

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Proteomická identifikace skořápkových plodů ve vybraných druzích cukroví

Proteomic identification of nuts in festive cookies

Bc. Lucie Kadeřábková

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

Studijní program: Učitelství chemie pro 2. stupeň základní školy a střední školy
(N0114A300093)

Studijní obor: N CH-BI 20 (0114TA300093, 0114TA300088)

Odevzdáním této diplomové práce na téma *Proteomická identifikace skořápkových plodů ve vybraných druzích cukroví* potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucí práce samostatně za použití v práci uvedené literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze 4. dubna 2024

Lucie Kadeřábková

Poděkování

Na prvním místě velice ráda věnuji toto poděkování paní doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph.D., pod jejímž vedením tato práce vznikala. Velmi si vážím jejího laskavého a současně profesionálního přístupu, odbornosti, smyslu pro detail a veškerého času, který mi věnovala. Neméně důležitá část vyjádření tohoto poděkování jí rovněž patří za její vstřícnost, neuvěřitelnou schopnost zachovat klid a za neobyčejnou podporu, kterou mi poskytovala během celého procesu zpracovávání této diplomové práce. Speciální poděkování patří taktéž panu Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D., který se postaral o notnou dávku napětí a očekávání v souvislosti se získáním dat za pomoci metody LC-ESI-Q-TOF MS. Přestože se touto cestou nepodařilo kvůli technickým problémům získat data od většiny připravených vzorků, upřímně mu děkuji za jeho věnovaný čas měření a část dat, kterou jsem nakonec získala. Mé poděkování samozřejmě náleží i ostatním pracovníkům a doktorandům z Laboratoře aplikované proteomiky, a to za vždy přátelskou atmosféru na pracovišti.

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se věnuje proteomické identifikaci vybraných skořápkových plodů na příkladu svátečního cukroví. Za účelem identifikace přítomných plodů ve vzorcích byly využity dva typy hmotnostní spektrometrie, jejichž výsledky mohou nabídnout vzájemné doplnění i srovnání. Teoretická část se v počátku zaměřuje na nutriční specifika skořápkových plodů. Její významný díl se poté zabývá širokou otázkou falšování a autentizace potravin, kdy je důraz kladen na skořápkové plody. Teoretickou část zakončuje pohled na odbornost tématu didaktickou optikou a jeho případné možnosti zařazení do výuky chemie či dalších oborů.

Předmětem analýzy bylo jedenáct druhů skořápkových plodů po vystavení teplot, simulující pečení cukroví, a sedm druhů vánočního cukroví (šest komerčních výrobků a jeden druh „neznámého“ cukroví, kde nebylo dopředu známo, z jakého skořápkového plodu bylo připraveno). Využita byla hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF s následným vyhodnocením pomocí objektově-relačního databázového systému PostgreSQL, a to s cílem získat charakteristické hodnoty m/z pro každý plod po teplotním ošetření a následně porovnat s hodnotami m/z nalezenými ve vzorcích vánočního cukroví. Pomocí nalezených hodnot bylo cílem identifikovat přítomnost deklarovaných plodů a určit, jaký plod byl použit v „neznámém“ cukroví. Jejich identifikace v cukroví byla potvrzena s různě vysokou úspěšností u čtyř ze šesti vzorků komerčních výrobků, míra úspěšnosti je vždy závislá na počtech nalezených unikátních hodnot m/z deklarovaného plodu. U „neznámého“ vzorku se podařilo správně odhalit využitý skořápkový plod na základě přítomnosti jedné třetiny unikátních hodnot m/z pro daný plod.

Další využitou metodou pro analýzu proteinové složky vzorků byla hmotnostní spektrometrie typu LC-ESI-Q-TOF (pouze pro vzorky vánočního cukroví), jež poskytuje detailnější informace o přítomných peptidech včetně aminokyselinových sekvencí. Touto metodou získané hodnoty m/z byly porovnávány s unikátními hodnotami m/z , které byly získány měřením z MALDI-TOF MS. Zjišťovaný překryv nalezených hodnot je ale poměrně nízký. Momentálně se tedy ukazuje postup, při němž byla využita metoda MALDI-TOF MS jako úspěšnější, nicméně relevantní porovnání obou metod v současné době není jednoznačně možné. Přesto lze s ohledem na vyšší přesnost a citlivost metody LC-ESI-Q-TOF MS očekávat její značný potenciál či dokonce možnost překonat úspěšnost měření z MALDI-TOF MS.

KLÍČOVÁ SLOVA

autentizace potravin, hmotnostní spektrometrie, skořápkové plody, cukroví, proteomika

ABSTRACT

This diploma thesis is devoted to the proteomic identification of selected nuts in festive cookies. Two types of mass spectrometry were used for the nut identification; their outcomes allow for comparison and completeness of the data. The theoretical part provides a comprehensive overview of the nutritional values of nuts and the issues of food fraud and authenticity. It concludes with a didactic view and potential applications in chemistry lessons and other school subjects.

The experimental part analysed eleven different nuts, submitted to high temperatures, which simulated baking and seven different types of festive cookies (six mass-produced cookies and one type of cookie with priorly unknown content of nuts). Mass spectrometry MALDI-TOF was used with subsequent evaluation using relational database system PostgreSQL to obtain characteristic m/z values for each of the eleven heat-subjected nuts. These values were then compared to the m/z values of the festive cookies to identify declared nuts and nuts used in the "unknown" sample. This identification was proved with various success rates in four of six mass-produced samples. The success rate was derived from the number of unique m/z values found in each of the nuts. The "unknown" sample was correctly identified based on the presence of one third of unique m/z values characteristic of the nuts.

Furthermore, an additional method used to analyse the protein components of the festive cookies samples was mass spectrometry LC-ESI-Q-TOF, which provided more detailed information about the present peptides and the amino acid sequences. The m/z values obtained from this method were compared to the unique values from MALDI-TOF MS; however, the data overlap was relatively low. This result suggests that the MALDI-TOF MS method is more accurate; nevertheless, a relevant comparison of both methods is ambiguous for now.

Nonetheless, considering the higher accuracy and sensitivity of the LC-ESI-Q-TOF MS method, it is to be expected its wider use and even the possibility of surpassing the success of measurements from MALDI-TOF MS.

KEYWORDS

food authentication, mass spectrometry, nuts, festive cookies, proteomics

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	10
1.1 Suché skořápkové plody	10
1.1.1 Charakteristika a spotřebitelské zařazení	10
1.1.2 Biochemické složení a látková charakteristika skořápkových plodů	11
1.1.3 Nutriční specifika zvolených skořápkových plodů	18
1.2 Produkce, spotřeba a zpracování skořápkových plodů	25
1.2.1 Celosvětová produkce skořápkových plodů	26
1.2.2 Spotřeba a konzumace surových i zpracovaných skořápkových plodů	28
1.3 Využití a pozice skořápkových plodů (nejen) ve výživě	29
1.4 Vliv na zdraví člověka jako klíčový aspekt konzumace	33
1.4.1 Pozitivní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka	33
1.4.2 Negativní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka	35
1.5 Falšování potravin se zaměřením na skořápkové plody	39
1.5.1 Důvody falšování	40
1.5.2 Druhy falšování	41
1.5.3 Dopady falšování na kvalitu a bezpečnost potravin	43
1.6 Analytické metody zaměřené na identifikaci a autentizaci potravin	44
1.6.1 Identifikace skořápkových plodů na základě lipidového obsahu	48
1.6.2 Identifikace skořápkových plodů na základě proteinového obsahu	50
1.6.3 Identifikace skořápkových plodů pomocí DNA (genomické) analýzy	52
1.7 Didaktický pohled na výuku odborného tématu ve výuce (chemie)	53
2 Experimentální část	58
2.1 Použité chemikálie a vybavení	58

2.2	Příprava pracovních roztoků	59
2.3	Referenční materiály	60
2.4	Vážení vzorků	63
2.5	Enzymatické štěpení vzorků	65
2.6	Přečištění pomocí reversní fáze	66
2.7	Provedení měření za pomoci MALDI-TOF MS	68
2.8	Provedení měření za pomoci LC-ESI-Q-TOF MS	70
2.9	Softwarové zpracování a vyhodnocení získaných dat	71
3	Výsledky	74
3.1	Výsledná data získaná z měření pomocí MALDI-TOF MS	74
3.1.1	Peptidové markery pro skořápkové plody v syrovém a pečeném stavu	74
3.1.2	Identifikace skořápkových plodů ve vánočním cukroví	87
3.2	Výsledná data získaná z měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS	92
4	Diskuse	98
	Závěr	104
	Seznam použitých zkratk	106
	Seznam použité literatury	109
	Seznam příloh	121

Úvod

Skořápkové plody, lidově ořechy, do stravy člověka patří již odnepaměti, ačkoli jsou to zpravidla drobná semena či plody rostlin, jsou velmi cennou komponentou lidského jídelníčku. Toto tvrzení podporuje mimo jiné např. akční rámec pro rozvoj a implementaci veřejných zakázek na potraviny a služby pro zdravou výživu představený Světovou zdravotnickou organizací (WHO) z roku 2021. WHO nejen skrze tento rámec zařazuje ořechy mezi zdraví prospěšné potraviny. Tradiční konzumaci vlašských nebo lískových ořechů v České republice již doplňují i další „exotičtější“ druhy skořápkových plodů, přičemž v současnosti u nás není takový problém zakoupit i naše nepůvodní ořechy. K dispozici jsou nejen jakožto samotné plody, ale také ve směsích či doplněné o další složky (např. sušené ovoce). Stále častěji jsou spotřebiteli ořechy s ohledem na svou vyšší pořizovací cenu vyhledávány i v různých zpracovaných produktech, tj. v pečivu, cereáliích, tyčinkách a dalších potravinách.

Zájem o produkty obsahující ořechy souvisí také s aktuálně rostoucím trendem konzumace nízkosacharidových produktů, tedy potravin bohatých na tuky a bílkoviny, čemuž ořechy v naprosté většině dokonale odpovídají. U zpracovaných produktů již může být vizuálně obtížnější určit, o jaké plody se jedná, případně jestli jsou v produktu skutečně obsaženy. Ořechy tak ve zpracované podobě mohou být právě s ohledem na vyšší pořizovací ceny významně více vzájemně zaměňovány či jinak falšovány. Falšování v potravinářství nemusí mít pouze finanční dopady na spotřebitele, nýbrž také na jeho zdraví, kdy mezi nejdůležitější z nich (v souvislosti se skořápkovými plody) patří rizika projevy alergie na přítomné složky, jež nebyly deklarovány výrobcem. Ve spojitosti s neustálými riziky klamavého jednání vůči spotřebiteli jsou pochopitelně snahy vyvíjet co možná nejvíce přesné, rychlé a finančně méně nákladné způsoby, jak taková jednání odhalit. Autentizace potravin využívá nejrůznější analytické metody (nejčastěji na bázi analýzy DNA či proteinů) k získání pravosti informací deklarované výrobcem o dané potravine.

Rovněž tato práce si klade za cíl potvrdit pravost informací uváděné výrobcem v souvislosti se skořápkovými plody. Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci autorky, kde bylo cílem rozlišení jedenácti druhů skořápkových plodů mezi sebou na základě proteomického složení. Již v rámci bakalářské práce bylo potvrzeno, že rozlišení všech

jedenácti plodů je od sebe navzájem možný. Vzorky byly v rámci předchozí práce štěpené enzymem trypsinem, a poté měřeny pomocí techniky hmotnostní spektrometrie, konkrétně metodou MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). Cennými výsledky z bakalářské práce jsou charakteristické hodnoty m/z , jež determinují každý z jedenácti druhů skořápkových plodů v této porovnávané skupině. Získané výsledky a odpovědi na otázky obvykle budí další otázky, ani nyní tomu nebylo jinak a na tyto otázky se pokusí přinést odpovědi právě následující diplomová práce.

Cílem předkládané diplomové práce je podpořit využitelnost metody MALDI-TOF MS i při analýze reálných produktů, v jejichž složení jsou právě některé ze skořápkových plodů deklarovány. Pro účely naplnění tohoto cíle byly modelově zvoleny vzorky vánočního cukroví, jež obsahují vybrané skořápkové plody. Poněvadž pečivo a cukroví obvykle prochází v rámci své přípravy pečením, podpořilo to vznik další otázky, respektive v přeneseném významu cíle práce, a sice, zda jednotlivé skořápkové plody budou poskytovat stále stejné či odlišné charakteristické hodnoty m/z . Prvotním cílem se tedy stalo zjistit, jaké jsou unikátní hodnoty m/z pro pečené varianty již dříve rozlišených skořápkových plodů s potenciální možností identifikovat vystavení teploty u analyzovaných plodů. Následně je cílem aplikovat stejný postup pro analýzu reálných vzorků vánočního cukroví se snahou verifikovat metodu MALDI-TOF MS pro identifikaci přítomných skořápkových plodů.

Poněvadž data získaná měřením MALDI-TOF MS v konečném pohledu poskytují „pouze“ hmotnostní spektra s identifikovanými charakteristickými hodnotami m/z bez další konkretizace identifikovaného peptidu jako je jeho původ či aminokyselinová sekvence. Lze očekávat, že ve vzorcích jako je vánoční cukroví budou identifikovány peptidy i z dalších ingrediencí, které se v hmotnostním spektru rovněž projeví signálem, tento signál může být silnější, a tedy překrýt či zabránit projevu ostatních méně zastoupených složek, tj. i přítomným skořápkovým plodům. Na základě toho je cílem využít i další metodu, konkrétně LC-ESI-Q-TOF MS (*liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*) pro získání detailních informací o nalezených peptidech. Pro celkové hodnocení mohou být zásadní, jak shody, tak ale i rozdíly ve výsledcích obou metod. Klíčovým cílem je zhodnocení využitých postupů s ohledem na jejich možné uplatnění při identifikaci přítomnosti skořápkových plodů v produktech.

1 Teoretická část

1.1 Suché skořápkové plody

Za skořápkové plody jsou a priori považovány ořechy (Hlavatá, 2015). Není ale zcela vhodné dávat mezi tato zdánlivá synonyma rovnítko. Biologie, respektive botanika, dokáže jednotlivé skořápkové plody velmi dobře rozčlenit, přičemž se ne vždy musí jednat o plody jako takové. Kategorie pravých ořechů přísluší pouze některým ze skupiny skořápkových plodů, a to konkrétně těm, jež botanicky odpovídají suchým nepukavým plodům. Mezi ně patří například ořechy lískové nebo makadamové (Valíček, 2002). Skupinu skořápkových plodů nelze tak příliš snadno generalizovat, poněvadž se nejedná jen o ořechy, nýbrž také o semena, jádra semen či části plodů rostlin pěstovaných především v tropických či subtropických oblastech (Valíček, 2002). Označení **suché skořápkové plody** pramení z povahy plodů jako takových. Oproti „klasickým“ dužnatým plodům jsou skořápkové plody tvrdé a skutečně i relativně suché, přestože jsou velmi bohaté na tuky (Dostálová & Kadlec, 2014).

1.1.1 Charakteristika a spotřebitelské zařazení

Z potravinářského pohledu skořápkové plody patří mezi ovoce (Dostálová & Kadlec, 2014), jedná se ale o velmi speciální, ovšem neméně důležitou skupinu. Dalo by se polemizovat nad tím, že do základního pojetí ovoce tyto plody příliš nezapadají, nicméně je to jen prvotní zdání. Ač skořápkové plody neobsahují vysoké procento vody, jako je tomu u většiny dostupného ovoce (Hlavatá, 2015), tak jejich podobnost s klasickým ovocem tkví ve významném podílu nutričně cenných látek, jako jsou vitamíny, minerály a tzv. bioaktivní látky (Hlavatá, 2015; Velíšek, 2002b). Dostálová a Kadlec (2014) uvádí, že se ovoce dále člení nejen do základních skupin, ale přidávají například tropické ovoce, hrozny a další. Skořápkové plody svou vlastní kategorií mají také, nazývá se **skořápkové ovoce**, a lze tam veškeré „ořechy“ bez obav zařadit. Obecně jsou skořápkové plody považovány za velmi heterogenní skupinu zahrnující nejen ořechy a semena, ale také se k nim přidružují například arašídny (Brufau *et al.*, 2006), jež mají zvláštní postavení. Jejich specifikum je dáno tím, že botanicky patří spíše k luštěninám nikoli k ovoci. Jejich spojení s dalšími skořápkovými plody tak čistě vychází z nutričního složení.

Arašídy nejsou jediným příkladem¹ přidružení ke skořápkovým plodům, další takovou ukázkou mohou být kupříkladu jedlé kaštiny (Sathe *et al.*, 2008a). Jejich přidružení pramení z podobnosti ve smyslu následné konzumace a eventuálních úprav na další potravinářské produkty (Kadlec *et al.*, 2012). Výživový potenciál či botanické hledisko je ale již více odlišné od základní skupiny skořápkových plodů (Sathe *et al.*, 2008a). Logicky větší význam má přiřazení například tzv. alaburek neboli sójových „oříšků“. Jedná se o pražené sójové boby, silně připomínající vzhledem i chutí arašídů (Bonku & Yu, 2020). Objevují se případy, kdy výrobci k těmto „oříškům“ přidávají v malém zastoupení také arašídy, což spotřebitel mnohdy ani nemusí poznat (Zdraví z přírody, n.d.). Dokonce i výživové hodnoty na první pohled mohou odpovídat některým skořápkovým plodům (Bonku & Yu, 2020), pražené sójové boby tvoří přibližně z jedné třetiny bílkoviny (Zdraví z přírody, n.d.), což naznačuje podobnost například k právě zmiňovaným arašídům. Obsah lipidů již ale není tak vysoký, proto mohou být tedy spíše alternativním zdrojem rostlinných bílkovin nikoli tuků (Bonku & Yu, 2020; Zdraví z přírody, n.d.).

Přehled veškerých ořechů, semen a plodů patřící do skupiny skořápkových plodů je specifikován vyhláškou č. 397/2021 Sb., §11. Kromě již zmíněných arašídů, jedlých kaštanů či lískových ořechů zahrnuje dále klasicky: kešu, kokos, mandle, makadamové ořechy, para ořechy, pekanové ořechy, piniové oříšky, pistácie a vlašské ořechy. Mimo základní skupinu skořápkových plodů taktéž výše uvedená vyhláška charakterizuje možné formy a podoby prodávaných plodů. Tzn., zdali se jedná o ořechy ve skořápce, pouze jako jádra, případně v pražené či solené formě. Charakterizovány jsou zde též nezbytné nároky na fyzikální, chemické a jakostní vlastnosti plodů včetně požadavků na ořechové produkty, jako jsou například různé ořechové pasty či mouky.

1.1.2 Biochemické složení a látková charakteristika skořápkových plodů

Biochemické složení skořápkových plodů z primárního hlediska zahrnuje všechny základní makroživiny, tj. proteiny, lipidy a sacharidy. V některých případech se ještě k makroživinám

¹ Kromě již zmíněných přidružených „skořápkových plodů“ (arašídy, jedlé kaštiny, alaburky) lze v tomto kontextu připomenout rovněž **piniové oříšky**, jež jsou semínka pocházející ze šištice borovice pinie (Hieke, 2008), a tak také mezi ostatní skořápkové plody chceme-li „ořechy“ stoprocentně nezapadají.

uvádí i podíl vody. Ačkoli voda nedodává tělu energii jako živiny, je nedílnou součástí lidské potravy (Pánek, 2002). Již výše bylo zmíněno, že procentuální zastoupení vody u skořápkových plodů není příliš vysoké (Hlavatá, 2015), čímž se značně liší od ostatního ovoce eventuálně plodů rostlin všeobecně. Základní poměr makroživin u jednotlivých druhů skořápkových plodů je přirozeně dán konkrétním druhem, ale také kvalitou půdy, následnou sklizní, zpracováním a uchováváním (Kadlec *et al.*, 2012). Skořápkové plody jsou z makroživinového hlediska zajímavé pro svůj obvykle velmi vysoký podíl lipidů, jež v drtivé většině zahrnují vyšší množství zdravých nenasycených mastných kyselin (Bonku & Yu, 2020). Nicméně některé ze skořápkových plodů jsou rovněž považovány za vhodný zdroj bílkovin (Sá *et al.*, 2020). I přestože lze bohatost proteinového složení porovnávat s živočišnými bílkovinami jen obtížně (Velíšek, 2002a), stále mají své poměrně zásadní místo mezi rostlinnými proteiny lidské stravy (Pánek, 2002). Podíl sacharidů je v rámci složení skořápkových plodů velmi variabilní a celkově není příliš významný v porovnání s vysokým podílem lipidů (Bonku & Yu, 2020).

Látkové složení skořápkových plodů samozřejmě nekončí základními makroživinami, obsahuje neméně důležité další, přesto však minoritní složky, jež jsou označovány jako mikroživiny. Patří sem vitamíny, minerální látky a tzv. bioaktivní sloučeniny zahrnující především látky s antioxidačními účinky (Pánek, 2002; Velíšek, 2002b).

Významným makro i mikronutrientům jsou věnovány následující části této podkapitoly.

Makronutrienty

Jako prvním nutrientem se nabízí **voda**, třebaže méně významná ve složení skořápkových plodů, tak je klíčovou součástí potravy člověka. Přestože se ne vždy hovoří o živině jako takové, je vhodné ji při obecném složení připomenout, jelikož má svou nezastupitelnou úlohu v organismu podobně jako ostatní živiny (Kleiner, 1999; Pánek, 2002). Množství vody ve skořápkových plodech bývá závislé na lokalitě a době sklizně, případně i na následné manipulaci s plody (Kadlec *et al.*, 2012; Sathe *et al.*, 2008a). Obecně je žádoucí nižší obsah vody (respektive vlhkosti), poněvadž plody nepodléhají tak snadno zkáze či nechtěným biologickým a chemickým změnám (Sathe *et al.*, 2008a). Přípustné množství vody je v České republice definováno vyhláškou č. 397/2021 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

Obvyklé zastoupení vlhkosti v celých plodech (tzn. i se skořápkou) se pohybuje okolo 10 % (uvedeno v hmotnostních procentech). Jedinou výjimkou mezi plody je kokosový ořech, jenž ve své podstatě představuje dužnatý plod chráněný skořápkou. Ovoce a dužnaté plody jsou charakterizovány přirozeně vyšším podílem vody, a v případě kokosu je limit obsahu vody stanoven na hodnotu 47 % (uvedeno v hmotnostních procentech).

První klasickou makroživinou jsou tedy až **sacharidy**, jež jsou pro skořápkové plody též méně významné. Zastoupení sacharidů se pohybuje v rozpětí cca 10 g sacharidů na 100 g plodů až 30 g sacharidů na 100 g plodů. Nejvyšší zastoupení vykazují kešu ořechy a pistácie (v obou případech je zastoupení sacharidů kolem 30 g na 100 g plodů), v ostatních případech lze hovořit o průměrné hodnotě kolem 15 g na 100 g plodů (Bonku & Yu, 2020; Brufau *et al.*, 2006), hodnota je přirozeně variabilní i dle podmínek při sklizni včetně následného zacházení s plody (Kadlec *et al.*, 2012; Sathe *et al.*, 2008a). Skořápkové plody z hlediska sacharidového zastoupení obsahují zejména sacharosu, monosacharidy téměř neobsahují (Sathe *et al.*, 2008a), což vykazuje značný rozdíl v porovnání s plody klasického ovoce, které je v různých množstvích bohaté na ovocný cukr (fruktosu).

Skořápkové plody jsou rovněž dobrým zdrojem **vlákniny**, což je specifická sacharidová složka potravy, která je pro člověka nestravitelná, ale pozitivně působí na lidské zdraví (Pánek, 2002). V případě skořápkových plodů se nejedná o adekvátní náhradu ovoce či zeleniny, nýbrž jde spíše o doplněk z hlediska zařazení dalšího zdroje vlákniny do potravy (Bonku & Yu, 2020). Vlákna celkově podporuje normální funkci gastrointestinálního traktu a má pozitivní účinek na udržování tělesné hmotnosti, udržování hladiny glukosy a hladiny cholesterolu v krvi, čímž souhrnně kladně působí na kardiovaskulární soustavu člověka (Bonku & Yu, 2020; Pánek, 2012).

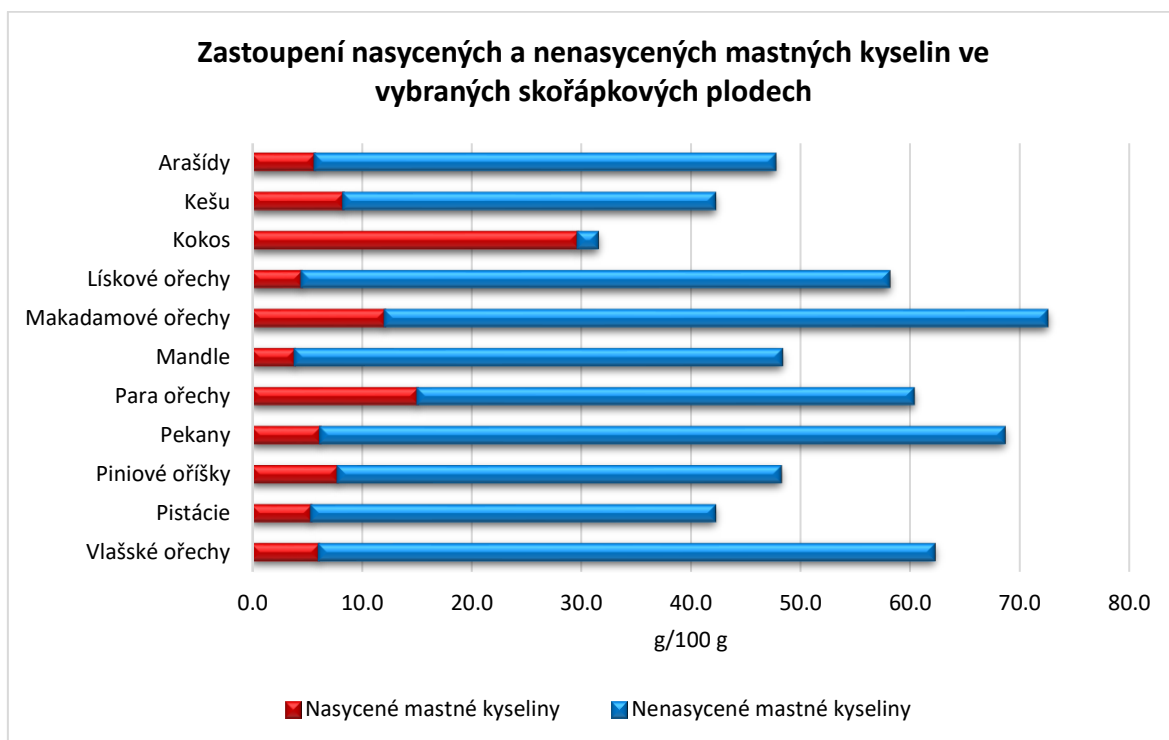
Dalšími velmi podstatnými makronutrienty jsou **bílkoviny**, přestože i množství bílkovin je napříč skořápkovými plody taktéž velmi variabilní, tak se již jedná o poměrně zásadní nikoli zanedbatelné množství (Sathe *et al.*, 2008a). Výjimkou je zde opět čerstvý kokosový ořech, u nějž je množství proteinů relativně nízké, a sice 3,0 g na 100 g plodu (Agyemang-Yeboah, 2011). Skořápkové plody představují poměrně dobrý zdroj bílkovin se zohledněním na to, že se jedná o potravinu rostlinného původu. U potravin živočišného původu (zejména u masa) lze samozřejmě hovořit o aminokyselinově bohatší stravě a naproti

tomu je jednostranná rostlinná strava vždy obvykle chudší na kvalitní bílkovinné zdroje (Velíšek, 2002a). V porovnání s bílkovinami živočišného původu mají přirozeně odlišné aminokyselinové složení a část esenciálních aminokyselin v nich ani není prakticky zastoupena (Venkatachalam & Sathe, 2006). V případě skořápkových plodů je obecně limitující až chybějící aminokyselinou threonin (Brufau *et al.*, 2006; Venkatachalam & Sathe, 2006), dále pak v naprosté většině skořápkových plodů (vyjma pistácií) je to aminokyselina lysin (Sathe *et al.*, 2008a). Obecně jsou ale skořápkové plody hodnoceny jako méně kvalitní zdroj bílkovin s ohledem na menší zastoupení některých esenciálních aminokyselin (Velíšek, 2002a). Další limity jsou spíše závislé na konkrétních druzích, jako například mandle mají své charakteristice limitující aminokyseliny cystein a methionin (Sathe *et al.*, 2008a; Venkatachalam & Sathe, 2006). Nejlépe aminokyselinově vybavené jsou para ořechy, které mají pestřejší zastoupení esenciálních aminokyselin proti ostatním plodům (Sathe *et al.*, 2008a), nicméně jejich konzumace by neměla být zvýšená, nýbrž spíše naopak kvůli velmi vysokému obsahu selenu (Sathe *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2019).

Mezi nejvíce zastoupené makroživiny napříč skořápkovými plody patří **lipidy**. Obsah tuků je fakticky u všech skořápkových plodů nejvyšší ze všech dostupných živin, a je tedy v rozpětí hodnot přibližně 33,5 g lipidů na 100 g plodů v případě čerstvého kokosu (Agyemang-Yeboah, 2011) až po cca 75,8 g lipidů na 100 g plodů v případě makadamových ořechů (Brufau *et al.*, 2006). Průměrně skořápkové plody tedy obsahují alespoň z poloviny své hmotnosti tuky. Množství tuků je podobně jako u ostatních živin samozřejmě variabilní s ohledem na konkrétní druh ale i lokalitu, kde jsou skořápkové plody pěstovány (Brufau *et al.*, 2006; Sathe *et al.*, 2008a).

Skořápkové plody mají velice příznivé lipidové složení, poněvadž v naprosté většině převažují nenasycené mastné kyseliny nad nasycenými, a to poměrně výrazně. Výjimku mezi zkoumanými plody tvoří pouze kokosový ořech, jehož lipidová charakteristika vyjadřuje přesný opak, tzn. výrazně dominují nasycené mastné kyseliny. Z tohoto důvodu kokos není příliš vhodným zdrojem zdravých tuků ve stravě člověka (Agyemang-Yeboah, 2011; Sathe *et al.*, 2008a).

Obrazové vyjádření podílu nasycených a nenasycených mastných kyselin u vybraných jedenácti skořápkových plodů je vyjádřeno graficky na následující straně (graf 1).



Graf 1: Zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin ve vybraných jedenácti druzích skořápkových plodů (zdroj dat: Sathe *et al.*, 2008a, s. 16).

Vysoký obsah nenasycených mastných kyselin představuje určité zdravotní benefity, má například vliv na snižování množství nízkodenzitních lipoproteinových částic (LDL) v krvi či obecně pozitivní vliv na zdraví kardiovaskulárního systému člověka (Sathe *et al.*, 2008a). I přes tyto příznivé zdravotní benefity není vhodná nadměrná konzumace skořápkových plodů. Uvádí se obvyklá porce kolem 25 g na den, případně 100 až 150 g na týden, vždy ale s ohledem na ostatní energetický příjem jedince (Hlavatá, 2015).

Mikronutrienty

Vzhledem k tomu, že mají skořápkové plody ve svém složení největší podíl tuků, tak v jejich složení dominují **vitamíny** rozpustné v tucích, zejména pak tokoferol (vitamín E). Tokoferol je přítomný v nutričním složení všech skořápkových plodů a jeho vliv na organismus je velice pozitivní (Sathe *et al.*, 2008a; Svačina *et al.*, 2008). Největší množství se ho nachází v mandlích, nejméně naopak v kokosovém ořechu (Sathe *et al.*, 2008a). Vitamín E vykazuje antioxidační účinky a společně se zdravými tuky příznivě působí na kardiovaskulární

soustavu člověka (Svačina *et al.*, 2008). Dále dominují vitamíny řady B (Sathe *et al.*, 2008a). Ořechy představují velice vhodný zdroj vitamínů skupiny B, zvláště pak thiaminu (B₁), niacinu (B₃), kyseliny pantothenové (B₅) a pyridoxinu (B₆), další vitamíny z řady B jsou jistě ve skořápkových plodech taktéž obsaženy, ale již je třeba více zohlednit konkrétní druh, jenž je za tímto účelem konzumován. Ve složení některých ořechů se vyskytuje také vitamín A, C nebo K, tyto vitamíny se již nevyskytují napříč celým spektrem skořápkových plodů (Sathe *et al.*, 2008a). Přítomnost vitamínů v potravě je pro správné fungování těla naprosto nezbytná, proto lze z tohoto hlediska skořápkové plody řadit na úroveň ovoce či zeleniny. Vyskytuje se dokonce označení tzv. superpotravin, jež skořápkovým plodům přísluší díky své nutriční bohatosti vzhledem k potřebnému množství na porci (Hlavatá, 2015).

Skořápkové plody dále obsahují **minerální látky**², kdy většina plodů obsahuje především Ca, K, Mg, P, což jsou majoritní prvky, které se v ořechích nachází. Dále jsou velmi často přítomny tzv. minoritní prvky a pro skořápkové plody jsou typické tyto následující tři: Fe, Mn, Zn. Třetí skupinu pak tvoří tzv. stopové prvky a mezi ně se řadí Cu a Se, které jsou pro některé ořechy též charakteristické (Sathe *et al.*, 2008a; Velíšek, 2002b). Rozdělení jednotlivých prvků do třech zmíněných kategorií kopíruje jejich zastoupení ve 100 g plodů; majoritní – stovky mg/100 g, minoritní – desítky mg/100 g, stopové – jednotky a méně mg/100 g (Velíšek, 2002b). Přesné zastoupení všech přítomných minerálních látek je přirozeně opět vázané nejen na konkrétní druh, eventuálně jeho odrůdu, ale rovněž na zeměpisnou lokalitu pěstování respektive i na kvalitu půdy (Sathe *et al.*, 2008a).

Minerálními látkami složení ale nekončí, skořápkové plody dále obsahují tzv. **bioaktivní látky**. Jedná se o látky, které nemají přímo výživovou funkci, ale slouží jako určitá podpora pro vstřebávání některých živin, případně mají ochrannou funkci (Sathe *et al.*, 2008a). Tyto látky mají často charakter antioxidantu a v případě skořápkových plodů se jedná o látky příbuzné fenolu (fenolické kyseliny, flavonoidy a další) či sterolu, tzv. fytosteroly (Alasalvar & Shahidi, 2008). Látky s antioxidačním charakterem pojmu volný radikál a chrání organismus například před vznikem nádorového onemocnění, rozvojem aterosklerosy či dalších civilizačních nemocí. Jedná se tedy o skupinu látek, jež je velmi

² Přestože jsou minerální látky v celé práci vyjadřovány jako jednotlivé chemické prvky, jedná se pouze o zápis umožňující snazší orientaci v textu; veškeré prvky se v potravě i těle člověka vyskytují jako odpovídající ionty.

výhodná pro prevenci před celou řadou onemocnění. Přestože jsou látky fenolické povahy napříč skořápkovými plody hojně obsaženy, jen velmi malou část člověk skutečně zkonzumuje. Důvodem je fakt, že největší koncentrace antioxidantů se nachází ve slupce či těsně pod ní. Pokud se před konzumací jádra této slupky zbaví, jsou pak ořechy pochopitelně o antioxidační účinky chudší (Sathe *et al.*, 2008a). Co se antioxidačního účinku tedy týče, je výhodné konzumovat plody se slupkou, jako jsou například běžně konzumovány vlašské ořechy. Antioxidační potenciál sice plody odstraněním slupky ztrácí, nicméně naprostá většina z nich si svůj antioxidační potenciál ponechává například i skrze přítomnost tokoferolu, jehož zastoupení je, s ohledem na jeho rozpustnost v tukách a velké množství tuků ve skořápkových plodech, velmi významné (Sathe *et al.*, 2008a; Svačina *et al.*, 2008).

Poslední podstatnou skupinou látek ve složení skořápkových plodů jsou fytosteroly, jež se dají též přiřadit k bioaktivním látkám, jelikož nemají a priori nutritivní funkci. Jedná se o látky příbuzné cholesterolu a pro rostlinu mají velmi důležitou strukturní funkci. Pro člověka v potravě nesou tyto látky značný benefit v souvislosti se vstřebáváním cholesterolu a s regulací jeho hladiny v krvi (Sathe *et al.*, 2008a).

Obecně vzato jsou skořápkové plody poměrně nutričně bohatou potravinou, pokud vezmeme v potaz doporučenou denní porci (cca 25 g), kdy jsou plody velice kvalitním zdrojem tuků, doplňují je bílkoviny a jsou bohaté na celou řadu minerálních látek a vitamínů (Hlavatá, 2015). Bohatost je samozřejmě věc první, schopnost poté využít takový potenciál v těle člověka je již věc druhá. Mnoho nutrientů má významný potenciál, který musí být podpořen vhodnou kombinací dalších nutrientů – typicky přítomnost tuků s vitamíny rozpustných v tukách, anebo poměrové zastoupení konkrétních prvků, velmi často se skloňuje poměr Ca a P. Toto samozřejmě nejsou jediná úskalí, ale záleží i na individualitě každého člověka, respektive jeho trávicího traktu, ne vždy je potravinu možné plnohodnotně využít, přestože je „papírově“ velmi hodnotná (Sathe *et al.*, 2008a).

Každý druh skořápkového plodu se pochopitelně vyznačuje svým konkrétním složením, přesto však mohou být v obsahu jednotlivých makroživin i mikroživin rozdíly související s celkovými podmínkami pěstování a sklizně. Stručná charakteristika nutrientů všech jedenácti zkoumaných plodů, včetně přehledových tabulek výživových hodnot, je uvedena v následující podkapitole 1.1.3 Nutriční specifika zvolených skořápkových plodů.

1.1.3 Nutriční specifika zvolených skořápkových plodů

Arašídy

Arašídy jsou přidruženým představitelem skořápkových plodů, jelikož by se formálně řadily mezi luštěniny. Průměrně z poloviny své hmotnosti obsahují tuky, přibližně ze čtvrtiny hmotnosti jsou obsaženy bílkoviny (Brufau *et al.*, 2006) a zbylé množství patří samozřejmě sacharidům, vláknině a mikroživinám. Z mikroživin jsou poměrně bohaté na vitamíny řady B, vitamín E a dále také zejména na K, Mg a P (Mingrou *et al.*, 2022). Detailní pohled na průměrný výživový profil klíčových nutrientů u arašídů je zpracován v tab. 1.

Tabulka 1: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u arašídů.

Arašídy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 567 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	6,5	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,64	Vit. E (mg/100 g)	8,33	Fe (mg/100 g)	4,580
Sacharidy (g/100 g)	7,6	Vit. B₂ (mg/100 g)	0,14	Ca (mg/100 g)	92,00	Mn (mg/100 g)	1,930
Vláknina (g/100 g)	8,5	Vit. B₃ (mg/100 g)	12,06	K (mg/100 g)	705,00	Zn (mg/100 g)	3,270
Bílkoviny (g/100 g)	25,8	Vit. B₅ (mg/100 g)	1,77	Mg (mg/100 g)	168,00	Cu (mg/100 g)	1,140
Tuky (g/100 g)	49,2	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,35	P (mg/100 g)	376,00	Se (mg/100 g)	0,007

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Kešu

Ořechy kešu jsou přirozeně bohaté na tuky (tvoří téměř polovinu hmotnosti) a proteiny, jichž ve složení průměrně nalezneme kolem pětiny jejich hmotnosti (Brufau *et al.*, 2006). Z hlediska mikroživin jsou zde dominující vitamíny skupiny B, zejména pak B₃, dále vitamíny E a K. Z minerálních látek stojí za zmínku K, Mg a P, stopově jsou zdrojem rovněž Fe a Zn (Sathe *et al.*, 2008a). Přehled nutrientů kešu ořechů (pro možné účely srovnání s ostatními plody) je zpracován v tab. 2.

Tabulka 2: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u kešu ořechů.

Kešu ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 553 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	5,2	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,42	Vit. E (mg/100 g)	0,90	Fe (mg/100 g)	6,680
Sacharidy (g/100 g)	26,9	Vit B₂ (mg/100 g)	0,06	Ca (mg/100 g)	37,00	Mn (mg/100 g)	1,660
Vláknina (g/100 g)	3,3	Vit. B₃ (mg/100 g)	1,06	K (mg/100 g)	660,00	Zn (mg/100 g)	5,780
Bílkoviny (g/100 g)	18,2	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,86	Mg (mg/100 g)	292,00	Cu (mg/100 g)	2,220
Tuky (g/100 g)	43,8	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,42	P (mg/100 g)	593,00	Se (mg/100 g)	0,019

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Kokos

Kokos se lehce odlišuje tím, že v čerstvé podobě obsahuje nemalý podíl vody. Proteiny dosahují 3 % hmotnosti a cca její třetinu tvoří nepříliš kvalitní tuky. Na živiny je chudší než ostatní skořápkové plody, dominují vitamíny skupiny B, z prvků především K (Agyemang-Yeboah, 2011). V tab. 3 je zpracován živinový přehled průměrného kokosu.

Tabulka 3: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u čerstvého kokosu.

Čerstvý kokos (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 354 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	47,0	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,07	Vit. E (mg/100 g)	0,24	Fe (mg/100 g)	2,430
Sacharidy (g/100 g)	6,2	Vit B₂ (mg/100 g)	0,02	Ca (mg/100 g)	14,00	Mn (mg/100 g)	1,500
Vláknina (g/100 g)	9,0	Vit. B₃ (mg/100 g)	0,54	K (mg/100 g)	356,00	Zn (mg/100 g)	1,100
Bílkoviny (g/100 g)	3,3	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,30	Mg (mg/100 g)	32,00	Cu (mg/100 g)	0,435
Tuky (g/100 g)	33,5	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,05	P (mg/100 g)	113,00	Se (mg/100 g)	0,010

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Lískové ořechy

Lískové oříšky jsou velmi hodnotné, ve svém složení obsahují přes 60 % tuků a dominují zde esenciální nenasycené mastné kyseliny, jež pozitivně působí na zdraví lidského organismu (Sathe *et al.*, 2008a). Množství bílkovin sice nedosahuje maxima mezi skořápkovými plody, ale jejich zastoupení není zanedbatelné (kolem 15 %). Mikroživinové složení je taktéž přívětivé, obsahují vitamíny B a vitamín E, navíc obsahují důležité prvky jako je Ca, K a stopově i Fe a Zn (Alphan *et al.*, 1996). Celkový přehled nutrientů je opět zpracován v tabulce níže (tab. 4).

Tabulka 4: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u lískových ořechů.

Lískové ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 628 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	5,3	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,64	Vit. E (mg/100 g)	15,00	Fe (mg/100 g)	4,700
Sacharidy (g/100 g)	7,0	Vit B₂ (mg/100 g)	0,11	Ca (mg/100 g)	114,00	Mn (mg/100 g)	6,180
Vláknina (g/100 g)	9,7	Vit. B₃ (mg/100 g)	0,18	K (mg/100 g)	680,00	Zn (mg/100 g)	2,450
Bílkoviny (g/100 g)	15,0	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,92	Mg (mg/100 g)	163,00	Cu (mg/100 g)	1,720
Tuky (g/100 g)	60,8	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,56	P (mg/100 g)	290,00	Se (mg/100 g)	0,002

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Makadamové ořechy

Makadamové ořechy vévodí mezi všemi vybranými skořápkovými plody z hlediska obsahu tuků (cca 75 % hmotnosti). Ve složení převažují nenasycené mastné kyseliny nad nasycenými a lze je tak považovat za zdroj kvalitních tuků (Brufau *et al.*, 2006). Množství proteinů je vzhledem k vysokému podílu tuků pochopitelně nižší (cca 8 g na 100 g hmotnosti). Zastoupení vitamínů je v zásadě obdobné jako u již výše zmíněných plodů, z prvků jsou obsaženy Ca, K, Mg, P, stopově dále také Cu nebo Fe (Brufau *et al.*, 2006, Sathe *et al.*, 2008a). Živinová tabulka makadamových plodů je zpracována obdobně jako v přechozích případech (viz tab. 5).

Tabulka 5: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u makadamových ořechů.

Makadamové ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 718 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	1,4	Vit. B₁ (mg/100 g)	1,20	Vit. E (mg/100 g)	0,54	Fe (mg/100 g)	3,690
Sacharidy (g/100 g)	5,2	Vit B₂ (mg/100 g)	0,16	Ca (mg/100 g)	85,00	Mn (mg/100 g)	4,130
Vláknina (g/100 g)	8,6	Vit. B₃ (mg/100 g)	2,47	K (mg/100 g)	368,00	Zn (mg/100 g)	1,300
Bílkoviny (g/100 g)	7,9	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,76	Mg (mg/100 g)	130,00	Cu (mg/100 g)	0,756
Tuky (g/100 g)	75,8	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,28	P (mg/100 g)	188,00	Se (mg/100 g)	0,004

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Mandle

Mandle mají velmi příznivé složení, asi 50 % hmotnosti tvoří zdravé tuky, cca čtvrtina je tvořena proteiny. Zastoupené vitamíny do jisté míry kopírují ostatní ořechy (předně vitamíny řady B a E), prvkové složení nevykazuje přílišné odchylky vůči dalším plodům, navíc jsou ale bohatší na antioxidanty (Sathe *et al.*, 2008a). Kompletní přehled živin je uveden v tab. 6.

Tabulka 6: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u mandlí.

Mandle (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 579 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	4,4	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,21	Vit. E (mg/100 g)	25,60	Fe (mg/100 g)	3,710
Sacharidy (g/100 g)	21,6	Vit B₂ (mg/100 g)	1,14	Ca (mg/100 g)	269,00	Mn (mg/100 g)	2,180
Vláknina (g/100 g)	12,5	Vit. B₃ (mg/100 g)	3,62	K (mg/100 g)	733,00	Zn (mg/100 g)	3,120
Bílkoviny (g/100 g)	21,2	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,47	Mg (mg/100 g)	270,00	Cu (mg/100 g)	1,030
Tuky (g/100 g)	49,9	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,14	P (mg/100 g)	481,00	Se (mg/100 g)	0,004

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Para ořechy

Para ořechy svým složením takřikajíc šlapou na paty makadamovým ořechům, poněvadž téměř 70 % jejich hmotnosti tvoří tuky. Podíl bílkovin je o maličko vyšší (cca 15 %). Minoritně, ale významně jsou zastoupeny vitamíny B (nejvíce thiamin), dále vit. E a z prvků se objevuje klasické zastoupení Ca, Mg, K, P (Sathe *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2019). Veliké specifikum para ořechů je v obsahu selenu, jehož množství v jedné porci ořechů (cca 20 g) představuje více než desetinásobek doporučeného množství selenu pro zdravého dospělého člověka (Silva *et al.*, 2019; Svačina *et al.*, 2008). Zařazení do jídelníčku má svá pozitiva, ale pouze v minimálním množství. Tabulkový přehled živin para ořechů je uveden v tab. 7.

Tabulka 7: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u para ořechů.

Para ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 659 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	3,4	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,62	Vit. E (mg/100 g)	5,70	Fe (mg/100 g)	2,430
Sacharidy (g/100 g)	4,2	Vit B₂ (mg/100 g)	0,04	Ca (mg/100 g)	160,00	Mn (mg/100 g)	1,220
Vláknina (g/100 g)	7,5	Vit. B₃ (mg/100 g)	0,30	K (mg/100 g)	659,00	Zn (mg/100 g)	4,060
Bílkoviny (g/100 g)	14,3	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,18	Mg (mg/100 g)	376,00	Cu (mg/100 g)	1,740
Tuky (g/100 g)	67,1	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,10	P (mg/100 g)	725,00	Se (mg/100 g)	1,920

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Pekanové ořechy

Pekany patří mezi tučnější skořápkové plody a daly by se řadit na pomyslné druhé místo za makadamové ořechy. Obsah tuků je opět v přibližné výši 70 % hmotnosti, množství proteinů dosahuje přibližně jedné desetiny hmotnosti (Sathe *et al.*, 2008a). Obsahují podobně jako ostatní plody vitamíny skupiny B, tokoferol, ale navíc například vitamín C (v přibližném zastoupení 1,1 mg/100 g). Z hlediska zastoupených minerálních látek nejsou pozorovány žádné významné odchylky od ostatních plodů (Sathe *et al.*, 2008a; U.S. Department of Agriculture, 2022). Výživový profil pekanů je zobrazen v následující tabulce (tab. 8).

Tabulka 8: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u pekanových ořechů.

Pekanové ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 691 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	3,5	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,66	Vit. E (mg/100 g)	1,40	Fe (mg/100 g)	2,530
Sacharidy (g/100 g)	13,9	Vit B₂ (mg/100 g)	0,13	Ca (mg/100 g)	70,00	Mn (mg/100 g)	4,500
Vláknina (g/100 g)	9,6	Vit. B₃ (mg/100 g)	1,17	K (mg/100 g)	410,00	Zn (mg/100 g)	4,530
Bílkoviny (g/100 g)	9,7	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,86	Mg (mg/100 g)	121,00	Cu (mg/100 g)	1,200
Tuky (g/100 g)	72,0	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,21	P (mg/100 g)	277,00	Se (mg/100 g)	0,004

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Piniové oříšky

Piniové oříšky se mnohdy připodobňují k arašídům, obsahově v nich taktéž převládají tuky (přes 60 %), bílkoviny dosahují ale jen cca jedné desetiny z celkové hmotnosti. Z vitamínů dominují opět vitamíny skupiny B a E. Minerální složení se nijak dramaticky neodchyluje od ostatních ořechů (Sathe *et al.*, 2008a). Nutriční přehled pinií je zpracován v tab. 9.

Tabulka 9: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u piniových oříšků.

Piniové oříšky (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 673 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	2,3	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,36	Vit. E (mg/100 g)	9,30	Fe (mg/100 g)	5,530
Sacharidy (g/100 g)	13,1	Vit B₂ (mg/100 g)	0,23	Ca (mg/100 g)	16,00	Mn (mg/100 g)	8,800
Vláknina (g/100 g)	3,7	Vit. B₃ (mg/100 g)	4,39	K (mg/100 g)	597,00	Zn (mg/100 g)	6,450
Bílkoviny (g/100 g)	13,7	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,31	Mg (mg/100 g)	251,00	Cu (mg/100 g)	1,320
Tuky (g/100 g)	68,4	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,09	P (mg/100 g)	575,00	Se (mg/100 g)	0,001

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Pistácie

Pistáciové ořechy jsou jedny z těch proteinově hodnotnějších, poněvadž obsah bílkovin dosahuje 20 % celkové hmotnosti (Sathe *et al.*, 2008a). Podíl tuků je samozřejmě vyšší, jak tomu u ořechů bývá, nicméně v porovnání s ostatními plody se jedná spíše o méně tučný druh mezi skořápkovými plody. Z vitamínů převládá vit. C a E, obvyklé zastoupení vykazují ale i vitamíny řady B, z prvků maximálně převažuje draslík. Pistácie vykazují svou jedinečnost v tom, že obsahují nejvíce bioaktivní látek (fytosterolů a sloučenin podobajících se fenolu), čímž ze sebe činí potravinu s významnými antioxidantními účinky (Sathe *et al.*, 2008a; U.S. Department of Agriculture, 2022). Výživový přehled pistácií je, v období již dříve představovaných skořápkových plodů, uveden níže pod tímto textem (tab. 10).

Tabulka 10: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u pistácií.

Pistácie (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 560 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	4,4	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,87	Vit. E (mg/100 g)	2,90	Fe (mg/100 g)	3,920
Sacharidy (g/100 g)	27,2	Vit B₂ (mg/100 g)	0,16	Ca (mg/100 g)	105,00	Mn (mg/100 g)	1,200
Vláknina (g/100 g)	10,6	Vit. B₃ (mg/100 g)	1,30	K (mg/100 g)	1020,00	Zn (mg/100 g)	2,200
Bílkoviny (g/100 g)	20,2	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,52	Mg (mg/100 g)	121,00	Cu (mg/100 g)	1,300
Tuky (g/100 g)	45,3	Vit. B₆ (mg/100 g)	1,70	P (mg/100 g)	490,00	Se (mg/100 g)	0,007

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

Vlašské ořechy

Vlašské ořechy nepředstavují výjimku mezi skořápkovými plody, jsou silně bohaté na tuky (a to kolem 65 % své hmotnosti). V jejich závěsu se nachází proteiny, jejichž podíl dosahuje mezi 15 až 25 % hmotnosti a řadí se tak mezi skořápkové plody, jež jsou nejvíce bohaté na bílkoviny. V tomto případě se autoři lehce rozcházejí a velmi záleží na konkrétní lokalitě pěstovaných ořešáků (Brufau *et al.*, 2006; Sathe *et al.*, 2008a). Obsahují samozřejmě vitamíny, a to především vitamíny skupiny B a tokoferol, z prvků dominuje opět draslík.

U vlašských ořechů stojí za zmínku také přítomnost bioaktivních látek (flavonoidy a fenolické sloučeniny), jež člověk konzumací vlašských ořechů získává snáz, poněvadž se tyto ořechy obvykle konzumují se slupkou. Ve slupce vlašských ořechů je zastoupeno největší procento bioaktivních látek (Sathe *et al.*, 2008a). Ani u vlašských ořechů nechybí výživový přehled, a to níže pod tímto textem v tab. 11.

Tabulka 11: Průměrné zastoupení makronutrientů a vybraných mikronutrientů u vlašských ořechů.

Vlašské ořechy (množství makroživin a klíčových mikroživin, energetická hodnota: 654 kcal/100 g)							
Voda (g/100 g)	4,1	Vit. B₁ (mg/100 g)	0,34	Vit. E (mg/100 g)	0,70	Fe (mg/100 g)	2,910
Sacharidy (g/100 g)	13,7	Vit. B₂ (mg/100 g)	0,15	Ca (mg/100 g)	98,00	Mn (mg/100 g)	3,410
Vláknina (g/100 g)	6,7	Vit. B₃ (mg/100 g)	1,12	K (mg/100 g)	441,00	Zn (mg/100 g)	3,090
Bílkoviny (g/100 g)	15,2	Vit. B₅ (mg/100 g)	0,57	Mg (mg/100 g)	158,00	Cu (mg/100 g)	1,590
Tuky (g/100 g)	65,2	Vit. B₆ (mg/100 g)	0,54	P (mg/100 g)	346,00	Se (mg/100 g)	0,005

Pozn. zdroj dat: U.S. Department of Agriculture, 2022.

1.2 Produkce, spotřeba a zpracování skořápkových plodů

Skořápkové plody, stejně jako ostatní zemědělské plodiny, jsou statisticky sledovány s ohledem na svou produkci a také poptávku spotřebitele (INC International Nuts & Dried Fruit, 2020). Vzrůstající poptávka spotřebitelů může mít přímo působící efekt na zvyšující se trend produkce dané komodity. Ořechy za poslední desetiletí získávají silnou pozici na potravinářském trhu. Jedná se tedy o komoditu, jež je čím dál více oblíbená napříč celým spotřebitelským světem a její produkce má tak skutečně zvyšující se tendence (Asci & Devadoss, 2021; FAOSTAT, 2021). Celkový objem vyprodukovaných ořechů není samozřejmě závislý jen na spotřebitelském chování, ale především také na politické situaci v pěstitelských velmocích a financích, tzn. na nákladech spojených se sklizní, distribucí případně dalším zpracováním (Adamová, 2021).

Na druhé straně je závislost produkce dána také klimatickými podmínkami a nově i celkovou udržitelností pěstování konkrétní komodity, v tomto případě tedy skořápkových plodů (Asci & Devadoss, 2021). Mnoho druhů skořápkových plodů v posledních letech „zažívá“ větší zájem ze strany běžného spotřebitele (Spherical Insights, 2023). Zájem o skořápkové plody roste přirozeně sezónně, zvláště pak v období vánočních či velikonočních svátků, které jsou u nás typicky spojené s pečením svátečního pečiva a cukroví, v němž samozřejmě ořechy nemohou chybět (Herynek, 2010). Nicméně i mimo tuto „hlavní sezónu“ jsou stále oblíbenějšími, a to díky větší popularizaci nejen v klasické reklamě, ale především skrze sociální sítě (Sheth, 2021). Produkty obsahující skořápkové plody si často nesou označení „protein“ nebo „low carb“, díky čemuž jsou ořechy mnohem více konzumovány v různých podobách (Fernan *et al.*, 2018; Jagdale *et al.*, 2021). Nemusí se jednat jen o proteinové nebo nízkosacharidové tyčinky, ale také ořechová másla, krémy nebo nápoje, někdy nepřesně označované jako rostlinná mléka (Ningtyas, 2023; Reyes-Jurado *et al.*, 2023). Ta se v současnosti těší taktéž velké oblibě nejen u osob, které ze zdravotních důvodů běžnou variantu konzumovat nemohou, ale i u ostatních spotřebitelů zejména díky tématu udržitelnosti (Aschemann-Witzel *et al.*, 2021; Asci & Devadoss, 2021).

1.2.1 Celosvětová produkce skořápkových plodů

Objem produkce skořápkových plodů obecně závisí nejen na poptávce, ale také na úrodnosti půdy, v níž jsou tyto užitkové rostliny pěstovány (Asci & Devadoss, 2021). V případě skořápkových plodů se jedná zejména o rostliny tropického či subtropického pásu, pouze některé z nich lze pěstovat i v našich zeměpisných šířkách, což se týká především vlašských a lískových ořechů (Valíček, 2002). Ostatní skořápkové plody k nám bývají zpravidla dováženy, jelikož jejich pěstování vyžaduje klima a podmínky, které je možné zajistit například jen pěstováním ve skleníku, což se v případě větší produkce již nevyplatí (Rada & Steinbach, 1997; Valíček, 2002).

Na produkci skořápkových plodů jako takovou je možné pohlížet spíše celosvětovým měřítkem. Mezi největší producenty patří asijské státy, USA případně některé africké státy a právě tyto země vyváží plody do celého světa (INC International Nuts & Dried Fruit, 2020).

Mezi nejvíce produkované skořápkové plody patří arašidy (FAOSTAT, 2021; INC International Nuts & Dried Fruit, 2020), které se objevují v mnohých potravinách. Burské oříšky jsou celosvětově produkovány v obrovských množstvích a jen za rok 2021 organizace FAOSTAT uvádí množství převyšující 50 mil. tun arašidů. V těsném závěsu stojí kokosové ořechy, jež se využívají taktéž v mnoha potravinách, přičemž kokosový tuk se přidává ale třeba i do kosmetiky (Patil & Benjakul, 2018). Světová produkce kokosu v roce 2021 činila obdobné množství, a sice cca 49 mil. tun (FAOSTAT, 2021).

Podobné enormní produkce u dalších skořápkových plodů již pozorovány nejsou, na pomyslné třetí příčce stojí vlašské ořechy, které mají svou tradici v Evropě, ale velice hojně jsou pěstovány po celém světě (FAOSTAT, 2021; Rada & Steinbach, 1997). Nicméně dle FAOSTAT v roce 2021 bylo vyprodukováno necelých 3,5 mil. tun ořechů, a proto nelze jejich množství srovnávat s arašidy či kokosem. Obdobné množství, tzn. cca 3,5 mil. tun, bylo v roce 2021 vyprodukováno i kešu ořechů. Přestože se kešu ořechy produkuje zejména v asijských státech, jsou poměrně oblíbené i u nás. Dalšími plody, jež překračují hranici produkce 3 mil. tun, jsou mandle, které jsou v naprosté většině produkovány pouze Spojenými státy americkými (FAOSTAT, 2021).

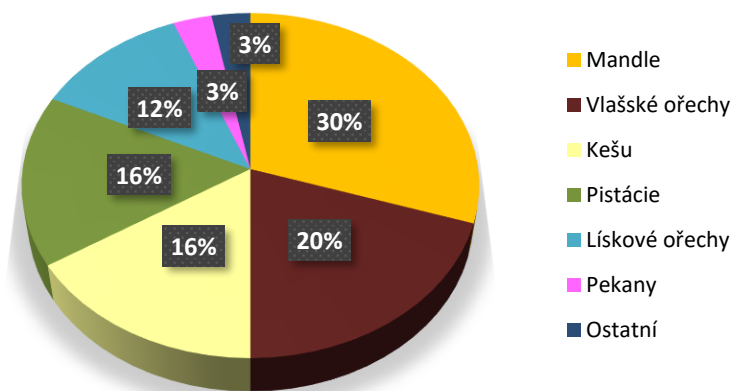
Ostatní skořápkové plody již nejsou produkovány v takových množstvích, kolem jednoho milionu tun se ještě vyprodukuje lískových ořechů nebo pistácií (FAOSTAT, 2021). Zbývající skořápkové plody lze zařadit do souhrnné skupiny, kdy jejich produkce dosahuje spíše jen desítek tisíc tun; do této kategorie patří brazilské (para) ořechy, makadamové, pekanové a piniové ořechy (FAOSTAT, 2021). Ani dle INC International Nuts & Dried Fruit (2020) se již nejedná o tak hojně produkované a konzumované plody. Většinou jsou tyto druhy skořápkových plodů řazeny mezi dražší, a ne zcela jednoduše pěstované plody, piniové oříšky se například sklízí v tříletých cyklech (Hieke, 2008). Ze statistického hlediska nejsou v kategorii „ostatní jedlé skořápkové plody“ jen výše uvedené, ale zahrnovány jsou i méně běžné ořechy jako například tygří ořechy případně další plody, které jsou ke skořápkovým plodům přidružovány. Obecně mezi největší producenty i u ostatních skořápkových plodů zůstávají stále země jako je Čína nebo USA.

1.2.2 Spotřeba a konzumace surových i zpracovaných skořápkových plodů

Produkce je samozřejmě důležitý údaj, nicméně reálná spotřeba dané potraviny či produktů jen málokdy odpovídá stoprocentní produkci. Některé ořechy jsou v tomto směru velmi unikátní a spotřebovávány jsou téměř v celém rozsahu své produkce, zejména ořechy, které nejsou produkovány v enormních množstvích, jako například piniové oříšky nebo makadamové ořechy (INC International Nuts & Dried Fruit, 2020). V průměru se ale u všech skořápkových plodů spotřebuje přibližně 90 % celosvětové produkce. Pomineme-li arašidy a kokosové ořechy, jež jsou statisticky dle Mezinárodní rady ořechů a sušeného ovoce (2020) zpracovávány samostatně. Největší podíl zkonsumovaných ořechů tak zaujímají mandle (cca třetina) a následují je vlašské ořechy (cca pětina). Oba dva tyto skořápkové plody jsou velmi oblíbené nejen pro přímou konzumaci, ale také pro zpracování na další průmyslové případně i domácí produkty, včetně již zmiňovaného cukroví nebo pečiva. Spotřeby všech vybraných skořápkových plodů odpovídají poměrově produkovanému množství a není tedy spatřován významný nesoulad mezi spotřebou a produkcí, produkce navíc dle dostupných údajů skutečně odráží i spotřebitelské preference a poptávku po jednotlivých plodech.

Procentuální podíly zkonsumovaných ořechů jsou vyobrazeny níže v grafickém provedení (graf 2).

Spotřeba ořechů v r. 2018 (procentuálně)



Graf 2: Procentuální zastoupení zkonsumovaných ořechů v roce 2018, pozn. kategorie ostatní zahrnuje makadamové (1 %), para (1 %) a piniové ořechy (1 %); uvedeno bez arašidů a kokosu (zdroj dat: INC International Nuts & Dried Fruit, 2020).

Všeobecně největším konzumentem skořápkových plodů jsou Evropané, kteří zkonsumují více než čtvrtinu veškeré produkce, v těsném závěsu jsou Američané, jejichž konzumace dosahuje přibližně 23 % všech spotřebovaných skořápkových plodů. V posledních deseti letech navíc dochází ke stabilnímu, téměř až lineárnímu nárůstu produkce a v návaznosti na to i spotřebě skořápkových plodů v populaci (tento údaj je vztažen na celosvětovou populaci, nikoli pouze na konkrétní kontinent či zemi). Mírné výkyvy lze pozorovat u piniových ořechů, pistácií a para ořechů, což patrně souvisí s nároky na pěstování v daných lokalitách (FAOSTAT, 2021; INC International Nuts & Dried Fruit, 2020). Celkově nejen produkce a spotřeba ale i zpracování, tzn. výroba produktů zahrnující ořechy, se rozrůstá. Tento zvyšující se trend s největší pravděpodobností bude přetrvávat s ohledem na moderní směry stravování a pohled na výživu i nadále (Jagdale *et al.*, 2021; Spherical Insights, 2023). Další důvod tohoto trendu může souviset také s klimatickými změnami následovanými nutností měnit budoucí zemědělské a hospodářské chování člověka (Aschemann-Witzel *et al.*, 2021; Asci & Devadoss, 2021).

1.3 Využití a pozice skořápkových plodů (nejen) ve výživě

Analogicky k dalším potravinám či potravinářským produktům mají i skořápkové plody svou tradici sahající až k historii člověka samotného (Beranová, 2005). Ořechy byly součástí lidského jídelníčku již od nepaměti, a to nejen jako součást tehdejší potrawy, ale i ve smyslu dřívějších „léčiv“ či dalších produktů pro vnější a vnitřní užívání (Beranová, 2005; Casas-Agustench *et al.*, 2011). Tyto zmiňované možnosti využití jsou prakticky zachovány dodnes. Využití za účelem konzumace zůstává ale stále na prvním místě, kdy i dle průzkumu trhu Spherical Insights (2023) lze pozorovat výrazně vyšší zájem o naprostou většinu druhů skořápkových plodů ze strany běžných spotřebitelů. Hnacím motorem trhu s těmito produkty je mimo jiné samozřejmě stále se zvyšující zájem o zdravé stravování, vyvážený příjem makroživin, eventuálně nízkosacharidová strava a sportovní komplexní výživa. Evropa celému světu v této oblasti vévodí a dle Spherical Insights (2023) bude mít i nadále celosvětově největší podíl na výrobě produktů, v nichž se budou zpracované skořápkové plody nacházet.

Světová zdravotnická organizace (WHO) dokonce skořápkové plody řadí mezi základní potraviny, jež je potřeba propagovat a zvyšovat jejich konzumaci. V roce 2021 WHO nejen v souvislosti s postupujícími zdravotními problémy v populaci za času pandemie covid-19 představila nový akční rámec pro rozvoj a implementaci veřejných zakázek na potraviny a služeb pro zdravou výživu. Znamená to, že ve všech veřejných institucích, včetně školských zařízení, by měla být propagována zdravější varianta stravování plná celozrnných výrobků, luštěnin, ořechů, zeleniny a ovoce. To vše s jasným cílem, a sice zmírnit narůstající množství pacientů, kteří v důsledku konzumace nezdravých jídel, zatěžují zdravotní systémy a předčasně umírají s kardiovaskulárními či dalšími zdravotními problémy (WHO, 2021). Dle tohoto rámce je zcela jistě patrné, že ideální je konzumovat ořechy v syrovém stavu, kdy obsahují ve většině případů jen zdravé nenasycené mastné tuky, minimální množství cukrů a bílkoviny dle konkrétního druhu skořápkového plodu. Konzumace pražených, solených či slazených ořechů již doporučována není právě pro svůj nepříliš zdravý potenciál v souvislosti s rozvojem celé řady civilizačních nemocí týkající se nejen onemocnění srdce, ale také možného rozvoje obezity či diabetu (Malik & Hu, 2012).

Neznamená to ovšem, že by konzumace skořápkových plodů, jež jsou tepelně či jinak zpracované a součástí nejrůznějších produktů, byla v každém případě nevhodná. Vždy je třeba v konzumaci i „méně zdravých“ potravin dodržet určitou rovnováhu. Není vhodné rozlišovat potraviny na zdravé či nezdravé, zvláště pak u dětí a mladistvých (Rusková, 2011). Každá potravina může být koneckonců nezdravou, pokud je to jediné, co se v jídelníčku daného člověka nachází. Z hlediska vývoje dětí a mladistvých je ale dobré hovořit o tom, jakou by měl mít jídelníček skladbu, které zdroje živin upřednostňovat a myslet také na druhou stranu, tzn. na zařazování pravidelného pohybu a žít tak vyváženě jak z hlediska příjmu, tak výdeje energie (Hlavatá, 2018; Rusková, 2011). Toto téma je zvláště důležité v období mladšího školního věku, kdy je ideální ho nenuceně zařazovat do výuky a výchovy žáků, což nakonec potvrzuje například realizovaný program Pohyb a výživa v letech 2013–2016 (NÚV, 2016).

Využití ořechů v gastronomii velmi úzce souvisí s jejich pozicí ve výživě člověka, nicméně má své čestné místo související především s přípravou svátečního pečiva a cukroví (Herynek, 2010). Obvykle se syrové plody, ovoce, zelenina nebo i maso tepelně zpracovává

pro svou lepší stravitelnost (Kadlec *et al.*, 2012). V případě ořechů tomu nebývá jinak, ovšem je zde i další důvod, kterým je výraznější či v některých případech nasládlejší chuť, což je z hlediska pečení sladkého pečiva a cukroví žádoucí. Tím obecně vylepšují senzoričné vlastnosti pokrmu jako celku. V syrovém stavu mohou být součástí například salátů, po tepelné úpravě jsou nejčastěji součástí pečiva nebo omáček (Towell, 2009). Využití skořápkových plodů samozřejmě ale nemá hranic a mohou být využívány i méně tradičně.

V České republice mají ořechy zatím svou největší tradici právě v pekárenské a cukrářské výrobě. V tomto ohledu jsou ořechy jednou z nejdůležitějších ingrediencí, přičemž je klíčová kvalita ořechů a zejména jejich skladování, aby nepodléhaly nechtěným chemickým změnám spojených s oxidací (žluknutím) tuků, v takovém případě by chuť pečiva nezvýraznila ani nevylepšila (Dostálová & Kadlec, 2014; Kadlec *et al.*, 2012). V české pekařské a cukrářské výrobě se využívají hlavně ořechy, které se tradičně v našich zeměpisných podmínkách pěstovaly a také konzumovaly i historicky, tzn. vlašské ořechy, lískové ořechy (Rada & Steinbach, 1997) a dále pak ořechy, které se k nám dříve dovážely, a to například mandle, kokos nebo pistácie.

Další skořápkové plody u nás nemají tak dlouholetou tradici, nicméně se samozřejmě setkáváme i nyní s pečivem nebo cukrovím obsahující ořechy kešu, pekanové ořechy a další skořápkové plody, přestože je to typičtější spíše pro zahraniční gastronomii (Bennion *et al.*, 1997). Mezi obvyklé pečivo obsahující skořápkové plody u nás tradičně patří vánoční cukroví jako vanilkové rohlíčky, staročeské pracny, kokosky, sádlové koláčky nebo ořechové sušenky na různé způsoby. Jedná se o běžné cukroví, jejichž tradice je zachována dodnes a v různých podobách jsou připravovány každoročně v období adventu snad téměř v každé rodině, případně jsou k dispozici v obchodech v komerční variantě (Herynek, 2010).

Využití ořechů napříč světem je ale mnohem pestřejší a rozhodně nekončí u pekárenských výrobků, ve Středomoří bývají některé z nich například součástí omáček, dresinků nebo past společně s rozmixovanou zeleninou a kořením (Norman, 1993). Pistácie jsou ale například využívány výhradně spíše do cukrovinek, zmrzlin a také pro svou nezaměnitelnou barvu. Naopak arašidy mají poměrně široké využití, zejména v asijské kuchyni jsou přidávány do obrovského množství pokrmů, v našich poměrech to není tak časté, nicméně se jedná o levnější variantu „ořechů“, které mají obdobné vlastnosti jako jiné u nás tradičně

využívané ořechy. Kokosové ořechy mají své využití taktéž v asijské kuchyni, využívá se z nich kokosové mléko pro zahušťování a dochucování, hojně se využívá také kokosový olej, jenž není výživově zcela optimální a není doporučeno na něm např. smažit s ohledem na značné zastoupení nasycených mastných kyselin (Norman, 1993; Sathe *et al.*, 2008a).

Ve smyslu moderního využití jsou skořápkové plody dnes velmi často součástí nejrůznějších tyčinek, kdy mají mnohdy zdánlivě vylepšené a obohacené výživové složení (Fernan *et al.*, 2018). Označování proteinové a nízkosacharidové bývá samozřejmě v kontextu obsahu ořechů a dalších zdrojů bílkovin oprávněné. Nicméně takových produktů je nabízeno široké spektrum, což odpovídá i nemalému cenovému rozpětí a rozdílům mezi produkty. Některé z nich se skutečně mohou srovnávat s nutričně bohatým hlavním jídlem a je možno jim ponechat označení „zdravého“ produktu. Nicméně se v dnešní době lze rovněž setkat s tzv. haló efektem, kdy potravina s pojmenováním „*protein*“ nebo „*low carb*“ evokuje v člověku domněle zdravější volbu (Fernan *et al.*, 2018), a to i přestože se složením nemusí nijak výrazně odchylovat od „neproteinových“ produktů, ba co hůře mohou být plné cukrů či umělých sladidel, což rozhodně nelze za nutričně bohaté nebo zdravé považovat (dTest, 2017; Fernan *et al.*, 2018).

Jak bylo lehce v úvodu této kapitoly nastíněno, obsah tuků v ořeších není prospěšný jen výživově, nýbrž má také pozitivní účinky i v případě vnějšího podání na pokožku (Kamal-Eldin & Moreau, 2009). Oleje extrahované z ořechů, jako je například mandlový, makadamový a další oleje, jsou často používány v kosmetických přípravcích, konkrétně do pleťových krémů, kosmetiky určené na vlasy i ostatní části těla. Tyto oleje působí hydratačním a regeneračním účinkem na pleť, pokožku i vlasy (Belsito *et al.*, 2011; Kamal-Eldin & Moreau, 2009).

Používat se nemusí jen jádra, ale také mohou být využity například i skořápky, které bývají využívány pro dekorativní a umělecké účely, případně i funkčně v rámci zahrad. Některé skořápky, například ty od arašídů a kokosu, se používají i při čištění vody. Mají schopnost absorbovat nečistoty a chemikálie z vody, díky čemuž mohou být použity jako filtrační médium (Loh *et al.*, 2021).

Zásadní místo mají ale skořápkové plody stále ve světě výživy a pro svůj výživový potenciál jsou právem považovány za „superpotravinu“ v lidském jídelníčku.

1.4 Vliv na zdraví člověka jako klíčový aspekt konzumace

Důležitým tématem je samozřejmě zdraví, které je s výživou člověka přímo spjaté. Již od dětství je vhodné se zajímat o svou potravu a ctít její vyváženost ve smyslu příjmu živin a výdeje pohybovou aktivitou. Pro utváření zdravého vztahu k potravě a pohybu je klíčové působení na děti v mladším věku, zejména pak v období navštěvování základní školy (NÚV, 2016; Rusková, 2011). V předchozí kapitole bylo již zmíněno, že skořápkové plody zvláště v syrovém stavu jsou WHO podporovány jako důležitá potravina zdravé výživy. Na základě této veřejné podpory by měla i nadále produkce skořápkových plodů do budoucna růst a měly by se tak stávat stále více součástí běžné (zdravé) stravy člověka (WHO, 2021).

Skořápkové plody podobně jako jakákoliv jiná základní potravina má přirozeně své pozitivní ale i negativní vlivy na zdraví člověka. Přestože mají skořápkové plody velikou podporu WHO, tak nejsou jako běžná potravina vždy vhodná pro každého (více viz podkapitola 1.4.2 Negativní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka).

1.4.1 Pozitivní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka

V pozitivním smyslu se uvádí, že konzumace ořechů vzhledem k jejich pestrému složení ovlivňuje nejednu orgánovou soustavu člověka a mnohdy působí i preventivně vůči rozvoji celé řady onemocnění. Týká se to zejména civilizačních nemocí, jež jsou spojené s určitou chronicitou (Ternus *et al.*, 2008). V mnoha případech se ale zatím protektivní charakter konzumace skořápkových plodů vůči některým nemocem spíše jen diskutuje, například s ohledem na **diabetes mellitus 2. typu** je jejich vliv stále nejednoznačný, proto je i nadále předmětem zkoumání. Ternus *et al.* (2008) uvádí, že konzumace skořápkových plodů u pacientů s diabetem má pozitivní vliv minimálně v tom, že ořechy působí na ostatní potraviny obsahující sacharidy a zabraňují tak velikým skokům glykémie, čímž snižují i celkovou glykemickou zátěž na organismus bez ohledu na ostatní přijímanou potravu (Ternus *et al.*, 2008). Jedna z novějších metaanalýz se soustředila na shromáždění potvrzujících důkazů tohoto působení a její výsledek spolehlivě potvrzuje zatím jen, že konzumace pistácií po dobu třech měsíců znatelně snižuje hladiny triglyceridů i glykémie v krvi. U ostatních ořechů nejsou výsledky klinicky významné, vliv na glykémii ve spojitosti s konzumací ořechů bude tedy i nadále předmětem výzkumu (Muley *et al.*, 2021).

Podobně jako u vlivu konzumace ořechů vůči diabetu, tak i vůči **neurodegenerativním onemocněním** není jednoznačná odpověď. Existují studie, kde se například potvrzuje souvislost se snížením rizika projevu neurodegenerativních chorob a diskutuje se i o účincích na rozvoj epilepsie (Hayes *et al.*, 2016). Nicméně kolektiv Nishi *et al.* (2023) tento jednoznačně pozitivní vliv v současné době nepotvrzuje, přestože uvádí, že je velmi pravděpodobný vliv pravidelné konzumace ořechů po celý život na mentální a kognitivní zdraví jedince ve starší dospělosti. I tato oblast tedy vyžaduje pokračující výzkum do budoucna (Nishi *et al.*, 2023).

Analogicky je stále zkoumán vliv na rozvoj **nádorových onemocnění** a prozatím taktéž zcela nepotvrzen. Důvodem jeho nepotvrzení je to, že rozvoj nádorového onemocnění nesouvisí jen se stravou, ale mnohdy převažují další neovlivnitelné faktory související se životem konkrétního jedince. Nicméně ukazuje se, že strava do jisté míry může být rozhodující v souvislosti s rozvojem nádorových onemocnění (Sathe *et al.*, 2008a). Kolektiv Ternus *et al.* (2008) uvádí, že je zde potenciál ve snížení rizik rozvoje rakoviny při konzumaci skořápkových plodů s ohledem na přítomnost antioxidantů a schopností odbourávat tzv. oxidativní stres, což bylo například pozorováno u makadamových ořechů (Garg *et al.*, 2007).

Diskutován je i vliv na přiměřenou a zdravou **hmotnost člověka**. I v odborné veřejnosti se objevují domněnky, že při pravidelné konzumaci ořechů může být riziko rozvoje nadváhy či obezity vyšší. Tento fakt ale nebyl potvrzen, přibývání na hmotnosti je dán zejména dalšími faktory a nejvíce pak nepoměrem mezi energetickým příjmem a pohybovým výdejem. Kolektiv autorů Ternus *et al.* (2008) pokládá za mylnou informaci to, že by ořechy zapříčiňovaly nárůst hmotnosti. Naopak se v několika klinických studiích ukázalo, že lidé, kteří pravidelně konzumují porci ořechů, mají průměrně nižší index tělesné hmotnosti (BMI) než osoby, co ořechy konzumují jen ojediněle (Jackson & Hu, 2014; Ternus *et al.*, 2008). Přesto je tato oblast stále předmětem zkoumání a nelze vyjádřit stoprocentně jednoznačné stanovisko. V roce 2019 kolektiv Eslami *et al.* podpořil spojitost pravidelné konzumace ořechů (cca dvě porce týdně) se sníženým rizikem nadváhy, případně obezity. Nicméně i nadále uvádí, že je stále nedostatečné množství výzkumů a informací, které by tento vliv dostatečně potvrzovaly (Eslami *et al.*, 2019).

Vliv na zdraví **kardiovaskulární soustavy** v souvislosti s konzumací ořechů byl též mnohokrát předmětem celé řady klinických studií (Azadmard-Damirchi *et al.*, 2011; Ternus *et al.*, 2008). Nicméně v tomto případě byl pozitivní účinek hned vícekrát potvrzen. Kolektiv autorů Ternus *et al.* (2008) uvádí, že pacienti konzumující porci skořápkových plodů alespoň čtyřikrát týdně, vykazovali méně problémů s kardiovaskulárním systémem než pacienti, kteří je pravidelně nekonzumují. Tento pozitivní účinek byl potvrzen bez ohledu na pohlaví, věk, zdravotní anamnézu nebo životní styl pacienta (Ternus *et al.*, 2008). Například i pracovní skupina Silva *et al.* (2019) uvádí přehled několika výzkumných studií, kde se taktéž potvrzuje pozitivní účinek pravidelné konzumace ořechů se zaměřením na para ořechy vůči zdraví srdce a cév. Dále se potvrdil příznivý vliv i u dalších plodů (např. u pistácií) na rozvoj atherosklerosy. Stabilní konzumace některých skořápkových plodů s určitou pravidelností má navíc vliv na snížení LDL hladiny v krvi (Baer *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019).

1.4.2 Negativní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka

Konzumace jakýchkoliv potravin si s sebou nese pochopitelně i svá negativa, kdy se uvádí zejména riziková kontaminace ořechů vláknitými houbami (Tournas *et al.*, 2015). Při nevhodném skladování je dalším možným rizikem i žluknutí obsažených tuků, u něhož se sice primárně nejedná o život ohrožující záležitost, ale spíše „jen“ o zhoršení sensorických vlastností potravin obsahující ořechy, i přesto není ale konzumace takto závadných produktů doporučována (Dostálová & Kadlec, 2014; Velíšek, 2002a).

Za klíčový negativní aspekt konzumace skořápkových plodů jsou v souvislosti i s řešeným tématem této diplomové práce rizika rozvoje silné alergické reakce, a to velmi často i bez předchozí pozitivní reaktivity na ořechy (Roux *et al.*, 2003).

Detailnější pohled na témata rizikové toxicity u kontaminovaných plodů a rozvoj alergických reakcí v souvislosti s konzumací ořechů je rozpracován na následujících stranách v rámci této podkapitoly.

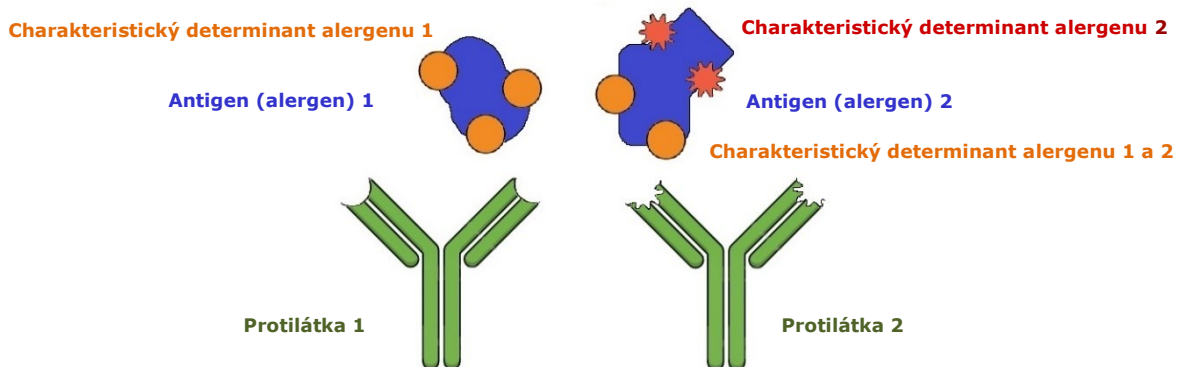
Riziková toxicita u kontaminovaných skořápkových plodů

Ořechy mohou být ve výjimečných případech kontaminovány sporami vláknitých hub (mikromycet), čímž mohou být v plodech přítomny jejich sekundární metabolity. Tyto metabolity jsou obvykle označovány jako mykotoxiny, mezi jejichž typické zástupce v souvislosti s ořechy patří především aflatoxin nebo ochratoxin (Tournas *et al.*, 2015). Lidské zdraví je konzumací takových plodů samozřejmě ohrožené, poněvadž mykotoxiny působí toxicky vůči vnitřním orgánům člověka, vykazují zejména hepatotoxicitu, nefrotoxicitu ale také i celkovou neurotoxicitu (Molyneux *et al.*, 2008; Coronel *et al.*, 2012). Toto riziko se ale v současné době maximálně snižuje nastavením přísných limitů v prodáváných a distribuovaných plodech nebo potravinách, v jejichž složení se skořápkové plody nachází. Limity jsou stanoveny odpovídajícím nařízením EU, a sice Nařízením Komise (ES) č. 1881/2006. Proto lze za mnohem závažnější negativní vliv na zdraví v konečném pojetí považovat rozvoj alergické reakce, který může být hůře předvídatelný. Přítomnost mykotoxinů podléhá velmi přísným kontrolám a toto riziko je tak mnohem více legislativně pod kontrolou (Nařízením Komise (ES) č. 1881/2006).

Alergické reakce

Alergická reakce v souvislosti s jakoukoliv potravinou je považována za určité riziko její konzumace. Potravinové alergie jsou poměrně časté a alergie na skořápkové plody je jednou z těch četnějších společně s alergiemi na plody moře, obiloviny či mléko (Drnková, 2019; Towell, 2009). Skořápkové plody dokáží způsobit velmi akutní stav alergické reakce až život ohrožující stav anafylaxe, kdy dochází k velmi silné alergické reakci těla hned v několika orgánových soustavách najednou. Tento stav je natolik silný, že vyžaduje odbornou lékařskou pomoc (Drnková, 2019). Přestože je prevalence alergií v populaci vůči ořechům a arašídům v jednotkách procent, tak se nejedná o výjimečné případy (McWilliam *et al.*, 2015). Zároveň také nelze projevy alergie na ořechy srovnávat s běžnou alergií na pyly, které se projevují například jen sennou rýmou. Alergie na skořápkové plody se často projevuje velmi silně a je doprovázena nejen kožními potížemi, ale také problémy s dýcháním, otoky v dutině ústní či gastrointestinálními projevy (Drnková, 2019; McWilliam *et al.*, 2015).

Dominující alergenní potravinou z této skupiny jsou arašídý, přestože se k ořechům jen přiřazují a ořechy to ze své podstaty ani nejsou (Crespo *et al.*, 2006). V Evropě je za nejčastější alergenní ořech považován lískový oříšek, v souvislosti s ním se hovoří i o tzv. zkřížené alergenicitě. Jedinec, který je alergický již na určitý alergen, jenž má charakteristický antigenní determinant, s největší pravděpodobností bude alergický i vůči jinému alergenu, jež má shodný charakteristický antigenní determinant (Dreskin *et al.*, 2021; McWilliam *et al.*, 2015). Tento determinant se označuje jako tzv. epitop a jedná se o krátký peptidový úsek v molekule alergenu (sekvence maximálně osmi aminokyselin), kam se vážou protilátky (viz obr. 1). Molekula alergenu má obvykle více takových míst a některé alergeny mohou vykazovat mezi sebou napříč shodnost či podobnost v tomto typickém determinantu, kam se pak protilátka naváže. Ve své podstatě to znamená, že pokud je jedinec alergický například na pyl rostliny z určité čeledi, může být pak alergický i na konzumovaný plod jiné rostliny ze stejné nebo i příbuzné čeledi. Právě z tohoto důvodu může být alergie na skořápkové plody potenciálně nebezpečná, navíc projev takové alergie může být nebývale silný s možným rizikem anafylaxe (Drnková, 2019; Fuchs, 2013).



Obrázek 1: Schématické vyobrazení charakteristických determinantů v případě zkřížené reaktivity, kdy charakteristický determinant alergenu 1 a 2, tzn. společný determinant obou alergenů, je zodpovědný za zkříženou reaktivitu protilátky 1 (vytvořeno pomocí online softwaru Mind the Graph, 2023).

Prozatím se v případě pozitivní reaktivity na jakýkoliv skořápkový plod doporučuje vyřazení veškerých skořápkových plodů ze svého jídelníčku, přitom ne všechny skořápkové plody představují velmi silnou alergenní potravinu, a ne všechny mezi sebou navzájem vykazují

potenciálně možnou zkříženou alergenicitu. Je to samozřejmě problematické i vzhledem k tomu, že je téma alergií a imunologie v souvislosti se skořápkovými plody nedostatečně probádáno (Dreskin *et al.*, 2021; McWilliam *et al.*, 2020). Vzhledem k tzv. zkřížené reaktivitě pozorujeme například souvislost alergie na břízovité rostliny a potravinovou alergii na lískové oříšky (Roux *et al.*, 2003). Zároveň je přítomná imunologická reaktivita mezi reakcí na arašídý a většinou ostatních ořechů (Dreskin *et al.*, 2021). Jsou ale mezi nimi ořechy, které nevykazují tak silný alergenní potenciál, jako jsou například kešu ořechy nebo kokos, přestože se alergie na ně vyskytují taktéž (Roux *et al.*, 2003).

Ačkoli je tato oblast stále nepříliš probádanou, představuje určitou vědeckou výzvu nejen pro oblast zdravotnictví ale i potravinářství. Do budoucna je zcela jistě vhodné prozkoumat možnosti léčby alergií či jejímu předcházení (McWilliam *et al.*, 2015, McWilliam *et al.*, 2020). Jedná se minimálně o život omezující stav, ale leckdy to může znamenat až život ohrožující stav, kdy z přehnané reakce imunitního systému člověka na cizí element (alergen), který tělu nikterak neubližuje, se může stát i boj o život (Drnková, 2019). Přitom by zdravý jedinec takto reagovat neměl. Podobně jako je diabetes, vysoký krevní tlak nebo nadváha, jsou i alergie dnes považovány za tzv. civilizační onemocnění (Sathe *et al.*, 2008b). Právě v souvislosti s tím, že se jedná o velmi se „rozšiřující trend“, jde do popředí rozvoj imunologie a technologií podporující odhalení či léčení alergických projevů. Dlouhodobě se spíše daří potlačovat projevy alergie, než nasazovat vhodnou léčbu (Drnková, 2019). V tomto případě může být nápomocna i proteomika, jež se zabývá proteiny, od jejich identifikace, určení struktury až po jejich funkce. Tím by mohlo být možné i lépe určit charakteristický determinant alergenu s možností nasazení adekvátní léčby. Prozatím bylo využito kvantitativní proteomiky na příkladu pacientů s celiakií (Zhang *et al.*, 2021).

Poněvadž jsou alergické reakce v souvislosti s požitím některých skořápkových plodů považovány v naprosté většině případů za velmi silné, existuje již od roku 2011 povinnost uvádět přítomnost alergenů na obalech potravin. Dle odpovídajícího Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 jsou vyčleněny zvláště pouze arašídý a ostatní skořápkové plody dále rozděleny nejsou. Tím se samozřejmě znevýhodňují jedinci, kteří nejsou alergičtí na více druhů skořápkových plodů. S tímto nařízením velmi úzce souvisí kontrola a bezpečnost potravin, čemuž se také věnuje následující kapitola 1.5.

1.5 Falšování potravin se zaměřením na skořápkové plody

Termín falšování pochází z latinského *falsum* čili padělání nebo napodobení. Falšování potravin zahrnuje tedy veškeré úmyslné snahy o napodobení či předložení méně hodnotné potraviny spotřebiteli, aniž by o tom věděl (Čížková, 2019). Falšování potravin ale i například veterinárních či dalších produktů je přibližně poslední dekádu nad míru skloňované téma. S ohledem na falšování potravin, které konzumuje člověk, je zájem o tuto problematiku pochopitelně vyšší i z řad široké veřejnosti, než pokud jde o falšování produktů z jakéhokoliv jiného odvětví (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015a). V souvislosti s touto problematikou a intenzivním řešením tématu tzv. dvojí kvality potravin na úrovni Evropské unie (Storzer, 2022), je vhodné definovat pojem kvalita potravin. Kvalita neboli jakost představuje ve své podstatě vlastnost, která potravinu (případně i jiný výrobek) charakterizuje v jeho komplexnosti. Pokud tedy posuzujeme kvalitu potraviny, tak by se mělo jednat o souhrn vlastností, jež splňuje patřičné požadavky na konkrétní produkt, respektive potravinu (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015a).

Co se kvality skořápkových plodů týče, tak jakostní požadavky jsou upraveny v již zmiňované vyhlášce č. 397/2021 Sb., §11. Tato vyhláška v přílohách č. 11–13 uvádí přípustné hmotnostní odchylky pro balené skořápkové plody na konkrétní celkové množství. Dále jsou zde uvedeny pro konkrétní druhy (případně i pro jejich zpracovanou podobu) požadavky na vzhled. Uvedený je zde popis barvy, chuti, vůně a nakonec procentuální tolerance vad či povolení odchylek v hmotnostních procentech.

Konkrétní požadavky na jakost jsou zákonem specifikovány i pro ostatní potravinářské či veterinární produkty a potraviny (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2000). Pravdivé označování a zákaz klamání spotřebitele v širokém slova smyslu (nejen nepravdivost informací ale také informace neúplné, nejasné, nepřesné či informace vyjadřující dvojsmyslnost atp.) je upraveno zákonem č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele, ve znění pozdějších předpisů. Ochrana spotřebitele a kontrola potravin je zaštiťována Českou zemědělskou a potravinářskou inspekcí, jež vykonává dozor ze státní pozice dle zákona č. 110/1997 Sb. Kontrola a ověřování pravosti potravin je proces, který lze jedním slovem pojmenovat jako autentizace. Při procesu autentizace je ověřována potravina v souladu s informacemi na obalu, jež výrobce deklaruje (Danezis *et al.*, 2016).

Průběžné a namátkové kontroly tak přispívají ke zlepšení dodržování legislativy související s falšováním potravin, klamáním spotřebitele a bezpečnosti potravin na trhu (Čížková, 2019). Pokud výrobce či distributor žádný ze zákonů neporušuje a spotřebitele nijak neklame, pak je již vyžadovaná kvalita vázána na náročnost spotřebitele. Spotřebitel mající své vlastní nároky a požadavky na danou potravinu rozhoduje o tom, zda je pro něho potravinu kvalitní, a tedy si ji zakoupí či nikoliv (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015a).

1.5.1 Důvody falšování

Historie falšování sahá téměř do historie lidstva samotného, respektive sahá do období rozvoje obchodu. Člověk prakticky od nepaměti vyrábí různé výrobky a velmi záhy objevil kouzlo v jejich prodeji, ať již v tzv. výměnném obchodu, tak později i v prodeji za účelem peněžního zisku (Čížková, 2019). V současnosti má falšování prakticky stále stejný hlavní motiv onoho padělání potravin či potravinářského výrobku, a tím je samozřejmě vyšší ekonomický zisk výrobce eventuálně prodejce (Čížková, 2019; Gallagher & Thomas, 2010). Mezi další důvody falšování potravin obecně patří vysoká cena potravin, a dále například nedostatkovost konkrétní komodity a vzrůstající poptávka u spotřebitele (Čížková, 2019). Za rizikové v tomto ohledu lze považovat například piniové oříšky, respektive produkty vyráběné z nich, jako jsou piniová pesta nebo másla. Piniové oříšky jsou velmi specifické skořápkové plody, jejichž významnou charakteristikou je, že dozrávají vždy v časovém horizontu tří let (Hieke, 2008). Zejména z těchto důvodů se jedná prakticky o nejdražší druh skořápkových plodů, čímž může aspirovat na cíl případného „falšovatele“.

Ořechy obecně patří mezi dražší komoditu, čímž ze sebe činí potenciálně rizikovou potravinu z hlediska onoho falšování. Možným falšováním jsou ohroženy především produkty, které jsou z nich vyráběny, případně se do nich skořápkové plody v různém množství přidávají. Může se jednat například o ořechová másla, rostlinné nápoje, které jsou alternativou mléka, dále pak pesta, omáčky, pekárenské výrobky, cukroví nebo müsli tyčinky s ořechy (Ding *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2018).

1.5.2 Druhy falšování

Historicky mělo falšování velmi jednoduchou a prozaickou podobu – nastavování těsta pískem, ředění mléka či alkoholických nápojů vodou apod. (Gallagher & Thomas, 2010). I v současnosti se lze samozřejmě setkat s podobným typem falšování, ale takové falšování není s dnešními možnostmi analýzy tak těžké odhalit. V této době se obvykle jedná o podstatně sofistikovanější způsoby, které si více pohrávají se skulinami v legislativě (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015b), ale jejich cílem je stále stejné oklamání spotřebitele. Samozřejmě i technologické pokroky rovněž napomáhají k rozvoji nových způsobů, kterými lze klamat. Pro jejich odhalení jsou pak zapotřebí čím dál více pokročilejší analytické postupy a metody vykazující mj. například vyšší citlivost. Vývoj analytických metod a postupů tak svádí pomyslný závod s výrobcí, jež se snaží klamat a vydělávat, aniž by byli odhaleni.

Primární motiv falšování je samozřejmě vyšší zisk (Čížková, 2019). Způsob, jakým výrobci mohou spotřebitele oklamat, zdaleka ale není jen jeden (Čížková *et al.*, 2012). Takových způsobů existuje celá řada a do budoucna lze předpokládat, že se mohou objevit další „inovativnější“.

V současnosti se setkáváme zejména s následujícími způsoby:

- záměna deklarované potraviny za levnější;
- nastavování deklarované složky potraviny za levnější složku;
- přítomnost složek, jež nejsou deklarovány;
- nastavování a falšování potraviny za účelem vylepšení konkrétní jakostní vlastnosti;
- nedodržení deklarovaného technologického postupu;
- uvádění vyššího obsahu složky, než je deklarováno;
- neuvedení pravdivého geografického původu či způsobu produkce;
- neoprávněné využití známé značky nebo názvu (Čížková *et al.*, 2012).

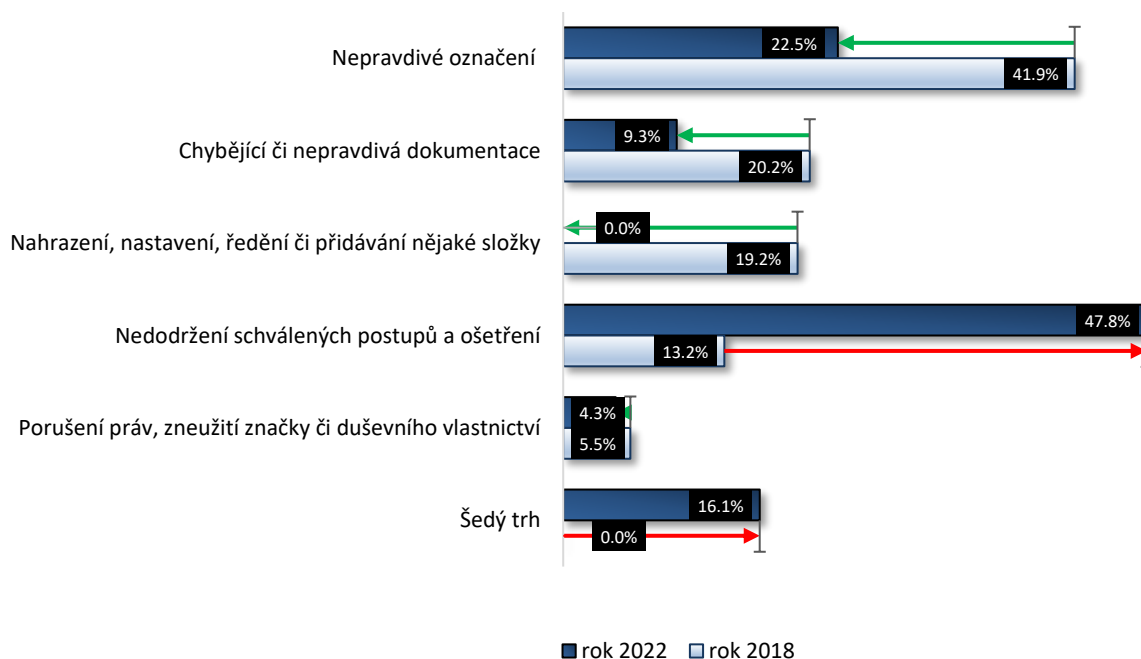
V kontextu výrobků ze skořápkových plodů jsou samozřejmě možné všechny způsoby falšování, přičemž nejčastěji se patrně setkáme se záměnou deklarované složky, respektive její nastavení. Typicky mohou být dražší ořechy zaměněny případně nastaveny za levnější arašidy nebo sóju. Systém správní pomoci a spolupráce (AACS) ve své poslední zveřejněné

výroční zprávě (2022) uvádí, že ořechy a výrobky z nich jsou významně ohroženy odhalením přítomnosti aflatoxinů či mikroorganismů. Falšování skořápkových plodů se týká zejména produktů, v nichž jsou odpovídající plody obsaženy. Zpracovávané skořápkové plody zasahují hned do několika kategorií, a to výživové doplňky, potraviny určené pro různé typy diet, pekárenské výrobky, cereálie a samozřejmě produkty z ořechů a semen rostlin.

Nejnovější výroční zpráva Systému správní pomoci a spolupráce odhaluje nejčastější prohřešky týkající se falšování potravin v Evropě (AACs, 2022). Téměř v polovině případů je možné hovořit o nedodržení deklarovaného postupu či ošetření. Na druhém místě je pak nepravdivé uvádění informací (respektive označení) na etiketě produktu. Proti situaci z minulých let je ale možné pozorovat zlepšující se trend v oblasti označování potravin, kdy se například ještě v roce 2018 tento prohřešek týkal stále téměř 50 % případů podezřelých potravin (AACs, 2018). Údaje z let 2018 a 2022 (pro Evropu) jsou k dispozici níže.

Pro vizuální porovnání údajů z obou výročních zpráv je uvedeno grafické vyjádření (graf 3).

Způsoby falšování dle AACs (srovnání let 2018 a 2022)



Graf 3: Procentuální zastoupení typů falšování v Evropě; celkový počet podezřelých potravin pro rok 2018 činí 234 a pro rok 2022 se jedná o 224 podezřelých potravin (zdroj dat: AACs, 2018; AACs, 2022).

Z grafu 3 lze pozorovat velký vzestup v kategorii falšování, která je označována jako nedodržení schválených postupů a ošetření, což zahrnuje i neoprávněnou manipulaci s produktem a využití nedeklarovaných postupů, jako například ošetření pesticidy či využití genetických modifikací (AACS, 2018; AACS, 2022). Nově se navíc v poslední zprávě AACS oddělila samostatná kategorie tzv. šedý trh, jež zahrnuje pašování, nelegální držení zvířat, rostlin, přípravků pro zemědělské účely nebo doplňků stravy. Procentuální zastoupení této kategorie není zanedbatelné, činí přibližně jednu šestinu případů (AACS, 2022).

1.5.3 Dopady falšování na kvalitu a bezpečnost potravin

Přestože základním motivem falšování potravin je ekonomický zisk (Čížková, 2019), jeho dopady mohou být podstatně větší než jen na peněženky spotřebitelů. V některých případech se sice skutečně jedná „jen“ o klamání spotřebitele ve smyslu méně kvalitního produktu, za který zbytečně přepláci, ale na straně druhé může oklamání spotřebitele vést až k ohrožení či poškození zdraví spotřebitele (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015b).

Podvodů, které nejsou a priori spojené s ohrožením zdraví spotřebitelů, je samozřejmě více, což se týká například ředění ovocných džusů nebo šťáv vodou s cukrem, snižování podílu ovoce v džemech, doslazování medů apod. (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015b). Situace, kdy je ale již ohrožené zdraví spotřebitele, nastává ve chvíli, kdy je levná náhražka v produktu jedovatá či způsobuje projevy nejrůznějších onemocnění u dětí nebo dospělých. Příkladem ohrožujícího falšování je například methanolová kauza z roku 2012, kdy nemalé množství lihovin bylo ředěno methanolem (Čížková *et al.*, 2012; Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015b). Objektivně méně závažná je oblast falšování týkající se nedodržování data spotřeby a trvanlivosti výrobků, i to ale rozhodně může ohrozit člověka na životě, zvláště pak tehdy, pokud je produkt mikrobiálně kontaminován (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2015b; Velíšek, 2002c).

Ve vztahu ke skořápkovým plodům je falšování zaměřeno zejména na náhradu vybraných dražších ořechů za levnější a snadno dostupnou variantu, kterými jsou arašídny. Toto platí prakticky u všech výrobků ze skořápkových plodů, co se týká ořechových nápojů, jakožto alternativ k mléku, tak je v tomto ohledu rovněž významné zaměňování za sóju či sójové produkty (Ding *et al.*, 2020). Jedná se o obdobný způsob jako při nahrazování ovoce cukrem

apod., s tím rozdílem, že arašídý či sója v porovnání s ostatními skořápkovými plody jsou podstatně silnějšími alergeny. Přítomnost alergenu v potravinách, jež není uveden na obale je tak pochopitelně vážný prohřešek výrobce v kontextu legislativy zohledňující nejen klamání spotřebitele, ale také Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011, které uvádí povinnost opatřovat potraviny číselným označením přítomného alergenu. Taková náhražka není tak „pouhým“ snížením kvality potraviny, ale také představuje nebezpečí pro alergika či potenciálního alergika.

Kromě případných alergických projevů je rizikové použití skořápkových plodů, jež jsou nevhodně skladovány a podléhají například žluknutí či jsou kontaminovány mikromycetami (Tournas *et al.*, 2015). Rizika konzumace plodů nebo potravin obsahující kontaminované skořápkové plody jsou zmíněna již v kapitole 1.4, konkrétně v podkapitole 1.4.2 Negativní vliv konzumace skořápkových plodů na zdraví člověka.

Nepravdivé označení geografického původu pěstovaných skořápkových plodů je jistě též považováno za falšování, poněvadž z míst charakteristických na chudé půdy mohou mít plody odlišné výživové hodnoty. Ačkoli je to stále jeden ze zmiňovaných prohřešků, nelze jej vnímat jako život ohrožující spotřebitele. Riziko by mohlo nastat dejme tomu v okamžiku, kdy by vypěstované plody pocházely z oblastí, které byly například zasažené radioaktivní havárií anebo z oblastí, kde se využívají u nás nedovolené látky a pesticidy pro svou prokazatelnou karcinogenitu případně další rizika (Lizakowski & Krampichowski, 2019).

1.6 Analytické metody zaměřené na identifikaci a autentizaci potravin

V obecném pojetí je autentizace potravin, případně identifikace konkrétních složek v potravinách a potravinářských produktech, velmi široký obor. Záleží na složení a povaze produktu a na jejím základě je následně volena i adekvátní metoda pro odhalení deklarovaného složení potraviny (Danezis *et al.*, 2016). Základním vodítkem pro stanovení metody může být povaha vzorku tzn., zda se jedná o rostlinný či živočišný produkt, eventuálně mohou pomoci i další bližší charakteristiky dané potraviny (Wadood *et al.*, 2020). Zásadní je nejen předpokládané zastoupení a množství živin (lipidy, proteiny,

sacharidy případně voda) v potravině, ale také heterogenita směsi, na jejíž bázi se mohou volit techniky s různou citlivostí a separační schopností (Campmajó & Núñez, 2021). Vzhledem k tomu, že falšování potravin je stále aktuální téma a výrobci bývají často o krok či dokonce několik kroků napřed, způsoby ověřování kvality a autenticity potravin také podléhají přirozenému vývoji (Medina *et al.*, 2019). Nepochybně je vhodné kombinovat více metod, jež se při ověřování pravosti potravin vzájemně mohou doplnit (Danezis *et al.*, 2016).

V současnosti existuje stále jen málo přesvědčivých důkazů o tom, která analytická metoda či postup při zpracování potravin za účelem zjištění její autenticity, je nejlepší (Medina *et al.*, 2019). Hlavní kritéria volby je zcela jistě časové a finanční hledisko analýzy. Záleží ale také na mnoha vlastnostech analyzovaného produktu či dalších faktorech postupu prováděné analýzy (Danezis *et al.*, 2016). Příprava vzorku je prvním a velmi zásadním krokem při zjišťování autenticity produktu, proto i této části postupu by měla být věnována dostatečná pozornost. Příprava vzorku by měla být v souladu s využívanou metodou, čímž může být i pomyslně zvýšena účinnost konkrétní zvolené analytické metody (Campmajó & Núñez, 2021; Mansour & Khairy, 2017). Zpracování vzorku zahrnuje v počátku obvykle jeho homogenizaci, dále se pokračuje postupy, které typicky umožňují extrakci jednotlivých fází a konkrétních chemických sloučenin (jako jsou například lipidy nebo proteiny v produktu). Volba extrakčních technik je závislá na množství potřebných finančních prostředků, to souvisí se spotřebou extrakčních činidel i jednorázových pomůcek (Campmajó & Núñez, 2021). Nyní se ale také více dbá na šetrnost využívaných technik a vybavení vůči životnímu prostředí, čemuž je možné jít více naproti například využitím významně menších objemů extrakčních činidel (Gómez-Ríos *et al.*, 2017).

Pro účely zjišťování autenticity potravin jsou skutečně hojně využívány veškeré spektroskopické a spektrometrické metody (Campmajó & Núñez, 2021; Cubero-Leon *et al.*, 2018). Naprostá většina využívaných metod v potravinářství si dává za cíl získat tzv. otisk prstu případně „*fingerprint*“ dané potravin, respektive její složky. Jak označení napovídá, jedná se o paralelu k lidskému otisku prstu, jež v tomto případě představuje jedinečnou charakteristiku dané potravin či její složky a je možné ji využít za účelem certifikace pravosti potravin (Medina *et al.*, 2019).

Z hlediska ověřování pravosti a kvality skořápkových plodů či dalších semen se široce využívají metody založené na chromatografii, tzn. kapalinová (LC, *liquid chromatography*) nebo plynová chromatografie (GC, *gas chromatography*). Kapalinová chromatografie je obvykle využívána ve spojení s hmotnostní detekcí (hmotnostní spektrometrie). Hmotnostní spektrometrie (MS, *mass spectrometry*) nemusí být jen detekční součástí metody, ale rovněž může fungovat jako samostatná analytická metoda (Campmajó & Núñez, 2021). K autentizaci potravin je dále možné využívat například i imunochemické metody (např. ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), které fungují na základě interakce antigen a protilátka. Přestože se jedná spíše o metody spadající do zdravotnictví (imunologie), své využití mají také v potravinářství, zvláště při identifikaci specifických proteinů u masných a mléčných produktů. Využívají se také při odhalení přítomnosti toxinů nebo některých bakteriálních kontaminací v potravinách (Danezis *et al.*, 2016).

Skořápkové plody, respektive ořechy, semena a některé jim podobné plody rostlin představují specifickou potravinářskou kategorii. V produktech se jedná o velmi složité směsi, které obsahují velké množství sloučenin a pohlíží se na ně jako na tzv. komplexní matrice. Kromě základních makroživin (lipidy, sacharidy, proteiny), obsahují také sloučeniny, které jsou odvozené od specifických úprav při svém potravinářském zpracování (Campmajó & Núñez, 2021). Pro svůj komplexní obsah jsou analyticky důležité pokročilé metody s velkou separační schopností. V souvislosti s tím se využívají většinou chromatografické metody. Kapalinová chromatografie (LC) nabízí široký analytický rozsah, je možné analyzovat, jak polární, tak nepolární látky o různé molekulové hmotnosti (Campmajó *et al.*, 2020; Campmajó & Núñez, 2021). Analýza se provádí u látek rozpustných v kapalně fázi, pro účely separace se využívá buď normální anebo reversní fáze. Pro detekci se využívají UV detektory, fluorescenční detektory anebo nejčastěji využívané hmotnostní detektory (MS) mající vysoké rozlišení (Campmajó & Núñez, 2021; Wadood *et al.*, 2020). Plynová chromatografie (GC) je naopak více specificky využívána pro identifikaci látek s nižší molekulovou hmotností a spíše sloučeniny těkavého charakteru. Jako detektory jsou u plynové chromatografie opět využívány hmotnostní detektory (MS) anebo například tzv. plamenoionizační detektor (FID, *flame ionization detector*), což je obvyklá součást plynového chromatografu (Campmajó & Núñez, 2021).

Využitá analytická metoda, podobně jako příprava vzorku, je jedním z dílčích kroků vedoucí k odhalení pravosti konkrétní potraviny. Posledním důležitým krokem analýzy je matematické či statistické zpracování naměřených dat (Medina *et al.*, 2019). Mezi nejčastěji využívané matematicko-statistické čili chemometrické metody patří využití analýzy hlavních komponent (PCA, *principal component analysis*), shlukové (klastrové) analýzy (CA, *cluster analysis*) nebo hierarchické shlukové analýzy (HCA, *hierarchical cluster analysis*). Všechny tyto analýzy zpracovávají data tak, že se zpracovávají podobnosti a odlišnosti mezi měřenými vzorky zároveň a na základě toho se dané vzorky ve skupině identifikují (Campmajó & Núñez, 2021; Zhao *et al.*, 2013). Kromě toho se využívají rovněž počítačová zpracování na bázi lineární diskriminační analýzy (LDA, *linear discriminant analysis*) či analýzy na základě parciální regrese (PLS, *partial least squares*), případně mohou být jednotlivé statistické metody také různě kombinovány (Campmajó & Núñez, 2021). Lineární diskriminační analýza využívá lineární kombinace vektorů, respektive středních hodnot těchto vektorů s cílem najít rozdíly mezi již známými identifikovanými kategoriemi (Campmajó & Núñez, 2021; Rahmani & Mani-Varnosfaderani, 2022).

Na analytické metody lze hledět také z hlediska analýzy konkrétních sloučenin. Mezi poměrně využívané metody patří genomické a proteomické analýzy, což jsou molekulární analýzy postavené na identifikaci DNA (genomika) nebo na identifikaci specifických proteinů případně peptidů (proteomika) v analyzovaném vzorku (Danezis *et al.*, 2016). Lze také provádět analýzy na základě identifikace specifických lipidových složek ve vzorku, čímž se zabývá lipidomika (Jardim *et al.*, 2023). Mezi komplexní využívané metody se dostávají také metabolomické přístupy, které jsou postavené na identifikaci metabolitů. Metabolomické analýzy zahrnují identifikaci celého spektra sloučenin, což znamená nejen proteinů/peptidů či nukleotidů, ale také lipidů, sacharidů, steroidních látek a dalších sloučenin. Z čehož vyplývá, že se jedná prakticky o analytický přístup, jež je nadřazen genomice nebo proteomice (Rubert *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2023). Je analyzován celý metabolom, ale s ohledem na velikou rozmanitost zkoumaných látek je prakticky nemožné jej identifikovat komplexně, podle konkrétních záměrů se tak připravují vzorky a metabolom je identifikován jen v určité oblasti a tedy částečně (Rubert *et al.*, 2015). I přes poměrně vysoké finanční náklady se také jako vhodná metoda pro autentizaci potravin využívá nukleární magnetická resonance (NMR). Její velkou výhodou je možnost provedení analýzy

i u velmi malého množství vzorku, který může navíc představovat i vysoce heterogenní směs (Danezis *et al.*, 2016). Další využívanou metodou je například i senzorická analýza, která je specifickou metodou, jak ohodnotit kvalitu a autenticitu potraviny. Výrobek by měl hodnotit zkušený konzument, hodnotí se nejen chuť, ale rovněž také vzhled, vůně a konzistence či textura potraviny. Vnímání člověka je ale do jisté míry přirozeně ovlivněno a je považováno za subjektivní. Na základě toho se i v rámci senzorické analýzy využívá více instrumentálních metod, jako jsou „elektronické smyslové orgány“ (Tan & Xu, 2020; Wadood *et al.*, 2020).

Campmajó & Núñez (2021) uvádí, že přestože chromatografické metody s využitím hmotnostní detekce jsou poměrně uspokojivé z hlediska identifikace konkrétních sloučenin deklarujících příslušnost k danému skořápkovému plodu, tak jsou v rámci analýz identifikovány spíše látky lipidické povahy. V rámci analýz využívajících zejména LC nebo GC jsou semena a ořechy identifikovány většinou jen na základě stanovení mastných kyselin, sloučenin fenolické povahy a sloučenin příbuzných vitamínu E (tokoferolu).

1.6.1 Identifikace skořápkových plodů na základě lipidového obsahu

Lipidomické přístupy představují pro potraviny velmi bohaté na tuky a oleje přirozenou cestu k jejich detailní analýze a identifikaci. Lipidomika přináší příležitost pro zkoumání lipidových profilů konkrétních potravin, eventuálně nalézt tzv. „*fingerprint*“ pro nejrůznější druhy tuků, olejnin, ořechů, semen a dalších potravin (Jardim *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2018). Analýzy pracující s lipidickou složkou analyzovaného vzorku využívají podobné technologie jako proteomika a další molekulární analýzy, obvykle využívané metody jsou v základu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (Jardim *et al.*, 2023). Analýza získaných dat je i v současnosti stále více manuální prací, navíc zatím není zcela jednotně dáno, jak pracovat s některými velmi malými (nejčastěji polárními) lipidy, které prakticky představují neznámé sloučeniny, tzn. látky bez stanoveného standardu (Jardim *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2018). Ačkoli jsou některé skořápkové plody bohaté na polární lipidy (např. kešu nebo pistácie), tak se ne vždy jedná o vhodný analytický postup vedoucí k jejich spolehlivé identifikaci (Song *et al.*, 2018). Právě tento kolektiv Song *et al.* (2018) se v Číně zabýval možnostmi fosfolipidové identifikace šesti druhů skořápkových plodů (arašídů, kešu, mandle,

pekany, pistácie, vlašské ořechy) za pomoci specifické kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HILIC-ESI-IT-TOF-MS, *hydrophilic liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry*). Výsledky práce ukazují, že lipidová identifikace není natolik spolehlivá, aby se pro všechny ořechy (např. mandle nebo pekany) dala lipidomická cesta využít jako analytická volba číslo jedna. Přesto ale několik výzkumných skupin potvrzuje, že lipidové markery v určité podobě mohou sloužit ke sledování autenticity některých ořechů a olejů. Například dvojice autorů Taş & Gökmen (2015) uvedla, že lipidomická analýza může být spolehlivá při identifikaci konkrétního druhu či variety u lískových ořechů, kdy extrahované triacylglyceroly, mastné kyseliny a tokoferoly byly identifikovány za pomoci třech různých chromatografických systémů (HPLC, *high-pressure liquid chromatography*; GC, *gas chromatography*; LC-ESI-Q-TOF, *liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight*) s potenciálem odlišit mezi sebou jednotlivé variety lískových ořechů na základě procentuálního zastoupení jednotlivých lipidických složek. Obdobnou analýzu provedl o tři roky dříve portugalský kolektiv Barreira *et al.* (2012) na mandlích, kde nejúspěšnějším postupem byla identifikace triacylglycerolů (TAG, *triacylglyceroles*) s následnou analýzou rozptylu (ANOVA, *analysis of variance*) a lineární diskriminační analýzou (LDA), kdy byly identifikovány TAG parametry pro rozlišení zkoumaných kultivarů mandlí v Portugalsku. Lipidomické analýzy se využívají zejména také při identifikaci čistých olejů, kolektiv Dong *et al.* (2015) například analyzoval dvanáct arašídových olejů, kdy část z nich byla modelově znehodnocena, tzn. „zfalšována“. Této výzkumné skupině se podařilo za pomoci dvoudimenzionální kapalinové chromatografie ve spojení s APCI-MS (*atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*) ukázat jasné rozlišení mezi analyzovaným normálním a modelově falšovaným arašídovým olejem na základě hodnocení parametrů TAG za pomoci chemometrického přístupu využívající analýzu hlavních komponent (PCA).

Přestože tyto techniky vykazují významný potenciál pro odhalení falšování složek v rámci ořechových produktů, jedná se spíše o identifikaci na základě deklarovaného geografického původu či odhalení konkrétního kultivaru a variety. Postupy lipidomické analýzy mohou tak vhodně doplňovat další molekulární přístupy, které si kladou za cíl odhalit pravost konkrétních potravinářských produktů (Danezis *et al.*, 2016; Jardim *et al.*, 2023).

1.6.2 Identifikace skořápkových plodů na základě proteinového obsahu

Ačkoli jsou lipidy majoritní složkou ořechů, mnoho z nich je poměrně bohatých i na proteiny, což přirozeně nabízí i další možnost zaměření jejich analýzy. Prozatím byly skořápkové plody jednotlivými výzkumnými skupinami zabývající se proteomikou potravin analyzovány spíše jednotlivě se zaměřením na identifikaci alergenů, tzn. specifických peptidů daných plodů (Li *et al.*, 2016; Polenta *et al.*, 2012; Sagu *et al.*, 2021). Rovněž proteomicky zaměřené analýzy využívají kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí, není to tedy jen doménou lipidomických analýz (Campmajó & Núñez, 2021; Sagu *et al.*, 2021).

Rozlišovací analýza v rámci skupiny ve smyslu širšího celku skořápkových plodů byla předmětem bakalářské práce, která této práci předchází (Kadeřábková, 2022). V rámci předchozí práce se ukázalo, že od sebe lze odlišit jedenáct druhů skořápkových plodů, a to na základě provedeného měření pomocí MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry*) s následným vyhodnocením za pomoci analýzy hlavních komponent (PCA). Na základě tohoto zjištění bylo hodnocení podrobena detailnější analýze naměřených píků v softwaru mMass. Výsledkem práce jsou získané unikátní hodnoty peptidů (m/z) pro jedenáct základních skořápkových plodů (Kadeřábková, 2022). V následujícím roce italský kolektiv Luparelli *et al.* (2023) si dal za cíl detekovat specifické alergeny u pěti druhů skořápkových plodů (kešu, lískové ořechy, mandle, pistácie a vlašské ořechy) a arašídů v rámci pekárenských výrobků, u nichž mohou být alergeny detekovány na základě kontaminace při výrobě. Jednalo se o vlastní pekařské výrobky, u nichž autoři znali přesné složení dopředu. V rámci proteomického přístupu bylo využito taktéž enzymatické štěpení vzorku trypsinem (Kadeřábková, 2022; Luparelli *et al.*, 2023), jemuž ale navíc předcházela extrakce, kdy byly přidány následující chemikálie: Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu) pufr (o pH 9,2) a močovina. Extrakce probíhala v orbitální třepačce po dobu 30 minut. Před štěpením byly vzorky ponechány v ultrazvukové lázni a podrobeny centrifugaci. Po odstranění přebytku močoviny byla provedena denaturace přítomných proteinů při 95 °C, následovaná redukcí dithiotreitem a alkylací jodacetamidem. Poté bylo přistoupeno k 16hodinovému štěpení trypsinem při zvýšené teplotě (37 °C) a za stálého míchání (Luparelli *et al.*, 2023). Měření pak proběhlo za pomoci kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, konkrétně

LC-ESI-MS. Výsledky přináší pozitivní zjištění týkající se rozlišení alergenních markerů všech šesti zkoumaných druhů v pekárenských produktech i s ohledem na to, zda se jedná o syrovou či praženou variantu. Analýza touto kapalinovou chromatografií představuje poměrně rychlou a spolehlivou metodu, jak analyzovat alergeny včetně i těch tzv. „skrytých“, jelikož ořechy nejsou primárně součástí produktu, ale mohou se v něm přesto vyskytovat na základě kontaminace při výrobě. Ukázalo se, že je zde potenciál implementovat tuto metodu do kontroly kvality na průmyslové úrovni, což by mohlo vyústit v ověřenější uvádění, zda potravinu obsahuje stopy skořápkových plodů a arašídů či nikoliv. Mnoho potravin je totiž takto označováno preventivně, třebaže obsah skořápkových plodů a arašídů nakonec v produktu není detekován (Luparelli *et al.*, 2023). Přestože kolektiv autorů Luparelli *et al.* (2023) uvádí, že jejich předkládaný postup je jednoduchým, z časového hlediska rychlým a výhodným. V práci, jež předchází této diplomové práci (Kadeřábková, 2022) byl postup zahrnující štěpení analyzovaných vzorků významně jednodušší a nevyžadoval 16hodinové enzymatické štěpení za zvýšené teploty, nýbrž jen 4hodinové štěpení za laboratorní teploty. Po štěpení následovalo pouhé přečištění vzorků a poté již mohlo být přistoupeno k instrumentálnímu měření na MALDI-TOF MS či LC-ESI-Q-TOF MS (Kadeřábková, 2022; Luparelli *et al.*, 2023). Výsledky této práce nasvědčují tomu, že využitý jednodušší postup má rovněž potenciál pro identifikaci konkrétního druhu skořápkového plodu v rámci potravinářských produktů, což je předmětem experimentální části této diplomové práce.

Metoda MALDI-TOF nebyla v souvislosti s proteomickou analýzou skořápkových plodů využita takto poprvé, např. kolektivem Huang *et al.* (2016) byl za pomoci této metody tvořen proteomický profil kokosu a současně s tím tvořena ještě dvoudimenzionální proteomická mapa s využitím 2D elektroforézy. Kolektiv Li *et al.* (2020) využil MALDI-TOF MS pro proteomickou analýzu arašídů s ohledem na podzemní vývoj semene, analýza probíhala v sedmi fázích a ukázala, že proteomické hodnocení v průběhu vývoje semene je velmi komplikovanou disciplínou. Nalezené specifické proteiny souvisely s transportem sacharidů, lipidů či konkrétních aminokyselin, což ukazuje na jejich klíčové postavení z hlediska metabolismu a vývoje semene (v tomto případě arašídů). Kromě MALDI-TOF, byla analýza doplněna taktéž o 2D elektroforézu a o PCR (*polymerase chain reaction*) metodu v reálném čase, na základě všech tří analýz bylo odhaleno, že proteom byl při vývoji

semene značně dynamický. V raných fázích (tzn. do čtvrté fáze) nebyl výskyt alergenních či potenciálně alergenních peptidů prakticky detekován, ve stadiu pět a šest byly detekovány peptidy s největším možným rozvojem závažné alergie, v posledním, tzn. sedmém stádiu bylo detekováno maximálně poloviční nebo dokonce nižší množství alergenních peptidů než v pátém a šestém stadiu (Li *et al.*, 2020). Vyplývá z toho opět fakt, že doplnění jednotlivých molekulárních přístupů navzájem je v této disciplíně velmi důležité. Je tedy vhodné na to pohlížet ve větší šíři, jako například sleduje již zmíněná metabolomika (Rubert *et al.*, 2015). Výsledky této studie ukázaly, že z hlediska hodnocení přítomnosti alergenů, tj. specifických peptidů ve vzorku, může hrát roli také zralost semen. Ze studie tedy vzešlo, že arašídý s nižší zralostí mohou být rizikovější pro citlivější osoby, tzn. alergiky anebo potenciální alergiky. Tato informace může tak přispět k tomu, v jaké fázi budou semena či skořápkové plody sklížena a následně využívána ke konzumaci přímo nebo v potravinářských produktech (Li *et al.*, 2020). V obou zmíněných případech se ale jednalo vždy o analýzu jen jednoho plodu, nikoli o rozlišovací analýzu v rámci skupiny zahrnující i další skořápkové plody.

1.6.3 Identifikace skořápkových plodů pomocí DNA (genomické) analýzy

Kromě molekulárních analýz postavených na identifikaci lipidů a proteinů se v souvislosti s identifikací skořápkových plodů lze rovněž setkat s genomickou analýzou, tzn. analýzou, v níž hlavní roli hraje deoxyribonukleová kyselina (Torricelli *et al.*, 2020). Pro určení skořápkového plodu se využívá extrahování DNA s využitím PCR metody v několika podobách, buď jako multiplex nebo simplex PCR (Ding *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2018; Torricelli *et al.*, 2020). Multiplexní PCR umožňuje zúžit identifikaci v rámci skupiny, což je výhodné v případě směsného vzorku, tzn. při analýze vzorku obsahující více než jeden skořápkový plod z téže skupiny (Ito *et al.*, 2018). Simplexní PCR umožňuje identifikaci se zaměřením na jeden konkrétní plod, což samozřejmě přináší vyšší citlivost a celkově vyšší přesnost získaných výsledků. Spolehlivost genomických analýz je poměrně vysoká, jak se například ukázalo z hlediska autentizace ořechových mlék v Asii, kde se objevují podvody typu nahrazování některých dražších ořechů za arašídý či sójové boby (Ding *et al.*, 2020).

Přestože se jedná o poměrně spolehlivé metody v oblasti autentizace potravin, je vhodné mít další doplňující metody, které mohou získaný výsledek podpořit či vyvrátit (Danezis *et al.*,

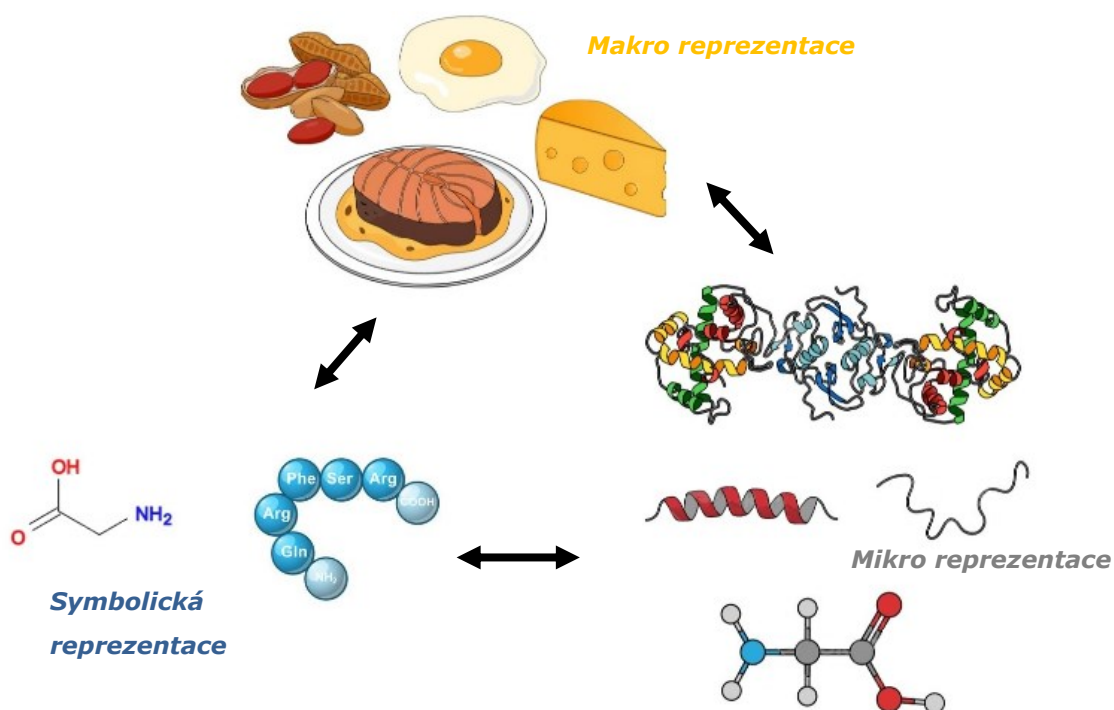
2016). Proto se můžeme setkat i s novou vědní disciplínou, jež se zabývá molekulárními analýzami potravin a nazývá se velmi obdobně jako ostatní dílčí molekulární analýzy, tzn. foodomika, respektive v anglickém označení „*foodomics*“. Tato disciplína zahrnuje všechny zmíněné dílčí analýzy, jako je genomika, transkriptomika, proteomika, lipidomika či jim nadřazená metabolomika. Cílem foodomiky je studium potravin a vývoj technologií, které podpoří ověřování pravosti potravin a s tím související ochranu spotřebitele. Základem využívaných technologií jsou molekulární analytické postupy, jejichž výsledky se porovnávají na základě celé řady faktorů, tj. finanční náklady, šetrnost k životnímu prostředí, čas nebo spolehlivost konkrétní metody (Herrero *et al.*, 2012).

1.7 Didaktický pohled na výuku odborného tématu ve výuce (chemie)

Zařazování odborných témat, jako nabízí tato diplomová práce, do výuky chemie pro sekundární vzdělávání³ se na první pohled příliš nemusí hodit. Důvodem je nejen nesoulad s požadavky na úrovni státního kurikula (MŠMT, 2021), ale také to, že chemie je sama o sobě považována za poměrně náročný a abstraktní obor již ve svých základech (Johnstone, 1991). Již Johnstone (1982) uvádí, že chemie, případně věda obecně, je pro žáky a studenty velmi náročná na představy i pochopení. Chemie prezentuje velmi abstraktní vědu a předpokladem jejího zvládnutí je prokázat schopnost pohybovat se ve třech tzv. úrovních chemických souvislostí (Johnstone, 1991). Tři úrovně, které uvádí Johnstone (1991) souvisí i s tím, jak by mohlo (mělo) být ve výuce abstraktní vědy postupováno.

Prvním krokem (například u nového tématu) by mělo být zobrazení úrovně „*makro*“, tedy něco snadno představitelného, známého z běžného života. Následovat by ji měla úroveň „*mikro*“, v němž je klíčové dostat se do základních „*mikro*“ představ, tj. prakticky do částicové chemie. Po zorientování se v obou těchto úrovních je možné teprve přistoupit ke třetí úrovni, kterou je „*symbolika*“, a sice oblast vzorců eventuálně dalších symbolů, jež chemicky znázorňují tutéž strukturu z mikrosvěta. Pohled na tříúrovňový systém reprezentací podle Johnstone (1991) na příkladu tématu proteiny je zobrazen na obr. 2.

³ Sekundární vzdělávání je dle mezinárodní klasifikace představováno dvěma stupni, tj. ISCED 2, ISCED 3 (Eurydice, 2023a; Eurydice, 2023b).



Obrázek 2: Tři úrovně reprezentací (*makro, mikro, symbolika*) na příkladu tématu proteiny (vytvořeno pomocí online softwaru Mind the Graph, 2023 podle: Johnstone, 1991).

Johnstone (1991) již ve 20. století přináší pohled, že by chemie mohla být vyučována od životně bližších témat, nikoli „tradičně“ od částicového složení, což dále rozpracovává ve své další práci (Johnstone, 2010). V této práci navrhuje přizpůsobit výuku chemie tak, aby byla více vyhovující psychologickým potřebám žáků a studentů. Samozřejmě to neznamená, že by byla výuka chemie dosud pojmána nevhodně, jen je třeba její podobu lehce přehodnotit a umožnit určité změny v tradiční výuce s ohledem na moderní dobu. Chemie ale i další přírodovědné obory by mohly být prezentovány více v souladu s psychologickými poznatky o učení, paměti, ale také udržení zájmu žáků (Johnstone, 2010). Důležitý je samozřejmě smysl aktivit, kdy by cílem nemělo být jen pamětné učení, nýbrž i vytváření hodnot, postojů, rozvíjení kompetencí a celého spektra dovedností skrze vzdělávací obsah (MŠMT, 2020). Takto lze pohlížet i na odborná témata, jejich zařazení tedy nemusí být nutně nevhodící se. Pokud bude využito se smysluplným cílem a adekvátně s ohledem na věk či schopnosti žáků, nemusíme již hovořit o nevhodném odborném tématu ve výuce.

Změny ve vzdělávání jsou samozřejmě závislé na státní vzdělávací politice ale také na schopnostech a kompetencích jednotlivých pedagogů (MŠMT, 2020). Doba, v níž se nyní vzdělávají další generace, se velmi proměnila a bude se měnit i nadále. Cílem vzdělávání by i dle Strategie 2030+ do budoucna mělo být mnohem více, než bylo doposud, a to získávat a rozvíjet kompetence, orientovat se v novodobém světě, vhodně využívat technologie, informace, nikoli tedy jen a pouze vzdělávací obsah (MŠMT, 2021). I v současnosti hlavní kurikulární dokumenty, tzn. rámcové vzdělávací programy (RVP) směřují tímto směrem. Učivo na úrovni RVP pro základní vzdělávání (RVP ZV) je jen doporučené a množství i formulace výstupů v jednotlivých vzdělávacích oborech pedagogové příliš nesvazuje, spíše naopak. Svazující může být pak nevhodně sestavený školní vzdělávací program (ŠVP), který by z RVP měl vycházet, ale jeho podoba je čistě v gesci školy a ideálně všech pedagogů, poté se již jedná o záležitost konkrétní školy (MŠMT, 2021).

Téma, které nabízí tato diplomová práce, by mohlo být v určité podobě součástí výuky chemie či obecně oborů vzdělávací oblasti Člověk a příroda, eventuálně také vzdělávací oblasti Člověk a zdraví (MŠMT, 2021). Klíčové ovšem je, jakým způsobem a s jakým cílem je takové téma pojato. Pro zařazení do výuky chemie na základní škole je možné vycházet z teoretických základů této práce, výuka tak může být více výživově a zdravotně motivována. Výuka navíc v tomto směru poskytuje vhodné podmínky pro uplatňování mezipředmětových vazeb (Hudecová, 2004), a to s ohledem na možné využití v rámci celé řady očekávaných výstupů nejen v chemii (např. v rámci chemie a společnost), ale také výchově ke zdraví (ve smyslu zdravého způsobu života a péče o zdraví), případně v rámci přírodopisu na příkladu biologie člověka (MŠMT, 2021).

Na středoškolské úrovni by již bylo možné otevřít téma i s ohledem na svou skutečně „odbornou“ část z hlediska proteomiky jako vědy, jež je možné uplatnit při zjišťování pravosti potravin. Teoretické seznámení žáků s využívanými metodami a cíli jejich používání v analýze by mohlo předcházet například také exkurzi na pracoviště, kde jsou příslušnou přístrojovou technikou vybaveni. Exkurze mohou být velmi vhodnou organizační formou výuky (Skalková, 1999), Petty (2013) uvádí, že exkurze jsou velice důležité z hlediska budování vztahů mezi učitelem a žáky a zároveň je to forma výuky, z níž si žáci obvykle odnáší více než jen zapamatované vědomosti. Skalková (1999) též uvádí, že se

exkurzemi podporuje větší názornost a prohlubují se znalosti ve všech oblastech (tj. vědomosti, dovednosti, hodnoty a postoje). Pokud je exkurze vhodně naplánovaná, může žáky motivovat i uvědomění si souvislostí daného tématu s reálným světem (Petty, 2013).

Bez ohledu na typ zařazovaného tématu a jeho zvolené formy ve výuce, je velmi klíčová práce s novými pojmy. Nových pojmů na vyučovací jednotku nemůže být velké množství, výuka pak pozbývá efektivity i celkového smyslu (Cowan, 2001; Miller, 1956). Chemie navíc sama o sobě bojuje s fenoménem, který do jisté míry představují i cizí jazyky, v rámci oboru chemie se od samého začátku žáci setkávají s velkým množstvím pojmů, které jsou nezbytně nutné pro ovládnutí „chemického jazyka“ (Mönch & Markic, 2022). Je třeba jednotlivé pojmy a „slovíčka“ zařazovat vhodně a postupně, zasazovat vhodně do kontextu a ctít minimálně tzv. Millerovo magické číslo, které pracuje se 7 ± 2 novými pojmy v rámci vyučovací jednotky (Miller, 1956). Nicméně žáci nepřijímají jen pojmy, ale zpravidla s nimi musí nějak pracovat a tyto myšlenkové operace rovněž kapacitu pracovní paměti z části zabírají, proto například Cowan (2001) uvádí jen čtyři nové pojmy na vyučovací jednotku. Pedagog by tak měl vhodně vybírat nejen téma, ale i pojmy, respektive jejich postupné využívání ve vyučovacích jednotkách tak, aby „neplýval“ kapacitou pracovní paměti žáků na zbytečné pojmy, čímž by na ty klíčové ona kapacita již nemusela zbývat.

V kontextu tématu této diplomové práce, jak bylo zmíněno i výše – pro chemii na základní škole, není stěžejní detailně představit proteomické postupy jako přístupy, které jsou vhodné při možné autentizaci potravin, ale spíše zvolit cestu seznámení s tím, že existují proteiny, co to je, proč jsou důležité z výživového nebo zdravotního hlediska. S ohledem na povahu třídního kolektivu je ale určitě možné se zaměřit i na oblast ověřování pravosti potravin s přesahem do vzdělávací oblasti Člověk a jeho svět, například se zaměřením na ochranu spotřebitele a prolnout to s běžným životem kolem nás (MŠMT, 2020; MŠMT, 2021).

Na gymnaziální, respektive středoškolské úrovni, je téma samozřejmě možné lehce rozšířit, přesto by se ale stále měl pedagog držet onoho množství nových pojmů na vyučovací jednotku (Cowan, 2001; Miller, 1956), a to i když se jedná již o starší žáky. Stále je vhodné se zaměřovat více na každodenní věci než zacházet do přílišných složitostí, aby žáci nebyli od studia chemie předčasně odrazeni její složitostí (Chalupa & Nesměrák, 2014). Větší význam zařazovat takové téma do hloubky má tedy například až u žáků, kteří by se chtěli

chemií či obecně přírodním vědám věnovat. Mohou to být například žáci, kteří navštěvují výběrový seminář s chemickým zaměřením. Těmto žákům by se takovým tématem mohlo otevřít větší povědomí o tom, co všechno se v rámci chemie dá studovat.

Odborná témata jsou zcela jistě výzvou pro každý obor, pokud se ale zvolí jeho vhodná didaktická transformace (Shulman, 1986), je možné ho ve své podstatě předat i těm nejmladším žákům. Důležité je uvědomění si jeho obtížnosti vůči věku, zájmu ale i s ohledem na schopnosti žáků a podle toho s daným tématem a žáky pracovat. Hlavní záležitostí by však měl být cíl zvolené aktivity a v ideálním případě, aby cíle nebyly jen kognitivní, ale rovněž afektivní a psychomotorické. Zvolená forma či metoda výuky je pak již závislá na konkrétních výchovně-vzdělávacích cílech.

Odborné téma je také možné rozvíjet v rámci neformálního, konkrétně spíše zájmového vzdělávání žáků například skrze přírodovědně orientované kroužky, tábory či další akce nabízené a pořádané skrze nejrůznější organizace poskytující volnočasové aktivity (např. DDM hl. m. Prahy, 2024). Možností, jak s takovým tématem ve svém plném rozsahu seznámit žáka, je například spolupráce vysokých škol, disponující tímto vybavením, se středními školami. Žáci, kteří by jevíli o tuto problematiku zájem, by si mohli práci sami vyzkoušet a účastnit se projektů, jako je např. Středoškolská odborná činnost, Otevřená věda a další (AV ČR, 2024; NPI, 2024). Tyto projekty do určité míry otevírají zájemcům dveře do světa vědy, případně na půdu vysoké školy, kam toto téma v celém svém rozsahu (tj. z hlediska své odbornosti) bez pochyby patří mnohem více.

2 Experimentální část

Následující kapitola se věnuje celkovému popisu experimentální části této diplomové práce s ohledem na všechny laboratorní činnosti, které byly realizovány v Laboratoři aplikované proteomiky na Ústavu biochemie a mikrobiologie (VŠCHT Praha). Na tomto pracovišti byla uskutečněna komplexní práce navazující na již proběhlou experimentální činnost v rámci zpracovávání bakalářské práce autorky (Kadeřábková, 2022), kde bylo cílem od sebe vybrané skořápkové plody proteomicky odlišit.

Mezi hlavní cíle této diplomové práce patří zjistit, jaké jsou unikátní hodnoty m/z pro pečené varianty již dříve rozlišených skořápkových plodů, s potenciální možností rozšířit databázi charakteristických hodnot m/z , případně i identifikovat rozdíly mezi oběma variantami. Následně je cílem ověřit možnost autentizace reálných potravinářských produktů (vánočního cukroví) na základě aplikace shodného postupu jako u plodů samotných se snahou zjistit, zda je touto cestou možná identifikace skořápkových plodů. Cílem je rovněž porovnat data dvou hmotnostně spektrometrických technik (MALDI-TOF MS vs. LC-ESI-Q-TOF MS).

Experimentální práce zahrnovala jako v předchozí práci autorky (Kadeřábková, 2022) obdobný sled kroků, a sice přípravu a zpracování referenčních materiálů, přípravu vzorků, vážení, přípravu potřebných roztoků. Dále štěpení vzorků pomocí enzymu trypsinu, přečištění vzorků, přípravu na měření a vlastní měření. Po měření samozřejmě následovalo softwarové zpracování výsledných dat a jejich vyhodnocení.

2.1 Použité chemikálie a vybavení

Pro průběh experimentální práce byly využity níže uvedené chemikálie a zásobní roztoky, stejně tak je uvedeno využití vybavení.

Chemikálie a zásobní roztoky

- Acetonitril; ACN (Sigma – Aldrich)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina; DHB (Sigma – Aldrich)
- Destilovaná voda; H₂O
- Hydrogenuhličitan amonný; NH₄HCO₃ (Fluka)
- Kyselina mravenčí; HCOOH (Penta Chemicals)

- Kyselina trifluoroctová; TFA (Sigma – Aldrich)
- Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics)
- Trypsin; lyofilizát (Sigma – Aldrich)

Konkrétní využití chemikálií a zásobních roztoků je uvedeno v následujících kapitolách, zejména pak v kapitole 2.2 Příprava pracovních roztoků.

Vybavení

- Analytické váhy ABT 120-5DM (Kern)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF MS – Autoflex Speed (Bruker Daltonics)
- Kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 RSLC nano (Dionex) sdružený s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonic)
- Laboratorní váhy (A&D Instruments Ltd.)
- Vortexovací zařízení WIZARD Advanced IR Vortex Mixer (VELP Scientifica cont. Sencor)
- Zip-Tip mikrokolony (špičky) obsahující reversní fázi C₁₈[®] (Millipore Corporation)

2.2 Příprava pracovních roztoků

Příprava roztoku trypsinu ke štěpení

Enzym trypsin, který byl využit ke štěpení proteinů ve všech analyzovaných vzorcích, byl připraven následujícím způsobem: lyofilizát trypsinu smíchaný s trypsin buffer (pufrem) dává vzniknout trypsinu o koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Takto koncentrovaný trypsin byl dále zředěn 50mM NH_4HCO_3 v objemovém poměru 1:50, přičemž vzniklý roztok trypsinu má koncentraci 0,02 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Příprava roztoků určených pro přečišťování

Přečišťování je dalším důležitým krokem po štěpení vzorků enzymem trypsinem, v rámci tohoto postupu se využívají tzv. ZipTip špičky, kdy dochází k přečištění na reversní fázi. Pro přečištění jsou využívány tři základní pracovní roztoky, a to aktivační neboli vlhčící roztok (wetting solution – W), ekvilibrační neboli stabilizační roztok (equilibration solution – Eq) a vymývací neboli eluční roztok (elution solution – El). Vznik homogenních roztoků byl

dokončen díky využití vortexovacího zařízení WIZARD Advanced IR Vortex Mixer. Všechny pracovní roztoky určené k přečišťování byly využívány opakovaně (kapitola 2.6 Přečištění pomocí reversní fáze).

Konkrétní příprava roztoků:

- **Aktivační roztok (W)** byl připraven jako 100% acetonitril.
- **Stabilizační roztok (Eq)** byl připraven jako 0,2% roztok kyseliny trifluoroctové.
- **Vymývací roztok (El)** byl připraven jako roztok čistého acetonitrilu a ekvilibračního roztoku v objemovém poměru 1:1. Případně jej lze připravit jako 100% ACN; H₂O; 10% TFA v objemovém poměru 50:49:1.

Příprava roztoku matrice

V následujícím kroku, tj. v kroku po přečištění a zakoncentrování peptidů na reversní fázi byla pro část vzorků, jež byla měřena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS, připravena matrice. Roztok matrice se následně míchá v konkrétním poměru se vzorky tak, aby došlo k vykrytalizování peptidů ve vzorku spolu s matricí. Matrice byla připravena následovně: na laboratorních vahách bylo odváženo 8,5±0,5 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB). K tomuto množství bylo přidáno 150 µl 100% acetonitrilu, 345 µl destilované vody a 5 µl 10% kyseliny trifluoroctové. Využití této matrice obsahující DHB bylo zvoleno na základě již provedené práce (Kadeřábková, 2022), ale také na základě vlastnosti samotné DHB, kdy vykazuje vysokou odolnost vůči případnému znečištění.

Pracovní roztoky pro LC-ESI-Q-TOF MS

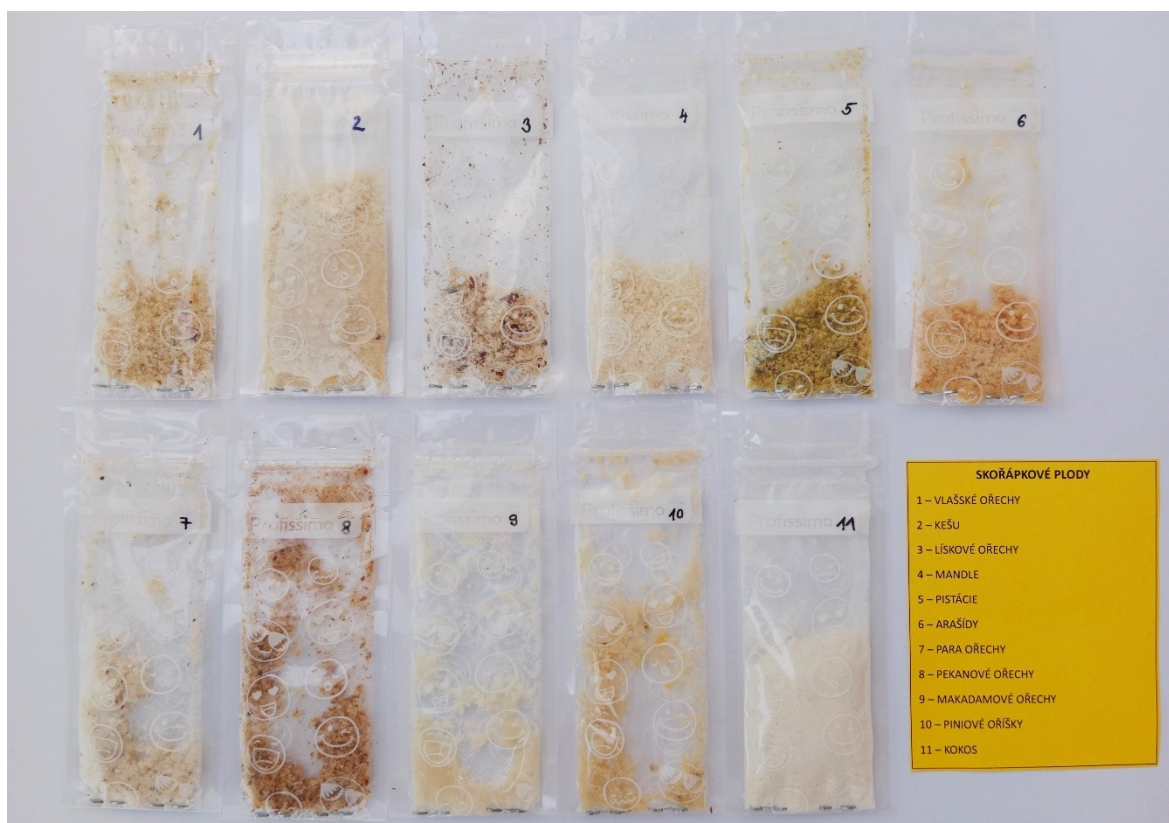
- Roztok pro resuspendaci: H₂O; ACN; HCOOH v objemovém poměru 96,9:3:0,1
- Mobilní fáze A: 0,1% roztok HCOOH v H₂O
- Mobilní fáze B: 0,1% roztok HCOOH v ACN

2.3 Referenční materiály

Tepelně neošetřené vzorky skořápkových plodů

Pro analýzu byly v první fázi využity stejné referenční materiály jako při rozlišovací analýze skořápkových plodů v mé bakalářské práci (Kadeřábková, 2022). Jednalo se o jedenáct typů

skořápkových plodů (arašídy, kešu ořechy, kokos, lískové ořechy, makadamové ořechy, mandle, para ořechy, pekanové ořechy, pinové ořechy, pistácie a vlašské ořechy) v jemně mleté podobě (obr. 3). Téměř všechny plody byly zakoupeny jako jádra (Mixit.cz) a ručně namlety pomocí kuchyňského mlýnku, vyjma kokosu, jež byl zakoupen přímo jako mletá kokosová dřev (Nature's Promise, Albert). Vzorky byly v mezidobí jednotlivých experimentálních činností uchovány v uzavřených sáčcích v mrazáku (při teplotě -18 °C).



Obrázek 3: Mleté skořápkové plody v neupečeném stavu (původní); číselné označení odpovídá následovně: 1: vlašské ořechy, 2: kešu ořechy, 3: lískové ořechy, 4: mandle, 5: pistácie, 6: arašídy, 7: para ořechy, 8: pekanové ořechy, 9: makadamové ořechy, 10: piniové ořechy, 11: kokos (foto: archiv autorky).

Tepelně ošetřené vzorky skořápkových plodů

Pro druhou fázi laboratorní práce byly připraveny skořápkové plody po vystavení teplot, kdy byly simulovány podmínky jako při pečení pečiva, sušenek či cukroví. Od každého druhu skořápkového plodu bylo odebráno množství cca jedné čajové lžičky a zabaleno do alobalu. Toto množství původního materiálu bylo vloženo na pečící plech a pečeno v horkovzdušné troubě na 180 °C po dobu 10 minut. Po vyndání z trouby a vychladnutí byly upečené plody

převedeny do nových zip sáčků (obr. 4). Připravené upečené vzorky byly rovněž před samotnou analýzou uchovány v mrazáku při -18 °C.

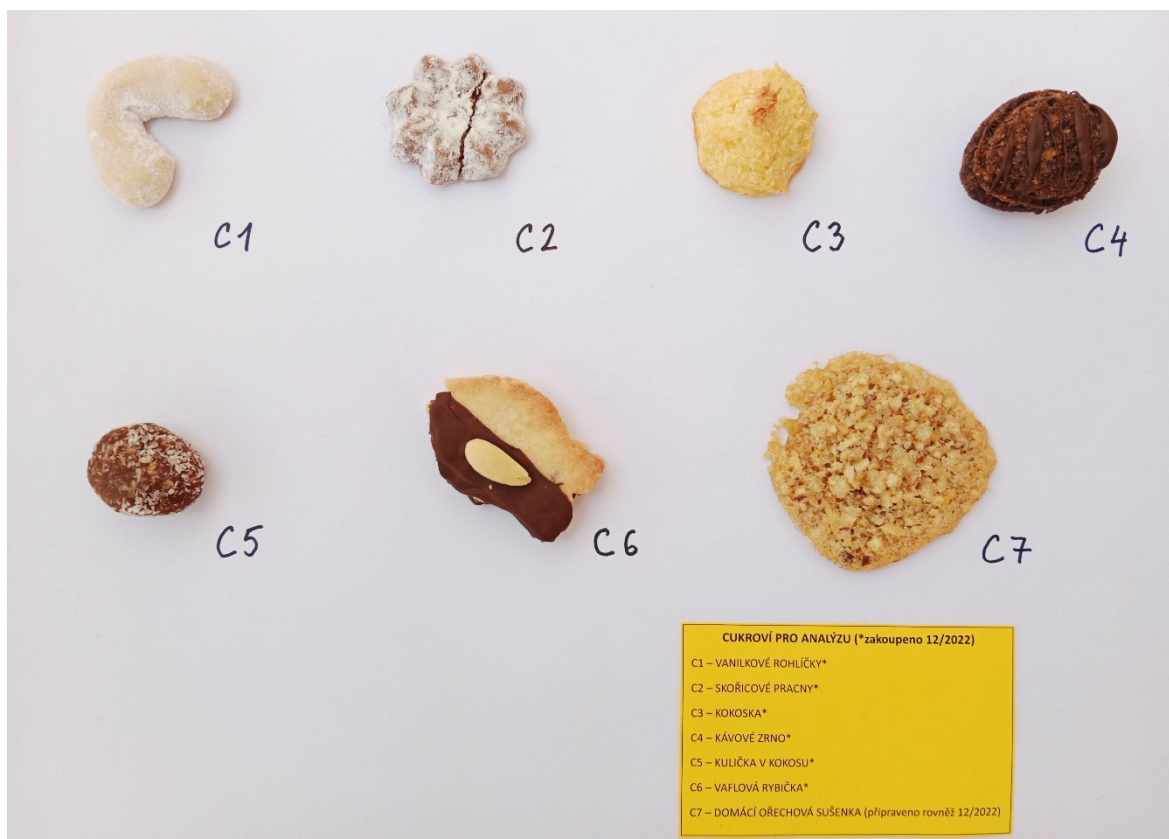


Obrázek 4: Mleté skořápkové plody po upečení (čas: 10 min; na 180 °C; v alobalu); označení je následující: 1T: vlašské ořechy, 2T: kešu ořechy, 3T: lískové ořechy, 4T: mandle, 5T: pistácie, 6T: arašidy, 7T: para ořechy, 8T: pekanové ořechy, 9T: makadamové ořechy, 10T: piniové ořechy, 11T: kokos (foto: archiv autorky).

Reálné vzorky vánočního cukroví

Pro třetí fázi experimentální části byly připraveny vzorky potravin obsahující skořápkové plody tak, jak jsou běžně konzumovány. Pro tyto účely a s ohledem na velikost bylo zvoleno pro analýzu vánočního cukroví. Cukroví (obr. 5) bylo zakoupeno v prodejně pekárna Kabát (výrobce: Pekárna Kabát s. r. o.) a za účelem analýzy bylo využito celkem šest druhů zakoupeného pečiva (vanilkové rohlíčky, skořicové pracky, kokoska, kávové zrno, kulička v kokosu, vaflové rybičky) a jeden vzorek byl připraven jako domácí „neznámý“ vzorek (ořechová sušenka obsahující vlašské ořechy, krystalový cukr a vejce; poměry na dávku: 100 g ořechů, 100 g cukru a jedno vejce). Složení „neznámého“ vzorku bylo sděleno až po určení jeho ořechového složení. Složení cukroví, které uvádí výrobce, je k dispozici jako

tabulkový přehled v rámci příloh této práce (Příloha č. 1). Samozřejmě i vzorky cukroví byly uchovány před zahájením experimentální práce v mrazáku, taktéž při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 5: Analyzované vánoční cukroví; označeno následujícím způsobem: C1: vanilkový rohlíček, C2: skořicová pracna, C3: kokoska, C4: kávové zrno, C5: kulička v kokosu, C6: vaflová rybička, C7: „neznámá“ domácí ořechová sušenka (foto: archiv autorky).

2.4 Vážení vzorků

Jednotlivé vzorky původních i pečených druhů skořápkových plodů byly váženy na analytických vahách. Výše navážky byla ponechána stejná jako tomu bylo v experimentální části mé bakalářské práce, tzn. $0,25 \pm 0,05$ mg (Kadeřábková, 2022). Nepečené plody byly odváženy vždy dvakrát (tab. 12), čímž mělo být doplněno dřívější měření, celkově vzorky nepečených plodů byly připraveny ve třech technických opakováních. Pečené plody pak byly odvažovány po každé třikrát (tab. 13), aby byl vytvořen adekvátní počet měření k měřením nepečených plodů. Samostatné plody byly tedy připraveny v počtech 22 vzorků nepečených plodů (tab. 12) a 33 vzorků upečených skořápkových plodů (tab. 13).

Tabulka 12: Navážky nepečených skořápkových plodů (uvedeno v mg na každý vzorek).

Označení – název plodu	Vzorek (a)	Vzorek (b)
1 – vlašské ořechy	0,27 [†]	0,20 [†]
2 – kešu ořechy	0,30 [†]	0,21 [†]
3 – lískové ořechy	0,24 [†]	0,26 [†]
4 – mandle	0,30 [†]	0,23 [†]
5 – pistácie	0,20 [†]	0,22 [†]
6 – arašídy	0,29 [†]	0,30 [†]
7 – para ořechy	0,25 [†]	0,27 [†]
8 – pekanové ořechy	0,21 [†]	0,29 [†]
9 – makadamové ořechy	0,30 [†]	0,22 [†]
10 – piniové oříšky	0,20 [†]	0,23 [†]
11 – kokos	0,29 [†]	0,20 [†]

[†] Takto označené navážky vzorků byly připraveny pouze na měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS, z technických důvodů ale měření nebylo dokončeno.

Tabulka 13: Navážky pečených skořápkových plodů (uvedeno v mg na každý vzorek).

Označení – název plodu	Vzorek (a)	Vzorek (b)	Vzorek (c)
1T – vlašské ořechy	0,30 [†]	0,20 [†]	0,26 [†]
2T – kešu ořechy	0,24 [†]	0,29 [†]	0,26 [†]
3T – lískové ořechy	0,29 [†]	0,28 [†]	0,30 [†]
4T – mandle	0,29 [†]	0,21 [†]	0,22 [†]
5T – pistácie	0,25 [†]	0,21 [†]	0,21 [†]
6T – arašídy	0,28 [†]	0,29 [†]	0,30 [†]
7T – para ořechy	0,27 [†]	0,23 [†]	0,29 [†]
8T – pekanové ořechy	0,28 [†]	0,24 [†]	0,25 [†]
9T – makadamové ořechy	0,26 [†]	0,27 [†]	0,30 [†]
10T – piniové oříšky	0,25 [†]	0,30 [†]	0,30 [†]
11T – kokos	0,29 [†]	0,28 [†]	0,26 [†]

[†] Takto označené navážky vzorků byly připraveny na obě techniky měření, nicméně z technických důvodů nebyly změřeny pomocí LC-ESI-Q-TOF MS, tzn., že byly podrobeny jen analýze za pomoci MALDI-TOF MS.

Navážka vánočního pečiva byla oproti referenčním vzorkům skořápkových plodů zvýšena. Rozhodnutí o úpravě vychází ze zcela přirozených důvodů, kterými jsou nižší podíl skořápkových plodů ve vzorku, přítomnost mouky a dalších ingrediencí. Navážka byla stanovena na $1,5 \pm 0,5$ mg a každý vzorek cukroví byl odvažován dvakrát (tab. 14).

Tabulka 14: Navážky vánočního cukroví (uvedeno v mg na každý vzorek).

Označení – název cukroví	Vzorek (a)	Vzorek (b)
C1 – vanilkové rohlíčky	1,15	1,93
C2 – skořicové pracny	1,99	1,87
C3 – kokoska	1,69	1,86
C4 – kávové zrno	1,24	1,72
C5A – kulička v kokosu (těsto)	1,25	1,39
C5B – kulička v kokosu (těsto s obalením)	1,64	2,00
C6 – vaflové rybičky	1,94	1,88
C7 – domácí ořechová sušenka (neznámá)	1,98	1,41

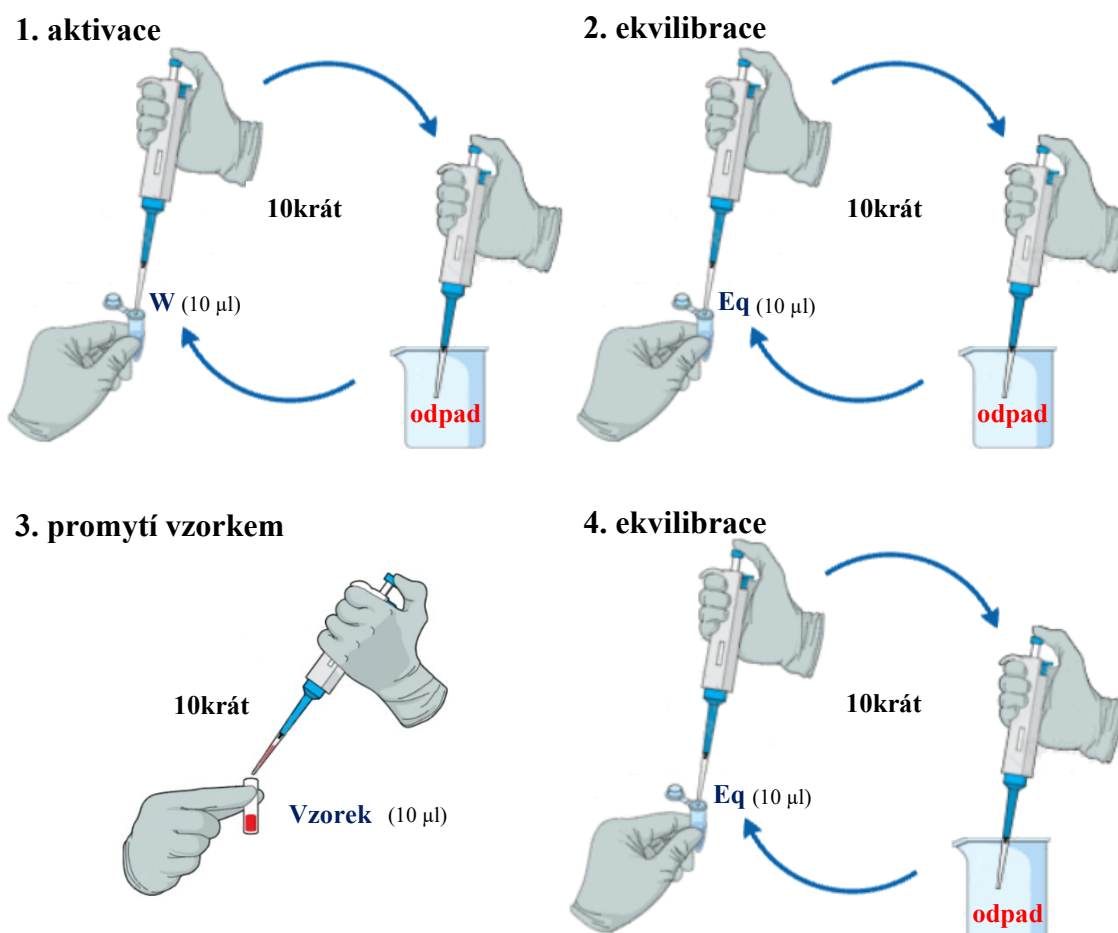
2.5 Enzymatické štěpení vzorků

Veškeré připravené vzorky (tj. nepečené i pečené skořápkové plody a cukroví) byly přidány do mikrozkušavek a přichystány na štěpení. Enzymatické štěpení spočívalo v přidání zředěného pracovního roztoku trypsinu (viz kapitola 2.2 Příprava pracovních roztoků). Ke vzorkům samostatných plodů (ať pečených, tak nepečených) bylo přidáno 10 μl roztoku trypsinu o koncentraci $0,02 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ke vzorkům pečiva (cukroví) bylo přidáno 15 μl pracovního roztoku trypsinu (o koncentraci $0,02 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Důvodem zvýšení objemu přidávaného roztoku trypsinu je navýšená navážka těchto vzorků ($1,5 \pm 0,5$ mg) a povaha vzorků, u kterých se očekávalo, že část roztoku absorbují. Dalším důvodem bylo vyšší zastoupení proteinů, respektive peptidů pocházející například z mouky nebo vajec. U všech vzorků platí, že byly podrobeny 4hodinovému štěpení (v uzavřených mikrozkušavkách) za laboratorních podmínek. Po čtyřech hodinách bylo štěpení zastaveno přidáním 1 μl 10% roztoku TFA u každého vzorku.

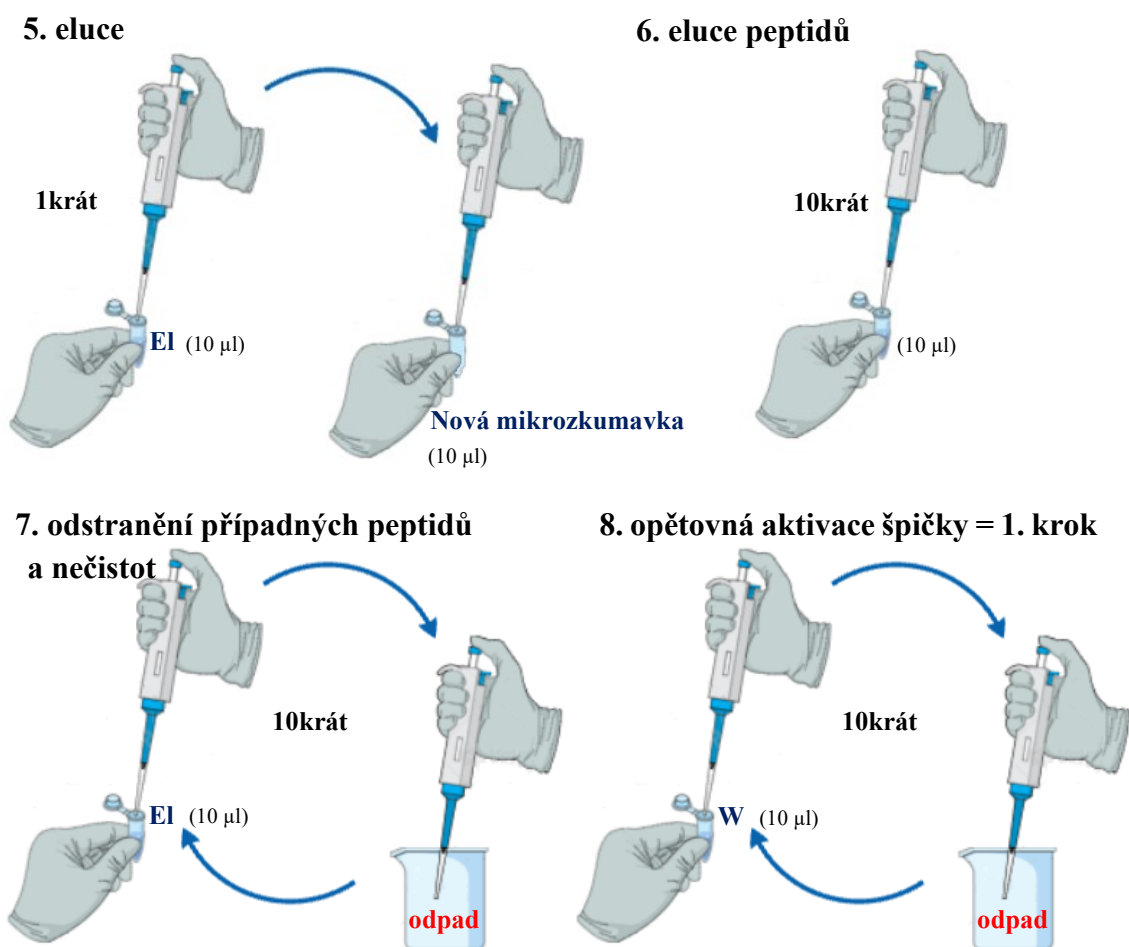
2.6 Přečištění pomocí reversní fáze

K přečišťování vzorků byla využívána specifická špička (nesoucí komerční název ZipTip C₁₈[®] od spol. Millipore Corporation). Tato špička, respektive mikrokolona, se nasadí na klasickou automatickou mikropipetu o odpovídajícím objemu a využívá se tak k přečištění vzorků. Přečišťování funguje na principu rozdělovací chromatografie s reversní fází, kdy stacionární fází představuje nepolární část mikrokolony obsahující uhlovodíkové řetězce C₁₈. Za účelem přečištění jsou využívány tři roztoky (aktivační – W, ekvilibrační – Eq, eluční – El), jejichž příprava je uvedena v kapitole 2.2 Příprava pracovních roztoků.

Pracovní postup je schematicky znázorněn na následujících obrázcích (obr. 6 a 7).



Obrázek 6: Schématické znázornění postupu přečištění – 1. část; W = aktivační roztok, Eq = ekvilibrační roztok (vytvořeno pomocí online softwaru Mind the Graph, 2023).



Obrázek 7: Schématické znázornění postupu přečištění – 2. část; El = eluční roztok, W = aktivační roztok (vytvořeno pomocí online softwaru Mind the Graph, 2023).

Na obr. 6 je patrná první část postupu, která zahrnuje opakované promytí ZipTip špičky aktivačním roztokem o objemu 10 µl. Poté byla provedena rovněž opakovaná ekvilibrace, respektive stabilizace ekvilibračním roztokem (objem 10 µl). Ve třetím kroku byla špička promývána opakovaně vzorkem (objem 10 µl), význam této fáze tkví v zachycení naštěpených peptidů na reversní fázi. Vzápětí je opět opakován krok ekvilibrace (objem 10 µl), jejíž účel je odsolení a odstranění polárních nečistot, které mohou být zachyceny na fázi. Další kroky postupu jsou znázorněny na obr. 7, kdy následující klíčový krok (krok č. 5) zahrnuje nasátí elučního roztoku a eluci peptidů do čisté mikrozumavky (objem 10 µl). Důležitým dalším krokem je opakované nasávání a vypouštění eluovaných peptidů v mikrozumavce, kdy je cílem přerušit hydrofobní vazby a uvolnit co možná největší množství peptidů z reversní fáze. Nakonec je potřeba špičku zbavit nečistot

a případně zbývajících peptidů pro možnost dalšího použití, eluční roztok byl využit pro vymytí špičky opakovaně (desetkrát objem 10 μ l). Špička v takovém stavu může být opět využita. Dalším krokem je opakované vymývání vlhčícím roztokem a celý cyklus postupu se může opakovat stejným způsobem pro nový vzorek.

Tímto způsobem popsáný postup přečišťování byl proveden u všech 71 vzorků. Takto přečištěné vzorky byly uchovány v mrazáku (-18 °C) po dobu dvou dnů, kdy bylo zahájeno měření. Další manipulace se vzorky probíhala až těsně před měřením. Nepečené vzorky byly odesílány pouze na měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS. Měření nepečených vzorků skořápkových plodů za pomoci MALDI-TOF MS bylo provedeno a následně vyhodnoceno v rámci bakalářské práce, na níž je touto prací navazováno (Kadeřábková, 2022). Proto byly tyto vzorky v celém svém objemu ponechány vysušit pod archem čistého papíru. Ostatní vzorky (tj. tři série pečených vzorků skořápkových plodů a dvě série vzorků vánočního pečiva) měly být měřeny dvojím způsobem, v prvním případě MALDI-TOF MS, kdy pro toto měření byl vždy odebrán alikvotní podíl o objemu 2 μ l přečištěného vzorku. A v druhém případě se jednalo o odeslání na měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS, pro něhož zůstalo zbývajících 8 μ l a taktéž bylo ponecháno sušit pod čistým listem papíru.

2.7 Provedení měření za pomoci MALDI-TOF MS

Před měřením

Připravené přečištěné a zakoncentrované vzorky obsahující peptidy (10 μ l) byly rozděleny na měření pomocí jednotlivých přístrojových technik (viz kapitola 2.6 Přečištění pomocí reversní fáze). Před měřením na MALDI-TOF MS byl každý přečištěný vzorek smíchán s matricí v poměru 1:3, což je poměr experimentálně stanovený a ověřený již v mé předchozí práci (Kadeřábková, 2022). Vždy 2 μ l purifikovaného vzorku byly smíchány se 6 μ l čerstvě připraveným roztokem matrice obsahující 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (viz kapitola 2.2 Příprava pracovních roztoků).

Smíchaný alikvotní podíl přečištěného vzorku a roztoku matrice byl pomocí vortexovacího zařízení na nižší otáčky promíchán. V dalším kroku byla směs obsažená v každé mikrozkušavce pipetována na speciální nerezový nosič typu *MTP 384 target plate polished*

steel, určený především pro analýzu vzorků rozpuštěných v organických rozpouštědlech (Bruker, 2023). Pro všechny vzorky platí, že byly rozpipetovány do pěti spotů, na spot bylo pipetováno vždy 1,5 μ l připravené směsi. Na každou mikroskopickou desku tím pádem připadalo pět rovnocenných spotů, přičemž jeden plod měl vždy zastoupení po třech mikroskopických a stejný druh pečiva zastoupení po dvou mikroskopických. Od každého druhu plodu bylo připraveno na měření celkem po patnácti spotech, od každého vzorku vánočního pečiva bylo připraveno po deseti spotech. Vzápětí nanášení směsí vzorků a matričního roztoku na nosič byly veškeré nanesené spoty ponechány schnout po dobu cca 45 minut. V konečném počtu bylo připraveno celkem tedy 245 spotů a z každého spotu bylo následně získáno hmotnostní spektrum.

Před samotným měřením byly připraveny spoty určené pro prvotní ale i průběžné kalibrace stroje. Standardy pro měření byly připraveny jako směs Peptide Calibration Standard II (směs standardních peptidů o známé hodnotě m/z) a čerstvě připraveného matričního roztoku v poměru 1:5. Na ocelový nosič bylo nanášeno desetkrát po 1 μ l připraveného standardu, tzn. vzniklo celkem šest spotů určených pro kalibraci (v případě měření spotů připadající na pečené skořápkové plody). Vzorky cukroví byly měřeny s časovým odstupem, rovněž i při jejich měření byly obdobně připraveny spoty určené pro jednotlivé kalibrace.

Samotné měření (MALDI-TOF MS)

Nerezový nosič byl po nanášení všech spotů vložen do zařízení MALDI-TOF MS Autoflex Speed od společnosti Bruker Daltonics. Měření bylo možné zahájit po vytvoření potřebných podmínek uvnitř hmotnostního spektrometru (zejména tvorba vakua v letové trubici MALDI-TOF). Následně byla zvolena metoda měření RP_900–4500_Da_2022, což odpovídá reflektorovému pozitivnímu módu a rozsahu měření 900–4500 m/z . Po přípravě zařízení bylo možné přistoupit k prvotní kalibraci a zahájit měření připravených spotů, pravidelná kalibrace byla prováděna opakovaně vždy po cca 28 měřeních.

Realizované měření probíhalo v pozitivním reflektorovém módu s využitím laseru o vlnové délce 355 nm. Data, lépe řečeno příslušná hmotnostní spektra, byla získávána postupným sběrem jednotlivých pulsů (shotů) laseru. U naprosté většiny vzorků bylo spektrum vytvořeno jako suma odpovídající 5000 laserových pulsů. Výjimku tvoří kešu ořechy (plod

č. 2), kdy byla spektra získávána jako suma 10 000 laserových pulsů. Dále pak jsou výjimkou makadamové ořechy (plod č. 9) a lískové ořechy (plod č. 3), kdy byla spektra získávána jako suma 20 000 laserových pulsů, toto rozhodnutí bylo učiněno z povahy získávaných spekter odpovídající 5000 pulsů, poněvadž poskytovaly méně výrazné píky a vyšší intenzity šumu. Vyšší počet laserových pulsů umožnil získat v těchto případech kvalitnější spektra pro další hodnocení.

2.8 Provedení měření za pomoci LC-ESI-Q-TOF MS

Jak bylo zmíněno dříve v kapitole 2.6, tak eluovaný objem obsahující přečištěný obsah s naštěpenými peptidy odpovídajícího vzorku byl v případě nepečených vzorků skořápkových plodů ponechán rovnou sušit, u ostatních vzorků bylo vždy 8 μ l koncentrovaného eluátu ponecháno sušit za dalším účelem analýzy pomocí LC-ESI-Q-TOF. Vysušený eluát byl ponechán v mrazáku až do doby možného měření touto metodou. Později byly jednotlivé vzorky resuspendovány a podrobeny analýze LC-ESI-Q-TOF MS.

Následkem technických problémů se nepodařilo měření u všech skořápkových plodů provést, a tedy tato data nyní k dispozici nejsou, což je již uvedeno u navázek, kterých se to týká. Podařilo se získat jen data z měření vzorků vánočního cukroví, za což patří mé poděkování panu Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D.

Výsledná hmotnostní spektra byla získána za pomoci metody kapalinové chromatografie Dionex Ultimate 3000 RSLC nano (Dionex) ve spojení s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonic). Vysušené vzorky byly před samotnou realizací měření rozpuštěny v 10 μ l rozpouštědla zahrnující vodu, acetonitril a kyselinu mravenčí v objemovém poměru 96,9:3:0,1. Objem nástřiku při analýze činil 1 μ l a byly využity dva druhy mobilní fáze, a sice mobilní fáze A tvořena 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a mobilní fáze B tvořena 0,1% kyselinou mravenčí v acetonitrilu. V první řadě byly jednotlivé vzorky nanášeny na zachytávací kolonu Acclaim PepMap 100 C₁₈ (100 μ m \times 2 cm, Dionex) s průtokem 5 μ l/min fáze A v délce trvání 10 minut. Peptidy byly eluovány za pomoci chromatografické kolony Acceraling PepMap RSLC C₁₈ (75 μ m \times 150 mm, Dionex) s využitím mobilní fáze B za následujícího gradientu:

0–10 minut 3% B, 10–40 minut 3–35% B, 42 minut 90% B, 55 minut 3% B, 55–65 minut 3% B. Peptidy byly eluovány přímo k ESI zdroji Captive Spray (Bruker Daltonics). Měření byla prováděna v Data-dependent analysis módu a pro následný výběr prekurzorů v rozsahu 400–1400 m/z . Hmotnostní spektra byla shromažďována v časovém intervalu každých 3 sekund, preferovaný náboj u prekurzorů byl stanoven na 2–5. Identifikované peptidy byly kolizí fragmentovány a na základě analýzy vzniklých fragmentů pomocí analyzátoru doby letu (TOF) byly zaznamenány jednotlivé odpovídající aminokyselinové sekvence v rozsahu 50–2200 m/z .

2.9 Softwarové zpracování a vyhodnocení získaných dat

Získaná data po provedeném měření na MALDI-TOF MS byla dále ručně hodnocena v softwaru mMass (verze programu 5.5.0). Program mMass umožňuje zobrazit každou sumu laserových pulsů pro dané měření v podobě sumárního spektra, s nímž je možné následně detailně pracovat v tomto softwarovém prostředí. Klíčové pro další hodnocení spekter je označení přítomných píků o konkrétní hodnotě m/z a intenzitě v daném spektru. Všechna naměřená spektra byla podrobena tomuto ručnímu vyhodnocení a získán z nich „balíček“ hodnot m/z , jež se v konkrétním spektru vyskytly (jedno sumární spektrum odpovídá jednomu spotu daného vzorku). Následně byly získané hodnoty pro všechna naměřená spektra přeneseny do prostředí MS Excel, kde byly tyto „balíčky“ hodnot m/z připraveny jako seznamy hodnot m/z pro každý skořápkový plod případně druh zkoumaného cukroví odděleně. Veškeré tyto seznamy hodnot m/z byly vkládány do systému PostgreSQL, což je databázový systém pracující v jazyce SQL, kdy tato zkratka značí užívání tzv. relačního databázového modelu při zpracovávání dat. Jednotlivé seznamy byly zpracovány v programu pgAdmin (verze programu databázového systému PostgreSQL 14.2) dle interního návodu pro nalezení unikátních hodnot m/z (Kirg & Kučková, 2022). Jednotlivé seznamy hodnot byly postupně vkládány do systému a následně porovnávány mezi sebou tak, aby byly získány unikátní hodnoty na základě stanovených kritérií, tzn. četnost přítomných hodnot, postupně byly získávány unikátní hodnoty vyskytující se minimálně v 10 z 15 až po hodnoty vyskytující se v 15 z 15 spekter (u nepečených plodů), přičemž při porovnávání hodnot v rámci seznamu a samozřejmě i napříč seznamy jednotlivých hodnot

byla stanovena tolerance $\pm 0,3$ m/z . Tato tolerance vychází z již zpracovávaných hodnot při hledání unikátních hodnot u nepečených, tzn. „syrových“ skořápkových plodů (Kadeřábková, 2022). Porovnání dat bylo provedeno nejen napříč pečenými plody, ale také byla zjišťována možnost identifikovatelnosti plodů, zda se jedná o plody vystavené teplotě či nikoliv, byly porovnávány tedy seznamy hodnot pečených a nepečených vzorků daného plodu mezi sebou, čímž by měla být podpořena možnost charakterizace plodu týkající se jeho tepelného zpracování. Obdobnému hodnocení byly podrobeny i seznamy vytipovaných hodnot m/z z naměřených spekter pro zkoumané cukroví obsahující skořápkové plody s tím rozdílem, že byly hledány vždy unikátní charakteristické hodnoty pouze v rámci daného druhu cukroví (tj. v rámci 10 naměřených spekter). Vyhledávány byly hodnoty postupně s minimálním výskytem 7 z 10 až po 10 z 10 hodnot v rámci naměřených spekter pro konkrétní druh cukroví. Pokud by bylo prováděno hodnocení napříč všemi druhy cukroví, pochopitelně by bylo značné množství vyskytujících hodnot odstraněno, jelikož některé druhy cukroví obsahují shodně konkrétní druh skořápkového plodu či plodů. Rovněž budou shodně obsahovat charakteristické hodnoty pro pšeničnou mouku, vejce či další společné ingredience. Získané charakteristické hodnoty pro naměřená spektra cukroví byly dále porovnávány s unikátními hodnotami pro pečené i nepečené plody a získávány tak informace ohledně možnosti identifikovat přítomnost deklarovaného plodu výrobcem či nikoliv.

Co se týče získaných dat z měření za pomoci LC-ESI-Q-TOF MS byly jednotlivé peaklisty extrahovány prostřednictvím softwaru DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) a nahrány do Proteinscape 4.2 (využívaného programu pro správu proteomických dat). Identifikace byla možná za pomoci Mascot serveru 2.4 (Matrix Science) a porovnávání bylo provedeno vůči rostlinné databázi proteinů, jež byla stažena z webové databáze <https://www.uniprot.org> (datum stažení a porovnávání vůči databázi: 15. 3. 2024). Výchozí tolerance pro přiřazování jednotlivých prekurzorů byla stanovena na 10 ppm a u fragmentů na 0,05 Da.

Identifikované přítomné peptidy ve vzorcích o známých hodnotách m/z s přiřazenými aminokyselinovými sekvencemi byly následně již „jen“ porovnávány vůči získaným hodnotám m/z z měření za pomoci MALDI-TOF MS v prostředí MS Excel, jelikož technickými problémy nebyla získána data pro referenční materiály, tj. pro jednotlivé druhy

skořápkových plodů, nebylo možné již provést obdobné vyhodnocení v prostředí objektově-relačního databázového systému PostgreSQL s možností identifikace daného druhu ve vzorcích vánočního cukroví na základě přítomnosti peptidů o známých aminokyselinových sekvencích.

3 Výsledky

Tato kapitola se věnuje výsledkům získaných z měření za pomoci MALDI-TOF MS a následně i výsledným datům z měření na LC-ESI-Q-TOF MS, a to v následujících samostatných podkapitolách (3.1 Výsledná data získaná z měření pomocí MALDI-TOF MS; 3.2 Výsledná data získaná z měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS). Poněvadž se nyní jedná o navazující práci, kdy v té předchozí byla schopnost od sebe rozlišit všech jedenáct zvolených skořápkových plodů pomocí MALDI-TOF MS již potvrzena (Kadeřábková, 2022), tak nynějším cílem bylo doplnit a porovnat „databázi“ unikátních hodnot m/z pro každý skořápkový plod nejen v syrovém ale také i v pečeném stavu. To vše s dalším cílem, a sice aplikovat stejný postup na analýzu reálných produktů a s pomocí zjištěných charakteristických hodnot m/z se pokusit identifikovat přítomnost deklarovaného skořápkového plodu, jak uvádí výrobce na etiketě. Druhá metoda (tj. měření za pomoci LC-ESI-Q-TOF MS) představuje náročnější metodu, co se týče obsluhy vybavení, potřebného času ale i následného vyhodnocování. Na druhou stranu by měla představovat citlivější metodu, u níž lze předpokládat, že významně a detailněji doplní data z MALDI-TOF MS. Původně bylo cílem obě techniky porovnat a pro účely identifikace plodů v reálných produktech (v tomto případě na vzorcích většinou kupovaného vánočního cukroví) zhodnotit úspěšnost jednotlivých využitých metod, což nakonec nemohlo být vlivem technických problémů spolehlivě učiněno.

3.1 Výsledná data získaná z měření pomocí MALDI-TOF MS

3.1.1 Peptidové markery pro skořápkové plody v syrovém a pečeném stavu

Pomocí MALDI-TOF MS byla získána hmotnostní spektra, která vyžadovala další hodnocení. Toto hodnocení spočívalo ve vyhledávání tzv. peptidových markerů, respektive unikátních hodnot m/z pro každý skořápkový plod ve svém pečeném stavu. V syrovém stavu jsou výsledky již známy, přičemž postup pro získávání charakteristických hodnot se nelišil od získávání těchto hodnot i pro plody v pečeném stavu (Kadeřábková, 2022). Postupně byly manuálně v programu mMass označovány píky v naměřených hmotnostních spektrech. Označeny byly všechny píky, jejichž intenzita signálu byla alespoň cca třikrát vyšší, než byla

intenzita šumu. Následně byly připravené hodnoty zpracovávány systémem PostgreSQL, jak již bylo uvedeno v kapitole 2.9 Softwarové zpracování a vyhodnocení získaných dat. Vyhledávání unikátních hodnot m/z bylo postavené na hledání specifických hodnot v rámci jednoho plodu, tzn. například vlašských ořechů tak, že byl v systému zadán příkaz, jež vyhledával shody v rámci jednoho plodu, ale zároveň nulový opakující se výskyt shodných hodnot v celé skupině skořápkových plodů. V tomto případě bylo pro každý plod vždy získáno 15 hmotnostních spekter pro možné porovnávání, každý vzorek plodu byl připraven ve třech technických opakováních a každé z těchto opakování zaujímalo pět spotů na nerezovém nosiči, jenž se vkládá přímo do přístroje MALDI-TOF MS. Pro hledání unikátních hodnot musela být vyjádřena četnost výskytu, pochopitelně se nabízí nejprísnejší kritérium, a sice výskyt v 15 z 15 hmotnostních spekter. Přestože pro některé skořápkové plody bylo i s tímto kritériem nalezeno poměrně vysoké množství unikátních hodnot m/z (například 23 charakteristických hodnot pro kokos), tak pro některé jiné plody byly nalezeny charakteristické hodnoty jen dvě (např. mandle nebo vlašské ořechy). Nalezení dvou unikátních hodnot je ale považováno za nedostatečné a minimální počet unikátních hodnot byl podobně jako u syrových plodů (Kadeřábková, 2022) stanoven na tři hodnoty. Četnost opakování byla tedy i při hledání unikátních hodnot pečených plodů stanovena stejně jako u syrových na 13 z 15 hmotnostních spekter (tj. v rámci jednoho skořápkového plodu).

Na základě nastavených kritérií byly získány seznamy unikátních hodnot m/z patřící specifickým peptidům, jež se vyskytly v rámci vzorku po enzymatickém štěpení trypsinem. O těchto specifických hodnotách lze hovořit jako o druhově charakteristických markerech, jež jsou představovány příslušnými peptidy (respektive peptidovými fragmenty). Veškeré unikátní hodnoty pro pečené vzorky skořápkových plodů jsou uvedeny v tab. 15. Jedná se o „seznam“ unikátních hodnot m/z pro pečené vzorky všech skořápkových plodů, jež byly porovnávány v celé skupině skořápkových plodů. Lze současně očekávat, že přestože se bude jednat o unikátní hodnoty pro pečené vzorky, mohou být v rámci nich schovány rovněž i původní charakteristické hodnoty m/z pro nepečené vzorky odpovídajících skořápkových plodů, což je taktéž zvýrazněno a doplněno v tab. 15.

Tabulka 15: Peptidové markery (hodnoty m/z) pro jednotlivé pečené skořápkové plody; **modře** jsou vyznačeny hodnoty, jež vykazují shodu s charakteristickými hodnotami pro daný plod před pečením ($\pm 0,3 m/z$), **zeleně** jsou vyznačeny možné shodné hodnoty s průměrně vyšší odchylkou $\pm 0,6 m/z$ (cfr. Kadeřábková, 2022).

Skořápkový plod	Unikátní hodnoty m/z (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)												
Arašíd	<u>1129,3</u>	<u>1142,3</u>	1185,3	<u>1256,5</u>	1288,3	<u>1298,3</u>	<u>1380,5</u>	<u>1472,7</u>	1542,5	<u>1561,5</u>	1623,5	<u>1639,7</u>	1731,7
	<u>1739,8</u>	1895,8											
Kešu ořechy	<u>1001,8</u>	<u>1063,8</u>	<u>1088,8</u>	1112,8	1120,8	1159,8	1182,8	<u>1214,8</u>	1377,8	1468,9	<u>1493,9</u>	1564,9	<u>1659,1</u>
	1851,1	2119,3											
Kokos	947,8	962,7	<u>965,7</u>	<u>1016,9</u>	1018,9	1031,8	<u>1050,8</u>	<u>1058,9</u>	1062,8	1255,9	1293,9	1340,1	1395,9
	1425,9	1494,9	1525,1	1554,9	1597,2	1627,1	1636,2	1713,3	1831,3	1857,4	1873,3	1971,4	1997,4
Lískové ořechy	919,8	956,7	990,8	1189,9	<u>1305,9</u>	1438,2	<u>1615,4</u>						
Makadamové ořechy	<u>954,9</u>	1010,9	1073,9	1211,2	1251,2	1299,2	1308,4	1344,3	1520,4	1537,5	1732,6	1734,6	1804,8
	1997,9												
Mandle	1006,9	1387,2	1722,5	<u>1935,7</u>									
Para ořechy	917,9	963,9	999,9	<u>1002,9</u>	1055,9	1176,9	1230,3	1309,2	1508,4	1792,7	1976,8		
Pekanové ořechy	937,9	1003,9	1009,9	1014,9	1036,9	1135,1	1235,1	1315,3	1383,4	1519,4	1603,6	1630,6	1744,7
	1749,8	<u>1860,8</u>	1929,9										
Piniové ořechy	909,8	944,8	<u>949,8</u>	1032,8	1057,8	1332,9	1358,9	1472,0	1489,2	1546,2	1600,1	1614,1	1702,3
	1770,2	1842,4											
Pistácie	1019,9	<u>1177,9</u>	<u>1211,9</u>	<u>1432,4</u>	1491,2	1505,4	<u>1549,4</u>	1723,4	1885,6				
Vlašské ořechy	1256,9	1449,1	1577,2	1749,2	1753,4	1975,4							

Podtržené hodnoty identifikují druh plodu (bez ohledu na pečení), přestože se neprojeví (vliv zaokrouhlení a stanovených kritérií) u syrových plodů (cfr. Kadeřábková, 2022).

U zkoumaných skořápkových plodů byly nalezeny a identifikovány výše uvedené charakteristické markery, které rozlišují plody na bázi peptidů mezi sebou i po vystavení vysoké teplotě (tzn. po simulaci pečení pečiva). V tab. 15 je vidět celkový pohled na všechny identifikované specifické hodnoty m/z pro pečené verze skořápkových plodů. Celkově lze shrnout, že pečené plody poskytují vyšší množství charakteristických hodnot peptidů, jež lze považovat za specifické markery, než tomu bylo u hodnot m/z pro syrové plody (cfr. Kadeřábková, 2022). Průměrně se jedná o získání o více než dvakrát více specifických hodnot, než tomu bylo u nepečených plodů, nicméně v některých případech zůstává počet unikátních hodnot m/z přibližně shodný (max. \pm jedna hodnota u lískových ořechů, mandlí, para ořechů nebo vlašských ořechů).

Z tab. 15 je dále patrné, že některé charakteristické hodnoty m/z pro pečené plody se shodují s unikátními hodnotami m/z pro syrové plody (modré podbarvení v tab. 15 značí tolerovanou průměrnou odchylku $\pm 0,3 m/z$). Vyhodnocování v rámci systému PostgreSQL bylo nastaveno pro práci jen s touto dovolenou odchylkou, nicméně v rámci výsledků byly pozorovány i velmi blízké hodnoty s průměrně lehce vyšší odchylkou. Potenciální shoda je tak vytipována i u dalších hodnot, kde byla průměrná odchylka vyšší než $\pm 0,3 m/z$, tedy odchylkou, s níž se v rámci hodnocení spekter pracovalo (zelené podbarvení v tab. 15 značí průměrnou odchylku $\pm 0,6 m/z$). U mnoha skořápkových plodů již z těchto hodnot dochází ke 100% překrytí specifických hodnot (respektující odchylku $\pm 0,3 m/z$, v tab. 15 modře) v syrovém stavu s unikátními hodnotami ve stavu pečeném.

Z tohoto poznatku vyplývá další možný pohled na výsledky, a sice vyhodnotit závislost tepelného zpracování skořápkových plodů a jejich identifikaci pomocí specifických hodnot m/z v rámci každého plodu samostatně. U některých plodů je toto rozlišení patrné na základě výsledků uvedených v tab. 15 málo pravděpodobné, u jiných naopak může být objevení determinace zpracování plodu možné. Získaná data tedy v současnosti potvrzují determinaci syrové a pečené varianty (tzn. rozlišování v rámci jednoho druhu plodu) jen u některých skořápkových plodů, jak ukazují následující tabulky: tab. 16 a tab. 17. Rozhodující kritérium při hodnocení bylo opět objevení se dané hodnoty alespoň ve 13 z 15 spekter daného tepelně (ne)zpracovaného skořápkového plodu, porovnávací celek čítal tedy jen 30 spekter, neboť bylo srovnáváno 15 plus 15 spekter (pro nepečenou a pečenou variantu) téhož druhu plodu.

Tabulka 16: Peptidové markery (hodnoty m/z) pro jednotlivé skořápkové plody s ohledem na rozlišení tepelného zpracování, zde pro pečené varianty; **fialově** jsou vyznačeny skořápkové plody, u nichž je možné rozlišení tepelného zpracování v rámci jednoho plodu, **žlutě** jsou vyznačeny plody, u nichž je rozlišení možné omezeně, rozlišující počet hodnot je roven buď jedné, maximálně dvěma (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

Skořápkový plod	Unikátní hodnoty m/z (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)											
Arašíd ^T	1731,7											
Kešu ořech ^T	1001,8	1104,8	1112,8	1120,8	1377,9	1564,9	1851,1	2119,3				
Kokos ^T	962,7	1062,8	1141,9	1255,9	1293,9	1425,9	1597,2	1636,2	1873,3	1971,4	1997,4	
Lískové ořechy ^T	1076,9											
Makadamové ořechy ^T	1010,9	1073,9	1187,2	1251,2	1299,2	1308,3	1344,3	1537,5	1804,8	1997,9		
Mandle ^T	1186,9	1387,2	1722,5									
Para ořech ^T	1309,2	1508,4	1792,7	1936,6	1976,8							
Pekanové ořechy ^T	937,9	1009,9	1014,9	1036,9	1135,1	1235,1	1315,3	1519,4	1630,6	1744,7	1749,8	1929,9
Piniové ořechy ^T	909,8	1057,8	1306,9	1332,9	1358,9	1472,1	1614,1	1702,3	1842,4			
Pistácie ^T	1019,9	1378,2	1491,2	1723,4	1936,6							
Vlašské ořechy ^T	1975,4											

^T odpovídá označení vzorků vystavených teplotě (pečené varianty všech zkoumaných skořápkových plodů).

Hodnoty tučně se shodují s unikátními hodnotami v tab. 15.

Hodnoty kurzívou jsou naopak navíc (významné pouze pro účely identifikace teplotního zpracování v rámci daného druhu) – nejde o shodu s tab. 15.

Tabulka 17: Peptidové markery (hodnoty m/z) pro jednotlivé skořápkové plody s ohledem na rozlišení tepelného zpracování, zde pro nepečené varianty; pro doplnění informací z tab. 16, **fialové** jsou vyznačeny skořápkové plody, u nichž je možné rozlišení tepelné zpracování v rámci jednoho plodu, **žlutě** jsou vyznačeny plody, u nichž je rozlišení možné omezeně, rozlišující počet hodnot je roven buď jedné, maximálně dvěma (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

Skořápkový plod	Unikátní hodnoty m/z (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)									
Arašíd ^S	1306,2	1316,1	1344,1							
Kešu ořechy ^S	1222,9	1540,9	1846,7							
Kokos ^S	-									
Lískové ořechy ^S	1481,1	1561,2								
Makadamové ořechy ^S	-									
Mandle ^S	1095,6	1225,2	1491,5	1843,8						
Para ořechy ^S	1203,3	1320,4	1322,5	1615,7	1651,7	1662,8	1665,8	1996,4		
Pekanové ořechy ^S	1098,2	1385,5								
Piniové ořechy ^S	1767,2									
Pistácie ^S	1120,9	1435,2								
Vlašské ořechy ^S	1005,8	1014,8	1064,9	1067,8	1128,9	1320,9	1432,2	1549,2	1569,2	1630,4

^S odpovídá označení vzorků syrových plodů (nepečené varianty všech zkoumaných skořápkových plodů)

Hodnoty tučně se shodují s unikátními hodnotami jen pro syrové plody v rámci celé skupiny skořápkových plodů (cfr. Kadeřábková, 2022).

Hodnoty kurzívou jsou navíc (pouze pro identifikaci nevystavení teploty v rámci jednoho druhu) – nejedná se o shodu (cfr. Kadeřábková, 2022).

Rozlišitelnost typu zpracování je možné jen u některých skořápkových plodů, jak vyplývá z předchozích dvou tabulek, tj. tab. 16 a tab. 17. Pohled na unikátnost a rozlišitelnost může být ovlivněna tím, co a s čím se porovnává. Samozřejmě lze očekávat, že pokud jsou srovnávána pouze naměřená spektra v rámci jednoho druhu, tak počet unikátních hodnot m/z s ohledem na identifikaci tepelného zpracování, může být velmi nízký. Z tab. 16 a 17 vyplývá, že u dvou druhů (kokos a makadamové ořechy) není možné rozlišit, zda byl plod tepelně zpracován či nikoliv, a to ani na základě přítomnosti jedné specifické hodnoty m/z . U šesti z jedenácti plodů (arašídů, lískové ořechy, pekaný, pinie, pistácie, vlašské ořechy) je rozlišitelnost možná omezeně, jelikož je postavena jen na jedné či dvou unikátních hodnotách determinující zpracování plodu. Důvodem omezené rozlišitelnosti je taktéž to, že například u vlašských ořechů nebyly ony unikátní hodnoty součástí všech 15 z 15 hmotnostních spekter, pokud by bylo nastaveno ono nejpřísnější kritérium, tak by u některých plodů z této pětičky nebyla získána ani jedna unikátní hodnota pro nepečené plody (arašídů a vlašské ořechy). V případě lískových ořechů, pekanů, pinií a pistácií by byla nejméně jedna až dvě unikátní hodnoty stále přítomny, u nich lze rozlišitelnost tepelného zpracování v rámci druhu považovat za „papírově“ úspěšnější, v celkovém pohledu je ale postavení rozlišitelnosti na jedné až dvou hodnotách spíše nedostačující a nelze ji tak považovat za stoprocentní.

Tabulka 16 při detailním pohledu poskytuje informaci ohledně toho, které unikátní hodnoty stanovené v rámci celé skupiny pečených plodů jsou současně unikátní hodnoty určující skutečně jen pečenou variantu daného druhu, tyto unikátní hodnoty jsou v tab. 16 **vyznačeny tučně**. Zbývající hodnoty jsou *zvýrazněny kurzívou* a přináší informaci, že v rámci pečené a nepečené varianty byly nalezeny další rozdíly, které lze využít jen za účelem určení, zda byl známý skořápkový plod podroben pečení či nikoliv. Tyto hodnoty ale nejsou relevantní pro případné porovnávání mezi všemi jedenácti druhy, hodnoty nejsou totiž unikátní pro daný druh napříč celou skupinou skořápkových plodů, a proto při identifikaci neznámého vzorku skořápkového plodu jsou nevyužitelné.

Tabulka 17 poskytuje obdobný náhled do výsledků, s tím rozdílem, že se jedná o již dříve naměřená data týkající se „syrových“ respektive nepečených plodů. V tab. 17 jsou rovněž zvýrazněny tučně hodnoty, které určují nepečenou variantu daného druhu a jsou to současně

hodnoty, které již byly jako unikátní hodnoty daného skořápkového plodu identifikovány (*cf.* Kadeřábková, 2022). Ostatní vyjádřené hodnoty jsou opět zvýrazněny kurzívou a poskytují možnost rozlišení mezi pečenou a nepečenou variantou, pokud by byl analyzovaný skořápkový plod považován za již známý. Podobně jako u těchto hodnot v tab. 16 i zde nejsou tyto unikátní hodnoty relevantní pro identifikaci neznámého plodu.

Ačkoli se tedy může zdát, že tabulky 16 a 17 poskytují částečně odlišné hodnoty, týká se to pouze hodnot vyznačených kurzívou a nalezení těchto hodnot je přirozeně dáno zadaným kritériem při hodnocení dat v PostgreSQL. Hledání a srovnávání bylo významně omezeno vždy na jeden konkrétní druh. Očekávaným výsledkem tohoto příkazu v programu byly rozdíly mezi pečenou a nepečenou variantou vzorku. Většina tab. 16 nicméně koreluje s celkovými výsledky, které vyjadřují unikátní hodnoty již v tab. 15. V tab. 17 přibližně 40 % nalezených hodnot odpovídá také známým hodnotám (*cf.* Kadeřábková, 2022). Nižší počet hodnot je dán přirozeně tím, že mnoho již zjištěných unikátních hodnot nedeterminuje jen (ne)zpracování, ale přímo druh jako takový.

Nalezení unikátních hodnot, které charakterizují daný skořápkový plod bez ohledu na jeho vystavení teplotou v rámci pečení, se nabídlo jako další pohled na získaná data a z toho vyplývající výsledky. Poněvadž se již v rámci předchozích zjištění ukázalo, že mnoho nalezených unikátních hodnot m/z pro pečené plody náleží i nepečeným plodům téhož druhu. Porovnáváno nyní bylo vždy 30 spekter od každého druhu vůči celé skupině skořápkových plodů zahrnující všech jedenáct skořápkových plodů vždy v pečené a nepečené variantě, tzn. každých 30 spekter bylo porovnáváno s hodnotami dalších 300 hmotnostních spekter, jež byly získány pro ostatní druhy. Kritérium pro získání unikátních hodnot bylo dáno výskytem alespoň ve 27 hmotnostních spektrech ze 30, toto kritérium by mělo poskytnout dostatečně průkazné unikátní hodnoty, jež identifikují konkrétní skořápkový plod. Zároveň výsledky tohoto porovnávání poskytly vždy alespoň tři unikátní hodnoty pro každý skořápkový plod, jež lze považovat za dostatečné množství pro spolehlivou identifikaci.

Specifické markery potvrzující konkrétní druh (tzn. markery nalezené pro pečenou a nepečenou variantu současně) byly nalezeny u všech plodů, což je naznačeno i v tab. 15, finální přehled unikátních hodnot pro každý skořápkový plod je v tab. 18 na další straně.

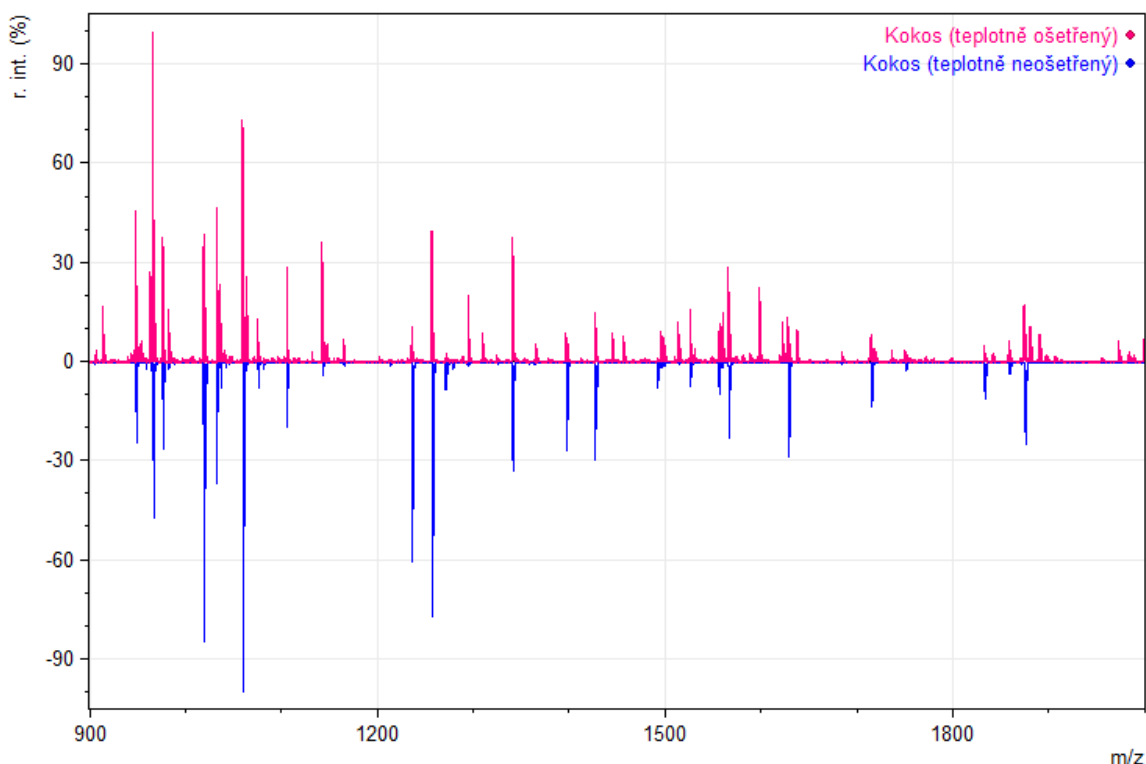
Tabulka 18: Peptidové markery (hodnoty m/z) pro jednotlivé skořápkové plody determinující konkrétní druh skořápkového plodu, uvedené hodnoty jsou společné pro pečenou i nepečenou variantu příslušného druhu skořápkového plodu (tolerance $\pm 0,3 m/z$).

Skořápkový plod	Unikátní hodnoty m/z (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)												
Arašíd	1128,9	1141,9	1184,9	1256,3	1288,3	1298,2	1380,5	1472,5	1542,4	1561,4	1623,4	1639,6	1739,7
	1895,8												
Kešu ořechy	1063,8	1088,9	1159,9	1182,9	1214,9	1468,9	1494,2	1659,2					
Kokos	947,9	965,9	1017,1	1019,1	1032,1	1036,1	1059,1	1105,1					
Lískové ořechy	919,7	956,7	990,8	1189,9	1305,9	1438,2	1615,2						
Makadamové ořechy	954,8	1211,2	1520,5	1732,6	1734,6								
Mandle	1006,9	1405,3	1935,7										
Para ořechy	917,8	963,9	999,9	1002,9	1055,9	1077,2	1138,2	1177,2	1230,4				
Pekanové ořechy	1003,9	1383,5	1603,6	1860,9									
Piniové ořechy	944,9	949,9	1032,9										
Pistácie	1178,1	1211,9	1432,2	1505,3	1549,3	1885,6							
Vlašské ořechy	1256,9	1449,1	1577,2	1749,2	1753,4								

Světle červeně označené hodnoty identifikují konkrétní skořápkový plod (kokos, mandle, para ořechy), přestože nebyly identifikovány jako unikátní hodnoty m/z pro pečené varianty plodů (tab. 15), jejich výskyt byl totiž ve 12 z 15 hmotnostních spekter. Kritérium, tj. výskyt hodnot min. ve 27 z 30, bylo splněno.

V celkovém pojetí naměřená hmotnostní spektra pečených skořápkových plodů byla bohatší na počet píků, působení teploty měl tak vliv na rozšíření „databáze“ unikátních hodnot m/z , což je demonstrováno na několika vybraných zástupcích skořápkových plodů prostřednictvím ukázky jejich hmotnostních spekter.

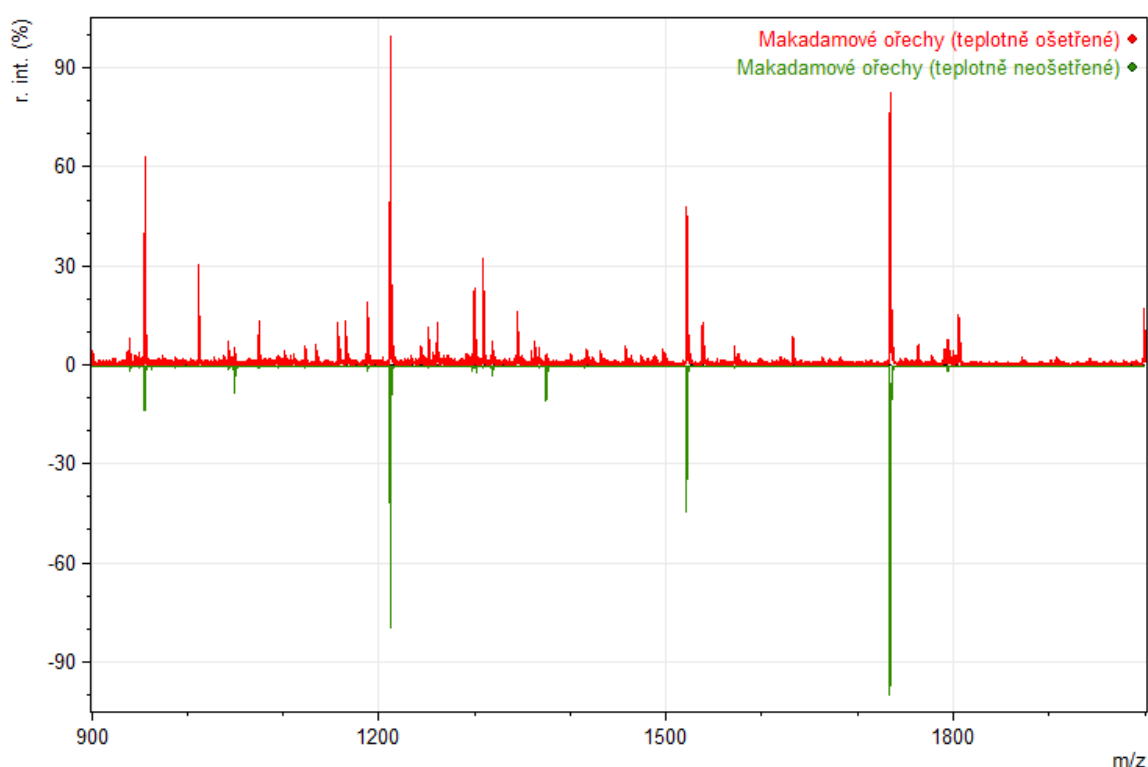
Za jedny z nejbohatších naměřených spekter lze považovat hmotnostní spektra pro kokosový ořech, ten již v nepečeném stavu poskytoval 15 unikátních hodnot m/z , v pečeném stavu s ohledem na výše stanovená kritéria se tento počet rozrostl na 26 charakteristických hodnot m/z (tab. 15 na str. 76), v případě kokosu lze hovořit skutečně jen o rozšíření databáze (cfr. Kadeřábková, 2022), jak je též patrné z obrazového porovnání níže na obr. 8.



Obrázek 8: Porovnání hmotnostních spekter pro vzorky teplotně ošetřeného a neošetřeného kokosu; data byla exportována z mMass (verze programu 5.5.0).

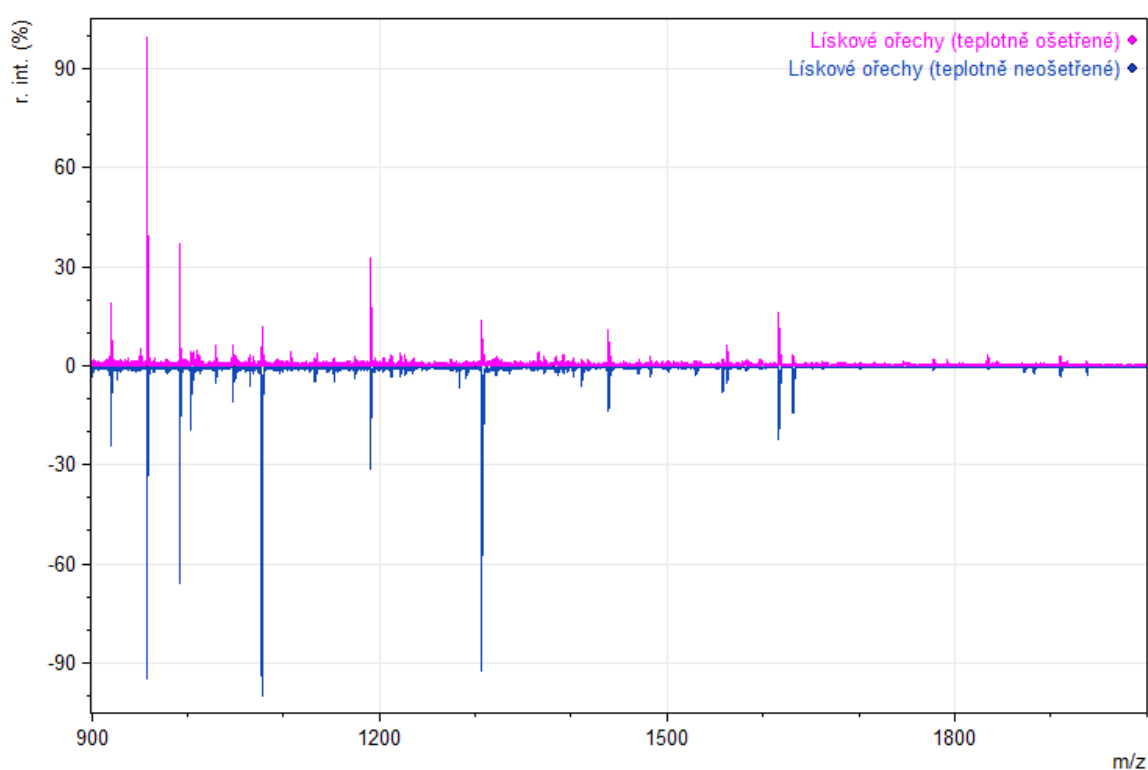
Na obr. 8 je vizuálně možné pozorovat nárůst počtu píků pro vzorek teplotně ošetřeného kokosu, objevené množství zaznamenaných signálů rozšiřuje již nalezené píky u teplotně neošetřeného vzorku kokosu přibližně dvojnásobně, což taktéž koreluje s přibližně dvojnásobným množstvím unikátních hodnot m/z pro teplotně ošetřenou variantu kokosu.

Za pomyslně „největšího skokana“ je možné považovat makadamové ořechy, jež ve své původní nepečené verzi poskytly velmi „chudé“ hmotnostní spektrum a počet unikátních hodnot byl roven čtyřem hodnotám. Po teplotním ošetření jsou hmotnostní spektra významně bohatší a poskytují více než třikrát více unikátních hodnot m/z pro tyto plody (tab. 15 na str. 76; *cf.* Kadeřábková, 2022), jejichž spektra v obou variantách jsou pro porovnání vyobrazena níže na obr. 9, i v případě makadamových ořechů se jedná o rozšíření původních unikátních hodnot (Kadeřábková, 2022).



Obrázek 9: Porovnání hmotnostních spekter pro vzorky teplotně ošetřených a neošetřených makadamových ořechů; data byla exportována z mMass (verze programu 5.5.0).

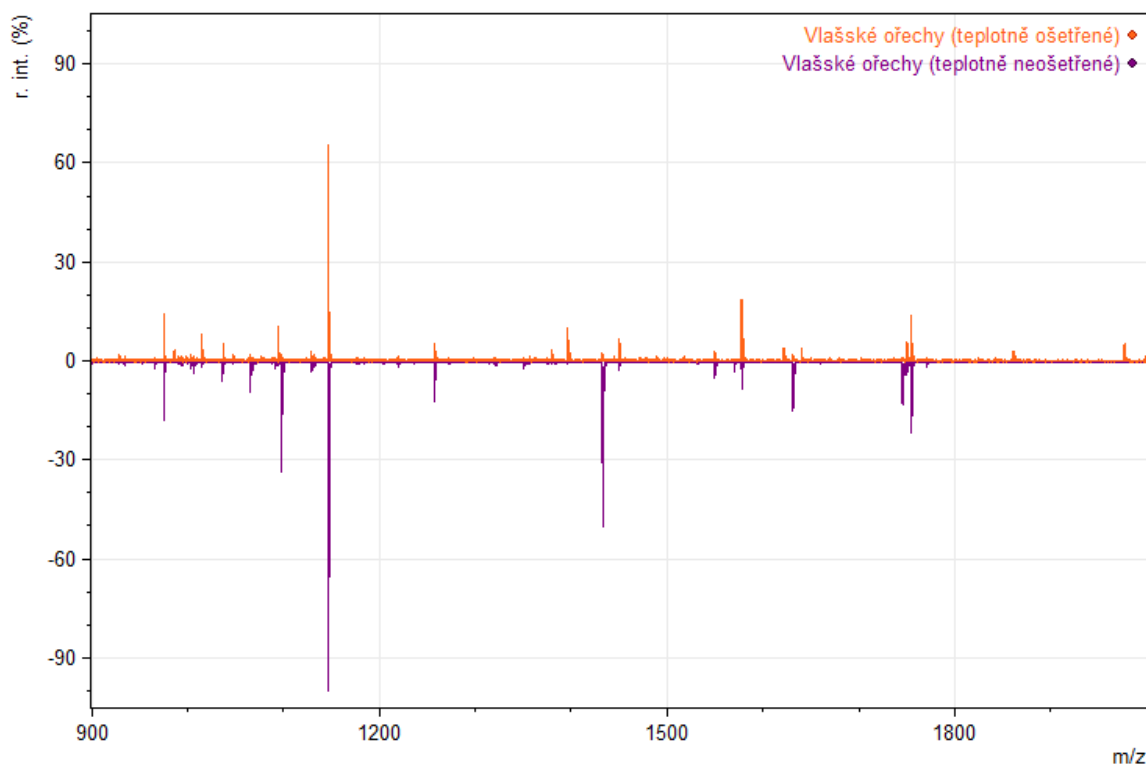
Co se týče dalších, zejména u nás hojně pěstovaných druhů, jako například lískových ořechů či vlašských ořechů, tak tam co do počtu získaných unikátních hodnot m/z nejsou tak znatelné změny. Lískové ořechy nejen číselně ale rovněž vizuálně poskytují téměř shodná hmotnostní spektra, samozřejmě s lehkými odchylkami, jak je uvedeno v rámci tab. 16 a tab. 17, díky nimž je omezeně možné nalézt rozdíl mezi pečenou a nepečenou variantou lískové ořechu. S ohledem na shodné hodnoty jsou patrné rozdíly v intenzitách nalezených píků. Porovnání obou variant je k dispozici na obr. 10.



Obrázek 10: Porovnání hmotnostních spekter pro vzorky teplotně ošetřených a neošetřených lískových ořechů; data byla exportována z mMass (verze programu 5.5.0).

U vlašských ořechů lze pozorovat obdobný fenomén s tím, že je opět databáze unikátních hodnot spíše rozšiřována proti původním hodnotám charakterizující vlašské ořechy v nepečeném stavu. Objevují se hodnoty charakteristické pro pečenou variantu, vymezení teplotně neošetřených vlašských ořechů vůči ošetřeným je možné na základě několika málo hodnot až při detailnějším hodnocení, tj. přiblížení jednotlivých částí hmotnostních spekter.

Tyto možné hodnoty jsou uvedeny již v tab. 16 a tab. 17. Porovnání pečené a nepečené varianty vlašských ořechů je uvedeno níže na obr. 11.



Obrázek 11: Porovnání hmotnostních spekter pro vzorky teplotně ošetřených a neošetřených vlašských ořechů; data byla exportována z mMass (verze programu 5.5.0).

S ohledem na vyšší množství unikátních hodnot m/z nejsou pro celkovou přehlednost charakteristické hodnoty součástí obrázků. Konkrétní hodnoty pro pečenou variantu příslušného skořápkového plodu jsou k dispozici v tabulkovém přehledu (tab. 15) na str. 76, pro nepečenou variantu konkrétního plodu jsou hodnoty k dispozici v bakalářské práci, jež této diplomové práci předchází (Kadeřábková, 2022).

Samostatná hmotnostní spektra všech teplotně ošetřených skořápkových plodů jsou k nahlédnutí v rámci příloh této práce (Příloha č. 2).

3.1.2 Identifikace skořápkových plodů ve vánočním cukroví

Reálné vzorky vánočního cukroví byly podrobeny stejné analýze jako vzorky samotných skořápkových plodů. Pomocí MALDI-TOF MS byla získána hmotnostní spektra, jež se dále hodnotila v prostředí softwaru mMass. Hodnocení v tomto prostředí stejně jako u samotných skořápkových plodů spočívalo ve vyhledávání unikátních hodnot m/z . Opět byla spektra postupně manuálně označována, respektive nalezené píky v nich. Klíčem pro výběr píků byla trojnásobná intenzita signálu vůči intenzitě přítomného šumu v hmotnostním spektru. Vytipované hodnoty na ony specifické m/z byly následně zpracovávány opět databázovým systémem PostgreSQL, pouze ale vždy s omezením na konkrétní druh vánočního cukroví, jelikož se ve více z nich objevily například vlašské ořechy tak, aby nebyly očekávané unikátní hodnoty m/z eliminovány. Pro hledané unikátní hodnoty musela být rovněž vyjádřena četnost výskytu těchto hodnot, stanoveno bylo kritérium výskytu alespoň v 7 hmotnostních spektrech z 10. Získané vytipované unikátní hodnoty m/z byly porovnávány se vzniklou databází charakteristických hodnot m/z pro jednotlivé skořápkové plody v pečeném stavu, ale obdobně také i s hodnotami v nepečeném stavu (Kadeřábková, 2022). Porovnání bylo provedeno v prostředí MS Excel, kde byly porovnávány unikátní hodnoty nalezené v hmotnostních spektrech pro jednotlivé druhy vánočního cukroví vůči unikátním hodnotám referenčních materiálů, tj. jednotlivých skořápkových plodů, jak v pečeném, tak i nepečeném stavu.

U některých druhů se po měření na MALDI-TOF MS s následným zpracováním v mMass a vyhodnocením v PostgreSQL podařilo nalézt shody s unikátními hodnotami m/z očekávaných skořápkových plodů, u některých druhů byly detekovány shody i s nedeklarovanými skořápkovými plody, ale tyto detekce nebyly vyhodnoceny jako potvrzující přítomnost daného druhu, jelikož se jednalo o výskyt vždy jen jedné hodnoty, jež se projevila shodou s nedeklarovaným plodem. Je samozřejmě možné uvažovat nad kontaminací detekovaným druhem, s ohledem ale na detekce méně využívaných plodů je pravděpodobnější, že vytipovaná hodnota m/z patří jiné ingredienci. U dvou vzorků se tímto postupem nepodařilo detekovat výrobcem deklarované skořápkové plody ani jednou shodou. Nalezené shody unikátních hodnot m/z skořápkových plodů v analyzovaném cukroví jsou uvedeny v tab. 19, konkrétní hodnoty u identifikovaných plodů poté v tab. 20.

Tabulka 19: Identifikované/neidentifikované skořápkové plody v analyzovaných vzorcích cukroví na základě provedené analýzy pomocí MALDI-TOF MS.

	Domácí sušenka	Kávové zrno	Kokoska	Kulička v kokosu (A)	Kulička v kokosu (B)	Skořicové pracky	Vaflové rybičky	Vanilkové rohlíčky
Arašídý	×	○	×	×	×	○	×	×
Kešu ořechy	×	×	×	○	○	×	×	×
Kokos	×	○	✓	✓	✓	○	○	○
Lískové ořechy	×	×	×	×	×	×	×	×
Makadamové ořechy	×	○	○	○	○	×	×	×
Mandle	×	×	×	×	×	×	✓	×
Para ořechy	○	○	×	×	×	○	○	○
Pekanové ořechy	×	○	○	×	×	○	○	×
Piniové ořechy	×	×	×	○	○	×	○	×
Pistácie	×	×	×	×	×	○	×	×
Vlašské ořechy	✓	○	○	○	×	✓	✓	×

✓ nalezení dostatečné shody, jež umožnila identifikaci daného skořápkového plodu ve vzorku cukroví.

× nenalezení shody, v rámci vytipovaných hodnot nebyla nalezena jediná shoda pro daný skořápkový plod ve vzorku cukroví.

○ nalezení shody v jedné hodnotě, nelze považovat za dostatečné pro identifikování daného skořápkového plodu ve vzorku cukroví.

Pozn. U druhu cukroví s názvem kulička v kokosu: **(A)** značí pouze analyzované těsto; **(B)** značí analyzované těsto i s (kokosovým) obalením kuličky.

Tabulka 20: Porovnání konkrétních nalezených unikátních hodnot m/z , jež je možné považovat za shodné s unikátními hodnotami m/z příslušných skořápkových plodů (týká se jen části vzorků vánočního cukroví, u něhož byla dostatečně průkazná identifikace daného skořápkového plodu).

Skořápkový plod	Unikátní hodnoty m/z (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)												
Kokos ^T	947,8	962,7	965,7	1016,9	1018,9	1031,8	1050,8	1058,9	1062,8	1255,9	1293,9	1340,1	1395,9
	1425,9	1494,9	1525,1	1554,9	1597,2	1627,1	1636,2	1713,3	1831,3	1857,4	1873,3	1971,4	1997,4
Kokos ^S	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											
Mandle ^T	1006,9	1387,2	1722,5	1935,7	Mandle ^S	1007,0	1095,5	1225,2	1405,4	1843,8			
Vlašské ořechy ^T	1256,9	1449,1	1577,2	1749,2	1753,4	1975,4							
Vlašské ořechy ^S	1064,9	1257,2	1449,3	1577,3	1749,2	1753,4							

Vánoční cukroví	Unikátní hodnoty m/z vykazující shodu s referenčními skořápkovými plody (přípustná odchylka $\pm 0,3 m/z$)												
Domácí sušenka	1256,8	1975,2											
Kokoska	947,4	965,3	1016,5	1019,5	1032,4	1058,5	1062,4	1105,4	1255,6	1293,4	1340,6	1396,5	1425,5
	1525,6	1555,6	1627,6	1635,6									
Kulička v kokosu (A)	965,3	1016,5	1031,4	1058,5	1062,4	1293,5	1339,6	1425,5	1524,6	1554,6	1626,6	1635,7	1872,7
Kulička v kokosu (B)	947,6	965,5	1016,6	1031,6	1058,6	1062,5	1255,6	1293,5	1339,6	1395,6	1425,6	1494,6	1524,6
	1554,6	1626,7	1635,7	1830,8	1872,7								
Skořicové pracny	1064,9	1257,1	1449,2	1577,3	1749,3	1753,5							
Vaflové rybičky	1006,9	1064,7	1095,5	1225,2	1256,9	1448,9	1749,2	1752,9	1974,9				

^T odpovídá označení vzorků plodů vystavených teplotě. ^S odpovídá označení vzorků syrových plodů.

Barevné podbarvení u nalezených hodnot odpovídá podbarvení daného skořápkového plodu v horní části tabulky.

Kurzívou jsou zvýrazněny hodnoty, u nichž je tolerance rozšířena $\pm 0,6 m/z$ (z důvodu prováděného servisu).

Pozn. U druhu cukroví s názvem kulička v kokosu: **(A)** značí pouze analyzované těsto; **(B)** značí analyzované těsto i s (kokosovým) obalením kuličky.

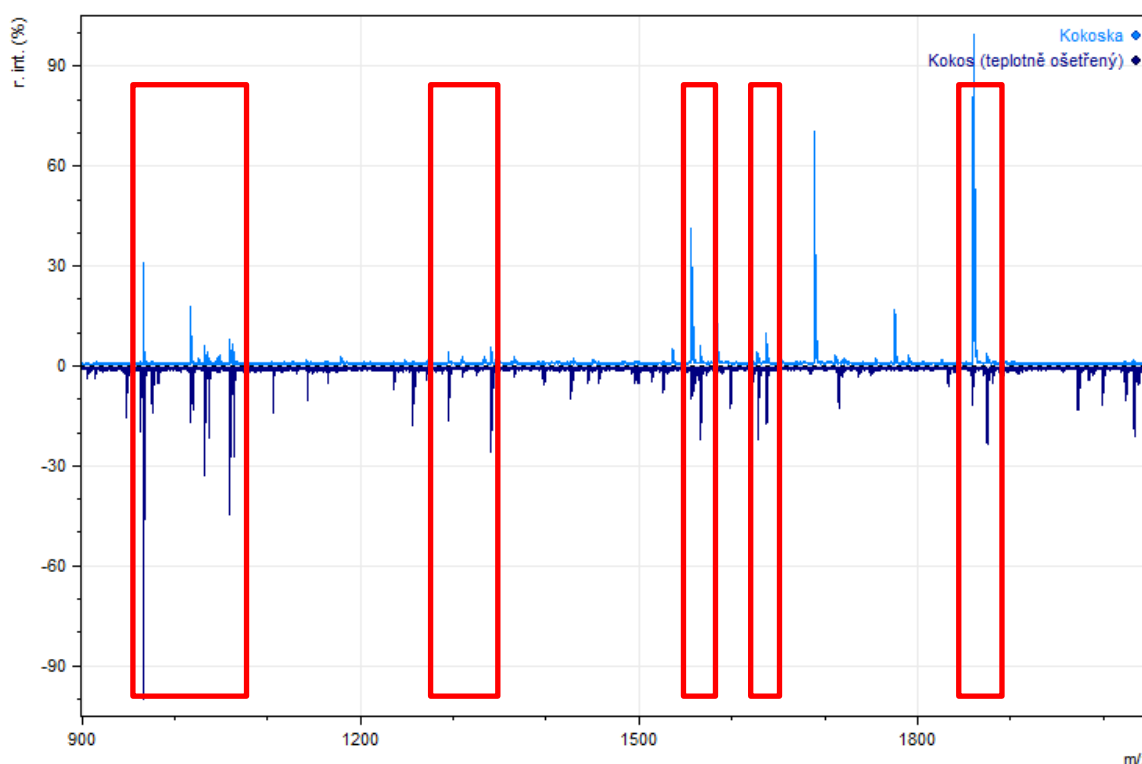
Tab. 19 zobrazuje pohled na identifikování jednotlivých skořápkových plodů v rámci analyzovaných reálných vzorků vánočního cukroví. U dvou druhů vánočního cukroví (kávové zrno a vanilkové rohlíčky) se nepodařilo za pomoci výše uvedeného postupu při využití analýzy za pomoci MALDI-TOF MS a dalším softwarovým vyhodnocováním identifikovat deklarované druhy skořápkových plodů ve složení. Identifikace byla úspěšnější zejména v druzích, kde byl ve složení očekáván kokos (kokoska a kulička v kokosu). U kuličky v kokosu tímto postupem bylo získáno v podobě **A** (tzn. jen z těsta) 13 unikátních hodnot m/z s rozšířenou tolerancí odchylky na $\pm 0,6 m/z$, to odpovídá nalezení poloviny charakteristických hodnot determinující kokos (tab. 20). V podobě **B** (tzn. nejen z těsta ale i s (kokosovým) obalením) bylo získáno 18 unikátních hodnot m/z s rozšířenou tolerancí odchylky na $\pm 0,6 m/z$, což odpovídá téměř 70 % nalezených hodnot určující kokos jako druh skořápkového plodu. Toto cukroví současně mělo dle výrobce obsahovat rovněž vlašské ořechy, ty nebyly spolehlivě detekovány, nalezena byla pouze jedna shoda u kuličky v podobě **A** navíc s rozšířenou tolerancí $\pm 0,6 m/z$. Vyhodnocení nalezených hodnot pro kokosku přineslo výsledky, u nichž jsou kombinovány hodnoty pro teplotně neošetřenou i ošetřenou variantu kokosu, jelikož si hodnoty obou variant kokosu odpovídají s ohledem na rozšířenou přípustnou odchylku $\pm 0,6 m/z$ lze tak považovat, že bylo nalezeno celkem 17 charakteristických hodnot m/z určující kokos ve složení kokosky, což odpovídá přibližně 65 % nalezených hodnot pro kokos samostatně ve skupině skořápkových plodů.

U domácí sušenky, jež byla ve fázi analýzy neznámým vzorkem, byl identifikován očekávaný druh, a sice vlašské ořechy ve dvou hodnotách m/z , to odpovídá nalezení třetiny unikátních hodnot m/z determinující vlašské ořechy. Nejúspěšnější identifikace vlašských ořechů byla ve složení skořicových pracen, kde bylo identifikováno hned 100 % unikátních hodnot (šest ze šesti hodnot) vlašských ořechů bez teplotního ošetření, jelikož u teplotně ošetřených i neošetřených lze pozorovat překryv hodnot, tak ani úspěšnost nalezení unikátních hodnot pro pečenou variantu není nízká, činí cca 83 % (tj. pět ze šesti hodnot).

Poslední uváděné cukroví nesoucí název vaflové rybičky jako jediné potvrdily odhalení dvou očekávaných plodů ve svém složení, a to vlašské ořechy s 83% úspěšností, jak pro teplotně ošetřené, tak pro teplotně neošetřené vlašské ořechy (ve dvou případech s rozšířenou tolerovanou odchylkou $\pm 0,6 m/z$). Druhými odhalenými plody byly mandle, jež se potvrdily

celkem třemi hodnotami determinující syrové mandle, úspěšnost je tedy přibližně 60 % (potvrzení tří hodnot z pěti). Nejen u rybiček měla být přítomnost dvou skořápkových plodů – rovněž u kuličky v kokosu jsou výrobcem deklarovány vlašské ořechy a kokos, dostatečně identifikován byl ale pouze kokos. Také u vanilkových rohlíčků měly být detekovány dva druhy, a sice vlašské a lískové ořechy, s využitím daného postupu a kritérii se nepodařilo dostatečně spolehlivě detekovat ani jeden výrobcem uvedený skořápkový plod. Stejně tak u cukroví, jež neslo označení kávové zrna, nebyla potvrzena přítomnost žádných skořápkových plodů, ani očekávaných mandlí dle uvedeného složení od výrobce.

Veškeré vytipované hodnoty získané vyhodnocením za pomoci systému PostgreSQL u analyzovaných druhů cukroví jsou k dispozici v přílohách této práce (Příloha č. 3). Za velmi úspěšné lze považovat potvrzení přítomnosti kokosu v reálném vzorku kokosky. S ohledem na minimum příměsí je vhodné i vizuální doplnění identifikace kokosu přímo na ukázce odpovídajících hmotnostních spekter (obr. 12). Vzhledem k vysokému počtu hodnot m/z , nejsou tyto hodnoty součástí obrázku, pro doplnění jsou hodnoty uvedeny v tab. 20.



Obrázek 12: Porovnání hmotnostního spektra kokosky a teplotně ošetřeného kokosu; červené části označují významné shody s unikátními hodnotami m/z kokosu; data byla exportována z mMass (verze programu 5.5.0).

3.2 Výsledná data získaná z měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS

Pomocí LC-ESI-Q-TOF MS byla získána data o nalezených peptidech, respektive peptidových fragmentech včetně detailů zahrnující jejich hodnotu m/z ; relativní molekulovou hmotnost, aminokyselinovou sekvenci, délku peptidového fragmentu a jeho odhadovaný původ. Součástí naměřených dat je i kvantifikovaný přehled nalezených peptidů k odpovídajícímu proteinu. Data z měření byla v rámci softwaru pro správu proteomických dat a za pomoci Mascot serveru 2.4 porovnávána vůči rostlinné databázi proteinů Uniprot. Vlivem technických problémů nebyla získána data od všech připravených vzorků, proto předmětem dalšího hodnocení nebyly tedy všechny vzorky, nýbrž jen vzorky vánočního cukroví. V tomto případě nebylo možné porovnávat získaná data od referenčních skořápkových plodů a data pocházející z měření vzorků vánočního cukroví. Přistoupeno bylo tedy k porovnávání unikátních hodnot m/z (se stanovenou rozšířenou tolerancí $\pm 0,6 m/z$) pro skořápkové plody z MALDI-TOF MS a získaných hodnot M_r peptidových fragmentů nalezených ve vánočním cukroví za pomoci metody LC-ESI-Q-TOF MS. Jelikož ale u dat z MALDI-TOF MS přísluší peptidům hodnota m/z , kdy se jedná vždy o jednotný jednotkový náboj a zároveň při měření vznikají H^+ ionty, hodnoty m/z jsou o tento náboj sníženy a porovnávány s molekulovou hmotností příslušných peptidů z LC-ESI-Q-TOF MS. Toto porovnávání bylo uskutečněno v prostředí MS Excel.

Využitá metoda hmotnostní spektrometrie vykazuje vyšší citlivost a přesnost, proto je možné přiřadit i pravděpodobný původ proteinu odpovídající nalezenému peptidovému fragmentu. Přiřazený původ je v současné době zatím spíše jen předpokládán s ohledem na to, že jsou k dané sekvenci přiřazeny proteiny původu rostliny, jež je nejlépe proteomicky popsána. Některé proteiny mohou mít rostliny pochopitelně navzájem společné a je to přirozené například i pro živočišnou říši. Rostliny, jejichž semena či plody jsou v této práci řešené skořápkové plody, nejsou prozatím mezi těmi nejlépe popsány. Vliv technických problémů při měření navíc zapříčinil, že ani k jejich lepšímu proteomickému popisu v současnosti nemohlo dojít, a tedy referenční měření pro další porovnávání není k dispozici. Vyhledávání sekvencí proběhlo jen oproti rostlinné databázi a z tohoto důvodu výsledky neobsahují i očekávané živočišné proteiny (pocházející například z vajec).

Nicméně i tak bylo touto metodou získáno nemalé množství dat k vzorkům vánočního cukroví, zjišťované shody mezi unikátními hodnotami m/z pocházející z měření MALDI-TOF MS a nalezenými hodnotami z LC-ESI-Q-TOF MS byly minimální, maximálně byly nalezeny dvě shodující se hodnoty s unikátními hodnotami m/z pro deklarované plody ve vzorku, v některých případech nebyla nalezena žádná shoda. Potvrzuje to fakt, že pro dostatečně průkazné vyhodnocení je zapotřebí mít k dispozici detailnější proteomický popis odpovídající skořápkovým plodům (respektive příslušným rostlinám). Na druhou stranu byla velmi spolehlivě potvrzena přítomnost peptidů pocházející z pšenice seté (*Triticum aestivum*), tzn. z mouky u všech vzorků, u nichž ji ve složení výrobce deklaroval, naopak u ostatních její přítomnost byla vyvrácena dle předpokladu (platí jak pro komerční vzorky cukroví, tak pro toho času neznámý vzorek cukroví).

V rámci této kapitoly jsou vybrány a blíže specifikovány jen potenciálně možné shody mezi oběma metodami, jež byly dohledány. Celkový přehled nalezených peptidů pro každý vzorek vánočního cukroví je součástí příloh této práce (Příloha č. 4).

Vanilkové rohlíčky (označení vzorků: C1a, C1b)

V obou vzorcích vanilkových rohlíčků byla velmi v hojném zastoupení potvrzena přítomnost peptidových fragmentů pocházející z pšenice seté, v obou vzorcích se podařilo shodně nalézt shodu pro vlašské ořechy, pouze v jednom ze vzorků (konkrétně v C1b) byly nalezeny dva peptidy o hodnotách m/z odpovídající toleranci $\pm 0,6 m/z$ patřící lískovým ořechům dle měření za pomoci MALDI-TOF MS (viz tab. 21 a Příloha č. 4).

Skořicové pracny (označení vzorků: C2a, C2b)

Ve dvou vzorcích skořicových pracen byla rovněž potvrzena přítomnost peptidových fragmentů pocházející z pšenice seté, v jednom ze vzorků (konkrétně v C2b) byl nalezen peptidový fragment o hodnotě m/z s odpovídající toleranci $\pm 0,6 m/z$ patřící vlašským ořechům dle měření za pomoci MALDI-TOF MS (viz tab. 21 a Příloha č. 4).

Kokoska (označení vzorků: C3a, C3b)

Ve vzorcích kokosky byla správně potvrzena nepřítomnost peptidových fragmentů pocházející z pšenice seté, výrobce v uvedeném složení její přítomnost neuvádí. Hledaná

shoda hodnot, jež by dle měření z MALDI-TOF MS měla odpovídat kokosu, byla objevena v obou vzorcích opakovaně, ale jen v jedné číselné hodnotě (viz tab. 21 a Příloha č. 4).

Kávové zrno (označení vzorků: C4a, C4b)

Ve vzorcích výrobku nesoucí označení jako kávové zrno byla opět potvrzena přítomnost deklarované pšenice seté, nicméně očekávané mandle se na základě porovnání unikátních hodnot zjištěné měření z MALDI-TOF MS nepodařilo touto cestou potvrdit (viz Příloha č. 4).

Kulička v kokosu (označení vzorků: C5a, C5b, C5c, C5d)

Tento druh cukroví byl analyzován ve čtyřech vzorcích, dva z nich odpovídaly vnitřní části (tzn. těstu) cukroví a další dva z nich vnější (tzn. část těsta včetně jeho vizuálně identifikovatelného obalení v kokosu). V prvních třech vzorcích byla identifikována přítomnost peptidových fragmentů pocházející z pšenice seté, jež byla výrobcem deklarována, ve čtvrtém vzorku potvrzena nebyla, je potřeba dodat, že odebírána byla jen vnější část, proto nemusela být přítomnost mouky detekována. Ve všech čtyřech vzorcích tohoto druhu cukroví byla nalezena odpovídající shoda v jedné unikátní hodnotě m/z pro kokos. Pro vlašské ořechy, které výrobce rovněž deklaruje, vytipovaná shoda nalezena nebyla (viz tab. 21 a Příloha č. 4).

Vaflové rybičky (označení vzorků: C6a, C6b)

Na příkladu druhu cukroví pojmenované jako vaflové rybičky byla poměrně ve velkém zastoupení potvrzena přítomnost peptidových fragmentů patřící pšenici seté, nicméně pro deklarované přítomné plody výrobcem (mandle, vlašské ořechy) se nepodařilo hodnoty m/z ve shodě s měřením z MALDI-TOF MS nalézt (viz Příloha č. 4).

Domácí ořechová sušenka – „neznámý vzorek“ (označení vzorků: C7a, C7b)

U tohoto druhu, jenž byl toho času při provádění analýzy neznámým vzorkem, byla správně potvrzena nepřítomnost peptidových fragmentů pocházející z mouky, nicméně nebyla ani potvrzena přítomnost vlašských ořechů ve smyslu shody v unikátních hodnotách m/z pocházející z měření MALDI-TOF MS (viz Příloha č. 4).

Tabulka 21: Nalezené shody v hodnotách Mr (LC-ESI-Q-TOF MS) s unikátními hodnotami m/z^* (MALDI-TOF MS) pro deklarované plody (tolerance $\pm 0,6 m/z$). Označení vzorků odpovídá následovně: C1a, C1b: vanilkové rohlíčky (vzorek a, b); C2b: skořicové pracky (vzorek b); C3a, C3b: kokoska (vzorek a, b); C5a, C5b: kulička v kokosu (A) – pouze vnitřní část (vzorek a, b); C5c, C5d: kulička v kokosu (B) – vnější část (vzorek c, d).

Označení vzorku	Mr (LC)	m/z^* (MALDI)	Název proteinu	Úsek sekvence aminokyselin	Aminokyselinová sekvence
C1a	1751,9	1752,4	Beta-amylase	419–433	R.LSNQLVEGQNYVNFK.T
C1b	1304,6	1304,9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	129–140	K.DAPMFVVGVEK.E
C1b	1614,8	1614,2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	167–181	K.LSVETTANQDPLVTK.G
C1b	1751,9	1752,4	Beta-amylase	419–433	R.LSNQLVEGQNYVNFK.T
C2b	1448,7	1448,1	Aminopeptidase M1-A	138–150	K.NMAVTQFEPADAR.R
C3a	1015,6	1015,9	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	121–129	R.TGKVEILEK.M
C3b	1015,6	1015,9	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	121–129	R.TGKVEILEK.M
C3b	1015,6	1015,9	NAC domain-containing protein 6	1–9	-.MKILPVGSR.F

Označení vzorku	Mr (LC)	m/z^* (MALDI)	Název proteinu	Úsek sekvence aminokyselin	Aminokyselinová sekvence
C5a	1015,6	1015,9	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	121–129	R.TGKVEILEK.M
C5a	1015,6	1015,9	NAC domain-containing protein 6	1–9	-.MKILPVGSR.F
C5b	1015,6	1015,9	NAC domain-containing protein 6	1–9	-.MKILPVGSR.F
C5c	1015,6	1015,9	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	121–129	R.TGKVEILEK.M
C5c	1015,6	1015,9	NAC domain-containing protein 6	1–9	-.MKILPVGSR.F
C5d	1015,6	1015,9	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	121–129	R.TGKVEILEK.M

* hodnoty m/z (MALDI-TOF MS) sníženy o hodnotu 1 m/z . Jelikož při měření vznikají H^+ ionty, pro možné porovnání se m/z o hodnotu tohoto náboje snižuje.

Zelené podbarvení označuje nalezené shody Mr v hodnotách LC-ESI-Q-TOF MS) s unikátními hodnotami m/z^* pro vlašské ořechy (MALDI-TOF MS).

Světle červené podbarvení označuje nalezenou shodu Mr v hodnotách (LC-ESI-Q-TOF MS) s unikátní hodnotou m/z^* pro lískové ořechy (MALDI-TOF MS).

Modré podbarvení označuje nalezené shody Mr v hodnotách (LC-ESI-Q-TOF MS) s unikátními hodnotami m/z^* pro kokos (MALDI-TOF MS).

Pozn. Rostlinný původ neodpovídá příslušným skořápkovým plodům (viz Příloha 4), prozatím není databáze jejich proteomů, s nimiž by porovnání bylo možné.

Jak již bylo zmíněno, tak rostlinný původ neodpovídá konkrétním skořápkovým plodům, v tab. 21 je navíc patrné, že naprosto stejné hodnoty m/z mohou patřit různým peptidovým fragmentům, jež přísluší jiným proteinům.

Vzhledem k tomu, že shod se nepodařilo získat mnoho, byly ke všem přiřazeným proteinům dohledány informace v databázi UniProt. U všech proteinů lze říci, že jsou běžnými rostlinnými proteiny vyskytující se napříč rostlinnou říší s různými funkcemi. Prvním v tab. 21 uvedeným je *beta-amylase* mající katalytickou funkci, je to mj. protein typický pro již zmiňovanou pšenici setou. Další nalezený protein *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic*, kdy se jedná se o enzym zásadní pro průběh glykolýzy, konkrétně pro její zahájení. Tento nalezený protein je klíčový zejména ve vývoji rostliny (UniProt, 2024).

Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial, jako další z nalezených shod, ničí superoxidové radikály, které jsou běžně produkovány v buňkách, zde byl tento protein identifikován s původem patřící rýži, nicméně určitá podoba tohoto proteinu se nachází například i v živočišných buňkách. Nicméně v tomto případě pro lísku v současné době není protein popsán. *Aminopeptidase M1-A* je opět protein, jež je charakteristický pro rostliny všeobecně, podobně jako v předchozím případě byl původ přiřazen rýži, jež je jedním ze zástupců s nejlépe popsáním proteomem. V tomto případě uvedená hodnota m/z odpovídá unikátní hodnotě m/z z MALDI-TOF MS pro vlašské ořechy, tento protein, jak z názvu napovídá, způsobuje štěpení peptidů na kratší peptidové úseky (UniProt, 2024).

S velmi četným opakováním u několika vzorků (s vytipovanou shodou pro kokosový ořech) byly dohledány následující dva proteiny, a sice *glutaminyl-peptide cyclotransferase*, který má katalytickou funkci v rámci posttranslačních úprav a *NAC domain-containing protein 6* mající vazbu na transkripci DNA, v obou případech se tedy taktéž jedná o proteiny důležité pro rostliny, případně živé organismy všeobecně (UniProt, 2024).

4 Diskuse

V rámci této diplomové práce bylo v širším pohledu řešeno téma zabývající se možnostmi autentizace potravin, na konkrétním příkladu identifikace skořápkových plodů ve vybraných vzorcích vánočního cukroví. Vzhledem k tomu, že se již v předchozí práci autorky podařilo rozlišit jednotlivé skořápkové plody při využití metody MALDI-TOF MS, tak hlavním cílem této diplomové práce bylo podpořit využitelnost metody MALDI-TOF MS i při analýze reálných produktů, v jejichž složení jsou právě některé ze skořápkových plodů deklarovány. Využita byla rovněž i druhá metoda hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-Q-TOF) se stejným cílem, a sice zjistit přítomnost deklarovaných plodů v produktech. Z technických důvodů ale nebyla provedena prozatím veškerá potřebná měření a na základě toho nelze tak tuto metodu v současné době považovat za (ne)úspěšnou. Nicméně podle získaných dat z MALDI-TOF MS lze konstatovat, že její využití v souvislosti s nastíněnými postupy je v určité podobě zcela jistě možné.

Diskuse na následujících stranách celkově sumarizuje a interpretuje zásadní výsledky této práce, dále rozebírá přínosy i limity práce a uvádí vyplývající implikace pro další výzkumný záměr, eventuálně pro praxi.

První klíčové výsledky vyplývající z experimentální části této diplomové práce se věnují zisku charakteristických hodnot m/z pro pečené varianty skořápkových plodů; stanovené kritérium pro potvrzení unikátní hodnoty m/z bylo zachováno jako u dřívější práce autorky, tj. 13 z 15 hmotnostních spekter (Kadeřábková, 2022). Toto kritérium poskytuje vždy minimálně čtyři unikátní hodnoty m/z (u mandlí), maximálně bylo získáno až 26 charakteristických hodnot m/z (u kokosového ořechu). V porovnání se získanými unikátními hodnotami m/z pro syrové varianty shodně zvolených plodů (Kadeřábková, 2022) lze shledat, že teplotně ošetřené vzorky naprosté většiny skořápkových plodů poskytly větší množství charakteristických hodnot m/z . Toto zjištění nejspíše souvisí s tím, že vlivem tepelné denaturace proteinů pravděpodobně došlo k umožnění lepší dostupnosti proteinu při štěpení enzymem trypsinem. Vystavení teplotou způsobilo výskyt nových hodnot m/z , které byly v některých případech i intenzivnější v porovnání s již předtím přítomnými peptidovými markery. U významné části skořápkových plodů lze pozorovat 100% či až téměř 100% překryv původních unikátních hodnot m/z pro plody

v syrovém stavu a pro plody po vystavení vysoké teplotě, s čímž souvisí jejich potvrzení jako druhově specifických. V takovém případě by se měly při využití daného postupu projevit v naměřeném hmotnostním spektru bez ohledu na jejich tepelné zpracování. Zdánlivě to může působit tak, že pokud je absolutní překryv mezi hodnotami, pak není možné určit, zda daný plod (ne)byl pečením vystaven. Avšak s ohledem na povahu většiny hmotnostních spekter lze toto tvrzení částečně vyvrátit. Při podezření přítomnosti konkrétního druhu lze pozorovat obvykle projevení vyššího množství signálů (u teplotně ošetřených) či nižšího počtu signálů (u syrových) patřící unikátním peptidovým fragmentům o příslušné hodnotě m/z .

Problematické může být akceptování určité hodnoty odchylky hledaných charakteristických hodnot m/z , podobně jako v předchozí práci (Kadeřábková, 2022) bylo v naprosté většině pracováno s odchylkou $\pm 0,3 m/z$. Při realizaci experimentální práce došlo k okolnostem, které dovedly k rozhodnutí tolerovanou odchylku zvýšit. Vlivem měření za odlišných podmínek ve smyslu rozdílného stavu kondice přístrojového vybavení MALDI-TOF MS, kdy naprostá většina vzorků pečených skořápkových plodů byla měřena za odlišné intenzity laseru (100 %), a ani tak kvalita hmotnostních spekter se zcela nevyrovnávala kvalitě získaných hmotnostních spekter v předchozí práci autorky (Kadeřábková, 2022). Při porovnávání již dříve naměřených spekter byl odhalen průměrný posun $\pm 0,6 m/z$, s čímž bylo při zpracovávání výsledků operováno i nadále. Tento posun u některých unikátních hodnot (nikoli u všech) o obvykle maximální hodnotě $0,6 m/z$ se navíc projevuje i při následném hodnocení u vytipovaných hodnot ve vzorcích cukroví. Nicméně například u hodnot pro kokos, pro něhož je toto zjištění patrně nejvíce signifikantní se ukazuje, že se nakonec o tak veliký posun většinou nejedná. Například hledané unikátní hodnoty m/z pro kokos v kokosce jsou většinou posunuty jen o $0,4 m/z$, a to pouze jedním směrem, obvykle $+0,4 m/z$, kdy lze i tuto hodnotu považovat za modus, jelikož v porovnávaném souboru se jedná o nejčastěji vyskytovanou hodnotu zmiňovaného posunu. I tento fakt potvrzuje skutečnost, že zjištěný posun hodnot m/z , chceme-li nesoulad mezi charakteristickými hodnotami, vznikl následkem rozdílných podmínek měření před a po servisu přístrojového vybavení MALDI-TOF MS; naměřená hmotnostní spektra pro vzorky cukroví již probíhala ve shodném režimu jako tomu bylo u předchozí práce autorky u referenčních vzorků syrových skořápkových plodů (Kadeřábková, 2022).

Shodný postup (pouze s drobnými úpravami jako je výše navážky či vyšší přidávaný objem pracovního roztoku trypsinu) byl aplikován i na vzorky sedmi druhů cukroví, z čehož jeden z nich představoval při prováděné analýze zcela neznámý vzorek. U čtyř vzorků ze šesti se podařilo potvrdit přítomnost deklarovaných plodů, a to s různou úspěšností, jež se váže na množství získaných unikátních hodnot m/z pro konkrétní druh. Za nejlepší výsledek lze považovat odhalení 100 % unikátních hodnot m/z pro vlašské ořechy (srovnáno s hodnotami v syrovém stavu) ve vzorku skořicových pracen, jelikož je značný překryv mezi unikátními hodnotami, tak v porovnání s vlašskými ořechy v pečeném stavu se jedná o 83% úspěšnost (nalezení pěti ze šesti hodnot). Za velmi úspěšné lze považovat i detekování dvou druhů skořápkových plodů ve vzorku cukroví nesoucí název vaflové rybičky, kdy se jednalo o 83% úspěšnost detekce vlašských ořechů a o 60% úspěšnost detekce deklarovaných mandlí. U vzorků cukroví obsahující kokos byla úspěšnost rovněž poměrně vysoká, a sice v rozmezí 50–70 %, což lze s ohledem na skutečnost, že kokosový ořech je charakterizován 26 unikátními hodnotami m/z , považovat skutečně za úspěšné, jelikož bylo vždy nalezeno minimálně 13 z 26 hodnot m/z .

U dvou zakoupených druhů (kávové zrna a vanilkové rohlíčky) nebyla detekce deklarovaných plodů jednoznačně potvrzena, u vanilkových rohlíčků bylo ručně dohledáno několik objevujících se hodnot patřící lískovým ořechům, nicméně četnost výskytu těchto hodnot byla velmi nízká (jen čtyři hodnoty v rámci deseti porovnávaných hmotnostních spekter), obdobně byly dohledávány hodnoty deklarovaných vlašských ořechů, které byly nalezeny jen v polovině hmotnostních spekter, což nelze považovat za dostatečně přesvědčivé. Zde se i nabízí konfrontace s uváděnými informacemi od výrobce, kdy sám výrobce deklaruje přítomnost dvou druhů ořechů a umisťuje je na prvním místě ve složení (*cf.* Příloha č. 1). Výsledky nenaznačují, že by obsah, ať už vlašských či lískových ořechů, byl poměrově vyšší vůči ostatním ingrediencím. Navíc ani nedošlo k dostatečnému projevení přítomných ořechů na základě využitého postupu při analýze, lze tak usuzovat, že jejich poměr vůči ostatním ingrediencím je naopak nižší. Pořadí ingrediencí tedy výrobce uvádí nevhodně až možná zbytečně matoucím dojmem, že je obsah ořechů významnější než například u ostatních druhů cukroví.

U vzorku cukroví, toho času s neznámým složením, byl identifikován jen jeden přítomný skořápkový plod, a sice vlašské ořechy ve dvou charakteristických hodnotách ze šesti, přestože se může zdát úspěšnost jakkoliv nízká, výsledek lze považovat za uspokojivý. Důvodem nalezení nižšího počtu unikátních hodnot m/z může být přítomnost většího množství vajec ve vzorku, jež mohla způsobit potlačení dalších projevů charakteristických peptidových fragmentů pro vlašské ořechy. Výsledkem je tedy správné odhalení přítomného plodu, i přestože se prokázalo nižším počtem charakteristických hodnot m/z . Při hledání potvrzení přítomnosti deklarovaných plodů ve vzorcích vánočního cukroví byla u každého druhu potvrzena (v některých případech vícekrát, nicméně vždy vůči jinému plodu) i tzv. náhodná shoda s nějakým dalším (nedeklarovaným) skořápkovým plodem. Jednalo se vždy o objevení pouze jediné hodnoty, nikoli více, proto lze tyto hodnoty klasifikovat skutečně jako jen náhodné (případně jako falešně pozitivní) s eventuální možností, že hodnota m/z se shoduje s projeveným peptidovým fragmentem patřící jiné ingredienci (např. vejci, mouce, mléku či dalším složkám). Přítomnost ostatních ingrediencí může, jak již bylo zmíněno výše, způsobovat neprojevení veškerých přítomných peptidů o známé (unikátní) hodnotě m/z .

Výsledná data získaná z měření LC-ESI-Q-TOF MS prozatím neukazují jasné výsledky, které by se relevantně daly diskutovat, respektive i porovnávat s výsledky z MALDI-TOF MS. Ukázalo se, že získané informace o zaznamenaných peptidových fragmentech nelze příliš dobře porovnávat s druhou využitou metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, kdy se i uvádí jejich vzájemné shody v nižších desítkách procent, což vychází ze zkušenosti Laboratoře aplikované proteomiky na VŠCHT Praha (Kuckova *et al.*, 2023), ale také i ze zkušeností jiného pracovního kolektivu (Kuzyk *et al.*, 2009), k čemuž je ale zapotřebí dodat, že v obou případech byl předmětem analýzy jiný materiál (Kuckova *et al.*, 2023; Kuzyk *et al.*, 2009). Za jednoznačný limit tohoto postupu lze považovat momentální nemožnost získat data pro referenční skořápkové plody, poněvadž při vytvoření základních (porovnávacích) databází charakteristických hodnot m/z a aminokyselinových sekvencí pro referenční skořápkové plody (respektive odpovídající rostliny) pomocí LC-ESI-Q-TOF MS by mohlo být možné porovnávat hodnoty a naměřená data v rámci jedné metody s mnohem vyšší přesností.

Snaha verifikovat obě využití metody nebyla stoprocentně naplněna kvůli technickým obtížím na pracovišti, nicméně určité limity práce nabízí samozřejmě potenciální možnost zlepšení celkového pohledu na výsledky, ať již ve smyslu obou metod jednotlivě či s budoucí možností jejich porovnání. Obecně vzato by pro „lepší“ výsledky mohla pomoci úprava postupu před štěpením vzorků, a sice přistoupení například k extrakci připravených vzorků, jak uvádí mimo jiné i kolektiv Luparelli *et al.* (2023). Rovněž může pomoci prodloužení délky doby enzymatického štěpení či zvýšení teploty (Luparelli *et al.*, 2023), což ale na druhou stranu již může lehce komplikovat navrhovaný postup při potenciálním využití řekněme u rutinního testování dokazující přítomnost konkrétních skořápkových plodů ve vzorku určité potraviny.

Z hlediska měření za pomoci LC-ESI-Q-TOF MS je aktuálně limitující, že nebyla získána potřebná data pro referenční materiál, není tedy zcela zřejmé, zdali by tato data významně změnila pohled na implikace vycházející z experimentální části této práce. Z hlediska budoucího výzkumného záměru je tedy směřování v tomto ohledu prozatím patrné, a sice vytvořit proteomické databáze pro referenční rostliny (respektive analyzované skořápkové plody) tak, aby bylo s čím porovnávat data získaná touto metodou u reálných vzorků, v jejichž obsahu mohou být analyzované skořápkové plody nalezeny. Samozřejmě, že úpravy v postupu předcházející samotnému štěpení, které by mohly vést k „lepšími“ datům jsou taktéž přípustné. Navíc s potenciálem získat vyšší množství charakteristických hodnot m/z zejména u plodů, u nichž se aktuálně uplatňovaným postupem „*rovňou prováděného štěpení trypsinem*“ získalo nižší počet unikátních hodnot m/z . Nicméně i bez předchozí extrakce v postupu před samotným štěpením se ukazuje postup na příkladu potravin, i když živočišného původu, jako vhodný a funkční (Kuckova *et al.*, 2019; Kuckova *et al.*, 2023). Tento pohled navíc podporuje již výše uvedené stanovisko, takový postup totiž celkově může pak znesnadňovat možnost implementovat postup do kontroly kvality na průmyslové úrovni, přičemž možná využitelnost v praxi je samozřejmě důležitá stejně tak jako vědecký záměr, jež byl výše na této straně rovněž nastíněn.

Přestože se může na první pohled zdát, že cíle bylo dosaženo s výsledky nevykazující vysokou míru úspěšnosti použitých metod, tato práce poskytuje veliké množství dat, které jsou nadále využitelné pro navazující výzkumnou práci s ohledem na potenciální možnost

rychlého odhalení přítomnosti skořápkových plodů v komerčně dostupných produktech jako je pečivo, tyčinky či jiné sladkosti a další výrobky. Takové uplatnění je pro tyto potraviny velmi vhodné s ohledem na to, že skořápkové plody patří mezi významné alergeny v potravinách, jež se kromě rozlišení na arašídy a další skořápkové plody prozatím nijak dále nerozlišují.

Závěr

V této diplomové práci bylo řešeno téma věnující se možnostem proteomické identifikace skořápkových plodů v reálných produktech, což bylo experimentálně realizováno na příkladu vánočního cukroví.

V první řadě byla analýza realizována za pomoci MALDI-TOF MS s následným zpracováním dat v programu mMass a v objektově-relačním databázovém systému PostgreSQL. Prvotně bylo cílem získat charakteristické markery (hodnoty m/z) pro jedenáct skořápkových plodů po teplotním ošetření, které mohou sloužit pro další hodnocení reálných produktů. Za pomoci tohoto postupu se podařilo získat celkově dostatečné množství unikátních hodnot m/z , které by spolehlivě prokazovaly přítomnost konkrétního druhu skořápkového plodu. V porovnání se získanými unikátními hodnotami m/z pro skořápkové plody v syrovém stavu lze konstatovat, že vystavení plodů teplotě, simulující pečení cukroví či pečiva obecně, většinou zajistilo bohatší hmotnostní spektra, z nichž bylo získáno většinou i o něco více charakteristických hodnot m/z . Využitý postup aplikovaný i na reálné produkty vánočního cukroví se ukázal úspěšný u čtyř ze šesti komerčních vzorků, správně byla identifikována i přítomnost vlašských ořechů u neznámého (toho času při analýze) vzorku domácího cukroví. Přestože se při hodnocení objevovaly opakovaně u všech druhů cukroví i náhodné shody s charakteristickými hodnotami m/z pro nedeklarované plody, jednalo se vždy pouze o jedinou shodu s daným plodem, což nelze považovat za potvrzení přítomnosti daného skořápkového plodu ve vzorku.

Ne vždy se za pomoci výše uvedeného postupu podařilo identifikovat veškeré unikátní hodnoty m/z ve vzorku, což je přirozeně dáno tím, že ve vzorcích nejsou skořápkové plody majoritní složkou a vzorky cukroví obvykle obsahují i další na proteiny bohaté složky jako je například vejce nebo mouka. Proto následovala ještě druhá část analýzy provedena pomocí LC-ESI-Q-TOF MS, nicméně vlivem technických problémů byla naměřena data pouze pro vzorky cukroví. Tato data poskytují veliké množství detailních informací o nalezených peptidech, potažmo i následně proteinech, ale přece nemohla být využita tak, jaký byl jejich původní záměr. Důvodem toho je v současné době absentující proteomický popis skořápkových plodů, s nimiž by bylo možné naměřená data porovnávat, mezi velmi dobře popsané rostliny patří například pšenice setá, jež se také projevila ve vzorcích, v nichž byla

výrobce deklarována, ale rostliny odpovídající analyzovaným skořápkovým plodům nikoli.

Data z LC-ESI-Q-TOF MS byla využita ještě pro porovnání s charakteristickými hodnotami m/z , které byly získány z MALDI-TOF MS. Hledaný překryv hodnot dopadl dle očekávání, a sice bylo nalezeno jen několik hodnot, které by si navzájem mohly odpovídat. S ohledem na pozorované zvětšení odchylky mezi hodnotami již při hodnocení dat z MALDI-TOF MS, byly i v případě porovnávání hledány hodnoty s průměrně vyšší odchylkou. Mezi potenciálně možnými shodami byly nalezeny proteiny spíše enzymatického charakteru, které plní (nejen) v rostlinném těle celou řadu funkcí na buněčné úrovni.

Ačkoli se dá závěrem konstatovat, že výsledky této diplomové práce nepřináší stoprocentně prokazatelná data dokazující jednoznačnou možnost využití jedné, druhé či obou metod hmotnostní spektrometrie. Postup, u něž bylo využito MALDI-TOF MS ukazuje možnost využití při kontrole kvality v praxi, jelikož se jedná o relativně rychlý a ekonomicky méně náročný postup, který již na poměrně malém počtu vzorků ukazuje nemalou úspěšnost detekce. Druhý (prozatím) nedokončený postup nelze v současné době s výsledky z MALDI-TOF MS relevantně porovnávat, nicméně má patrně vyšší potenciál pro svou značnou přesnost a citlivost, na druhou stranu se jedná o nákladnější a časově náročnější postup při zavádění, řekněme do průmyslových podmínek.

Na samotný závěr je nutné dodat, že předkládaná diplomová práce přináší výsledky a informace, které momentálně přispívají k potřebě dalšího výzkumu v této oblasti. Například rozšíření množství analyzovaných (reálných ale i modelových) vzorků by mohlo být klíčem, jak mnohem lépe zhodnotit úspěšnost využitého postupu i konkrétní metody s podstatně vyšší vypovídající hodnotou pro praktické využití při kontrole kvality potravin. Další (navazující) výzkum navíc nemusí zůstat pouze u samotných skořápkových plodů ale může zahrnovat i další rostlinné složky potravy, které jsou podobně jako ořechy významnými alergeny.

Seznam použitých zkratk

2D	dvoudimenzionální (two-dimensional)
AACS	System správní pomoci a spolupráce (Administrative assistance and cooperation system)
ACN	acetonitril (acetonitrile)
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
APCI-MS	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry)
AV ČR	Akademie věd České republiky (Czech Academy of Sciences)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
CA	klastrová analýza (cluster analysis)
DDM	dům dětí a mládeže (youth centre)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5-dihydroxybenzoic acid)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (enzyme-linked immunosorbent assays)
El	eluční roztok (elution solution)
Eq	ekvilibrační roztok (equilibration solution)
ES	Evropská komise (European Commission)
EU	Evropská unie (European Union)
FAOSTAT	Organizace pro výživu a zemědělství - statistická databáze (Food and agriculture organization corporate statistical database)
FID	plamenoionizační detektor (flame ionization detector)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HCA	hierarchická shluková analýza (hierarchical cluster analysis)

HILIC-ESI-IT-TOF	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací, dobou zachycení iontů a analyzátozem doby letu (hydrophilic liquid chromatography electrospray ionization ion trap time-of-flight)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
INC	Mezinárodní rada ořechů a sušeného ovoce (International nut & dried fruit council)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LC-ESI	kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací (liquid chromatography electrospray ionization)
LC-ESI-Q-TOF	kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací, kvadrupólem a analyzátozem doby letu (liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight)
LDA	lineární diskriminační analýza (linear discriminant analysis)
LDL	nízkodenzitní lipoproteinové částice (low density lipoprotein)
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight)
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti iontu ku náboji (mass-to-charge ratio)
Mr	relativní molekulová hmotnost (relative molecular mass)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MŠMT	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy (Ministry of education, youth and sports)
NMR	nukleární magnetická resonance (nuclear magnetic resonance)
NPI	Národní pedagogický institut (National pedagogical institute)
NÚV	Národní ústav pro vzdělávání (National institute for education)

PCA	analýza hlavních komponent (principle component analysis)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PLS	parciální regrese nejmenších čtverců (partial least squares)
RVP	Rámcový vzdělávací program (Framework educational programme)
RVP ZV	Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání (Framework educational programme for primary and lower secondary education)
SQL	strukturovaný dotazovací jazyk (structured query language)
ŠVP	Školní vzdělávací program (School educational programme)
TAG	triacylglyceroly (triacylglyceroles)
TFA	kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
USA	Spojené státy americké (United States of America)
UV	ultrafialové záření (ultraviolet radiation)
W	vlhčící roztok (wetting solution)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organization)

Seznam použité literatury

- AACS. (2018). *The EU food fraud network and the system for administrative assistance - food fraud - Annual report 2018*. Získáno 3.8.2023 z: https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-05/ff_ffn_annual-report_2018.pdf
- AACS. (2022). *2022 Annual report - Alert and cooperation network*. Získáno 26.3.2024 z: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-10/acn_annual-report_2022.pdf
- Adamová, B. (2021). *Úroda ořechů v roce 2020/2021*. Svět Plodů. Získáno 20.9.2023 z: <https://www.svetplodu.cz/clanek/29/uroda-orechu-v-roce-2020-2021/>
- Agyemang-Yeboah, F. (2011). Health benefits of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seeds and coconut consumption. In V. Preedy (Ed.), *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>
- Alasalvar, C. & Shahidi, F. eds., (2008). *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. (1st edition). CRC Press.
- Alphan, E., Pala, M., AÃ § kurt, F. & Yilmaz, T. (1996). 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>
- Aschemann-Witzel, J., Gantriis, R. F., Fraga, P. & Perez-Cueto, F. J. A. (2021). Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18), 3119–3128. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793730>
- Asci, S. & Devadoss, S. (2021). Trends and issues relevant for the US tree nut sector. *Choices*, 36(2), 1–7. <https://www.jstor.org/stable/27098588>
- AV ČR. (2024). Otevřená věda. *Středisko společných činností Akademie věd ČR, v. v. i.* Získáno 2.1.2024 z: <https://www.otevrenaveda.cz/cs/index.html>
- Azadmard-Damirchi, S., Emami, S. H., Hesari, J., Peighambardoust, S. H. & Nemati, M. (2011). Nuts composition and their health benefits. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5(9), 544–548.
- 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>
- Barreira, J. C. M., Casal, S., Ferreira, I. C. F. R., Peres, A. M., Pereira, J. A. & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Supervised chemical pattern recognition in almond (*Prunus dulcis*) portuguese PDO cultivars: PCA- and LDA-based triennial study. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9697–9704.
<https://doi.org/10.1021/jf301402t>
- Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks Jr, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J. & Snyder, P. W. (2011). Plant-derived fatty acid oils as used in cosmetics. *Final Report*, 1–100.
- Bennion, E. B., Bamford, G. S. T. & Bent, A. J. (1997). Nuts used in confectionery. In E. B. Bennion, G. S. T. Bamford, & A. J. Bent (Eds.), *The Technology of Cake Making* (pp. 128–140). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6690-5_12
- Beranová, M. (2005). *Jídlo a pití v pravěku a starověku*. Academia.
- Bonku, R. & Yu, J. (2020). Health aspects of peanuts as an outcome of its chemical composition. *Food Science and Human Wellness*, 9(1), 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.12.005>
- 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>
- Bruker. (2023). MTP targets Bruker Daltonics. *Bruker store*. Získáno 23.2.2023 z: <https://store.bruker.com/products/mtp-targets>
- Campmajó, G. & Núñez, O. (2021). Authentication of nut and seed products. In *Chromatographic and Related Separation Techniques in Food Integrity and Authenticity* (pp. 129–155). World scientific (Europe).
https://doi.org/doi:10.1142/9781786349972_0005
- Campmajó, G., Saez-Vigo, R., Saurina, J. & Núñez, O. (2020). High-performance liquid chromatography with fluorescence detection fingerprinting combined with chemometrics for nut classification and the detection and quantitation of almond-based product adulterations. *Food Control*, 114, 107265.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107265>
- Casas-Agustench, P., Salas-Huetos, A. & Salas-Salvadó, J. (2011). Mediterranean nuts: origins, ancient medicinal benefits and symbolism. *Public Health Nutrition*, 14(12A), 2296–2301. <https://doi.org/10.1017/S1368980011002540>
- Chalupa, R. & Nesměrák, K. (2014). Chemofobie, veřejný obraz chemie a co s tím. *Chemické listy*, 108(10), 995–1000. Získáno z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/460>
- 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>

- Cowan, N. (2001). The magical number 4 in short-term memory: A reconsideration of mental storage capacity. *Behavioral and Brain Sciences*, 24(1), 87–114. <https://doi.org/10.1017/s0140525x01003922>
- 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>
- Cubero-Leon, E., De Rudder, O. & Maquet, A. (2018). Metabolomics for organic food authentication: Results from a long-term field study in carrots. *Food Chemistry*, 239, 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.161>
- Čížková, H. (2019). Úvod do problematiky falšování potravin. *PotravinInfo.cz*. Získáno 2.8.2023 z: <https://www.potravininfo.cz/33/uvod-do-problematiky-falsovani-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EkANU95wg9VMPNKotn835R-w9PBWuC7BmQ/?query=%DAvod%20do%20problematiky%20fal%B9ov%E1n%E1D%20potravin&serp=1>
- Čížková, H., Ševčík, R., Rajchl, A., Pivoňka, J. & Voldřich, M. (2012). Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy*, 106(10), 903–910. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/830>
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V. & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85(Part A), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- DDM hl. m. Prahy. (2024). Domovská stránka nabídky volnočasových aktivit DDM hl. m. Prahy. *Dům dětí a mládeže hl. m. Prahy*. Získáno 2.1.2024 z: <https://ddmpraha.cz/>
- 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>
- Dong, X. Y., Zhong, J., Wei, F., Lv, X., Wu, L., Lei, Y., Liao, B. S., Quek, S. Y. & Chen, H. (2015). Triacylglycerol composition profiling and comparison of high-oleic and normal peanut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2580-5>
- Dostálová, J. & Kadlec, P. (2014). *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin* (1. vydání). Key Publishing.
- Dreskin, S. C., Koppelman, S. J., Andorf, S., Nadeau, K. C., Kalra, A., Braun, W., Negi, S. S., Chen, X. & Schein, C. H. (2021). The importance of the 2S albumins for allergenicity and cross-reactivity of peanuts, tree nuts, and sesame seeds. *Journal of*

- Allergy and Clinical immunology*, 147(4), 1154–1163.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.004>
- Drnková, B. (2019). *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Grada Publishing.
- dTest. (2017). Srovnání: Proteinové tyčinky. *Časopis DTest*, 6, 50–57. Získáno 12.9.2023 z: <https://www.dtest.cz/clanek-5911/srovnani-proteinove-tycinky>
- Eslami, O., Shidfar, F. & Dehnad, A. (2019). Inverse association of long-term nut consumption with weight gain and risk of overweight/obesity: a systematic review. *Nutrition Research*, 68, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.04.001>
- Eurydice. (2023a). Primární a nižší sekundární vzdělávání (Základní vzdělávání). *European commission website*. Získáno 13.12.2023 z: <https://eurydice.eacea.ec.europa.eu/cs/national-education-systems/czechia/primarni-nizsi-sekundarni-vzdelavani-zakladni-vzdelavani>
- Eurydice. (2023b). Vyšší sekundární vzdělávání a postsekundární neterciární vzdělávání (Střední vzdělávání). *European commission website*. Získáno 13.12.2023 z: <https://eurydice.eacea.ec.europa.eu/cs/national-education-systems/czechia/vyssi-sekundarni-vzdelavani-postsekundarni-neterciarni>
- FAOSTAT. (2021). Production data: countries by commodity. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Získáno 20.9.2023 z: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
- Fernan, C., Schuldt, J. P. & Niederdeppe, J. (2018). Health halo effects from product titles and nutrient content claims in the context of “protein” bars. *Health Communication*, 33(12), 1425–1433. <https://doi.org/10.1080/10410236.2017.1358240>
- Fuchs, M. (2013). *Potravinové alergie*. Maxdorf.
- Gallagher, M. & Thomas, I. (2010). Food Fraud: The deliberate adulteration and misdescription of foodstuffs. *European Food and Feed Law Review*, 5(6), 347–353.
- 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>
- Gómez-Ríos, G. A., Vasiljevic, T., Gionfriddo, E., Yu, M. & Pawliszyn, J. (2017). Towards on-site analysis of complex matrices by solid-phase microextraction-transmission mode coupled to a portable mass spectrometer via direct analysis in real time. *Analyst*, 142(16), 2928–2935. <https://doi.org/10.1039/C7AN00718C>

- 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>
- Herrero, M., Simó, C., García-Cañas, V., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2012). Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(1), 49–69. <https://doi.org/10.1002/mas.20335>
- Herynek, P. (2010). *České Vánoce v kuchyni*. Argo spol. s.r.o.
- Hieke, K. (2008). *Encyklopedie jehličnatých stromů a keřů*. Computer Press.
- Hlavatá, K. (2015). Výživa ve zdraví i nemoci - Ovoce. In K. Vízner (Ed.), *Kazuistiky v angiologii*, 2(3), s. 20–22. <https://www.geum.org/files/shop-archiv-casopisu/pdf/51.pdf#page=20>
- Hlavatá, K. (2018). *Potravinová pyramida ve světě i u nás. Jaká má být denní skladba stravy? Víím, co jím*. Získáno 22.9.2023 z: https://www.vimcojim.cz/magazin/clanky/o-vyzive/Potravinova-pyramida-ve-svete-i-u-nas.-Jaka-ma-byt-denni-skladba-stravy__s10010x11012.html
- 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>
- Hudecová, D. (2004). Mezipředmětové vztahy – malé zamyšlení nad terminologií. In: *Mezipředmětové vztahy – malé zamyšlení nad terminologií*. www.msmt.cz/file/9647_1_1/
- INC International nuts & dried fruit. (2020). *Nuts & dried fruits. Statistical yearbook 2019/2020*. INC International nuts & dried fruit. Získáno 22.9.2023 z: https://inc.nutfruit.org/wp-content/uploads/2021/09/1594640174_INC_Statistical_Yearbook_2019-2020.pdf
- 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>
- Jackson, C. L. & Hu, F. B. (2014). Long-term associations of nut consumption with body weight and obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 408S–411S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071332>
- Jagdale, Y. D., Mahale, S. V., Zohra, B., Nayik, G. A., Dar, A. H., Khan, K. A., Abdi, G. & Karabagias, I. K. (2021). Nutritional profile and potential health benefits of super foods: A review. *Sustainability*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/su13169240>

- Jardim, T., Domingues, M. R. M. & Alves, E. (2023). An overview on lipids in nuts and oily fruits: oil content, lipid composition, health effects, lipidomic fingerprinting and new biotechnological applications of their by-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2208666>
- Johnstone, A. H. (1982). Macro and microchemistry. In *Chemistry in Britain* 18(6), 409–410.
- Johnstone, A. H. (1991). Why is science difficult to learn? Things are seldom what they seem. *Journal of Computer Assisted Learning*, 7(2), 75–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2729.1991.tb00230.x>
- Johnstone, A. H. (2010). You can't get there from here. *Journal of Chemical Education*, 87(1), 22–29. <https://doi.org/10.1021/ed800026d>
- Kadeřábková, L. (2022). *Využití hmotnostní spektrometrie při proteinové analýze vybraných skořápkových plodů* [Bakalářská práce]. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra chemie a didaktiky chemie. Vedoucí práce: Kučková, Š. <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/172620/130327816.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kadlec, P., Melzoch, K. & Voldřich, M. (2012). Přehled tradičních potravinářských výrob. In *Ostrava: Key Publishing* (1. vydání). Key Publishing.
- Kamal-Eldin, A. & Moreau, R. A. (2009). 3 - Tree nut oils. In R. A. Moreau & A. Kamal-Eldin (Eds.), *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils* (pp. 127–149). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-97-4.50009-7>
- Kirg, R. & Kučková, Š. (2022). Návod na instalaci a nalezení unikátních hodnot m/z pro metody MALDI-TOF a LC-MS/MS. *Interní laboratorní materiál Laboratoře aplikované proteomiky VŠCHT Praha*. Získáno 4.10.2023.
- Kleiner, S. (1999). Water: an essential but overlooked nutrient. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 200–206. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00048-6)
- Kuckova, S., Meledina, A., Soucek, F., Straka, D. & Smirnova, T. A. (2023). Rapid determination of animal origin and type of fish meat processing using proteomic species-specific markers. *SSRN 4424843*. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4424843>
- Kuckova, S., Zitkova, K., Novotny, O. & Smirnova, T. (2019). Verification of cheeses authenticity by mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 42(22), 3487–3496. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900659>
- Kuzyk, M. A., Ohlund, L. B., Elliott, M. H., Smith, D., Qian, H., Delaney, A., Hunter, C. L. & Borchers, C. H. (2009). A comparison of MS/MS-based, stable-isotope-labeled, quantitation performance on ESI-quadrupole TOF and MALDI-TOF/TOF mass spectrometers. *Proteomics*, 9(12), 3328–3340. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800412>

- Li, H., Liang, X., Zhou, B., Chen, X., Hong, Y., Zhou, R., Li, S., Liu, H., Lu, Q. & Liu, H. (2020). A proteomic analysis of peanut seed at different stages of underground development to understand the changes of seed proteins. *PLoS One*, *15*(12): : e0243132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243132>
- 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>
- Lizakowski, P. & Krampichowski, A. (2019). Analysis of food safety in the aspect of health. *World Scientific News*, *120*(2), 234–245. <https://worldscientificnews.com/analysis-of-food-safety-in-the-aspect-of-health/>
- Loh, Z. Z., Zaidi, N. S., Syafiuddin, A., Yong, E. L., Boopathy, R., Hong Kueh, A. B. & Prastyo, D. D. (2021). Shifting from conventional to organic filter media in wastewater biofiltration treatment: A review. *Applied Sciences*, *11*(18). <https://doi.org/10.3390/app11188650>
- Luparelli, A., Losito, I., De Angelis, E., Pilolli, R. & Monaci, L. (2023). Multi-Target detection of nuts and peanuts as hidden allergens in bakery products through bottom-up proteomics and high-resolution mass spectrometry. *Foods*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/foods12040726>
- Malik, V. S. & Hu, F. B. (2012). Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: The role of sugar-sweetened beverages. *Current Diabetes Reports*, *12*(2), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0259-6>
- Mansour, F. R. & Khairy, M. A. (2017). Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography B*, *1061–1062*, 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.055>
- McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S. & Allen, K. (2015). The prevalence of tree nut allergy: A systematic review. *Current Allergy and Asthma Reports*, *15*(9), 54. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0555-8>
- McWilliam, V., Perrett, K., Dang, T. & Peters, R. (2020). Prevalence and natural history of tree nut allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *124*(5), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.01.024>
- Medina, S., Perestrelo, R., Silva, P., Pereira, J. A. M. & Câmara, J. S. (2019). Current trends and recent advances on food authenticity technologies and chemometric approaches. *Trends in Food Science & Technology*, *85*, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.017>
- Miller, G. A. (1956). The magical number seven, plus or minus two: Some limits on our capacity for processing information. *Psychological Review*, *63*(2), 81.

- Mind the Graph. (2023). Mind the Graph: Free infographic maker for science [online software]. Získáno 4.1.2024 z: <https://mindthegraph.com/>
- Mingrou, L., Guo, S., Ho, C.-T. & Bai, N. (2022). Review on chemical compositions and biological activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 46(7), e14119. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14119>
- Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H., & Campbell, B. C. (2008). Chapter 6 – Health aspects and antiaflatoxic Activity of phytochemicals in tree Nuts. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds). *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. (1st edition, pp. 95–108). CRC Press.
- Mönch, C., & Markic, S. (2022). Exploring pre-service chemistry teachers' pedagogical scientific language knowledge. *Education Sciences*, 12(4), 244.
- MŠMT. (2021). Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání. <https://www.edu.cz/wp-content/uploads/2021/07/RVP-ZV-2021.pdf>
- MŠMT. (2020). Strategie vzdělávací politiky České republiky do roku 2030+. https://www.msmt.cz/uploads/Brozura_S2030_online_CZ.pdf
- Muley, A., Fernandez, R., Ellwood, L., Muley, P. & Shah, M. (2021). Effect of tree nuts on glycemic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *JBIM Evidence Synthesis*, 19(5). <https://doi.org/10.11124/JBISRIR-D-19-00397>
- Nařízení 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>
- Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.* (2006). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32006R1881>
- Ningtyas, D. W. (2023). Chapter 8 - Plant-based butter like spreads. In S. Prakash, B. R. Bhandari & C. Gaiani (Eds.), *Engineering Plant-Based Food Systems* (pp. 151–166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89842-3.00013-0>
- Nishi, S. K., Sala-Vila, A., Julvez, J., Sabaté, J. & Ros, E. (2023). Impact of nut consumption on cognition across the lifespan. *Nutrients*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/nu15041000>
- Norman, J. (1993). *Ořechy - Neobvyklé přísady do sladkých a kořeněných pokrmů*. Champagne Avantgarde.

- NPI. (2024). Středoškolská odborná činnost. *Národní pedagogický institut České republiky*. Získáno 2.1.2024 z: <https://www.soc.cz/>
- NÚV. (2016). POHYB A VÝŽIVA. Pokusné ověřování změn v pohybovém a výživovém režimu žáků ZŠ. *Národní ústav pro vzdělávání*. Získáno 22.9.2023 z: <http://archiv-nuv.npi.cz/t/pohyb-a-vyziva.html?highlightWords=pohyb+v%25C3%25BD%25C5%25BEiva>
- Pánek, J. (2002). *Základy výživy*. Svoboda Servis.
- Patil, U. & Benjakul, S. (2018). Coconut Milk and Coconut Oil: Their manufacture associated with protein functionality. *Journal of Food Science*, 83(8), 2019–2027. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14223>
- Petty, G. (2013). *Moderní vyučování* (6. přepracované vydání). Portál.
- 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*. Knižní klub.
- Rahmani, N. & Mani-Varnosfaderani, A. (2022). Quality control, classification, and authentication of Iranian rice varieties using FT-IR spectroscopy and sparse chemometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112, 104650. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104650>
- Reyes-Jurado, F., Soto-Reyes, N., Dávila-Rodríguez, M., Lorenzo-Leal, A. C., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E. & López-Malo, A. (2023). Plant-based milk alternatives: types, processes, benefits, and characteristics. *Food Reviews International*, 39(4), 2320–2351. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421>
- Roux, K. H., Teuber, S. S. & Sathe, S. K. (2003). Tree nut allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131(4), 234–244. <https://doi.org/10.1159/000072135>
- Rubert, J., Zachariasova, M. & Hajslova, J. (2015). Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food – a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(10), 1685–1708. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1084539>
- Rusková, J. (2011). Specifika výživy dospívajících. *Pediatric pro praxi*, 12(4), 277–280. <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/04/15.pdf>
- 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). <https://doi.org/10.3390/molecules26154698>
- Sathe, S. K., Monaghan, E. K., Kshirsagan, H. H. & Venkatachalam, M. (2008a). Chapter 2 – Chemical composition of edible nut seeds and its implications in human health. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds). *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. (1st edition, pp. 11–36). CRC Press.
- Sathe, S. K., Sharma, G. M. & Roux, K. H. (2008b). Chapter 4 – Tree nut allergens. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds). *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. (1st edition, pp. 65–84). CRC Press.
- Sheth, J. (2021). New areas of research in marketing strategy, consumer behavior, and marketing analytics: the future is bright. *Journal of Marketing Theory and Practice*, 29(1), 3–12. <https://doi.org/10.1080/10696679.2020.1860679>
- Shulman, L. S. (1986). Those who understand: knowledge growth in teaching. *Educational Researcher*, 15(2), 4–14. <https://dx.doi.org/10.3102/0013189X015002004>
- 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>
- Skalková, J. (1999). *Obečná didaktika*. ISV nakladatelství.
- Song, S., Cheong, L.-Z., Wang, H., Man, Q.-Q., Pang, S.-J., Li, Y.-Q., Ren, B., Wang, Z. & Zhang, J. (2018). Characterization of phospholipid profiles in six kinds of nut using HILIC-ESI-IT-TOF-MS system. *Food Chemistry*, 240, 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.021>
- Spherical Insights. (2023). Global nut products market. *Spherical Insights Report*. Získáno 22.9.2023 z: <https://www.sphericalinsights.com/reports/nut-products-market>
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2000). *Tisková zpráva: Kontrola správnosti označování potravin („falšování“ potravin)*. SZPI. Získáno 2.8.2023 z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/kontrola-spravnosti-oznacovani-potravin-falsovani-potravin.aspx>
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2015a). *Falšování potravin - aktuální problém?* UniConsulting. Získáno 2.8.2023 z: http://www.uniconsulting.cz/download/pdf/SZPI_falsovani_potravin_final.pdf
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2015b). *Podvody v oblasti potravin - Informace a rady spotřebitelům*. SZPI. Získáno 3.8.2023 z:

<https://www.szpi.gov.cz/clanek/podvody-v-oblasti-potravin-informace-a-rady-spotrebitelum.aspx>

- Storzer, P. (2022). *Česko jako první země EU definuje dvoji kvalitu potravin jako nelegální*. Právo pro všechny zastřešeno D.A.S. Získáno 2.8.2023 z: <https://www.pravoprovsechny.cz/clanky/zakaz-dvoji-kvality-potravin/>
- 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.
- Tan, J. & Xu, J. (2020). Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: A review. *Artificial Intelligence in Agriculture*, 4, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.aiia.2020.06.003>
- Taş, N. G. & Gökmen, V. (2015). Profiling triacylglycerols, fatty acids and tocopherols in hazelnut varieties grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.010>
- Ternus, M. E., Lapsley, K. & Geiger, C. J. (2008). Chapter 3 – Health benefits of tree nuts. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds). *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals and Health Effects*. (1st edition, pp. 37–36). CRC Press.
- Torricelli, M., Pierboni, E., Rondini, C., Altissimi, S. & Haouet, N. (2020). Sesame, pistachio, and macadamia nut: development and validation of new allergenic systems for fast real-time PCR application. *Foods*, 9(8), 1085. <https://doi.org/10.3390/foods9081085>
- Tournas, V. H., Niazi, N. S. & Kohn, J. S. (2015). Fungal presence in selected tree nuts and dried fruits. *Microbiology Insights*, 8, 1–6. <https://doi.org/10.4137/MBI.S24308>
- Towell, R. (2009). Peanuts, Legumes, Seeds and Tree Nuts. In *Food Hypersensitivity* (pp. 166–182). <https://doi.org/10.1002/9781444312119.ch8>
- U.S. Department of Agriculture. (2022). Food data central. *U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service*. Získáno 28.8.2023 z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/>
- UniProt. (2024). Získáno 15.3.2024 z: <https://www.uniprot.org/>
- Valíček, P. (2002). *Užitkové rostliny tropů a subtropů* (2. upravené vydání). Academia.
- Varol, Ö. & Tatlı, 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>
- 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. & Sathe, S. K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4705–4714. <https://doi.org/10.1021/jf0606959>
- 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>
- Wadood, S. A., Boli, G., Xiaowen, Z., Hussain, I. & Yimin, W. (2020). Recent development in the application of analytical techniques for the traceability and authenticity of food of plant origin. *Microchemical Journal*, 152, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104295>
- WHO. (2021). WHO urges governments to promote healthy food in public facilities. *World Health Organization*. Získáno 22.9.2023 z: <https://www.who.int/news/item/12-01-2021-who-urges-governments-to-promote-healthy-food-in-public-facilities>
- Zákon č. 634/1992 Sb. Zákon o ochraně spotřebitele (1992). <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-634>
- Zákon č. 110/1997 Sb. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů (1997). <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>
- Zdraví z přírody. (n.d.). Alaburky pražené 100g ZP. Popis a detaily produktu. *Zdraví z přírody.cz*. Získáno 30.8.2023 z: <https://www.zdravizprirody.cz/alaburky/904-alaburky-prazene-100g-zp-8594046765709.html>
- Zhang, W., Sun, L., Wang, Y., Zhao, M., Zhang, Q., Li, X., Tian, W., Liu, M. & Zhang, Q. (2021). Identification of significant potential signaling pathways and differentially expressed proteins in patients with wheat intolerance based on quantitative proteomics. *Journal of Proteomics*, 246, 104317. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104317>
- Zhao, F., Liu, J., Wang, X., Li, P., Zhang, W. & Zhang, Q. (2013). Detection of adulteration of sesame and peanut oils via volatiles by GC × GC–TOF/MS coupled with principal components analysis and cluster analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(3), 337–347. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200133>
- Zhao, L., Zhang, B., Huang, H., Huang, W., Zhang, Z., Wang, Q., Luo, H. & An, B. (2023). Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into metabolic networks during cashew fruit development and ripening. *Food Chemistry*, 404, 134765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134765>

Seznam příloh

Příloha 1: Složení zakoupeného vánočního cukroví (uváděné výrobcem).

Příloha 2: Hmotnostní spektra pro všech jedenáct skořápkových plodů (teplotně ošetřených).

Příloha 3: Vytipované hodnoty m/z pro jednotlivé vzorky analyzovaného vánočního cukroví, jež sloužily k porovnání s unikátními hodnotami m/z pro referenční skořápkové plody.

Příloha 4: Kompletní přehled dat získaných z měření LC-ESI-Q-TOF MS po srovnání s rostlinnou databází proteinů (UniProt).