

UNIVERZITA KARLOVA
PEDAGOGICKÁ FAKULTA

Proteinové složení mouk a pekárenských
výrobků

Katedra chemie a didaktiky chemie

Vypracovala: Kristýna Rychlovská

Vedoucí práce: PhDr. Martin Čapek Adamec, Ph.D.

Konzultantka: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Hrdličková Kučková, Ph.D.

2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Proteinové složení mouk a pekárenských výrobků vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., zákona o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, ve znění pozdějších předpisů.

Datum

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní doc. Mgr. Ing. Štěpánce Hrdličkové Kučkové, Ph.D., a panu PhDr. Martinu Čapku Adamcovi, Ph.D., za jejich odborné rady, přátelský a lidský přístup, trpělivost a společně strávený čas.

Děkuji rodině za všestrannou podporu a umožnění studia.

Abstrakt

Cílem této práce bylo provedení analýzy proteinového složení mouk a pečiva z různých druhů rostlin pomocí metody peptidového mapování. Vzorky byly analyzovány metodami LC/ESI-Q-TOF a výsledná spektra byla porovnána s dostupnými databázemi rostlinných proteinů. Původ nalezených rostlin byl diskutován z hlediska spolehlivosti metody v dané skupině i s ohledem na taxonomické vztahy. Výsledky analýz byly srovnány se složením deklarovaným výrobcem a bylo zhodnoceno, zda u daného typu výrobku lze použitou metodikou verifikovat toto složení.

V případě kukuřice seté (*Zea mays*) byla tato metoda shledána jako spolehlivá, ve výsledku kukuřičného výrobku byly nalezeny pouze proteiny z kukuřice. U rýže seté (*Oryza sativa*) a hrachu setého (*Pisum sativum*) byly nalezen jeden, respektive dva proteiny z rostliny jiného původu, ale přesto lze metodiku i v těchto případech považovat rovněž za spolehlivou. U obilovin byla použitá metodika shledána jako méně spolehlivá, lze sice dobře rozlišit, že vzorek pochází z lipnicovitých rostlin (*Poaceae*), ale v nižších taxonomických jednotkách (už od taxonu rodu) nelze původ proteinů deklarovat. Tato skutečnost je v práci široce diskutována, příčina pravděpodobně spočívá v přílišné příbuznosti jednotlivých lipnicovitých rostlin – identifikace proteinu ze společné části genomu (a proteomu) naráží na limity metody.

klíčová slova: metoda proteinového mapování, mouka, pečivo, pšenice, žito, kukuřice, rýže

Abstract

The aim of this study was to carry out an analysis of a protein composition of different crop species using the method of peptide mass mapping. The samples were analysed using analytical method LC/ESI-Q-TOF and the acquired spectra were compared with the plant protein databases. The origin of the found plants was discussed in the aspect of the reliability of the used method considering the taxonomical relationships in the taxonomical group. The results of the analysis were compared with the food composition specified by the producer, and it was evaluated, if it is possible to verify the protein composition by using the applied method.

In case of maize (*Zea mays*) this method is considered as reliable, because all of the found proteins were identified as maize proteins. In case of rice (*Oryza sativa*) and pea (*Pisum sativum*), only one, respectively, two proteins of different plants species were found in the number of the relevant plant proteins. This method was evaluated as not so reliable for samples made of cereals (*Poaceae*). It is possible to conclude, whether the product comes from *Poaceae* or not, but it is impossible to verify the taxon of genus or the inferior taxons. This fact was in a great extent discussed in this thesis – the reason is probably the resemblance of *Poaceae*, and the identification of the protein from common part of proteome is limited by the scopes of the used method.

key words: method of peptide mass mapping, flour, bakery products, wheat, rye, maize, rice

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. CÍLE PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 ZEMĚDĚLSTVÍ	11
3.1.1 VZNIK ZEMĚDĚLSTVÍ.....	11
3.1.2 NEJDŮLEŽITĚJŠÍ PLODINY	12
3.1.3 GENETICKÉ ASPEKTY DOMESTIKACE A ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN.....	15
3.2 SLOŽENÍ ROSTLINNÉ POTRAVY ČLOVĚKA.....	17
3.2.1 VYBRANÉ SKUPINY PROTEINŮ.....	20
3.3 SLOŽENÍ MOUK A PEČIVA.....	22
3.3.1 LEGISLATIVNÍ RÁMEC A PLNĚNÍ V PRAXI.....	22
3.3.2 KATEGORIZACE SLOŽENÍ A ZNAČENÍ VÝROBKŮ	23
3.3.3 SPOTŘEBITELSKÉ OMYLY	24
3.3.4 DOBARVOVÁNÍ PEČIVA	24
3.3.5 MRAŽENÍ PEČIVA.....	25
3.3.6 PŘESNÉ SLOŽENÍ NEBALENÝCH VÝROBKŮ	26
3.3.7 POZNÁMKY K VYBRANÝM SUROVINÁM A PRODUKTŮM.....	27
3.4 ANALYTICKÉ METODY.....	28
3.4.1 PRINCIP ANALYTICKÝCH METOD LC/ESI-Q-TOF.....	28
3.4.2 IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ METODY PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	31
4.2 POUŽITÉ VÝROBKY.....	31
4.3 ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ	33
4.3.1 ŠTĚPENÍ TRYPSINEM.....	33

4.3.2 PŘEČIŠTĚNÍ A ZAKONCENTROVÁNÍ PEPTIDOVÝCH ŠTĚPŮ NA REVERZNÍ FÁZI.....	33
4.3.3 IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ LC/ESI-Q-TOF	33
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
5.1 SLOŽENÍ VÝROBKŮ.....	35
5.2 METODIKA INTERPRETACE ZÍSKANÝCH DAT	36
5.3 ROSTLINY PŮVODU IDENTIFIKOVANÝCH PROTEINŮ.....	37
5.3.1 VYSVĚTLENÍ TAXONOMICKÝCH VZTAHŮ.....	39
5.4 ANALYZOVANÉ VÝROBKY	42
5.4.1 MOUKA 1.....	42
5.4.2 MOUKA 2.....	45
5.4.3 MOUKA 3.....	49
5.4.4 MOUKA 4.....	52
5.4.5 MOUKA 5.....	55
5.4.6 MOUKA 6.....	59
5.4.7 PEČIVO 1.....	61
5.4.8 PEČIVO 2.....	64
5.4.9 PEČIVO 3.....	68
5.4.10 PEČIVO 4.....	71
5.4.11 PEČIVO 5.....	74
5.4.12 PEČIVO 6.....	77
5.4.13 PEČIVO 7.....	79
5.4.14 PEČIVO 8.....	82
5.4.15 PEČIVO 9.....	85
5.5 SOUHRNNÁ DISKUZE	88
6. ZÁVĚR	92
7. SEZNAM TABULEK	94
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	96

9. SEZNAM ZKRATEK.....	97
10. POUŽITÁ LITERATURA	98

1. ÚVOD

Zemědělství hrálo v dějinách lidstva větší roli, než se v dnešním „moderním“ světě odpoutaném od přírody může zdát. Člověk odpradáвна trávil podstatnou část roku činnostmi zabezpečujícími potravu. Původní lovecko-sběračské společenství bylo postupně ve většině kultur nahrazeno různými stupni cíleného zemědělství a zásadně tak změnilo podobu životního stylu, vznikla trvalá sídla a rychle narůstal počet lidí. Primitivní národy (ve smyslu původní nedotčené evropskou civilizací) své plodiny považovaly za dar bohů nebo je s božstvy ztotožňovaly, stejně tak naši přímí předkové vykonávali velké množství rituálů spojených s úrodou. Ti, jež dnes nazýváme Kelty, na jaře vítali při Beltine světlou plodnou část roku (dnes Čarodějnice, stavění májek), v srpnu oslavovali úrodu při Lughnasadu (dnes dožínky), při Samhainu se loučili s úrodnou částí roku, sbírali poslední plody, poráželi slabá zvířata, na den otvírali bránu mrtvým a přenechávali vládu zimě a jejím duchům (dnes se tato tradice promítá i do Dušiček a Martinských hodů). Tyto a mnohé další svátky měly anuální rytmus v hlubokém spojení s přírodou. Dávne tradice daly základ mnoha dnešním zvykům a naše doba jim vtiskla dnešní podobu. Tyto zvyky se nezjevují jen ve výjimečných událostech, jako jsou slavnosti, ale zasahují do každodenního života s takovou samozřejmostí, že teprve srovnání s jinými kulturami nebo životem předků může poskytnout nadhled, ze kterého je možné je vidět. Nedílnou součástí naší (a samozřejmě každé jiné) kultury je jídlo – jeho složení, podoba, „životní cyklus“, a všechny zvyky spojené s jeho konzumací. Tato práce budiž úzkým náhledem pomocí moderní technologie, poznatků a dnešních zákonů na toto pomíjené dědictví (v podobě mouk a pečiva).

2. CÍLE PRÁCE

- vypracovat rešerši na téma nejdůležitější zemědělské plodiny a složení mouk a pečiva
- provést analýzy jednotlivých pekárenských výrobků a zpracovat jejich výsledky
- diskutovat původ nalezených rostlinných proteinů
- zhodnotit, zda se výsledky analýzy liší pro jednotlivé typy mouk a pečiva
- zhodnotit, zda danou metodou lze verifikovat deklarované složení výrobků

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ZEMĚDĚLSTVÍ

3.1.1 VZNIK ZEMĚDĚLSTVÍ

Před několika tisíci lety lidstvo prošlo zásadní změnou životního stylu, která měla určující vliv na podobu tehdejšího života a má vliv i na podobu dnešní civilizace. Z lovců a sběračů se postupně stali usedlí zemědělci, nastala tzv. zemědělská revoluce. Postupným šlechtěním se z planých rostlin staly kulturní, tedy domestikované. Nejstarší doklady o domestikaci byly nalezeny na Blízkém Východě, na ostatních místech se domestikace objevila později a vyvíjela se pomaleji. Existují doklady o tom, že v některých oblastech epicentra domestikace nikdy nevznikla, nýbrž sem byl tento trend přišířen z dalších oblastí; naproti tomu některé primitivní (ve smyslu původní) kmeny zůstaly ve způsobu života lovecko-sběračském dodnes. [1]

Po celém světě s výjimkou Austrálie se začaly pěstovat různé místní rostliny, nejprve v tzv. sklizňovém stádiu – sběrači se shromažďovali v daném období v místě, kde dozrávaly. Pěstování rostlin začalo převládat v neolitu (mladší době kamenné). Domestikace rostlin, které se pěstovaly ve střední Evropě, proběhla na Předním východě; a přes Řecko a Balkánský poloostrov a území dnešního Maďarska se plodiny dostaly do našich zemí. [2] Není přitom jasné, zda změnu podnítila migrace zemědělců z oblasti vzniku zemědělství (která určitě alespoň částečně proběhla [3]), nebo se více šířil nový způsob života bez výměny původních obyvatel. Bylo však zjištěno, že tato změna postupovala velice rychle, přeměna životního stylu trvala jen 4–8 generací. [4] Udává se, že díky zemědělství se nejen změnil životní styl lidí, ale také byl umožněn strmý nárůst populace – během generace se až zdvojnásobila. [2]

Následující historický exkurz sleduje čtyři nejdůležitější plodiny, které byly obsaženy ve zkoumaných vzorcích – pšenici, žito, kukuřici a rýži. Největšího významu pro výživu starých národů u nás bez pochyb nabylo obilí.

3.1.2 NEJDŮLEŽITĚJŠÍ PLODINY

OBILNINY

Při sklizni obilí se nejprve používaly nože, od nejstaršího neolitu jsou doloženy srpy nejčastěji obloukovitého tvaru, s rukojetí z kostí, paroží nebo dřeva, s kamennými čepelkami, nahrazených v době bronzové ostřími z bronzu. Po sklizni se obilí vydrolovalo ručně, vymlacovalo klacky, kyji, šlapalo se, přeháněl se přes něj dobytek, vytloukaly se snopy o příčné desky nebo kámen [2, 5]. Cepy jsou známy až od středověku. Obilí se ukládalo do opakovaně používaných jam vymazaných hlínou, popřípadě vypálených, vystlaných či vydřevených. Jámy různých tvarů a velikostí byly známy ještě před osídlení Kelty, za jejich vlády i po příchodu Slovanů. Doklady o brahách (jednoduchých ze stran otevřených staveb), sýpkách nebo stodolách, které jsou na severu a severozápadě Evropy známé už od doby bronzové, jsou u nás přesvědčivé až od středověku. K drcení obilí se používala kamenná drtidla – plochá podložka a třič různého tvaru. Na hrubší šrot se mlelo většími drtidly, na jemnou mouku drtidly menšími a za vyložení mnoha času. Asi od 5. století před naším letopočtem se z Řecka do našich zemí dostaly mlýnky řeckého typu podobné drtidlům. Keltové používali efektivnější mlýnky rotační, Germáni po osídlení našich zemí jejich zvyk nepřejali a většinou používali jednodušší drtidla a teprve od 3. až 4. století našeho letopočtu se opět začaly uplatňovat rotační mlýnky, které pak v upravené podobě používali i Slované. Vodní mlýny jsou na našem území doložené až ve 12. století. [2] Z obilí se připravovaly především kaše a pekly se placky z těst a kaší čerstvých, kvašených, z mléka nebo vody. Ve starších nálezech byly i malé chleby z kvašeného těsta nejprve zadělávány pravděpodobně kyselým mlékem, běžnou potravinou se chléb stal až pro příchozí Slované. Staří Slované také již s jistotou znali sladké pečivo – koláče a pirogy s medem. [3]

Pšenice

V neolitu (mladší době kamenné) se v našich podmínkách pěstovala především pšenice dvouzrnka. Často se sela ve směsi s pšenicí jednozrnkou, jejíž podíl se během doby bronzové snižoval. Tyto pšenice byly pluchaté, zrno nevypadávalo samo z klasu, vřeteno klasu bylo značně lámavé, bylo nutné plodinu velmi pracně odpluchovávat (jak se ukázalo,

mechanicky složité odpluchování může být značně usnadněno zahřátím nebo namočením obilek [3]). Během prvního tisíciletí před naším letopočtem pluchaté pšenice mizí, i když existují i středověké nálezy těchto pšenic (pravděpodobně se udržovala jako plevel). Postupně se s vylepšujícím se zemědělstvím šířilo i pěstování náročnějších bezpluchých pšenic (pšenice setá – *Triticum aestivum*, pšenice shloučená – *Triticum compactum*). Pšenici setou začali více pěstovat Keltové několik staletí před naším letopočtem, a hlavní plodinou se stala u Slovanů po jejich příchodu v druhé polovině prvního tisíciletí našeho letopočtu. [2, 3] Dnešní název pšenice je právě staroslovanského původu. [6] Tvrdé pšenice (*Triticum durum* a *Triticum spelta*) se na našem území hojně nepěstovaly, i když ojedinělé nálezy existují. [3] S postupnou degradací půdy ve středověku (vyčerpání bez hnojení a ponechání ladem, ničení bitvami) ustupovalo i pěstování pšenice a začalo dominovat žito. Na vrchol se pšenice vrátila až s příchodem moderní agrikultury ve 20. století. [2] Dnes zaujímá asi třetinu veškeré osevní plochy [7], je to třetí nejprodukovanější plodina na světě a z rostlinných zdrojů poskytuje lidstvu nejvíce bílkovin. [8] Využívá se mimo jiné k výrobě škrobu, lihu, jako krmivo a stelivo pro hospodářská zvířata. [7]

Žito

Žito pravděpodobně vzniklo křížením divokých druhů, které dodnes v oblasti původu na Kavkaze a v Přední Asii vytváří porosty. [7] Zpočátku se nejspíše šířilo s jinými plodinami jako plevel. Kultivace započala na jihu Evropy, ale zde se nepěstovalo, v oblibě jej naopak měly severské národy, protože bylo odolné vůči drsnějšímu klimatu. Od Germánů se pak pravděpodobně šířilo zpět na jih. V našich zemích začalo nabývat na významu po příchodu Slovanů [6] ve středověku a raném novověku, není však pravdou, že by bylo žito přineseno až Slovanů. [2, 3, 9] Lépe v našich podmínkách snášelo méně úrodnou a vyčerpanou půdu a dalších několik století proto pak převažovalo nad pšenicí až do století devatenáctého. [2, 3] Dodnes je žito především evropskou plodinou a díky své odolnosti se pěstuje i za polárním kruhem a na Sibiři. [6, 7] Z žita se kromě pečiva vyrábí destiláty a praží se na výrobu kávoviny, využívá se i jako hostitelská rostlina námelu. [7]

Kukuřice

Kukuřice byla hlavní plodinou, kterou původní obyvatelé Ameriky pěstovali tisíce let před příchodem Kolumba. Mnohé kmeny kukuřici uctívaly, v Aztécké říši byla kukuřice zbožštěna a její původ byl připisován daru bohů. Pěstována (stejně jako ostatní plodiny) byla na chinampách, uměle zbudovaných ostrůvcích na jezerech. [5] Mayové kukuřici připisovali takový význam, že zemřelé vybavovali na poslední cestu kromě nefritových perel právě kukuřicí, kterou jim vkládali do úst. Systém milpového zemědělství funguje, i když s nástroji z modernějších materiálů, v odlehlých oblastech dodnes. [10] V Jižní Americe byla kukuřice doprovázena dalšími plodinami (brambory, quinoa), ale i tak byla nejdůležitější plodinou, z níž se kromě nejrůznějších pokrmů připravovaly i nápoje. V různých kmenech z celé Ameriky byla kukuřice používána jako rituální rostlina při svatebních obřadech, obětování bohům, k předpovídání budoucnosti, léčení, výkladu vzniku světa a v dalších oblastech. [5]

U této plodiny se nepodařilo nalézt jejího divokou formu. Soudí se, že tato původní dnes zaniklá forma se nakřížila s rostlinou *Tripsacum dactyloides* [5], a tak vznikla teosinta, která dodnes v oblasti roste. [7] Mnohočetným zpětným nakřížováním a šlechtěním dospěla kukuřice do dnešní podoby. Dodnes je kukuřice nejdůležitější plodinou v severní části Ameriky, rozšířila se po celém světě a je jednou z nejdůležitějších plodin zkrmovaných hospodářským zvířatům. U nás byla po zahradnických pokusech poprvé vypěstována roku 1830 na poli, ve větší míře se ale začala pěstovat až ve 20. století. [5] Na většině našeho území se tato plodina pěstuje na zelenou píci a siláž, v nížinách také na zrno. V celosvětovém kontextu je to v současné době neprodukovanější plodina. [8] Průmyslově ji lze zpracovávat na celou řadu produktů: škrob, líh, kukuřičný lepek, cukr, aceton, olej z klíčků, celulosu a mnoho dalších. [7, 11]

Rýže

Původ názvu rýže lze vysledovat až v sanskrtu, staroperštině a arabštině. [6] Tato plodina vznikla v oblasti jihovýchodní Asie [12], do Evropy ji přinesli Arabové a Turci. Dnes se vyskytuje ve dvou kulturních formách jako typ horský a bažinný. Horský typ je pěstován na typických terasovitých políčkách i ve vysokých nadmořských výškách a vyžaduje velký přísun srážek. Je jednodušší na obdělávání, ale kvůli malým obilkám poskytuje nižší výnosy. Bažinný typ se pěstuje v nižších polohách, deltách řek a bažinách v teplejších oblastech. Tato forma je náročná na zavodnění a větší podíl manuální práce, její výnosy

jsou však vyšší. Oba typy mohou existovat ve formě velkozrnné (obilky delší než 7 mm) a drobnozrnné (obilky kratší než 5 mm). Dnes se pěstují zejména dva poddruhy: rýže setá japonská a indická. Rostlina japonské rýže je vysoká asi 1 m, její obilky jsou široké a je pěstována v Japonsku, Číně, jižní Evropě, Jižní Americe i v USA. Indická rýže má rostliny vyšší, obilky úzké a zploštělé a je pěstována zejména v Indii, Číně, na Filipínách, v USA, na jihu Evropy a severu Afriky. [11]

Přes 90 % světové produkce rýže zajišťuje jih a východ Asie, kde je dominantní konzumovaná plodinou. Rýže obsahuje málo lepku, proto není vhodná k přípravě klasického chleba, zato se kromě vaření zpracovává i pufováním, vyrábí se z ní škrob, alkoholické nápoje, sláma se zkrmuje hospodářským zvířatům nebo se zpracovává jako materiál na klobouky, rohože či papír. [7] Celosvětově je to po kukuřici druhá nejprodukovanější plodina. [8]

3.1.3 GENETICKÉ ASPEKTY DOMESTIKACE A ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN

Proces domestikace rostlin podle archeologie započal ve stepích Přední Asie, v „úrodném půlměsíci“. [13] Jako domestikační syndrom je označován souhrn změn, které je možno pozorovat prakticky u všech domestikovaných druhů rostlin i zvířat. Pro rostliny je to například zvýšení počtu a klíčivosti semen, změna jejich tvaru a velikosti, zvýšení výnosu. Často došlo ke změně období, kdy rostliny kvetou a plodí, interindividuální synchronizaci této doby, i k úbytku ochranných orgánů rostliny (trny, chlupy) a snížení obsahu toxických látek [13, 14]. U některých rostlin dokonce šlechtěním došlo k závislosti na člověku do takové míry, že nejsou schopny se samy rozmnožit (např. banán), naproti tomu některé méně domestikované rostliny jsou schopny se bez péče člověka vrátit do původní formy. Během šlechtění (zejména v dnešní době výrazně) dochází k bottleneck effectu oproti planým druhům, proto je pro domestikanty typická malá genotypová variabilita (fenotypově, tedy z hlediska vnějších znaků, naopak dochází k rozrůznění). [14]

Na rychlost domestikace, tedy zda proběhla během pár staletí nebo mnoha tisíciletí, se vědecké názory různí. Faktem je, že v jedné oblasti mohly zároveň existovat plané a již částečně nebo úplně domestikované druhy. Nález planého druhu proto není spolehlivým indikátorem, že se v dané oblasti neobjevovaly i domestikovanější populace (a naopak).

Vzhledem k tomu, že šlechtění probíhalo v určitých časoprostorových podmínkách, kde se vyskytovaly i plané druhy (oblast, ve které se kulturní druh začal oddělovat od divokého, se nazývá primární kulturní centrum [13]), je pravděpodobné zpětné křížení s planými druhy, což proces domestikace zpomalovalo. Naopak rychlejší domestikaci umožňuje fakt, že čím menší počet genů ovlivňuje daný znak, tím kratší dobu bude trvat při šlechtění na daný znak jeho fixace – některé znaky lze zafixovat během pár desítek generací. Například pro změnu teosinty (předchůdce kukuřice) v kukuřici byly pravděpodobně zásadní pouze dva geny, *Tb-1* a *Tga-1*. [14] Pokud je však domestikační znak ovlivněn mnoha geny malého účinku, bude selekce na tento znak probíhat pomaleji. Rychlost domestikace také ovlivňuje tzv. locus genu, tedy umístění daného genu v genomu. Jsou-li žádoucí (domestikaci podporující) geny umístěny blízko sebe, je pravděpodobnější jejich společný přenos do dalších generací. [14]

V průběhu domestikace často došlo k polyploidii, totiž zmnožení chromozomových sad. Běžný stav představují 2 chromozomové sady (jedna od matky, jedna od otce), u domestikovaných plodin se však často nalézají tetraploidie (4 sady, př. brambory, pšenice špalda, žito) či hexaploidie (6 sad, např. pšenice setá, oves). Polyploidizace může být spojena se vzdálenou hybridizací (mezidruhově či mezirodově křížení) a zpětným křížením. [13, 14] Proces polyploidizace nastává u *Poaceae* často spontánně, asi 70 % druhů je polyploidních. [13] Může být výhodná i z hlediska domestikace, díky více sadám může rostlinná buňka obsahovat také více variant genů a tím vzniká prostor pro adaptaci a šlechtění. [14] Bylo prokázáno, že mezirodově hybridy se dají vytvořit mezi rody *Triticum*, *Aegilops*, *Secale*, *Agropyron* a také mezi dvojicí *Hordeum* a *Elymus*; rod *Triticum* pak tvoří mezidruhově hybridy (tj. křížení druhů v rámci rodu *Triticum*). [13] Dobře prozkoumaná je polyploidizace spojená s mezirodovým křížením u dnešní pšenice. Došlo ke zkřížení diploidní trávy *Triticum urartu* (AA) s další diploidní trávou *Aegilops sp.* (BB). Kříženec AB nebyl plodný, ale při současném zdvojení chromozomů na AABB vznikl plodný kříženec *Triticum turgidum* [15] (jinde se uvádí *T. dicoccoides* [13]). Následně došlo k dalšímu křížení, tentokrát s diploidním mnohoštětem *Aegilops tauschii* (DD). Kříženec ABD opět nebyl plodný, ale při zdvojení všech tří chromozomových sad (AABBDD) vznikla plodná hexaploidní tráva, která byla dále šlechtěna na dnešní pšenicí setou (*Triticum aestivum*). [15] Kombinací křížením jiných druhů rodu *Triticum* vznikly jiné dnešní druhy pšenice. [13]

3.2 SLOŽENÍ ROSTLINNÉ POTRAVY ČLOVĚKA

Člověk se naučil využívat několik tisíc druhů rostlin, z nichž bylo nějaké formě domestikace podrobena asi 500 druhů rostlin. [14] Kvůli nárokům na všestrannou intenzifikaci produkce a zvýšení ekonomické rentability se dnes k užtku využívá jen menší část druhů, než byla využívána v minulosti. Uvádí se, že pouze 10–14 druhů rostlin zajišťuje 90% lidské stravy, z čehož polovinu tvoří obiloviny. Další druhy jsou z hlediska celkové produkce méně významné, významu nabývají spíše lokálně. [12]

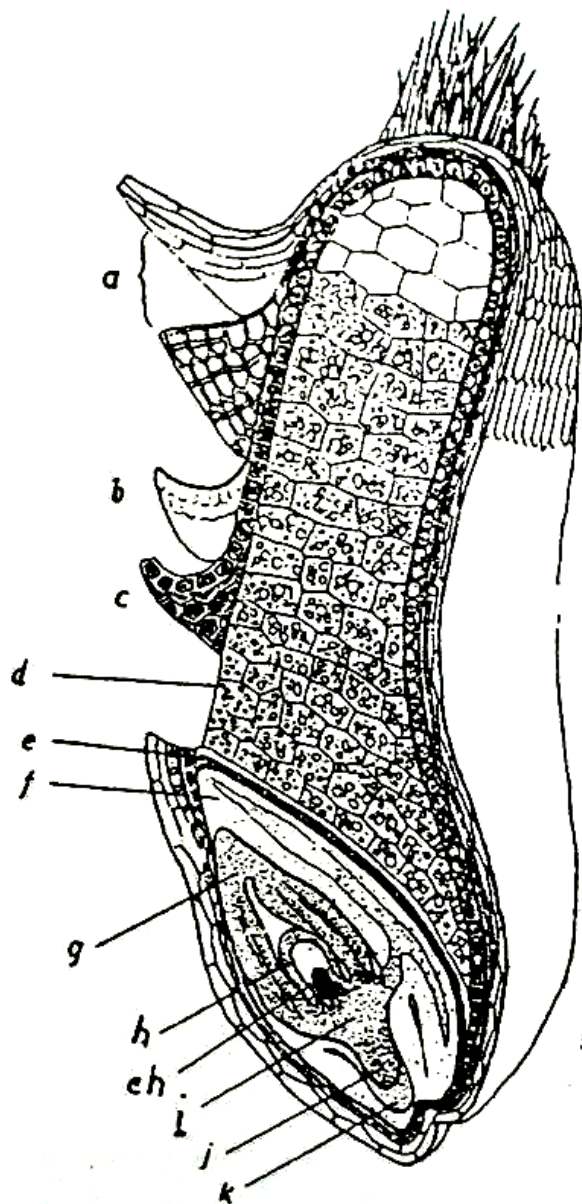
Rostliny byly šlechtěny pro své vlastnosti v mnoha ohledech – výnos zrna, snadnost sklizně a zpracování na využitelné části, odolnost při uchovávání [14] Využitelné jsou všechny části těl rostlin, pokud neobsahují toxické složky nebo významné množství inhibujících látek. Nejvíce jsou využívány ty části, které jsou energeticky bohaté, tj. rostlinné zásobní orgány. Důležitý je obsah základních typů živin (sacharidy, proteiny, tuky) či žádaných sekundárních metabolitů (př. pochutiny jako káva, kakao, čaj atd.). [12]

Uvádí se, že ze všech bílkovin, které lidstvo přijímá, rostliny zajišťují 65 % veškerých bílkovin (47 % připadá na obilniny). Z obilnin tvoří 43 % pšenice, rýže 39 %, kukuřice 12 %. Aminokyselinové složení rostlinné a živočišné potravy se liší, semena bývají bohatá na kyselinu asparagovou a glutamovou, naopak je zde pro člověka limitující množství lysinu. [8] Obsah bílkovin se přirozeně liší u jednotlivých druhů, průměrně (s ohledem na meziodrůdové rozdíly) pšenice obsahuje 12,1 %, žito 11,0 %, ječmen 11,6 %, oves 14,8 %, rýže 6,5–7,7 %, kukuřice 11,0 %, proso 11,0 %, pohanka 13,3 % a laskavec (amarant) 13,6 % bílkovin [8]. V závislosti na zdroji se tato čísla mohou lišit v řádu jednotek procent. Vzhledem k tomu, že obalové vrstvy zrn obilovin obsahují vyšší podíl proteinů, obsah proteinů v mouce a pekárenských výrobců závisí na způsobu zpracování (mletí celého zrna do celozrnných výrobků zajišťuje vyšší obsah proteinů).

Obsah jednotlivých živin závisí na stavbě jednotlivých semen – u *Poaceae* obilí (viz níže).

Stavba obilky

Obilka (na obrázku 1) je nažka, tj. jednosemenný suchý plod, u lipnicovitých rostlin (*Poaceae*). Obaly kvítka vytváří na vrchní straně pluchu, na spodní plušku. Některé plodiny mají po sklizni obilky nahé, tedy bez pluch a plušek (pšenice, žito, kukuřice, některé ječmeny a ovsy), jiné pluchaté (rýže, čirok, proso, některé ječmeny a ovsy). Pluchaté obilky se před mletím musí loupat, při výrobě šrotu se obilky neloupou a šrotují se celé. Na povrchu samotné obilky je několikavrstevné oplodí, osemení pod ním je jednovrstevné. Směrem dovnitř se dále nachází aleuronová vrstva, ve které jsou tzv. aleurony – drobná kulatá zrna, ve kterých jsou deponovány bílkovinné enzymy připravené na aktivaci během klíčení, kdy štěpí polysacharidy semene a zajišťují tak výživu zárodku. Do tmavých mouk se tato vrstva mele také, při výrobě bílých mouk se tato vrstva naopak odstraňuje. Endosperm (též bílek) tvoří většinu objemu obilky a obsahuje zejména škrob a zásobní bílkoviny (prolaminy gliadiny a gluteininy), méně pak tuky a minerální látky. Směrem dovnitř endospermu ubývá bílkovin zodpovědných za organoleptické vlastnosti mouky, stejně jako tuků, proto je velký rozdíl v kvalitě mouk mletých z různých částí semene. Vyšší obsah bílkovin vykazují obilky označované podle vzhledu za sklovité. [12]



- a – oplodí
- b – osemení
- c – aleuronová vrstva
- d – endosperm
- e – vrstva palisádových buněk
- f – štítek
- g – koleoptile
- h – základ 1. pravého listu
- ch – vzrostný vrchol
- i – mezokotyl
- j – základ kořínku
- k – kořenová čepička

Obrázek 1. Schéma stavby obilky. [16]

3.2.1 VYBRANÉ SKUPINY PROTEINŮ

ZÁSOBNÍ PROTEINY

Během zrání semene se v semenech tvoří a ukládají zásobní proteiny. Ty mají za úkol fungovat jako depot aminokyselin pro následné klíčení semene a raný vzrůst a zajistit tak přežití v době, kdy ještě rostlina sama nesyntetizuje živiny. Množství zásobních proteinů v semenech se liší v závislosti na typu plodiny a druhu, u obilnin se pohybuje okolo 10 %, u luštěnin může dosahovat 40 % sušiny. [17] Bylo prokázáno, že kyselina abscisová hraje jednu z klíčových rolí při potlačování předčasného klíčení semen a při ukládání zásobních proteinů. [18]

V rostlinách jsou proteiny historicky děleny podle chemických vlastností na prolaminy, gluteliny, globuliny a další. [8, 19, 20]

Prolaminy

Tyto bílkoviny se vyznačují vysokým obsahem aminokyselin prolinu a glutaminu. Konkrétní názvy tyto proteiny nesou podle rodů rostlin, kde se vyskytují – v pšenici jsou obsaženy gliadiny, v žitu sekaliny, v ječmeni hordeiny, v ovsu aveniny, v kukuřici zeiny a v rýži oryzeiny. Prolaminy s gluteniny tvoří gluten (tj. lepek). Zejména prolaminy pšenice, ječmene a žita mohou způsobovat celiakii. [21] Prolaminy pšenice (gliadiny) tvoří 33 % pšeničných bílkovin, zhruba 45 % proteinů žita jsou prolaminy (23 % celku připadá na sekalin), u ječmene tvoří 25 % bílkovin hordein, u kukuřice 50 % zein. [8]

Gluteliny a gluteniny (Glutelins and glutenins)

Gluteliny tvoří hlavní součást bílkovin celých i mletých zrn rýže (v samotných otrubách převažují albuminy) [22], rýžové proteiny jsou z 80 % právě gluteliny. U kukuřice se gluteliny podílí z 20–45 % na celkovém množství kukuřičných bílkovin. [8, 20]

Gluteniny jsou podskupinou glutelinů u obilnin a jsou jedněmi z nejčastěji nalézáných proteinů v obilných surovinách. Spolu s prolaminy jsou součástí lepku. Tyto proteiny jsou tvořeny velkou a malou podjednotkou (v angličtině označované jako high molecular mass a low molecular mass), a jsou stabilizovány disulfidickými můstky, hydrofobními interakcemi a dalšími nevazebnými interakcemi. Gluteniny jsou důležitou a sledovanou součástí mouky, protože jsou zodpovědné za viskoelastické vlastnosti těsta. [23] V pšenici tvoří gluteniny 46 % všech proteinů. [8]

Globuliny (Globulins)

Bílkoviny globulární struktury jsou často rozlišovány do frakcí podle rychlosti sedimentace (písmeno S značí jednotku Svedberg). Tyto frakce bývají specifické pro určité taxonomické skupiny. Četnými skupinami jsou 11S frakce (nejčetnější [24], např. leguminy), 7S frakce (vicilin, konvicilin), 12S frakce (obiloviny).

ENZYMY

Enzymy jsou nepostradatelné biokatalyzátory většinou bílkovinného původu. Urychlují průběh reakcí v organismu a většina reakcí se děje za jejich asistence. V buňkách mohou tvořit až 90 % všech bílkovin. [25] V následujících odstavcích jsou zachyceny některé skupiny enzymů vícenásobně nalezených ve vzorcích.

β -Amylasy (Beta-amylases)

Enzymy β -amylasy patří mezi hydrolasy, konkrétněji škrob štěpící glykosidasy. Podílejí se na katabolismu sacharidů – štěpí vazby (1 \rightarrow 4)- α -D glykosidické vazby v polysacharidech. Z neredukujícího konce řetězce polysacharidu odštěpují maltosové jednotky (2 glukosové jednotky). [25–27]

rRNA N-glykosidasy (rRNA N-glycosidases)

Tyto proteiny mají katalytickou funkci, účastní se jako enzymy endohydrolýzy N-glykosidické vazby na adenosinu na 28S rRNA (ribosomální RNA typické pro velkou podjednotku ribozomů u eukaryotických organismů). Účastní se také obranné reakce rostlinné buňky vyvolané přítomností cizího tělesa nebo zraněním, tato reakce má za úkol zmírnění poškození organismu a prevenci před infekcí zapříčiněnou zraněním. [28, 29] Hrají úlohu při inhibici translace, tedy té části exprese genu, kdy je na základě komplementarity bází pomocí RNA posléze formován protein. [26]

Syntasy škrobu (Starch synthases)

Tento enzym ze skupiny transferas katalyzuje reakci, při níž jsou přidávány jednotky glukosy do molekuly škrobu. Schematicky lze vyjádřit jako $\text{UDP-glukosa} + (1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glukosyl (n)} = \text{UDP} + (1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glukosyl (n + 1)}$. V buňce se nachází v chloroplastech a v amyloplastech – plastidech, v nichž je uskladňován škrob. [26]

Glukosa-1-fosfát adenyltransferasy (Glucose-1-phosphate adenyltransferases)

Enzymy se účastní metabolismu škrobu, katalyzují proces, který se dá vyjádřit schématem $ATP + \alpha\text{-D-glukosa-1-fosfát} = \text{difosfát} + ADP\text{-glukosa}$. [27] Tento enzym má podobu heterotetrameru (tedy struktury složené z dvou nebo více různých monomerů) složeného ze dvou velkých a dvou malých podjednotek. Bylo prokázáno, že geny kódující malé podjednotky těchto proteinů jsou u kukuřice prakticky totožné v různých částech rostliny. Pomocí sekvenace genů kódujících malou podjednotku tohoto enzymu byl sestaven fylogenetický strom vybraných užitkových rostlin. [30]

SERPINY (Serpins)

Tato skupina proteinů působí jako inhibitory proteas, jejichž funkce je znemožněna změnou konformace. Serpiny i geny kódující serpiny byly v pšenici objeveny v roce 1994, do té doby byly rostlinné serpiny a některé jejich kódující geny prokázány pouze u ječmene. [31]

3.3 SLOŽENÍ MOUK A PEČIVA

3.3.1 LEGISLATIVNÍ RÁMEC A PLNĚNÍ V PRAXI

Ve snaze vysvětlit nezvyklý původ surovin ve výsledcích analýz (kapitola 5.4) a polemizovat možnost přidávání různých surovin do výrobků, byla zpracována tato kapitola jako pohled do legislativního zázemí týkající se mouk a pečiva, a také do praktik obchodních řetězců.

Základem legislativy týkající se mouk a pečiva je zákon 110/1997 Sb., „O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů“, vyhláška 333/1997 Sb. (aktuálně platí novelizující vyhláška 182/2012) a vyhláška 113/2005 Sb (novelizovaná naposledy v roce 2011).

3.3.2 KATEGORIZACE SLOŽENÍ A ZNAČENÍ VÝROBKŮ

Již od roku 1997 vyhláška č. 333/1997 Sb. [32] ukládá povinnost označovat u pečiva zařazení do kategorií podle složení (pšeničné, žitné, pšenično žitné, žitno pšeničné, celozrnné, vícezrnné, speciální). Tyto kategorie mají stanovené množství jednotlivých surovin. Pšeničný a žitný výrobek musí obsahovat nejméně 90 % hmotnosti mlýnských výrobků dané suroviny, pšenično žitný pak alespoň 50 % pšenice a alespoň 10 % žita (analogicky žitno pšeničný). Celozrnné výrobky musí obsahovat alespoň 80 % celozrnné mouky či jim odpovídající množství upravených obalů obilky. Vícezrnné výrobky jsou klasifikovány jako výrobky, do jejichž těsta jsou přidány „mlýnské výrobky z jiných obilovin než z pšenice a žita, luštěniny nebo olejnin v celkovém množství nejméně 5 % z celkové hmotnosti“. [32] Speciální výrobky obsahují „kromě mlýnských výrobků z pšenice a žita další složku, zejména obiloviny, olejnin, luštěniny, vlákninu, suché skořápkové plody, zeleninu, mléčné výrobky nebo brambory, v množství nejméně 10 % z celkové hmotnosti“. [32] Procenta obsahu jsou vztažena k celkové hmotnosti mlýnských výrobků. Po zavedení vyhlášky 182/2012 Sb. [33] nastala změna v klasifikaci běžného pečiva. Původní znění: „běžným pečivem (se rozumí) tvarovaný pekařský výrobek vyrobený z pšeničné nebo žitné mouky, přísad a přídatných látek“ [32], bylo aktualizováno na: „běžným pečivem (se rozumí) tvarovaný pekařský výrobek z pšeničné nebo žitné mouky anebo jiných mlýnských obilných výrobků“. Mlýnské obilné výrobky jsou pak definovány jako „výrobky získané zpracováním obilí, pohanky a rýže“. [32, 33]

Vyhláška 113/2005 Sb. [34] „O způsobu označování potravin a tabákových výrobků“ (naposledy novelizovaná v roce 2011) v příloze 1 ukládá povinnost spotřebitele informovat o několika kategoriích alergenů, z výrobků testovaných v této práci jsou to obiloviny obsahující lepek, sojové boby a výrobky z nich a sezam. [34] 13. 12. 2014 vstoupilo v platnost nařízení 1169/2011, které ukládá za povinnost označit alergeny i u nebalených potravin. [35]

V § 10 vyhláška 113/2005 Sb. ukládá povinnost oznamovat obsah aditiv výrobku na obalu potravin. To se však netýká nebalených výrobků. [34] Také v zákoně 110/1997 Sb. se hovoří o povinnosti značení kompletního složení pouze balených potravin. [36]

3.3.3 SPOTŘEBITELSKÉ OMYLY

Spotřebitelé často tápou v různých slovech označujících výrobky. Mnohé výrazy jsou i legislativně ošetřeny, ale legislativa nikdy nemůže dostihnout snahu řetězců nalákat zákazníka přitažlivými názvy.

S pojmem „cereálie“ reklamní kampaně spojují snídaneč ve formě lupínků a sušenek jako nezdravějšího začátku dne. Hojně propagované slovo „cereální“ však pouze znamená, že je výrobek vyroben z obilovin. Tento zprofanovaný výraz neinformuje o žádném zdravotním benefitu. Je lhostejné, jestli se jedná o výrobek z lupínků nebo pečivo, „cereálie“ označuje obilovinu a analogicky výrobek pocházející z obilovin. [37]

Slovo „vícezrný“ znamená přítomnost i jiné suroviny než hlavní mouky, výrobek však nemusí pocházet z mouky celozrné. [37]

Všeobecně se uvádí používání celozrných variant pečiva jako zdravější. Celozrné mouky jsou namlety z celých obilovin i s jejich obalovými vrstvami, které jsou bohaté na vlákninu, vitamíny i minerální látky, čímž poskytují skutečné zdravotní benefity. Žitná mouka je oproti pšeničné tmavší a má vyšší podíl rozpustné i nerozpustné vlákniny, která má kladný vliv na kondici střev. [37] Spotřebitelé často předpokládají, že tmavé pečivo je synonymem k celozrnému pečivu a pečivo celozrné je dietnější, ani jedno ale není pravda. [37, 38] Těchto omylů se často využívá při barvení pečiva (viz kapitola 3.3.4), které ale nemá žádný zlepšující vliv na pečivo ani po stránce technologické, ani po stránce zdravotní. [37]

3.3.4 DOBARVOVÁNÍ PEČIVA

Jak upozornil v roce 2011 dTest [39], mnoho druhů běžného pečiva v obchodních řetězcích má navzájem dost podobné složení – základy na mouky jsou tvořeny běžnou pšeničnou moukou a různé druhy pečiva se z něho tvoří přidáním koření, sladu, karamelu apod. V ČR je zakázáno dobarvovat pečivo umělými přísadami, ale dobarvování jako takové ani u běžných pekařských výrobků zakázáno není. Dobarvuje se buď karamel, nebo praženým žitným, ječmenem, případně praženým sladem. U cukrářských výrobků je dobarvování pochopitelné, u pekařských je jeho význam diskutabilní – k dekoraci u běžných kaiserek nebo housek jistě neslouží. Podle dTestu a Fóra zdravé výživy se využívá

obecného povědomí o zdravotních benefitech celozrnného pečiva, jejichž barva je tmavší. [38, 39] Šedohnědá barva přítomná v mnoha typech výrobků, je ovšem typická právě pro dobarvované pečivo [40], dobarvované pečivo není výživově příznivější, mění se jen jeho vzhled. [37]

Že lze sladidel s tmavou barvou využít jako marketingového tahu, ukázal řetězec Billa, který nedávno (2016) uvedl na pulty žitno pšeničný chléb Darken s praženým ječmenem. Je možné polemizovat o tom, zda si je běžný spotřebitel vědom, že ječný slad je kromě lehce nasládlé chuti zdrojem nezvykle tmavé barvy, nebo původ barvy přisuzuje celozrnnosti. Tento výrobek ukazuje ještě jednu rovínu, ve které lze uvažovat – až při takto tmavém zbarvení je teprve cítit lehce sladká chuť sladu v pečivu. K obarvení běžného pečiva, aby vypadalo tmavší, stačí mnohem méně sladu – barva je příkrášlena a na chuti se nic nemění. Na snímku (obrázek 2) v porovnání s žitno pšeničným chlebem Žitan (83 % žita) z řetězce Norma.



Obrázek 2. Chleby Žitan (Norma) a Darken (Billa).

3.3.5 MRAŽENÍ PEČIVA

Ve snaze ušetřit za suroviny (=zvýšit zisk), a zároveň zákazníkovi nabídnout pocit dobré koupě za stejnou cenu, se začal před několika lety šířit trend dopékaného pečiva. Pekárna v takovém případě výrobek pouze zapeče a poté všechny procesy v něm zastaví mražením. Tento polotovár se převáží a dopéká na prodejnách obchodníka. Výhod je pro řetězec

mnoho, polotovary vydrží i několik měsíců, na prodejnách je možné používat pouze malé pícky, pečivo po dopečení voní a láká na místě ke koupi. Pro zákazníka ovšem výhod mnoho shledat nelze, výživové vlastnosti zůstávají sice stejné [38], ale po vychladnutí je chuť a vůně pečiva jiná než při klasickém postupu, a utrpí tím významně trvanlivost. Původ pečiva bez označení ale nelze poznat jinak než podle různých ukazatelů při rozkrojení, jak upozornila spotřebitelská organizace dTest. [39] V srpnu 2012 proto vešla v platnost vyhláška 182/2012 Sb., která zavedla povinnost jasně označit, zda je pečivo čerstvé, rozmrazované, nebo ze zmrazeného polotovaru. [33] V roce 2011, kdy trend nastupoval, se v České republice dopékalo 15 % pečiva. [39] V roce 2012 to bylo již 20 %. [41] Novější čísla pro ČR se nepodařilo získat, ale a vzhledem k tomu, že např. v USA se dopékají tři čtvrtiny pečiva [39] a celá polovina pečiva v Evropě prošla mražením [41], lze předpokládat číslo vyšší než poslední získané. Některé typy pečiva se pečou do své výsledné podoby v pekárnách, kde se také zamrazí, a na prodejnách se pouze nechají rozmrazit a nijak se již tepelně neupravují. Toto pečivo musí být označeno jako „rozmrazované“. [33]

Zajímavou a důležitou informací je i to, že dopékané a rozmrazované pečivo obsahuje jiná a četnější aditiva, aby si přitažlivý vzhled uchovalo i po šokovém zmrazení na $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, dlouhém skladování a opětovném rozmražení. [41]

3.3.6 PŘESNÉ SLOŽENÍ NEBALENÝCH VÝROBKŮ

Ani dnes nemohou spotřebitelé snadno a přehledně v obchodě zjistit přesné složení nebaleného výrobku včetně všech aditiv, jako je tomu například v Německu. Zákon 110/1997 Sb. a jeho prováděcí vyhlášky dávají za povinnost označování různých informací, přesné složení nebalených výrobků mezi nimi není. [36] Snaha získat přesné složení se neseťká s úspěchem, protože personál řetězce jej nezná, prodejny mívají seznam vypracovaný, ale nebývá roky aktualizovaný a nejsou tak evidovány ani všechny druhy prodávaných pečiv, natož jejich složení, jak upozornil pořad ADost! [40]

Spotřebitel se také nemá šanci dozvědět (jedině, když o tom informuje sám výrobce/prodejce), jestli ke kypření pečiva byl použit kvásek nebo levnější droždí. Regulace je zavedena pouze u výrobků používajících slova „tradiční“, „staročeský“, těmito slovy je možné označit pouze výrobky, které nebyly dokypřovány, kvašení zajišťuje vitální

žitný kvas s více než 70 % žitné mouky. [32, 33] Ostatní výrobky mohou být kypřeny droždím i různými aditivami. [41]

DTest také upozornil na vyšší obsah vody v pečivu v posledních letech – vázání vody se opět docílí pomocí aditiv. [41]

3.3.7 POZNÁMKY K VYBRANÝM SUROVINÁM A PRODUKTŮM

BRAMBORY – Bramborový škrob se v potravinářství používá velmi často. Mnohá bezlepková pečiva mají za hlavní surovinu právě brambory v podobě bramborového škrobu. Přidávání brambor do pečiva na úkor obilné mouky zmiňuje také dTest. [41] Vyhláška 113/2005 Sb. zmiňuje, že ve škrobech je nutné uvádět lepek, pokud není možné jeho přítomnost vyloučit. [34] Lepek se netýká brambor, ale z této formulace vyhlášky lze vyvodit, že ve škrobech se zbytkové proteiny mohou vyskytovat, a proto je možnost, že budou nalezeny brambory, pokud byl přidán bramborový škrob.

RÝŽE – Podle § 4 vyhlášky 333/1997 Sb. není povoleno skupiny rýží (ve smyslu velikosti zrna a přítomnosti obalů) mísit, povolený podíl jiné skupiny je maximálně 10 %, o druhu původu se nehovoří, v § 1 je zmíněna rýže setá a její odrůdy. V rýži je povoleno maximálně 1,0 % jiných semen. [32]

JÁHLY – Mohou obsahovat maximálně 0,2% podíl jiných semen než prosa. [32]

SÓJA – Dnes se sója jako alergen uvádí u výrobků často. Někdy bývá skutečně do pečiva přidávána (i když její používání jako zlepšující látky bylo častější dříve [37]), jindy je výrobcem uváděna spíše preventivně, protože při zpracování výrobků může dojít ke kontaminaci sójou zpracovávanou v témže závodu.

Podle § 8 odst. 6 vyhlášky 113/2005 Sb. není nutné označovat jednosložkové potraviny složením, pokud je shodné s názvem výrobku. [34]

V § 8 je také uvedeno, že označení potraviny upozorněním na alergen „není povinné, pokud název, pod kterým je potravina prodávána, jednoznačně odkazuje na tuto alergenní složku“. [34]

Podle 182/2012 Sb. se jako knäckebrot označuje výrobek „výrobek křehké konzistence z mlýnských obilných výrobků a dalších surovin obvykle ve tvaru obdélníku vyrobený tepelnou úpravou“. [33]

3.4 ANALYTICKÉ METODY

3.4.1 PRINCIP ANALYTICKÝCH METOD LC/ESI-Q-TOF

LC/ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation-Quadrupole-Time Of Flight) je uspořádání metod, ve kterém jsou analyty separovány kapalinovou chromatografií (LC) a poté ionizovány a analyzovány kvadrupólovým a následně průletovým analyzátozem.

Kapalinová chromatografie (LC, Liquid Chromatography)

Chromatografie dnes představuje jednu z nejpoužívanějších separačních metod, kdy je vzorek (směs látek) rozdělován mezi dvě fáze – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Analyt je unášen kapalnou mobilní fází přes stacionární fázi umístěnou v koloně a jeho jednotlivé složky na základě svých vlastností různou měrou interagují se stacionární fází. Tím jsou složky vzorku různou měrou zpoždovány a dochází k separaci. [42]

Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry)

Hmotnostní spektrometrie je v dnešní době jednou z nejčastěji používaných analytických metod. Poskytuje údaje o hmotnosti ionizovaných atomů, molekul či jejich částí, díky čemuž je možné zkoumat struktury anorganické i organické, a to nízkomolekulární i vysokomolekulární. Nejprve je nutné vzorek převést na plynnou fázi (vypařením) do vakua, ionizovat jej pomocí iontového zdroje a poté detekovat. Výsledek analýzy je zobrazen jako hmotnostní spektrum iontů přítomných ve vzorku. [43–45]

Ionizace elektrosprejem (ESI, ElectroSpray Ionisation)

Iontové zdroje používané v hmotnostní spektrometrii se liší energií dodávanou analytu za účelem jej ionizovat. Měkké zdroje dodávají analytu energii dostatečnou k ionizaci, ne však tak vysokou, aby došlo k jeho fragmentaci. Pro organické látky se prahové hodnoty ionizačních energií pohybují od 7 do 16 eV. [43, 44] Použitím tvrdých zdrojů, které výrazně překračují ionizační energie látek, dochází k eliminaci nadbytku vibračně-rotační energie fragmentací iontu. [44]

ESI, ionizace elektrosprejem, je metoda měkké ionizace, která je jako jedna z nemnoha vhodná i pro analýzu biomakromolekul jako jsou proteiny, protože nedochází k jejich fragmentaci. Chromatografií rozseparované látky postupně přicházejí na ústí kovové

sprejovací kapiláry, kde je pomocí vloženého vysokého elektrického napětí a zmlžujícího plynu vzorek v rozpouštědle rozprášen na kapičky. Vzniklé kapičky na svém povrchu nesou náboj, jehož hustota se na povrchu vypařováním rozpouštědla zvyšuje. V momentě, kdy repulzní síly mezi náboji překročí sílu povrchového napětí, která udržovala kapičku pohromadě, dochází ke Coulombické explozi. Původní náboj je tak distribuován mezi ještě menší útvary. Samotné ionty jsou buď z kapičky vytrhávány, nebo vznikají po vypaření zbytku rozpouštědla. Po uvolnění iontů jsou tyto transportovány do vakuované části a hmotnostního analyzátoru. [46]

Kvadrupólový analyzátor (Q, Quadrupole)

Kvadrupól se skládá ze čtyř kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu. Ty jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého vysokofrekvenčního napětí. Ionty, které se dostanou mezi tyče, začínají vlivem střídavého elektrického pole oscilovat. [44] Tento analyzátor umožňuje nastavení podmínek elektrického pole tak, aby k detektoru procházely ionty o určité hodnotě m/z , kde m představuje hmotnost a z náboj částice. Ostatní ionty pro svou nestabilní dráhu k detektoru neprojdou. Vkládané napětí lze regulovat, takže je možné tímto filtrem nechat postupně projít ionty celého intervalu hodnot m/z . [42] Výhodou kvadrupólového analyzátoru je rychlost snímání spekter a snadnost údržby a obsluhy. [45]

Průletový analyzátor (TOF, Time Of Flight)

TOF analyzátor je v principu tvořen dutou trubicí, ve které jsou ionty urychlovány silným elektrickým polem. Ionty se i přes stejnou dodanou energii pohybují různou rychlostí, rychlost letu je totiž závislá na hmotnosti částic – lehčí ionty se pohybují rychleji, těžší pomaleji. Vzdálenost, kterou ionty musí urazit od vstupu do analyzátoru k detektoru, je pro daný analyzátor konstantní. V průběhu letu se ionty rozřazují a měří se čas, za který dorazí k detektoru. Díky tomu je možné zjistit molekulovou hmotnost iontu, resp. poměr m/z . [44, 45] V závislosti na citlivosti přístroje je možné od sebe odlišit ionty, jejichž doba průletu se liší o různý časový úsek (v řádech nanosekund [47]). Detektor poskytuje signál, který je po digitalizaci převedený do počítače, kde je zpracován do podoby hmotnostních spekter.

3.4.2 IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ METODY PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ

Metoda proteinového mapování umožňuje identifikovat jednotlivé bílkoviny. Protein je převeden do roztoku, kde je rozštěpen pomocí specifických proteas – enzymů, které štěpí peptidové vazby ve známém místě. Nejpoužívanějšími proteasami pro tento účel jsou trypsin a chymotrypsin. V práci byl jako proteasa použit trypsin (EC 3.4.21.4), který řetězec proteinu štěpí za bazickými aminokyselinami lysinem (Lys) a argininem (Arg). Vzniklá směs peptidových štěpů se přečistí a pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) jsou získány hodnoty m/z odpovídající podílu molekulových hmotností a náboje jednotlivých štěpů. Srovnání získaných hodnot jednotlivých štěpů s databázemi umožňuje identifikovat jednotlivé proteiny. [25, 48]

Limity metody

Správná identifikace proteinu vzorku je závislá na přítomnosti štěpu v databázi – identifikovat se tedy dají jen vzorky, jejichž aminokyselinové sekvence již byly popsány. Velmi příbuzné organismy mají značnou část genomu (a tedy proteomu) společnou, při výzkumu může být identifikován štěp, který je těmto organismům společný a může dojít k jeho přiřazení příbuznému organismu. Jsou-li některé proteiny velmi rozšířené v široké skupině organismů (zajišťují základní funkce) a jejich diverzita je i mezi relativně nepříbuznými organismy minimální, může dojít ke shodě štěpů i u evolučně vzdálenějších taxonů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

acetonitril (ACN) – Lach-Ner

kyselina mravenčí (HCOOH) – Fluka

trypsin – Promega Corporation

trifluoroctová kyselina (TFA) – Sigma-Aldrich

uhličitan amonný (NH₄HCO₃) – Fluka

ZipTip C18 špičky – Millipore Corporation

destilovaná voda H₂O

4.2 POUŽITÉ VÝROBKY

K získání vzorků bylo použito 6 druhů mouk a střídka z 9 druhů pečiva (viz tabulka 1). Složení je pro přehlednost uvedeno také v kapitole 5.4 u každého výrobku zvlášť spolu s očekávanými druhy rostlin. Diskuse nad složením pečiva je uvedena v kapitole 5.5.

Tabulka 1. Složení všech analyzovaných výrobků.

*	Název výrobku	Výrobce (distribuce)	Dostupné informace o složení
M1	Mouka špaldová celozrnná hladká	Natural Jihlava	špaldová mouka
M2	Mouka hrachová nativní	Extrudo Bečice	žlutý hrách
M3	Kukuřičná mouka polohrubá	Natural Jihlava JK	žádné **
M4	Pšeničná mouka hrubá	Ramill	potravinářská pšenice

*	Název výrobku	Výrobce (distribuce)	Dostupné informace o složení
M5	Jahelná mouka hladká	Natural Jihlava JK	jahelná mouka
M6	Krupička bezlepková rýžová jemná	Extrudo Bečice	rýže
P1	Rohlík sojový	Albert	čerstvé běžné pečivo
P2	Kaiserka s pohankou	Billa	vícezrnné pečivo, A: lepek, sója, mléko, SO ₂
P3	Špaldové tyčinky se sezamem	Biolinie	špaldová mouka celozrnná (44 %), pšeničná mouka celozrnná, sezam (19 %), palmový tuk, droždí, jedlá sůl s jódem, může obsahovat stopy sóji
P4	Rajčatová bulka	Billa	žádné
P5	Knäckebrot Roggen Vollkorn	Edeka	55 % celozrnná žitná mouka, 35 % žitná mouka, droždí, 4 % žitné otruby, žitný kvásek, sůl, kyselina mléčná, strouhanka (pšeničná mouka, cukr, rostlinný olej, droždí, sůl), sezamová semínka
P6	Žitná placka	Albert	běžné pečivo žitné
P7	Rustikální bageta z pohanky	Tesco	žádné
P8	Rhombing bageta světlá	Albert	běžné pečivo vícezrnné
P9	Chlebičky rýžové s amarantem	Racio	rýže 95,25 %, amarant 4 %, mořská sůl 0,75 %

* pořadí mouk (M) a pečiv (P)

** výrobce v tomto případě neporušuje žádné nařízení, viz kapitola 3.7.7.

4.3 ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

4.3.1 ŠTĚPENÍ TRYPSINEM

Vzorky byly nejprve vystaveny působení trypsinu (15 μ l trypsinu o koncentraci 2 μ g/ μ l ve 100 μ l roztoku 50 mmol/l NH_4HCO_3) po dobu dvou hodin za laboratorní teploty.

4.3.2 PŘEČIŠTĚNÍ A ZAKONCENTROVÁNÍ PEPTIDOVÝCH ŠTĚPŮ NA REVERZNÍ FÁZI

K přečištění a zakoncentrování peptidových štěpů byla použita mikrokolona ZipTip C18. Byly připraveny tři promývací roztoky: aktivační (W), ekvilibrační (EQ), eluční (EL).

W: 50% ACN v H_2O

EQ: 0,2% TFA v H_2O

EL: 50% ACN + 0,1% TFA v H_2O

Postup:

1. Aktivace reverzní fáze ve špičce promytím 10 μ l aktivačního roztoku (W). (10 \times)
2. Ekvilibrace peptidů promytím 10 μ l ekvilibračního roztoku (EQ). (10 \times)
3. Navázání peptidů promýváním 10 μ l vzorku. (10 \times)
4. Odsolení navázaných peptidů promytím 10 μ l ekvilibračního roztoku (EQ). (10 \times)
5. Eluce peptidů opětovným promytím 8 μ l elučního roztoku (EL). (10 \times nasátí a vypuštění téhož roztoku)
6. Eluce zbývajících peptidů k pročištění špičky 10 μ l elučního roztoku (EL). (10 \times)

4.3.3 IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ LC/ESI-Q-TOF

Vzorky byly měřeny pomocí UHPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano (Dionex) zapojeného s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonics). Vzorky byly rozpuštěny ve směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{HCOOH}$ v poměru 97:3:0,1 a nanoseny na zachytávací kolonu Acclaim PepMap 100 C18 – 100 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$ s částicemi reverzní fáze o

velikosti 5 μm (Dionex); průtok 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ po dobu pěti minut. Následná chromatografie na reverzní fázi byla provedena na koloně Acclaim PepMap RSLC C18 – 75 μl \times 250 mm s částicemi reverzní fáze o velikosti 2 μl (Dionex), průtok 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Byla provedena gradientová eluce se složením fází A: 0,1% HCOOH v H₂O, B: 0,1% HCOOH v ACN. Zvolený gradient měl vzhledem k B následující průběh: 0 min – 3 % B, 5 min – 3 % B, 85 min – 50 % B, 86 min – 90 % B, 95 min – 90% B, 96 min – 3 % B, 110 min – 3 % B. Měření bylo provedeno s výběrem prekurzoru v rozsahu 400–2200 Da.

Peaklisty byly extrahovány ze změřených dat pomocí programu Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics). Proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Mascot 2.2.04 (Matrix Science), vyhledáváno bylo v proteinové databázi Uniprot (verze 2010–2012) s parametry: hydroxylace prolinu a oxidovaný methionin jako variabilní modifikace, MS/MS přesnost přiřazení hmotností štěpů 0,05 Da a přesnost v MS modu 50 ppm.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 SLOŽENÍ VÝROBKŮ

V případě Špaldových tyčinek se sezamem (PEČIVO 3), Knäckebrot Roggen Vollkorn (PEČIVO 5) a Chlebičků rýžových s amarantem (PEČIVO 9) se jednalo o výrobky balené, proto je dostupné složení podrobnější (viz kapitola 3.3).

Ostatní pečivo bylo prodáváno jako nebalené zboží určené k okamžité spotřebě a tyto výrobky nemusely mít v době nákupu (konec roku 2014), ani dnes, vyznačené celé složení. U některých nebalených výrobků tak kromě názvu nebyla k dispozici žádná další informace (PEČIVO 4 a 7).

V době nákupu výrobků také neplatilo nařízení 1169/2011 (v platnost vstoupilo 13. 12. 2014), podle kterého musí mít i nebalené výrobky označené obsažené alergeny. [35] Někteří prodejci již alergeny uváděli před zahájením této povinnosti (sója u kaiserky s pohankou – PEČIVO 2), v jiných případech alergeny uváděny nebyly (paradoxně např. sojový rohlík – PEČIVO 1).

Zbarvení střídky u rajčatové bulky (PEČIVO 4) nemuselo korespondovat s obsahem rajčat (která ale byla zjevně na povrchu), mohlo být výsledkem barviv, z podoby pečiva lze usuzovat na běžné pšeničné pečivo. V případě rustikální bagety z pohanky (PEČIVO 7) na první pohled lze pochybovat o čistě pravdivosti názvu „z pohanky“, spíše lze předpokládat, že by skutečnosti lépe odpovídal název „s pohankou“. U Špaldových tyčinek se sezamem (PEČIVO 3) byly tyčinky sezamem posypané, ve střídce nebyl sezam pozorovatelný (mohl být ovšem namletý).

Kaiserka s pohankou (PEČIVO 2), Rhombing bageta (PEČIVO 8) byly klasifikovány jako vícezrné, ostatní jako běžné pečivo, pokud byla informace dostupná.

U výrobku rustikální bagety z pohanky (PEČIVO 7) a rajčatová bulka (PEČIVO 4) nebylo dodrženo povinné označení, zda je výrobek čerstvý, rozmrazovaný nebo ze zmrazeného polotovaru, ani jeho klasifikace mezi pšenično/žitné výrobky (viz kapitola 3.3).

Žádný z pekářských výrobků nebyl označen slovem „tradiční“ nebo „staročeský“, které by mělo značit absenci kypřidel a zaručovat obsah žita.

5.2 METODIKA INTERPRETACE ZÍSKANÝCH DAT

Celkem bylo testováno 15 vzorků, 6 mouk a 9 pečivářenských výrobků. U každého vzorku byly provedeny 3 opakování analýzy. Za spolehlivě identifikované proteiny lze považovat takové, u kterých byly nalezeny alespoň 2 různé peptidy (bez ohledu na počet jejich opakování). V potaz byly brány pouze proteiny, u nichž byl daný protein identifikován ve všech třech opakováních analýzy, a zároveň u každé z nich překročil hodnotu dvou různých shodných peptidových částí řetězce proteinu. Cílem práce, i vzhledem k jejímu rozsahu, není podat plný encyklopedický přehled všech informací o všech těchto proteinech – u každého vzorku bylo vybráno a podrobněji popsáno 10 proteinů s nejvyšším ukazatelem tzv. „scores“ (u ostatních proteinů je okomentován pouze původ, je-li něčím zajímavý). Ukazatel „scores“, podle kterého jsou proteiny řazeny, se počítá z mnoha faktorů – např. z počtu identifikovaných různých peptidů v proteinovém řetězci, četnosti jednotlivých nalezených proteinů, atd. Je tedy v pořádku, že v tabulkách prvních deseti (nebo méně, nebylo-li nalezeno deset) nejspolehlivěji určených proteinů nejsou tyto proteiny uspořádány podle počtu nalezených peptidů, neboť to je pouze jeden z ukazatelů, z něhož bylo celkové pořadí počítáno. Počet shodných peptidů byl vypočítán jako aritmetický průměr z údajů všech třech analýz zaokrouhlený na celé číslo, v závorce je uvedena směrodatná odchylka zaokrouhlená na celé číslo. Každý protein byl podle svého unikátního kódu „gi“ (GenInfo Identifier) vyhledán v databázích NCBI [49] a následně UniprotKB [26], případně Expasy [27], odkud byly čerpány informace o funkci, výskytu v buňce nebo rostlinném těle. Zde byly také nalezeny informace o rostlinách, v nichž byl daný protein nalezen. Anglický název proteinů (pokud není uvedeno jinak) byl převzat z databáze UniprotKB. Názvy proteinů byly ponechány v angličtině, v případě podrobnějšího komentáře jsou užívány české ekvivalenty. Vybrané skupiny nalezených proteinů byly popsány pro přehlednost v kapitole 3.2.1, ve výsledcích je k těmto obecným charakteristikám pouze odkázáno. V případě, že byly nalezeny totožné proteiny ve více vzorcích, jsou všechny následující odkázány k prvnímu popsanému. Srovnání výsledků bylo vzhledem k rozsahu práce prováděno pouze s rostlinnými databázemi, a byly testovány pouze proteiny, jiné informace proto z našich dat nelze získat – nelze tedy posoudit přítomnost přísad živočišného produktu, nebo např. umělých barviv. Možné limity identifikace konkrétních rostlinných druhů či vyšších taxonů (z různých hledisek)

byly pojednány také v kapitolách 3.1.3, 3.4.2 a dále 5.3.1 a shrnuty v kapitole 5.5. Úplná data všech zjištěných údajů jsou uvedena na příloženém CD.

5.3 ROSTLINY PŮVODU IDENTIFIKOVANÝCH PROTEINŮ

Tabulka 2. Přehled nalezených rostlinných druhů.

Latinský název rostliny	Český název rostliny	Taxonomické zařazení (čeleď)
<i>Aegilops tauschii</i>	mnohoštět Tauschův	<i>Poaceae</i>
<i>Amaranthus hypochondriacus</i> ,	laskavec červenoklasý	<i>Amaranthaceae</i>
<i>Brachypodium distachyon</i>	r. válečka *	<i>Poaceae</i>
<i>Cicer arietinum</i>	cizrna beraní	<i>Fabaceae</i>
<i>Citrus sinensis</i>	pomerančovník čínský	<i>Rutaceae</i>
<i>Cyrtococcum patens</i>	r. proso *	<i>Poaceae</i>
<i>Dasypyrum villosum</i>	kosmáč huňatý	<i>Poaceae</i>
<i>Digitaria sanguinalis</i>	rosička krvavá	<i>Poaceae</i>
<i>Fagopyrum esculentum</i>	pohanka obecná	<i>Polygonaceae</i>
<i>Glycine max</i>	sója luštinatá	<i>Fabaceae</i>
<i>Helianthus annuus</i>	slunečnice roční	<i>Asteraceae</i>
<i>Hordeum vulgare</i>	ječmen setý	<i>Poaceae</i>
<i>Hordeum vulgare var. distichon</i>	ječmen dvouřadý	<i>Poaceae</i>
<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	ječmen setý dvouřadý	<i>Poaceae</i>
<i>Iberis amara</i>	iberka hořká	<i>Brassicaceae</i>
<i>Lophopyrum elongatum</i> **	r. pýrovník *	<i>Poaceae</i>
<i>Oryza sativa</i>	rýže setá	<i>Poaceae</i>
<i>Panicum miliaceum</i>	proso seté	<i>Poaceae</i>

Latinský název rostliny	Český název rostliny	Taxonomické zařazení (čeleď)
<i>Pisum sativum</i>	hrách setý	<i>Fabaceae</i>
<i>Psathyrostachys juncea</i>	–	<i>Poaceae</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i>	trnovník akát	<i>Fabaceae</i>
<i>Secale cereale</i>	žito seté	<i>Poaceae</i>
<i>Secale strictum subsp. africanum</i>	r. žito *	<i>Poaceae</i>
<i>Setaria italica</i>	bér italský	<i>Poaceae</i>
<i>Solanum melongena</i>	lilek vejcoplodý	<i>Solanaceae</i>
<i>Solanum lycopersicum</i>	lilek rajče	<i>Solanaceae</i>
<i>Sorghum bicolor</i>	čirok obecný	<i>Poaceae</i>
<i>Spartina alterniflora</i>	r. spartina *	<i>Poaceae</i>
<i>Thinopyrum ponticum</i>	r. pýrovník *	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum aestivum</i>	pšenice setá	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum dicoccoides</i>	r. pšenice *	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum macha</i>	pšenice macha	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum turgidum</i>	pšenice naduřelá	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum spelta</i>	pšenice setá špalda	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum timopheevii subsp. armeniacum</i>	pšenice Timofejevova	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum turgidum subsp. durum</i>	pšenice naduřelá pravá	<i>Poaceae</i>
<i>Triticum urartu</i>	r. pšenice *	<i>Poaceae</i>
<i>Vicia faba</i>	bob obecný	<i>Fabaceae</i>
<i>Zea mays</i>	kukuřice setá	<i>Poaceae</i>

* r. je zkratka pro taxon rodu, nebylo možné určit český druhový název, viz níže

** *Lophopyrum elongatum* = *Thinopyrum ponticum*, podrobněji viz níže

5.3.1 VYSVĚTLENÍ TAXONOMICKÝCH VZTAHŮ

Tato kapitola má za cíl poukázat na problematiku názvosloví a vztahů mezi jednotlivými taxony a vyjasnit užívané pojmy (viz tabulka 2). Latinské názvy rostlin jsou převzaty z databází UniProtKB [26] a NCBI [49], ze kterých byly sbírány údaje o proteinech. České názvy byly přežaty z biolib.cz [50], aby byl zajištěn jednotný přístup k názvosloví. V případě absence celého českého názvu (především druhu) bude užíván český rod, či celý latinský název v momentech, kdy by český rod mohl být zavádějící. Nomenklaturní diskuze byla obohacena údaji z databáze KEW [51] (mezinárodní taxonomický/nomenklaturní vyhledavač provozovaný Royal Botanic Gardens). Několik názvů téže rostliny, které vznikly nejen vícenásobným popsáním, ale měnily se také na základě přehodnocování taxonomických vztahů a byly užívány podle preferencí různých autorů, jasně ukazuje, že vztahy v rámci *Poaceae* jsou velmi úzké a spleťité. Zejména nápadná je změť mezi rody *Elymus*, *Lophophyrum*, *Thinopyrum* a *Triticum*. Díky moderním genetickým metodám je možné, že se budou tyto taxonomické jednotky v budoucnu znovu přeuspořádávat.

Konkrétní taxonomické poznámky

Čeština zná pouze rod *Brachypodium* jako rod válečka, druhový název rostliny *Brachypodium distachyon* nenabízí.

Cyrtococcum patens nemá český ekvivalent. Podle KEW: Royal botanic gardens je přípustné ještě synonymum *Panicum patens*, rod *Panicum* se do češtiny překládá jako proso.

Pohanka obecná *Fagopyrum esculentum* byla určena také jako *Fagopyrum esculentum subsp. esculentum*, v češtině se poddruh již dále neoznačuje.

Nalezený ječmen *Hordeum vulgare subsp. vulgare* je podle biolib.cz přípustný názvem pouze jako *convar. vulgare*, tedy ječmen setý dvouřadý.

Název *Hordeum vulgare var. distichon* byl v databázi UniProt zanesený jako *Hordeum vulgare var. distichum*, nicméně podle biolib.cz i KEW slovo *distichum* neexistuje ani jako synonymum, přípustná je pouze varianta *distichon*. Zajímavé je, že UniProt zná i variantu

distichon, uznává ji jako synonymum, u některých proteinů ji i uvádí, ale většina proteinů je označena jinde neuznávaným *distichum*.

Lophopyrum elongatum je podle biolib.cz i KEW synonymum k *Thinopyrum elongatum*, tedy též ke zmíněnému *Thinopyrum ponticum*.

Podle databáze proteinů byla rostlina původu některých proteinů označena jako *Oryza sativa subsp. japonica*, *Oryza sativa subsp. indica*, *Oryza sativa japonica group*. Biolib.cz připouští pouze *Oryza sativa*, KEW připouští první dvě varianty jako synonyma k *Oryza sativa*. *Oryza sativa japonica* (resp. *indica*) *group* je označení používané pouze v databázi NCBI, patrně myšleno jako synonymum *Oryza sativa subsp. japonica* (resp. *indica*) nebo poddruhy velmi podobné tomuto.

Psathyrostachys juncea se do češtiny nepřekládá, zajímavý je pohled ke starším dnes nepoužívaným, ale uznávaným synonymům. První synonymickým výrazem je *Elymus junceus*, jehož rod *Elymus* je v češtině zanesen jako pýrovník, jiné synonymum zní *Triticum juncellum* – poukazuje na blízkou příbuznost s pšenicí.

Žito *Secale cereale subsp. ancestrale*, které se ve výsledcích objevilo, je podle KEW málo užívané synonymum k *Secale cereale* (na biolib.cz není uvedeno ani jako *Secale cereale subsp. ancestrale*, ani *Secale ancestrale*, pouze jako *Secale cereale*).

Secale strictum subsp. africanum české názvosloví nezná, ani varianty *S. strictum* nebo *S. africanum* možné podle KEW. Možné je pouze držet se rodu žito.

Setaria italica sice čeština zná jako bér italský nebo také vlašský, je však dobré poukázat také na přípustné synonymum *Panicum italicum* (proso italské nebo vlašské), které ukazuje na příbuznost s druhem *Panicum miliaceum*.

Celý název *Spartina alterniflora* čeština nezná. Samotný rod *Spartina* se překládá podle biolib.cz stejnojmenně: spartina. Podle KEW je možné k celému názvu též použít synonymum *Sporobolus alterniflorus*, přičemž rod *Sporobolus* se do češtiny překládá jako opadavec.

V případě *Thinopyrum ponticum* je možné přeložit pouze rod jako pýrovník. Celý název *Thinopyrum ponticum*, ani jeho uznávaný ekvivalent *Thinopyrum elongatum* či *Elymus elongatus subsp. ponticus* databáze biolib.cz v češtině nezná.

Triticum aestivum – dnešní pšenice setá, se nejčastěji v literatuře označuje jako pšenice obecná, v této práci byl z důvodu konzistence použit výraz z biolib.cz pšenice setá.

Triticum dicoccoides podle biolib.cz nemá český ekvivalent, je nutno se tedy v češtině přidršet pouze rodu pšenice.

V případě pšenice Timofejevovy je v českém názvosloví k dispozici pouze název *Triticum timopheevii*, *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum* není podle biolib.cz možné, i když KEW připouští i delší variantu jako synonymum.

Triticum urartu je druh pšenice, který se do češtiny nepřekládá. Podle KEW lze synonymicky označit jako *Crithodium urartu*, ale ani zde čeština nenabízí více než *Crithodium* jako synonymum *Triticum*, tedy pšenice.

5.4 ANALYZOVANÉ VÝROBKY

5.4.1 MOUKA 1

Ve vzorku MOUKA 1 o složení uvedeném v tabulce 3 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 4). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 3. Složení výrobku MOUKA 1.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Mouka špaldová celozrnná hladká	Natural Jihlava	špaldová mouka hladká	pšenice setá špalda (<i>Triticum spelta</i>)

Tabulka 4. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 1.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	21 (3)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
2	14 (0)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
3	15 (2)	gi 475612819	Protein disulfide-isomerase	<i>Aegilops tauschii</i>
4	14 (1)	gi 475588764	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
5	12 (0)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
6	10 (2)	gi 148508784	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Triticum aestivum</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
7	10 (1)	gi 253783729	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Triticum aestivum</i>
8	6 (2)	gi 109452233	High-molecular-weight glutenin subunit Bx17	<i>Triticum aestivum</i>
9	8 (1)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
10	7 (1)	gi 474407060	Uncharacterized protein, Hypothetical protein TRIUR3_08536	<i>Triticum urartu</i>

protein 1 (Globulin-3A)

V buňce má tato globulární bílkovina několik funkcí, jednak slouží k uskladňování živin, jednak se účastní odpovědi na cytokininy. [26] Tento protein je jedním z proteinů způsobující celiakii (glutenová enteropatie, autoimunitní onemocnění střev způsobené odpovědí organismu na lepek), souvisí však pravděpodobně i s některými případy onemocnění diabetem prvního typu. Pšeničné proteiny fungují pro organismus jako antigen, imunitní odpověď organismu pak u některých jedinců pravděpodobně způsobuje i zanícení a poškození buněk Langerhansových ostrůvků ve slinivce. [52]

protein 2 (Beta-amylase)

Tento enzym má stejnou charakteristiku jako jiné β -amylasy (viz kapitola 3.2.1). [26]

protein 3 (Protein disulfide-isomerase)

Identifikovaný protein napomáhá přeskupení disulfidických vazeb v proteinech. Obsahuje jedno aktivní centrum s thioredoxiny – důležité enzymy obsahující síru schopné redoxních reakcí. [26]

protein 4 (Globulin-1 S allele)

Zmíněný protein slouží k uchovávání živin. [26]

protein 5 (Beta-amylase)

Nalezený enzym má stejnou charakteristiku jako ostatní β -amylasy (více v kapitole 3.2.1). [26]

protein 6 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Tento enzym se uplatňuje v metabolismu glukosy při oxidačně-redukčních reakcích, kde aldehydická nebo oxo skupina působí jako donor vodíku nebo elektronu, a NAD nebo NADP jako akceptor. Kódován je genem GAPC. [26]

protein 7 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Nalezený protein je charakterizován stejně jako předchozí, vzniká přepisem genu GA3PD. [26]

protein 8 (High-molecular-weight glutenin subunit Bx17)

Protein je součástí větší podjednotky molekuly gluteninu. Slouží jako rezervoár živin. [26] Podrobnosti o gluteninu v kapitole 3.2.1.

protein 9 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Tento enzym se účastní obranné reakce rostlinné buňky. Hraje důležitou úlohu při inhibici translace. [26] Podrobněji popsáno v kapitole 3.2.1.

protein 10 (Uncharacterized protein [26], Hypothetical protein TRIUR3_08536 [49])

Funkce tohoto proteinu prozatím není objasněna.

INTERPRETACE

Všech 10 identifikovaných a popsáných proteinů vzorku MOUKA 1 náleží do čeledi *Poaceae* (lipnicovité). Sedm je možné přiřadit rodu *Triticum*, tři druhu *Aegilops tauschii*. Druhy *Aegilops tauschii* a *Triticum urartu* lze považovat za součást pšenice seté, jejich genom se v minulosti inkorporoval do genetické informace dnešní pšenice, jak je uvedeno v kapitole 3.1.3. Celkem bylo nalezeno 43 proteinů, které byly přítomny ve všech opakováních analýzy a byly prokázány alespoň dvěma peptidy. Celkově náleželo rodu *Triticum* 27 identifikovaných proteinů a *Aegilops tauschii* 10 proteinů (tzn. u 37 proteinů je možné jejich původ považovat za pšeničný). Další nalezené rostliny: *Hordeum vulgare* (*Poaceae*, celkem 3x); *Spartina alterniflora* (*Poaceae*), *Dasypyrum villosum* (*Poaceae*),

Solanum melongena (*Solanaceae*) byly detekovány vždy pouze jedním proteinem. *Poaceae* a jejich složité taxonomické vztahy byly diskutovány výše v kapitole 5.3.1, a jsou dále shrnuty v kapitole 5.5. Záměrné přidávání dalších surovin do jednodruhové mouky s deklarovaným složením na obalu je nepravděpodobné, spíše se jedná o nerozlišitelnost příliš příbuzných rostlin. Rod *Solanum* (druh v rámci diskutability) by u pečiva mohl ve vzorku pocházet z přídatku bramborového škrobu – nicméně u mouky pro něho není vysvětlení. Mohlo tedy dojít ke kontaminaci mouky během života výrobku. Žádný z proteinů neodpovídá deklarovanému a hledanému druhu pšenice seté špaldy. Zároveň není možné popřít, že nenalezení hledané rostliny skutečně znamená její nepřítomnost ve vzorku (viz kapitola 3.4.2).

5.4.2 MOUKA 2

Ve vzorku MOUKA 2 o složení uvedeném v tabulce 5 bylo podrobněji popsáno devět nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 6). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 5. Složení výrobku MOUKA 2.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Mouka hrachová nativní	Extrudo Bečice	žlutý hrách	hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)

Tabulka 6. Prvních 9 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 2.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	13 (4)	gi 75102461	Seed biotin-containing protein SBP65	<i>Pisum sativum</i>
2	10 (6)	gi 7339551	Convicilin	<i>Pisum sativum</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
3	10 (4)	gi 126405	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3	<i>Pisum sativum</i>
4	6 (0)	gi 493730	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2	<i>Pisum sativum</i>
5	5 (2)	gi 137579	Provicilin	<i>Pisum sativum</i>
6	7 (2)	gi 3122053	Elongation factor 1-alpha	<i>Pisum sativum</i>
7	2 (0)	gi 282925	Legumin K	<i>Pisum sativum</i>
8	2 (0)	gi 502146614	PREDICTED: 1-Cys peroxiredoxin-like	<i>Cicer arietinum</i>
9	2 (0)	gi 1754979	Em protein	<i>Robinia pseudoacacia</i>

protein 1 (Seed biotin-containing protein SBP65)

Tento polypeptid může sloužit jako zdroj vázaného biotinu (též vitamín B7 nebo vitamín H) pro některé enzymy ovlivňující růst semen rostliny a jejich správné zrání. Až 90 % biotinu vázaného na proteiny může být v hrachu vázáno tímto hydrofobním polypeptidem, pravděpodobně přes lysin. Biotinylační (tj. vázající biotin) doména je značně odlišná od ostatních známých enzymů, jež také vážou biotin. [53]

protein 2 (Convicilin)

O konvicilinu se hovoří jako o jednom z nejsilnějších alergenů u lidí s alergií na hrách. [54] Specifické protilátky třídy IgE ze séra pacientů prokázaly reakci ve více než 50 % případech takto postižených osob. [55] Pomocí konvicilinu z hrachu byla studována exprese genů v semenech u transgenního tabáku. Tabák dokázal konvicilin exprimovat a ukládat taktéž v semenech, nicméně molekula se po translaci rozpadala na menší polypeptidy. [56] V semenu se konvicilin uplatňuje jako zásobní protein patřící do skupiny 7S globulinů [26], které tvoří trimerní struktury. [17]

protein 3 (Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3)

Lipoxygenasy, řazené mezi oxidoreduktasy, jsou v rostlinách běžné enzymy. Účastní se celé řady procesů – růstu a vývoje rostliny a jejího stárnutí, při obraně proti škůdcům a v odpovědi na zranění. Tento enzym obsahuje kationt železa a v buňce se nalézá v cytoplazmě. Substrátem pro lipoxygenasy jsou mastné kyseliny obsahující *cis,cis*-1,4-pentadienovou strukturu. Tento enzym zpracovává kyselinu linolovou (kyselina *cis,cis*-oktadeka-9,12-dienová), reakcí s kyslíkem (O₂) vzniká (9S,10E,12Z)-9-hydroperoxy-10,12-oktadekadienová kyselina. [26]

protein 4 (Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2)

Charakteristika tohoto proteinu je totožná s předchozím. [26]

protein 5 (Provicilin)

Bylo zjištěno, že provicilin je nejprve syntetizován jako preprovicilin s následným odstraněním signálního peptidu a C-konce peptidu a je dále upravován. Zmíněný protein je deponován v tzv. aleuronové vrstvě. Tato vrstva vzniká tak, že prekurzory bílkovin prochází z cytoplazmy do vakuol a formují se ve vrstvu na vnější straně endospermu. Proteiny z aleuronové vrstvy slouží jako důležitý depot pro procesy v následném klíčení semene, a jsou důležitým zdrojem živin i pro organizmy živící se semeny rostlin. [26]

protein 6 (Elongation factor 1-alpha)

Působí jako elongační faktor – pomáhá řídit elongaci (=prodlužování) polypeptidového řetězce vznikající bílkoviny. Pomocí tohoto elongačního faktoru a energie uvolněné z GTP je aminoacyl-tRNA zařazena na A místo na ribozomu. Nachází se v cytoplazmě na ribozomech. [26]

protein 7 (Legumin K)

Leguminy jsou proteiny typické pro bobovité rostliny (*Fabaceae*, dříve nazývané také leguminózy). Tyto proteiny jsou známy již dlouho a od sedmdesátých let byla podrobně prozkoumána i jejich struktura a vlastnosti, exprese byla zkoumána v řadě studií zejména u tolice rodu *Medicago truncatula* a u dalších rostlin. Sekvence jednoho z genů kódujícího legumin byla zjištěna již v roce 1984. [57] Pro svoji podobnost mléčnému proteinu kaseinu jsou leguminy nazývány rostlinným kaseinem. Leguminy náleží mezi 11S globulární proteiny se zásobní funkcí. Ke vzniku leguminu je nutná kaskáda dějů. Nejprve vzniká pre-

prolegumin, který se dostává do lumen endoplasmatického retikula, přes disulfidický můstek se spojují α (větší, hydrofilní) a β (menší, hydrofobní) řetězce a vzniká prolegumin. Proleguminy se spojují v trimery, které jsou pomocí vesikulů dopraveny do zásobní vakuoly, kde se tvoří legumin. [17, 58] Z hlediska kvarterní struktury tvoří legumin hexamer z šesti párů podjednotek (alfa + beta). Uvádí se, že je v potravě zdrojem aminokyselin obsahujících síru. [26] Legumin nebývá příčinou alergií u osob citlivých na hrách. [54]

protein 8 (PREDICTED: 1-Cys peroxiredoxin-like)

Peroxiredoxiny jsou enzymy, které jsou pro organismus důležité při odstraňování H_2O_2 . Při redukci peroxidu se uplatňuje $-SH$ skupina cysteinu, která je oxidována na skupinu $-SOH$. Předpokládá se, že tento protein bude náležet do skupiny 1-Cys, tedy mezi peroxiredoxiny s jednou cysteinovou skupinou v aktivním místě enzymu. [59]

protein 9 (Em protein)

Em (Early-methionine-labeled) proteiny jsou spojeny s embryogenezí – zráním zárodku. Osmotický stres a kyselina abscisová ovlivňují expresi genů kódujících Em proteiny a působí tak na zrání semen. Bylo prokázáno, že tyto proteiny jsou u akátu kódovány jedním nebo několika za sebou seřazenými geny. Srovnáním aminokyselinové sekvence bylo vyvozeno, že tyto proteiny z akátu jsou homologní k proteinům jiných rostlin, a že v různých rostlinných druzích zastávají podobnou funkci. [60]

INTERPRETACE

7 z 9 nalezených proteinů tohoto vzorku bylo přiřazeno rodu *Pisum sativum*, hrachu setému, z něhož výrobce mouku deklaroval. Je možné s jistotou tedy vyvodit, že mouka skutečně obsahovala slíbený hrách. Dále byly nalezeny druhy *Cicer arietinum* a *Robinia pseudoacacia*, obě bobovité rostliny (každá určena jedním proteinem). Přítomnost trnovníku akátu *Robinia pseudoacacia* je nepravděpodobná, ačkoli jeho květy mají potravinářské využití, nikoli však v ČR, pravděpodobnější se jeví vysvětlení v podobě falešného přiřazení na základě příbuznosti rostlin. Přítomnost cizrny *Cicer arietinum* je pravděpodobnější, i vzhledem k využití plodiny na mouku, nicméně příbuzenský vztah cizrny a hrachu je natolik těsný, že nelze spolehlivě prohlásit, že by ve vzorku byla přítomna i cizrna (více o limitu metody příbuzností rostlin v kapitole 3.4.2 a v diskuzi 5.5).

Celkově bylo nalezeno pouze 9 proteinů splňující kritéria všech 3 opakování a dvou a více shodných peptidů.

5.4.3 MOUKA 3

Ve vzorku MOUKA 3 o složení uvedeném v tabulce 7 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 8). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 7. Složení výrobku MOUKA 3.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Kukuřičná mouka polohrubá	Natural Jihlava JK	–	kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)

Tabulka 8. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 3.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	16 (3)	gi 162461970	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>Zea mays</i>
2	16 (5)	gi 73747074	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>Zea mays</i>
3	16 (5)	gi 16305144	Legumin 1	<i>Zea mays</i>
4	18 (6)	gi 62738111	Pyruvate Phosphate Dikinase From Maize	<i>Zea Mays</i>
5	16 (3)	gi 413952473	Putative translation elongation factor family protein	<i>Zea mays</i>
6	10 (2)	gi 226504732	Sorbitol dehydrogenase homolog 1	<i>Zea mays</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
7	13 (4)	gi 226509797	Phosphoglycerate kinase	<i>Zea mays</i>
8	12 (2)	gi 224030527	Uncharacterized protein	<i>Zea mays</i>
9	8 (2)	gi 194690156	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Zea mays</i>
10	14 (5)	gi 145666464	Protein disulfide-isomerase	<i>Zea mays</i>

protein 1 (Glucose-1-phosphate adenyltransferase)

Tento protein se jako jeden z mnoha účastní syntézy škrobu (viz kapitola 3.2.1). [26] Tento enzym je kódován dvěma paralogními geny Bt2 a L2 – situace vznikla jako výsledek tetraploidizace genomu kukuřice; v průběhu evoluce se každý gen začal uplatňovat na jiném místě, Bt2 v cytosolu endospermu a L2 v listech rostliny. [61] Tento protein byl kódován genem Bt2 na 4. chromozomu. [49]

protein 2 (Glucose-1-phosphate adenyltransferase)

Tento protein taktéž pochází z malé podjednotky téhož enzymu jako v případě předchozího proteinu (podrobněji kapitole 3.2.1). [26]

protein 3 (Legumin 1)

Leguminy byly původně identifikovány v leguminózách (*Fabaceae*), později byly nalezeny také v ostatních rostlinách – včetně jednoděložných, kam je řazena i kukuřice. Jako ostatní leguminy slouží tento globulární protein jako depot živin. [26] V analýze z roku 2001, kde byla srovnávána četnost přepisů mRNA v kukuřici odrůdy B73, byla u leguminu 1 zaznamenána jedna z nejnižších četností přepisů z identifikovaných proteinů. [62] V jiné analýze bylo zjištěno, že tento protein na rozdíl od homologních proteinů v jiných rostlinách nepodléhá štěpení na menší části, ale zůstává přítomen ve velikosti 51 kDa. V divoké odrůdě kukuřice je tento protein početnější než v jiných odrůdách. [63]

protein 4 (Pyruvate Phosphate Dikinase From Maize [49])

Kukuřice patří mezi C4 rostliny, které zachycují CO₂ na fosfoenolpyruvát za vzniku čtyřuhlíkatého oxalacetátu. Děje odlišné od klasické C3 fotosyntézy vyžadují také odpovídající enzymatickou výbavu. Detekovaný enzym katalyzuje vznik fosfoenolpyruvátu, což je možné popsat schématem: ATP + pyruvát + fosfát = AMP + fosfoenolpyruvát + difosfát. Tento protein je řazen mezi metaloproteiny, jako ligand se uplatňuje hořčík. [26]

protein 5 (Putative translation elongation factor family protein)

Předpokládá se, že tento protein se uplatňuje jako elongační faktor, tedy napomáhá biosyntéze proteinů. [26]

protein 6 (Sorbitol dehydrogenase homolog 1)

Tento enzym katalyzuje děj vyjádřený schématem: L-identol + NAD⁺ = L-sorbosa + NADH + H⁺. Protein byl nalezen v plasmodesmatech, cytosolu. Jako kofaktor se uplatňuje zinečnatý iont Zn²⁺. [26]

protein 7 (Phosphoglycerate kinase)

Enzym byl nalezen v mnoha buněčných komponentech: v jádře, plasmatické membráně, vakuolární membráně, plasmodesmatech, stromatu chloroplastu a dalších. Katalyzuje děj ATP + 3-fosfoglycerát = ADP + 1,3-bisfosfoglycerát. [27] Tento enzym pochází z kukuřice, enzymy se stejnou funkcí byly nalezeny i v mnoha jiných organismech. [26]

protein 8 (Uncharacterized protein)

Ačkoliv je gen tohoto proteinu kompletně osekvenován, o funkci proteinu je známo pouze, že slouží jako rezervoár živin. [26]

protein 9 (Fructose-bisphosphate aldolase)

Tento enzym patřící do třídy lyas je účastný ve 4. kroku glykolýzy, katalyzuje rozklad šestiuhlíkatého substrátu dva tříuhlíkaté fragmenty: fruktosa-1,6-bisfosfát = glyceraldehyd-3-fosfát + dihydroxyaceton-fosfát. [27] Enzym také katalyzuje opačný proces v glukoneogenezi. [25] Jako kofaktor se uplatňuje zinečnatý iont Zn²⁺. [27]

protein 10 (Protein disulfide-isomerase)

Katalyzuje přeskupení disulfidických –S–S– vazeb v proteinech. Ke své činnosti potřebuje tento enzym redukční činidlo. Disulfidická vazba je při přeskupování redukována na thiolové –S–H vazby, a reoxidací se pak uskupují nové –S–S– vazby. V buňkách tento enzym pomáhá udržovat redox rovnováhu buňky nebo organely, nalezen byl v endoplasmatickém retikulu. [26]

INTERPRETACE

Vzorek MOUKA 3 byl v určení rostlin poskytujících nalezené proteiny mimořádně homogenní. Všech 10 nejspolehlivěji určených proteinů bylo přiřazeno plodině deklarované výrobcem – kukuřici seté (*Zea mays*). Celkem bylo ve všech 3 opakováních analýzy identifikováno 39 proteinů s více než 2 shodnými peptidy. U všech 39 proteinů byla jako rostlina původu přiřazena kukuřice. Na základě těchto výsledků je možné potvrdit, že mouka byla skutečně vyrobena pouze z kukuřice. Zároveň se v tomto případě dobře osvědčila zvolená metodika.

5.4.4 MOUKA 4

Ve vzorku MOUKA 4 o složení uvedeném v tabulce 9 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 10). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 9. Složení výrobku MOUKA 4.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Pšeničná mouka hrubá	Ramill	potravinářská pšenice	pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)

Tabulka 10. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 4.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	16 (4)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
2	14 (2)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
3	18 (3)	gi 475612819	Protein disulfide- isomerase	<i>Aegilops tauschii</i>
4	13 (2)	gi 326514918	Sucrose synthase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>var. distichum</i>
5	9 (3)	gi 253783729	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>
6	9 (2)	gi 224589266	Serpin 1	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>
7	7 (1)	gi 109452233	High-molecular-weight glutenin subunit Bx17	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>
8	9 (3)	gi 148508784	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>
9	9 (2)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>
10	8 (1)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 2 (Beta-amylase)

Nalezený protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 3 (Protein disulfide-isomerase)

Tentýž protein byl popsán u vzorku MOUKA 1 jako protein 3.

protein 4 (Sucrose synthase)

Tento enzym hraje významnou roli v metabolismu sacharosy. [26] Děj, který katalyzuje, lze vyjádřit schématem: NDP-glukosa + D-fruktosa = NDP + sacharosa, kde N vyjadřuje dusíkatou bázi. Z nukleotidů je preferován uridindifosfát (UDP), nicméně reakce se může účastnit také adenosindifosfát (ADP). Tento enzym se uplatňuje jednak v produkci UDP-glukosy důležité pro buněčné stěny a biosyntézu glykoproteinů, jednak v tvorbě ADP-glukosy podstatné v biosyntéze škrobu. [27]

protein 5 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Tento enzym byl nalezen také u vzorku MOUKA 1 (protein 7).

protein 6 (Serpín 1)

Tento serpin je lokalizován v mezibuněčném prostoru. Slouží jako inhibitor serinových proteas. [26]

protein 7 (High-molecular-weight glutenin subunit Bx17)

Tento protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, popsán je jako protein 8.

protein 8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Tentýž protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1 (protein 6).

protein 9 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Tento protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 10 (12S seed storage globulin 1)

Protein globulární struktury, který se uplatňuje v uchování živin. [26]

INTERPRETACE

Z popsaných deseti proteinů (tabulka 10) pět proteinů pochází přímo z pšenice seté, *Triticum aestivum*, z níž se mouka podle výrobce má skládat. V jednom případě byl nalezen druh pšenice *Triticum urartu*, u třech proteinů byl jako rostlina původu označen mnohoštet Tauschův *Aegilops tauschii*, oboje pravděpodobně jako odkaz na součást genomu pšenice (viz kapitola 3.1.3). Z popsaných proteinů byl jeden protein přisouzen ječmeni *Hordeum vulgare*. Celkem bylo identifikováno 30 proteinů, které splnily podmínky nalezení ve všech třech analýzách a zároveň vykázaly dva a více

identifikovaných peptidů. Z celkových 30 proteinů 19 náleželo některému z druhů pšenice *Triticum* a 7 druhu *Aegilops tauschii* (tedy 26 proteinů ukazuje na přítomnost pšenice). Ve výsledcích se dále objevily rostliny pšenice naduřelá *Triticum turgidum* (1×), *Dasyphyrum villosum* (1×) a ječmen *Hordeum vulgare* (celkem 3×) – všechny rostliny náležící stejně jako hledaná pšenice setá do lipnicovitých (*Poaceae*). Ve všech třech případech lze přítomnost vysvětlit příbuzností organismů. U ječmene je přípustná také možnost kontaminace při zpracování.

U jednodruhové mouky (=balený výrobek) je nepravděpodobné, že by výrobce přidával jiné rostliny jako záměr. Jako pravděpodobnější se jeví vysvětlení, že zde metoda proteinového mapování nalézá své limity a nedokáže dostatečně rozlišit velmi příbuzné druhy s podobným a v některých částech shodným genomem (více v kapitole 3.4.2 a následně v diskuzi v kapitole 5.5).

5.4.5 MOUKA 5

Ve vzorku MOUKA 5 o složení uvedeném v tabulce 11 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 12). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 11. Složení výrobku MOUKA 5.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Jahelná mouka hladká	Natural Jihlava JK	jahelná mouka	proso seté (<i>Panicum miliaceum</i>)

Tabulka 12. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 5.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	19 (5)	gi 281333923	Starch synthase	<i>Panicum miliaceum</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
2	19 (5)	gi 545292629	Starch synthase	<i>Setaria italica</i>
3	21 (4)	gi 380691810	Pyruvate orthophosphate dikinase	<i>Cyrtococcum patens</i>
4	19 (5)	gi 380691806	Pyruvate orthophosphate dikinase	<i>Digitaria sanguinalis</i>
5	15 (4)	gi 514813846	PREDICTED: alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	<i>Setaria italica</i>
6	15 (3)	gi 514750542	PREDICTED: pyruvate, phosphate dikinase 2	<i>Setaria italica</i>
7	16 (3)	gi 413952824	Sucrose synthase	<i>Zea mays</i>
8	9 (2)	gi 514795259	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>Setaria italica</i>
9	15 (4)	gi 514712923	1,4-alpha-glucan- branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic	<i>Setaria italica</i>
10	14 (2)	gi 514820490	PREDICTED: protein TOC75, chloroplastic	<i>Setaria italica</i>

protein 1 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic [26], S-type granule bound starch synthase 1 [49])

Tato glykosyltransferasa je přítomná v metabolismu škrobu. Na subcelulární úrovni je tento protein přítomen v chloroplastech a amyloplastech. [26] Podrobnější informace v kapitole 3.2.1.

protein 2 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic)

Protein vykazuje stejnou funkci jako předchozí popsany. [26]

protein 3 (Pyruvate orthophosphate dikinase)

Tento metaloprotein vážící hořečnaté ionty Mg^{2+} se uplatňuje jako kinasa v metabolickém cyklu zahrnujícím pyruvát. Katalyzovanou reakci je možno shrnout schématem: $ATP + \text{fosfát} + \text{pyruvát} = AMP + \text{difosfát} + 2 H^+ + \text{fosfoenolpyruvát}$. [26]

protein 4 (Pyruvate orthophosphate dikinase)

Funkci tohoto proteinu lze popsat stejně jako u předchozího proteinu 3 tohoto vzorku. [26]

protein 5 (PREDICTED: alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic [49])

Fosforylasy, enzymy ze třídy transferas, odštěpují glukosové jednotky z delšího řetězce glukanu a váží je s fosfátovým zbytkem. Děj lze shrnout jako $1,4\text{-}\alpha\text{-D-glukan}(n) + \text{fosfát} = 1,4\text{-}\alpha\text{-D-glukan}(n-1) + \alpha\text{-D-glukosa-1-fosfát}$. Substrát je specifický pro daný enzym a konkrétní $\alpha\text{-D-glukan}$ u tohoto enzymu zatím není znám. [27]

protein 6 (PREDICTED: pyruvate, phosphate dikinase 2 [49])

Bér italský (také vlašský) patří mezi C4 rostliny, pro které je tento enzym typický. Umožňuje vznik fosfoenolpyruvátu při následujícím ději: $ATP + \text{pyruvát} + \text{fosfát} = AMP + \text{fosfoenolpyruvát} + \text{difosfát}$. [26]

protein 7 (Sucrose synthase)

Tento enzym je účastný biosyntézy sacharosy, kdy reaguje $NDP\text{-glukosa} + D\text{-fruktosa}$ a vzniká $NDP + \text{sacharosa}$. [27] V opačném procesu ze sacharosy vzniká $UDP\text{-glukosa}$ a fruktosa, které mohou být dále využity k dalším dějům. [26]

protein 8 (Glucose-1-phosphate adenylyltransferase)

Tato transferasa je účastna při metabolismu škrobu (podrobněji kapitola 3.2.1). Na subcelulární úrovni byla nalezena v chloroplastech. [26]

protein 9 (1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic [49])

Nalezený protein se uplatňuje v metabolismu škrobu. Katalyzuje přenos části řetězce $1,4\text{-}\alpha\text{-D-glukanu}$ a její napojení na hydroxylovou skupinu na jiném místě. Ve druhém směru reakce katalyzuje hydrolyzu O-glykosidické vazby. Interaguje nekovalentní vazbou s kationtem. [26]

protein 10 (PREDICTED: protein TOC75, chloroplastic [49])

Podle endosymbiotické teorie chloroplasty (stejně jako mitochondrie) vznikly z prokaryotického organismu pohlceného jiným organismem. Kódování mnoha proteinů přešlo ze semiautonomních organel do jádra, funkce však těmto organelám zůstala, proto do nich musí být mnohé proteiny dopraveny. K transportu proteinů z jádra do těchto organel slouží translokony. Identifikovaný protein patří mezi TOC (Translocon of the outer membrane of chloroplast), proteiny nacházející se na vnější membráně chloroplastu. TOC75 tvoří kanál, jímž proteiny dopravované do chloroplastu procházejí. [64]

INTERPRETACE

Z 10 popsaných proteinů vzorku MOUKA 5 šest proteinů pochází z bérů italského (*Setaria italica*), jehož přípustným synonymem je proso italské (*Panicum italicum*) – podrobněji v kapitole 5.3.1. Příbuzné proso seté (*Panicum miliaceum*) bylo prokázáno v jednom případě, stejně jako *Cyrtococcum patens*, náležící taktéž k rodu proso (taktéž kapitola 5.3.1). Rod proso tedy vyhověl v 8 z 10 proteinů. Dále byly nalezeny rostliny rosnička krvavá (*Digitaria sanguinalis*) a kukuřice setá (*Zea mays*), obě vzdálenější lipnicovité (*Poaceae*). Ve vzorku bylo nalezeno (ve všech třech opakováních a spolehlivě prokázáno alespoň 2 peptidy) celkem 53 proteinů, z nichž převažuje rod proso (celkem 31 proteinů). Častěji se opakovala již zmíněná kukuřice (celkem 11×), čtyřikrát byl nalezen širok obecný *Sorghum bicolor*, jednou pak rýže *Oryza sativa japonica*, pšenice *Triticum urartu* a ječmen *Hordeum vulgare*. Všechny jmenované jsou řazeny do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Výjimku tvoří nalezený laskavec červenoklasý (*Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthaceae*), jenž byl identifikován v jednom případě.

Přiřazení původu různých lipnicovitých rostlin tomuto vzorku může vzniknout následkem příbuznosti mezi lipnicovitými, mohla by tak být vysvětlena většina odchylek v tomto vzorku. Zejména kukuřice, jejíž jméno bylo u proteinů v souvislosti s jejich původem uváděno jako druhé nejčastější, je modelovým organismem, tedy dobře probádanou rostlinou. Proteiny společné s ní by tedy mohly být přiřazeny jí, protože u ní byly popsány dříve, ačkoli pochází z prosa. Proso naopak nebývá často předmětem zájmu, což by mohlo vysvětlovat, proč se kukuřice objevuje ve výsledku prosa a ne třeba u také často studované pšenice (např. vzorek MOUKA 1 nebo MOUKA 4), ačkoli jsou všechny zmíněné lipnicovité rostliny příbuzné. Vysvětlení přítomnosti široku by mohlo být podobné.

Zajímavá je přítomnost méně příbuzného laskavce, s nímž je vzhledem k jiné čeledi záměna méně pravděpodobná než s jinými lipnicovitými, ne však nemožná. Vyloučit nelze také kontaminaci, avšak přidávání dalších rostlin do jednodruhové mouky není pravděpodobné.

V případě tohoto vzorku je možné jasně prokázat přítomnost prosa, zároveň ale roztržitost dalších výsledků nalezených rostlin dává znát, že metodiku u tohoto vzorku nelze aplikovat bezvýhradně.

5.4.6 MOUKA 6

Ve vzorku MOUKA 6 o složení uvedeném v tabulce 13 bylo podrobněji popsáno pět nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 14). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 13. Složení výrobku MOUKA 6.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Krupička bezlepková rýžová jemná	Extrudo Bečice	rýže	rýže setá (<i>Oryza sativa</i>)

Tabulka 14. Prvních 5 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 6.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	13 (7)	gi 115476014*	PREDICTED: glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>
2	13 (8)	gi 222622792	Uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp. japonica</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
3	13 (7)	gi 531874316	Glutelin	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp. indica</i>
4	9 (4)	gi 115444481 *	PREDICTED: phosphoglycerate kinase, cytosolic	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>
5	3 (0)	gi 115461693 *	PREDICTED: outer envelope pore protein 16, chloroplastic	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>

* u těchto proteinů nebylo možné nalézt je pod původním kódem z důvodu zastaralosti záznamu (který může znamenat pouze restrukturalizaci databáze v rámci inovace, čtení genomu), po přesměrování na novější záznamy byl vybrán protein s nejlepší shodou aminokyselin (rostlina, tedy rýže, se vždy shodovala v původním i náhradním záznamu)

protein 1 (PREDICTED: glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic [49])

Tento protein se s proteinem pod původním kódem shoduje v sekvenci 479 aminokyselin. [49] Vykazuje stejnou funkci jako ostatní enzymy tohoto typu (viz kapitola 3.2.1).

protein 2 (Uncharacterized protein)

U daného proteinu je známo, že se uplatňuje jako zásobní protein. [26]

protein 3 (Glutelin)

Gluteliny a jejich úloha v rostlinné buňce byly popsány v kapitole 3.2.1.

protein 4 (PREDICTED: phosphoglycerate kinase, cytosolic [49])

Popisovaný protein vykazuje s proteinem pod původním kódem shodu v 402 aminokyselinách. [49] Katalyzuje děj $ATP + 3\text{-fosfoglycerát} = ADP + 1,3\text{-bisfosfoglycerát}$. Na subcelulární úrovni je přítomen v cytosolu. [27]

protein 5 (PREDICTED: outer envelope pore protein 16, chloroplastic [49])

Zmíněný protein se s proteinem pod původním kódem shoduje v sekvenci 146 aminokyselin. [49] Uplatňuje se jako transmembránový proteinový kanál, jeho funkcí je import proteinů do chloroplastového stromatu a mitochondriální matrix. V jeho struktuře byly nalezeny helixové struktury. [26]

INTERPRETACE

U tohoto vzorku bylo identifikováno pouze 5 proteinů, které by vyhověly podmínce minimální shody dvou peptidů při všech opakování analýzy. U všech pěti byla jako rostlina původu určena rýže setá (*Oryza sativa*). Ačkoli byly nalezeny oba dva poddruhy (*japonica*, *indica*), rozlišení poddruhů je patrně pod možností této metody kvůli přílišné shodě genomu tak příbuzných druhů (viz dále v kapitole 5.5).

U tohoto vzorku je možné jednoznačně potvrdit přítomnost rýže seté.

5.4.7 PEČIVO 1

Ve vzorku PEČIVO 1 o složení uvedeném v tabulce 15 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 16). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 15. Složení výrobku PEČIVO 1.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Rohlík sojový	Albert	běžné čerstvé pečivo	pšenice setá, sója luštinatá

Tabulka 16. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 1.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	16 (2)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
2	16 (2)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
3	17 (3)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
4	12 (1)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
5	12 (3)	gi 224589270	Serpin 3	<i>Triticum aestivum</i>
6	12 (3)	gi 475588764	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
7	14 (3)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>
8	7 (1)	gi 121449	Glutenin, high molecular weight subunit DY10	<i>Triticum aestivum</i>
9	14 (0)	gi 9967357	Alpha subunit of beta conglycinin	<i>Glycine max</i>
10	9 (2)	gi 75282265	Serpin-Z1A	<i>Triticum aestivum</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 2 (Beta-amylase)

Tento protein plní stejnou funkci jako předchozí identifikovaný. Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 3 (Globulin-3A)

Identifikovaný protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1, a popsán jako protein 1.

protein 4 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Zjištěný protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 5 (Serpín 3)

Serpiny se uplatňují jako inhibitory serinových proteas (kapitola 3.2.1). Tento protein je přítomen v mezibuněčném prostoru. [26]

protein 6 (Globulin-1 S allele)

Tentýž protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, kde byl popsán jako protein 4.

protein 7 (12S seed storage globulin 1)

Tento protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 4, jako protein 10.

protein 8 (Glutenin, high molecular weight subunit DY10)

Nalezený protein tvoří velkou podjednotku glutenin (podrobněji kapitola 3.2.1) a uplatňuje se jako depot živin v semeni pšenice. [26] Gen kódující tento protein byl osekvenován v roce 1989. [65]

protein 9 (Alpha subunit of beta conglycinin)

Identifikovaný β -conglycinin je jedním z hlavních zásobních proteinů sóji. β -conglycinin může vyvolávat alergické reakce. [54] Bylo zjištěno, že strava bohatá na β -conglycinin může mít ateroprotektivní efekt (tj. redukuje aterosklerózu) a snižuje hladinu cholesterolu v játrech a séru. [66, 67]

protein 10 (Serpín-Z1A)

Tento serpin (inhibitor serinových proteas, viz kapitola 3.2.1) inhibuje chymotrypsin a katepsin G. Mezi karboxylovou skupinou serpinu a hydroxylovou skupinou serinu proteasy vzniká kovalentní vazba, produkt je stabilní a funkce proteasy je tak blokována. Tento serpin je přítomen v mezibuněčném prostoru. [68]

INTERPRETACE

U 6 z 10 popsaných proteinů tohoto vzorku byla jako zdrojová rostlina označena pšenice *Triticum* – 5x pšenice setá *T. aestivum* a 1x *T. urartu*. Podobně jako v jiných vzorcích

jiných obilnin byl přítomen mnohoštet Tauschův (*Aegilops tauschii*), v tomto případě ve 3 proteinech. Nalezen byl také protein pocházející ze sóji luštinaté (*Glycine max*).

Vysvětlení přítomnosti *Aegilops tauschii* a *Triticum urartu* bylo provedeno v kapitole 3.1.3, daný protein je kódován částí genomu, kterou si dnešní pšenice nese z těchto předků.

Celkem bylo nalezeno 61 proteinů vyhovujících podmínkám opakování ve všech provedených analýzách a zároveň s dvěma a více identifikovanými peptidy. V rámci rodu *Triticum* (bez ohledu na rod) bylo nalezeno 31 proteinů, *Aegilops tauschii* byl nalezen v 16 případech – pšenice (s ohledem na kapitolu 3.1.3) byla tedy identifikována 47×. Kromě již zmíněných rostlin byly proteiny přiřazeny také následujícím rostlinám: válečka *Brachypodium distachyon* (2×), ječmen *Hordeum vulgare* (2×), *Psathyrostachys juncea* (1×) – synonymum k rodu *Elymus*, tedy pýrovník, dále *Lophopyrum elongatum* (1×) – opět synonymum k rodu *Elymus*, *Dasyphyrum villosum* (1×). Všechny jmenované jsou řazeny mezi rostliny lipnicovité (*Poaceae*), diskuze ohledně záměnnosti velmi příbuzných rostlin je nabídnuta dále v kapitole 5.5. Je nutné brát také v potaz, že rostlin určených jako zdrojových bylo popsáno více, nicméně nalezeny byly pouze jednou až dvakrát, a také počet shodných peptidů byl u některých na hraně spolehlivosti.

Sója *Glycine max* (*Fabaceae*) byla v celém souboru přítomna 7×.

Rostlina původu jednoho proteinu byla označena jako *Solanum melongena*, mohlo se jednat o bramborový škrob přidávaný do pečiva (s ohledem na to, že by pravděpodobně tento škrob pocházel z rodu *Solanum tuberosum* – otázka určení druhu je poněkud diskutabilní).

Nalezení převážné většiny pšeničných proteinů a také opakování proteinů shodných se vzorkem MOUKA 1 a MOUKA 4 dokazuje, že pečivo je možné přiřadit pšeničné mouce, a proteiny lze identifikovat i přesto, že prošly dalšími procesy při výrobě pečiva. V pečivu byla potvrzena přítomnost sóji zmíněné v názvu výrobku.

5.4.8 PEČIVO 2

Ve vzorku PEČIVO 2 o složení uvedeném v tabulce 17 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 18). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 17. Složení výrobku PEČIVO 2.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Kaiserka s pohankou	Billa	vícezrnné pečivo, A: lepek, sója, mléko, SO ₂	pšenice setá, pohanka obecná

Tabulka 18. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 2.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	14 (1)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
2	13 (1)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
3	16 (2)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
4	12 (2)	gi 475588764	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
5	12 (1)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
6	7 (1)	gi 109452233	High-molecular-weight glutenin subunit Bx17	<i>Triticum aestivum</i>
7	8 (2)	gi 75282265	Serpin-Z1A	<i>Triticum aestivum</i>
8	8 (2)	gi 110341796	High-molecular-weight glutenin By8	<i>Triticum aestivum</i>
9	8 (1)	gi 473793747	Serpin-Z2B	<i>Triticum urartu</i>
10	10 (2)	gi 409924368	Major allergenic storage protein	<i>Fagopyrum esculentum</i> subsp. <i>esculentum</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 2 (Beta-amylase)

Zjištěný protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 3 (Globulin-3A)

Identifikovaný protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1 a popsán jako protein 1.

protein 4 (Globulin-1 S allele)

Tentýž protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, kde byl popsán jako protein 4.

protein 5 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 6 (High-molecular-weight glutenin subunit Bx17)

Tento protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, popsán je zde jako protein 8.

protein 7 (Serpín-Z1A)

Totožný protein byl identifikován ve vzorku PEČIVO 1 (protein 10).

protein 8 (High-molecular-weight glutenin By8)

Identifikovaný protein má význam v uchovávání živin. [26] Více v kapitole 3.2.1.

protein 9 (Serpín-Z2B)

Bylo zjištěno, že tento protein hraje roli v odpovědi na stres způsobený suchem, exprese genu kódující tento protein je v případě sucha zvýšená. [69] Během různých vývojových stádií rostliny se početnost tohoto proteinu mění. [70] Více o serpínech v kapitole 3.2.1.

protein 10 (Major allergenic storage protein)

Tento protein má v semenech pohanky zásobní funkci [26], je však pro člověka silným alergenem. Alergická reakce se může projevovat různými způsoby, od podráždění trávicího traktu, přes kožní problémy, až k anafylaktickým stavům a smrti. U postižených jsou popsány vysoké hladiny odpovědných IgE imunoglobulinů, ale přesný mechanismus účinku na organismus a jeho imunitní odpovědi nejsou dosud známy. [71, 72]

INTERPRETACE

Stejně jako u předchozího výrobku, pšeničného pečiva, byly u tohoto výrobku nejčastěji nalezeny rostliny *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, *Triticum aestivum*. Vysvětlení původu proteinů z *T. urartu* a *A. tauschii* bylo nabídnuto v kapitole 3.1.3 V popsáných proteinech byla nalezena také výrobcem deklarovaná pohanka obecná *Fagopyrum esculentum*.

Celkem bylo nalezeno 47 proteinů, které splňovaly přítomnost při všech opakování analýzy a zároveň byly potvrzeny dvěma a více peptidy. Z celkového množství bylo určeno 26 proteinů náležících rodu *Triticum*, a 12 mnohoštětu *Aegilops*, tedy 38 z 47 proteinů je možno přisoudit pšenici (s ohledem na kapitolu 3.1.3). Kromě zmíněných rostlin z prvních deseti popsáných proteinů byly podobně jako v jiných obilných výrobcích určeny i další rostliny. Dva proteiny byly přisouzeny ječmeni *Hordeum vulgare*, po jednom proteinu pak rostlinám *Spartina alterniflora*, *Dasyphyrum villosum*, *Brachypodium distachyon*, *Thinopyrum ponticum*, *Setaria italica*, pšenice macha *Triticum macha*. Všechny tyto rostliny náleží do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), a i když je pekařská praxe různá, je pravděpodobné, že rostliny byly označeny spíše díky totožným úsekům genetické informace kódující stejné proteiny (kapitola 3.4.2 a dále 5.5). Kromě *Poaceae* byl nalezen jeden protein z rostliny *Solanum melongena* příslušející do čeledi lilkovité (*Solanaceae*), jehož přítomnost může být vysvětlena přidáváním bramborového škrobu do pečiva (r. *Solanum*) – stejně jako u vzorku PEČIVO 1 a PEČIVO 7 (viz kapitola 5.4.7 a dále kapitola 5.4.13). Výrobcem slíbená pohanka *Fagopyrum esculentum* byla zastoupena celkem dvěma proteiny.

Přítomnost většiny proteinů pocházejících z pšenice a výrazná podobnost se vzorkem MOUKA 1 a 4, indikuje stejně jako v případě vzorku PEČIVO 1, že tento výrobek skutečně pocházel z pšeničné mouky. Také tvrzení výrobce o přítomnosti pohanky bylo ověřeno. Označení „vícezrnné pečivo“ (kapitola 3.3) může naznačovat přítomnost nejen deklarované pohanky, ale i případné míchání dalších mouk – např. z nalezeného ječmene. Zda se jedná o limit metodiky nebo tento postup, není možné takto prokázat – ke splnění klasifikace vícezrnného pečiva mohla postačit právě pohanka. Zda její obsah přesáhl požadovaných 5 %, není možné touto metodou ověřit. Sója uvedená jako alergen nalezena nebyla, pravděpodobně se jednalo o preventivní varování, které výrobci uvádějí, pokud se v závodu pracuje se sójou.

5.4.9 PEČIVO 3

Ve vzorku PEČIVO 3 o složení uvedeném v tabulce 19 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 20). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 19. Složení výrobku PEČIVO 3.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Špaldové tyčinky se sezamem	Biolinie	špaldová mouka celozrnná (44 %), pšeničná mouka celozrnná, sezam (19 %) palmový tuk, droždí, jedlá sůl s jódem, může obsahovat stopy sóji	pšenice setá špalda, pšenice setá, sezam indický, sója luštinatá

Tabulka 20. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 3.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	15 (0)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
2	16 (0)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
3	16 (0)	gi 137582	Vicilin	<i>Pisum sativum</i>
4	16 (1)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
5	10 (0)	gi 482677643	Beta-amylase	<i>Brachypodium distachyon</i>
6	10 (0)	gi 94315069	1Dy high molecular weight glutenin subunit	<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>
7	14 (1)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
8	8 (0)	gi 22090	HMW glutenin subunit 1By9	<i>Triticum aestivum</i>
9	11 (1)	gi 474323981	Globulin-1 S allele	<i>Triticum urartu</i>
10	8 (0)	gi 126161	Legumin A2	<i>Pisum sativum</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 2 (Beta-amylase)

Totožný protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 3 (Vicilin)

Vicilin slouží jako zásobní protein hrachu, spolu s konvicilinem tvoří 7S globulinovou frakci. Je jedním z nejvýznamnějších alergenů u lidí alergických na hrách. [54, 55] Byla prokázána zkřížená reaktivita mezi hrachem a jinými bobovitými rostlinami (*Fabaceae*), způsobená reakcí na podobné proteiny globulinové frakce 11S a 7S. [73, 74] Tento protein se nalézá v aleuronové vrstvě. [26]

protein 4 (Globulin-3A)

Identifikovaný protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1, kde byl popsán jako protein 1.

protein 5 (Beta-amylase)

Nalezený enzym má stejnou charakteristiku jako ostatní β -amylasy (viz kapitola 3.2.1). [26]

protein 6 (1Dy high molecular weight glutenin subunit)

Tento protein byl identifikován jako součást velké podjednotky gluteninu (podrobněji kapitola 3.2.1), v rostlině se podílí na uchování živin. [26]

protein 7 (12S seed storage globulin 1)

Tentýž protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 4 (protein 10).

protein 8 (HMW glutenin subunit 1By9)

Nalezený protein slouží jako depot živin. [26] Podrobnosti o gluteninu v kapitole 3.2.1.

protein 9 (Globulin-1 S allele)

Tento protein se stejně jako předchozí uplatňuje v uskladňování živin. [26]

protein 10 (Legumin A2)

Stejně jako ostatní leguminy, i tento protein se v buňce vyskytuje v hexamerní struktuře, kde jsou jednotlivé řetězce spojeny disulfidickými můstky. Náleží do 11S globulární frakce a plní funkci zásobního proteinu. [26]

INTERPRETACE

Ve vzorku bylo očekáváno několik rostlin, výsledek analýzy byl však mnohem pestřejší. V popsáných 10 proteinech se objevily zejména rostlin z čeledi lipnicovitých (*Aegilops tauschii*, *Triticum aestivum*, *Thinopyrum ponticum*, *Triticum urartu*). Ve dvou z deseti popsáných proteinů se objevil hrách setý *Pisum sativum* z jiné čeledi (bobovité – *Fabaceae*).

Celkem bylo nalezeno 69 proteinů potvrzených při všech třech opakováních analýzy a zároveň specifikovaných dvěma a více peptidy. Mimo již zmíněné druhy byly nalezeny proteiny, u nichž byly určeny rostliny původu: obilniny - pšenice *Triticum dicoccoides* (3×), ječmen *Hordeum vulgare* (3×), jedním proteinem pak žito *Secale cereale*, *Secale strictum subsp. africanum*, další druhy pšenice *Triticum turgidum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta* a další lipnicovitá *Spartina alterniflora*. Celkem bylo rodu *Triticum* přiřazeno 42 proteinů, druhu *Aegilops tauschii* pak 12 proteinů – celkem 54 proteinům tedy lze přisoudit pšeničný původ (s ohledem na kapitolu 3.1.3). Z jiných čeledí než deklarované *Poaceae*, byl za bobovité (*Fabaceae*) nalezen již výše zmíněný hrách setý ještě 4x, a dále 1x bob obecný *Vicia faba*. Jeden protein byl určen jako pocházející z *Iberis amara* (brukvovitě, *Brassicaceae*).

Přítomnost četných různých *Poaceae* stejně jako v jiných obilných vzorcích by se dala vysvětlit vzájemnou záměnností vzhledem k podobnosti genetické informace a tudíž totožným proteinům (viz kapitola 3.4.2). U jiných čeledí, kde je záměnnost s deklarovanými lipnicovitými méně věrohodná, i když vůbec ne nemožná, se nabízí zejména vysvětlení kontaminací. Záměrné přidávání výrobek je nepravděpodobné vzhledem k tomu, že se jednalo o balený výrobek. Přítomnost hrachu a bobu by mohla také vysvětlit záměnnost v rámci čeledi se sójou luštinatou, která ovšem byla uvedena jako potenciální stopová složka (nejspíše jako preventivní informace o možném alergenu), sama však nalezena nebyla.

Pšenice setá špalda, která měla být ve výrobku obsažena ze 44 %, byla určena pouze jedním proteinem. Nicméně na příkladu tohoto vzorku i jiných v této práci je ukázáno, že minimálně taxon druhu nelze u lipnicovitých deklarovat, a často je sporné i určení rodu v rámci této čeledi – jako zde, kdy byly určeny všemožné rostliny původu a jejich přítomnost je značně nepravděpodobná. Vysvětlení je nabídnuto také v kapitole 5.5. Přítomnost totožných proteinů jako v případě vzorku MOUKA 1 a 4 potvrzuje, že pečivo je vyrobeno z pšeničné mouky. Zvláště působí několikerá přítomnost nepříbuzného hrachu (ev. bobu) – nelze ovšem prokázat, zda do výrobku byl nějak přidáván hrách, šlo o kontaminaci, nebo hrách jako dobře prozkoumaný organismus dokáže prostupovat i do interpretace výsledků jiných čeledí. Sezam indický byl nejspíše přítomen pouze na povrchu výrobku (makroskopicky patrné), ne v testované střídce.

5.4.10 PEČIVO 4

Ve vzorku PEČIVO 4 o složení uvedeném v tabulce 21 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 22). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 21. Složení výrobku PEČIVO 4.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
rajčatová bulka	Billa	žádné	pšenice setá, rajče

Tabulka 22. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 4.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	16 (3)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
2	19 (6)	gi 474393599	Sucrose synthase	<i>Triticum urartu</i>
3	14 (2)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
4	15 (3)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>
5	16 (2)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
6	11 (2)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
7	14 (3)	gi 474246751	S seed storage globulin 1	<i>Triticum urartu</i>
8	11 (1)	gi 4588609	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	<i>Triticum aestivum</i>
9	12 (3)	gi 224589270	Serpin 3	<i>Triticum aestivum</i>
10	9 (0)	gi 94315069	1Dy high molecular weight glutenin subunit	<i>Thinopyrum ponticum x Triticum aestivum</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 2 (Sucrose synthase)

Nalezený enzym má úlohu v metabolismu sacharosy. Katalyzovaný děj lze vyjádřit: NDP-glukosa + D-fruktosa = NDP + sacharosa, kde N vyjadřuje dusíkatou bázi. [26]

protein 3 (Beta-amylase)

Tento protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 4 (12S seed storage globulin 1)

Identifikovaný protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 4, jako protein 10.

protein 5 (Globulin-3A)

Protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1, a popsán zde jako protein 1.

protein 6 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Tento protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 7 (S seed storage globulin 1)

Zjištěný protein plní funkci rezervoáru živin. [26]

protein 8 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic)

Tato transferasa sehrává úlohu v metabolismu škrobu. V buňce je lokalizována v chloroplastech, amyloplastech. [26] Více o tomto typu enzymu v kapitole 3.2.1.

protein 9 (Serpín 3)

Totožný protein byl popsán také u vzorku PEČIVO 1 jako protein 5.

protein 10 (1Dy high molecular weight glutenin subunit)

Nalezený protein byl identifikován také u vzorku PEČIVO 3 (protein 8).

INTERPRETACE

Mezi 10 popsanými proteiny byly ve vzorku PEČIVO 3 přítomny pouze lipnicovité (*Poaceae*), převážně pšenice setá *Triticum aestivum* (5×), dále pšenice *Triticum urartu* (3×) a mnohoštět Tauschův *Aegilops tauschii* (2×), a zmíněn je i pýrovník *Thinopyrum ponticum*.

Celkem bylo identifikováno 55 proteinů vyhovující podmínce nálezu ve všech 3 opakováních analýzy a zároveň se 2 a více potvrzenými peptidy. I v dalších proteinech jasně dominovala přítomnost proteinů ze zmíněných pšenic a mnohoštětu, přičemž *T. urartu* a *A. tauschii* lze považovat za důkaz pšenice seté díky společnému genomu (vysvětlení v kapitole 3.1.3). Celkově bylo rodu *Triticum* přiřazeno 36 proteinů a 15 pak *Aegilops tauschii* – dnešní pšenici seté tedy lze přiřknout 51 proteinů. Z dalších nalezených rostlin původu lze zmínit vždy jeden nalezený protein rostlin: *Zea mays*, *Hordeum vulgare*,

Dasyphyrum villosum, *Triticum durum* – všechny náleží do *Poaceae* a jejich nález lze přičíst podobné genetické, a tedy i proteinové, výbavě deklarovaných a těchto určených rostlin (komentář dále v kapitole 5.5). Jeden protein byl přiřazen slibovanému rajčeti *Solanum lycopersicum* (*Solanaceae*).

U tohoto výrobku byly nalezeny popsané proteiny shodné s proteiny vzorků MOUKA 1 a 4 (pšeničné mouky) a PEČIVO 1 a 3 (pšeničná pečiva), jasně lze tedy i na základě tohoto faktu poukázat na přítomnost pšenice. Výrobce zmíněné rajče bylo identifikováno pouze jedním proteinem. Příčinu lze hledat v přítomnosti rajčete zejména na povrchu výrobku a méně ve střídce, odkud byl brán vzorek k analýze; k určení podílu jednotlivých surovin však nelze tuto metodu jednoduše použít.

5.4.11 PEČIVO 5

Ve vzorku PEČIVO 5 o složení uvedeném v tabulce 23 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 24). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 23. Složení výrobku PEČIVO 5.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Knäckebröt Roggen Vollkorn	Edeka	55 % celozrnná žitná mouka, 35 % žitná mouka, droždí, 4 % žitné otruby, žitný kvásek, sůl, kyselina mléčná, strouhanka (pšeničná mouka, cukr, rostlinný olej, droždí, sůl), sezamová semínka	žito seté, pšenice setá, sezam indický

Tabulka 24. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 5.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	8 (2)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
2	8 (2)	gi 167004	Embryo globulin	<i>Hordeum vulgare</i>
3	7 (0)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
4	6 (3)	gi 334086816	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	<i>Triticum spelta</i>
5	6 (1)	gi 75279910	Serpin-Z1B	<i>Triticum aestivum</i>
6	5 (1)	gi 7594647	Early-methionine-labelled polypeptide	<i>Secale cereale</i>
7	5 (1)	gi 14329739	High molecular weight glutenin subunit x	<i>Secale cereale</i>
8	6 (1)	gi 474323981	Globulin-1 S allele	<i>Triticum urartu</i>
9	5 (1)	gi 231540	Beta-amylase	<i>Secale cereale</i>
10	5 (0)	gi 62548385	HMW glutenin subunit	<i>Triticum aestivum</i>

protein 1 (Globulin-3A)

Tento protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1 a popsán jako protein 1.

protein 2 (Embryo globulin)

Tato globulární bílkovina se účastní skladování živin. [26]

protein 3 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin [49])

Tento protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 4 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic)

Tento enzym se účastní metabolismu škrobu (kapitola 3.2.1). V buňce se nachází v organelách amyloplastech. [26]

protein 5 (Serpine-Z1B)

V organismu se nachází v mezibuněčném prostoru. [26] Bylo zjištěno, že tento serpin působí jako substrátový inhibitor chymotrypsinu (serinová proteasa) a katepsinu G (cysteinová proteasa). Neinhibuje však proteasu subtilisin rodu bakterií *Bacillus*, serinovou proteasu trypsin vřeckovýtrusé houby *Fusarium*, ani hordolisin, serinovou proteasu z ječmene (lat. *Hordeum*). [68]

protein 6 (Early-methionine-labelled polypeptide)

Tento polypeptid je jeden z nejčtenějších polypeptidů nacházející se v cytosolu zralých buněk zárodku. [26]

protein 7 (High molecular weight glutenin subunit x)

Tento protein je součástí větší podjednotky molekuly gluteninu (více v kapitole 3.2.1). GLU-R1 gen, kódující tento protein, a jeho alely jsou podrobně zkoumány, protože je možné je využít ve šlechtění ekonomicky výhodnějších variant rostlin. [75]

protein 8 (Globulin-1 S allele)

Tento protein byl popsán již u vzorku PEČIVO 3 jako protein 9.

protein 9 (Beta-amylase)

Identifikovaný protein má stejnou charakteristiku jako ostatní β -amylasy (viz kapitola 3.2.1). [26]

protein 10 (HMW glutenin subunit)

Protein je součástí velké podjednotky gluteninu (podrobněji kapitola 3.2.1), stejně jako protein 7. V buňce slouží k uskladnění živin. [26]

INTERPRETACE

Z 10 popsaných proteinů s nejvyšším ukazatelem „scores“ bylo v tomto výrobku deklarované žito seté *Secale cereale* přítomno 3×. Šest proteinů bylo přiřazeno taktéž deklarované pšenici seté *Triticum aestivum* a jeden ječmeni *Hordeum vulgare*.

Ve vzorku bylo identifikováno celkem 19 proteinů vyhovující podmínkám přítomnosti při všech opakovaných analýzy a zároveň s minimálně dvěma nalezenými peptidy. V dalších podrobněji nepopsaných proteinech byly přítomny již zmíněné rostliny, navíc také mnohoštět *Aegilops tauschii*, jeden protein byl přiřazen pšenici *Triticum urartu* (*Poaceae*) a cizrně *Cicer arietinum* (*Fabaceae*). Deklarované žito se objevilo ještě 2× (dohromady tedy v pěti případech), ječmen byl nalezen celkem 2×.

Mnohoštět *Aegilops* a *Triticum urartu* provází většinu pšeničných vzorků, protože jejich geny (a tedy i proteiny) jsou obsaženy i v dnešních pšenicích (kapitola 3.1.3). Celkem bylo z pšenice *Triticum* nalezeno 7 proteinů a z mnohoštětu 4 proteiny (za pšeničné tedy lze považovat 11 proteinů). Výskyt cizrny lze záměnností kvůli příbuznosti vysvětlit hůře, nicméně jedná se o jediný protein, který ve všech 3 analýzách vykázal 2 společné peptidy, tedy na hranici spolehlivosti. Není možné vyloučit ani přidávání jiné suroviny do výrobku (ačkoli to u baleného výrobku, navíc původem z Německa, není příliš pravděpodobné), nebo pozdější kontaminaci.

Výrobce deklaruje minimálně 94% podíl žita setého a do 6 % pšenice seté (ostatní ingredience nemají uveden procentuální obsah), obě tyto plodiny byly dle výsledku analýzy ve výrobku zastoupeny. Četnost výskytu proteinů z žita (5) a pšenice (11) neodpovídá procentuálnímu zastoupení deklarovaných plodin, ovšem touto metodou není možné určovat podíl obsahu jednotlivých složek. Sensoricky výrobek (chuťově i vůní) odpovídal skutečně žitu. Sezam indický nalezen nebyl, ačkoli výrobek nebyl sezamem sypaný – jeho povrch a střídka byly homogenní. Sensoricky výrobek odpovídal také legislativně definovanému označení „knäckebröt“ (viz kapitola 3.3.7).

5.4.12 PEČIVO 6

Ve vzorku PEČIVO 6 o složení uvedeném v tabulce 25 byly podrobněji popsány tři nejlépe identifikované proteiny (tabulka 26). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 25. Složení výrobku PEČIVO 6.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
žitná placka	Albert	běžné pečivo žitné	pšenice setá, žito seté

Tabulka 26. První 3 nejrelevantnější proteiny nalezené ve vzorku PEČIVO 6.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	4 (1)	gi 7594647	Early-methionine-labelled polypeptide	<i>Secale cereale</i>
2	3 (0)	gi 475542024	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
3	2 (0)	gi 12247762	1-Cys peroxiredoxin	<i>Triticum turgidum subsp. durum</i>

protein 1 (Early-methionine-labelled polypeptide)

Tentýž protein byl popsán již jako protein 6 u vzorku PEČIVO 5.

protein 2 (Globulin-1 S allele)

Nalezený protein slouží v rostlině jako depot živin. [26]

protein 3 (1-Cys peroxiredoxin)

Tento protein jakožto peroxiredoxin katalyzuje reakci, kterou lze postihnout schématem: $2 R'-SH + ROOH = R'-S-S-R' + H_2O + ROH$. [76]

INTERPRETACE

V tomto vzorku se podařilo identifikovat pouze 3 proteiny při všech opakováních analýzy, ve kterých byly nalezeny alespoň 2 potvrzující peptidy. Bylo nalezeno deklarované žito *Secale cereale*. Jeden protein byl přiřazen mnohoštetu *Aegilops tauschii*, přítomném ve všech našich výsledcích obilných pečiv (pravděpodobně jako součást genomu pšenice); jeden pšenici naduřelé pravé *Triticum turgidum subsp. durum* (poddruh je otázka spekulací) – obě stejně jako žito *Poaceae*.

O tomto výrobku je i vzhledem k nízkému množství získaných proteinů možné říci, že pochází z obilných surovin. Formulace „běžné pečivo žitné“ znamená alespoň 90 % podíl žita ve výrobku, ale neomezuje výrobce striktně na použití pouze žita. Výsledky naznačují, že by do pečiva mohla být přidána i pšenice (čistě žitné pečivo se vyrábí málokdy), nicméně přesnější specifikace už narazí na limity metody. Přílišná příbuznost lipnicovitých rostlin pravděpodobně zatím neumožňuje rozlišit úplně spolehlivě ani rody v rámci *Poaceae* (viz diskuze v kapitole 5.5).

5.4.13 PEČIVO 7

Ve vzorku PEČIVO 7 o složení uvedeném v tabulce 27 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 28). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 27. Složení výrobku PEČIVO 7.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Rustikální bageta z pohanky	Tesco	žádné	pšenice setá, pohanka obecná

Tabulka 28. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 7.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	13 (2)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>
2	13 (2)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
3	16 (3)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>
4	16 (2)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
5	14 (2)	gi 474246751	S seed storage globulin 1	<i>Triticum urartu</i>
6	14 (2)	gi 475588764	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
7	11 (2)	gi 75282265	Serpin-Z1A	<i>Triticum aestivum</i>
8	11 (0)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
9	11 (2)	gi 310619512	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	<i>Triticum spelta</i>
10	11 (4)	gi 475612819	Protein disulfide- isomerase	<i>Aegilops tauschii</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 2 (Beta-amylase)

Nalezený protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 jako protein 5.

protein 3 (12S seed storage globulin 1)

Zjištěný protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 4, jako protein 10.

protein 4 (Globulin-3A)

Tento protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1 a popsán jako protein 1.

protein 5 (S seed storage globulin 1)

Zmíněný protein byl identifikován také u vzorku PEČIVO 4 jako protein 7.

protein 6 (Globulin-1 S allele)

Tentýž protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, kde byl popsán jako protein 4.

protein 7 (Serpín-Z1A)

Protein byl již identifikován ve vzorku PEČIVO 1 (protein 10).

protein 8 (rRNA N-glycosidase [26], Tritin[49])

Tento protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 9 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic)

Identifikovaný protein úlohu v metabolismu škrobu (kapitola 3.2.1). V buňce se nalézá v chloroplastech a amyloplastech. [26]

protein 10 (Protein disulfide-isomerase)

Totožný protein byl popsán u vzorku MOUKA 1 jako protein 3.

INTERPRETACE

V prvních 10 popsaných proteinech byly ve vzorku PEČIVO 7 nalezeny tři druhy pšenice - *Triticum urartu*, *aestivum* a *spelta*, a mnohoštet Tauschův *Aegilops tauschii*. Výskyt mnohoštetu a *T. urartu* je stejně jako v ostatních výrobcích nejspíš způsobený historickým vývojem dnešní pšenice (viz kapitola 3.1.3).

Celkem bylo při všech opakováních analýzy nalezeno 54 proteinů potvrzených alespoň 2 peptidy. Kromě již zmíněných rostlin byla nalezena dvakrát pohanka *Fagopyrum esculentum* s průměrným počtem shodných peptidů 9 a 5. Dále byly nalezeny lipnicovité rostliny ječmen *Hordeum vulgare subsp. vulgare*, další dva druhy pšenice (*Triticum dicoccoides* a *durum*), *Spartina alterniflora*, *Lophopyrum elongatum*, *Brachypodium distachyon*, *Dasypyrum villosum*. Rod pšenice *Triticum* byl celkově nalezen 30×, *Aegilops tauschii* pak 16× – pšenici je tak možno považovat za potvrzenou v 46 proteinech (vysvětlení v kapitole 3.1.3). Skutečná přítomnost ječmene a jiných druhů pšenice v pečivu je možná, i když vzhledem k nákladům méně pravděpodobná, stejně jako u ostatních zmíněných identifikovaných druhů předpokládáme spíše záměnnost způsobenou již

diskutovanou příbuzností lipnicovitých rostlin a nerovnoměrnou měrou výzkumu některých organismů (viz kapitola 3.4.2). Nález jednoho proteinu ze *Solanum melongena* může být způsoben přidáváním bramborového škrobu (*Solanum tuberosum*) do výrobku.

Název výrobce „rustikální bageta“ neříká o složení vůbec nic, podrobnější informace dostupné nebyly (předpoklad je tedy běžné levné pšeničné pečivo, to odpovídá i sensorickým vlastnostem výrobku), jediným vodítkem složení je v názvu zmíněná pohanka. Pohanka se určitě vyskytovala na povrchu výrobku, kde se nacházely křupavé krupičky (nejspíše pocházející z drcené pohanky) a její přítomnost byla potvrzena i ve střídce. O tomto výrobku je možné s jistotou říci, že obsahoval pšenici. Toto tvrzení ještě podporuje skutečnost, že 9 z 10 prvních popsaných proteinů bylo nalezeno také v předchozích vzorcích pšeničných mouk a pečiv.

5.4.14 PEČIVO 8

Ve vzorku PEČIVO 8 o složení uvedeném v tabulce 29 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 30). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 29. Složení výrobku PEČIVO 8.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Rhombing bageta světlá	Albert	běžné pečivo vícezrné	pšenice setá

Tabulka 30. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 8.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	12 (2)	gi 475523854	Beta-amylase	<i>Aegilops tauschii</i>
2	12 (2)	gi 474451266	Beta-amylase	<i>Triticum urartu</i>

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
3	18 (2)	gi 390979705	Globulin-3A	<i>Triticum aestivum</i>
4	14 (2)	gi 475608251	12S seed storage globulin 1	<i>Aegilops tauschii</i>
5	10 (1)	gi 121449	Glutenin, high molecular weight subunit DY10	<i>Triticum aestivum</i>
6	10 (2)	gi 391929	rRNA N-glycosidase, Tritin	<i>Triticum aestivum</i>
7	12 (3)	gi 474246751	S seed storage globulin 1	<i>Triticum urartu</i>
8	14 (3)	gi 475588764	Globulin-1 S allele	<i>Aegilops tauschii</i>
9	11 (2)	gi 310619512	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	<i>Triticum spelta</i>
10	8 (1)	gi 109452233	High-molecular-weight glutenin subunit Bx17	<i>Triticum aestivum</i>

protein 1 (Beta-amylase)

Tentýž protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 5).

protein 2 (Beta-amylase)

Nalezený protein byl popsán také u vzorku MOUKA 1 (protein 2).

protein 3 (Globulin-3A)

Protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 1, a popsán jako protein 1.

protein 4 (12S seed storage globulin 1)

Identický protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 4, jako protein 10.

protein 5 (Glutenin, high molecular weight subunit DY10)

Týž protein byl nalezen také ve vzorku PEČIVO 1 a popsán jako protein 8.

protein 6 (rRNA N-glycosidase[26], Tritin [49])

Tento protein je totožný s identifikovaným proteinem 9 u vzorku MOUKA 1.

protein 7 (S seed storage globulin 1)

Zjištěný protein byl identifikován také u vzorku PEČIVO 4 jako protein 7.

protein 8 (Globulin-1 S allele)

Tentýž protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, kde byl popsán jako protein 4.

protein 9 (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic)

Nalezený protein byl identifikován také u vzorku PEČIVO 7 (protein 9).

protein 10 (High-molecular-weight glutenin subunit Bx17)

Protein byl nalezen také u vzorku MOUKA 1, popsán je jako protein 8.

INTERPRETACE

Mezi 10 popsanými proteiny byly v tomto vzorku nejčastěji za rostlinu původu označeny pšenice druhů *Triticum aestivum*, *urartu* a *spelta* a dále mnohoštet *Aegilops tauschii*. Celkem bylo identifikováno všemi opakováními a minimálně dvěma shodnými peptidy 44 proteinů, převažovaly již zmíněné druhy. Následující rostliny byly určeny jako původci vždy jednoho proteinu: lipnicovité – žito *Secale cereale*, oves *Avena sativa*, pšenice druhů *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*, *turgidum* a *durum*, dále a *Spartina alterniflora*. Ve vzorku byla označena jako přítomná také brukvovitá rostlina iberka hořká (*Iberis amara*). Jeden protein označil přítomnost slunečnice roční *Helianthus annuus*. Souhrnně byl nalezen rod *Triticum* 26×, *Aegilops tauschii* pak 12 – v rámci vysvětlení z kapitoly 3.1.3 lze tedy pšenici považovat za potvrzenou 38 proteiny.

Pečivo bylo výrobcem klasifikováno jako pšeničné vícezrné, mělo by tedy obsahovat více jak 5 % jiné suroviny než pšenice. Ve výrobku byla patrná semínka, nejspíše slunečnicová, vícezrnnost tedy patrně zajišťovala právě ona, střídka se jeví jako jednodruhová pšeničná (i s ohledem na ostatní výsledky – diskuze v kapitole 5.5). Ačkoli byla testována pouze střídka, pravděpodobně se do testovaného zlomku střídky dostal protein ze slunečnicového semínka.

Přítomnost celkem 6 druhů pšenice nelze u běžného pečiva považovat za pravděpodobnou. Stejně tak přítomnost dalších lipnicovitých rostlin se zdá být spíše výsledkem nerozlišitelnosti příliš příbuzných druhů touto metodou. Brukvovitá rostlina iberka byla nalezena také u vzorku PEČIVO 3 a uspokojivé vysvětlení kromě kontaminace nabízí pouze limitní možnost metody rozlišit totožné sekvence v proteinech některých rostlin, byť méně příbuzných. Je možná také kontaminace nějakou brukvovitou rostlinou příbuznou iberce.

U tohoto výrobku je možné potvrdit, že v něm byla obsažena pšenice – i vzhledem ke shodě popsaných proteinů s předchozími popsanými pšeničnými výrobky. Nelze potvrdit, zda výrobek dostal tvrzení o vícezrnnosti – nelze kvantitativně určit, zda byl podíl jiného zrna požadovaných 5 %, pro vícezrnnost však hovoří makroskopická přítomnost semínek a nalezení slunečnicového proteinu.

5.4.15 PEČIVO 9

Ve vzorku PEČIVO 9 o složení uvedeném v tabulce 31 bylo podrobněji popsáno deset nejlépe identifikovaných proteinů (tabulka 32). Diskuze o jejich původu je provedena níže.

Tabulka 31. Složení výrobku PEČIVO 9.

Název výrobku	Výrobce (příp. distribuce)	Dostupné informace o složení	Očekávané druhy rostlin
Chlebíčky rýžové s amarantem	Racio	rýže 95,25 %, amarant 4 %, mořská sůl 0,75 %	rýže setá, laskavec

Tabulka 32. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 9.

Pořadí nalezeného proteinu	Počet shodných peptidů	Označení	Název proteinu	Identifikovaná rostlina
1	22 (2)	gi 115445465 *	Glutelin type-B 5	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>
2	23 (2)	gi 119394866	Glutelin	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>
3	22 (1)	gi 222622530	Uncharacterized protein	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>
4	23 (2)	gi 531874316	Glutelin	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>indica</i>
5	20 (0)	gi 115453625 *	Glutelin type-A 3	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>
6	20 (0)	gi 222622792	Uncharacterized protein	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>
7	22 (1)	gi 222622532	Uncharacterized protein	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>
8	19 (1)	gi 403071895	Chain A, Crystal Structure Of Rice Granule Bound Starch Synthase I Catalytic Domain	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>
9	14 (2)	gi 218196777	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>indica</i>
10	16 (2)	gi 428674406	Glutelin	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>

* u těchto proteinů nebylo možné nalézt je pod původním kódem z důvodu zastaralosti záznamu (který může znamenat pouze restrukturalizaci databáze v rámci inovace, čtení genomu), po přesměrování na novější záznamy byl vybrán protein s nejlepší shodou aminokyselin (rostlina, tedy rýže, se vždy shodovala v původním i náhradním záznamu).

protein 1 (Glutelin type-B 5)

U náhradního záznamu byla shoda s původním záznamem 500 aminokyselin. [49] Tento protein hraje roli v uchování živin v semeni a v obranné reakci buňky. Lokalizován je na vnější membráně buňky. [26] Více v kapitole 3.2.1.

protein 2 (Glutelin)

Tento zásobní protein náleží k 11S globulinové frakci a tvoří hexamerní strukturu stabilizovanou disulfidickými můstky. [26] Zařazení glutelinů viz kapitola 3.2.1.

protein 3 (Uncharacterized protein)

Identifikovaný protein hraje roli v uchování živin. Tvoří hexamer, v němž jsou jednotlivé podjednotky spojeny disulfidickými můstky. [26]

protein 4 (Glutelin)

Nalezený protein byl nalezen také ve vzorku MOUKA 6 jako protein 3.

protein 5 (Glutelin type-A 3)

Popisovaný protein s proteinem pod původním kódem vykazuje shodu v 496 aminokyselinách. [49] V buňce funguje jako zásobní protein. [26] Více v kapitole 3.2.1.

protein 6 (Uncharacterized protein)

Ačkoli je tento protein plně osekvenován, o jeho funkci je známo pouze, že slouží jako depot živin. [26]

protein 7 (Uncharacterized protein)

Tento protein se uplatňuje jako rezervoár živin. Je řazen do 11S globulární frakce a ve své hexamerní struktuře obsahuje disulfidické můstky. [26]

protein 8 (Chain A, Crystal Structure Of Rice Granule Bound Starch Synthase I Catalytic Domain [49])

Tento protein se účastní syntézy škrobu. [26] Struktura útvaru byla zkoumána v roce 2012 a byla objasněna přítomnost disulfidických můstků spojující jednotlivé domény. [77]

protein 9 (Putative uncharacterized protein)

Jako kofaktor tohoto proteinu se uplatňují hořčičnaté ionty Mg^{2+} . Protein se účastní metabolismu pyruvátu a katalyzuje transfer fosfátové skupiny z ATP na donor. [26]

protein 10 (Glutelin)

Protein náleží do 11S globulární frakce, uplatňuje se jako rezervoár živin. V hexamerní struktuře hrají roli disulfidické můstky. [26] Zařazení glutelinu v kapitole 3.2.1.

INTERPRETACE

Všech 10 popsanych proteinů tohoto vzorku pochází z rýže seté (*Oryza sativa*). Určení poddruhu *indica* nebo *japonica* je pravděpodobně pod rozlišovací schopnosti použité metody vzhledem ke značné příbuznosti rostlin. Při všech opakováních analýzy a minimálně se 2 shodnými peptidy bylo nalezeno celkem 33 proteinů, z nichž 32 bylo přisouzeno rýži *Oryza sativa*. V jednom případě byl nalezen *Citrus sinensis* – vysvětlení by mohla poskytnout přítomnost citrónu (*Citrus limon*) jako konzervačního prostředku. Výrobce jej ale ve složení neuvádí, výrobek sensoricky kyselý nebyl, vzhledem k ceně se dnes používá spíše kyselina citrónová a výrobek je konzervován vysušením potraviny, proto toto vysvětlení nelze považovat za důvěryhodné. Pro přítomnost této rostliny (byť reprezentované jediným proteinem), ve vzorku nebylo nalezeno jiné vysvětlení než kontaminace nebo totožná sekvence úseku daného proteinu a proteinu jiné méně příbuzné rostliny.

S určitostí je možné potvrdit skutečnou přítomnost rýže ve vzorku. Z deklarovaného laskavce nebyl nalezen žádný protein. Tato metodika byla vyhodnocena jako vhodná pro rýžové vzorky.

5.5 SOUHRNNÁ DISKUZE

TYPY PROTEINŮ

Byly očekávány především zásobní proteiny z endospermu semen a enzymy z aleuronové vrstvy. Tyto dvě skupiny byly skutečně ve výsledcích dominantní. Z výsledků vyplývá překvapivě častá přítomnost β -amylas ve vzorcích. V semenech by se měly vyskytovat v aleuronové vrstvě, tedy zaujímat menší podíl než zásobní proteiny, a navíc vzorky byly převážně z bílých mouk, do kterých se aleuronová vrstva nesmýlá. Může se jednat o nedokonalé odstranění aleuronové vrstvy při mletí mouky, obsah β -amylas v endospermu,

a je možné, že tyto enzymy lépe reagují na zvolenou metodiku. Je třeba vzít také v potaz, že ke zjišťování koncentrace se tato metoda nedá použít.

ROSTLINY PŮVODU A POUŽITÁ METODIKA

Vzorek z kukuřice (MOUKA 2) byl vyhodnocen jako zcela homogenní, rýžové vzorky (MOUKA 6, PEČIVO 9) jako téměř homogenní, stejně jako hrách (MOUKA 2). Ve všech obilných vzorcích bylo nalezeno několik rostlin (v ostatních plodinách méně), které by podle dostupného složení přítomny být neměly. Vysvětlení se nabízí dvojí: a) tyto rostliny ve vzorku přítomny nebyly a právě zde se ukazuje limit použité metodiky, b) rostliny přítomny byly jako záměrný přídavek nebo jako kontaminace.

Ad a)

Na velice složité a dosud nejspíš ne s konečnou platností taxonomické uspořádání uvnitř *Poaceae* bylo upozorněno již v kapitole 5.3.1. Interpretaci ztěžuje také nepříbuzné křížení druhů a vznik polyploidních rostlin (vysvětlení v kapitole 3.1.3). Přítomnost proteinů z mnohoštetu Tauschova *Aegilops tauschii* (v každém z obilných vzorků) a *Triticum urartu* (v každém obilném vzorku kromě PEČIVA 6) je s největší pravděpodobností způsobena přítomností genomu těchto rostlin v dnešní hexaploidní pšenici. [15]

Už jen fakt, že bylo jako rostlin původu určeno celkem 8 druhů rodu pšenice (*Triticum*), z čehož dokonce 6 najednou se objevilo ve vzorku PEČIVO 3 a PEČIVO 6, dává tušit, že analýza v rámci obilnin na úrovni poddruhů a druhů nejspíše selhává. Nejistou se zdá být i spolehlivost v rámci rodů. Přestože většina výrobků (až na dva vícezrnné) byla deklarovaná jako běžné jednodruhové pečivo, v žádném z obilných vzorků se nepodařilo nalézt pouze jeden rod rostlin. Ve dvou vzorcích (MOUKA 5, PEČIVO 2) bylo nalezeno 10 latinských rodů rostlin, ve dvou vzorcích (PEČIVO 3 a PEČIVO 7) 9 rodů, v ostatních vzorcích méně.

Domněnku o limitu metody navíc podporuje i mnohonásobný výskyt druhů (byť potvrzených jen minimálním počtem proteinů), jejichž skutečná přítomnost je krajně nepravděpodobná (př. *Dasypyrum villosum*, *Brachypodium distachon*, *Thinopyrum ponticum* = *Lophophyrum elongatum*, *Spartina alterniflora*). Lze předpokládat, že hlavní orientace výrobce směřuje na výtěžek, tedy i na náklady spojené se surovinami a jednoduchostí výrobního procesu. Nelze očekávat, že by výrobce do výrobku přidával

dražší suroviny, aniž by na to alespoň v názvu nebo složení upozornil. Příklad rostlin, které se u nás nevyskytují a nezpracovávají, potažmo ani nemají české jméno, tedy považujeme za značně nepravděpodobný, i kdyby měl být způsobený jen kontaminací. Za mnohem pravděpodobnější považujeme, že tyto rostliny byly vybrány k podrobnému výzkumu, ke čtení genomu, jsou dobře prostudované, dané geny a proteiny u nich byly popsány jako u prvních a při vyhledávání v databázi se výsledek shodného proteinu k nim přiřadí, aniž by protein skutečně musel pocházet z této rostliny. Limity metody v této oblasti (určení části společného genomu více rostlin) byly zmíněny v kapitole 3.4.2.

Pro tuto variantu hovoří i fakt, že i ve vzorcích baleného pečiva (z obilnin pocházejících vzorků PEČIVO 3 a 5), které by měly mít označené všechny přísady, i ve vzorcích mouk, které měly být jednodruhové, byly nalezeny také jiné než deklarované rostliny.

Ad 2)

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.3, jednodruhové pečivo (žitné, pšeničné) má spodní limit obsahu mlýnského výrobku 90 %. Čím je u nebaleného běžného pečiva výrobce doplní do 100 %, pokud se nejedná o alergeny a nepřesáhne hranici 5 % (již kategorie vícezrnné pečivo), uvádět nikde nemusí. Byl proto předpoklad, že se v nebaleném pečivu objeví i jiné než deklarované plodiny.

Není možné vyloučit ani kontaminace proteiny zpracovávanými v daném závodě výrobce, aniž by byly přidávány do pečiva záměrně. Koncentrace poměrů složek ve vzorku touto metodou určovat nelze.

V několika případech byly jako rostliny původu označeny rostliny jiné čeledi, než deklarované plodiny (nejčastěji *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Amaranthaceae*). V těchto případech je kostrbatější vysvětlení 1) a je nutné uvažovat, že by se ve vzorku skutečně objevit mohly. V případě r. *Solanum* ve třech vzorcích pečiva (PEČIVO 1, 2 a 7) se nabízí vysvětlení přidáním bramborového škrobu.

U jiných než deklarovaných výrobků nebyla objevena sója, u které jako u zlepšujícího přípravku byl předpoklad, že bude přítomna i v ostatních výrobcích. Také pohanka byla nalezena pouze v deklarovaných výrobcích.

Ve vzorcích nebyl nalezen shodný počet proteinů, lze předpokládat, že při vyšším počtu proteinů by se rozšiřoval také počet nalezených rostlin.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem, posoudit poctivost výrobce touto metodou není příliš spolehlivé. Pro jisté konstatování, zda v některých případech se jedná o šizení nebo o neupřímnost v uváděném složení nebalených výrobků, by bylo třeba vzorky otestovat ještě jinou, pro daný účel standardizovanou metodou – např. imunochemickou metodou.

6. ZÁVĚR

Na základě provedené analýzy je možné konstatovat, že nepříbuzné taxony (na úrovni čeledí) je možné touto metodou relativně spolehlivě odlišit. S nižšími taxony se spolehlivost určení konkrétního druhu snižuje, na úrovni druhů je již diskutabilní a v rámci rozlišení nižších taxonů než druhu (poddruhů, variet apod.) již nelze tuto metodu považovat za spolehlivou.

U obilnin (čeleď lipnicovité, *Poaceae*), ve vzorcích nejčastěji zastoupených, jsou pravděpodobně příliš úzké a spletené příbuzenské vztahy, posílené zpětným nakřížováním a polyploidizací genetické informace, spolehlivost tedy není zaručena již na úrovni druhu. Podobně výsledky vzorku prosa (*Poaceae*) byly roztrženy mezi více rostlin. Přítomnost mnohoštětu Tauschova (*Aegilops tauschii*) ve všech a *Triticum urartu* ve většině vzorků z pšenice byla vysvětlena v kapitole 3.1.3 – tyto rostliny se historicky staly součástí genomu dnešní pšenice. Několikrát byly nalezeny lipnicovité rostliny *Spartina alterniflora*, *Dasyphyrum villosum*, *Brachypodium distachyon*, *Lophopyrum elongatum* = *Thinopyrum ponticum*, jejichž výskyt je v našich podmínkách nepravděpodobný. Nejspíše zde zvolenou metodiku limitují její možnosti, pravděpodobně jsou tyto druhy natolik příbuzné jiným lipnicovitým rostlinám, že mají mnohé proteiny nejen homologní, ale zcela totožné aminokyselinové sekvence v nalezených štěpech. Program připisuje nález proteinu rostlině, u které byl popsán jako první, ačkoli by bylo možné jej nalézt i u jiných rostlin. Roli hraje i fakt, že některé organismy jsou zmapovány mnohem lépe.

Vzhledem k těmto výsledkům není možné s jistotou konstatovat, zda např. pečivářský výrobek deklarovanou pšenicí setou špaldu obsahoval či nikoli – není možné odlišit, zda výrobce šetřil na surovině a nahradil špaldu levnější pšenicí setou, nebo tato metoda naráží právě zde na svůj limit a databáze přiřazují protein jinému druhu. Z hlediska determinace přítomnosti jednotlivých obilnin tedy byla tato metoda vyhodnocena jako méně vhodná. Pro ověření či vyvrácení přítomnosti různých druhů a poddruhů rostlin by bylo nutné použít ještě jiné analytické postupy.

Velmi dobré výsledky byly naopak získány ve vzorcích z kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*). V případě kukuřice vzorek obsahoval pouze kukuřičné proteiny, u rýže byl ve dvou vzorcích nalezen pouze 1 protein z jiné rostliny. U mouky z hrachu (*Pisum sativum*) náležely pouze 2 proteiny jiným, a to velmi příbuzným rostlinám (v rámci

Fabaceae). V případech výrobků z těchto rostlin se ukázala použitá metodika jako vhodná a spolehlivá.

Nejčastěji byly identifikovány skupiny proteinů: enzymy (různých tříd a funkcí, např. β -amylasy, rRNA N-glykosidasy, syntasy škrobu a sacharosy), zásobní proteiny (globuliny, gluteniny, gliadiny), serpiny a další. Zásobní proteiny by měly dle skladby semen pocházet z endospermu semen, enzymy především z aleuronové vrstvy. Částečným překvapením bylo časté zjištění přítomnosti β -amylas, které byly očekávány v menším množství – je však třeba vzít v potaz, že tyto enzymy mohou lépe reagovat na zvolenou metodiku a tato metoda se nedá jednoduše použít pro zjišťování koncentrací složek.

Nebyl zjištěn podstatný rozdíl v kvalitě získaných dat mezi moukami z dané suroviny a pekárenských výrobků, u obou typů je analýza stejně dobře možná. U vzorků ze shodné suroviny bylo možné porovnat přítomnost proteinů v obou typech výrobků. V četných případech byly nalezeny totožné proteiny v několika vzorcích mouk i pečiv najednou.

Pro ověření složení výrobků z kukuřice, rýže a hrachu se tato metoda dá označit za vhodnou, pro obilniny však nelze zcela doporučit pro nespolehlivé rozlišování nižších taxonů.

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Složení všech analyzovaných výrobků.	31
Tabulka 2. Přehled nalezených rostlinných druhů.	37
Tabulka 3. Složení výrobku MOUKA 1.	42
Tabulka 4. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 1.	42
Tabulka 5. Složení výrobku MOUKA 2.	45
Tabulka 6. Prvních 9 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 2.	45
Tabulka 7. Složení výrobku MOUKA 3.	49
Tabulka 8. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 3.	49
Tabulka 9. Složení výrobku MOUKA 4.	52
Tabulka 10. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 4.	53
Tabulka 11. Složení výrobku MOUKA 5.	55
Tabulka 12. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 5.	55
Tabulka 13. Složení výrobku MOUKA 6.	59
Tabulka 14. Prvních 5 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku MOUKA 6.	59
Tabulka 15. Složení výrobku PEČIVO 1.	61
Tabulka 16. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 1.	62
Tabulka 17. Složení výrobku PEČIVO 2.	65
Tabulka 18. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 2.	65
Tabulka 19. Složení výrobku PEČIVO 3.	68
Tabulka 20. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 3.	68
Tabulka 21. Složení výrobku PEČIVO 4.	71
Tabulka 22. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 4.	72
Tabulka 23. Složení výrobku PEČIVO 5.	74
Tabulka 24. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 5.	75

Tabulka 25. Složení výrobku PEČIVO 6.	78
Tabulka 26. První 3 nejrelevantnější proteiny nalezené ve vzorku PEČIVO 6.	78
Tabulka 27. Složení výrobku PEČIVO 7.	79
Tabulka 28. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 7....	80
Tabulka 29. Složení výrobku PEČIVO 8.	82
Tabulka 30. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 8....	82
Tabulka 31. Složení výrobku PEČIVO 9.	85
Tabulka 32. Prvních 10 nejrelevantnějších proteinů nalezených ve vzorku PEČIVO 9....	86

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schéma stavby obilky. (Petr, Speciální produkce)	19
Obrázek 2. Chleby Žitan (Norma) a Darken (Billa).....	25

9. SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	Enzyme Commission (systematické řazení enzymů)
EL	eluční roztok
EQ	ekvilibrační roztok
ESI	ElectroSpray Ionisation (ionizace elektrosprejem)
gi	GenInfo Identifier (kód proteinu, podle kterého lze vyhledávat v databázích)
GTP	guanosintrifosfát
MS	Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NDP	nukleotiddifosfát
LC	Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)
r.	taxonomická jednotka rodu
RNA	ribonukleová kyselina
Q	Quadropole (kvadrupólový analyzátor)
TOF	Time Of Flight (průletový analyzátor)
UDP	uridindifosfát
W	aktivační roztok

10. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] RICHERSON, Peter J., Robert BOYD a Robert L. BETTINGER. Was agriculture impossible during the pleistocene but mandatory during the holocene? A climate change hypothesis. *American Antiquity*. 2001, **66**(3), 387-411. ISSN 2325-5064.
- [2] BERANOVÁ, Magdalena a Antonín KUBAČÁK. *Dějiny zemědělství v Čechách a na Moravě*. Praha: Libri, 2010. ISBN 978-80-7277-113-4.
- [3] BERANOVÁ, Magdalena. *Jídlo a pití v pravěku a ve středověku*. Vyd. 2. Praha: Academia, 2011. ISBN 978-80-200-1991-2.
- [4] GALETA, Patrik. Stali se poslední lovci střední Evropy prvními zemědělci? *Živa*. Praha: Academia, 2016, **163**(5), 217-220. ISSN 0044-4812.
- [5] IVANEGA, Jan. *Z historie zemědělství*. Praha: Národní zemědělské muzeum Praha, 2012. Prameny a studie (Národní zemědělské muzeum). ISBN 978-80-86874-40-1.
- [6] NOVÁK, František Antonín. *Farmaceutická botanika: Systematika a morfologie léčivých rostlin*. Praha: Zdravotnické nakladatelství v Praze, 1950.
- [7] ŠAŠKOVÁ, Dagmar. *Trávy a obilí*. Praha: Artia, 1993. Člověk v přírodě. ISBN 80-85805-03-0.
- [8] VELÍŠEK, Jan. *The Chemistry of Food*. Chichester. Wiley, 2014. ISBN: 978-1-118-38384-0.
- [9] LEKEŠ, Jaroslav. *Šlechtění obilovin na území Československa: dosažené výsledky a další vývoj ve šlechtění, semenářství a odrůdovém zkušebnictví*. Praha: Brázda, 1997. ISBN 80-209-0271-6.
- [10] MORLEY, Sylvanus Grisworld. *Mayové*. Praha: Orbis, 1977. ISBN: 605-22-857.
- [11] VALÍČEK, Pavel. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Vyd. 2. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.
- [12] BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Josef ŽĎÁRSKÝ. *Biologie II: Nauka o potravinářských surovinách*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-7080-402-5.
- [13] CHLOUPEK, Oldřich. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 3. Praha: Academia, 2008. Česká matice technická (Academia). ISBN 978-80-200-1566-2.

- [14] SMÝKAL, Petr. Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa*. Praha: Academia, 2009, **156**(1), 6-9. ISSN 0044-4812.
- [15] DOLEŽEL, Jaroslav. Tráva s trojím věnem. *Vesmír*. Praha: Vesmír, spol. s r. o., 2009, **88**(1), 561-566. ISSN 1214-4029.
- [16] PETR, Jiří a Jozef HÚSKA. *Speciální produkce rostlinná*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 1997. ISBN 80-213-0152-X.
- [17] SHEWRY, Peter R., Jonathan A. NIAPIER a Arthur S. TATHAM. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*. 1995, **6**(7), 945-956. ISSN 1531-298X.
- [18] RIVIN, Carol J a Timothy GRUDT. Abscisic Acid and the Developmental Regulation of Embryo Storage Proteins in Maize. *Plant Physiology*. 1991, **95**, 358-365. ISSN 1532-2548.
- [19] OSBOURNE, Thomas. *The vegetable proteins*. London: Longmans, Green, 1909. Dostupné z: <https://ia802605.us.archive.org/6/items/vegetableprotein00osbouoft/vegetableprotein00osbouoft.pdf>
- [20] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-3-7.
- [21] KOHOUT, Pavel. Novinky v bezlepkové dietě. *Interní Medicína pro praxi*. 2008; **10**(3), 113–116. ISSN: 1803-5256.
- [22] CAGAMPANG, Gloria a kol. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry*. 1966, **43**(2), 143-155.
- [23] PAYNE, Peter I. a kol. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Journal of the Food and Agriculture*. 1987, **40**, 51-65. DOI: 10.1002/jsfa.2740400108.
- [24] ADACHI, Motoyasu a kol. Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, **100**(12), 7395–7400. DOI:10.1073/pnas.0832158100.
- [25] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-7080-551-X.

- [26] UniProt: UniProtKB results. *UniProt* [online]. UniProt Consortium, 2016 [cit. 2016-10-03]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=&sort=score>.
- [27] ExPASy: Enzyme. *ExPASy: Bioinformatics Resource Portal* [online]. Lausanne: Swiss institute of Bioinformatics, 2016 [cit. 2016-10-03]. Dostupné z: <http://enzyme.expasy.org/>
- [28] THEIS, T. a U. STAHL. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004, **61**(4), 437-455. ISSN 1420-682x. DOI: 10.1007/s00018-003-3231-4.
- [29] ROBERTS, Walden K. a Claude SELITRENNIKOFF. Plant proteins that inactivate foreign ribosomes. *Bioscience Reports*. 1986, **6**(1), 19-29. ISSN: 0144-8463.
- [30] HANNAH, Curtis L. a kol. Maize Genes Encoding the Small Subunit of ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiology*. 2001, **127**, 173–183. ISSN: 1532-2548.
- [31] ROSENKRANDS, Ida a kol. Serpins from wheat grain. *FEBS Letters*. 1994, **343**, 75-80. ISSN: 1873-3468.
- [32] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 333/1997 Sb. ze dne 31.12.1997, O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta. In: *Sbírka zákonů*.
- [33] Vyhláška č. 182/2012 Sb. ze dne 23. května 2012, O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta. In: *Sbírka zákonů*.
- [34] Vyhláška č. 113/2005 Sb. ze dne 21.3.2005, O způsobu označování potravin a tabákových výrobků. In: *Sbírka zákonů*.
- [35] Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. In: *Úřední věstník Evropské unie*.
- [36] Zákon č. 110/1997 Sb. ze dne 24.4.1997, Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*.
- [37] Vyznáte se v pečivu? DTest: Ledový čaj bez čaje. Praha: Moraviapress, 2014, **21**(8), 30-31. ISSN 1210-731X.

- [38] Mýty o chlebu a pečivu: Tisková konference "Zabijácké pečivo?". In: *Fórum zdravé výživy* [online]. Praha: Fórum zdravé výživy, 2016 [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: www.fzv.cz/wp-content/uploads/2015/06/TM-M%C3%BDty-o-pe%C4%8Divu.doc
- [39] Pekař mrazí housky. *DTest: Šlehačky s éčky*. Praha: Svoboda Press, 2011, **18**(7), 32-33. ISSN 1210-731X.
- [40] Tajemné složení nebaleného pečiva. *Stream* [online]. Praha: Seznam.cz, 2014 [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: <https://www.stream.cz/adost/10003977-adost-tajemne-slozeni-nebaleneho-peciva>
- [41] Pekaři s pravdou ven! *DTest: Nohy v pohodě*. Praha: Svoboda Press, 2012, **19**(8), 26-28. ISSN 1210-731X.
- [42] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava: P. Klouda, 1996. ISBN 80-902155-0-5.
- [43] MILATA, Viktor. *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. Bratislava: Státní technická univerzita, 2008. ISBN 978-80-227-2960-4.
- [44] NĚMCOVÁ, Irena a kol. *Spektrometrické analytické metody II*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-586-8.
- [45] VŘEŠŤÁL, Jan. *Hmotnostní spektrometrie*. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1835-6.
- [46] Michal Holčapek : Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice. *Univerzita pardubice* [online]. Pardubice [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf
- [47] SMITH, R.M. *Understanding mass spectra: a basic approach*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. ISBN: 0-471-42949-X
- [48] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [49] *NCBI: National Center for Biotechnology Information* [online]. Rockville Pike: National Center for Biotechnology Information, 2016 [cit. 2016-10-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- [50] *BioLib: Biological Library* [online]. 1999-2016 [cit. 2016-10-05]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/>
- [51] World checklist of selected plant families: Quick search. *KEW: Royal Botanical Gardens* [online]. Richmond: Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, 2016 [cit. 2016-12-03]. Dostupné z: <http://apps.kew.org/wcsp>
- [52] MACFARLANE, Amanda J. A Type 1 Diabetes-related Protein from Wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat storage globulin, Glb1, linked to islet demate. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(1), 54-63. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M210636200
- [53] DUVAL, Manuel a kol. The major biotinyl protein from *Pisum sativum* seeds covalently binds biotin at a novel site. *Plant Molecular Biology*, 1994, **26**(1), 265–273. ISSN: 0167-4412.
- [54] *ALLERGEN NOMENCLATURE* [online]. Lincoln: University of Nebraska, 2016 [cit. 2016-10-08]. Dostupné z: <http://allergen.org/>
- [55] SANCHEZ-MONGE, R. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clinical and Experimental Allergy*, 2004; **34**(11), 1747–1753. ISSN: 1365-2222. DOI:10.1111/j.1365-2222.2004.02085.x.
- [56] NEWBIN, Edward J. Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in the seeds of transgenic tobacco. *Planta*. 1990, **180**(4), 461-470. ISSN: 1432-2048.
- [57] LYCETT, Grantley W. The complete nucleotide sequence of a legumin gene from pea (*Pisum sativum* L.). *Nucleic Acids Research*, 1984,. **12**(11), ISSN: 0305-1048.
- [58] MÜNTZ, Karl. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*. 1996, **47**(298), 605-622. ISSN: 0022-0957.
- [59] HALLIWELL, Berry. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 2006, 141, 312-322. ISSN: 1532-2548.

- [60] VAN DAMME, Els J. M and Willy J. PEUMANS. Molecular cloning of two classes of Em-like proteins from the seeds of the leguminous tree *Robinia pseudoacacia*. *Tree Physiology*. 1996, 16, 841-845. ISSN 1758-4469.
- [61] RÖSTI, Sandrine a Kay DENYER. Two paralogous genes encoding small subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize, Bt2 and L2, replace the single alternatively spliced gene found in other cereal species. *Journal of Molecular Evolution*. 2007, 65(3), 316–327. ISSN: 1432-1432. DOI: 10.1007/s00239-007-9013-0
- [62] WOO, Young Min a kol. Genomics Analysis of Genes Expressed in Maize Endosperm Identifies Novel Seed Proteins and Clarifies Patterns of Zein Gene Expression. *Plant Cell*. 2001, 13(10), 2297–2318. ISSN 1531-298X. DOI: 10.1105/tpc.010240
- [63] YAMAGATA, Tomomi a kol. Uncleaved legumin in developing maize endosperm: identification, accumulation and putative subcellular localization. *Journal of experimental botany*. 2003, 54 (384): 913-922. ISSN: 0022-0957. DOI: 10.1093/jxb/erg090.
- [64] ARONSSON, H. a P. JARVIS. The Chloroplast Protein Import Apparatus, Its Components, and Their Roles. *Plant Cell Monographs*. 2009, 13, 1-35. ISSN: 1861-1370. DOI:10.1007/7089_2008_40.
- [65] ANDERSON, Olin D. a kol. Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. *Nucleic Acids Research*. 1989, **17**(1), 461-462.. ISSN: 0305-1048.
- [66] FERREIRA, Ederlan de Souza a kol. Soy β -Conglycinin (7S Globulin) Reduces Plasma and Liver Cholesterol in Rats Fed hypercholesterolemic Diet. *Journal of medicinal food*. 2011, **14**(1/2), 94–100. ISSN: 1096-620X. DOI: 10.1089/jmf.2009.0204
- [67] ADAMS, Michael .R. a kol. Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *Journal of Nutrition*. 2004, **134**(3), 511-6. ISSN: 0022-3166.
- [68] OSTERGAARD, H. Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamins storage proteins. Cloning and characterization of five major molecular forms. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, **275**(43), 33272-9. ISSN: 0021-9258.

- [69] ZHOU, Jiaying a kol. Identification of drought stress related proteins from 1S (1B) chromosome substitution line of wheat variety Chinese Spring. *Botanical Studies*. 2016, **57**(20). ISSN: 1999-3110. DOI 10.1186/s40529-016-0134-x
- [70] HE, Miao a kol. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *BMC Plant Biology*, 2015, **15**(97). ISSN 1471-2229. DOI: 10.1186/s12870-015-0471-z
- [71] HEFFLER, E. a kol. Clinical manifestations, co-sensitizations, and immunoblotting profiles of buckwheat-allergic patients. *Allergy*. 2011, **66**(2), 264-70. ISSN: 1398-9995. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02469.x
- [72] NOMA T. a kol. Fatal buckwheat dependent exercised-induced anaphylaxis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2001, **19**(4), 283-6. ISSN: 2228-8694.
- [73] PEETERS, K.A.M.B. a kol. Clinical relevance of sensitization to lupine in peanut-sensitized adults. *Allergy*. 2009, **64**, 549-555. ISSN: 1398-9995. DOI:10.1111/j.1398-9995.2008.01818.x.
- [74] BALLABIO, Cinzia. IgE-Mediated Cross-Reactivity among Leguminous Seed Proteins in Peanut Allergic Children. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010, **65**, 396–402. ISSN: 1573-9104. DOI 10.1007/s11130-010-0199-8
- [75] DE BUSTOS, A. a N. JOUVRE. Characterisation and analysis of new HMW-glutenin alleles encoded by the Glu-R1 locus of *Secale cereale*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003, **107**, 74–83. ISSN: 1432-2242 DOI 10.1007/s00122-003-1234-z
- [76] Quick GO: A fast browser for Gene Ontology terms and annotations. *The European Bioinformatics Institute: The home for big data in biology* [online]. Hinxton: EMBL-EBI, 2016 [cit. 2016-12-03]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0051920>
- [77] MOMMA, Mitsuru a Zui FUJIMOTO. Interdomain Disulfide Bridge in the Rice Granule Bound Starch Synthase I Catalytic Domain as Elucidated by X-Ray Structure Analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012, **76**(8), 1591–1595. ISSN: 1347-6947. DOI: 10.1271/bbb.120305

K práci byly přiloženy na CD přílohy s úplnými daty získanými z jednotlivých analýz. Každý vzorek má vytvořenou složku (např. MOUKA 1, PEČIVO 1), ve které se nachází soubory s výsledky ze všech třech analýz.