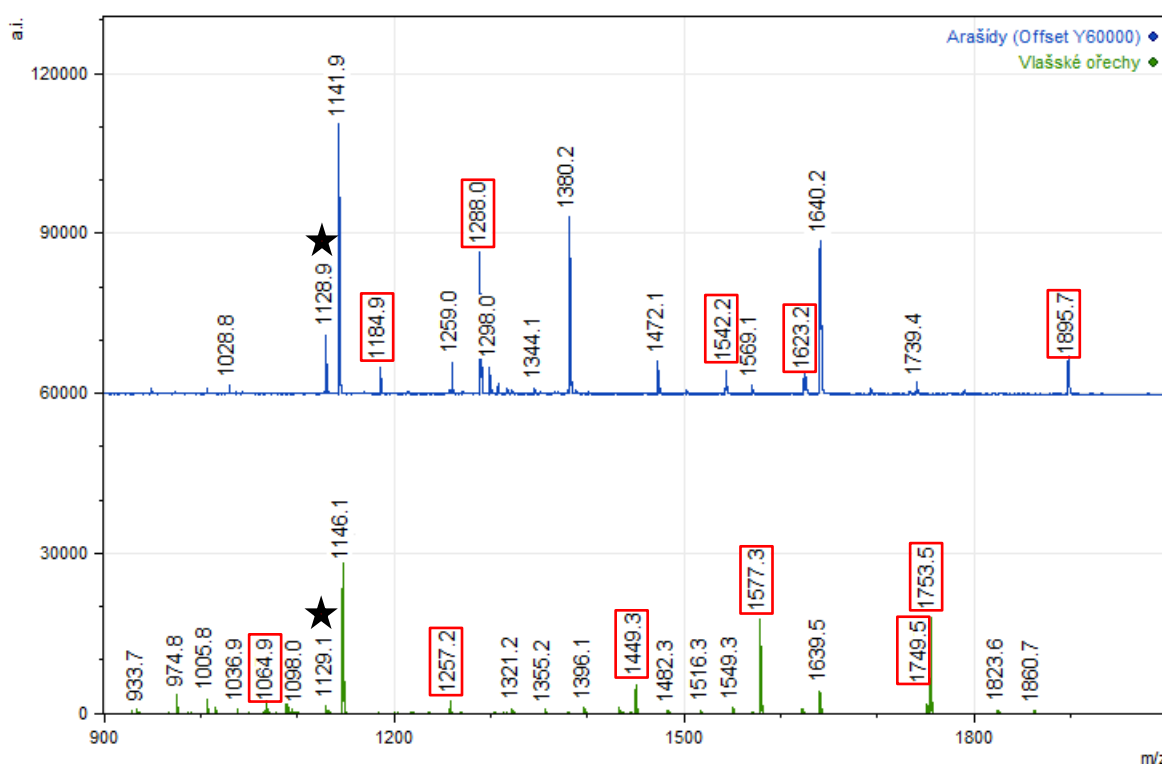


Obrázek 15: Hmotnostní spektrum para ořechů, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).



Obrázek 16: Hmotnostní spektrum pro piniové oříšky, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

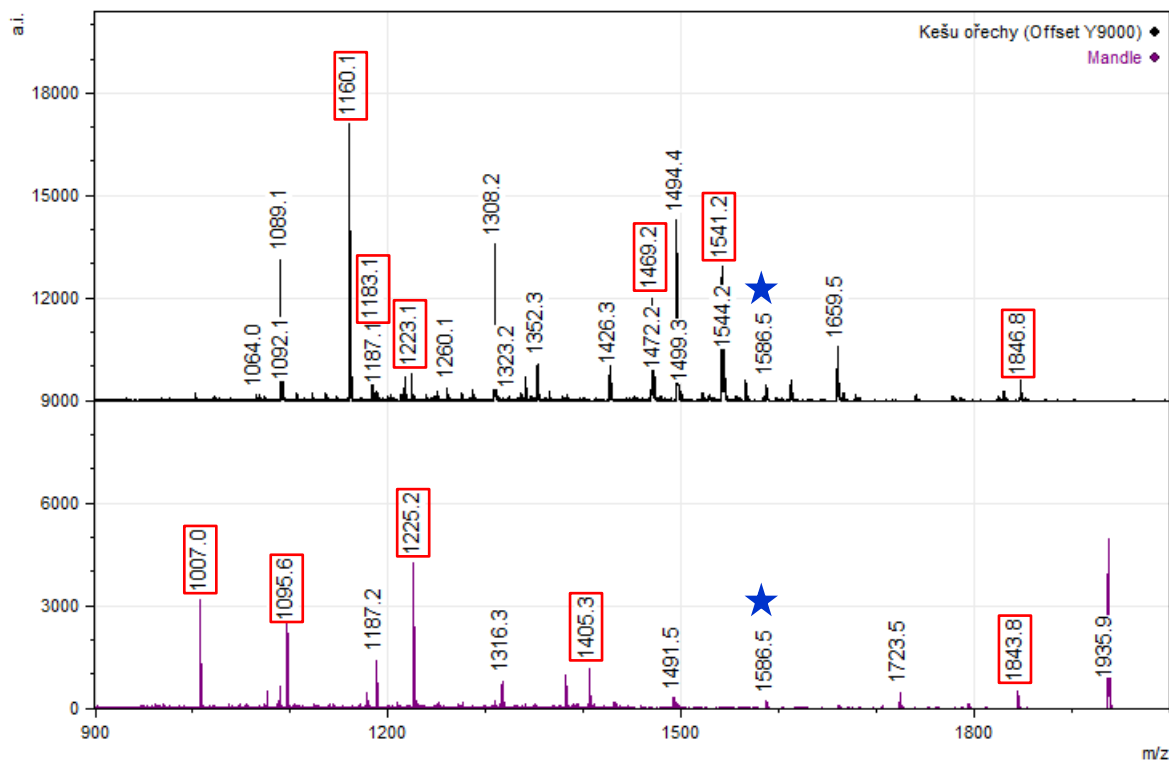
Dalších pět plodů (arašidy, kešu ořechy, liskové ořechy, mandle a vlašské ořechy) vykazuje seznam unikátních peptidů s počtem pět nebo šest. Hmotnostní spektra těchto pěti plodů byla zpracována do třech následujících obrázků. Na obr. 17 je uvedena dvojice plodů: arašidy a vlašské ořechy. V rámci porovnání těchto spekter si lze povšimnout shodných hodnot ($\pm 0,3 m/z$), které na základě shody nemohly být do seznamu unikátních hodnot zařazeny, jedná se o: $1128,9 m/z$ v hmotnostním spektru arašidů a $1129,1 m/z$ v hmotnostním spektru vlašských ořechů.



Obrázek 17: Porovnání hmotnostních spekter arašidů a vlašských ořechů, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z , hvězdičkou jsou pak označeny shodné hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

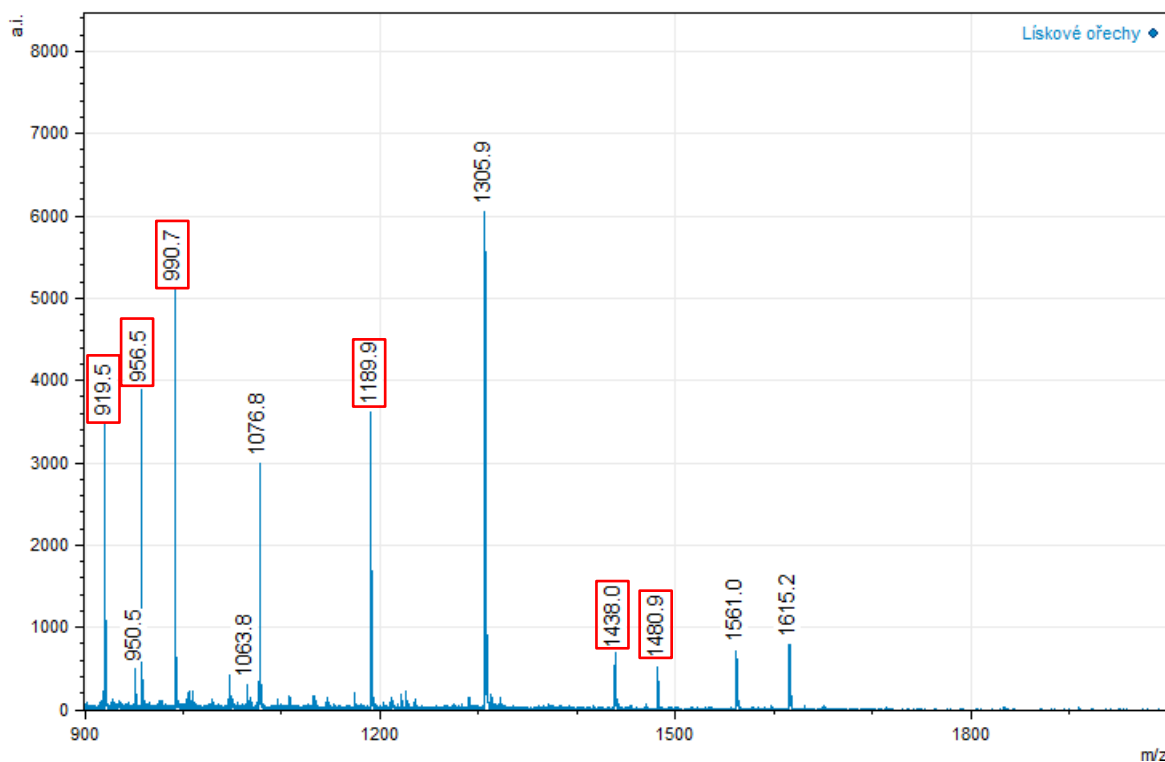
V rámci druhé dvojice jsou porovnávány hmotnostní spektra kešu ořechů a mandlí. Na obr. 18 je taktéž patrná shoda hodnot: $1586,5 m/z$ v hmotnostním spektru kešu ořechů i ve spektru mandlí. Takových shod bylo v celkovém penzu dat samozřejmě více a byly také odfiltrovány pomocí databázového systému PostgreSQL. Klíčové ovšem je, zda se hodnoty dostaly do užšího výběru. V případě shody u arašidů a vlašských ořechů se jednalo skutečně o hodnoty patřící mezi charakteristický předvýběr, jelikož se vyskytly v 15 z 15 spekter (u obou plodů).

V druhém případě (dvojice kešu ořechy a mandle) tomu tak nebylo, hodnota se sice vyskytuje napříč mnoha spektry, ale kritérium výskytu alespoň u 13 z 15 spekter nebylo splněno ani u jednoho plodu z této dvojice.



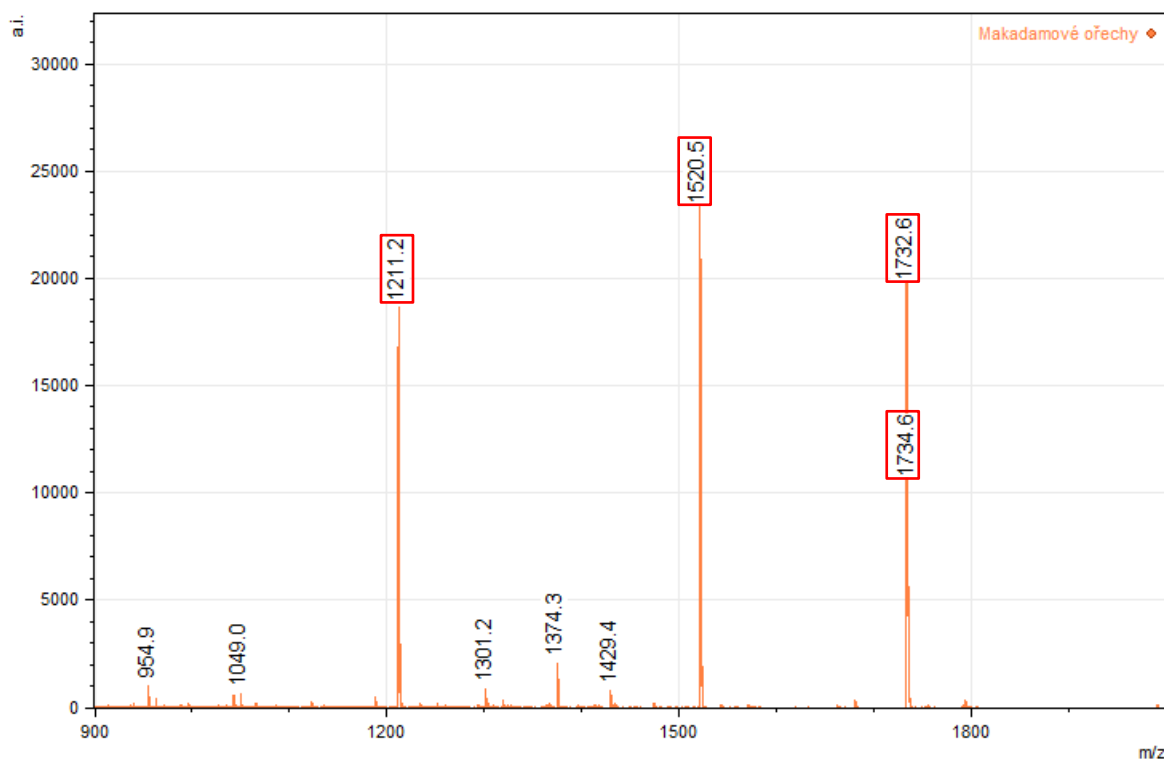
Obrázek 18: Porovnání hmotnostních spekter kešu ořechů a mandlí a vlašských ořechů, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z , hvězdičkou jsou pak označeny shodné hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

Poslední z této pětičky, tzn. lískové ořechy, mají hmotnostní spektrum s vyznačenými charakteristickými hodnotami na obr. 19.



Obrázek 19: Hmotnostní spektrum pro lískové ořechy, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

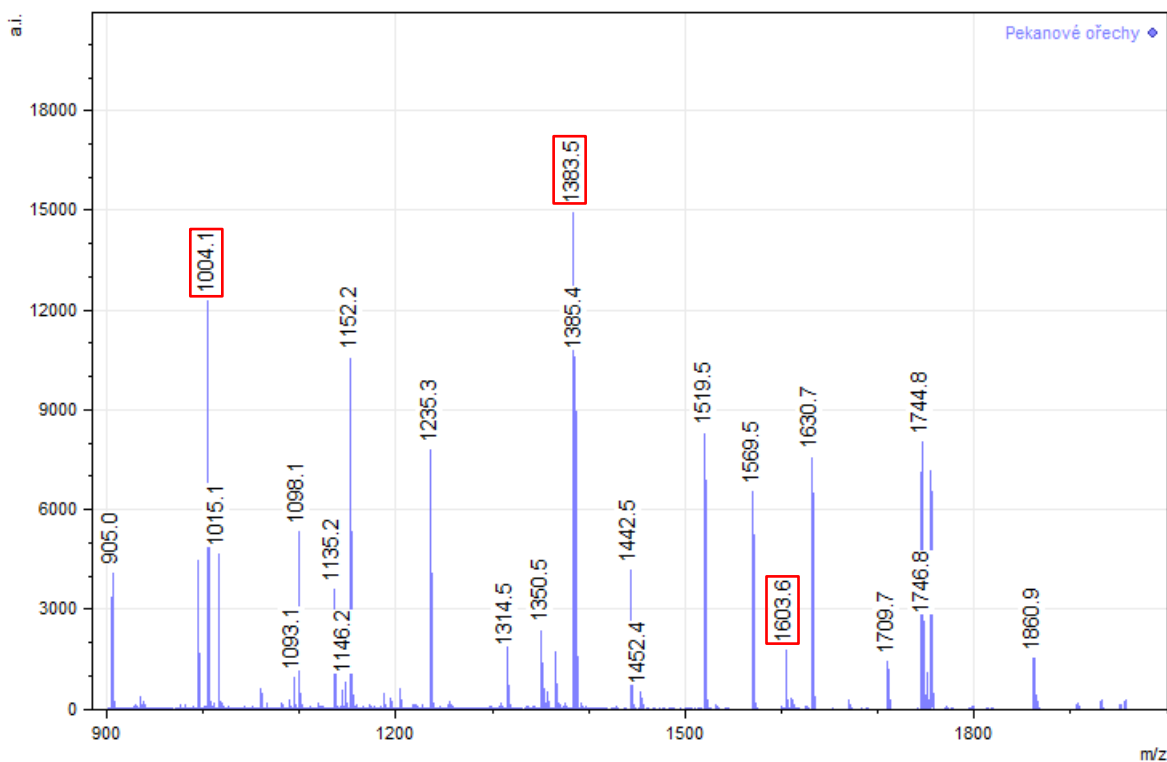
Naopak nejmenší počet unikátních hodnot vykazovaly makadamové ořechy, pekanové ořechy a pistácie. Zatímco makadamové ořechy jsou charakterizovány čtyřmi unikátními peptidy, tak pekanové ořechy a pistácie již pouze třemi charakteristickými peptidy na plod. Přestože se nejedná o příliš vysoký počet, tak u makadamových ořechů je tento výsledek očekávaný. Makadamové ořechy mají totiž poměrně „chudé“ hmotnostní spektrum, jež je vyobrazeno na obr. 20.



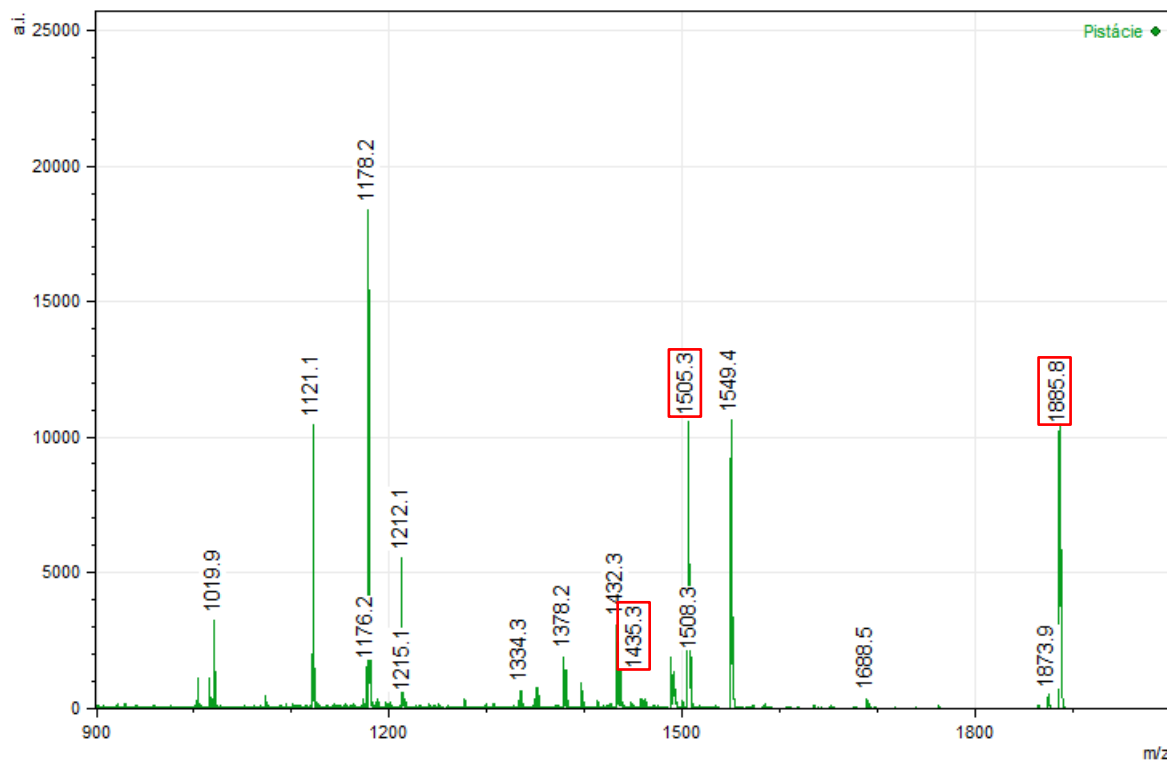
Obrázek 20: Hmotnostní spektrum pro makadamové ořechy, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

V případě pekanových ořechů (obr. 21) a pistácií (obr. 22) jsou k dispozici naopak spektra poměrně „bohatá“, i tak ovšem neposkytují vysoký počet unikátních hodnot. V obou případech je důvodem to, že na počátku naprostá většina hodnot nesplňuje kritérium výskytu ve 13 z 15 spekter (s tolerancí $\pm 0,3 m/z$), ani v jednom případě tak nevznikl příliš dlouhý předvýběr, který byl navíc ještě redukován ve smyslu porovnání s ostatními předvýběry.

Přestože některé plody neposkytují příliš rozsáhlý počet unikátních hodnot m/z , o to přesnější je to ale informace z hlediska identifikovatelnosti. Pro potvrzení skořápkového plodu v hmotnostním spektru neznámého vzorku je klíčové určení přítomnosti všech unikátních hodnot m/z odpovídající danému plodu (se stanovenou přípustnou odchylkou $\pm 0,3 m/z$).



Obrázek 21: Hmotnostní spektrum pro pekanové ořechy, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).



Obrázek 22: Hmotnostní spektrum pro pistácie, v rámečcích jsou unikátní hodnoty m/z (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

3.3 Výsledky vyplývající z měření pomocí metody LC-MS/MS

Pomocí kapalinové chromatografie LC-MS/MS byl získán přehled nalezených proteinů včetně počtu peptidů, kterými byly ve vzorcích potvrzeny. Vzhledem k tomu, že všech jedenáct vzorků je rostlinného původu, tak výsledky byly porovnány s rostlinnou databází proteinů Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Toto porovnání funguje na principu srovnání sekvence přítomných peptidů, tzn. s proteinovou knihovnou. Nalezené sekvence tak mohou odpovídat části proteinů, jež se v databázích nachází. Na jejich základě může být pak přiřazen konkrétní protein.

Metoda je velmi citlivá, proto je možné určit s velmi vysokou pravděpodobností, o jaký protein se jedná. Nicméně jeho původ nemusí být vždy přiřazen odpovídajícímu rostlinnému druhu, s čímž se pojí několik důvodů. Stejně jako u živočichů se u rostlin vyskytují proteiny, které mají jednotlivé druhy společné a na základě toho není možné stejné sekvence u více druhů odlišit. Mezi tyto proteiny lze řadit například enzymy odpovídající za správný průběh fotosyntézy. Dalším důvodem může být, že dostupná knihovna proteinů neobsahuje proteiny všech rostlinných (ani živočišných) druhů. Proto je konkrétní sekvence přiřazena k druhu s již známou sekvencí aminokyselin, která odpovídá nalezenému peptidu ve vzorku. Teoretickým důvodem také může být kontaminace, s ohledem na dobré odlišení vzorků za pomoci PCA byl tento důvod ale vyloučen. Kontaminace by byla možná spíše vlastním zaviněním, jelikož se jednalo o nově připravované vzorky nikoli tentýž vzorky využitě pro měření na MALDI-TOF MS s následným PCA vyhodnocením.

Přesto však bylo touto metodou téměř u všech vzorků nalezeno několik desítek proteinů, které charakterizují proteinovou povahu skořápkových plodů, respektive semen z botanického pohledu. Vzhledem k velikému množství nalezených proteinů byl vypracován přehled nejvíce zastoupených proteinů napříč jednotlivými vzorky (tab. 10). Kratší přehled byl také zpracován s ohledem na druhově specifické proteiny (tab. 11), tedy proteiny, u nichž byl potvrzen původ daného rostlinného druhu. Souhrny všech nalezených proteinů pro každý vzorek (po odstranění proteinů, jež nebyly potvrzeny minimálně dvěma peptidy) jsou k dispozici v přílohách této práce (Přílohy) počínaje stranou I.

Přehled v tabulce 10 shrnuje nejvíce zastoupené (nalezené) proteiny napříč vzorky. Celkem je uvedeno patnáct proteinů, jež se vždy objevily nejméně u čtyř zkoumaných plodů. Toto

kritérium bylo doplněno o údaj s průměrným počtem unikátních peptidů na daný protein včetně směrodatné odchylky. Pořadí v tabulce 10 je vytvořeno s klesajícím průměrným počtem peptidů na konkrétní protein. Nejnižše postavené proteiny mohou i přesto vykazovat poměrně vysoké zastoupení napříč všemi vzorky, ovšem počet unikátních peptidů na protein již tak vysoký není.

Tabulka 10: Přehled nejvíce zastoupených proteinů napříč všemi vzorky.

Kód	Název proteinu	Průměrný počet peptidů	Zastoupení napříč vzorky
MD37C_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c	10±1	4 z 11
HSP7E_ARATH	Heat shock protein 70 kDa	9±2	8 z 11
G3PC2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	8±3	11 z 11
EF1A1_ARATH	Elongation factor 1-alpha	6±1	11 z 11
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein	6±3	6 z 11
ATPAM_ARATH	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	5±2	6 z 11
ENO_SOLLC	Enolase	5±2	7 z 11
ATPB_M_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4±2	4 z 11
MASY_CUCMA	Malate synthase, glyoxysomal	4±2	5 z 11
UGPA_PYRPY	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	4±1	6 z 11
ALF2_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	3±1	8 z 11
ACEA_CUCMA	Isocitrate lyase	3±1	4 z 11
MDHC1_ARATH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	3±1	7 z 11
PGKY_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	3±1	4 z 11
UBIQ_AVESA	Ubiquitin	2±1	6 z 11

Primárně k prvním deseti proteinům byly zpracovány základní informace a funkce, tento textový přehled je uveden níže. Informace byly dohledávány nejvíce za pomoci databáze UniProt na základě odpovídajícího kódu proteinu.

Prvním uvedeným proteinem v tab. 10 je **probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c**, již podle názvu vyplývá, že se jedná o pravděpodobného zprostředkovatele transkripce genů vázaných na RNA polymerázu II (String, 2022). Druhým v pořadí je **heat shock protein 70 kDa**, obecně heat shock proteiny neboli chaperony se zapojují do ochrany organismu (nejen u rostlin). Heat shock protein 70 kDa umožňuje ve stresové situaci degradaci poškozených proteinů, naopak ale také dokáže usnadnit skládání nově syntetizovaných proteinů. U tohoto konkrétního heat shock proteinu bylo pozorováno, že ve spolupráci s dalšími proteiny může vytvářet rezistenci proti parazitické oomycetě (plísni) *Hyaloperonospora parasitica* (UniProt, 2022).

Dále je uveden **glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic**, který představuje rostlinný protein účastnící se glykolýzy, respektive katalyzuje její zahájení. Základní funkce tkví v tom, že jsou degradovány složité a komplexní sacharidy (např. škrob v nezelených plastidech). Jednoduché sacharidy pak slouží jako energetický základ pro výrobu mastných kyselin či aminokyselin, jež jsou důležité pro vývoj rostliny, zejména kořenů (UniProt, 2022). Ve všech vzorcích byl dále stanoven **elongation factor 1-alpha**, který představuje typický protein pro všechna eukaryota, tj. nejen pro rostliny, ale i živočichy včetně člověka. Elongační faktor je důležitým funkčním proteinem v rámci genové exprese, konkrétně při translaci, kdy zajišťuje vazbu mezi aminoacyl-tRNA a ribozomem (UniProt, 2022).

Luminal binding protein je dalším nalezeným proteinem, který pravděpodobně napomáhá ke vzniku proteinových komplexů endoplazmatického retikula. V rámci databáze UniProt je taktéž uvedeno, že napomáhá ke skládání některých chaperonů (tzn. heat shock proteinů). Dalšími proteiny jsou **ATP synthase subunit alpha/beta, mitochondrial**. Oba představují součásti tzv. ATP syntázy, jejíž funkcí je výroba ATP (adenosintrifosfát). Vznik ATP je možný na základě pohybu vodíkových kationtů. Za pomoci vodíkového gradientu ATP vzniká z ADP (adenosindifosfátu). V případě beta podjednotek (oproti alfa) platí, že jsou mnohem důležitější, jelikož vykazují poměrně vysokou afinitu ve svých vazebných místech pro molekulu ATP (UniProt, 2022).

Enolasa jako další protein, který byl identifikován taktéž v naprosté většině vzorků, představuje enzym uplatňující se v glykolýze při přeměně (2R)-2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Podobně jako elongační faktor je to taktéž protein zásadní pro všechna eukaryota.

Malate synthase, glyoxysomal je velmi důležitým enzymem glyoxylátového cyklu (UniProt, 2022). Glyoxylátový cyklus probíhá v některých krocích stejně jako Krebsův cyklus, zejména na samotném počátku, kdy vzniká citrát a izocitrát (Klouda, 2012). Stejně jako malate synthase je v tomto kontextu důležitý protein **isocitrate lyase**. Ta zajišťuje první krok odlišující se od Krebsova cyklu, poněvadž rovnou katalyzuje izocitrát za vzniku sukcinátu a glyoxylátu (UniProt, 2022). Malate synthase pokračuje v následujícím kroku, kdy katalyzuje reakci glyoxylátu a acetylkoenzymu A za vzniku malátu (UniProt, 2022). Konečný krok provádí **malate dehydrogenase**, která katalyzuje vznik oxalacetátu z malátu (UniProt, 2022). Oxalacetát je pak využíván k tzv. glukoneogenezi (vzniku glukózy). Tato biochemická dráha je pro rostliny důležitá zejména, pokud není schopna fotosyntézy, tzn. v okamžiku klíčení semen. Vysoký podíl tuků v semenech je při klíčení spotřebováván na acetylkoenzym A, který vstupuje do glyoxylátového cyklu a umožňuje získání energie v podobě glukózy i bez průběhu fotosyntézy. Rostlina má dostatek energie pro vyklíčení a svůj počáteční vývoj (Klouda, 2012).

Na desátém místě v tab. 10 je ještě uveden protein **UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase**, jež se sice nevyznačuje příliš vysokým počtem peptidů, ale vyskytl se přibližně u poloviny vzorků. Protein má metabolicky důležitou úlohu v rámci metabolismu sacharidů, což je pro rostliny důležité například z hlediska výroby buněčné stěny, jeho úlohou je poskytnout glukózu v rámci buněčného metabolismu za spotřeby UTP (uridintrifosfát). Jeho důležitost tkví v tom, že vzniká UDP- α -D-glukóza, což je takový předstupeň pro vznik dalších sacharidů nebo polysacharidů, tedy stavebních složek rostlinného těla (UniProt, 2022).

V rámci níže uvedené tabulky (tab. 11) je zpracován přehled deseti druhově specifických proteinů. Pořadí proteinů v tab. 11 bylo vytvořeno opět s ohledem na počet potvrzujících peptidů daného proteinu ve vzorku. Jedná se zejména o zásobní proteiny, jež byly nalezeny ve vzorku plodu s odpovídajícím rostlinným původem.

Většina proteinů uvedená v tab. 11 vykazuje zásobní funkci a pro člověka tak představuje riziko vzniku alergií. Informace k proteinům jsou taktéž dostupné v rámci databáze UniProt pod odpovídajícím kódem proteinu.

Tabulka 11: Přehled nalezených druhově specifických proteinů.

Kód	Název proteinu	Počet peptidů	Původ
ALL11_ARAHY	Allergen Ara h1, clone P17	41	<i>Arachis hypogaea</i> (Podzemnice olejná)
ALL12_ARAHY	Allergen Ara h1, clone P41B	37	<i>Arachis hypogaea</i> (Podzemnice olejná)
AMP23_MACIN	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-3	22	<i>Macadamia integrifolia</i> (Makadamie celolistá)
MDL2_PRUDU	(R)-mandelonitrile lyase 2	20	<i>Prunus dulcis</i> (Makadamie celolistá)
AMP22_MACIN	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	16	<i>Macadamia integrifolia</i> (Makadamie celolistá)
LECG_ARAHY	Galactose-binding lectin	8	<i>Arachis hypogaea</i> (Podzemnice olejná)
2SS2_BEREX	2S sulfur-rich seed storage protein 2	6	<i>Bertholletia excelsa</i> (Juvie ztepilá)
2SS1_BEREX	2S sulfur-rich seed storage protein 1	4	<i>Bertholletia excelsa</i> (Juvie ztepilá)
PLSC_COCNU	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	3	<i>Cocos nucifera</i> (Palma kokosová)
CONG_ARAHY	Conglutin	3	<i>Arachis hypogaea</i> (Podzemnice olejná)

Prvním je **allergen Ara h 1**, jež se vyskytl primárně ve vzorku arašídů, a to ve dvou formách: homolog P17 a P41B. Molekulárně je protein identifikován právě těmito dvěma izoformami, někdy označované jako klony (Md *et al.*, 2021). Alergen Ara h 1 je společně s Ara h 2 alergenem v naprosté většině zodpovědný za alergickou reakci na arašidy. Řadí se do skupiny 7S globulinů (konkrétně leguminů) podobně jako ostatní proteiny vyskytující

se v semenech luštěnin (Breiteneder & Mills, 2005; Md *et al.*, 2021). Ara h 1 je zásobní protein, jehož základní funkcí je ochrana semene a následně dostatek energie pro růst potenciální rostliny (Tengchuan *et al.*, 2009).

Kromě vzorku arašídů byl identifikován metodou LC-MS/MS také ve vzorku para ořechů, pekanových ořechů a makadamových ořechů. Tento výskyt u čtyř dalších vzorků naznačuje kontaminaci arašídů, jež je možná již ze strany výrobce, případně vlastním zaviněním. S ohledem na dobré rozlišení jednotlivých vzorků pomocí PCA je tak pravděpodobné, že mohlo dojít ke kontaminaci spíše vlastním nedopatřením u vzorku para ořechů, jež v pořadí následovaly po vzorku arašídů. U dalších dvou bylo nalezení peptidů odpovídající alergenu Ara h 1 stanoven na počet dva čili je možná i kontaminace pocházející již od výrobce.

Dalšími uvedenými jsou **vicilin-like antimicrobial peptides 2-3 (vicilin-like antimicrobial peptides 2-2)** jsou také k dohledání v databázi alergenů jakožto alergen Mac i 1 (Allergen nomenclature, n.d.). S ohledem na jejich název patří do skupiny tzv. vicilinů patřící mezi 7S globuliny. Jsou velmi odolné a stabilní (viz kapitola 1.6 Rizika spojená s konzumací). Pro tyto konkrétní viciliny byly navíc zjištěny antimikrobiální, antibakteriální a protiplísňové účinky, čímž semeno rostliny před těmito vlivy chrání (UniProt, 2022). Mezi alergeny se dále řadí **2S sulfur-rich seed storage protein 1 (2S sulfur-rich seed storage protein 2)**, které patří mezi hlavní alergeny para ořechů (někdy se označují jako alergen Ber e 1). Oba dva nalezené proteiny mají zejména zásobní funkci pro semeno rostliny, přičemž se skládají vždy z kratšího a delšího řetězce, které jsou propojeny disulfidickými vazbami (UniProt, 2022). Mezi alergeny patří také protein **conglutin** původem se jedná o alergen arašídů, který je uvedený v tabulce na posledním místě (UniProt, 2022).

Ostatní proteiny z tab. 11 mají jiné než zásobní funkce. Například **galactose-binding lectin** má protilátkovou funkci, kdy specifický lektin pro D-galaktózu naváže do své struktury iont přechodného kovu a vápenatý kationt, čímž aktivuje aglutinaci buněk (UniProt, 2022). Zbylé dva **1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase** a **(R)-mandelonitrile lyase 2** vykazují specifickou enzymatickou aktivitu. U (R)-mandelonitrile lyase 2 je zásadní funkcí uvolňování kyanovodíku v mandlích. Přičemž enzym katalyzuje rozštěpení (R)-mandelonitrilu (část amygdalinu) na benzaldehyd a kyanovodík (UniProt, 2022).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda mohou být skořápkové plody od sebe rozlišeny na základě proteinového složení. Při řešení tohoto problému byly využity dvě hmotnostně spektrometrické techniky, konkrétně hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí LC-MS/MS. Proteiny obsažené ve skořápkových plodech byly nejprve štěpeny enzymem trypsinem na peptidy, jež jsou měřitelné oběma metodami. Získaná data byla hodnocena analýzou hlavních komponent (PCA) a pomocí databázového programu PostgreSQL.

Již nejjednodušší hodnocení PCA analýzou potvrdilo možnou diferenciaci zkoumaných skořápkových plodů na základě jejich proteinového složení. Nejprve byly porovnávány všechny plody současně, což ale nebylo stoprocentně úspěšné a prokazatelně se podařilo odlišit pouze tři plody z jedenácti. Na základě toho byly postupně odebírány dobře odlišitelné druhy, čímž vznikaly menší skupiny vhodné pro další porovnávání. Celková diferenciací byla nakonec potvrzena třemi 3D zobrazeními, přičemž nejmenší skupina zahrnovala pět druhů skořápkových plodů. Výsledky byly podpořeny dobrou diferenciací skořápkových plodů z hlediska průměrného zastoupení proteinů, kdy bylo rozlišení úspěšné již jedním, maximálně však dvěma 3D grafy.

S ohledem na velmi dobré rozlišení pomocí PCA bylo provedeno i přímé hodnocení hmotnostních spekter, z čehož byly získány unikátní hodnoty m/z pro každý skořápkový plod. Nejvíce charakteristických hodnot m/z bylo nalezeno pro kokosový ořech, a naopak nejméně pro pekanové ořechy či pistácie. Bez ohledu na jejich počet byla získána velmi přesná charakteristika každého plodu, což je využitelné v případě analýz výrobků obsahující skořápkové plody.

Druhé měření uskutečněné metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí umožnilo doplnit předchozí zjištění. Výsledky poskytly bližší charakteristiku proteinové povahy zkoumaných skořápkových plodů, lépe řečeno semen rostlin obecně. Data potvrzují jistou přirozenou blízkost plodů mezi sebou, na druhou stranu ale také i odlišnosti. Byť je to metoda velmi citlivá, tak se nejedná o stoprocentní volbu pro druhovou identifikaci. Ze získaných dat druhový původ konkrétní rostliny totiž nebyl nebo nemohl být vždy potvrzen.

Závěrem, přestože se skořápkové plody vyznačují vysokým obsahem lipidů, tak je jejich proteomické rozlišení velmi dobře realizovatelné. Na získané poznatky by mohlo být navázáno analýzou nejrůznějších výrobků, jejichž složení zahrnují skořápkové plody. Zjištění pocházející z této práce by tak mohlo být pomyslným odrazovým můstkem pro hodnocení autenticity potravin obsahující skořápkové plody.

Seznam použitých zkratk

2D-PAGE	Dvoudimenzionální polyakrylamidová gelová elektroforéza (Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
AAS	Aminokyselinové skóre (Amino Acid Score)
ACN	Acetonitril (acetonitrile)
ADP	Adenosindifosfát (adenosine diphosphate)
ATP	Adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5-dihydroxybenzoic acid)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
EU	Evropská unie (European Union)
HCCA	4-hydroxy- α -kyanoskořicová kyselina (4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid)
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
LC-ESI-Q-TOF	Kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací, kvadrupólem a analyzátozem doby letu (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein)
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MALDI-TOF	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
OTA	Ochratoxin A (ochratoxine A)
PCA	Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TFA	Kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
TOF	Detektor doby letu (Time-of-Flight)
UTP	Uridintrifosfát (uridine triphosphate)

Seznam použité literatury

- Agyemang-Yeboah, F. (2011). Chapter 43 - Health benefits of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seeds and coconut consumption. In V. Preedy, R. R. Watson, & V. B. Patel (Eds.), *Nuts and seeds in health and disease prevention* (1st edition, pp. 361–367). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10043-X>
- Allergen Nomenclature. (n.d.). *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee*. Získáno 2.2.2022 z: <http://www.allergen.org/>
- Alphan, E., Pala, M., Açkurt, F., & Yilmaz, T. (1997). Nutritional composition of hazelnuts and its effects on glucose and lipid metabolism. In A. I. Köksal, Y. Okay, & Y. N. T. Güsnes (Eds.), *IV International Symposium on Hazelnut 445* (pp. 305–310). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.445.41>
- Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Novotny, J. A. (2012). Measured energy value of pistachios in the human diet. *British Journal of Nutrition*, 107(1), 120–125. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002649>
- Bartůňková, J., & Paulík, M. (2005). *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada.
- Brar, P. K., Proano, L. G., Friedrich, L. M., Harris, L. J., & Danyluk, M. D. (2015). Survival of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on raw peanut and pecan kernels stored at –24, 4, and 22°C. *Journal of Food Protection*, 78(2), 323–332. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-327>
- Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Plant food allergens – structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6), 395–399. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2005.05.004>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>
- Brufau, G., Boatella, J., & Rafecas, M. (2006). Nuts: source of energy and macronutrients. *British Journal of Nutrition*, 96(S2), S24–S28. <https://doi.org/10.1017/BJN20061860>
- Burks, A. W. (2008). Peanut allergy. *The Lancet*, 371(9623), 1538–1546. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60659-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60659-5)

- Cabanillas, B., & Novak, N. (2015). Allergic reactions to pine nut: A Review. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 25(5), 329–333. <http://www.jiaci.org/issues/vol25issue5/2.pdf>
- Cardoso, B. R., Duarte, G. B. S., Reis, B. Z., & Cozzolino, S. M. F. (2017). Brazil nuts: nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food Research International*, 100, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.036>
- Coronel, M. B., Marín, S., Cano-Sancho, G., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2012). Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(6), 979–993. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.660708>
- Crespo, J. F., James, J. M., Fernandez-Rodriguez, C., & Rodriguez, J. (2006). Food allergy: nuts and tree nuts. *British Journal of Nutrition*, 96(S2), S95–S102. <https://doi.org/10.1017/BJN20061869>
- Ding, Y., Jiang, G., Huang, L., Chen, C., Sun, J., & Zhu, C. (2020). DNA barcoding coupled with high-resolution melting analysis for nut species and walnut milk beverage authentication. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2372–2379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10241>
- Dostál, P. (2009). *Anatomie a morfologie rostlin v pojmech a nákresech* (3. upravené vydání). Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta.
- Dostálová, J., & Kadlec, P. (2014). *Potravinářské zboží: technologie potravin* (1. vydání). Key Publishing.
- Dreher, M. L. (2012). Pistachio nuts: composition and potential health benefits. *Nutrition Reviews*, 70(4), 234–240. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2011.00467.X>
- Drnková, B. (2019). *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Grada Publishing.
- Gardea, A. A., Martínez-Telléz, M. A. & Yahia, E. M. (2011). 8 – Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch). In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of*

- Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 143–165). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857092618.143>
- Garg, M. L., Blake, R. J., Wills, R. B. H., & Clayton, E. H. (2007). Macadamia nut consumption modulates favourably risk factors for coronary artery disease in hypercholesterolemic subjects. *Lipids*, 42(6), 583–587. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3042-8>
- Hashim-Jones, J. (2020). *Interactive International chronostratigraphic chart. Interactive Geological Timescale*. Supported by CSIRO's Environmental Informatics Group and the Geological Survey of Queensland. Získáno 18.8.2021 z: <https://stratigraphy.org/timescale/>
- Havliš, J. (1999). Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Časopis Vesmír*, 78(448). Získáno 26.11.2021 z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-8/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof.html>
- Hayes, D., Angove, M. J., Tucci, J., & Dennis, C. (2016). Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1231–1241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.760516>
- Hejný, S., & Slavík, B. (2003). *Květena České republiky 2*. Academia.
- Hendrych, R. (1986). *Systém a evoluce vyšších rostlin: učební přehled* (2. upravené vydání). Státní pedagogické nakladatelství.
- Hieke, K. (2008). *Encyklopedie jehličnatých stromů a keřů*. Computer Press.
- Hlavatá, K. (2017). *Ořechy jsou důležitou součástí zdravého jídelníčku*. Vím, Co Jím. Získáno 24.9.2021 z: https://www.vimcojim.cz/magazin/clanky/o-vyzive/Orechy-jsou-dulezitou-soucasti-zdraveho-jidelnicku__s10010x10209.html
- Horáček, P. (2007). *Encyklopedie listnatých stromů a keřů*. Computer Press.
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 404–414. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2019.01.001>

- Hrouda, L. (2007). Změny ve fylogenetické klasifikaci rostlin. In P. Sekerka (Ed.), *Botanický systém a evidence rostlin v botanických zahradách Botanické zahrady 2007* (s. 4–22). Botanická zahrada hl. m. Prahy. <http://www.ibotky.cz/dokumenty/konference-bz-2007.pdf>
- Huang, J., Liu, Xiaoqing, Lan, Q., Lai, X., Luo, Z., & Yang, G. (2016). Proteomic profile of coconuts. *European Food Research and Technology*, 242, 449–455. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2556-1>
- Ito, M., Mizota, T., Kitaguchi, T., Ohno, K., Ohba, T., & Tanaka, M. (2018). Simultaneous detection of eight species of tree nut in foods using two tetraplex polymerase chain reaction assays. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(11), 1985–1991. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1497940>
- Jílek, P. (2019). *Imunologie: stručně, jasně, přehledně* (2. doplněné vydání). Grada Publishing.
- Jolliffe, I. (2022). A 50-year personal journey through time with principal component analysis. *Journal of Multivariate Analysis*, 188(104820), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.JMVA.2021.104820>
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065), 1–16. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Jubeen, F., Bhatti, A. I., Maqbool, U., & Mehboob, S. (2012). Fungal incidence, aflatoxin B-1, tocopherols and fatty acids dynamics in ground and tree nuts during storage at two moisture levels. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(4), 521–527. <https://tinyurl.com/yc74rza8>
- Kadlec, P., Melzoch, K., & Voldřich, M. (2012). *Přehled tradičních potravinářských výrob.* (1. vydání). Key Publishing.
- Kalina, T., & Váňa, J. (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii.* (1. vydání). Karolinum.

- Kavina, K. (1950). *Morfologie rostlin*. Nakladatelství českých zemědělců - Brázda. Získáno 20.8.2021 z: <https://www.ndk.cz/view/uuid:1ef2e750-bffc-11e9-8fdf-005056827e52?page=uuid:8b9c4e65-8c64-49ba-837a-106d5f2e4cd0>
- Keet, C., Pistiner, M., Plesa, M., Szelag, D., Shreffler, W., Wood, R., Dunlop, J., Peng, R., Dantzer, J., & Togias, A. (2021). Age and eczema severity, but not family history, are major risk factors for peanut allergy in infancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *147*(3), 984-991.e5. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.11.033>
- Klouda, P. (2012). *Biochemie zblízka* (1. vydání). Nakladatelství Pavko.
- Koch, M. A., German, D. A., Kiefer, M., & Franzke, A. (2018). Database taxonomics as key to modern plant biology. *Trends in Plant Science*, *23*(1), 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.10.005>
- Krasauskas, A., Paulauskienė, A., & Tarasevičienė, Ž. (2015). Micromycetes contaminating nuts used for food. *Biologija*, *61*(3–4), 109–115. <https://doi.org/10.6001/biologija.v61i3-4.3202>
- Küçüköner, E., & Yurt, B. (2003). Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology*, *217*(4), 308–310. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0763-7>
- Kulhavý, J. (1993). *Palmy: Množení, pěstování, ošetřování*. Blesk.
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, *91*(10), 1535–1556. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Li, S., Geng, F., Wang, P., Lu, J., & Ma, M. (2016). Proteome analysis of the almond kernel (*Prunus dulcis*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(10), 3351–3357. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7514>
- Li, Y. C., Qian, H., Sun, X. L., Cui, Y., Wang, H. Y., Du, C., & Xia, X. H. (2014). The effects of germination on chemical composition of peanut seed. *Food Science and Technology Research*, *20*(4), 883–889. <https://doi.org/10.3136/FSTR.20.883>

- Lutz, M., Álvarez, K., & Loewe, V. (2017). Chemical composition of pine nut (*Pinus pinea* L.) grown in three geographical macrozones in Chile. *CyTA - Journal of Food*, *15*(2), 284–290. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1250109>
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E., & Yamamoto, T. (2014). Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-16>
- McElwain, J. C., & Punyasena, S. W. (2007). Mass extinction events and the plant fossil record. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*(10), 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.003>
- Md, A., Maeda, M., Matsui, T., Takasato, Y., Ito, K., & Kimura, Y. (2021). Purification and molecular characterization of a truncated-type Ara h 1, a major peanut allergen: oligomer structure, antigenicity, and glycoform. *Glycoconjugate Journal*, *38*, 67–76. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09969-1>
- Moctezuma, E., & Feldman, L. J. (1998). Growth rates and auxin effects in graviresponding gynophores of the peanut, *Arachis hypogaea* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, *85*(10), 1369–1376. <https://doi.org/10.2307/2446395>
- Michalak, M., & Kiełtyka-Dadasiewicz, A. (2019). Nut oils and their dietetic and cosmetic significance: A review. *Journal of Oleo Science*, *68*(2), 111–120. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18216>
- Moodley, R., Kindness, A., & Jonnalagadda, S. B. (2007). Chemical composition of edible *Macadamia* nuts (*Macadamia integrifolia*) and impact of soil quality. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *42*(14), 2097–2104. <https://doi.org/10.1080/10934520701627074>
- Moreno, F. J., & Clemente, A. (2008). 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *The Open Biochemistry Journal*, *2*, 16–28. <https://doi.org/10.2174/1874091X00802010016>

- Mori, S. A., & Prance, G. T. (1990). Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Advances in Economic Botany*, Vol. 8, 130–150. <https://www.jstor.org/stable/43927571>
- Müller, M., & Völkel, W. (2012). The use of liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) in biological monitoring [Biomonitoring Methods, 2007]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*, 3–52. <https://doi.org/10.1002/3527600418.bilcsmsonite0011>
- Nářízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnice Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004.* (2011). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex%3A32011R1169>
- Naghshi, S., Sadeghian, M., Nasiri, M., Mobarak, S., Asadi, M., & Sadeghi, O. (2021). Association of total nut, tree nut, peanut, and peanut butter consumption with cancer incidence and mortality: a comprehensive systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Advances in Nutrition*, 12(3), 793–808. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa152>
- Nohel, P., Rokyta, R., Holeček V. & Vlasák, R. (2011). Oxidační stres, jeho stanovení, nemoci jím způsobené a jeho snižování antioxidanty. *Časopis Vesmír*, 90(357). Získáno 8.4.2022 z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-6/oxidacni-stres.html>
- Ortiz-Quezada, A. G., Lombardini, L., & Cisneros-Zevallos, L. (2011). Chapter 104 - Antioxidants in Pecan Nut Cultivars [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. In V. R. Preedy, R. R. Watson, & V. B. Patel (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (1st edition, pp. 881–889). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10104-5>
- Pánek, J. (2002). *Základy výživy*. Svoboda Servis s.r.o.

- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19–34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>
- Polenta, G. A., Weber, D., Godefroy-Benrejeb, S., & Abbott, M. (2012). Effect of processing on the detectability of pecan proteins assessed by immunological and proteomic tools. *Food Analytical Methods*, 5(2), 216–225. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9255-8>
- Rada, R., & Steinbach, G. (1997). *Lexikon užitkových rostlin*. Knížní klub.
- Richardson, D. G. (1996). The health benefits of eating hazelnuts: Implications for blood lipid profiles, coronary heart disease, and cancer risks. In A. I. Köksal, Okay Y, & Y. N. T. Günses (Eds.), *IV International Symposium on Hazelnut 445* (pp. 295–300). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.445.39>
- Rico, R., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2016). Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. *Food Science & Nutrition*, 4(2), 329–338. <https://doi.org/10.1002/fsn3.294>
- Ros, E. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients* 2(7), 652–682. <https://doi.org/10.3390/nu2070652>
- Ross, I. A. (2001). *Anacardium occidentale*. In *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses* (Vol. 2, pp. 43–53). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-237-1_3
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). Correction: A higher level classification of all living organisms. *PLOS ONE*, 10(6), e0130114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130114>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>

- Sagu, S. T., Huschek, G., Homann, T., & Rawel, H. M. (2021). Effect of sample preparation on the detection and quantification of selected nuts allergenic proteins by LC-MS/MS. *Molecules*, 26(15), 4698, 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules26154698>
- Sathe, S. K., Wolf, W. J., Roux, K. H., Teuber, S. S., Venkatachalam, M., & Sze-Tao, K. W. C. (2002). Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4333–4341. <https://doi.org/10.1021/jf020007v>
- Satija, A., & Hu, F. B. (2018). Plant-based diets and cardiovascular health. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 28(7), 437–441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.02.004>
- Schägger, H., Aquila, H., & von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 173(1), 201–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90179-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90179-0)
- Schlett, S. (2008). *100 potravin pro zdraví jaké šance skrývá správná výživa se všemi cennými složkami: jak zdravou výživou předcházet chorobám, mírnit potíže a posilovat imunitu* (1. vydání). Ikar.
- Schmidt, H., Krause, S., Gelhaus, C., Petersen, A., Janssen, O., & Becker, W.-M. (2010). Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of the 2S albumin family. *Journal of Proteome Research*, 9(7), 3701–3709. <https://doi.org/10.1021/pr1002406>
- Silva, A. C. T. da, Cardozo, L. F. M. F., Cruz, B. O. da, Mafra, D., & Stockler-Pinto, M. B. (2019). Nuts and cardiovascular diseases: focus on Brazil nuts. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 32, 274–282. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20190016>
- Slavíková, Z. (2002). *Morfologie rostlin* (1. vydání). Karolinum.
- String. (2022). *HSFC1 protein (Arabidopsis thaliana) - STRING interaction network*. Získáno 8.2.2022 z: <https://string-db.org/network/3702.AT3G24520.1>

- Štech, M. (2016). Jak přenést příběh cévnatých rostlin do středoškolské biologie. *Časopis ŽIVA. Nakladatelství Academia, SŠČ AV ČR, v. v. i, 2/2016*, 70–75. Získáno 18.8.2021 z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/jak-prenest-pribeh-cevnatych-rostlin-do-stredoskol.pdf>
- Stephenson, R. (2005). Macadamia: Domestication and commercialization. *Chronica Horticulture*, 45(2), 11–15. <https://www.actahort.org/chronica/pdf/ch4502.pdf?referer>
- Svačina, Š., Bretšnajdrová, A., Holcátová, I., Horáček, J., Kovářová, K., Kreuzbergová, J., Müllerová, D., Peiskerová, M., Rušavý, Z., Sulková, S., & Šmahelová, A. (2008). *Klinická dietologie* (1. vydání). Grada Publishing.
- Sze-Tao, K. W. C., & Sathe, S. K. (2000). Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1393–1401. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9<1393::AID-JSFA653>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1393::AID-JSFA653>3.0.CO;2-F)
- Tengchuan, J., Albillos, S. M., Feng, G., Howard, A., Tong-Jen, F., Kothary, M. H., & Zhang, Y. Z. (2009). Crystal structure of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8643–8651. <https://doi.org/10.1021/JF9017355>
- Tláskal, P., Blatná, J., Dlouhý, P., Dostálová, J., Perlín, C., Pivoňka, J., Kunová, V., & Štiková, O. (2016). *Výživa a potraviny pro zdraví*. Společnost pro výživu, z.s.
- Vajravijayan, S., Nandhagopal, N., & Gunasekaran, K. (2017). Crystal structure determination and analysis of 11S coconut allergen: Cocosin. *Molecular Immunology*, Vol. 92, 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.10.018>
- UniProt. (2022). Získáno 10.2.2022 z: <https://www.uniprot.org/>
- Valíček, P. (2002). *Užitkové rostliny tropů a subtropů* (2. upravené vydání). Academia.
- Vander Leek, T. K., Liu, A. H., Stefanski, K., Blacker, B., & Bock, S. A. (2000). The natural history of peanut allergy in young children and its association with serum peanut-specific IgE. *The Journal of Pediatrics*, 137(6), 749–755. <https://doi.org/10.1067/mpd.2000.109376>

- Vaňková, H. (1999). Peptidové mapy. *Chemické Listy*, 93(2), 120–127. http://ww.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_120-127.pdf
- Varol, Ö., & Tatli, A. (2002). Phytosociological investigations of a *Pinus pinea* L. forest in the Eastern Mediterranean Region (K. Maraş–Turkey). *Plant Ecology*, 158(2), 223–228. <https://doi.org/10.1023/A:1015574206377>
- Velasco, J., Dobarganes, C., & Márquez-Ruiz, G. (2010). 1 - Oxidative rancidity in foods and food quality. In L. H. Skibsted, J. Risbo, & M. L. Andersen (Eds.), *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 3–32). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699260.1.3>
- Velíšek, J. (2002a). *Chemie potravin 1* (2. upravené vydání). OSSIS.
- Velíšek, J. (2002b). *Chemie potravin 2* (2. upravené vydání). OSSIS.
- Velíšek, J. (2002c). *Chemie potravin 3* (2. upravené vydání). OSSIS.
- Venkatachalam, M., Kshirsagar, H. H., Seeram, N. P., Heber, D., Thompson, T. E., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2007). Biochemical composition and immunological comparison of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9899–9907. <https://doi.org/10.1021/jf0714721>
- Venkatachalam, M., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2008). Biochemical characterization of soluble proteins in pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8103–8110. <https://doi.org/10.1021/jf801268k>
- Vyhláška č. 397/2021 Sb. Vyhláška o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány (2021). <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-397>
- Weberling, F. (1992). *Morphology of flowers and inflorescences* (1. vydání). Cambridge University Press Archive. <https://tinyurl.com/4ha67hbc>
- Weinberger, T., & Sicherer, S. (2018). Current perspectives on tree nut allergy: a review. *Journal of Asthma and Allergy*, 11, 41–51. <https://doi.org/10.2147/jaa.s141636>

- Willis, K., & McElwain, J. (2014). *The evolution of plants* (2. vydání). Oxford University Press. <https://tinyurl.com/ynmu4pfp>
- Wood, L. G., & Garg, M. L. (2011). Chapter 85 - Macadamia nuts (*Macadamia integrifolia* and *tetraphylla*) and their use in hypercholesterolemic subjects. In V. Preedy, R. R. Watson, & V. B. Patel (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (1st edition, pp. 717–725). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10085-4>
- Yada, S., Huang, G., & Lapsley, K. (2013). Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.01.008>
- Yada, S., Lapsley, K., & Huang, G. (2011). A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.007>
- Záruba, K. (2016). *Analytická chemie I. díl*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Zhang, G., Hu, L., Melka, D., Wang, H., Laasri, A., Brown, E. W., Strain, E., Allard, M., Bunning, V. K., & Musser, S. M. (2017). Prevalence of Salmonella in cashews, hazelnuts, macadamia nuts, pecans, pine nuts, and walnuts in the United States. *Journal of Food Protection*, 80(3), 459–466. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-16-396>
- Ziegler, V. (2001). *Základy paleontologie* (1. vydání). Karolinum. Univerzita Karlova v Praze.

Přílohy

Příloha 1: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku vlašských ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	8
HSP7C_PETHY	Heat shock cognate 70 kDa protein OS=Petunia hybrida GN=HSP70 PE=2 SV=1	8
G3PC3_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC3 PE=2 SV=1	6
ATPAM_HELAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Helianthus annuus GN=ATPA PE=3 SV=1	6
G3PC_PETHY	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Petunia hybrida GN=GAPC PE=2 SV=1	6
EF1A_ORYSJ	Elongation factor 1-alpha OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=REFA1 PE=2 SV=2	6
ACEA_CUCMA	Isocitrate lyase OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	5
HS901_ARATH	Heat shock protein 90-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP90-1 PE=1 SV=3	5
ACT2_SOLLC	Actin-51 (Fragment) OS=Solanum lycopersicum PE=3 SV=1	5
MASY_CUCSA	Malate synthase, glyoxysomal OS=Cucumis sativus PE=2 SV=2	5
G3PC_TAXBA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Taxus baccata PE=2 SV=1	4
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	4
ACT1_DAUCA	Actin-1 OS=Daucus carota PE=2 SV=1	4
METE2_ARATH	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=MS2 PE=1 SV=1	4
ACT2_DAUCA	Actin-2 OS=Daucus carota PE=2 SV=1	4
THI42_VITVI	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic OS=Vitis vinifera GN=THI1-2 PE=3 SV=1	4
MASY_GOSHI	Malate synthase, glyoxysomal OS=Gossypium hirsutum PE=2 SV=1	4
ATPBM_DAUCA	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Daucus carota GN=ATPB PE=3 SV=1	3
METE_PLESU	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Plectranthus scutellarioides GN=MET PE=1 SV=2	3
MASY_SOYBN	Malate synthase, glyoxysomal (Fragment) OS=Glycine max PE=2 SV=1	3
HSP80_SOLLC	Heat shock cognate protein 80 OS=Solanum lycopersicum GN=HSC80 PE=2 SV=1	3
PGMC2_ARATH	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g70730 PE=2 SV=1	3
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	3
EMP1_ORYSJ	Embryonic abundant protein 1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=EMP1 PE=2 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
ADH1_PETHY	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Petunia hybrida GN=ADH1 PE=3 SV=1	2
UBIQ_AVESA	Ubiquitin OS=Avena sativa PE=1 SV=1	2
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	2
RAN_VICFA	GTP-binding nuclear protein Ran/TC4 OS=Vicia faba PE=2 SV=1	2
ADH_MALDO	Alcohol dehydrogenase OS=Malus domestica GN=ADH PE=2 SV=1	2
RS4_MAIZE	40S ribosomal protein S4 OS=Zea mays GN=RPS4 PE=2 SV=1	2
H2B10_ARATH	Histone H2B.10 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g22880 PE=1 SV=3	2
H2A1_MEDTR	Probable histone H2A.1 OS=Medicago truncatula GN=MtrDRAFT_AC149210g1v1 PE=1 SV=1	2
ACOC_CUCMA	Aconitate hydratase, cytoplasmic OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	2
PGMC_PEA	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Pisum sativum GN=PGM1 PE=1 SV=1	2
GLNA_VIGAC	Glutamine synthetase nodule isozyme OS=Vigna aconitifolia PE=2 SV=1	2
RS4_GOSHI	40S ribosomal protein S4 OS=Gossypium hirsutum GN=RPS4 PE=2 SV=1	2

Příloha 2: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku kešu ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
RBL_AESPA	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Aesculus pavia GN=rbcl PE=3 SV=2	12
RBL_ACESA	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Acer saccharum GN=rbcl PE=3 SV=1	12
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	12
MD37C_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37C PE=1 SV=1	12
HSP72_SOLLC	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=Solanum lycopersicum GN=HSC-2 PE=1 SV=1	12
G3PC2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana GN=GAPC2 PE=1 SV=1	11
G3PC_SINAL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Sinapis alba GN=GAPC PE=2 SV=2	10
RBL_SOLBU	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Solanum bulbocastanum GN=rbcl PE=3 SV=1	10
HSP70_SOYBN	Heat shock 70 kDa protein OS=Glycine max GN=HSP70 PE=1 SV=1	10
G3PC2_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC2 PE=1 SV=1	9
G3PC_PETHY	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Petunia hybrida GN=GAPC PE=2 SV=1	9
EF1A_TOBAC	Elongation factor 1-alpha OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1	8
EF1A1_DAUCA	Elongation factor 1-alpha OS=Daucus carota PE=1 SV=1	8
G3PC_CRAPL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Cratostigma plantagineum GN=GAPC PE=2 SV=1	8
HSP83_IPONI	Heat shock protein 83 OS=Ipomoea nil GN=HSP83A PE=2 SV=1	8
ACT2_SOLLC	Actin-51 (Fragment) OS=Solanum lycopersicum PE=3 SV=1	8
EF1A_ORYSJ	Elongation factor 1-alpha OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=REFA1 PE=2 SV=2	7
HSP12_SOLPE	17.6 kDa class I heat shock protein OS=Solanum peruvianum PE=2 SV=1	6
HSP82_MAIZE	Heat shock protein 82 OS=Zea mays GN=HSP82 PE=3 SV=1	6
ENO_ALNGL	Enolase OS=Alnus glutinosa GN=PGH1 PE=2 SV=1	6
UGPA_MUSAC	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Musa acuminata GN=UGPA PE=2 SV=1	5
MDHC_MAIZE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Zea mays PE=1 SV=2	5
ACT2_DAUCA	Actin-2 OS=Daucus carota PE=2 SV=1	5
PHS1_ARATH	Alpha-glucan phosphorylase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PHS1 PE=1 SV=1	5
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	4
MDHC1_ARATH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g04410 PE=1 SV=2	4

Accession	Protein	#Peptides
HSP11_DAUCA	17.8 kDa class I heat shock protein OS=Daucus carota PE=3 SV=1	4
MD37A_ARATH	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37A PE=1 SV=1	4
RS4_GOSHI	40S ribosomal protein S4 OS=Gossypium hirsutum GN=RPS4 PE=2 SV=1	4
ENO1_ARATH	Enolase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ENO1 PE=1 SV=1	4
R15A1_ARATH	40S ribosomal protein S15a-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPS15AA PE=2 SV=2	4
ADH1_MAIZE	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Zea mays GN=ADH1 PE=2 SV=1	3
SODM_HEVBR	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=SODA PE=2 SV=1	3
HS25P_ARATH	25.3 kDa heat shock protein, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP25.3 PE=2 SV=1	3
HSP21_SOLPE	17.3 kDa class II heat shock protein OS=Solanum peruvianum PE=1 SV=1	3
HSP21_PEA	17.1 kDa class II heat shock protein OS=Pisum sativum GN=HSP17.7 PE=2 SV=1	3
ALF_MAIZE	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS=Zea mays PE=1 SV=1	3
CYPH_CATRO	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Catharanthus roseus GN=PCKR1 PE=2 SV=1	3
PGMC_POPTN	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Populus tremula GN=PGM1 PE=2 SV=1	3
R27AA_ARATH	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPS27AA PE=1 SV=2	3
1433E_TOBAC	14-3-3-like protein E OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	3
EF2_BETVU	Elongation factor 2 OS=Beta vulgaris PE=2 SV=1	3
TPIS_MAIZE	Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Zea mays PE=3 SV=3	3
CD48A_ARATH	Cell division control protein 48 homolog A OS=Arabidopsis thaliana GN=CDC48A PE=1 SV=1	3
RL3_ORYSJ	60S ribosomal protein L3 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=RPL3 PE=2 SV=2	3
TBA1_HORVU	Tubulin alpha-1 chain OS=Hordeum vulgare GN=TUBA1 PE=2 SV=1	3
PHSL_IPOBA	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic OS=Ipomoea batatas PE=2 SV=1	3
ICDHC_ARATH	Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Arabidopsis thaliana GN=CICDH PE=2 SV=1	3
RS5_CICAR	40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Cicer arietinum GN=RPS5 PE=2 SV=1	3
MASY_BRANA	Malate synthase, glyoxysomal OS=Brassica napus PE=2 SV=1	3
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	3
HS178_ARATH	17.8 kDa class I heat shock protein OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP17.8 PE=2 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
HSP12_SOYBN	Class I heat shock protein (Fragment) OS=Glycine max GN=HSP6834-A PE=3 SV=1	2
ANXD4_ARATH	Annexin D4 OS=Arabidopsis thaliana GN=ANN4 PE=2 SV=1	2
ADH1_PETHY	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Petunia hybrida GN=ADH1 PE=3 SV=1	2
RSSA_CICAR	40S ribosomal protein SA OS=Cicer arietinum GN=RAP40 PE=2 SV=1	2
RUBB_BRANA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic OS=Brassica napus PE=2 SV=1	2
FABI_BRANA	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic OS=Brassica napus PE=1 SV=2	2
RL10_EUPES	60S ribosomal protein L10 OS=Euphorbia esula GN=RPL10 PE=2 SV=1	2
CYP1_SOYBN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1 OS=Glycine max GN=Cyp1 PE=1 SV=1	2
HS22C_SOYBN	Small heat shock protein, chloroplastic (Fragment) OS=Glycine max GN=HSP22 PE=2 SV=1	2
ACOC_CUCMA	Aconitate hydratase, cytoplasmic OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	2
RL8_SOLLC	60S ribosomal protein L8 OS=Solanum lycopersicum GN=RPL8 PE=2 SV=1	2
ACEA_ARATH	Isocitrate lyase OS=Arabidopsis thaliana GN=ICL PE=1 SV=2	2
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	2
6PGD2_SPIOL	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2, chloroplastic OS=Spinacia oleracea GN=pgdP PE=1 SV=1	2
SCRK_SOLTU	Fructokinase OS=Solanum tuberosum PE=1 SV=1	2
SAR1A_ARATH	GTP-binding protein SAR1A OS=Arabidopsis thaliana GN=SAR1A PE=2 SV=1	2
REHYA_ORYSJ	1-Cys peroxiredoxin A OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os07g0638300 PE=2 SV=1	2
REHY_MEDTR	1-Cys peroxiredoxin OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1	2
HSP7F_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP70-6 PE=1 SV=1	2
TBB1_ELEIN	Tubulin beta-1 chain OS=Eleusine indica GN=TUBB1 PE=2 SV=1	2
CH62_CUCMA	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial OS=Cucurbita maxima GN=CPN60-2 PE=1 SV=1	2
ASSY_ARATH	Argininosuccinate synthase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g24830 PE=2 SV=3	2
ALFC_ORYSJ	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os11g0171300 PE=1 SV=2	2

Příloha 3: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku lískových ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	8
G3PC_PEA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Pisum sativum GN=GAPC1 PE=1 SV=1	7
G3PC_DIACA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Dianthus caryophyllus GN=GAPC PE=1 SV=1	7
HSP7E_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP70-5 PE=2 SV=1	7
EF1A_MANES	Elongation factor 1-alpha OS=Manihot esculenta GN=EF1 PE=3 SV=1	6
EF1A_ORYSJ	Elongation factor 1-alpha OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=REFA1 PE=2 SV=2	6
ACT2_DAUCA	Actin-2 OS=Daucus carota PE=2 SV=1	6
G3PC2_HORVU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic (Fragment) OS=Hordeum vulgare GN=GAPC PE=2 SV=1	5
G3PC_RANAC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Ranunculus acris GN=GAPC PE=2 SV=1	5
ACT3_ORYSI	Actin-3 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=ACT3 PE=3 SV=2	5
HSP82_MAIZE	Heat shock protein 82 OS=Zea mays GN=HSP82 PE=3 SV=1	4
ENPL_HORVU	Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1	4
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	4
ATPAM_BETVU	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Beta vulgaris GN=ATPA PE=3 SV=1	4
CLPB1_ORYSJ	Chaperone protein ClpB1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=CLPB1 PE=2 SV=1	4
ALF2_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2 OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	3
CYPH_LUPLU	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Lupinus luteus PE=2 SV=1	3
CHSY_ANTMA	Chalcone synthase OS=Antirrhinum majus GN=CHS PE=3 SV=1	3
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	3
1433B_SOYBN	14-3-3-like protein B (Fragment) OS=Glycine max GN=GF14B PE=2 SV=1	3
STAD_ELAGV	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, chloroplastic OS=Elaeis guineensis var. tenera PE=2 SV=2	3
G3PC_TAXBA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Taxus baccata PE=2 SV=1	3
HS181_ARATH	18.1 kDa class I heat shock protein OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP18.1 PE=2 SV=1	2
MDHC_BETVU	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Beta vulgaris GN=NR1 PE=1 SV=1	2
ADH1_ORYSI	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=ADH1 PE=2 SV=1	2
ADH1_PETHY	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Petunia hybrida GN=ADH1 PE=3 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
PGMC_POPTN	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Populus tremula GN=PGM1 PE=2 SV=1	2
6PGD1_ARATH	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g64190 PE=2 SV=1	2
FABI_BRANA	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic OS=Brassica napus PE=1 SV=2	2
ILV5_PEA	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic OS=Pisum sativum GN=PGAAIR PE=1 SV=1	2
HSP81_ORYSI	Heat shock protein 81-1 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=HSP81-1 PE=2 SV=1	2
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	2
ATPBM_ARATH	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g08670 PE=1 SV=1	2
ADH_MALDO	Alcohol dehydrogenase OS=Malus domestica GN=ADH PE=2 SV=1	2
HSP11_PEA	18.1 kDa class I heat shock protein OS=Pisum sativum GN=HSP18.1 PE=2 SV=1	2
ALFC3_ARATH	Probable fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=FBA3 PE=1 SV=1	2
KPYC_SOLTU	Pyruvate kinase, cytosolic isozyme OS=Solanum tuberosum PE=2 SV=1	2
UGPA_ASTPN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Astragalus penduliflorus GN=UGP PE=1 SV=1	2
GLNA3_MEDSA	Glutamine synthetase nodule isozyme OS=Medicago sativa GN=GS1 PE=2 SV=1	2
CHSE_IPONI	Chalcone synthase E OS=Ipomoea nil GN=CHSE PE=2 SV=1	2
ACOC_CUCMA	Aconitate hydratase, cytoplasmic OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	2
THI4_ALNGL	Thiamine thiazole synthase, chloroplastic OS=Alnus glutinosa GN=THI1 PE=2 SV=1	2
PDI_DATGL	Protein disulfide-isomerase OS=Datisca glomerata GN=PDI PE=1 SV=1	2
GAPN_NICPL	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Nicotiana plumbaginifolia GN=GAPN PE=2 SV=1	2
PKS4_RUBID	Polyketide synthase 4 OS=Rubus idaeus GN=PKS4 PE=1 SV=1	2

Příloha 4: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku mandlí.

Accession	Protein	#Peptides
MDL2_PRUDU	(R)-mandelonitrile lyase 2 OS=Prunus dulcis GN=MDL2 PE=1 SV=1	20
G3PC_ANTMA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Antirrhinum majus GN=GAPC PE=1 SV=1	13
G3PC_CRAPL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Craterostigma plantagineum GN=GAPC PE=2 SV=1	9
MD37C_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37C PE=1 SV=1	9
MD37E_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37E PE=1 SV=3	9
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	9
ACT7_ARATH	Actin-7 OS=Arabidopsis thaliana GN=ACT7 PE=1 SV=1	8
G3PC_TAXBA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Taxus baccata PE=2 SV=1	7
EF1A1_ARATH	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=A1 PE=1 SV=1	6
ENO_RICCO	Enolase OS=Ricinus communis PE=2 SV=1	6
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	5
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	5
UBIQ_AVESA	Ubiquitin OS=Avena sativa PE=1 SV=1	4
HSP11_MEDSA	18.1 kDa class I heat shock protein (Fragment) OS=Medicago sativa GN=HSP18.1 PE=2 SV=1	4
ATPBM_ARATH	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g08670 PE=1 SV=1	4
ENO_MESCR	Enolase OS=Mesembryanthemum crystallinum GN=PGH1 PE=2 SV=1	4
ENO_ALNGL	Enolase OS=Alnus glutinosa GN=PGH1 PE=2 SV=1	4
CYPH_CATRO	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Catharanthus roseus GN=PCKR1 PE=2 SV=1	3
MASY_CUCMA	Malate synthase, glyoxysomal OS=Cucurbita maxima PE=1 SV=1	3
PDI_DATGL	Protein disulfide-isomerase OS=Datisca glomerata GN=PDI PE=1 SV=1	3
GPX4_GOSHI	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Gossypium hirsutum PE=2 SV=1	3
ATPAM_HELAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Helianthus annuus GN=ATPA PE=3 SV=1	3
CATA2_ARATH	Catalase-2 OS=Arabidopsis thaliana GN=CAT2 PE=2 SV=3	3
ADH_FRAAN	Alcohol dehydrogenase OS=Fragaria ananassa GN=ADH PE=3 SV=2	2
OLEO1_PRUDU	Oleosin 1 OS=Prunus dulcis GN=OLE1 PE=2 SV=1	2
GRDH_DAUCA	Glucose and ribitol dehydrogenase OS=Daucus carota GN=CAISE5 PE=2 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
PGKY_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	2
HSP12_DAUCA	18.0 kDa class I heat shock protein OS=Daucus carota PE=3 SV=1	2
ADH1_PEA	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	2
GPX4_SOLLC	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Solanum lycopersicum GN=GPXle-1 PE=2 SV=1	2
SODC1_SOLLC	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 OS=Solanum lycopersicum GN=SODCC.1 PE=2 SV=2	2
ACEA_CUCMA	Isocitrate lyase OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	2
GPX4_SPIOL	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Spinacia oleracea PE=2 SV=1	2
ALF2_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2 OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	2
RAN_VICFA	GTP-binding nuclear protein Ran/TC4 OS=Vicia faba PE=2 SV=1	2
MDHM_BRANA	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Brassica napus GN=MDH PE=2 SV=1	2
ATPB_MYRFG	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Myristica fragrans GN=atpB PE=3 SV=1	2
MDHC2_ARATH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g43330 PE=2 SV=1	2
ALF_ORYSJ	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=FBA PE=1 SV=2	2

Příloha 5: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku pistácií.

Accession	Protein	#Peptides
G3PC2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana GN=GAPC2 PE=1 SV=1	15
G3PC_DIACA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Dianthus caryophyllus GN=GAPC PE=1 SV=1	13
G3PC_SINAL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Sinapis alba GN=GAPC PE=2 SV=2	13
G3PC_ANTMA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Antirrhinum majus GN=GAPC PE=1 SV=1	10
G3PC_PETHY	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Petunia hybrida GN=GAPC PE=2 SV=1	10
G3PC_CRAPL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Craterostigma plantagineum GN=GAPC PE=2 SV=1	9
G3PC_TAXBA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Taxus baccata PE=2 SV=1	9
RBL_CARPA	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Carica papaya GN=rbcl PE=3 SV=2	9
EF1A_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=EF1A PE=3 SV=1	8
EF1A1_DAUCA	Elongation factor 1-alpha OS=Daucus carota PE=1 SV=1	8
ATPAM_HELAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Helianthus annuus GN=ATPA PE=3 SV=1	8
G3PC_GINBI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Ginkgo biloba PE=2 SV=1	7
HS901_ARATH	Heat shock protein 90-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP90-1 PE=1 SV=3	6
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	6
ACT2_SOLLC	Actin-51 (Fragment) OS=Solanum lycopersicum PE=3 SV=1	5
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	5
ATPAM_ARATH	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ATPA PE=1 SV=2	5
EF2_BETVU	Elongation factor 2 OS=Beta vulgaris PE=2 SV=1	4
H4_ARATH	Histone H4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g07660 PE=1 SV=2	4
RUBB_PEA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic OS=Pisum sativum PE=1 SV=2	4
ATPBM_DAUC A	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Daucus carota GN=ATPB PE=3 SV=1	4
HSP81_ORYSI	Heat shock protein 81-1 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=HSP81- 1 PE=2 SV=1	4
ALF_MAIZE	Fructose-biphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS=Zea mays PE=1 SV=1	3
ADH1_MAIZE	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Zea mays GN=ADH1 PE=2 SV=1	3
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	3

Accession	Protein	#Peptides
PGKY_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	3
UGPA1_ARATH	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g17310 PE=2 SV=1	3
PGKH2_ARATH	Phosphoglycerate kinase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g56190 PE=2 SV=3	3
PGKH_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	3
AATM_LUPAN	Aspartate aminotransferase P2, mitochondrial (Fragment) OS=Lupinus angustifolius PE=1 SV=1	3
PGMC_POPTN	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Populus tremula GN=PGM1 PE=2 SV=1	3
RL12_PRUAR	60S ribosomal protein L12 OS=Prunus armeniaca GN=RPL12 PE=2 SV=1	2
UBIQ_AVESA	Ubiquitin OS=Avena sativa PE=1 SV=1	2
PSBC_ACOAM	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein OS=Acorus americanus GN=psbC PE=3 SV=1	2
MDHC1_ARATH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g04410 PE=1 SV=2	2
RL10_EUPES	60S ribosomal protein L10 OS=Euphorbia esula GN=RPL10 PE=2 SV=1	2
RL4_PRUAR	60S ribosomal protein L4 OS=Prunus armeniaca GN=RPL4 PE=1 SV=1	2
GBLP_MEDSA	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein OS=Medicago sativa GN=GB1 PE=1 SV=1	2
HSP21_IPONI	17.2 kDa class II heat shock protein OS=Ipomoea nil GN=SHSP-1 PE=2 SV=1	2
GPX4_CITSI	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Citrus sinensis GN=CSA PE=1 SV=1	2
PGKY_WHEAT	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	2
G3PA1_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=GAPA1 PE=1 SV=3	2
REHYA_ORYSI	1-Cys peroxiredoxin A OS=Oryza sativa subsp. indica GN=OsI_27030 PE=2 SV=1	2
RS14_CHLRE	40S ribosomal protein S14 OS=Chlamydomonas reinhardtii GN=RPS14 PE=1 SV=1	2
ADH1_SOLTU	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Solanum tuberosum GN=ADH1 PE=2 SV=1	2
CAPP_SOLTU	Phosphoenolpyruvate carboxylase OS=Solanum tuberosum GN=PPC1 PE=2 SV=2	2
IF4A9_TOBAC	Eukaryotic initiation factor 4A-9 OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1	2
RS6_ASPOF	40S ribosomal protein S6 OS=Asparagus officinalis GN=rps6 PE=2 SV=1	2

Příloha 6: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku arašídů.

Accession	Protein	#Peptides
ALL11_ARAHY	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	41
ALL12_ARAHY	Allergen Ara h 1, clone P41B OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	37
LECG_ARAHY	Galactose-binding lectin OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=3	8
EF1A_ORYSJ	Elongation factor 1-alpha OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=REFA1 PE=2 SV=2	6
EF1A_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=EF1A PE=3 SV=1	6
G3PC_DIACA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Dianthus caryophyllus GN=GAPC PE=1 SV=1	6
G3PC_PETHY	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Petunia hybrida GN=GAPC PE=2 SV=1	6
RBL_BERLA	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Berzelia lanuginosa GN=rbcl PE=3 SV=1	6
LOX2_SOYBN	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2 OS=Glycine max GN=LOX1.2 PE=2 SV=1	6
RBL_CASFS	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Cassia fistula GN=rbcl PE=3 SV=1	5
PGKH_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	4
ATPAM_BETVU	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Beta vulgaris GN=ATPA PE=3 SV=1	4
PPDK2_ORYSJ	Pyruvate, phosphate dikinase 2 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PPDK2 PE=3 SV=1	4
H4_ARATH	Histone H4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g07660 PE=1 SV=2	4
ACT3_SOYBN	Actin-3 OS=Glycine max GN=SAC3 PE=3 SV=2	4
UGPA_PYRPY	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Pyrus pyrifolia PE=2 SV=1	4
H2B10_ARATH	Histone H2B.10 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g22880 PE=1 SV=3	4
ADH1_PEA	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	3
CONG_ARAHY	Conglutin OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	3
LOX4_ORYSJ	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 4 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0700700 PE=2 SV=1	3
CONG7_ARAHY	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=2	3
PGKY_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	3
H2B5_ARATH	Histone H2B.5 OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g09480 PE=1 SV=3	3
ENO_ALNGL	Enolase OS=Alnus glutinosa GN=PGH1 PE=2 SV=1	3
ENO_MESCR	Enolase OS=Mesembryanthemum crystallinum GN=PGH1 PE=2 SV=1	3
LOX1_SOYBN	Seed linoleate 13S-lipoxygenase-1 OS=Glycine max GN=LOX1.1 PE=1 SV=2	3

Accession	Protein	#Peptides
PDI11_ARATH	Protein disulfide isomerase-like 1-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PDIL1-1 PE=1 SV=1	2
GRDH1_ARATH	Glucose and ribitol dehydrogenase homolog 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g54870 PE=2 SV=1	2
LOX1_HORVU	Linoleate 9S-lipoxygenase 1 OS=Hordeum vulgare GN=LOX1.1 PE=1 SV=2	2
ASPR_CUCPE	Aspartic proteinase OS=Cucurbita pepo PE=2 SV=1	2
CATA1_CUCPE	Catalase isozyme 1 OS=Cucurbita pepo GN=CAT1 PE=2 SV=1	2
H2A1_MEDTR	Probable histone H2A.1 OS=Medicago truncatula GN=MtrDRAFT_AC149210g1v1 PE=1 SV=1	2
LOXB_PHAVU	Linoleate 9S-lipoxygenase (Fragment) OS=Phaseolus vulgaris PE=2 SV=1	2
GLYG1_SOYBN	Glycinin G1 OS=Glycine max GN=GY1 PE=1 SV=2	2
METE_CATRO	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Catharanthus roseus GN=METE PE=2 SV=1	2
SBP65_SOYBN	Seed biotin-containing protein SBP65 OS=Glycine max GN=SBP65 PE=1 SV=1	2
ALF_CICAR	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS=Cicer arietinum GN=ALDC PE=1 SV=1	2
FDH_ARATH	Formate dehydrogenase, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=FDH1 PE=1 SV=1	2

Příloha 7: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku para ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
ALL11_ARAHY	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	12
2SS2_BEREX	2S sulfur-rich seed storage protein 2 OS=Bertholletia excelsa GN=BE2S2 PE=3 SV=1	6
MD37C_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37C PE=1 SV=1	6
2SS1_BEREX	2S sulfur-rich seed storage protein 1 OS=Bertholletia excelsa GN=BE2S1 PE=1 SV=2	4
HSP11_MEDSA	18.1 kDa class I heat shock protein (Fragment) OS=Medicago sativa GN=HSP18.1 PE=2 SV=1	4
HS17C_ARATH	17.6 kDa class I heat shock protein 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP17.6C PE=2 SV=2	4
G3PC1_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC1, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana GN=GAPC1 PE=1 SV=2	4
HSP70_SOYBN	Heat shock 70 kDa protein OS=Glycine max GN=HSP70 PE=1 SV=1	4
EF1A_MANES	Elongation factor 1-alpha OS=Manihot esculenta GN=EF1 PE=3 SV=1	4
HSP11_HELAN	17.6 kDa class I heat shock protein OS=Helianthus annuus GN=HSP17.6 PE=2 SV=1	3
H2B10_ARATH	Histone H2B.10 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g22880 PE=1 SV=3	3
ENO_ORYSJ	Enolase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ENO1 PE=1 SV=2	3
HSP70_CHLRE	Heat shock 70 kDa protein OS=Chlamydomonas reinhardtii GN=HSP70 PE=1 SV=2	2
HS16A_WHEAT	16.9 kDa class I heat shock protein 1 OS=Triticum aestivum GN=hsp16.9A PE=2 SV=1	2
H2B10_ORYSI	Histone H2B.10 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=H2B.10 PE=3 SV=1	2
H4_ARATH	Histone H4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g07660 PE=1 SV=2	2
LECG_ARAHY	Galactose-binding lectin OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=3	2
HSP83_IPONI	Heat shock protein 83 OS=Ipomoea nil GN=HSP83A PE=2 SV=1	2
MDHC2_ARATH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g43330 PE=2 SV=1	2
ALF_MAIZE	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS=Zea mays PE=1 SV=1	2

Příloha 8: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku pekanových ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
G3PC_PEA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Pisum sativum GN=GAPC1 PE=1 SV=1	11
G3PC_DIACA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Dianthus caryophyllus GN=GAPC PE=1 SV=1	10
BIP5_TOBAC	Luminal-binding protein 5 OS=Nicotiana tabacum GN=BIP5 PE=2 SV=1	10
G3PC_ANTMA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Antirrhinum majus GN=GAPC PE=1 SV=1	9
ATPBM_HEVBR	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=ATPB PE=2 SV=1	9
ATPAM_PEA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Pisum sativum GN=ATPA PE=1 SV=2	9
HSP70_MAIZE	Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	9
MD37C_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37C PE=1 SV=1	9
G3PC_PETHY	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Petunia hybrida GN=GAPC PE=2 SV=1	8
CATA3_NICPL	Catalase isozyme 3 OS=Nicotiana plumbaginifolia GN=CAT3 PE=1 SV=1	8
BIP_SOLLC	Luminal-binding protein OS=Solanum lycopersicum PE=1 SV=1	8
BIP2_MAIZE	Luminal-binding protein 2 OS=Zea mays GN=BIPE2 PE=1 SV=3	8
HSP7C_PETHY	Heat shock cognate 70 kDa protein OS=Petunia hybrida GN=HSP70 PE=2 SV=1	8
G3PC_CRAPL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Craterostigma plantagineum GN=GAPC PE=2 SV=1	7
G3PC3_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC3 PE=2 SV=1	7
CATA1_CUCPE	Catalase isozyme 1 OS=Cucurbita pepo GN=CAT1 PE=2 SV=1	7
ACT2_SOLLC	Actin-51 (Fragment) OS=Solanum lycopersicum PE=3 SV=1	7
MASY_CUCMA	Malate synthase, glyoxysomal OS=Cucurbita maxima PE=1 SV=1	7
G3PC_GINBI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Ginkgo biloba PE=2 SV=1	6
EF1A_ORYSJ	Elongation factor 1-alpha OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=REFA1 PE=2 SV=2	6
EF1A_MANES	Elongation factor 1-alpha OS=Manihot esculenta GN=EF1 PE=3 SV=1	6
ENO1_HEVBR	Enolase 1 OS=Hevea brasiliensis GN=ENO1 PE=1 SV=1	6
ENO_ALNGL	Enolase OS=Alnus glutinosa GN=PGH1 PE=2 SV=1	6
MASY_GOSHI	Malate synthase, glyoxysomal OS=Gossypium hirsutum PE=2 SV=1	6
ACT1_DAUCA	Actin-1 OS=Daucus carota PE=2 SV=1	6
G3PC1_HORVU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic OS=Hordeum vulgare GN=GAPC PE=2 SV=1	5

Accession	Protein	#Peptides
ACEA_GOSHI	Isocitrate lyase OS=Gossypium hirsutum PE=2 SV=1	5
PGMC_PEA	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Pisum sativum GN=PGM1 PE=1 SV=1	5
PGMC_POPTN	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Populus tremula GN=PGM1 PE=2 SV=1	5
AAT3_ARATH	Aspartate aminotransferase 3, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ASP3 PE=1 SV=1	5
CATA1_ARATH	Catalase-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=CAT1 PE=2 SV=3	4
CATA3_ARATH	Catalase-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=CAT3 PE=1 SV=3	4
ALF_ORYSJ	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=FBA PE=1 SV=2	4
ALF_MAIZE	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS=Zea mays PE=1 SV=1	4
AAT1_MEDSA	Aspartate aminotransferase 1 OS=Medicago sativa GN=AAT-1 PE=1 SV=2	4
IF4A1_ORYSJ	Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os06g0701100 PE=2 SV=2	4
ENO1_MAIZE	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=1 SV=1	3
GPX4_SPIOL	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Spinacia oleracea PE=2 SV=1	3
MDHC_MEDSA	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Medicago sativa GN=CMDH PE=1 SV=1	3
UGPA_ASTPN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Astragalus penduliflorus GN=UGP PE=1 SV=1	3
HSP11_MEDSA	18.1 kDa class I heat shock protein (Fragment) OS=Medicago sativa GN=HSP18.1 PE=2 SV=1	3
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	3
UGPA_HORVU	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1	3
ENPL_CATRO	Endoplasmic reticulum chaperone homolog OS=Catharanthus roseus GN=HSP90 PE=1 SV=1	3
1433E_TOBAC	14-3-3-like protein E OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	3
SAR1A_ARATH	GTP-binding protein SAR1A OS=Arabidopsis thaliana GN=SAR1A PE=2 SV=1	3
R27AA_ARATH	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPS27AA PE=1 SV=2	2
ALL11_ARAHY	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	2
PDI_RICCO	Protein disulfide-isomerase OS=Ricinus communis PE=1 SV=1	2
ACEA1_SOYBN	Isocitrate lyase 1 (Fragment) OS=Glycine max GN=ICL1 PE=2 SV=1	2
GPX4_CITSI	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Citrus sinensis GN=CSA PE=1 SV=1	2
H2B10_ARATH	Histone H2B.10 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g22880 PE=1 SV=3	2
SAHH_CATRO	Adenosylhomocysteinase OS=Catharanthus roseus GN=SAHH PE=1 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
RS251_ARATH	40S ribosomal protein S25-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPS25A PE=3 SV=3	2
ADT1_SOLTU	ADP,ATP carrier protein, mitochondrial OS=Solanum tuberosum GN=ANT PE=2 SV=1	2
CISY_FRAAN	Citrate synthase, mitochondrial OS=Fragaria ananassa GN=MCSI PE=1 SV=1	2
MDHG_CITLA	Malate dehydrogenase, glyoxysomal OS=Citrullus lanatus PE=1 SV=1	2
ADH1_PETHY	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Petunia hybrida GN=ADH1 PE=3 SV=1	2
SODM_HEVBR	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Hevea brasiliensis GN=SODA PE=2 SV=1	2
PDI_DATGL	Protein disulfide-isomerase OS=Datisca glomerata GN=PDI PE=1 SV=1	2
H2A1_MEDTR	Probable histone H2A.1 OS=Medicago truncatula GN=MtrDRAFT_AC149210g1v1 PE=1 SV=1	2
METE_PLESU	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Plectranthus scutellarioides GN=MET PE=1 SV=2	2
AATM_LUPAN	Aspartate aminotransferase P2, mitochondrial (Fragment) OS=Lupinus angustifolius PE=1 SV=1	2
HS901_ARATH	Heat shock protein 90-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP90-1 PE=1 SV=3	2
RL15A_PICMA	60S ribosomal protein L15-1 OS=Picea mariana GN=SB61 PE=2 SV=1	2
EF2_BETVU	Elongation factor 2 OS=Beta vulgaris PE=2 SV=1	2
ATPA_PELHO	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Pelargonium hortorum GN=atpA PE=3 SV=1	2
HSP80_SOLLC	Heat shock cognate protein 80 OS=Solanum lycopersicum GN=HSC80 PE=2 SV=1	2
MDHM_CITLA	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Citrullus lanatus GN=MMDH PE=1 SV=1	2
EXPA1_ARATH	Expansin-A1 OS=Arabidopsis thaliana GN=EXPA1 PE=2 SV=1	2
RS15A_DAUCA	40S ribosomal protein S15a OS=Daucus carota GN=RPS15A PE=2 SV=3	2
HSP7I_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 9, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP70-9 PE=2 SV=1	2
RS13_PEA	40S ribosomal protein S13 OS=Pisum sativum GN=RPS13 PE=2 SV=1	2
IFRH_SOLTU	Isoflavone reductase homolog OS=Solanum tuberosum PE=2 SV=1	2
RAB1B_ARATH	Ras-related protein RABB1b OS=Arabidopsis thaliana GN=RABB1B PE=2 SV=1	2
6GPD3_ARATH	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g02360 PE=2 SV=1	2
RS4_MAIZE	40S ribosomal protein S4 OS=Zea mays GN=RPS4 PE=2 SV=1	2

Accession	Protein	#Peptides
RS4_GOSHI	40S ribosomal protein S4 OS=Gossypium hirsutum GN=RPS4 PE=2 SV=1	2
ACOC_CUCMA	Aconitate hydratase, cytoplasmic OS=Cucurbita maxima PE=2 SV=1	2
FABI_ARATH	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=MOD1 PE=1 SV=1	2

Příloha 9: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku makadamových ořechů.

Accession	Protein	#Peptides
AMP23_MACIN	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-3 (Fragment) OS=Macadamia integrifolia GN=AMP2-3 PE=1 SV=1	22
AMP22_MACIN	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2 OS=Macadamia integrifolia GN=AMP2-2 PE=2 SV=1	16
ACT1_ORYSI	Actin-1 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=ACT1 PE=1 SV=1	7
EF1A_TOBAC	Elongation factor 1-alpha OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1	6
EF1A1_DAUCA	Elongation factor 1-alpha OS=Daucus carota PE=1 SV=1	5
G3PC_SINAL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Sinapis alba GN=GAPC PE=2 SV=2	5
EF1A1_HORVU	Elongation factor 1-alpha OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1	4
HS901_ARATH	Heat shock protein 90-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HSP90-1 PE=1 SV=3	3
ENO_ALNGL	Enolase OS=Alnus glutinosa GN=PGH1 PE=2 SV=1	3
PGMC_POPTN	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Populus tremula GN=PGM1 PE=2 SV=1	3
CAPP1_SACHY	Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme OS=Saccharum hybrid PE=3 SV=1	3
MDHC_BETVU	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Beta vulgaris GN=NR1 PE=1 SV=1	2
MASY_SOYBN	Malate synthase, glyoxysomal (Fragment) OS=Glycine max PE=2 SV=1	2
ALL11_ARAHY	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1	2
ASPR_HORVU	Phytapsin OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1	2
MAOX_POPTN	NADP-dependent malic enzyme OS=Populus trichocarpa PE=2 SV=3	2
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	2
UBIQ_AVESA	Ubiquitin OS=Avena sativa PE=1 SV=1	2
RAN_VICFA	GTP-binding nuclear protein Ran/TC4 OS=Vicia faba PE=2 SV=1	2
IF4A1_ARATH	Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=TIF4A-1 PE=1 SV=1	2
ENO1_MAIZE	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=1 SV=1	2
PGMC_SOLTU	Phosphoglucomutase, cytoplasmic OS=Solanum tuberosum GN=PGM1 PE=2 SV=1	2
THI4_ARATH	Thiamine thiazole synthase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=THI1 PE=1 SV=1	2
SSDH_ARATH	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH5F1 PE=1 SV=2	2

Příloha 10: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku piniových oříšků.

Accession	Protein	#Peptides
EF1A1_ARATH	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=A1 PE=1 SV=1	3
H4_ARATH	Histone H4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g07660 PE=1 SV=2	2
G3PC_GINBI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Ginkgo biloba PE=2 SV=1	2

Příloha 11: Nalezené proteiny metodou LC-MS/MS ve vzorku sušeného kokosu.

Accession	Protein	#Peptides
G3PC_MAGLI	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Magnolia liliiflora GN=GAPC PE=2 SV=1	7
G3P_ATRNU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Atriplex nummularia PE=2 SV=1	7
ENO2_MAIZE	Enolase 2 OS=Zea mays GN=ENO2 PE=2 SV=1	7
ENO_ORYSJ	Enolase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=ENO1 PE=1 SV=2	7
G3PC_DIACA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Dianthus caryophyllus GN=GAPC PE=1 SV=1	6
ENO1_HEVBR	Enolase 1 OS=Hevea brasiliensis GN=ENO1 PE=1 SV=1	6
PGKH_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	6
ENO1_MAIZE	Enolase 1 OS=Zea mays GN=ENO1 PE=1 SV=1	6
G3PC_CRAPL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Craterostigma plantagineum GN=GAPC PE=2 SV=1	5
ENO_SOLLC	Enolase OS=Solanum lycopersicum GN=PGH1 PE=2 SV=1	5
PGKY_TOBAC	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1	4
ALF_ORYSJ	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=FBA PE=1 SV=2	4
G3PC_TAXBA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic OS=Taxus baccata PE=2 SV=1	4
EF1A2_HORVU	Elongation factor 1-alpha OS=Hordeum vulgare GN=BLT63 PE=1 SV=1	4
UGPA1_ARATH	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g17310 PE=2 SV=1	4
HSP7C_PETHY	Heat shock cognate 70 kDa protein OS=Petunia hybrida GN=HSP70 PE=2 SV=1	3
PLSC_COCNU	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase OS=Cocos nucifera PE=1 SV=1	3
H4_ARATH	Histone H4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g07660 PE=1 SV=2	3
REHYA_ORYSI	1-Cys peroxiredoxin A OS=Oryza sativa subsp. indica GN=OsI_27030 PE=2 SV=1	2
TPIS_ORYSJ	Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=TPI PE=1 SV=3	2
HSP11_OXYRB	18.3 kDa class I heat shock protein OS=Oxybasis rubra GN=HSP18 PE=2 SV=1	2
ACT_CHLRE	Actin OS=Chlamydomonas reinhardtii PE=1 SV=1	2
H2B10_ARATH	Histone H2B.10 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g22880 PE=1 SV=3	2
ACT_SCHDU	Actin OS=Scherffelia dubia PE=2 SV=1	2
ARF_MAIZE	ADP-ribosylation factor OS=Zea mays GN=ARF1 PE=2 SV=2	2