

Univerzita Karlova  
Pedagogická fakulta  
Katedra chemie a didaktiky chemie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Rozlišení živočišného původu masa na základě proteomické analýzy

Determination of animal meat origin by proteomic analysis

Iva Suchá

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.  
Studijní program: Specializace v pedagogice  
Studijní obor: B CH-M

2024

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Rozlišení živočišného původu masa na základě proteomické analýzy potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucí práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha 15.4.2024

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, vstřícnost a poskytnutí cenných rad při vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří i pracovníkům Laboratoře proteomické analýzy VŠCHT za pomoc a rady poskytnuté při realizaci této práce.

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá rozlišením živočišného původu masa na základě jeho proteomické analýzy. V teoretické části je nejprve popsáno chemické složení masa a příslušná legislativa pro maso a masné výrobky, načež jsou popsány analytické metody využívané pro rozlišení živočišného původu masa, potažmo pro odhalování jeho falšování. V experimentální části se jedna z těchto metod využívá, konkrétně se jedná o hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF. Cílem práce bylo, s využitím této metody, nalézt unikátní  $m/z$  hodnoty pro zkoumané druhy masa ve třech typech úprav (syrové, pečené, pečené se solí) a na jejich základě druhy mas od sebe rozlišit. Analyzováno bylo maso z prasete domácího (*Sus scrofa domestica*), tura domácího (*Bos primigenius taurus*), kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), krůty domácí (*Meleagris gallopavo domestica*), králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), jelena siky (*Cervus nippon*), kachny domácí (*Anas platyrhynchos domesticus*) a z tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*). Kromě druhového rozlišení masa bylo zkoumáno, jestli je možné od sebe rozlišit různé způsoby úpravy masa (syrové, pečené, pečené se solí) a rozlišit druhový původ mas bez ohledu na jejich úpravu, vše na základě nalezených unikátních  $m/z$  hodnot. Vytyčené cíle byly naplněny až na rozlišení kachního masa bez ohledu na úpravu. V tomto případě se nepodařilo nalézt unikátní hodnoty  $m/z$ .

## KLÍČOVÁ SLOVA

Maso, hmotnostní spektrometrie, proteiny

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis deals with distinguishing the animal origin of meat based on its proteomic analysis. The theoretical part first describes the chemical composition of meat and the relevant legislation for meat and meat products, followed by a description of the analytical methods used to distinguish the animal origin of the meat, i.e. to detect its adulteration. In the experimental part, one of these methods is used, namely MALDI-TOF mass spectrometry. The goal of the work was, using this method, to find unique  $m/z$  values for the examined types of meat, in three types of preparation (raw, baked, baked with salt), and on their basis to distinguish the types of meat from each other. Meat from domestic pig (*Sus scrofa domestica*), domestic tour (*Bos primigenius taurus*), domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*), domestic turkey (*Meleagris gallopovo domestica*), domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), sika deer (*Cervus nippon*), domestic ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*) and from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was analyzed. In addition to the species distinction of meat, it was investigated whether it is possible to distinguish different methods of meat preparation (raw, baked, baked with salt) and to distinguish the species origin of meats regardless of their preparation, all on the basis of the unique  $m/z$  values found. The set targets were met except for the distinction of duck meat regardless of treatment. In this case, it was not possible to find unique  $m/z$  values.

## **KEYWORDS**

Meat, mass spectrometry, proteins,

## Obsah

Úvod .....	7
1 Teoretická část .....	8
1.1 Maso v lidské stravě a legislativa .....	8
1.2 Složení masa .....	12
1.2.1 Proteiny .....	13
1.2.2 Lipidy .....	17
1.2.3 Další složky .....	18
1.3 Druhy masa .....	20
1.4 Zpracování masa .....	22
1.5 Falšování masa.....	23
1.6 Analytické metody využívané pro odhalování falšování masa .....	25
1.6.1 Elektroforézní metody .....	26
1.6.2 Imunologické metody .....	27
1.6.3 Analýza DNA .....	28
1.6.4 Spektroskopické metody .....	29
1.6.5 Chromatografické metody .....	29
1.6.6 Hmotnostní spektrometrie .....	30
2 Experimentální část.....	33
2.1 Materiál a metody .....	33
3 Výsledky a diskuse .....	40
3.1 Rozlišení masa bez ohledu na úpravu.....	40
3.2 Rozlišení masa s ohledem na úpravu.....	42
3.2.1 Syrové maso .....	42
3.2.2 Pečené maso .....	43
3.2.3 Pečené maso se solí .....	44
3.2.4 Tepelně stabilní hodnoty $m/z$ .....	45
3.2.5 Využití .....	46
3.3 Rozlišení masa na základě druhu úpravy.....	47
Závěr.....	50
Seznam použitých zkratk .....	51
Seznam použitých zdrojů.....	53

## Úvod

Čížková *et al.* (2012) uvádí, že maso, potažmo masné výrobky, podléhají častému falšování. Spotřebitelé tak jsou při nákupu těchto produktů klamáni ze strany výrobce. Což jim může způsobit i zdravotní problémy. Pro odhalení falšování a pro zajištění bezpečnosti potravin je využíváno analytických metod. Jmenovitě se jedná o elektroforézní, imunologické a chromatografické metody. Dále jsou využívány metody založené na analýze DNA a využívána je také hmotnostní spektrometrie, např. MALDI-TOF<sup>1</sup>. Právě hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla využita k naplnění cílů této bakalářské práce.

V první části této práci se pojednává o mase, jeho chemickém složení a legislativě, která ho upravuje. Zároveň jsou v práci popsány analytické metody zmíněné výše, tedy metody využívané pro odhalování falšování masa, potažmo masných výrobků.

V bakalářské práci byly analyzovány různé druhy masa, a to ve třech formách. Jednalo se o syrové maso, pečené maso a pečené maso se solí. Mezi rozlišované druhy masa patřilo maso z prasete domácího (*Sus scrofa domestica*), tura domácího (*Bos primigenius taurus*), kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), krůty domácí (*Meleagris gallopavo domestica*), králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*), jelena siky (*Cervus nippon*) a kachny domácí (*Anas platyrhynchos domesticus*). Cílem práce bylo nalezení unikátních hodnot  $m/z$  pro zkoumané druhy masa, ty pak pomocí nalezených hodnot  $m/z$  od sebe rozlišit, a to bez ohledu na jejich úpravu (syrové, pečené, pečené se solí) a posléze s ohledem na úpravu. Dalším cílem bylo rozlišení typu úpravy, kterému bylo maso podrobeno.

Unikátní  $m/z$  hodnoty, tzv. biomarkery, slouží nejen k identifikaci masa, ale mohou být užitečné i k odhalování jeho falšování.

---

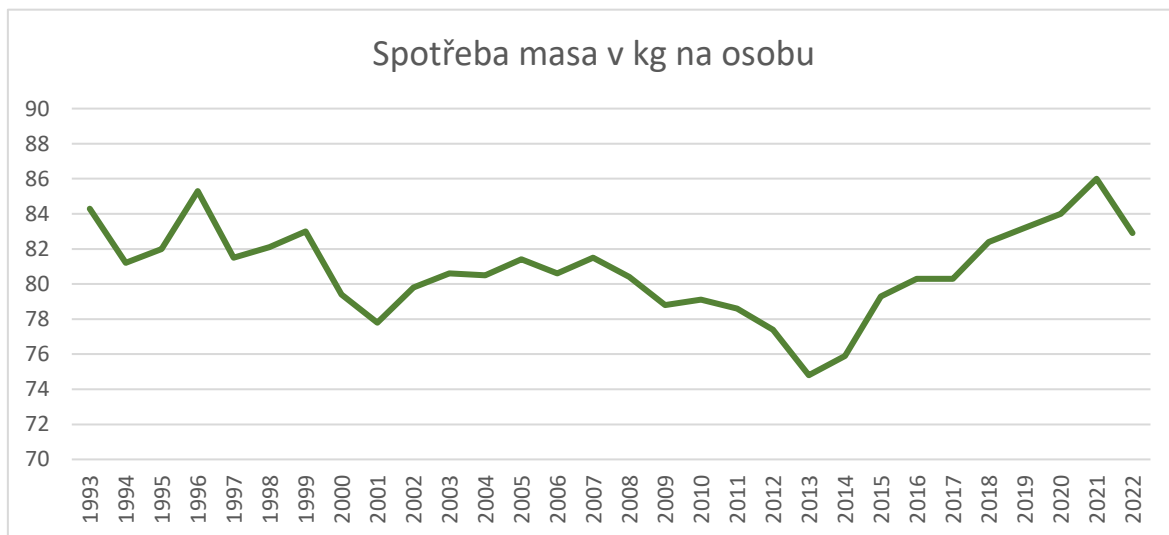
<sup>1</sup> Matrix assisted laser ionization/desorption time-of-flight; Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu

# 1 Teoretická část

## 1.1 Maso v lidské stravě a legislativa

Maso, jakožto jedna z prominentních složek lidské stravy, je definováno jako všechny požitelné části zvířat získané především z porážky skotu, prasat, hovězího dobytka a drůbeže. Maso lze i získat od farmové zvěře či volně žijící zvěře (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 853/2004, 2004). Maso je významná potravinová složka v oblasti získávání energie a živin, protože je bohaté na bílkoviny, tuky a určité minerály. Jeho důležitost spočívá i ve správném vývoji mozku (Ahmad *et al.*, 2018). V posledních letech jeho spotřeba stabilně vzrůstá jak v České republice, tak i v Evropské unii či v některých dalších zemích světa. Například v USA je spotřeba masa téměř až dvakrát vyšší nežli v Evropské unii (Daniel *et al.*, 2011; Whitton *et al.*, 2021). V současné době je průměrná roční spotřeba masa na osobu 82,9 kg (obrázek 1). Tento fakt může být z jedním z důvodů pro falšování masa a produktů z něj vyrobených. Falšováním se zabývají následující kapitoly.

**Obrázek 1:** Spotřeba masa v ČR za jeden rok v rozmezí let 1993-2022



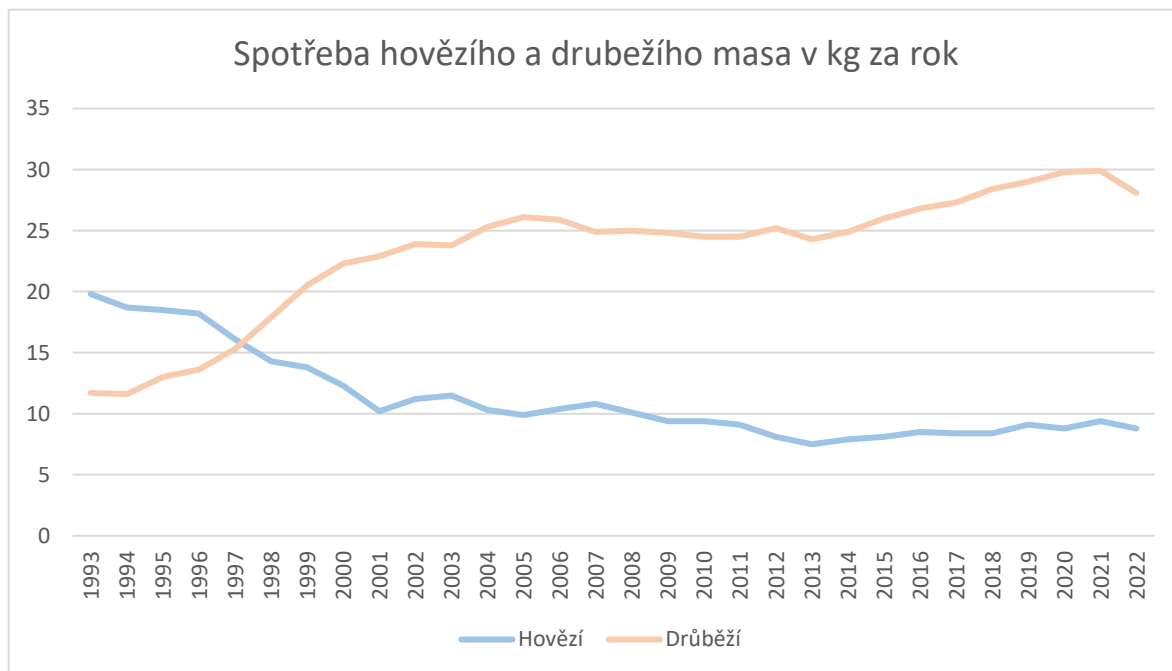
Zdroj: (Český statistický úřad, 2023)

Podobně se lze zabývat spotřebou masa podle jeho druhů, kde nejvíce konzumovaným druhem masa je vepřové maso. V roce 2022 byla v České republice jeho roční spotřeba 43,9 kg na osobu. Oproti tomu hovězího masa bylo ve stejném roce spotřebováno jen 8,8 kg na osobu. Druhým nejvíce zastoupeným druhem masa je drůbež, kde jeho roční spotřeba je 28,1 kg (Český statistický úřad, 2023).



Spotřeba hovězího masa dle ČSÚ (2023) od roku 1993 každým rokem klesá, naproti tomu spotřeba drůbežního každým rokem roste, viz obrázek. 2, jedinou výjimkou je rok 2022. Možným aspektem je cena, kdy dle FAO<sup>2</sup> (n. d.) byla v roce 2023 průměrná cena za tunu hovězího masa 8748 dolarů a za tunu drůbežního masa byla 1251 dolarů. Cena se odvíjí od nákladnější produkce hovězího masa a názoru spotřebitelů, kteří považují kuřecí maso za zdravější variantu (Warriss, 2000). Podobný trend lze sledovat i v USA, kde každoroční spotřeba kuřecího masa roste a hovězího mírně klesá (Daniel *et al.*, 2011). Stejné údaje uvádí i Whitton *et al.* (2021), a to že ve většině sledovaných zemí dochází k zvyšování spotřeby masa kuřecího a v polovině sledovaných zemí se jeho spotřeba více než zdvojnásobila, zatímco došlo k mírnému poklesu spotřeby masa hovězího. Nicméně i tak se celková spotřeba masa zvyšuje napříč zeměmi.

**Obrázek 2:** Spotřeba hovězího a drůbežního masa za jeden rok v ČR v rozmezí let 1993-2022



Zdroj: (Český statistický úřad, 2023)

<sup>2</sup> Food Agriculture Organization of the United Nations

## Legislativa

Aby bylo možné zabývat se falšováním masa a masných výrobků, je nutné vědět, jaké druhy masa a masných výrobků jsou a jaké požadavky musejí splňovat pro jejich uvedení na trh. Současně je také třeba vymezit samotné falšování. V tomto směru je nutné uvést, že česká legislativa pojem ‘falšování’ či dokonce ‘falšovaná potravina’ přímo nedefinuje. V zákoně o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., (1997) je dle § 10 zakázáno uvádět potraviny klamavě označené, neznámého původu nebo obsahující látky v rozporu s požadavky na složení, což dále upřesňuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 (2011). Tento dokument v článku 7 kapitoly III uvádí, že informace o potravinách nesmějí být pro spotřebitele zavádějící s ohledem na deset aspektů, jmenovitě „povahu, totožnost, vlastnosti, složení, množství, trvanlivost, zemi původu nebo místo provenience, způsob výroby nebo získání.“ Na národní úrovni toto nařízení dále specifikuje i vyhláška č. 417/2016 Sb. (2016), kde jsou uvedeny tuzemské výjimky pro zavádějící informace.

V České republice konkrétní požadavky pro maso a masné výrobky dále upravuje vyhláška Ministerstva zemědělství číslo 69/2016 Sb. (2016), ve které je zaveden způsob členění masa na druhy a skupiny. S výjimkou neděleného a děleného jatečně upraveného těla drůbeže je maso rozděleno na následující skupiny: výsekové maso, kosti, krev, droby, syrové sádlo, mleté maso, maso zvěře ve farmovém chovu a zvěřinu. Tyto skupiny jsou dále ve stejné vyhlášce definovány. Mezi nejdůležitější skupiny, pro účely této práce, patří výsekové maso, které je podle výše zmíněné vyhlášky definováno jako „maso rozbourané, určené k uvádění na trh“, což je běžně prodejné maso v různých technologických celcích. Dále se zde definuje maso zvěře ve farmovém chovu a zvěřiny. Tyto dvě skupiny se liší pouze v tom, že maso zvěřiny pochází ze zvěře volně žijící, zatímco maso z druhé skupiny pochází ze zvěře chované na farmách, o které živočišně druhy se v těchto dvou případech konkrétně jedná, je zmíněno níže. Poslední skupinou, kterou je vhodné zmínit, je mleté maso, které není blíže přiblíženo ve zmíněné vyhlášce. Nicméně tato vyhláška odkazuje na nařízení Evropského parlamentu č. 853/2004, (2004), kde toto vymezení přítomno je. Dle něj je mleté maso vymezeno následovně: „Mletým masem se rozumí vykostěné maso, které bylo rozmělněno a obsahuje méně než 1 % soli.“

Maso je také dle vyhlášky 69/2016 Sb. (2016) zařazováno do skupin podle druhu zvířete, ze kterého musí pocházet, aby mohlo být tímto způsobem označeno. Nejčastěji se jedná o maso hovězí, vepřové, králičí, telecí či skopové, ale dají se sem zařadit i méně běžné druhy, např.

hřiběcí, koňské či kůzlečí anebo kozí maso, viz tabulka 1. Tatáž vyhláška označuje rovněž živočišné druhy u zvěřiny a zvěře z farmového chovu. Řadí mezi ně daněk, srnec, prase divoké, zajíc, bažant, kachna divoká, husa divoká a křepelka.

Mezi konzumované druhy masa patří dále i maso drůbeží, které ale není výše uvedenou vyhláškou upřesněno. Toto upřesnění poskytuje až Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 (2013). Do kategorie drůbežního masa se v tomto dokumentu začleňuje maso z pěti zvířecích druhů, přesněji z – kura domácího, kachny, husy, krůty a perličky.

**Tabulka 1: Označení masa podle živočišného druhu a věku porážky**

Označení masa podle živočišného druhu	Kategorie zvířat, ze které musí maso pocházet
Hovězí maso	Maso mladého býka, býka, jalovice, volka, krávy
Vepřové maso	Maso prasat určených k výkrmu, maso prasnic, maso selat
Telecí maso	Maso skotu mladšího dvanácti měsíců
Skopové maso	Maso ovcí
Jehněčí maso	Maso jehňat ve věku nejvýše dvanácti měsíců
Králičí maso	Maso králíků
Kůzlečí maso	Maso kůzlat ve stáří nejvýše dvanácti měsíců
Hřiběcí maso	Maso hřibat ve stáří nejvýše osmnácti měsíců
Koňské maso	Maso koní

Zdroj: (Vyhláška č. 69/2016 Sb.,2016); (Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1308/2013, 2013)

Kromě masa je v rámci autentizace jeho složení a původu důležité vymezit i masné výrobky a masné polotovary, které jsou produkty masného průmyslu, kde hlavní výrobní surovinou je maso. Masné výrobky jsou upraveny v nařízení Evropského Parlamentu a Rady č. 853/2004 (2004). Uvádí se zde, že „masnými výrobky se rozumějí zpracované výrobky získané zpracováním masa nebo dalším zpracováním takto zpracovaných výrobků, takže z řezné plochy je zřejmé, že produkt pozbyl znaků charakteristických pro čerstvé maso.“ Čerstvé maso je následně podle téhož nařízení rozuměno jako „maso, k jehož uchování nebylo použito jiného ošetření než chlazení, zmrazení nebo rychlého zmrazení.“ Masné výrobky i masné polotovary jsou podle vyhlášky 69/2016 Sb. (2016) děleny na dvě skupiny – na masné výrobky a masné polotovary. Do skupiny masných výrobků se dle zmíněné vyhlášky zařazují např. tepelně opracované, tepelně neopracované, tepelně opracované pro tepelnou úpravu, trvanlivý tepelně upravovaný, trvanlivý fermentovaný, konzervy a polokonzervy a další. Jejich definice, dle vyhlášky 69/2016 Sb., jsou uvedeny v tabulce 2. Do zvláštní skupiny zmíněné nařízení následně člení masné polotovary, které jsou méně

opracovanými produkty než masné výrobky. „Masnými polotovary se rozumí čerstvé maso, včetně rozmělněného masa, ke kterému byly přidány potraviny, koření nebo přídavné látky anebo které bylo podrobeno ošetření, jež nestačí ke změně vnitřní struktury svalových vláken masa, a tím i k vymizení vlastností čerstvého masa.“ Zde může vzniknout problém s označováním mletého masa, kdy podle výše zmíněných vyhlášek a nařízení je za mleté maso možné označit pouze rozmělněné maso s přídavkem soli menším než 1 %. V případě, že k rozmělněnému masu bylo přidáno koření či další látky, je nutné výrobek označit jako masný polotvar.

**Tabulka 2:** *Definice masných výrobků*

Masný výrobek	Definice podle vyhlášky č. 69/2016 Sb.
Tepelně opracovaný	Masný výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut.
Tepelně neopracovaný	Masný výrobek, u kterého neproběhlo ve všech částech tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut.
Tepelně neopracovaný určený pro tepelnou úpravu	Masný výrobek určený ke kuchyňské úpravě, u kterého neproběhlo ve všech částech tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut.
Trvanlivý tepelně opracovaný	Masný výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut a došlo k technologickému opracování za definovaných podmínek.
Trvanlivý fermentovaný	Masný výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého proběhla fermentace.
Konzerva	Výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, sterilizovaný.
Polokonzerva	Výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, pasterizovaný.

Zdroj: (Vyhláška č. 69/2016 Sb., 2016)

## 1.2 Složení masa

Kvalita masa jakožto svalové tkáně zvířat závisí na vícero různých faktorech, například na věku či druhu zvířete anebo k jakému typu úkonů byla svalová tkáň určena. Složení masa je u zvířete určováno po proběhnutí *rigor mortis*<sup>3</sup>, ale dříve, nežli dojde k jeho degenerativním změnám *post mortem*<sup>4</sup>. Jednoduchým způsobem lze složení masa rozdělit do několika skupin látek, jako například na: proteiny, lipidy, vodu a další složky (vitamíny, minerály apod.).

<sup>3</sup> posmrtná ztuhlost

<sup>4</sup> posmrtné změny

Největší podíl masa tvoří voda, a to přibližně z 75 %. Proteiny tvoří okolo 19 % a lipidy tvoří 2,5 %, viz tabulka 3. Nicméně, jak uvádí Lawrie (2006), jde spíše o orientační složení.

**Tabulka 3:** *Orientační složení masa*

Látka	Složení	Obsah
Voda		75 %
Proteiny	Myofibrilární <ul style="list-style-type: none"> <li>• Myosin<sup>5</sup></li> <li>• Aktin<sup>5</sup></li> <li>• Tropomyosin</li> <li>• Titin (connectin)</li> <li>• Troponin</li> <li>• Nebulin</li> </ul>	19 %
	Sarkoplasmatické <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glycerinaldehyd fosfát dehydrogenáza</li> <li>• Myoglobin</li> <li>• Hemoglobin</li> </ul>	
	Pojivová tkáň <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolagen</li> <li>• Elastin</li> </ul>	
Lipidy	Fosfolipidy	2,5 %
	Triacylglyceroly	
	Mastné kyseliny	
Sacharidy a další sloučeniny	Kyselina mléčná	1,2 %
	Glukosa-6-fosfát	
	Glykogen	
Minerály	Fe, K, Na, P, Zn	< 1 %
Vitamíny	A, D, E, B-komplex	< 1 %

Zdroj: (Lawrie, 2006; Steinhauser, 2000; Velišek, 2014)

Přestože svalovina obsahuje esenciální mastné kyseliny a vitamíny, sama o sobě není jejich hlavním zdrojem v těle zvířete. Mnohem bohatším zdrojem jsou vnitřnosti. Například játra obsahují značné množství vitamínu A, zatímco svalovina je bohatá na esenciální aminokyseliny a některé minerály (Lawrie, 2006).

### 1.2.1 Proteiny

Po vodě jsou druhou nejvíce zastoupenou složkou v mase proteiny, jejichž kvalita se určuje nejen podle složení obsažených aminokyselin, ale i podle jejich dostupnosti při trávení (Bhat *et al.*, 2021a). Také se u nich hovoří o nutriční důležitosti, která je určovaná podle

<sup>5</sup> Post mortem se z aktinu a myosinu ve svalovině tvoří komplex aktomyosinu

požadovaného příjmu dusíku a esenciálních aminokyselin (viz níže), v závislosti na ostatních přijímaných živinách a individuálních potřebách člověka a jeho parametrech, jako např. tělesné váze, věku a pohlaví. Tělo posléze esenciální aminokyseliny používá podle své potřeby k syntéze dalších aminokyselin (Velíšek, 2014). Pokud by tělo mělo esenciálních aminokyselin nedostatek, mohlo by docházet k poruchám ústřední nervové soustavy, atrofii svalstva nebo k zpomalení růstu. Ve stravě poskytují největší obsah dusíku a umožňují např. výstavbu a obnovu tkání. Nicméně je nutno dodat, že byť teoretický energetický zisk z proteinů je v podobné výši jako u např. sacharidů (přibližně 4 kcal), proteiny nejsou stejně vhodné jako zdroj energie. Důvodem je to, že u nich oproti sacharidům dochází k větší zátěži organismu při procesu trávení (Odstrčil & Odstrčilová, 2006).

Svalové proteiny tvoří z celkového objemu svaloviny okolo 19 %. Ty se následně dělí na sarkoplasmatické (rozpuštěné ve vodě a slabých solných roztocích), myofibrilární (rozpuštěné pouze v solných roztocích) a na pojivové tkáně, které se při nízkých teplotách ve vodě ani v solných roztocích nerozpouštějí (Lawrie, 2006; Velíšek, 2014). Myofibrilární společně se sarkoplasmatickými proteiny se dají nazvat plnohodnotnými proteiny. Na druhou stranu, proteiny obsažené v pojivové tkáni nenabízejí velkou nutriční hodnotu, protože jsou téměř nestravitelné (Velíšek, 2014).

Myofibrilární proteiny, jichž je více než 20, z největší části tvoří myosin, aktin, titin, tropomyosin, troponin a nebulin, a to až z 90 %. Myosin, zaujímající asi 29 % obsahu všech myofibrilárních proteinů, společně s aktinem umožňuje kontrakci svaloviny. Proces této kontrakce je spuštěn uvolněním vápenatých iontů ze sarkoplasmatického retikula. Ionty se následně naváží na troponin, kde změní jeho „tvar molekuly“, což později způsobí změny i u tropomyosinu a aktinu. Aktin pak reaguje s myosinem a společně vytvoří aktomyosin, který ve svalu způsobuje zkrácení sarkomu, a tím dochází ke svalové kontrakci. Pro relaxaci svalu je důležitý i ATP (adenosintrifosfát), který disociuje komplex aktomyosinu na aktin a na komplex myosin-ATP. Ten je hydrolyzován na myosin, ADP (adenosindifosfát) a anorganický fosfát (Velíšek, 2014). Ke svalovým kontrakcím dochází u zvířete rovněž i *post mortem* vzhledem k uvolňování vápenatých iontů ze sarkoplasmatického retikula. Nicméně už není k dispozici ATP na disociaci aktomyosinu a sval zůstává v kontrakci, což vede ke stavu, který je nazývaný jako *rigor mortis* (Lawrie, 2006).

Mezi sarkoplasmatické proteiny se řadí především myoglobin a hemoglobin, které mají transportní funkci (Steinhauser, 2000). Myoglobin transportuje především kyslík a např.

v tělech vodních savců, kde je jeho obsah až desetkrát vyšší než u jiných savců, myoglobin funguje i jako zásobník kyslíku (Velíšek, 2014).

Třetím obsaženým typem proteinů jsou proteiny pojivové tkáně neboli stromatické proteiny. Ty nejčastěji tvoří vazivo, chrupavky či šlachy. Jedná se především o kolagen a elastin, které ale nemají vysokou nutriční hodnotu. Také se jedná o neplnohodnotné proteiny kvůli absenci tryptofanu a specifické proteiny s ohledem na vlastnosti. Např. při jejich zahřívání ve vodě přechází na želatinu, jež se uplatňuje i v masné výrobě (Steinhauser, 2000).

Z proteinů vyskytujících se ve svalovině zvířat je možno získat všechny esenciální aminokyseliny, jedná se o isoleucin (Ile), leucin (Leu), lysin (Lys), metionin (Met), fenylalanin (Phe), threonin (Thr), tryptofan (Trp) a valin (Val), což jsou takové aminokyseliny, které lidské tělo nedokáže získat jiným způsobem nežli potravou (Ahmad *et al.*, 2018; Steinhauser, 2000). Takové proteiny se také nazývají plnohodnotné anebo proteiny zvířecího původu. Důvodem je, že proteiny pocházející z rostlinných zdrojů někdy postrádají jednu či více z esenciálních aminokyselin (Velíšek, 2014).

Ve svalovině se však nevyskytují pouze proteiny obsahující aminokyseliny esenciální, ale i neesenciální, zde se jedná o kyselinu asparagovou (Asp), asparagin (Asn), kyselinu glutamovou (Glu), glutamin (Gln), glycin (Gly), cystein (Cys), prolin (Pro), serin (Ser), tyrosin (Tyr) a alanin (Ala). V některých případech může nastat situace, že jsou všechny esenciální aminokyseliny obsaženy, ale vyskytují se v malém množství. Takové aminokyseliny se nazývají limitující, protože posléze limitují využití ostatních aminokyselin, které se jinak vyskytovaly v dostatečném množství, viz tabulka 4 (Lawrie, 2006; Velíšek, 2014).

V mase se vyskytují i arginin (Arg) a histidin (His), ale ty se zvlášť vyčleňují do vlastní kategorie semi-esenciálních aminokyselin. Důvodem je, že tyto aminokyseliny jsou pro dospělého člověka neesenciální, jejich tělo je dokáže samo syntetizovat, ale pro např. kojence, kvůli jejich rychlému růstu, jsou tyto aminokyseliny esenciální, protože je jejich tělo nedokáže syntetizovat v dostatečném množství (Velíšek, 2014). V různých svalových tkáních se může nacházet odlišné množství aminokyselin v závislosti na zvířecím druhu, viz tabulka 4.

**Tabulka 4: Obsah aminokyselin v hovězím, vepřovém, kuřecím a rybím masu**

Aminokyseliny (v g na 16 g dusíku)	Hovězí	Vepřové	Kuřecí	Ryba
Ala	5,8	5,5	3,4	6,0
Arg	6,3	6,4	5,6	5,7
Asx <sup>6</sup>	9,0	8,9	9,2	10,4
Cys	1,3	1,1	1,3	1,2
Glx <sup>7</sup>	15,3	14,5	15,0	14,1
Gly	4,9	5,7	5,3	4,8
His	3,4	3,3	2,6	3,5
Ile	4,8	5,1	5,3	4,8
Leu	8,1	7,6	7,4	7,7
Lys	8,9	8,1	8,0	9,1
Met	2,7	2,7	2,5	2,9
Phe	4,4	4,2	4,0	3,9
Pro	3,8	4,6	4,1	3,7
Ser	4,0	4,2	3,9	4,3
Thr	4,6	4,9	4,0	4,6
Trp	1,1	1,4	1,0	0,6
Tyr	3,6	3,6	3,3	3,7
Val	5,0	5,2	5,1	6,1
Celkové EAK <sup>8</sup>	44,5	43,8	41,9	45,0
Celkové AK <sup>9</sup>	97,0	96,8	91,0	97,5
Limitující AK	Val	Ser	Trp	Trp

Zdroj: (Velíšek, 2014)

Obsah aminokyselin se může lišit v i rámci stejného zvířete. Příkladem mohou být údaje uvedené v tabulce 5, kde se nacházejí rozdílné obsahy tryptofanu a lysinu v různých svalech prasete. Obsah aminokyselin zůstává stejný s minimálními odchylkami, pokud se nejedná o extrémní podmínky, kdy je maso vystaveno například vysoké teplotě po dlouhou dobu nebo je uzeno či je k němu přidána sůl. Poté je možné, že aminokyseliny budou v masu nedetekovatelné (Lawrie, 2006).

<sup>6</sup> V citované literatuře se uvádí kyselina asparagová a asparagin v součtu společně.

<sup>7</sup> V citované literatuře se uvádí kyselina glutamová a glutamin v součtu společně.

<sup>8</sup> Esenciální aminokyseliny

<sup>9</sup> Aminokyseliny



**Tabulka 5: Obsah tryptofanu a lysinu v různých svalech prasete**

Typ svalu	Tryptofan [mg/g]	Lysin [mg/g]
Sval zádový (obratle 4-6); ( <i>L. dorsi lumbar</i> )	0,015	0,089
Sval zádový (obratle 13-15); ( <i>L. dorsi thoracic</i> )	0,012	0,078
Sval zádový (obratle 8-12); ( <i>L. dorsi thoracic</i> )	0,018	0,061
Sval poloblantý; ( <i>musculus semimembraneus</i> )	0,015	0,083
Nadhřebenový sval; ( <i>musculus supraspinatus</i> )	0,021	0,071

Zdroj: (Lawrie, 2006)

### 1.2.2 Lipidy

Lipidy jsou tvořeny širokou škálou sloučenin, za jejichž společného jmenovatele lze považovat jejich nerozpustnost ve vodě a vysokou rozpustnost v organických rozpouštědlech. Lipidy jsou nejlepším zdrojem energie překonávající tu, kterou mohou poskytnout sacharidy nebo proteiny, a to více než dvojnásobně (Warriss, 2000). V lidském těle se tuk ukládá do tukových tkání a v některých orgánech, kde pak slouží jako zásoba energie, která by člověku stačila na několik měsíců. Zároveň slouží jako ochrana orgánů hlavně se jedná o srdce a ledviny a dále také poskytuje tepelnou izolaci (Ahmad *et al.*, 2018). Příjem tuků by měl v ideálním případě tvořit více než 20 % podílu ve stravě, ale zároveň nepřesahovat 30 % podílu. V případě nedostatku by mohlo docházet k neúměrnému příjmu např. lipofilních vitamínů či esenciálních mastných kyselin. Avšak ve vyspělých zemích spíše dochází k nadměře příjmu tuků, což může vést k nadměrné obezitě či nadváze (Odstrčil & Odstrčilová, 2006).

Téměř celý obsah tuků v mase se skládá z esterů mastných kyselin a glycerolu (triacylglycerolu). Zbylý obsah doplňují fosfolipidy a některé příbuzné látky (Lawrie, 2006). Nicméně pokud se mluví o obsahu tuku v mase, často se jedná o obsah všech výše zmíněných lipidů, nejen pouze triacylglycerolů, byť vytvářejí největší podíl z nich (Food Standards Agency, 2002). V tucích se vyskytují nejvíce následující čtyři typy mastných kyselin v detekovatelném množství. Jedná se o kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou, která se oproti ostatním jako jediná liší ve svém zastoupení v závislosti na druhu masa, viz tabulka č. 6 (Lawrie, 2006).

**Tabulka 6:** Složení mastných kyselin ve vybraných masech

Mastné kyseliny	Procentuální zastoupení		
	Hovězí	Jehněčí	Vepřové
Tuková tkáň			
Kyselina palmitová	26,1	21,9	23,9
Kyselina stearová	12,2	22,6	12,8
Kyselina olejová	35,3	28,7	35,8
Kyselina linolová	1,1	1,3	14,3
Svalová tkáň			
Kyselina palmitová	25	22,2	23,2
Kyselina stearová	13,4	18,1	12,2
Kyselina olejová	36,1	32,5	32,8
Kyselina linolová	2,4	2,7	14,2

Zdroj: (Lawrie, 2006)

### 1.2.3 Další složky

Kromě proteinů a lipidů maso obsahuje mimo jiné i sacharidy, vitamíny či různé minerály, jako je například železo, draslík, zinek anebo fosfor.

#### Sacharidy

Sacharidy jsou součástí extraktivních složek svaloviny. Název této skupiny látek je odvozen od extrahovatelnosti vodou. Jedná se o velmi nesourodou skupinu látek, co se chemického složení týče. Nicméně jedná se o důležitou skupinu pro vytváření specifické chuti masa a jeho aroma (Steinhauser, 2000).

Místem, kde se nachází největší koncentrace sacharidů, jsou játra zvířete, kde se nachází více než polovina z jejich celkového objemu, a následně ve svalovině. Sacharidy jsou u zvířat přítomny hlavně ve formě glykogenu a část z nich tvoří i glukosa, která je spíše rozpuštěna v krvi (Ahmad *et al.*, 2018). Ve svalovině je například uložen svalový glykogen, který poskytuje pohotovou energii pro okamžitý pohyb v případě nebezpečí, a zajišťuje tak rychlou reakci zvířete. V takovém případě se však jeho koncentrace v těchto svalech snižuje a následně je doplňován ze zásobního glykogenu jater (Hyypä *et al.*, 1997; Lawrie, 2006). U poraženého zvířete má vliv na vlastnosti a změny masa. Především se jedná o postmortální změny odehrávající se v mase. Glykogen se anaerobní glykolýzou přemění v kyselinu mléčnou, což má za následek snížení pH. To má v konečném důsledku vliv na zvýšení

trvanlivosti masa (Velíšek, 2014) a nepřímý vliv na jeho senzorycké vlastnosti. Mění například barvu, texturu, křehkost a také retenci vody (Ahmad *et al.*, 2018).

### Vitamíny

Vitamíny jsou nedílnou součástí lidské stravy, kterou je nutné přijímat z potravin, neboť tělo vitamíny nedokáže samo vyrobit. Jejich důležitost spočívá ve správném vývoji a růstu těla člověka, hlavně v jeho prvních letech (Ahmad *et al.*, 2018). Vitamíny vyskytující se ve svalové tkáni zvířat lze rozdělit na dvě skupiny, na rozpustné v tucích – A, D, E, a na rozpustné ve vodě – tzv. B-komplex vitamíny (neboli např. riboflavin (B<sub>1</sub>), tiamin (B<sub>2</sub>), kyselinu listovou (B<sub>9</sub>), vitamín B<sub>6</sub> a vitamín B<sub>12</sub>). Dále se ve svalové tkáni vyskytuje vitamín C, nicméně jen jako složka ve stopovém množství (Steinhauser, 2000).

Maso je z vyjmenovaných vitamínů nejbohatší na tzv. B-komplex vitamíny, kde např. ve vepřovém mase převládá vitamín B<sub>1</sub>, a to v daleko větším množství než jiné vitamíny v ostatních druzích masa. Dále nejvíce obsaženým vitamínem je vitamín B<sub>2</sub>, kde se jeho množství v hovězím a vepřovém mase příliš neodlišuje. V hovězím mase je oproti masu vepřovému stejný obsah vitamínů anebo obsahuje vitamínů méně kromě obsahu kyseliny listové (B<sub>9</sub>), viz tabulka 7 (Lawrie, 2006).

**Tabulka 7:** Obsah vitamínů v syrových masech

Vitamíny		Hovězí	Vepřové
A		Zbytkové množství	Zbytkové množství
B <sub>1</sub> (tiamin)	[mg]	0,07	1,0
B <sub>2</sub> (riboflavin)	[mg]	0,20	0,25
B <sub>9</sub> (kyselina listová)	[μg]	10	3
B <sub>6</sub>	[mg]	0,3	0,5
B <sub>12</sub>	[μg]	2	2
D		Zbytkové množství	Zbytkové množství

Zdroj: (Lawrie, 2006)

### Minerály

Minerály, ke kterým lze zařadit například železo, draslík nebo vápník, jsou významnou součástí jídelníčku. Nicméně ani je si nedokáže tělo samo vyrobit, a proto je nutné je přijímat z potravin jako vitamíny (Ahmad *et al.*, 2018). Minerály reagují s vodou a také mezi sebou a tím se snižuje jejich dostupnost pro lidské tělo (Velíšek, 2014). Kromě masa, které bylo upraveno (např. přidáním soli, kvůli čemuž obsahuje více sodíku), je v mase nejvíce se

vyskytujícím minerálem draslík, viz tabulka 8. Obsahy minerálů se s vařením masa též relativně zvyšují, nicméně to je zapříčiněno ztrátami vody (vlhkosti), viz tabulka 8 (Lawrie, 2006).

**Tabulka 8:** *Obsah minerálů v mase*

Druh masa	Minerály (mg/100 g)				
	Na	K	Fe	Zn	P
Syrové					
Hovězí	26	140	0,7	1,1	79
Vepřové	47	160	0,4	0,6	91
Vařené					
Hovězí	35	200	1,0	1,5	110
Vepřové	69	240	0,6	0,9	140

Zdroj: (Food Standards Agency, 2002)

### 1.3 Druhy masa

Maso lze dělit podle různých přístupů. Hlavním takovým přístupem je druhové odlišení masa, které je tím nejjednodušším a zároveň tím nejčastějším, se kterým se spotřebitelé setkávají. Toto rozlišení lze dále specifikovat, a to například určením plemene zvířete, věku zvířete, např. zda se jedná o maso hovězí či telecí, anebo určením konkrétní svalové tkáně, ze které maso pochází. Rozdíly mezi jednotlivými druhy masa případně mezi plemeny či svalovou tkání jsou reflektovány v např. v chemickém složení masa, které může být nadále ovlivňováno a pozměňováno i funkcí svalů, zdravím, parametry výživy anebo rozdílným zatížením. A právě toto složení lze následně analyzovat pro konkrétní určení druhu masa, popřípadě určení svalové tkáně apod. (Lawrie, 2006; Steinhauser, 2000). Druhovým rozlišením se zabývá i experimentální část této práce, ve které jsou zkoumané následující druhy masa – hovězí, jelení, kachní, králičí, krůtí, kuřecí, rybí a vepřové.

Maso lze i rámcově rozdělit na maso červené, které podle mezinárodní zdravotnické organizace (2015), anglicky World Health Organization (WHO), zahrnuje nejen maso hovězí, ale i vepřové, telecí, skopové, jehněčí, ovčí či také kozí, a dále na maso bílé, které dle De Smet & Vossen (2016) zahrnuje maso drůbeže, např. kuřecí, krůtí anebo kachní. Autoři vymezili hlavní rozdíly bílého a červeného masa, na základě kterých maso rozdělili, mezi ně zařadili vyšší obsah myoglobinu u červeného masa a zároveň vyšší obsah hemového železa (dvojmocného železa). Nicméně dále zmiňují, že přesná definice není stanovená a lze o zařazení jednotlivých druhů mas debatovat. Zde například Williams (2007) vepřové maso

nezařazuje mezi maso červené, ale mezi maso bílé. Bíle maso může zahrnovat i maso pocházející z ryb (Zhu *et al.*, 2015).

Červené maso je kromě zdroje proteinů také bohatým zdrojem vitamínů a minerálních látek. Dle Williamse (2007) patří k hojně zastoupeným mikroživinám například vitamíny ze skupiny B-komplex (zejména B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> a B<sub>12</sub>), kdežto u minerálních látek je to hlavně draslík, fosfor, zinek a železo<sup>10</sup>. Obdobnou charakteristikou se lze zabývat u konkrétních druhů, jako např. u hovězího, které je významnějším zdrojem železa, zinku a vitamínu K oproti jiným červeným masům (Kralík *et al.*, 2018). Zároveň je zařazováno mezi tučnější druhy, ač záleží i na volbě anatomické části zvířete. Pereira & Vicente (2013) například uvádí, že některé výsekové části tura domácího mohou mít obsah tuku kolem 11–18 % v případě hovězího boku anebo 10,3 % v případě roštěnce, který se řadí mezi části s největším obsahem tuku. Oproti nim má např. kýta poloviční obsah tuku dosahující přibližně 5 % (Steinhauser, 2000). Ve srovnání nejen s hovězím, ale i s jinými červenými masy, jako například s jehněčím, je vepřové maso výhodným zdrojem vápníku, fosforu a především draslíku (Kralík *et al.*, 2018). Lze také říci, že je oproti masu z hovězího dobytka bohatší na kyselinu linolovou, viz tabulka 6, což je látka, jež byla shledána prospěšnou pro stavbu buněčných stěn (Lawrie, 2006). Dále je vepřové maso společně s hovězím také zařazováno mezi tučnější masa, avšak vepřové je z těchto dvou tučnější a některé jeho výsekové části masa mohou být tvořeny až z 30 % tuky, jako například u kýty a pečeně (Steinhauser, 2000). Právě z tohoto důvodu, tedy vyššího obsahu tuků, je vepřové maso společně s hovězím spojováno se závažnými zdravotními riziky. Např. červené maso, a zvláště nadměrná konzumace masných výrobků z červeného masa, zvyšuje riziko karcinomu střev či konečníku, což je ohled, ve kterém bylo bílé maso hodnoceno lépe (Giromini & Givens, 2022).

Drůbeží maso, primárně kuřecí a krůtí, je také lépe hodnoceno s ohledem na poměr obsažených proteinů a tuků zejména v prsní části, ve které v průměru obsahují vyšší počet proteinů nežli tuků. Lze o nich tedy říci, že jsou ve srovnání s červenými masy libovější, a z tohoto důvodu jsou více využívány při redukčních dietách (Kralík *et al.*, 2018). Důležitá je však technologická úprava drůbežího masa vzhledem k tomu, že jeho kůže patří k jeho nejvíce tučným částem. Pokud kůže není odstraněna a maso je upravováno společně s ní, zvedá se obsah tuků na srovnatelnou úroveň s jinak tučnějšími druhy masa, jako např.

---

<sup>10</sup> Williams (2007) uvádí, že na 100 g červeného masa připadá asi 25 % RDI uvedených minerálů, kde RDI označuje denní doporučené dávky pro dospělého jedince.

s hovězím či vepřovým (Pereira & Vicente, 2013). Kralík *et al.* (2018) uvádí, že kuřecí maso nezravené kůže obsahuje někdy až 3krát více tuku než maso zbavené kůže. Dále uvádí, že kuřecí maso je výhodným zdrojem pro některé minerální látky, zejména hořčík, sodík a vápník, které však jsou v obdobné výši jako u masa vepřového. Zároveň je dobrým zdrojem niacinu (vitamín B<sub>3</sub>), kterého obsahuje skoro 2krát více než hovězí a vepřové maso, a při konzumaci 100 g kuřecího masa lze získat až 56 % jeho doporučené denní dávky (Kralík *et al.*, 2018; Pereira & Vicente, 2013). Z drůbežích mas je považováno maso kachní naopak jako jedno z tučnějších. Tuk představuje v průměru až 6,5 % celkového obsahu, což je ve srovnání s kuřecím a krůtím masem přibližně 2krát více. Také je oproti jiným drůbežím masům bohatší na železo, kde se svým obsahem více přibližuje masu hovězímu (Food Standards Agency, 2002).

Rybí maso se svým složením nejvíce vymyká dosud uvedeným druhům. Zatímco průměrný obsah vody u savců či drůbeže totiž dosahuje v průměru rozmezí 72 % až 75 %, u ryb často přesahuje i 80 % v závislosti na druhu. V tom se odráží i zastoupení proteinů, které je u ryb nižší nežli u jiných druhů – zatímco u ostatních druhů jsou proteiny průměrně obsaženy ve 21 % až 23 %, u ryb je to jen okolo 18 %, přičemž obsah tuků je opět závislý na konkrétním druhu (Food Standards Agency, 2002). Nejvíce prospěšnými látkami, které jsou v rybách obsažené, jsou omega-3 mastné kyseliny, tj. nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA), které jsou nejvíce obsažené v tučných rybách, jako je například losos, tuňák a další mořské ryby (Oomen *et al.*, 2000). Ostatní druhy masa omega-3 mastné kyseliny obsahují také, ač v průměru výrazně méně. Mimo ryb patří k lepším zdrojům omega-3 mastných kyselin například i maso hovězí a jehněčí, zatímco maso vepřové a kuřecí patří ke zdrojům podstatně chudším (Williams, 2007).

#### **1.4 Zpracování masa**

V mase *post mortem* stále probíhají některé biochemické procesy, které jsou součástí jeho technologické úpravy. Např. stále dochází k uvolňování vápenatých iontů a v jejich důsledku dochází ke svalovým kontrakcím a nastává již zmíněný *rigor mortis*. U různých druhů zvířat tato ztuhlost probíhá v jiných časových intervalech. U hovězího dobytka se např. pohybuje jeho trvání v rozmezí 10-24 hodin, u vepřů v rozmezí 4-18 hodin a u drůbeže je doba nejkratší – v průměru 2-4 hodiny. *Rigor mortis* postupně odeznívá v rámci několika dní, kdy

vše závisí na okolních podmínkách. Doba trvání se prodlužuje s tím, pokud je maso skladováno při nižších teplotách (Velíšek, 2014).

Maso se během probíhajícího *rigor mortis* nezpracovává, jelikož nedosahuje požadovaných vlastností a zůstává ztuhlé. Zpracovává se tedy buď před nastáním posmrtné ztuhlosti anebo po jejím odeznění. Například před nastáním posmrtné ztuhlosti je maso „suché“ a má dobrou schopnost vázat vodu, proto bývá výhodné maso zpracovat co nejdříve (Velíšek, 2014).

Jedním z nejčastějších typů zpracování masa je tepelné zpracování. Procesy zpracování mohou být i jiného rázu, například mletí či zrání. Tepelné zpracování zejména zajišťuje zdravotní nezávadnost masa, když zneškodňuje patogenní mikroorganismy obsažené v mase. To však může ovlivnit dostupnost obsažených živin v závislosti na vnitřní teplotě masa. Příliš vysoké teploty mohou způsobit nechtěné strukturální změny (např. zkracování svalových vláken) (Tornberg, 2005), nicméně nižší teplota může podpořit biologickou využitelnost živin v mase a jeho stravitelnost (Bhat *et al.*, 2021b). Při výrobě masných výrobků je jednou nejvyužívanějších přidávaných složek sůl. Ta je přidávána buď pro prodloužení trvanlivosti anebo ke zlepšení chuti masných výrobků. Nicméně to může způsobit změny ve složení či více proteiny denaturovat (Agregán *et al.*, 2023).

## 1.5 Falšování masa

Nejen v současné době, ale i v minulosti provázelo produkci masa jeho falšování za účelem ekonomického zisku. Tento akt zahrnuje například účelnou úpravu produktu či jeho označení (Čížková *et al.*, 2012; Manning & Soon, 2019). To v některých případech může vést k újmě na zdraví či na životě, např. při neuvedení alergenu. I v jiných život neohrožujících situacích je však důležité, aby spotřebitel měl přesné informace o zakoupeném produktu, jako například při vynechání vepřového masa z důvodu náboženství či vynechání masa z jídelníčku úplně (vegetariánství, veganství apod.) (Ballin, 2010; Du *et al.*, 2023; Visciano & Schirone, 2021). Čížková *et al.* (2012) se zabývali falšováním potravin, přičemž uvedli hlavní typy jejich falšování, což zahrnovalo i falšování masa a masných výrobků. Metodika autorů pro určení hlavních typů falšování spočívala v určení četnosti výskytu jednotlivých typů v odborných publikacích zabývajících se touto problematikou. Autoři uvádí, že byt' byla celková četnost výskytu dílčích typů falšování v odborných publikacích ovlivněna aktuálními kauzami (např. výskytem koňského masa

v hovězích výrobcích, viz dále<sup>11</sup>), v širším měřítku se typy falšování masa dlouhodobě nemění.

Mezi typy falšování masa podle (Čížková *et al.*, 2012) patří například záměna uvedeného typu masa za levnější alternativu. U tohoto typu je autory uveden příklad, kdy se maso z mořského pstruha nahrazuje maso z lososa, čímž se zabývala i studie od Herrero *et al.* (2011). Ti vzájemné nahrazení těchto dvou druhů masa odhalili u 5 zkoumaných vzorků z celkových 20. Dalším zmíněným typem falšování je následně nastavování masa levnější složkou. V tomto případě je zastoupení nedeklarované složky nižší. Již nedochází k úplné náhradě jako výše, ale pouze k částečné, kdy je cílem zajištění lepších parametrů pro prodej masa, jako například při přidání levnějších sójových bílkovin k navýšení jejich podílu v masných výrobcích anebo při přidání vody k zvýšení váhy či křehkosti kuřecího masa (Čížková *et al.*, 2012). Tuto skutečnost sledovala i Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) na území České republiky. Při své namátkové inspekci v roce 2012 podrobila testování kuřecí maso prodávané v maloobchodních i velkoobchodních řetězcích a sledovala obsah vody. U čtyř výrobků byl následně zjištěn zvýšený obsah vody v podílu až 15,5 %. V maso se dále vyskytovaly i chloridy, které v jejich nadměře způsobují podráždění trávicího traktu. Jednalo se tedy o potenciální nebezpečí pro koncového spotřebitele (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2012).

Dalším typem obecnějšího přístupu k falšování masa je přítomnost nedeklarovaných složek. Zde lze uvést jako příklad použití jiných druhů masa v masných výrobcích, jako například koňského či drůbežního (Čížková *et al.*, 2012). Například v roce 2013 byla při rutinních kontrolách odhalena přítomnost koňského masa v masných výrobcích, které byly označeny jako pocházející z masa hovězího. Toto představovalo zdravotní riziko pro spotřebitele, protože koňské maso mohlo obsahovat tzv. fenylbutazon, což je veterinární lék způsobující u lidí závažná onemocnění, jako je leukopenie či aplastická anémie (Visciano & Schirone, 2021). Obdobných zjištění dosáhla i studie autorů Ayaz *et al.* (2006). Ta odhalila stejný typ falšování při nalezení nedeklarovaných druhů masa ve 22 zkoumaných vzorků masných výrobků z celkově 100 vzorků. Jednalo se zejména o případy, kdy výrobky z hovězího, jako jsou klobásy, obsahovaly kromě hovězího i maso drůbeží. V jednom případě bylo dokonce nalezeno nedeklarované maso, které bylo jelení a koňské, čímž opět vznikalo zdravotní riziko pro spotřebitele.

---

<sup>11</sup> Viz například (Visciano & Schirone, 2021).



Dle Čížkové *et al.* (2012) do zahrnutých způsobů falšování dále náleží nedeklarování typu úpravy, jakému bylo maso podrobeno. Jedná se zejména o případy, kdy bylo maso vydáváno za čerstvé, ale ve skutečnosti bylo předtím zmražené a dále rozmražené. Tuto skutečnost odhalily švýcarské laboratoře zajišťující kontrolu potravin, kdy při testování 43 čerstvých vzorků odhalily nedeklarované zmražení u 15 % vzorků (Gremaud *et al.*, 2002).

Nastavování přísadami ke zlepšení kvality, jako například přibarvování nedeklarovanými barvivy pro dosažení požadovaného vzhledu, je dalším typem falšování dle Čížkové *et al.* (2012). Studie, jež se tímto zabývala, byla např. studie autorů Czech-Zalubská *et al.* (2023), která zjistila přítomnost nepovolených barviv u 7,33 % zkoumaných vzorků (tedy ve 20 z 273 celkových). V poslední řadě se v (Čížková *et al.*, 2012) uvádí také typ falšování masa a masných výrobků, kdy dochází k nesprávnému uvedení geografického původu masa anebo k nesprávnému uvedení způsobu jeho produkce. V druhém případě se diskutuje například o vydávání ryb vyprodukovaných na farmách za ryby divoké. První případ, tedy nesprávné uvedení geografického původu, odhalila SZPI při rutinních kontrolách několika restaurací, v nichž docházelo ke klamání spotřebitele uvedením Argentiny jako země původu, ačkoliv maso pocházelo podle informací na produktu z Brazílie (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2019). Podobné typy falšování masa uvádí konkrétně i Primrose *et al.* (2010) či Ballin (2010), ten společně s nimi dále například zmiňuje nahrazení plemene stejného druhu jiným plemenem (typicky levnějším), zavádějící informace o krmení zvířete, stáří zvířete při porážce, nahrazení masa označeného jako organické masem vyprodukovaným konvenčními způsoby a dále nesprávné označení svalové tkáně, ze které maso pochází.

Z uvedených příkladů plyne, že některé praktiky falšování mohou vést ke zdravotní újmě spotřebitelů, zejména nahrazování jiného masa koňským. Proto je důležité mít k dispozici vhodné a spolehlivé metody na odhalování falšování masa. Tyto metody jsou popsány v následující podkapitole.

## **1.6 Analytické metody využívané pro odhalování falšování masa**

Jak plyne z podkapitoly 1.5, falšování masa či masných výrobků je určitým bezpečnostním rizikem pro spotřebitele, a proto je třeba toto falšování dokázat detekovat. Pro tento cíl se využívají různé analytické metody. K identifikaci či rozlišení živočišných druhů masa, a tedy i odhalení falšování masa, se využívají primárně dva přístupy. Jedná se o analýzu proteinů (peptidů) a dále o analýzu DNA. Pro identifikaci masa lze také využít analýzu

triacylglycerolů, nicméně ta se řadí mezi nejméně využívané metody (Alikord *et al.*, 2018; Ballin *et al.*, 2009). Pro analýzu proteinů se v současnosti více využívají jiné analytické metody, jako například chromatografické a spektroskopické metody. Dalšími možnými metodami jsou následně metody imunologické a elektroforézní. Ty jsou specifické tím, že byly k tomu účelu využívány významně zejména v minulosti, nicméně v současnosti se více než ony využívá hmotnostní spektrometrie či její kombinace s výše jmenovanými metodami, jako např. chromatografií (Alikord *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2023; Rahmati *et al.*, 2016).

### 1.6.1 Elektroforézní metody

Elektroforéza byla použita jako jedna z prvních metod k identifikaci druhového původu masa. Používá se především k identifikaci masa v syrovém stavu, kdy dovoluje identifikaci obsažených proteinů rozpustných ve vodě, tj. sarkoplasmatických (Alikord *et al.*, 2018). Tyto a zbylé proteiny se separují v elektrickém poli ve speciálním médiu ve formě gelu, kdy se jedná především o polyakrylamidové gely (PAGE) a polyakrylamidové gely v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). V případě elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) je principem separace proteinů na základě jejich rozdílných molekulových velikostí a jejich náboje, kdy se proteiny podle svého náboje pohybují směrem ke katodě či anodě. Oproti tomu u polyakrylamidové elektroforézy v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) se proteiny pohybují pouze směrem k anodě z důvodu negativního náboje, který jim dodal dodecylsírany sodný (SDS). Tento náboj převyšuje původní náboj proteinu, čímž jejich rychlost závisí pouze na molekulové váze proteinu (Montowska & Pospiech, 2007).

Často se k rozlišení masa elektroforéza SDS-PAGE nevyužívá samostatně, ale ve spojení s isoelektrickou fokusací (IEF), u které se proteiny separují v gelu a pohybují se směrem k hodnotě pH, která souhlasí s jejich isoelektrickým bodem (pI). Spojení těchto dvou typů elektroforézy se nazývá dvoudimenzionální elektroforéza (2-DE), kdy v první dimenzi se využívá IEF, po které následuje druhá dimenze se SDS-PAGE (Bouchal & Kučera, 2003; Montowska & Pospiech, 2007). Dvoudimenzionální elektroforéza umožňuje současně separovat až tisíce proteinů a zároveň provedení následné analýzy a identifikace celých proteinů (Montowska & Pospiech, 2010; Rabilloud *et al.*, 2010). Následná analýza se nejčastěji provádí pomocí hmotnostní spektrometrie, kterou se identifikují vyseparované proteiny (Collinsová & Jiráček, 2004).

Elektroforéza má i řadu limitací, které mohou přispívat k jejímu nižšímu využití. Patří mezi ně například náročnější analýza hydrofobních a špatně rozpustných proteinů, velká míra

komplexnosti metody, časová náročnost anebo proteiny s příliš malou (<10 kDa), či příliš velkou (>60 kDa) molekulovou hmotností, které již není metodou možné detekovat (Bouchal & Kučera, 2003; Montowska & Pospiech, 2010).

### 1.6.2 Imunologické metody

Alternativou pro výše zmíněné metody nabízí imunologické metody založené na interakci mezi antigeny s protilátkami (Alikord *et al.*, 2018). Aktahova *et al.* (2018) uvádí jako jejich výhodu zkrácení doby potřebné k analýze a možnost využití při rutinních testech velkého počtu vzorků. Nejvíce užívaným typem imunologické metody je tzv. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), která je vybírána pro svoji specifickou, jednoduchost a také citlivost. Další výhodou je, že oproti jiným metodám nevyžaduje nákladné vybavení (Aydin, 2015). Využití této metody je možné v několika provedeních. Nejvyužívanější jsou primárně tzv. indirect (nepřímá) a sandwich (sendvičová) metoda. V případě nepřímé je využíváno dvou protilátek, z nichž jedna je specifická k antigenu, který je navázán v imunosorbentu, a druhá je svázána společně s enzymem (z čehož vyháží název Enzyme-Linked) a navazuje se na první protilátku. Přidaný substrát v reakci s enzymem způsobí detekovatelnou barevnou reakci. Tzv. sendvičová metoda také využívá dvou protilátek, ale oproti první metodě, se liší v tom, že v imonosorbentu je navázána protilátka (někdy zvaná záchytná), na kterou se následně váže antigen pocházející ze vzorku. Druhá využívaná protilátka s navázaným enzymem (někdy zvaná detekční) se posléze váže na již navázaný antigen. A identicky, jako u tzv. nepřímé, se na enzym navazuje substrát, který po navázání produkuje detekovatelný signál ve formě změny barvy (Alikord *et al.*, 2018; Asensio *et al.*, 2008).

Ačkoli má ELISA řadu výhod, stejně jako jiné metody má svá omezení. Tím hlavním je princip metody. Její limitace vychází z toho, že se k identifikaci druhu masa je třeba vybrat specifický antigen či protilátku v závislosti na typu metody, což však není vždy možné. Např. pokud jsou tyto druhy masa neznámé anebo známé jsou, jen nemají dosud stanovený svůj specifický antigen či protilátku, tak jejich jednoznačná identifikace není možná, protože je není na základě čeho odlišit (Alikord *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2020). Taktéž metoda není vhodná na identifikaci více druhů zároveň (Li *et al.*, 2020). Vzhledem k možnosti vzájemné reakce protilátek (antigenů) více příbuzných druhů (např. kuřecího a krůtího) nastává potíž u rozlišení druhů, které k sobě mají v příbuznosti velice blízko (Sentandreu & Sentandreu, 2011). V potaz je také nutné vzít to, že cílové proteiny

(protilátky) mohou být při tepelné úpravě denaturovány. Z tohoto důvodu je důležité pro identifikaci tepelně upraveného masa zvolit takové proteiny, které jsou tepelně stabilnější (Asensio *et al.*, 2008). Například Zvereva *et al.* (2015) ve svém výzkumu identifikovala pomocí „sendvičové“ formy ELISA antigen troponin I jako tepelně stabilní biomarker pro identifikaci svaloviny savců.

### 1.6.3 Analýza DNA

Analýza DNA nabízí alternativní přístup při identifikaci masa, kde oproti metodám založených na analýze proteinů je cenově dostupnější. Jedinou výjimkou je ELISA, která rovněž patří k cenově dostupnějším metodám (Zia *et al.*, 2020), avšak při jejím srovnání s metodami analýzy DNA, konkrétně real-time PCR a testovací soupravy využívající sendvičové metody ELISA, Perestam *et al.* (2017) došli k závěru, že real-time PCR je citlivější metodou oproti ELISA<sup>12</sup> a zároveň spolehlivější a cenově dostupnější. Z tohoto důvodu shledali metodu real-time PCR jako vhodnější. Na druhou stranu ELISA byla podle nich méně časově náročnou. V praxi z toho tak vyplývá to, že výběr vhodné metody bude vždy záviset na požadavcích výzkumu.

Co se týče výhod, jednou z hlavních motivací pro výběr metod využívající analýzy DNA, je analýza u tepelně opracovaného masa. Oproti analýze DNA má totiž studování proteinů tu nevýhodu, že při tepelné úpravě proteiny denaturují a ztrácejí tak některé svoje vlastnosti, kterých je využíváno u metod založených na proteinové analýze a ty posléze nelze využít. A zároveň mají analýzy DNA výhodu, že se DNA vyskytuje téměř ve všech buňkách. To vede na to, že jsou metody založené na analýze DNA jsou v některých případech preferovanější nežli jiné metody podle výběru studovaných vzorků (Alikord *et al.*, 2018).

Nejvyužívanější metodou založené na analýze DNA patří polymerní řetězová reakce, jež jsou značeny jako PCR (Akhatova *et al.*, 2018; Alikord *et al.*, 2018; Montowska & Pospiech, 2010). PCR metody jsou citlivé a zároveň specifické pro druh zvířete, nicméně nejsou specifické pro typ svaloviny daného druhu, tudíž pomocí nich nelze rozlišit typ svaloviny. To samé platí i pro rozlišení geografického původu masa (Montowska & Pospiech, 2010). Existují různé typy PCR využívané při analýze, kdy každá má určité využití a výhody oproti jiným typům, například multiplex PCR je výhodná pro analýzu několika živočišných druhů zároveň a real time PCR je využívána pro kvantitativní analýzu vzorků. Další široce

---

<sup>12</sup> Úroveň detekce vepřového masa u real-time PCR byla 0,10 % (w/w) a u ELISA 10 % (w/w), u hovězího masa byla detekce u real-time PCR 0,50 % (w/w) a u ELISA 1,00 % (w/w).

využívaným typem je PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Tato metoda funguje tak, že nejprve proběhne PCR a její produkty se následně podrobí enzymatickému štěpení a analýze pomocí polyakrylamidové elektroforézy (PAGE). Výsledkem je tzv. fingerprint, který je specifický pro jednotlivé druhy masa (Alikord *et al.*, 2018).

#### 1.6.4 Spektroskopické metody

Mezi další metody využívané k identifikaci druhu masa patří metody spektroskopické, které jsou vyhledávané z důvodu, že poskytují relativně rychlou, nedestruktivní a současně i nízkonákladovou identifikaci vzorků. Spektroskopické metody jsou založeny na měření vzájemné interakce mezi elektromagnetickým zářením a sledovaným vzorkem. Mezi nejpoužívanější typy této skupiny metod se především řadí infračervená spektroskopie (Du *et al.*, 2023; Grundy *et al.*, 2023).

Infračervená spektroskopie, založená na absorpci infračerveného záření vzorkem, se dělí podle oblasti využitých vlnočtů na tři oblasti, a to na blízkou (near infrared tj. NIR), střední (mid infrared tj. MIR) a vzdálenou (far infrared tj. FIR). Nejvíce užívanými typy z tohoto výběru jsou NIR a MIR, a to po řadě o vlnočtu  $14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  (Akhatova *et al.*, 2018; Candoğan *et al.*, 2021). Spektra získaná v NIR oblasti poskytují komplexní informace, které mohou být vyhodnoceny pomocí matematické analýzy, jako např. PCA (principal component analysis), k získání informace o původu masa (Akhatova *et al.*, 2018; Čížková *et al.*, 2012). Toto učinili například Cozzolino a Murray (2004). Ti metodou NIR spektroskopie analyzovali vzorky hovězího, jehněčího, kuřecího a vepřového masa, přičemž výsledky vyhodnocovali s využitím PCA. Z celkového počtu 332 vzorků se jim podařilo metodou úspěšně odlišit více než 85 % vzorků.

#### 1.6.5 Chromatografické metody

Identifikaci masa je dále možné provést pomocí chromatografických metod, které separují jednotlivé složky analyzovaného vzorku podle jejich afinity vůči stacionární a mobilní fázi. Chromatografické metody umožňují separovat velké množství látek najednou, čímž jsou vhodné pro identifikaci směsí a také tepelně upravených vzorků. Separace probíhá během pohybu mobilní fáze skrze fázi stacionární, kdy podle charakteru mobilní fáze nese chromatografie název kapalinová (liquid chromatography; LC) a plynová (gas chromatography; GC). Z těchto dvou je pro identifikaci proteinů více využívanou kapalinová chromatografie. Plynovou chromatografie se spíše využívá k analýze těkavých látek. Aby bylo možné vyseparované látky identifikovat, spojuje se chromatografie

s různými typy detektorů. Nicméně nejvíce se spojuje s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography/ mass spectrometry; LC-MS), kdy je tato metoda velice citlivá, specifická a výsledky jsou velice dobře reprodukovatelné (Abbas *et al.*, 2018; Alikord *et al.*, 2018; Montowska & Pospiech, 2010). Právě této poslední kombinace (zvaná jako LC-MS/MS čili liquid chromatography tandem mass spectrometry) bylo využito u (Montowska & Fornal, 2017) k úspěšnému rozlišení tří druhů drůbežního masa v masných výrobcích, konkrétně kuřecího, husího a kachního. Pomocí této metody autorky nejprve našly specifické peptidy dílčích druhů a poté s nimi druhy masa odlišily. Nicméně pro krutí maso, jež bylo zkoumáno také, nebyly nalezeny žádné specifické peptidy.

### 1.6.6 Hmotnostní spektrometrie

V současné době se hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry; MS) řadí mezi hojně využívané metody k identifikaci proteinů či peptidů. Du *et al.* (2023) mezi výhody této metody řadí například její značnou citlivost a využitelnost při identifikaci syrových, ale i opracovaných vzorků. Nicméně pořizovací cena je podle nich oproti jiným metodám vyšší, a to zejména při srovnání s metodami ELISA či DNA analýzami.

V principu je hmotnostní spektrometrie metodou, která rozlišuje ionty podle jejich poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Toto rozlišení se odehrává v části hmotnostního spektrometru zvané hmotnostní analyzátor. Hmotnostní spektrometr se dále skládá z ionizačního zdroje a detektoru. Pro provedení analýzy je třeba pomocí ionizační techniky převést analyty na ionty. U analýzy proteinů/peptidů se mezi nejčastěji používané techniky řadí matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) a elektrosprejová ionizace (ESI) a ty se kombinují s různými typy detektorů, primárně se jedná o detektor doby letu částic (time of flight; TOF) a kvadrupólový detektor (quadrupole; Q), které se někdy využívají i zároveň, např. jako tzv. Q-TOF. Dále je možná spojení dvou hmotnostních spektrometrií do tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie, kde nejprve dochází k rozlišení iontů, které jsou následně fragmentovány a jsou separovány v druhém hmotnostním spektrometru (Domon & Aebersold, 2006; Dvořáková *et al.*, 2014).

Zároveň lze společně s hmotnostní spektrometrií využít i výše zmíněné elektroforetické či chromatografické metody za účelem snížení komplexnosti testovaných vzorků (Montowska & Pospiech, 2010). Též lze docílit využitím enzymů, jako například trypsinu, jež štěpí proteiny, pokud mají na C-koncích zbytky argininu anebo lysinu (Dvořáková *et al.*, 2014).

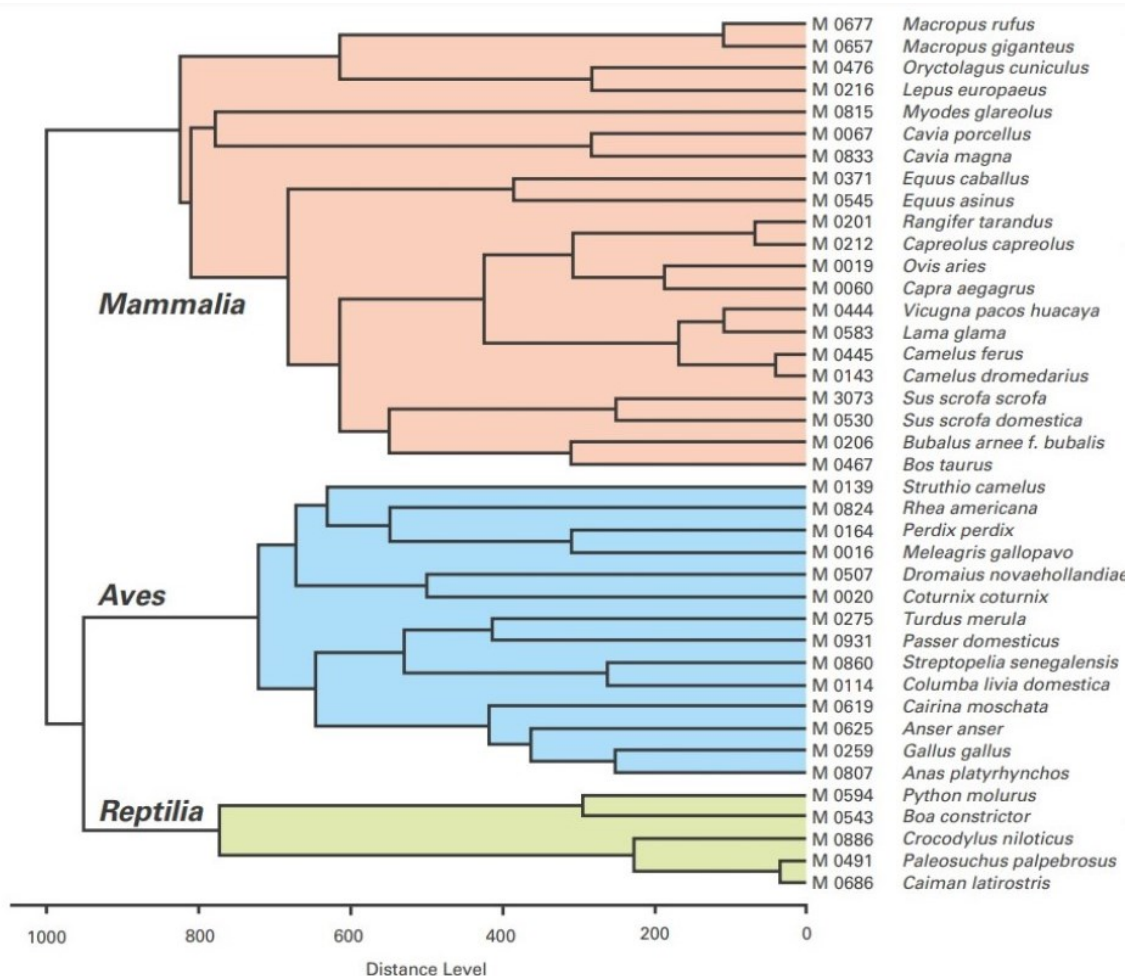
### 1.6.6.1 MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je jednou z analytických metod využívaných při proteomické analýze, tj. analýze všech proteinů vyskytujících se v organismu tvora. Jedním využívaným proteomickým přístupem s využitím MALDI-TOF je tzv. peptidové mapování (peptide mass mapping), kdy se vzorek nejprve enzymaticky štěpí a následně se analýzou pomocí MALDI-TOF získají hodnoty  $m/z$  specifické pro daný druh masa, někdy zvané jako biomarkery (Dvořáková *et al.*, 2014). Podobného přístupu bylo využíváno i v experimentální části této bakalářské práce.

Dle zmíněného popisu MS v podkapitole 1.6.6 je hmotnostní spektrometrie založena na separaci iontů na základě poměru jejich hmotností ku náboji ( $m/z$ ). Při využití ionizační techniky MALDI se analyty na ionty převádí laserovým zářením, u čehož je důležité využít matrice, tedy roztoku, který absorbuje laserové záření namísto zkoumaného analytu a tím se zabraňuje jeho nevhodnému štěpení. Nejčastější volbou matrice je kyselina 2, 5-dihydroxybenzoová (DHB), ale využívá se i 3, 5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina či 3-hydroxypikolinová kyselina. Ionty, urychlovány elektrostatickým polem, po průletu hmotnostním analyzátozem dopadají na detektor. Zde se využívá detektor TOF, který měří jejich dobu letu. Na detektor nejprve dopadají ionty s nižší molekulovou hmotností a na základě změřených dob letu všech iontů hmotnostní spektrometr dále generuje hmotnostní spektrum, které je unikátní graf pro každý konkrétní druh masa (Dvořáková *et al.*, 2014; Kowalczyk-Akimowicz & Bucka-Kolendo, 2020; Marvin *et al.*, 2003).

Rau *et al.* (2021) využili metodu MALDI-TOF (bez výše popsaného enzymatického štěpení), pro analýzu více než 1000 vzorků masa ze 132 různých druhů zvířat (savci, ptáci, plazi). Výsledná spektra mezi sebou porovnávali a vyhledávali v nich unikátní hodnoty jednotlivých druhů mas. Dále využili shlukové analýzy (cluster analysis) k vytvoření dendrogramu, ve kterém vyobrazili testované druhy masa v závislosti na jejich vzájemné podobnosti v proteinovém složení, viz obrázek 3. Tento dendrogram je vytvořen tak, že čím více shodných hodnot bylo u dvou druhů živočichů zjištěno, tím blíže si v dendrogramu jsou.

Obrázek 3: Dendrogram vyobrazující podobnost v proteinovém složení



Zdroj: (Rau *et al.*, 2021)



## 2 Experimentální část

V této bakalářské práci byly rozlišovány různé živočišné druhy masa pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Jedním z cílů práce bylo nalezení unikátních  $m/z$  hodnot a skrze ně rozlišit živočišné druhy masa, nejprve nezávisle na jeho úpravě a následně i v závislosti na úpravě masa. Analyzovány byly celkem tři úpravy masa, konkrétněji se jednalo o syrové maso, pečené maso a pečené maso s přidanou solí. Dalším cílem práce bylo zjistit, zdali je možné pomocí unikátních hodnot  $m/z$  určit typ úpravy, kterému bylo maso podrobeno. Laboratorní měření včetně přípravy vzorků, jejich vážení, pročišťování a následné měření bylo prováděno na Ústavu biochemie a mikrobiologie, přesněji v Laboratoři aplikované proteomiky na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.

### 2.1 Materiál a metody

#### Použité chemikálie

- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB); (Sigma Aldrich, USA)
- Acetonitril (ACN); (Sigma Aldrich, USA)
- Hydrogenuhličitan amonný (Lachema, ČR)
- Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Německo)
- Trifluoroctová kyselina (TFA); (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (Pierce Trypsin Protease MS-Grade, USA)

#### Použité vybavení

- Analytické váhy ABT 120-5DM (Kern, Německo)
- Centrifuga (Eppendorf, Německo)
- Eppendorf zkumavky objem 1,5 ml a 0,5 ml (Eppendorf, Německo)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Německo)
- Vortex (Eppendorf, Německo)
- Zip-Tip špičky s reverzní fází C<sub>18</sub> (Milipore Corporation, USA)

## **Příprava vzorků**

V této práci byly podrobeny analýze vzorky pocházející z celkem osmi zvířecích druhů. Ty obsahovaly maso ze čtyř druhů savců, kterými bylo prase domácí (*Sus scrofa domestica*), tur domácí (*Bos primigenius taurus*), králík domácí (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) a jelen sika (*Cervus nippon*), který byl zvolen jako zástupce volně žijící zvěře. Dále šlo o tři druhy drůbeže a jeden druh ryby. Mezi drůbeží druhy patřil kur domácí (*Gallus gallus domesticus*), krůta domácí (*Meleagris gallopavo domestica*) a kachna domácí (*Anas platyrhynchos domesticus*). Jediným zástupcem ryb byla tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*). Maso bylo zakoupeno v běžně dostupných sítích supermarketů (Billa, Lidl, Penny). Jediné jelení maso bylo odkoupeno od myslivce. Maso jednotlivých vzorků bylo odebráno z následujících zakoupených tělesných částí – u prasete domácího byl vzorek odebrán z plece, u tura domácího vzorek pocházel z kýty, obdobně u jelena siky, u králíka domácího byl vzorek odebrán z hřbetu, vzorky z masa kachny domácí, krůty domácí a kuřete domácího byly odebrány z prsního masa a maso z tilápie nilské pocházelo z filetu.

Každý zvířecí druh byl podroben testování ve třech formách úpravy – syrové, pečené a pečené se solí. Pečené maso bylo třeba nejdříve tepelně upravit. Úprava proběhla tak, že maso bylo nejprve naporcováno na kousky o rozměrech 3 cm x 3 cm x 1 cm a po naporcování bylo v alobalu pečeno v předem předehřáté horkovzdušné troubě při 120 °C po dobu 20 min. Druhé pečené maso bylo upraveno identickým způsobem, ale před začátkem pečení k němu byla přidána sůl o hmotnosti 0,2 g. Po provedení všech úprav vzniklo pro vlastní měření celkem 24 vzorků, tj. 8 syrových, 8 pečených a 8 pečených se solí. Vzorky masa byly posléze označeny, tak, že ke každému druhu masa bylo přiřazeno velké písmeno v abecedním pořadí, tzn. A – vepřové, B – hovězí, C – kuřecí, D – krůtí, E – králičí, F – rybí, G – jelení a H – kachní. Následně bylo podle typu úpravy k tomuto písmenu přiřazeno druhé malé písmeno – jmenovitě: a – syrové maso, b – pečené maso a c – pečené se solí. Například syrové vepřové maso bylo takto označeno jako Aa a pečené kuřecí maso jako Cb.

## **Štěpení vzorků**

Připravené vzorky masa bylo nejdříve potřeba rozštěpit trypsinem k uvolnění peptidů ze vzorků. Ke štěpení bylo třeba připravit roztok trypsinu. Roztok byl připraven přidáním 100 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> na každé 2 µl trypsinu. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 µl trypsinu. Pro ukončení štěpení bylo nutno přidat 1 µl TFA. Před začátkem samotného měření byly vzorky nejprve podrobeny testování vhodné doby štěpení trypsinem a vhodné navážky.

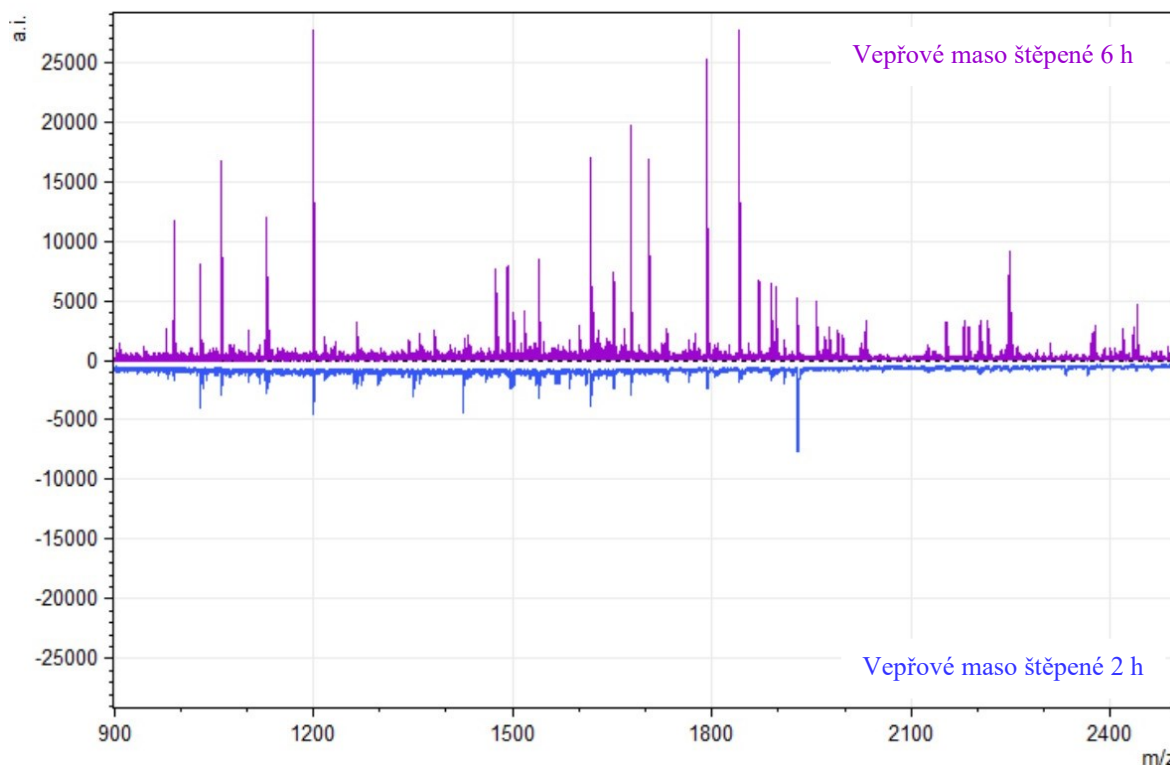
To mělo za cíl určit vhodnou kombinaci doby štěpení a navážky, u které se, po následném vyhodnocení spekter z hmotnostního spektrometru MALDI-TOF, dosáhlo největšího počtu píků. Pro testování byly vybrány dva druhy syrového masa – kuřecí a vepřové. Celkem se testovalo pět různých dob štěpení. Jednalo se o štěpení trvajících 2, 4, 6, 22 a 28 hodin za laboratorních podmínek, tj. při 25 °C. Zároveň byly vzorky testovány ve dvou navážkách, a to 1 mg a 2 mg. Po vytvoření všech kombinací vzniklo celkem 24 vzorků, které byly následně změřeny v hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF. Následovalo získání počtu píků z jednotlivých spekter. Bylo patrné, že navážka 1 mg u většiny dob štěpení, a i u obou druhů mas, poskytovala větší množství píků nežli navážka 2 mg. Výjimka nastala pouze ve dvou případech, u vepřového masa při době štěpení 22 h a u kuřecího masa u doby štěpení 28 h. Při srovnání dob štěpení nejvíce píků poskytovala doba 6 h, a to jak u vepřového, tak i u kuřecího masa, viz tabulka 9. Uvedené počty píků jsou v tabulce 9 zprůměrované ze tří spotů a je k nim uvedena směrodatná odchylka.

**Tabulka 9:** Počty píků při testování doby štěpení a navážky (průměr ze tří spotů se směrodatnou odchylkou)

Doba štěpení	2 h		4 h		6 h		22 h		28 h	
	1 mg	2 mg	1 mg	2 mg	1 mg	2 mg	1 mg	2 mg	1 mg	2 mg
<b>Vepřové maso</b>	99±9	59±5	153±6	109±3	203±8	168±9	127±6	144±6	168±8	142±4
<b>Kuřecí maso</b>	119±7	39±9	110±3	70±10	156±9	120±10	153±10	121±11	111±11	117±3

Na obrázku 4 jsou porovnána spektra vepřového masa štěpeného po dobu 2 h a 6 h. Lze vidět, že větší počet píků byl nalezen u doby štěpení 6 h a dále že zde byla i větší intenzita nalezených píků.

**Obrázek 4:** Srovnání spekter vepřového masa štěpeného 2 h a 6 h



Z tohoto důvodu byla zvolena jako nejvhodnější navážka 1 mg a doba štěpení byla určena na dobu 6 h. Následovalo navážení všech zkoumaných 24 vzorků, tj. 8 druhů masa ve třech formách úpravy, na analytických vahách, kde byly všechny vzorky naváženy ve třech navážkách o hmotnosti  $1,0 \pm 0,2$  mg. Celkový počet vzorků, které byly dále připravovány k analýze, vzrostl na počet 72. K odlišení jednotlivých navážek se k označení vzorků přidalo číslo určující pořadí jejich navážky (např. Aa1, Aa2 a Aa3). Hodnoty jednotlivých navážek jsou uvedeny v tabulce 10. Po navážení se ke vzorkům přidalo 10  $\mu$ l roztoku trypsinu a vzorky se nechaly štěpit. Štěpení bylo po 6 h ukončeno přidáním 1  $\mu$ l 10% TFA.

**Tabulka 10:** Navážené hmotnosti analyzovaných mas: A-Vepřové; B-Hovězí; C-Kuřecí; D-Krůtí; E-Králičí; F-Rybí; G-Jelení; H-Kachní

	Syrové (a)		Pečené (b)		Pečené se solí (c)	
	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek	Navážka [mg]
<b>Navážka 1</b>	Aa1	0,9	Ab1	1,2	Ac1	1,0
	Ba1	1,1	Bb1	1,1	Bc1	1,2
	Ca1	1,0	Cb1	1,2	Cc1	1,1
	Da1	1,1	Db1	1,2	Dc1	1,2
	Ea1	1,1	Eb1	1,1	Ec1	1,2
	Fa1	1,0	Fb1	1,1	Fc1	1,0
	Ga1	1,2	Gb1	1,2	Gc1	1,2
	Ha1	0,9	Hb1	0,8	Hc1	1,2
	<b>Navážka 2</b>	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek
Aa2		1,2	Ab2	1,2	Ac2	0,8
Ba2		0,8	Bb2	0,8	Bc2	0,9
Ca2		1,2	Cb2	1,2	Cc2	1,0
Da2		1,1	Db2	1,1	Dc2	1,0
Ea2		0,9	Eb2	0,8	Ec2	1,2
Fa2		0,9	Fb2	1,0	Fc2	0,8
Ga2		0,8	Gb2	0,9	Gc2	1,1
Ha2		1,1	Hb2	1,1	Hc2	0,9
<b>Navážka 3</b>	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek	Navážka [mg]	Vzorek	Navážka [mg]
	Aa3	0,9	Ab3	0,9	Ac3	1,1
	Ba3	1,2	Bb3	1,2	Bc3	0,8
	Ca3	1,2	Cb3	1,2	Cc3	1,0
	Da3	1,1	Db3	0,9	Dc3	1,1
	Ea3	1,0	Eb3	1,0	Ec3	1,1
	Fa3	0,8	Fb3	1,1	Fc3	0,9
	Ga3	1,0	Gb3	0,8	Gc3	0,8
	Ha3	0,8	Hb3	0,8	Hc3	1,2

### **Příprava vzorků na měření**

Z jednotlivých vzorků bylo, po ukončení štěpení trypsinem, nutné rozštěpené peptidy dále izolovat. To bylo provedeno pomocí pipetovací špičky ZipTip C<sub>18</sub>. Proces byl rozdělen do tří navazujících fází: do (1) wettingu (zvlhčení), (2) ekvibrace (vyrovnání) a (3) eluce (vyloučení). Pro všechny tři byly připraveny rozdílné roztoky. Na první fázi (wetting) bylo třeba využít 200 µl 100 % ACN. K druhé fázi (ekvibraci) bylo použito 0,2 % TFA ve vodě. A v posledním kroku (eluci) byl potřeba roztok 50 % ACN a 0,1 % TFA ve vodě.

Samotný postup pipetování byl proveden za použití pipetovací špičky ZipTip s reverzní fází C<sub>18</sub>, která v sobě obsahuje chromatografické médium. Postup byl proveden u každého z připravených vzorků totožně. V prvním kroku se provedlo zvlhčení pomocí specifického roztoku, viz výše, pipetou se pak nasál 10 µl roztoku a špička pipety se jím desetkrát vymyla. V dalším kroku, tzn. ekvibraci, byl použit druhý připravený roztok. Pomocí pipety se desetkrát nasálo 10 µl roztoku, který se vždy po nasátí vypustil do odpadu. Dále následovalo nasátí 10 µl roztoku se zkoumaným vzorkem, který se desetkrát vymýval se špičce pipety. Následně se zopakovala ekvibrace, při níž se opět použil druhý roztok a nasálo se pomocí pipety 10 µl roztoku, který se desetkrát nasál a vypustil se do odpadu. Poté následovala poslední fáze – eluce. Ta začala nasátím 8 µl třetího, elučního, roztoku, který se pak vypustil do mikrozkuhavky, kde se desetkrát vymýval. V posledním kroku se použil eluční roztok na vyčištění špičky pipety, kde se opětovně nasálo 10 µl roztoku, které se poté vypustily do odpadu. Postup byl opakován pro každý zkoumaný vzorek.

Po izolaci peptidů na špičce ZipTip bylo nutné připravit roztok na matici – roztok DHB. Na roztok bylo třeba 150 µl 100% ACN a 250 µl 0,2 % TFA, ke kterým bylo přidáno 8,7 mg DHB se 100 µl H<sub>2</sub>O. Každý vzorek byl smíchán s maticí v poměru 1:5, tzn. 1 µl vzorku byl přidán ke 5 µl matrice. Posléze byl vzniklý roztok nanesen na destičku MALDI-TOF. Každý vzorek byl nanesen na 3 spoty na destičce v objemu 2 µl. Destička byla ponechána na vyschnutí, po kterém se na destičce vytvořily krystalky.

### **Měření vzorků**

Po přípravě vzorků k měření byla destička vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (Bruker Daltonics), u nějž byla provedena kalibrace a jednotlivé vytvořené krystalky byly laserem ostřelovány. Rozsah měření probíhal v rozmezí 900-3700 Da, ve kterém se vyskytoval největší počet píků. Měření probíhalo při laserové intenzitě 60 % s 10 000 shoty na spektrum.

## **Vyhodnocování výsledků**

Získaná spektra byla vyhodnocena pomocí programu mMass ve verzi 3.1.2 při procesu manuální identifikace píků. Ve zkoumaných spektrech se v průměru vyskytovalo 140 píků. Tyto píky znázorňovaly peptidy, které byly ve vzorcích nalezeny po rozštěpení trypsinem. Peptidy, které se vyskytovaly ve spektrech náležících k jednomu živočišnému druhu masa a nevyskytovaly se ve spektrech zbylých druhů masa, bylo možné nazvat jako charakteristické (někdy též zvané unikátní či specifické). K nalezení těchto charakteristických peptidů, které byly v dalším zpracování vyjádřeny pomocí hodnot  $m/z$ , došlo s využitím databázového programu PostgreSQL. Pomocí něhož bylo možné porovnat velké objemy dat.

### 3 Výsledky a diskuse

Pro ověření cílů (viz kapitola 2) byla provedena proteomická analýza zkoumaných vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Tím byla získána spektra analyzovaných vzorků. Po ručním označování píků v jednotlivých spektrech skrze program mMass vzniklo celkem 216 seznamů s hodnotami  $m/z$ , které byly porovnávány. Každému druhu masa, z celkem osmi zkoumaných, náleželo vždy 27 seznamů s hodnotami  $m/z$ . Těchto 27 seznamů se dále dělilo podle typu úpravy masa, z nichž devět spekter náleželo syrovému masu, devět pečenému masu a devět pečenému masu se solí. Pro nalezení specifických hodnot bylo nutné seznamy mezi sebou porovnat podle analyzovaného hlediska. To bylo možné provést pomocí databázového systému PostgreSQL.

#### 3.1 Rozlišení masa bez ohledu na úpravu

Při prvním porovnání hodnot proběhlo srovnání všech osmi druhů masa bez ohledu na úpravu. To znamená, že byly mezi sebou srovnány všechny seznamy hodnot  $m/z$  náležející jednomu druhu masa, kterých bylo celkem 27, viz kapitola 3. Nejprve byl zvolen limit výskytu dané  $m/z$  hodnoty v co nejvyšším počtu spekter (nejlépe ve všech). Zde byla, po otestování vyšších četností, zvolena četnost výskytu v minimálně ve 24 seznamech z 27 celkových. Jak již bylo zmíněno, ověřovány byly i jiné četnosti, nicméně při zvolení vyšší hodnoty bylo nalezeno jen velmi malé množství hodnot  $m/z$ , např. u limitu výskytu ve 25 seznamech z 27 celkových byly nalezeny hodnoty  $m/z$  jen pro dva druhy masa. Z tohoto prvotního srovnání vzniklo osm zúžených seznamů podle zadaného limitu vždy po jednom pro každý druh masa. Ty se následně pomocí databázového programu také porovnály mezi sebou a vyhledaly se hodnoty vyskytující se pouze u jednoho druhu masa, a ne u žádného jiného druhu (vše s tolerancí  $\pm 0,3 m/z$ ). Tímto se docílilo získání hodnot, které se vykytovaly alespoň ve 24 seznamech z 27 celkových a jež se vztahovaly k jednomu druhu masa a nevyskytovaly se v žádném jiném druhu masa. Neboli byly získány unikální hodnoty  $m/z$  druhu masa bez ohledu na to, jakým způsobem bylo upraveno. Jednotlivé hodnoty  $m/z$  jsou uvedeny v tabulce 11.

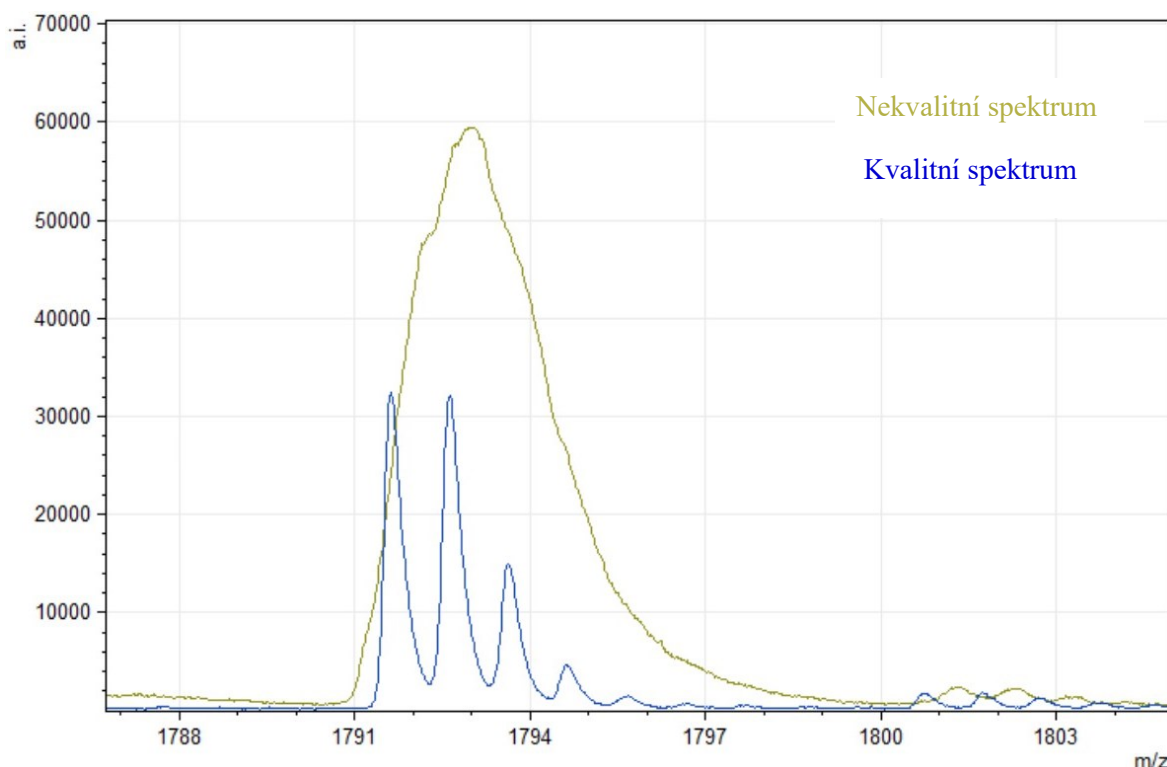


**Tabulka 11:** Unikátní hodnoty  $m/z$  pro jednotlivé druhy masa bez ohledu na jejich úpravu

Druh masa	Hodnoty $m/z$
Hovězí maso	1073,9; 1086,9; 1100,9; 1528,3; 1530,2; 1641,3; 1887,6; 1913,4
Jelení maso	907,9; 1602,6; 1689,6; 1881,8
Kachní maso	
Králičí maso	1027,0; 1054,0; 1250,2; 1300,2; 1417,3; 1489,3; 1578,4; 1667,5; 1731,6; 1764,5; 1809,6; 1818,7; 1856,7; 1869,8; 1908,9; 2014,8; 2635,3
Krůtí maso	1371,3; 1477,5; 1529,4; 1531,4; 1536,5; 1619,4; 1749,6
Kuřecí maso	1343,0; 1886,6; 1897,6; 2077,9; 2189,8; 2202,9; 2418,0; 2567,1; 2605,2; 2619,2; 2689,2
Rybí maso	924,9; 945,9; 1157,2; 1294,3; 1309,4; 1374,4; 1386,4; 1398,4; 1491,6; 1564,5; 1597,5; 1646,7; 1766,7; 1855,8; 1900,8; 1987,9; 2004,0; 2116,0; 2229,2
Vepřové maso	1144,9; 1359,0; 1477,0; 2151,7

Pomocí unikátních hodnot  $m/z$  z tabulky 11 bylo možné identifikovat sedm z osmi uvedených druhů masa i bez bližšího určení jejich zpracování. Nejvíce unikátních hodnot bylo nalezeno pro rybí maso, a to v počtu 19. Králičí maso mělo druhý nejvyšší počet nalezených hodnot, a to celkem 17. U kuřecího, hovězího a krůtího masa bylo v tomto pořadí nalezeno 11, 8 a 7 hodnot. Nejméně hodnot bylo nalezeno u vepřového a jeleního masa, kde se u obou jednalo jen o čtyři hodnoty. Nicméně jak lze vidět z tabulky 11, tak pro kachní maso nebyla nalezena ani jedna unikátní hodnota. A to ani v případě, že se limit pro výskyt snížil. Ověřovány byly přitom limity v rozmezí 23 z 27, 22 z 27 a 21 z 27. Ani v jednom z nich však nebyla unikátní hodnota  $m/z$  pro kachní maso nalezena. Proto se přistoupilo k variantě dále nesnižovat limit a ponechat jej jako 24 z 27, který byl shledán jako dostatečný pro ostatní druhy masa. Kachní maso se bez ohledu na úpravu nedalo identifikovat. A pro jeho identifikaci bude třeba zvolit jinou metodu srovnání. Důvodem neúspěšné identifikace mohlo být to, že některá spektra z kachního masa nebyla dostatečně kvalitní a některé hodnoty nebylo možné v spektru určit (viz obrázek 5), což způsobilo nižší počet hodnot  $m/z$  než, jak to bylo u jiných druhů. Tím se zvýšila i pravděpodobnost, že se hodnoty budou shodovat s hodnotami z jiných spekter. Specificky tomu tak bylo více u spekter zbylé drůbeže z důvodu příbuznosti druhů a malé odlišnosti v nalezených hodnotách (viz obrázek 3; podkapitola 1.6.6.1), kdy mohlo dojít na to, že hodnoty budou při srovnání vyřazeny. Dalším důsledkem bylo to, že některé hodnoty, které by mohly být identifikovány jako unikátní, nebyly určeny.

**Obrázek 5:** Srovnání kvality spekter kachního masa



## 3.2 Rozlišení masa s ohledem na úpravu

V dalším kroku bylo provedeno srovnání zkoumaných druhů masa podle typu jejich úpravy. Jednalo se nejprve o porovnání masa v syrovém stavu, kde každému druhu masa náleželo devět spekter a tím pádem i devět seznamů s hodnotami  $m/z$ . Dále se jednalo o pečené maso a pečené maso se solí, kde každému náleželo identické množství seznamů  $m/z$ . Jednotlivá srovnání byla provedena zvlášť podle typu zpracování v následujících kapitolách 3.2.1, 3.2.2 a 3.2.3.

### 3.2.1 Syrové maso

Při prvním porovnání hodnot se mezi sebou srovnaly seznamy s hodnotami  $m/z$  všech syrových mas. Účelem bylo všechna syrová masa mezi sebou porovnat a získat unikátní hodnoty pro jednotlivé zvířecí druhy. Toho bylo docíleno nejprve nalezením hodnot, které se vyskytovaly v co nejvyšším počtu seznamů s hodnotami  $m/z$  vztahujících se k jednomu druhu masa, např. k vepřovému. Každému syrovému masu náleželo devět takových seznamů. Nejprve byl ověřen limit výskytu hodnot  $m/z$  ve všech devíti seznamech. Limit výskytu byl ověřován s tolerancí  $\pm 0,3 m/z$ . Takto nalezené hodnoty  $m/z$  se porovnály

s hodnotami zbylých druhů mas. Následně byly vyřazovány opakující se hodnoty u jednotlivých druhů mas v syrovém stavu. Po vyřazení takových hodnot zůstaly u jednotlivých živočišných druhů pouze hodnoty, které pro ně jsou charakteristické. A jelikož se u všech druhů masa podařilo nalézt dostatečné množství hodnot s výskytem ve všech devíti spektrech, nebylo nutné limit počtu výskytu hodnot snižovat. Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce 12.

**Tabulka 12:** Unikátní hodnoty  $m/z$  pro syrové maso

Druh masa	Hodnoty $m/z$
Hovězí maso	957,9; 1086,9; 1232,3; 1431,3; 1530,3; 1593,3; 1644,3; 1802,6; 1820,5; 1927,7; 2151,9; 2161,0; 2502,1
Jelení maso	907,9; 1117,2; 1308,3; 1359,4; 1437,4; 1609,5; 3198,5; 3261,5
Kachní maso	918,7; 1328,2; 1653,3; 1886,5; 1908,7; 2130,9
Králičí maso	971,9; 1110,0; 1135,9; 1146,0; 1250,1; 1268,2; 1315,2; 1333,1; 1356,2; 1417,2; 1447,2; 1449,2; 1578,3; 1647,4; 1667,5; 1672,4; 1702,4; 1764,6; 1809,5; 1854,7; 1856,6; 1884,6; 2272,9; 2369,9; 2375,1; 2635,2
Krůtí maso	1371,3; 2104,0; 2150,1; 2216,0; 2383,9; 2486,3; 2605,4; 2614,4; 3065,9
Kuřecí maso	1313,2; 1325,1; 1451,1; 1472,2; 1484,2; 1588,3; 1624,4; 1629,4; 1712,4; 1724,4; 1760,4; 1805,5; 1816,4; 1967,7; 1982,6; 2018,6; 2153,8; 2189,8; 2202,8; 2417,9; 2689,2; 2708,3
Rybí maso	946,0; 1043,2; 1241,4; 1256,3; 1278,4; 1309,4; 1370,4; 1386,4; 1398,5; 1403,4; 1460,5; 1526,6; 1558,6; 1597,6; 1603,7; 1855,9; 1900,8; 2116,0; 2229,2; 2347,3; 2475,4; 3473,2
Vepřové maso	1101,7; 1374,9; 1381,9; 1434,9; 1640,0; 1667,1; 1764,1; 1772,2; 1800,3; 1869,3; 1895,2; 1907,3; 1967,3; 1975,2; 2151,5; 2177,5; 2185,4; 2213,5; 2233,6; 2287,5; 2369,6; 2404,7; 2514,8; 2566,5; 2634,6; 2732,7; 2933,9; 3196,9; 3260,0; 3311,1

Z tabulky 12 lze vidět, že u všech druhů masa byly nalezeny unikátní hodnoty  $m/z$  a bylo možné syrové maso pomocí nich rozlišit. Nejvíce hodnot bylo nalezeno pro vepřové maso, a to v celkovém počtu 30. Dalšími druhy masa, u kterých bylo nalezeno větší množství hodnot, bylo králičí v počtu 26 hodnot, rybí a kuřecí v identickém počtu 22 hodnot. V hovězím, krůtím a jelením mase se našlo po řadě 13, 9 a 8 unikátních hodnot. Nejméně unikátních hodnot bylo nalezeno v kachním mase, a to v celkovém počtu 6.

### 3.2.2 Pečené maso

V dalším kroku proběhlo srovnání pouze pečených mas za účelem jejich rozlišení podle zvířecího druhu. Postup byl identický postupu v podkapitole 3.1, lišil se pouze v typu úpravy, která byla zkoumána.

**Tabulka 13:** Unikátní hodnoty *m/z* pro pečené maso

Druh masa	Hodnoty <i>m/z</i>
Hovězí maso	913,9; 1036,9; 1073,9; 1086,9; 1100,9; 1129,9; 1153,9; 1394,2; 1528,4; 1530,2; 1602,2; 1641,3; 1772,4; 2217,8; 2219,8
Jelení maso	951,0; 1246,2; 1280,2; 1437,3; 1609,5; 1881,7; 1913,9; 1995,9; 2050,9; 2220,1; 2328,3; 2461,3; 2589,5; 3646,2
Kachní maso	1591,6; 1908,8; 1939,8
Králíčí maso	944,9; 1027,0; 1052,0; 1054,0; 1250,2; 1285,2; 1300,2; 1342,3; 1399,4; 1423,3; 1474,4; 1476,4; 1529,4; 1542,5; 1563,6; 1573,4; 1656,6; 1690,6; 1712,6; 1759,6; 1764,5; 1842,7; 1856,7; 1880,7; 1884,8; 2009,8; 2108,0; 2135,9; 2143,0; 2152,1; 2243,0; 2433,2; 2439,4; 2561,4; 2733,4
Krůtí maso	928,9; 1045,9; 1062,9; 1152,1; 1371,2
Kuřecí maso	1353,2; 1392,2; 1460,2; 1512,3; 1531,3; 1548,3; 1619,4; 1684,5; 1706,4; 1723,4; 1731,5; 1749,5; 1779,5; 1804,5; 1870,6; 1906,5; 1936,7; 1967,7; 2037,8; 2077,8; 2115,6; 2189,9; 2244,0; 2251,8; 2316,9; 2382,9; 2439,0; 2500,2; 2567,1; 2605,2; 2619,1; 2659,2; 2689,2; 2776,4; 3048,7
Rybí maso	910,0; 960,9; 1050,9; 1386,4; 1398,2; 1430,3; 1496,4; 1900,9; 2457,5
Vepřové maso	905,8; 1010,9; 1067,9; 1117,9; 1491,2; 1523,1; 1542,0; 1609,2; 1690,2; 1758,3; 1773,4; 1907,4; 1927,2; 2055,4; 2123,6; 2142,5; 2149,6; 2151,6; 2233,7; 2374,7; 2634,9

I zde lze z tabulky 13 vidět, že byly nalezeny unikátní hodnoty u všech druhů mas, a tedy i v upraveném stavu lze různé druhy mas od sebe odlišit pomocí unikátních hodnot *m/z*. Nejvíce hodnot bylo nalezeno u kuřecího a králíčího masa. U obou se jednalo o celkový počet 35 hodnot. Následovalo vepřové maso, ve kterém se našlo 21 unikátních hodnot. U hovězího a jeleního masa bylo nalezeno 15 a 14 unikátních hodnot v tomto pořadí. Dále se u rybího masa vyskytovalo osm hodnot, u krůtího masa pět hodnot a nejméně hodnot bylo u kachního masa, a to tři hodnoty.

Ve srovnání s počtem hodnot získaných ze spekter pečeného masa je u některých druhů mas více unikátních hodnot než v syrové formě. Například počet unikátních hodnot syrového kuřecího masa byl 22 a počet u pečeného kuřecího masa byl 35, tedy více než u syrového. To mohlo být způsobeno tím, že některé části proteinu nebyly pro trypsin snadno dostupné a během tepelné úpravy, kdy některé proteiny denaturovaly, se některé z těchto částí staly dostupnými ke štěpení (Velíšek, 2014).

### 3.2.3 Pečené maso se solí

V této podkapitole proběhlo srovnání pečených mas se solí a obdobně jako v předchozích dvou podkapitolách se i zde hledaly unikátní hodnoty k rozlišení masa na základě zvířecího

druhu. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14. Postup byl identický k postupu v kapitole 3.1. Z uvedené tabulky 14 lze vyčíst, že i zde byly nalezeny unikátní hodnoty  $m/z$ , podle kterých lze maso rozlišit. Nejvíce unikátních hodnot bylo nalezeno u králičího masa – 28. V hovězím a rybím masu bylo nalezeno obdobné množství unikátních hodnot, a to 23 a 21. Dále v kuřecím a vepřovém masu se vyskytovalo 17 a 10 hodnot. A nejméně unikátních hodnot bylo nalezeno u krůtího, jeleního a kachního masa (po řadě 5, 3 a 3).

**Tabulka 14:** Unikátní hodnoty  $m/z$  pro pečené maso se solí

Druh masa	Hodnoty $m/z$
Hovězí maso	913,9; 950,9; 1070,0; 1086,9; 1100,9; 1153,9; 1220,9; 1299,2; 1394,3; 1431,1; 1502,2; 1602,3; 1641,2; 1670,3; 1688,4; 1741,4; 1772,4; 1887,6; 1913,5; 2202,8; 2501,0; 3197,5; 3645,8; 3647,8
Jelení maso	1881,8; 2589,4; 3198,0
Kachní maso	945,2; 1243,4; 1336,4
Králičí maso	1026,9; 1054,0; 1072,9; 1300,2; 1342,3; 1529,4; 1539,4; 1542,4; 1578,4; 1656,6; 1667,5; 1759,6; 1764,5; 1842,6; 1856,7; 1975,9; 2009,8; 2014,9; 2107,9; 2129,9; 2135,9; 2242,9; 2418,2; 2433,2; 2561,3; 2635,4; 2647,5
Krůtí maso	928,9; 1099,0; 1152,0; 1371,2; 1482,3
Kuřecí maso	1343,2; 1512,4; 1619,4; 1662,6; 1689,5; 1779,6; 1839,7; 1870,6; 1897,7; 1936,8; 2115,9; 2256,0; 2316,9; 2439,0; 2567,2; 2579,2; 2605,3; 2619,2;
Rybí maso	960,9; 1250,3; 1254,3; 1294,1; 1309,3; 1374,5; 1386,2; 1398,3; 1433,4; 1465,5; 1496,5; 1564,5; 1597,4; 1646,6; 1744,7; 1766,7; 1855,7; 1900,8; 2120,1; 2229,3; 2863,3
Vepřové maso	1067,8; 1264,2; 1349,2; 1491,3; 1523,2; 1609,3; 1758,4; 1927,5; 2036,7; 2055,6

### 3.2.4 Tepelně stabilní hodnoty $m/z$

Při bližším porovnání hodnot z tabulek 12 a 13 lze nalézt několik hodnot, které se vyskytují v obou tabulkách napříč všemi živočišnými druhy masa. Jedná se tedy o hodnoty  $m/z$ , které byly nalezeny jak v syrovém, tak i v pečeném masu a které byly odolné vůči tepelnému zpracování. Jinak řečeno jsou tepelně stabilní pro zvolenou úpravu. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 15. Tyto hodnoty by se daly považovat za více spolehlivé, protože se musely vyskytovat ve všech seznamech s hodnotami  $m/z$  syrového i pečeného masa. Alespoň jedna hodnota byla nalezena u všech druhů mas. Celkem čtyři hodnoty byly nalezeny u tří druhů, a to u masa vepřového, králičího a rybího. U kuřecího masa to byly celkem tři hodnoty. Hovězímu a jelenímu masu náležely každému dvě hodnoty. Nejméně hodnot, a to jedna, bylo nalezeno u kachního a krůtího masa.

**Tabulka 15:** Unikátní tepelně stabilní hodnoty *m/z* (tučně vyznačené hodnoty byly nalezeny i v pečeném mase se solí)

Druh masa	Hodnoty <i>m/z</i>
Hovězí maso	<b>1086,9</b> ; 1530,3
Jelení maso	1437,3; 1609,5
Kachní maso	1908,8
Králičí maso	1250,1; <b>1764,6</b> ; <b>1856,6</b> ; 1884,6
Krůtí maso	<b>1371,3</b>
Kuřecí maso	1967,7; 2189,8; 2689,2
Rybí maso	<b>1386,4</b> ; <b>1398,5</b> ; <b>1900,8</b> ; 2475,4
Vepřové maso	1907,3; 2151,5; 2233,6; 2634,6

Některé z hodnot z tabulky 15 byly nalezeny v syrovém a pečeném mase, ale i v pečeném mase s přidanou solí (tabulka 14). Tyto hodnoty byly nejen odolné vůči tepelnému zpracování, ale i vůči působení soli. Výskyt těchto hodnot byl opět ve všech seznamech hodnot *m/z* pečeného masa se solí. Nicméně takové hodnoty byly nalezeny jen u čtyř druhů z osmi. Mezi tyto druhy patřilo hovězí maso a krůtí maso, kde u obou byla nalezena jedna hodnota. Dále u králičího masa byly nalezeny dvě hodnoty a nejvíce hodnot bylo nalezeno u ryby, kde to byly celkem tři hodnoty.

### 3.2.5 Využití

Hodnoty uvedené v podkapitolách 3.2.1, 3.2.2 a 3.2.3 umožňují rozlišení živočišných druhů masa v různých typech úprav. Unikátní hodnoty mohou sloužit nejen k identifikaci druhu masa, ale i k odhalení případného falšování. Například k odhalení jiného druhu masa nežli toho, který byl uveden na obale výrobku. Především u mletého masa, kdy je náročnější odhalit, že došlo k nahrazení větší části objemu jiným masem pouhým okem, může být tato metoda vhodná. Nicméně je nutno dodat, že nalezení charakteristických hodnot znamená pouze možný výskyt jiného druhu masa ve vzorku, a nikoliv zjištění v jakém množství se ve vzorku vyskytuje. Chung a Hellberg (2020) v případě mletého masa např. uvádějí nalezení jen stopového množství vepřového masa u mletého hovězího masa. S využitím real-time PCR testovali různé úrovně vyčištění industriálního mlýnku (úplné, částečné a žádné). Vepřové maso bylo v mletém hovězím mase nalezeno i při částečném vyčištění industriálního mlýnku, a autoři tak uvádějí, že při nedostačeném vyčištění nástrojů dochází ke kontaminaci hovězího masa vepřovým. Pro definitivní určení, zda se jedná o falšování, a nikoliv o pouhou kontaminaci jako výše, je nutné maso podrobit dalšímu testování.

Nalezení charakteristických hodnot  $m/z$  ale může sloužit jakožto první krok k vytipování mas, které by bylo vhodné dále testovat.

Hodnoty nalezené u obou opracovaných druhů mas (tabulka 13 a 14) by bylo možné využít pro autentizaci masných výrobků či odhalení jejich falšování. Tepelná úprava patří mezi jedny z hlavních úprav používaných ve výrobě masných výrobků, jak dokládá i kapitola 1. V případě masných výrobků nastává přitom obdobný případ jako u mletého masa. Odhalení falšování druhu masa je pouhým okem obvykle problematictější než u masa výsekového, a proto je vhodnější volit analytické metody. Falšováním masa a masných výrobků se z hlediska typů provedení zabývá podrobněji podkapitola 1.5.

### **3.3 Rozlišení masa na základě druhu úpravy**

Při posledním srovnání došlo k vzájemnému porovnání seznamů vztahujících se k jednomu druhu masa, např. vepřovému, viz kapitola 3. Seznamy se tedy neporovnávaly s ostatními druhy masa, ale sledovalo se, zda by bylo možné nalézt unikátní hodnoty pro určení typu úpravy, kterému bylo maso podrobeno. Nejprve byly nalezeny hodnoty  $m/z$ , s tolerancí  $\pm 0,3$   $m/z$ , které se vyskytovaly ve všech devíti seznamech s hodnotami  $m/z$  syrového masa patřícímu jednomu živočišnému druhu. Obdobně proběhlo srovnání i pečeného masa a pečeného masa se solí. Takto vzniklé tři zúžené seznamy s hodnotami  $m/z$  byly porovnány vzájemně a hodnoty opakující se ve více seznamech než pouze v jednom byly vyřazeny. Takto byly nalezeny hodnoty  $m/z$  unikátní pro způsob zpracování jednoho živočišného druhu (vše opět s tolerancí  $\pm 0,3$   $m/z$ ). Jediná výjimka byla u jeleního masa, kde limit výskytu byl v osmi seznamech z celkových devíti, protože pro vyšší ze dvou zmíněných seznamů nebyly nalezeny hodnoty pro pečené maso se solí a nebylo možné typy úprav pro toto maso rozlišit. Tyto hodnoty jsou pro každý zvířecí druh uvedeny v tabulce 16.

**Tabulka 16: Unikátní hodnoty m/z pro určení typu úpravy jednotlivých druhů mas**

Druh masa	Typ úpravy	Počet hodnot m/z	Hodnoty m/z
Hovězí maso	Syrové	27	957,9; 960,9; 989,9; 998,9; 1050,9; 1117,9; 1126,9; 1171,1; 1343,2; 1491,3; 1538,2; 1593,3; 1601,5; 1633,4; 1731,5; 1802,6; 1820,5; 1887,9; 1927,6; 1956,8; 1995,7; 2151,9; 2161,0; 2246,8; 2439,0; 2502,1; 2515,5
	Pečené	8	1036,9; 1073,9; 1129,9; 1528,4; 1563,2; 2217,8; 2219,8; 2417,9
	Pečené se solí	21	924,8; 945,9; 950,9; 1010,8; 1079,0; 1297,0; 1299,2; 1399,2; 1474,2; 1502,2; 1635,4; 1688,4; 1723,4; 1728,5; 1741,4; 1908,5; 2142,7; 2501,0; 3197,5; 3645,8; 3647,8
Jelení maso	Syrové	27	917,9; 970,9; 989,9; 998,9; 1023,9; 1038,0; 1051,0; 1117,2; 1128,2; 1154,0; 1171,3; 1265,2; 1308,3; 1359,5; 1370,4; 1374,4; 1431,4; 1435,4; 1511,4; 1538,4; 1624,6; 1628,6; 1633,6; 1640,5; 1651,5; 3198,5; 3261,5
	Pečené	22	945,9; 1145,1; 1184,2; 1221,1; 1234,1; 1280,2; 1474,3; 1476,3; 1494,4; 1539,4; 1563,4; 1635,5; 1670,5; 1764,5; 1973,9; 2055,9; 2220,0; 2328,3; 2418,1; 2839,7; 3473,0; 3646,3
	Pečené se solí	13	1010,9; 1037,1; 1130,0; 1442,4; 1529,3; 1593,5; 1723,6; 1753,6; 1772,6; 1813,6; 1987,8; 2234,2; 2439,2
Kachní maso	Syrové	22	918,7; 976,9; 1002,9; 1028,9; 1032,9; 1128,0; 1130,9; 1297,2; 1328,2; 1358,9; 1500,3; 1633,4; 1653,3; 1766,4; 1791,2; 1886,5; 1906,7; 1956,8; 2130,9; 2213,9; 2439,2; 2567,3
	Pečené	10	1591,6; 1808,8; 1839,8; 1897,8; 1909,8; 1927,8; 1939,9; 1987,9; 2116,0; 3198,0
	Pečené se solí	5	1130,3; 1184,2; 1243,4; 1336,4; 1398,6
Králičí maso	Syrové	36	902,9; 971,9; 998,9; 1002,9; 1028,9; 1110,0; 1128,1; 1135,9; 1146,0; 1268,1; 1315,2; 1333,1; 1343,2; 1356,2; 1427,3; 1447,2; 1449,2; 1491,3; 1511,3; 1538,3; 1601,4; 1616,5; 1641,4; 1647,4; 1651,4; 1672,4; 1689,5; 1702,4; 1731,6; 1854,7; 1887,6; 2213,9; 2272,9; 2369,9; 2438,9; 2635,0; 3197,7
	Pečené	12	944,9; 1052,0; 1221,2; 1423,3; 1476,4; 1573,4; 1712,6; 1880,7; 2143,0; 2152,1; 2439,4; 2733,4
	Pečené se solí	5	1082,9; 1130,1; 1723,5; 2418,2; 2647,5
Krutí maso	Syrové	25	1029,3; 1285,3; 1300,3; 1383,3; 1637,4; 1658,6; 1731,6; 1770,7; 1791,7; 1839,8; 1897,7; 1909,7; 1956,9; 2104,0; 2150,1; 2216,0; 2383,9; 2439,2; 2486,3; 2515,3; 2567,3; 2605,4; 2614,4; 3065,9; 3197,9
	Pečené	6	924,9; 1045,9; 1062,9; 1264,2; 1477,4; 1516,3
	Pečené se solí	7	1099,0; 1157,1; 1399,3; 1482,3; 1500,3; 1536,5; 1623,4
Kuřecí maso	Syrové	34	1128,0; 1157,0; 1265,0; 1313,2; 1325,1; 1374,2; 1383,1; 1451,1; 1472,2; 1474,2; 1484,2; 1538,2; 1588,3; 1616,4; 1624,4; 1629,4; 1637,3; 1641,3; 1658,4; 1712,4; 1724,5; 1760,4; 1770,5; 1805,5; 1816,5; 1906,5; 1913,5; 1975,6; 1982,6; 1995,7; 2018,6; 2153,8; 2566,8; 2708,3
	Pečené	28	924,9; 1221,0; 1353,2; 1392,2; 1460,2; 1531,3; 1548,4; 1684,5; 1706,4; 1723,2; 1728,5; 1731,5; 1749,5; 1804,5; 1808,6; 1908,5; 2014,6; 2037,8; 2077,8; 2115,6; 2244,0; 2251,8; 2382,9; 2500,2; 2659,2; 2776,4; 3048,7; 3197,7
	Pečené se solí	9	945,9; 1011,0; 1037,9; 1536,4; 1623,4; 1635,5; 1662,6; 2256,0; 2579,2
Rybí maso	Syrové	23	998,9; 1043,2; 1054,1; 1078,1; 1128,2; 1207,4; 1241,3; 1256,3; 1278,3; 1403,4; 1460,5; 1526,6; 1558,6; 1624,7; 1658,6; 1714,8; 1768,8; 1818,8; 1895,9; 2347,3; 2475,4; 3167,9; 3473,2
	Pečené	9	1655,5; 1711,6; 1995,9; 2095,9; 2329,3; 2433,2; 2448,4; 2457,5; 2619,4
	Pečené se solí	5	907,9; 1744,7; 1873,7; 2077,1; 2863,3
Vepřové maso	Syrové	42	902,7; 960,7; 989,7; 1101,7; 1126,8; 1264,8; 1300,0; 1358,9; 1374,9; 1381,9; 1427,0; 1434,9; 1490,9; 1500,0; 1510,9; 1537,9; 1640,0; 1651,0; 1667,1; 1676,1; 1731,2; 1764,1; 1772,2; 1800,3; 1839,2; 1956,4; 1967,3; 1975,2; 2177,5; 2185,4; 2213,5; 2287,5; 2369,6; 2404,7; 2438,7; 2514,8; 2566,6; 2732,7; 2933,9; 3196,9; 3260,0; 3311,1
	Pečené	17	905,8; 907,8; 976,8; 1221,0; 1269,9; 1343,1; 1539,2; 1542,0; 1578,2; 1635,2; 1773,4; 2123,6; 2149,6; 2202,6; 2246,8; 2374,8; 2635,0
	Pečené se solí	7	1297,1; 1349,2; 1563,3; 1809,5; 1908,7; 1975,6; 2036,7



V tomto případě bylo zjištěno, že určení způsobu úpravy pomocí nalezených unikátních hodnot  $m/z$  u jednotlivých druhů mas je možné, protože u každého druhu masa bylo nalezeno dostatečné množství unikátních hodnot pro toto rozlišení, viz tabulka 16. Využitelnost těchto hodnot by byla možná například při analýze neznámého vzorku masa, kde by tyto hodnoty sloužily k zjištění dodatečných informací o vzorku, v tomto případě by se jednalo o typ úpravy. Dalším využitím by bylo ověření, zda maso prošlo deklarovaným způsobem úpravy. Nejvíce hodnot  $m/z$  bylo nalezeno vždy u porovnávání syrového masa u všech zkoumaných druhů mas. Jejich počty se pohybovaly v rozmezí 42 až 22 hodnot, kdy nejvíce jich bylo nalezeno u vepřového, a to zmíněných 42, a nejméně 22 u kachního masa. U pečeného masa se počty  $m/z$  hodnot pohybovaly v rozmezí 28 až 6. Zde počty nalezených  $m/z$  hodnot byly nižší než u syrového masa. Nejvíce hodnot náleželo kuřecímu masu – 28, a nejméně krůtímu – šest. U pečeného masa se solí bylo nalezeno nejméně  $m/z$  hodnot ze všech tří typů uprav. Ty se vyskytovaly v rozmezí 21 až 5 hodnot. Zmíněných 21 hodnot se vyskytovalo u hovězího masa a počet pět hodnot byl nalezen u více druhů masa u kachního, rybího a u králičího. Pouze u dvou druhů masa nastala situace, kdy bylo nalezeno více  $m/z$  hodnot u masa pečeného se solí nežli u masa pečeného. Jednalo se o maso krůtí, kde počet  $m/z$  hodnot pečeného masa byl celkem šest, ale počet  $m/z$  hodnot pečeného masa se solí byl sedm. U masa hovězího byl rozdíl více znatelný. U pečeného masa bylo nalezeno hodnot celkem osm oproti tomu u masa pečeného se solí bylo nalezeno celkem 21 hodnot.

## Závěr

V této bakalářské práci s názvem Rozlišení živočišného původu masa na základě proteomické analýzy byla napsána teoretická část, která se nejprve zaměřovala na úvod do problematiky spotřeby masa a jakou část jídelníčku tvoří ve společnosti. Dále se zaměřovala na složení masa jako takového, na popis jeho jednotlivých částí a porovnání různých živočišných druhů na základě tohoto složení. Byla sepsána rešeršní část o různých metodách využívaných při odhalování falšování masa a masných výrobků. Následně byla popsána i zmíněná problematika falšování masa a masných výrobků. V další řadě byla napsána experimentální část, kde byly popsány použité metody, příprava vzorků a jejich popis. Dále bylo popsáno, jakým způsobem byly vzorky upraveny na další analýzu. V poslední řadě následoval samotný popis analýzy vzorků. Získané výsledky byly v několika kapitolách odprezentovány. Vytyčenými cíli práce byly – nalezení unikátních hodnot  $m/z$  a dále živočišné rozlišení masa bez ohledu na jeho úpravu a rozlišení masa s ohledem na úpravu, kde se jednalo o syrové, pečené a pečené maso se solí a rozlišení typu úpravy masa. Vše pomocí proteomické analýzy realizované pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. První cíl se povedlo naplnit pouze částečně. Jedno ze zkoumaných mas se nepodařilo uvedeným způsobem (bez ohledu na úpravu) rozlišit, a jednalo se o kachní. Nebyla zde nalezena ani jedna unikátní hodnota  $m/z$ . Zbylé druhy se rozlišit podařilo. Druhý cíl byl zcela naplněn, protože se všechny druhy masa povedlo rozlišit v každé analyzované úpravě, tedy jak v syrovém, tak i v pečeném mase i pečeném mase se solí. Zde při srovnání jednotlivých výsledných hodnot byly nalezeny i tepelně stabilní peptidy, které nedenaturovaly, a některé z nich byly nalezeny i po přidání soli, a tedy nebyly solí denaturovány. Poslední cíl – rozlišení typu úpravy – byl také naplněn zcela. V tomto případě se povedlo všechny druhy masa na základě jejich úpravy rozlišit. Nalezené hodnoty lze tedy využít při identifikaci či odhalování falšování masa nebo masných výrobků. Využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro nalezení unikátních hodnot  $m/z$  masa bylo tím pádem úspěšné a zjištění zmíněná výše indikují možnost využití této metody pro identifikaci masných výrobků.

## Seznam použitých zkratk

2-DE	Dvoudimenzionální elektroforéza
AK	Aminokyseliny
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
ČSÚ	Český statistický úřad
DHB	2, 5 – Dihydroxybenzoová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
EMK	Esenciální aminokyseliny
ESI	Elektrosprejová ionizace
FAO	Food Agriculture Organization of the United Nations
GC	Plynová chromatografie
IEF	Isoelektrická fokusace
IR	Infračervená spektroskopie
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MALDI-TOF	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem času letu
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MIR	Středně blízká infračervená spektroskopie
NIR	Blízká infračervená spektroskopie
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCA	Analýza hlavních komponent
PCR	Polymerní řetězová reakce
Q	Kvadrupólový detektor
Q-TOF	Kvadrupólový detektor v kombinaci s detektorem doby letu

RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SDS	Dodecyl síran sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecyl síranu sodného
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TFA	Trifluoroctová kyselina
TOF	Detektor doby letu
WHO	Mezinárodní zdravotnická organizace

## Seznam použitých zdrojů

- Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., Prpić, J., Jemersić, L., & Pleadin, J. (2018). Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, 246, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>
- Agregán, R., Pateiro, M., Kumar, M., Franco, D., Capanoglu, E., Dharma, K., & Lorenzo, J. M. (2023). The potential of proteomics in the study of processed meat products. *Journal of Proteomics*, 270, 104744. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104744>
- Ahmad, R. S., Imran, A., & Hussain, M. B. (2018). Nutritional Composition of Meat. In M. S. Arshad (Ed.), *Meat Science and Nutrition* (s. 61-77). IntechOpen. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77045>
- Akhatova, D., Zdeňková, K., Koncošová, M., & Demnerová, K. (2018). Aktuální metody používané pro odhalení falšování masa a masných výrobků. *Chemické listy*, 112(4), 207-214.
- Alikord, M., Momatz, H., Keramat, J., Kadivar, M., & Rad, A. H. (2018). Species identification and animal authentication in meat products: a review. *Journal of food Measurement and Characterization*, 12, 145-155. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9625-z>
- Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.010>
- Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*, 17(2), 214-220. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2006.00046.x>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., & Karlsson, A. H. (2009). Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration. *Meat Science*, 83(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>

- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Bekhit, A. E., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2021a). Emerging processing technologies for improved digestibility of muscle proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 226-239. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.010>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Bekhit, A. E., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2021b). Thermal processing implication on the digestibility of meat, fish and seafood proteins. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *20*(5), 4511-4548. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12802>
- Bouchal, P., & Kučera, I. (2003). Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: Principy a aplikace. *Chemické listy*, *97*(1), 29-36.
- Candoğan, K., Altuntas, E. G., & İğci, N. (2021). Authentication and Quality Assessment of Meat Products by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Food Engineering Reviews*, *13*(1), 66-91. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09251-y>
- Collinsová, M., & Jiráček, J. (2004). Současný vývoj v proteomice. *Chemické listy*, *98*(12), 1112-1118.
- Cozzolino, D., & Murray, I. (2004). Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, *37*(4), 447-452. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.013>
- Czech-Zaľubská, K., Klich, D., Jackowska-Tracz, A., Didkowska, A., Bogdan, J., & Anusz, K. (2023). Dyes used in Processed Meat Products in the Polish Market, and their Possible Risks and Benefits for Consumer Health. *Foods*, *12*(13), 2610. <https://doi.org/10.3390/foods12132610>
- Český statistický úřad. (2023, 12. prosinec). *Česká republika od roku 1989 v číslech - aktualizováno 12.12.2023*. Český statistický úřad. <https://www.czso.cz/csu/czso/ceska-republika-od-roku-1989-v-cislech-aktualizovano-12122023>
- Čížková, H., Ševčík, R., Rajchl, A., Pivoňka, J., & Voldřich, M. (2012). Trendy v autenticitě potravin a v přístupech detekci falšování. *Chemické listy*, *106*(10), 903-910.
- Daniel, C. R., Cross, A. J., Koebnick, C., & Sinha, R. (2011). Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutrition*, *14*(4), 575-583. <https://doi.org/10.1017/S1368980010002077>

- De Smet, S., & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health: A review. *Meat Science*, *120*, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.008>
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, *312*(5771), 212-216. <http://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Du, J., Gan, M., Xie, Z., Zhou, C., Li, M., Wang, M., Dai, H., Huang, Z., Chen, L., Zhao, Y., Niu, L., Zhang, S., Guo, Z., Wang, J., Li, X., Shen, L., & Zhu, L. (2023). Current progress on meat food authenticity detection methods. *Food Control*, *152*, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109842>
- Dvořáková, P., Hernychová, L., & Vojtěšek, B. (2014). Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická onkologie*, *27*(1), 104-109.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (n. d.). *FAO Meat Price Index*. <https://fao.org/markets-and-trade/commodities/meat/fao-meat-price-index/en/>
- Food Standards Agency. (2002). *McCance and Widdowson's The Composition of Foods* (6. vyd). The Royal Society of Chemistry.
- Giromini, C., & Givens, D. I. (2022). Benefits and risks associated with meat consumption during key life processes and in relation to the risk of chronic diseases. *Foods*, *11*(14), 2063. <https://doi.org/10.3390/foods.11142063>
- Gremaud, G., Karlen, S., & Hulliger, K. (2002). Analytical methods for the Authentication of Meat and Meat Products: Recent Developments. In *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* (Vol. 93, s. 481-501).
- Grundy, H. H., Brown, L. C., Romero, M. R., & Donarski, J. A. (2023). Review: Methods to determine offal adulteration in meat products to support enforcement and food security. *Food Chemistry*, *399*, 133818. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133818>
- Herrero, B., Vieites, J. M., & Espineira, M. (2011). Authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. *Food Chemistry*, *127*(3), 1268-1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.070>
- Hyypä, S., Räsänen, L. A., & Pösö, A. R. (1997). Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *American Journal of Veterinary Research*, *58*(2), 162-166. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1997.58.02.162>

- Chung, S. M., & Hellberg, R. S. (2020). Effects of poor sanitation procedure on cross-contamination of animal species in ground meat products. *Food Control*, *109*, 106927. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106927>
- Kowalczyk-Akimowicz, M., & Bucka-Kolendo, J. (2020). MALDI-TOF MS - application in food microbiology. *Acta biochimica Polonica*, *67*(3), 327-332. [https://doi.org/10.18388/abp.2020\\_5380](https://doi.org/10.18388/abp.2020_5380)
- Kralik, G., Kralik, Z., Grčević, M., & Hanžek, D. (2018). Quality of chicken meat. In B. Yücel, T. Taşkin (Eds.), *Animal Husbandry and Nutrition* (s. 63-95). IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72865>
- Lawrie, R. A. (2006). *Lawrie's meat science* (7. vyd). Woodhead Publishing Limited.
- Li, Y.-C., Liu, S.-Y., Meng, F.-B., Liu, D.-Y., Zhang, Y., Wang, W., & Zhang, J.-M. (2020). Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat adulteration. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *19*(4), 2256-2296. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12579>
- Manning, L., & Soon, J. M. (2019). Food fraud vulnerability assesment: Reliable data sources and effective assesment approaches. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.007>
- Marvin, L. F., Roberts, M. A., & Fay, L. B. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chmica Acta*, *337*(1-2), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.08.008>
- Montowska, M., & Fornal, E. (2017). Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products. *Food Chemistry*, *237*, 1092-1100. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.059>
- Montowska, M., & Pospiech, E. (2007). Species identification of meat by electrophoretic methods. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *6*(1), 5-16.
- Montowska, M., & Pospiech, E. (2010). Authenticity Determination of Meat and Meat Products on the Protein and DNA Basis. *Food Reviews International*, *27*(1), 84-100. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.518297>
- Nařízení evropského parlamentu a rady (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. (2011). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R1169&qid=1713099672539#d1e1266-18-1>.



- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013. (2013). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32013R1308&qid=1688596328565>.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 853/2004. (2004). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32004R0853&qid=168855792528>.
- Odstrčil, J., & Odstrčilová, M. (2006). *Chemie potravin*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů.
- Oomen, C. M., Feskens, E. J., Räsänen, L., Fidanza, F., Nissinen, A. M., Menotti, A., Kok, F. J., & Kromhout, D. (2000). Fish Consumption and Coronary Heart Disease Mortality in Finland, Italy, and the Netherlands. *American Journal of Epidemiology*, *151*(10), 999-1006.
- Pereira, P. M., & Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, *93*(3), 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Perestam, A., Fujisaki, K. K., Nava, O., & Hellberg, R. S. (2017). Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control*, *71*, 346-352. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016/07.017>
- Primrose, S., Woolfe, M., & Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(12), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.006>
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, *73*(11), 2064-2077. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016>
- Rahmati, S., Julkapli, N. M., Yehye, W. A., & Basirun, W. J. (2016). Identification of meat origin in food products: Review. *Food Control*, *68*, 379-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.013>
- Rau, J., Hiller, E., Mannig, A., Dyk, M., Wenninger, O., Stoll, P., Wibbelt, G., & Schreiter, P. (2021). Animal Species Identification of Meat using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Aspects of Food Control and Animal Health*, *14*, 1-12. <https://doi.org/10.48414/aspects2021/14>

- Sentandreu, M. A., & Sentandreu, E. (2011). Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Science*, 89(3), 280-285. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.028>
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2012, 20. prosinec). *Inspekce zjistila kuřecí maso falšované přidáním až 15 % vody*. <https://szpi.gov.cz/clanek/inspekce-zjistila-kuřecí-maso-falšovane-pridaním-az-15-vody.aspx>
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. (2019, 11. únor). *Potravinářská inspekce zjistila v restauracích tři případy klamaní spotřebitele o původu hovězího masa a desítky případů absence nabývacích dokladů*. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/potravinarska-inspekce-zjistila-v-restauracich-tri-pripady-klamani-spotrebitele-o-puvodu-hoveziho-masa-a-desitky-pripadu-absence-nabyvacich-dokladu.aspx>
- Steinhauser, L. (2000). *Produkce masa*. Last.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70(3), 493-508. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.021>
- Velíšek, J. (2014). *The Chemistry of Food*. Wiley Blackwell.
- Visciano, P., & Schirone, M. (2021). Food Frauds: Global incidents and misleading situations. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 424-442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.010>
- Vyhláška č. 69/2016 Sb., o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. (2016). [https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_vyhlaska-2016-69.html](https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2016-69.html)
- Vyhláška č. 417/2016 Sb., o některých způsobech označování potravin. (2016). <https://eagri.cz/public/portal/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/uplna-zneni/vyhlaska-2016-417>
- Warriss, P. D. (2000). *Meat Science An Introductory Text*. CABI.
- Whitton, C., Bogueva, D., Marinova, D., & Phillips, C. J. (2021). Are We Approaching Peak Meat Consumption? Analysis of Meat Consumption from 2000 to 2019 in 35 Countries and its Relationships to Gross Domestic Product. *Animals*, 11(12), 3466. <https://doi.org/10.3390/ani11123466>

- WHO. (2015). *Q&A on the carcinogenicity of the red meat and processed meat*. International agency for research of cancer: [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/11/Monographs-QA\\_Vol114.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/11/Monographs-QA_Vol114.pdf)
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64, 113-119. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x>
- Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. (1997). <https://eagri.cz/public/portal/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/uplnazneni/zakon-1997-110-potravinarska-vyroba>.
- Zhu, Y., Lin, X., Zhao, F., Shi, X., Li, H., Li, Y., Zhu, W., Xu, X., Li, C., & Zhou, G. (2015). Meat, dairy and plant proteins alter bacterial composition of rat gut bacteria. *Scientific reports*, 5(15220), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep15220>
- Zia, Q., Alawami, M., Mokhtar N., F. K., Nhari R., M. H., & Hanish, I. (2020). Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 324, 126664. <https://doi.org/j.foodchem.2020.126664>
- Zvereva, E. A., Kovalev, L. I., Ivanov, A. V., Kovaleva, M. A., Zherdev, A. V., Shishkin, S. S., Lisitsyn, A. B., Chernukha, I. M. & Dzantiev, B. B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*, 105, 46-52. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.001>