

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Chemické složení pravěké stravy

Vypracovala: Bc. Monika Polačková
Vedoucí bakalářské práce: Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D.
Studijní obor: Biologie, geologie a enviromentalistika-chemie

V Praze dne 15. dubna 2011

podpis

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v období listopad 2010 – duben 2011.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 15. dubna 2011

podpis

SOUHRN

První lidé se živilo lovem a především sběrem nejrůznějších plodů a semen. V raném zemědělství si pralidé podmanili svět rostlin a zvířat a během celé existence člověka na Zemi se celý systém zdokonaloval až k dnešnímu typu zemědělství.

Jednou z hlavních neodmyslitelných složek potravy jsou proteiny, neboť z nich většina organismů získává životně důležité látky a v omezené míře i energii. Tato bakalářská práce se věnuje hledání a zkoumání jednoduchých receptů na zhotovení „pravěké“ potravy, která byla následně připravena v chemické laboratoři. Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí metody peptidového mapování hmotnostním spektrometrem pracujícím na principu MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) a metody peptidových štěpů LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry).

Cílem práce bylo doplnění databáze referenčních vzorků na VŠCHT, a tím usnadnění identifikace neznámých potravinových zbytků při archeologických nálezích.

Dovolte mi touto cestou poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Mgr. Štěpánce Kučkové, Ph.D. za její odborné vedení a cenné rady, celému kolektivu laboratoře za ochotu a vytvoření milého pracovního prostředí. Těm všem patří můj dík za pomoc při řešení problémů, přátelský přístup a příjemnou spolupráci

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Jak se jedlo v pravěku	9
2.1.1	Doba kamenná	9
2.1.1.1	Paleolit	10
2.1.1.2	Mezolit	11
2.1.1.3	Neolit	11
2.1.2	Doba bronzová	13
2.1.3	Doba železná	14
2.2	Proteinové složení vybrané pravěké stravy	15
2.2.1	Proteiny	15
2.2.2	Proteinové složení obilovin	15
2.2.3	Proteinové složení drůbežího masa	16
2.3	Analýza pomocí peptidového mapování	18
2.3.1	Proteáza trypsin	18
2.3.2	Izolace štěpů pomocí mikrokolon ZIP TIP	18
2.3.3	Hmotnostní spektrometrie a TOF analyzátor	19
2.3.3.1	Ionizace analytu	19
2.3.3.2	Identifikace peptidových štěpů pomocí LC-MS/MS	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použité chemikálie a pomůcky	21
3.1.1	Promývací roztoky pro reverzní fázi ZIP TIP	21
3.1.2	Příprava matrice	21
3.1.3	Použité ingredience	21
3.2	Příprava modelových vzorků	22
3.2.1	Kaše z pšenice dvouzrnky (vzorek 1)	22
3.2.2	Kaše z žita ozimého (vzorek 2)	22
3.2.3	Příprava drůbežího masa (vzorek 3)	22
3.3	Štěpení modelových vzorků tryptinem	22
3.4	Zakoncentrování a přečištění peptidů na reverzní fázi	23

3.5	Analýza pomoci MALDI-TOF MS	23
3.6	Analýza pomoci LC-MS/MS	23
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1	Analýza pšeničné kaše	24
4.2	Analýza žitné kaše	26
4.3	Analýza drůbežího masa	27
5	ZÁVĚR	29
6	LITERATURA	31
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	32

1 ÚVOD

Pravěk označuje jedno z nejstarších období vzniku a vývoje člověka, společnosti a kultury. První pralidé se objevili na začátku čtvrtohor, tedy před 2,5 miliony let, a od počátku každodenně hledali nezbytnou potravu potřebnou k přežití. Nejdříve byli přírodními lovci a sběrači, kteří migrovali z místa na místo do oblastí bohatých na zdroje potravy a vody. Postupem času si zakládali přechodná obydlí a přecházeli k usedlému zemědělskému způsobu života.

Zkoumání složení pravěké stravy je velice nelehký úkol. Jako primární zdroj poznatků se využívají archeologické nálezy. Ze zbytků potravy, nástrojů, pecí, ohnišť a nádob na vaření či k podávání jídla je možné vyvodit, jaké jídlo se konzumovalo a připravovalo. Abychom se k těmto informacím dobrali, je důležité současné studium hmotné kultury, stavebních pozůstatků, klimatu a životního prostředí, ve kterém pralidé žili. Další problém, který souvisí s hledáním složení pravěké stravy, je nízká životnost organických potravinových zbytků v důsledku hnití a rozpadu až na nejjednodušší látky. Nejlepší zbytky rostlin se dají nalézt tam, kde byl biologický rozklad pozdržen vlivem extrémních podmínek, jako je například trvalé zamokření, vysušení či permafrost. Taková archeologická naleziště jsou relativně vzácná, ale jsou oknem do říše organických potravin. Pozůstatky stravy lze nalézt také v půdě jako odpadní materiál – semena, plevy nebo zbytky po spálení v zuhelnatělé produkty. Všechna tato hlediska nám přibližují, jakým způsobem naši vzdálení předci zpracovávali a uskladňovali potravu. Nejdolnější skupinou jsou anorganické zvířecí kosti. Za předpokladu, že půda není příliš kyselá, v ní mohou přetrvat i několik tisíc let. Nedávno vyvinuté analytické metody otevřely zkoumání lidské stravy nové obzory.¹

Tato bakalářská práce se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie k identifikaci proteinů obsažených v potravinách, které se konzumovali již v pravěku. Dosažené výsledky poslouží k doplnění peptidové databáze referenčních vzorků, které umožní identifikaci potravinových zbytků získaných při archeologických výzkumech.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Pravěk je nejdelší epocha v dějinách lidstva, trval více než dva miliony let a doba jeho ukončení byla v různých částech světa jiná. Pravěk dělíme podle materiálů, které lidé prvotně zpracovávali, na dobu kamennou (2.1.1), bronzovou (2.1.2) a železnou (2.1.3).^{2,3}

2.1 Jak se jedlo v pravěku

Periodizaci pravěku lze chápat také podle způsobu opatřování potravy. Rozeznáváme období přisvojovacího hospodářství, které trvalo do 7. tisíciletí př. n. l. na Předním východě a v Evropě až do 5. tisíciletí př. n. l. Lidé si sběrem a lovem přisvojovali potravu z přírody. Datujeme ho od vzniku člověku do začátku prvního zemědělství. Z technologického hlediska této epoše odpovídá starší doba kamenná a mezolit. Druhá fáze je období výroby potravy. Začala v mladší době kamenné (neolitu) a skončila se vznikem prvních řemesel a obchodu v době železné. Člověk pěstoval první plodiny a choval dobytek.³

2.1.1 Doba kamenná

Charakterizuje epochu lidstva (od vzniku člověka-3500 př. n. l), ve které začali předci opracovávat kamenné valouny a vytvářeli z nich první primitivní nástroje.⁶

Dobu kamennou dělíme časově na:

paleolit (vznik člověka do 10 000 př. n. l.) (kap. 2.1.1.1)

mezolit (10 000-7 000 l. př. n. l.) (kap. 2.1.1.2)

neolit (7000-3500 př. n. l.) (kap. 2.1.1.3)²

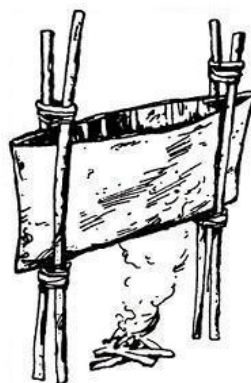
2.1.1.1 Paleolit

První pralidé ve starším paleolitu, *Homo habilis* ranější *Homo ergaster*, si obstarávali obživu hlavně sběrem plodů a mršin živočichů. Postupem času, muži nabyli schopnosti lovit v tlupách drobnou zvěř. Z Přesletic u Prahy byly doloženy například pozůstatky ze srnce. Příležitostně se ovšem odvážili i na robustnější kusy. Nalezly se i kosti slona a koně, ale není prokázáno, že je lidé skutečně ulovili³. Pomoci nejjednodušších kamenných nástrojů si zabitě zvíře rozdělili a z jeho kostí získali morek. Také rybolov zaujímal významné postavení. *Homo erectus* se živil smíšenou stravou, v níž převažovalo maso ulovených zvířat. Pravděpodobný byl i příležitostný kanibalismus, zejména v období sucha, když jídla nebylo nazbyt.^{3,5}

Technika lovu se postupně zdokonalovala a lovci lovíli kolektivně. Sběr jedlých rostlin, plodů, semen a drobných živočichů plnil stálou roli v opatrování potravy. Znalost ohně umožnila první úpravu potravy – vařením – jídlo se tak stalo stravitelnějším a zvýšila se tak kvalita výživy⁴. Střední paleolit započal vznik dalšího druhu *Homo*, *Homo sapiens neanderthalensis*. Tehdejší lidé lovíli jeleny, tury, bizony, zubry, lesní slony a mamuty. Dokonce se našly doklady o lovu medvěda v jeskyni Šipka na Kotouči u Štramberka na Moravě. Z rostlinné potravy se sbíraly lískové oříšky, planá jablka a houby.³

Vyvrcholením starší doby kamenné je mladý paleolit, kdy se vyvinul druh *Homo sapiens*. Tehdejší klima poskytovalo ideální podmínky stádové zvěři (bizonům, jelenům, sobům a antilopám). Díky značnému počtu zvířat a dokonalejším zbraním se lov opět zjednodušil. Lovci využívali vrhací zbraně, oštěpy, ale také luk a šípy. Lovili koně, zubry a v západní Evropě také soby. Sobí maso bylo ceněno pro vysoký obsah tuku, který lovcům v obdobích glaciálů zajišťoval stálou tělesnou váhu. Z této doby se v Dolních Věstonicích našly ostatky mamuta³. Menší zvířata byla lovena do sítí a pastí. Oblíbenou kořistí se stával zajíc. Ohniště se měnila v různorodé typy, některá měla kamenné obložení, jiná měla termální strukturu s kameny ve vnitř. Maso se nejen opékalo, ale také dusilo v jámách, nad nimiž se rozdělal oheň. Rozmohlo se také vaření v nádobách rostlinného původu (obr. 1), nebo ve vacích z kůže, do nichž se nalila voda, která se přivedla do varu

rozpálenými kameny, které se vhažovaly dovnitř. Z této doby se nám dochovaly přepálené a částečně rozpadlé křemencové valouny.³⁻⁵



Obrázek 1. Nádoba na vaření zhotovená z kůry.⁶

2.1.1.2 Mezolit

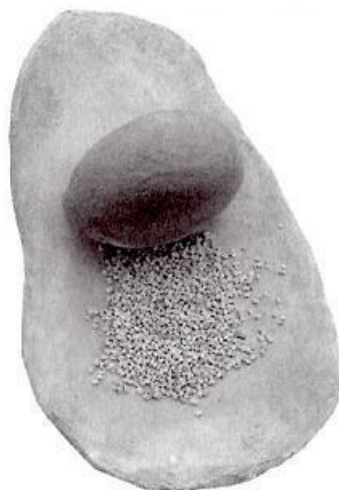
Toto období zakončilo kořistnický způsob života, kdy lov a sběr byly jediným zdrojem obživy. Jeho konec se v každé části světa lišil, ale na některých místech planety se udržuje dodnes. Nástroje byly méně vypracované než ve vrcholném paleolitu, avšak mnohem účinnější. Nejvíce se rozmohl rybolov. Začaly se využívat háčky různých tvarů, sítě a rybářské vrše. Tehdejší lidé objevili plavidla, díky kterým měli přístup na volné moře. Škála lovených ryb se tak rozrostla o mnoho nových druhů. Také u nás v jižních Čechách i v třeboňské pánvi vznikaly osady v blízkosti řek a jezer. Zhruba před 10,5 tisíci let př. n. l., se objevil planý oves (*Avena sp.*), planý ječmen (*Hordeum spontaneum*), čočka (*Lens sp.*), vikev (*Vicia sp.*), hrách (*Pisum sp.*), pistácie (*Pistacia sp.*) a mandloně (*Prunus dulcis*).^{4,6,7}

2.1.1.3 Neolit

Přechod k zemědělství považujeme za jednu z nejvýznamnějších změn ve způsobu života v dějinách lidstva. Neolitický člověk se stal zemědělcem a chovatelem dobytka. Tradiční lov, rybolov a sběr převzal doplňující úlohu, neboť zemědělství nasýtilo větší počet lidí. Sběr byl v počátcích nahrazen sklizní planých rostlin. Nejstarší oblast prvních planých obilovin byla v tzv. úrodném půlměsíci na Blízkém východě. Divoce rostoucí

pšenice a ječmen dali vznik pšenici dvouzrné, jednozrné a ječmeni. Původ žita není dosud známý. Oves byl znám jako plevelná příměs. Obilí mělo po celý pravěk nezastupitelnou úlohu. Lidé pěstovali také proso dovezené z Číny, ale pro náročné obhospodařování se neosvědčilo. Dále se konzumovaly luštěniny, mák, zelenina (zelí, cibule, česnek), ovoce (jablka, hrušky) a ořechy. Sbíral a pěstoval se také merlík bílý (*Chenopodium album*) a sveřep stoklasý (*Bromus secalinus*).³

V Evropě se zemědělství rozvinulo nejdříve na jihovýchodě. V 6. tisíciletí př. n. l. se populace usídlila na území Slovenska a Českých zemí. Ve střední Evropě se nejvíce pěstovala pšenice dvouzrnka, jednozrnka, méně častá pšenice špalda, obecná a shloučená, ječmen, proso, žito, hrách a čočka. K drcení zrna se používaly kamenné podložky, na nichž se drtilo zrno na hrubou mouku (obr. 2).



Obrázek 2. Kamenný mlýnek na mouku.⁶

Ze získaného a nadrceného obilí se připravovaly jednoduché kaše, oslazené ovocem nebo medem od divokých včel. Slané kaše se vařily společně s masem nebo s morkem. Z kaší se na ohništi pekly placky (obr. 3). Kaše byly buď čerstvé, nebo zkvašené, z mléka či z vody. Dnes zkvašenou placku považujeme za základ dnešního chleba.

Lov divokých zvířat nahrazoval chov zvířat domácích. Nejstarší dochované nálezy pocházejí z Blízkého východu. Lidé cílevědomě drželi v zajetí původně divoká zvířata. Nejstarší zdomestikované zvíře byla ovce, později si lidé podmanili kozu a nakonec hovězí

dobytek. Prase nebylo příliš časté. Při kolonizaci střední Evropy se nejvíce osvědčil skot, neboť se mu v našich přírodních podmínkách nejlépe dařilo. Maso se nejčastěji vařilo nebo dusilo.^{4,6,7}



Obrázek 3. Pečení placek na horkých kamenech.⁴

2.1.2 Doba bronzová

Po neolitu se produktivní hospodářství rozvíjelo, společnost zdokonalila způsob obživy a také se rozšířil nový výrobní materiál – měď. Období se nazývá eneolit. Když se měď začala slévat s cínem, datujeme počátek doby bronzové (3500-1100 př. n. l.)⁸. V zemědělství se nadále rozšiřovaly méně známé plodiny jakými byly žito, oves, proso a luštěniny. Pravděpodobně se již dělal a uchovával kvásek, který se vyráběl z části těsta předešlého pečení, ke kterému se přidala voda. Vznikl tak základ na pečení nového chleba. Ve švýcarských a jihoněmeckých oblastech, ale také v Čechách v Mohelnici se uchovaly rostliny, které lidé sbírali a poté pojídali jejich listy, stonky, plody, kořeny (např. mrkve, petržele, řepy, merlíku, kopřivy, smetánky, pohanky svlačcovité, řepky, řeřichy, šťovíku, česneku, plané majoránky a dalších). Z ovocných stromů se konzumovali plody jabloně lesní, hrušně polničky, třešně ptačí, višně obecné a snad i révy vinné. Z domácích zvířat se šířil skot a také kůň, jehož význam rostl. V severní Evropě lidé stále chovali ve stádech soby. Po roce 2000 př. n. l. se do Evropy dostal z Indie kur domácí,

z Mezopotámie kachna domácí. Drůbež nebyla příliš oblíbená, a proto se vyskytovala pouze ojedinele. Lidé si ji připravovali k jídlu nejrůznějšími způsoby – vařením, ale také opékáním na rožni, nebo ji obalili listy a opekli v popelu pod hořícím ohněm. Přírodním doplňkem opatřování potravy byl stále lov zvěře a ryb. Dokladem jsou nálezy rybích kostí a bronzových udiček. Jedli se také říční škeble. Rozvíjela se těžba soli a solivarnictví.^{4,9}

2.1.3 Doba železná

Doba železná je datována zhruba od 1100 př. n. l. do doby narození Krista. Hlavní výrobní surovinou se stalo železo. Strava Keltů se skládala z chleba a vařeného či pečeného vepřového, hovězího nebo skopového masa a ryb. Z pšenice a chmelu připravovali pivo a z révy vinné také víno. I v této pokročilé době byly nalezeny ostatky lovené zvěře. V Ostrově v Čechách objevili archeologové pozůstatky vlka, koně a divoké kočky. Z ryb jsou doloženy pozůstatky tluště, lososa a štiky. Keltové dojili kravské a kozí mléko, ze kterého vyráběli sýry a tvaroh.^{4,8}

2.2 Proteinové složení vybrané pravěké stravy

2.2.1 Proteiny

Proteiny jsou základní chemické složky všech živých buněk živočišného a rostlinného původu. Zastávají řadu funkcí (stavební, transportní atd.) a ve výživě heterotrofních organismů jsou nenahraditelné. Získávají se z rostlinné a živočišné potravy. V procesu trávení se rozloží na jednoduché aminokyseliny, ze kterých zejména živočišné syntetizují vlastní bílkoviny, nebo v omezené míře slouží i jako zdroj energie.^{10,11}

2.2.2 Proteinové složení obilovin

Hlavní zdroj rostlinných proteinů v potravě představují semena rostlin, pro člověka v první řadě obiloviny, obzvláště pšenice a žito (Tab. I).

Pšeničná mouka obsahuje až 15 % bílkovin. Nejhodnotnější bílkoviny jsou prolaminy a gluteliny, které představují 80 % celého bílkovinného složení pšenice a zastávají zásobní funkci. Zbývajících 20 % představují ve vodě rozpustné protoplazmatické bílkoviny (albuminy a globuliny – cytoplazmatické proteiny, enzymy s aktivitou α - a β -amylázy, proteázy, lipázy, lipoxygenázy atd.).

Žitné albuminy a globuliny představují 55 % a prolaminy a gluteliny zabírají 45 % celkového proteinového složení žitné mouky. Nejčastěji vyskytující aminokyseliny v obilném zrně jsou kyselina glutamová a prolin (Tab.II).^{10,11}

Tabulka I. Základní proteinové složení vybraných obilovin.¹¹

Obilovina	Proteiny			
	Albuminy	Globuliny	Prolaminy	Gluteliny
Pšenice	14,7 %	7,0 %	32,6 %	45,7 %
Žito	44,4 %	10,2 %	20,9 %	24,5 %
Ječmen	12,1 %	8,4 %	25,0 %	54,5 %
Oves	20,0 %	11,9 %	14,0 %	53,9 %

Tabulka II. Obsah aminokyselin v obilovinách (v g vtaženo na 16 g dusíku).¹¹

Aminokyselina	Pšenice	Žito	Ječmen	Oves
L-alanin	3,6	4,3	4	4,5
L-arginin	4,6	4,6	4,7	6,3
L-asparagin + L-asparagová kyselina	4,9	7,2	5,7	7,7
L-cystein	2,5	1,9	2,3	2,7
L-glutamová kyselina	29,9	24,2	23,6	20,9
glycin	3,9	4,3	3,9	4,7
L-histidin	2,3	2,2	2,1	2,1
L-isoleucin	3,3	3,5	3,6	3,8
L-leucin	6,7	6,2	6,7	7,3
L-lysin	2,9	3,4	3,5	3,7
L-methionin	1,5	1,5	1,7	1,7
L-fenylalanin	4,5	4,4	5,1	5,0
L-prolin	9,9	9,4	10,9	5,2
L-serin	4,6	4,3	4,0	4,7
L-threonin	2,9	3,3	3,3	3,3
L-tryptofan	0,9	1,0	0,9	1,1
L-tyrosin	3,0	1,9	3,1	3,3
L-valin	4,4	4,8	5,0	5,1

2.2.3 Proteinové složení drůbežního masa

Strava živočišného původu je bohatým zdrojem proteinů. Proteiny představují asi 20 % hmotnosti svaloviny, která se skládá z proteinů svalových vláken neboli myofibrilárních proteinů, rozpustných sarkoplazmatických proteinů a nerozpustných strukturních proteinů (pojivové tkáně) (Tab. III). Následující tabulka IV popisuje složení a zastoupení jednotlivých aminokyselin v drůbežím mase, ve kterém převažují kyselina glutamová a lysin.¹¹

Tabulka III. Přehled a procentuální zastoupení svalových proteinů v pojivových tkáních.¹¹

Protein	Podíl v %	Protein	Podíl v %
myofibrilární proteiny	60,5	sarkoplasmatické proteiny	29
myosin	29	enzymy	24,5
aktin	13	myoglobin	1,1
konnektin	3,7	hemoglobin	3,3
tropomyosin	3,2	aj. extracelulární proteiny	
troponin (C, I, T)	3,2	strukturní proteiny a proteiny organel	10,5
aktinin (α -, β -, γ -)	2,6	kolagen	5,2
myomesin, desmin aj.	5,8	elastin	0,3
		mitochondriální proteiny	5

Tabulka IV. Obsah aminokyselin v kuřecím mase (v g vtaženo na 26 g dusíku).¹¹

Aminokyselina	Kuřecí maso
L-alanin	3,4
L-arginin	5,6
L-asparagin + L-asparagová kyselina	9,2
L-cystein	1,3
L-glutamová kyselina	15,0
glycin	5,3
L-histidin	2,6
L-iso-leucin	5,3
L-leucin	7,4
L-lysin	8,0
L-methionin	2,5
L-fenylalanin	4,0
L-prolin	4,1
L-serin	3,9
L-threonin	4,0
L-tryptofan	1,0
L-tyrosin	3,3
L-valin	5,1

2.3 Analýza pomoci peptidového mapování

Metoda peptidového mapování (peptide mass fingerprinting – PMV) využívá k identifikaci proteinů tzv. otisků prstů. To jsou soubory enzymatických štěpů, které vznikly z příslušného proteinu. Nejprve se rozruší disulfidové můstky vzorku redukcí, pomocí dithiotreitolu a vzniklé -SH skupiny se blokují alkylací (jodacetamid). Dále se štěpí proteasami trypsinem nebo chymotrypsinem. Změřené hmotnosti peptidů se zadají do vyhledávacího programu např. Mascot nebo Proteomics. Na základě experimentálních výsledků se porovnají hmotnosti hledaných bílkovin a stanoví se výsledné složení analyzované látky. Pravděpodobnost správného přiřazení je dána statistickými parametry, což představuje procento pokrytí sekvence nebo poměr nalezených a zadaných peptidů.¹²

2.3.1 Proteáza trypsin

Trypsin je serinová proteáza, kterou vytváří živočichové ve slinivce břišní ve formě proenzymu trypsinogenu. Specificky štěpí peptidové vazby, na nichž se podílí karboxylovou skupinou bazické kyseliny (lysin a arginin). Při hydrolýze bílkovin trypsinem vznikají velké peptidové fragmenty, jejichž terminální aminokyselina na C-konci je lysin nebo arginin. Optimální pH pro hydrolýzu je v rozmezí 7-9.^{13,14}

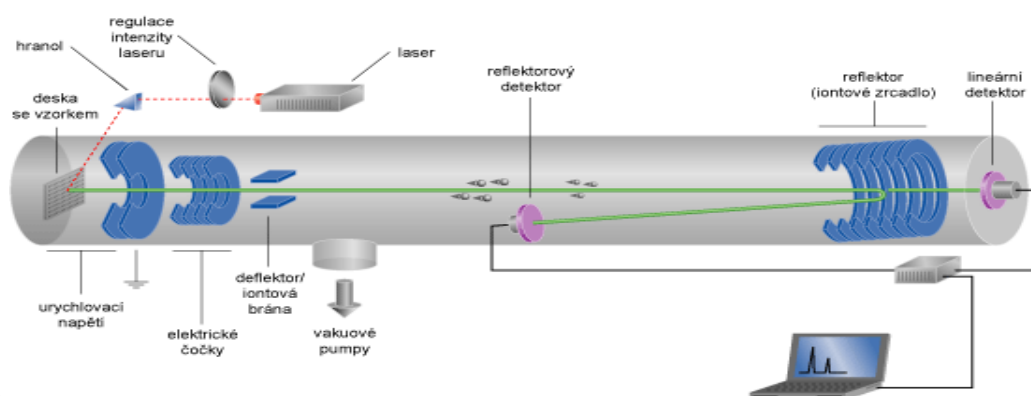
2.3.2 Izolace štěpů pomoci mikrokolon ZIP TIP

Mikrokolony ZIP TIP jsou nástavce (špičky) velikosti 10 μ na automatické pipety s vloženým chromatografickým médiem, kterým je reversní fáze C₁₈. Po nasátí peptidů, proteinů do mikrokolony, se biomakromolekuly napoutají na reversní fázi. Anorganické sloučeniny zůstanou v roztoku. Poté se sorbent promyje malým množstvím elučního roztoku, díky kterému se biomakromolekuly zpětně uvolní.¹⁵

2.3.3 Hmotnostní spektrometrie a TOF analyzátor

Hmotnostní spektrometrie rozděljuje nabitě částice podle jejich hmotnosti. Hmotnostní spektrometry mají tři základní části – iontový zdroj, analyzátor a detektor. Ionty vletí do analyzátorů, kde se rozdělí podle hmotnosti a nábojů.

Analyzátor TOF (Time of Flight) ionty urychluje vysokým napětím a tím získají impuls stejné kinetické energie. Doba letu iontů závisí na poměru hmotnosti k náboji. Detektor funguje na dvou principech: lineárním, který je výhodnější pro měření celých bílkovin, a reflektorovém, kterým se měří peptidy (obr. 5).^{12,16}



Obrázek 5. Schematický obrázek hmotnostního spektrometru MALDI-TOF

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).¹⁶

2.3.3.1 Ionizace analytu

Při tomto způsobu ionizace je nejdůležitější látkou matrice. Tou nejčastěji bývá hydroxybenzoová kyselina a její deriváty. Matrice se nanáší na ocelovou destičku, která se vkládá do přístroje. Ionizace laserem je přenos energie elektromagnetického záření na matici, která se díky ní převede do plynné fáze. Na matici je navázán analyt (peptid, protein), který od ní obdrží H^+ iont. Analyty s H^+ iontem se měří v pozitivním módu přístroje (na detektor letí pouze kationty).^{16,17}

2.3.3.2 Identifikace peptidových štěpů pomocí LC-MS/MS

Identifikace peptidových štěpů se provede pomocí kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Při hmotnostní spektrometrii ESI-Q-TOF se molekuly vzorku rozdělí kapalinovou chromatografií a ionizují se tzv. elektrosprejem (ESI). Princip spočívá v aplikaci vysokého elektrického potenciálu na místo vyústění kapiláry, ze které vytékají frakce molekul. Tandemovým hmotnostním spektrometrem se rozštěpí na základě poměrů hmotnosti a náboje iontů. Způsob je natolik šetrný, že prakticky nedochází k fragmentaci molekul. Analýza iontů probíhá ve dvou analyzátoch, kvadrupólovém a time-of-flight, oddělených kolizní celou s inertním plynem. Získaná data se porovnávají s on-line databázemi. Za jednoznačně identifikovaný je obvykle považován protein identifikovaný nejméně dvěma peptidy.¹⁸

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a pomůcky

Trypsin TCPK (Promega)

Trifluoroctová kyselina (Sigma)

2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) (Sigma)

ZIP TIP C18 (Millipore)

H₂SO₄ (Penta)

3.1.1 Promývací roztoky pro reverzní fázi ZIP TIP

Aktivační roztok – 50% acetonitril v H₂O

Ekvilibrační roztok – 0,2% trifluoroctová kyselina v H₂O

Eluční roztok – 50% acetonitril s 0,1% kyseliny trifluoroctové v H₂O

3.1.2 Příprava matrice

V 500 µl roztoku (30% acetonitril s 0,2% kyselinou trifluoroctovou v H₂O) bylo rozpuštěno 9,6 mg 2,5- dihydroxybenzoové kyseliny.

3.1.3 Použité ingredience

Pšenice dvouzrnka – Bioharmonie

Žito ozimé – Country Life

Plnotučné mléko – Moravia

Vzorek drůbežního masa – zakoupeno v obchodním řetězci Albert

3.2 Příprava modelových vzorků

3.2.1 Kaše z pšenice dvouzrnky (vzorek 1)

40 g rozemleté pšenice dvouzrné bylo zalito 100 ml vody. Směs byla vařena při mírné teplotě na elektrickém vařiči. Když kaše zhoustla, bylo přidáno 12 ml plnotučného mléka. Po odstavení a vychladnutí byl odebrán vzorek a následně byl vložen do sušárny. Po vysušení byla odebrána část vzorku k analytickému rozboru.

3.2.2 Kaše z žita ozimého (vzorek 2)

40 g rozemletého žita bylo zalito 110 ml vody. Směs byla vařena při mírné teplotě na elektrickém vařiči. Když kaše zhoustla, bylo přidáno 12 ml plnotučného mléka. Po odstavení a vychladnutí byl odebrán vzorek, který byl následně vložen do sušárny. Po vysušení byla odebrána část vzorku k analytickému rozboru.

3.2.3 Příprava drůbežího masa (vzorek 3)

Část kuřecího masa byla upečena v elektrické troubě při teplotě 200 °C. Poté byla několik dní sušena na suchém místě. Po vysušení byla odebrána část vzorků k analytickému rozboru.

3.3 Štěpení modelových vzorků trypsinem

Štěpící roztok byl připraven z 1 µl roztoku trypsinu o koncentraci 1 µg/µl a 50 µl 50mM hydrogenuhličitanu amonného. K několika miligramům odebraných z připravených modelových vzorků (vysušené pšeničné a žitné kaše a kuřecí maso) bylo přidáno po 10 µl štěpícího roztoku. Štěpení probíhalo při laboratorní teplotě 23°C po dobu dvou hodin.

3.4 Zakoncentrování a přečištění peptidů na reverzní fázi

Nejprve byla aktivována reversní fáze (ZIP TIP C18) pětinasobným promytím 10 μ l aktivačního roztoku. Dále se reverzní fáze ekvilibrovala pětinasobným promytím 10 μ l ekvilibračního roztoku. Zachycení peptidů se provádělo desetinásobným promytím 10 μ l analyzovaného roztoku. Poté následovala ekvilibrace prováděná pětinasobným promytím 10 μ l ekvilibračního roztoku. Eluce navázaných peptidů byla provedena 5 μ l elučního roztoku, které byly 10 \times prosátý. (Celkový objem analyzovaného vzorku po eluci byl 5 μ l). Zbytky navázaných peptidů byly odstraněny desetinásobným promytím 10 μ l elučního roztoku. Pro zkoncentrování a přečištění dalších vzorků byl celý postup pro každý vzorek zopakován.

3.5 Analýza pomoci MALDI-TOF MS

Na ocelovou desku byla nanášena směs 2 μ l přečištěných a zkoncentrovaných peptidů (kap. 3.4) a 4 μ l roztoku matrice (3.1.2). Poté co směs vykryštovala, byla ocelová deska se vzorkem vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Měření probíhalo v pozitivním reflektorovém modu s napětím 20 kV a přesností $\pm 0,2$ Da. Interval detekovaných hmot (m/z) byl od 900 do 2000 Da. Výsledné spektra se zprůměrovala z nejméně 200 jednotlivých měření.

3.6 Analýza pomoci LC-MS/MS

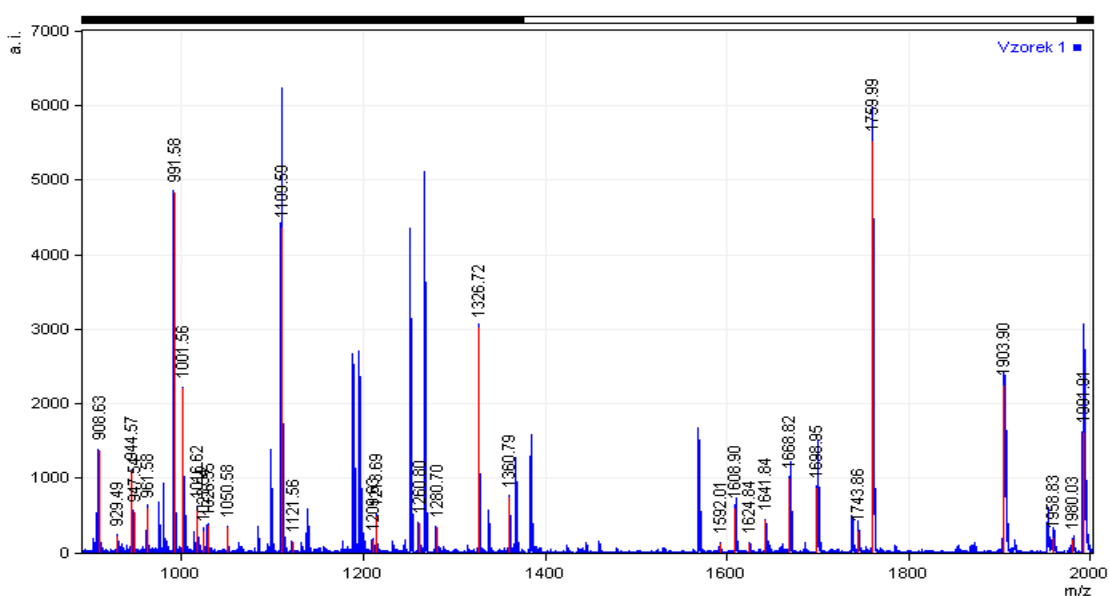
Část naštěpených vzorků trypsinem byla odeslána k rozboru na Přírodovědnou fakultu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích do laboratoře strukturní biologie k Mgr. Peteru Koníkovi.

Po eluci byly peptidy nanášeny přímo do hmotnostního spektrometru ESI-Q-TOF. Při ionizaci elektrosprejem procházel eluát po výstupu z chromatografické kolony kapilárkou, na které bylo napětí 15 V-30 V. Vlastní identifikace konkrétních druhů proteinů byla vyhodnocena v databázi Uniprot.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

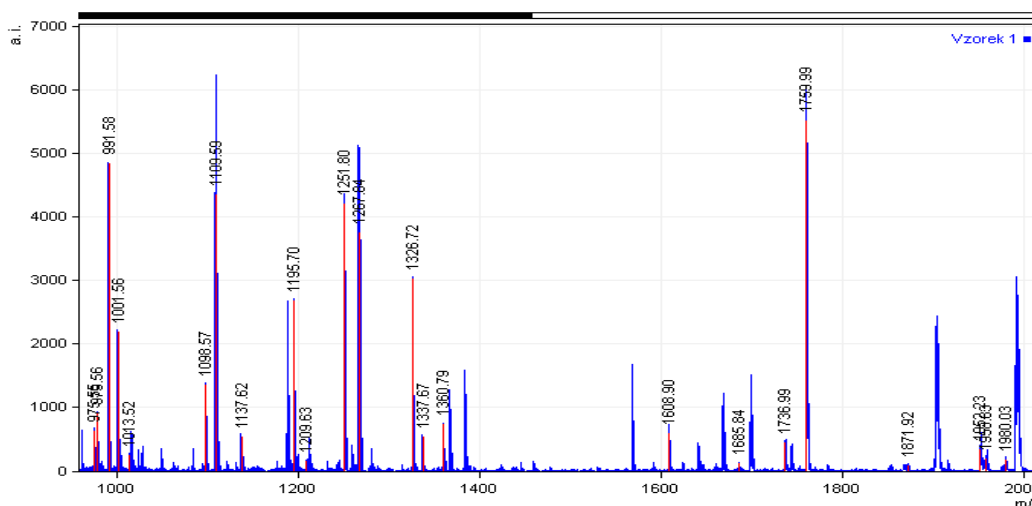
4.1 Analýza pšeničné kaše

Při analýze pšeničné kaše (vzorku 1) peptidovým mapováním byl získán seznam hodnot m/z píků peptidů, které se ve vzorku vyskytovaly nejčastěji. V obrázku číslo 6 jsou červeně vyznačeny peptidy pocházející z pšenice dvouzrnky. Peptidy byly identifikovány na základě databáze referenčních vzorků, která byla vytvořena v laboratoři hmotnostní spektrometrie na VŠCHT, a která obsahuje mimo jiné i peptidy pocházející z pšeničné mouky. Shoda našeho vzorku s databází pro pšeničné peptidy byla přibližně 45 %. Shoda s databází je vyjádřena jako poměr počtu shodných hodnot m/z peptidů nalezených v našem analyzovaném vzorku, které odpovídají hodnotám m/z pšeničných peptidů z databáze ku celkovému počtu hodnot m/z , které byly zjištěny ve vzorku.



Obrázek 6. Spektrum vzorku 1 (obilné kaše) s vyznačenými peptidy pocházejícími z pšenice dvouzrnky.

V obrázku číslo 7 jsou červeně vyznačeny peptidy pocházejících z mléčných bílkovin, které byly do vzorku přidány při přípravě ve formě kravského mléka (3.2.1). Shoda našeho vzorku s databází referenčních vzorků z VŠCHT byla asi 45 %.



Obrázek 7. Spektrum vzorku 1 (obilné kaše) s vyznačenými peptidy pocházejícími z mléka.

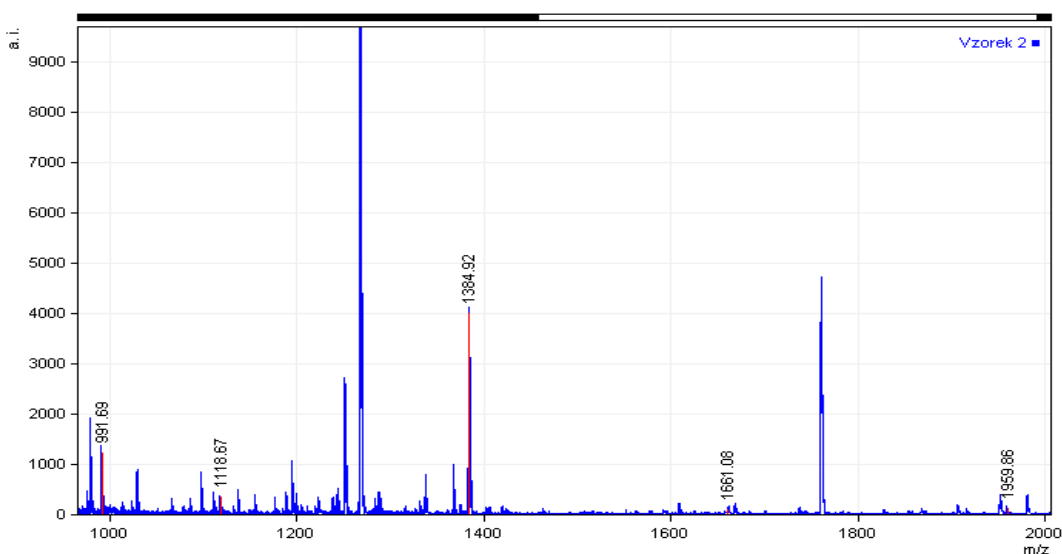
Analýza peptidových štěpů pomocí LC-MS/MS identifikovala konkrétní proteiny obsažené ve vzorku 1, které jsou uvedeny v tabulce V. Rozpoznané kaseiny (α -S1 kasein, α -S2 kasein) a laktoglobuliny (β -laktoglobulin) jsou mléčné proteiny. Amyláza (α -amyláza, β -amyláza) a gliadin (γ -gliadin) patří k proteinům pšenice.

Tabulka V. Identifikované proteiny obsažené v pšeničné kaši (vzorku 1) pomocí metody LC-MS.

Přístupový kód proteinů	Název proteinů	Mr (Da)	pI (pH)	Počet identifikovaných peptidů
CAS1_BOVIN	α -S1 kasein	24 513	4,7937	12
CAS2_BOVIN	α -S2 kasein	26 002	8,6591	11
LACB_BUBBU	β - laktoglobulin	18 255	4,6377	9
AMYB_WHEAT	β -amyláza	56 575	5,0832	4
CASK_BOVIN	K- kasein prekurzor	21 255	6,3558	4
LACB_BOVIN	β - laktoglobulin prekurzor	19 870	4,7373	4
IA03_WHEAT	α - amyláza	18 209	7,3244	1
GDB2_WHEAT	γ - gliadin prekurzor	37 098	7,5939	1

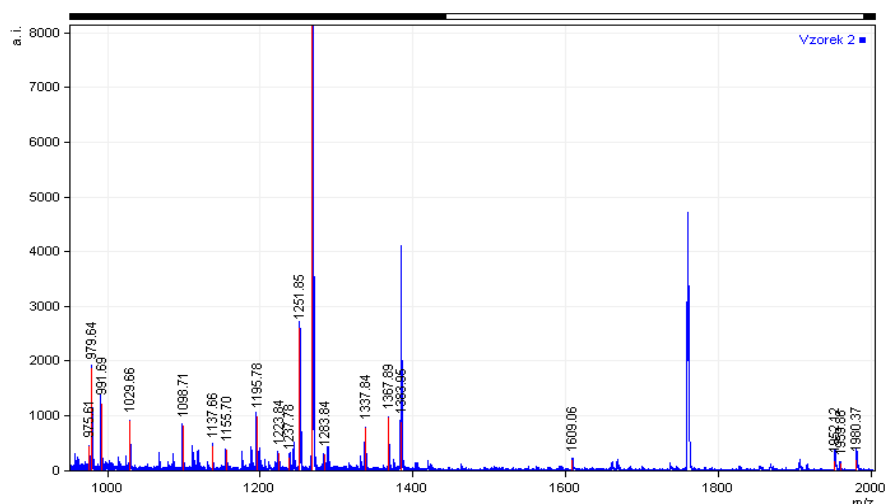
4.2 Analýza žitné kaše

Z rozboru žitné kaše (vzorku 2) metodou hmotnostní spektrometrie MALDI TOF se získal seznam hodnot m/z píků peptidů, které se ve vzorku vyskytovaly nejčastěji. Červeně vyznačené píky v obrázku 8 patří peptidům obilovin. Žito ozimé není dosud uvedeno v databázi VŠCHT, proto porovnání peptidů proběhlo proti pšeničné mouce, což vysvětluje nízkou shodu s obilnými proteiny, pouze 17 % vzorku 2, odpovídá dvěma peptidům pšeničné mouky.



Obrázek 8. Spektrum vzorku 2 (obilné kaše) s vyznačenými peptidy pocházejících z obilovin.

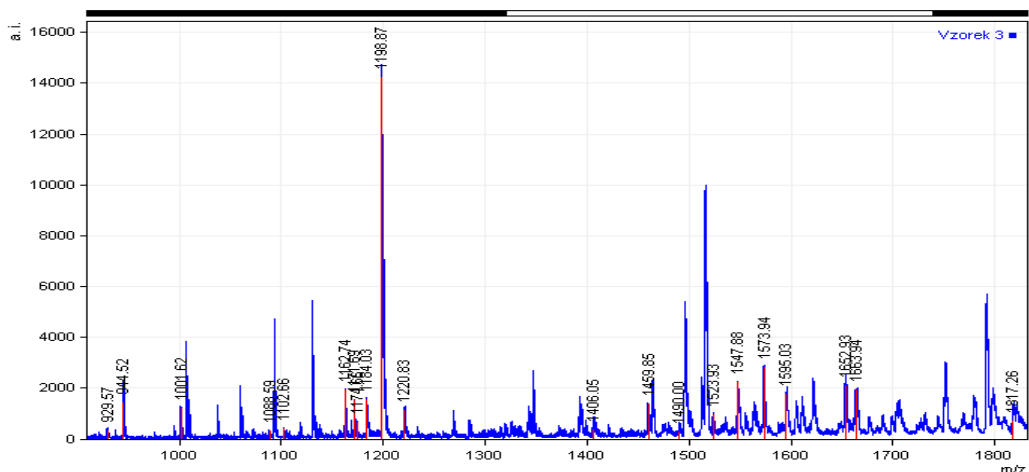
V hmotnostním spektru vzorku 2 jsou červeně vyznačené peptidy pocházející z mléčných bílkovin kravského mléka (obr. 9), které bylo do vzorku žitné kaše přidáno při její přípravě (3.2.2). Podařilo se přiřadit 50 % všech píků nalezených ve vzorku k hmotnostem peptidů pocházejících právě z mléčných bílkovin na základě shody jejich hodnot m/z s peptidy v databázi referenčních proteinových materiálů z VŠCHT.



Obrázek 9. Spektrum vzorku 2 (žitné kaše) s vyznačenými peptidy pocházejícími z mléka

4.3 Analýza drůbežního masa

Hmotnostní spektrometrií MALDI TOF se získal seznam hodnot m/z píků peptidů živočišného původu (vzorek 3). Červeně vyznačené píky v obrázku 10 odpovídají peptidům kolagenům z živočišných tkání. V databázi VŠCHT chybí peptidy drůbeže, což potvrzuje nízkou shodu výsledků našeho vzorku, pouze 36 %.



Obrázek 10. Spektrum vzorku 3 (drůbežního masa) s vyznačenými peptidy pocházejících z živočišných tkání.

Metodou peptidových štěpů pomocí LC-MS/MS, byly získány proteiny v tabulce VI. Tkáň z kuřecího masa obsahuje širokou škálu proteinů např. kreatinkinázy, kolageny, myosin, aktiny atd.

Tabulka VI. Konkrétní proteiny kuřete.

Přístupový kód proteinů	Název proteinů	Mr (Da)	pI (pH)	Počet identifikovaných peptidů
KCRM_CHICK	Kreatinkináza	43301	6,5327	18
CA21_CHICK	Kolagen α	129624	9,2347	14
MLE1_CHICK	Myosin izoforma A1	20683	4,7673	11
G3P_CHICK	Glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza	35550	8,7695	10
MLE3_CHICK	Myosin izoforma A2	16568	4,3079	5
ACTA_CHICK	α - aktin	41967	5,077	4
MYH3_CHICK	Myosin embryoni	222677	5,5173	9
MLRS_CHICK	Myosin regulátor	18625	4,5392	1
TRIF_CHICK	Troponin I	21090	9,6198	1
ENOB_CHICK	β - enoláza	47035	7,3643	1
MYSS_CHICK	Myosin adult	222874	5,4987	13
ALFC_CHICK	Fruktóza bisfosfát aldoláza	14429	6,1104	1
TPCS_CHICK	Troponin C	18232	3,8509	2
KAD1_CHICK	Adenylkináza	21669	8,944	1
TPIS_CHICK	Triózafosfát izomeráza	26472	6,8134	2

5 ZÁVĚR

Jedním z cílů této práce bylo zjistit pomocí literárních pramenů jakou potravu jedli první lidé v pravěku. Z nalezených pramenů byly vybrány recepty, které posloužily k přípravě modelových vzorků tří „pravěkých“ pokrmů. Tyto vzorky byly následně podrobeny rozborům moderními analytickými metodami, aby se zjistilo jejich proteinové složení. Cílem rovněž bylo doplnění referenční databáze historických proteinových materiálů na VŠCHT o nově připravené modelové vzorky.

V chemické laboratoři byly připraveny modelové vzorky dvou kaší – jedné z pšenice dvouzrnky, vody a mléka a druhé ze žita ozimého, vody a mléka. Po vysušení z nich byly odebrány vzorky, které v laboratoři hmotnostní spektrometrie na VŠCHT v Praze byly podrobeny analýze metodou peptidového mapování. Kromě obilných kaší byl připraven i vzorek živočišného původu – tkáň pečeného kuřecího masa. Metoda peptidového mapování identifikovala rostlinné a živočišné peptidy ve všech analyzovaných vzorcích. Peptidy byly identifikovány na základě databáze referenčních vzorků, která byla vytvořena v laboratoři hmotnostní spektrometrie na VŠCHT. Ve vzorku pšeničné kaše se peptidy pšenice i mléka shodovaly ve 45 % s referenčními vzorky obsaženými v databázi. Peptidy z žitné kaše se shodovaly s databází pouze v 17 % případů, protože žito v referenční databázi nebylo dosud zastoupeno. Porovnání peptidů z žita tak proběhlo pouze proti peptidům z pšeničné mouky, která obsahuje odlišné proteiny, což vysvětluje nízkou shodu při porovnávání obou druhů obilovin. Mléčné peptidy u žitné mouky byly ve výsledném spektru zastoupeny z 50 % (50% shoda s databází). Vzorek kuřecí tkáň se shodoval pouze z 36 % s kolagenními proteiny obsaženými v referenční databázi. I v tomto případě byla relativně nízká shoda výsledků zapříčiněna nedostatečně rozšířenou databází referenčních materiálů, kde se proto vzorek porovnával proti kolagenům hospodářských zvířat (prase domácí, tur domácí).

Část všech tří naštěpených vzorků trypsinem byla odeslána k rozboru metodou LC-MS/MS do Českých Budějovic na Jihočeskou univerzitu. Tato analýza identifikovala dokonce konkrétní proteiny pocházející z pšenice, žita, mléka a kuřete.

Analýzy hmotnostní spektrometrií pracujících na principu MALDI-TOF a pomocí LC-MS/MS jsou velice perspektivní a moderní způsoby odhalování bílkovinného složení různých typů materiálů, včetně potravinových zbytků nalezených při archeologických výzkumech, jak bylo prokázáno na připravených modelových vzorcích „pravěké“ potravy.

6 LITERATURA

1. Freedman, P.: Jídlo – dějiny chuti, Mladá Fronta, Praha 2008
2. Čapek, V., Pátek, J.: Světové dějiny I.: Dějiny lidských civilizací od pravěku do poloviny 17. století, Fortuna, Praha 1992
3. Vlček, E.: Dějiny pravěku a starověku I., Státní nakladatelství, Praha 1989
4. Beranová, M.: Jídlo a pití v pravěku a ve středověku, Academia, Praha 2007
5. Kolektiv autorů: Historie lidstva: Od doby ledové k civilizaci, Alpres, Frýdek Místek 2007
6. Wolf J.: Člověk a jeho pradějiny, Nakladatelství ARSCI, Praha 2006
7. Bouzek, J.: Pravěk českých zemí v evropském kontextu, Triton, Praha 2006
8. Popelka, M.: Dějepis pro gymnázia a střední školy: Pravěk a starověk, SPN, Praha 2008
9. Podborský, V.: Dějiny pravěku a rané doby dějinné, Masarykova Univerzita, Brno 1997
10. Příhoda, J., Skřivan P., Hrušková, M.: Cereální chemie a technologie I.: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin, vydavatelství VŠCHT, Praha 2003
11. Velíšek, J., Hajšlová, J.: Chemie potravin I., OSSIS, Tábor 2009
12. Káš, J., Kodíček, M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie, vydavatelství VŠCHT, Praha 2005
13. Kodíček, M.: Biochemické pojmy, výkladový slovník, vydavatelství VŠCHT, Praha 2004
14. Vondrážka, Z., Rauch, P., Káš, J.: Enzymologie, vydavatelství VŠCHT, Praha 1998
15. <http://www.millipore.com/catalogue/module/c5737> (20. 3. 2011)
16. <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php> (20. 3. 2011)
17. Havliš, J.: Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, Vesmír, 1999, 78, p. 448
18. Helán, V.: Analýza organických látek: Sborník přednášek z kurzu, 2 THETA, Český Těšín 2005

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

LC-MS/MS – Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionistaion - Time of Flight

ESI – elektrosprej

PMV – peptide mass fingerprinting