

Změna proteinového profilu hovězího masa v průběhu jeho zrání

Bc. Jitka Veselá

Diplomová práce
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka VESELÁ**
Osobní číslo: **T09677**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změna proteinového profilu hovězího masa
v průběhu jeho zrání**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte chemické složení hovězího masa a jeho základní vlastnosti.
2. Popište průběh postmortálních změn.

II. Praktická část

1. Pomocí SDS-PAGE stanovte profil molekulových hmotností vzorků hovězího masa v průběhu zrání.
2. Výsledky vyhodnoťte pomocí shlukové analýzy.
3. Vyhodnocené výsledky diskutujte s dostupnou literaturou.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] PIPEK, P. Technologie masa I, 3.vyd., VŠCHT, Praha 1993.
- [2] STEINHAUSER, L. a kol. Produkce masa, 1.vyd., Last, Brno 2000.
- [3] DAVÍDEK, J., VELÍŠEK, J., POKORNÝ, J. Chemical Changes during Food Processing, 4. vyd., Elsevier, Amsterdam 1990.
- [4] BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. Food Chemistry, 4. vyd., Springer, New York 2008.
- [5] ZEECE, M. G., WOODS, T. L., KEEN, M. A., REVILLE, W.J. Role of Proteinases and Inhibitors in Postmortem Muscle Protein Degradation. American Meat Science Association: 45th Reciprocal Meat Conference. 1992.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

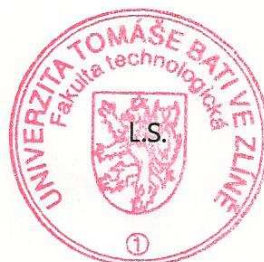
25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VESELÁ JITKA

Obor: CHTP - THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5.2011

Markéta Jitka

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací.

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na sledování změn proteinového profilu hovězího masa během jeho zrání. Proteinový profil byl zjišťován ve svalovině mladých býků pomocí metody SDS-PAGE. Vzorky masa byly analyzovány v různé fázi zralosti, od vzorků 24 hodin *post mortem* až po dobu zrání 4 týdnů. Proteiny byly zjišťovány v mase syrovém a také tepelně opracovaném. V teoretické části této práce je stručně popsána charakteristika masa, jeho chemické složení a biochemické a enzymatické procesy probíhající během zrání masa. Poznátky z teoretické části a výsledky z části praktické byly diskutovány s dostupnou literaturou. Ve vzorcích syrového masa byl zaznamenán vyšší počet detekovaných proteinů než ve vzorcích masa tepelně opracovaného.

Klíčová slova: hovězí maso, protein, zrání, SDS-PAGE

ABSTRACT

This thesis is focused on monitoring changes of the protein profile of beef during its aging. The protein profile was investigated in muscle of young bulls using the SDS-PAGE. The meat samples were analyzed at different stages of aging; fresh samples (up to 24 hours *post mortem*) and also matured meat (up to 4 weeks of ripening) were observed. Proteins were determined in raw meat as well as meat after heat treatment. The characterization of meat, its chemical structure, biochemical and enzymatic processes during the aging of meat are shortly described in the theoretical part of this thesis. The knowledge of the theoretical part as well as practical results were along with the available literature discussed. Higher number of proteins was detected in the raw meat in comparison with meat that was heat-treated.

Keywords: beef, protein, aging, SDS-PAGE

Zde bych ráda poděkovala doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za jeho věnovaný čas, ochotu a vstřícnost při konzultacích a také za pomoc a rady při statistickém vyhodnocení výsledků.

Dále chci poděkovat doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za pomoc při vyhodnocení analyzovaných vzorků.

Veliké poděkování patří také Bc. Ludmile Zálešákové, DiS. za vstřícnost a za ochotu vždy pomoci při práci v laboratoři.

V neposlední řadě chci poděkovat svým nejbližším - manželovi, rodičům a dětem za velikou podporu, nemalou trpělivost a pomoc po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA MASA	13
1.1 HISTOLOGICKÁ STAVBA MASA.....	14
1.1.1 Svalová tkáň	15
2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ HOVĚZÍHO MASA	19
2.1 VODA	19
2.2 BÍLKOVINY	20
2.2.1 Bílkoviny sarkoplazmatické.....	22
2.2.2 Bílkoviny myofibrilární.....	22
2.2.3 Bílkoviny stromatické	25
2.3 OSTATNÍ SLOŽKY MASA.....	25
3 VLASTNOSTI MASA	28
3.1 BARVA	28
3.2 VAZNOST.....	29
3.3 KŘEHKOST.....	30
4 POSTMORTÁLNÍ ZMĚNY BĚHEM ZRÁNÍ MASA	31
4.1 PRAE RIGOR.....	31
4.2 RIGOR MORTIS	32
4.3 ZRÁNÍ MASA	33
4.4 HLUBOKÁ AUTOLÝZA	36
4.5 ABNORMÁLNÍ PRŮBĚH POSMRTNÝCH ZMĚN.....	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
5 CÍLE PRÁCE	40
6 METODIKA PRÁCE	41
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	41
6.2 ANALYZOVANÉ VZORKY	41
6.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ	45
6.4 SDS-PAGE.....	45
6.4.1 Nanášení vzorků a vlastní elektroforéza	47
6.4.2 Barvení a hodnocení gelů	47
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	48

7.1	OPTIMALIZACE VZORKŮ PRO SDS-PAGE	48
7.2	VÝSLEDKY PROTEINOVÉHO PROFILU HOVĚZÍHO MASA V PRŮBĚHU JEHO ZRÁNÍ	50
7.2.1	Proteinový profil hovězího masa býka A	51
7.2.2	Proteinový profil hovězího masa býka B	53
7.2.3	Proteinový profil hovězího masa býka C	54
7.2.4	Proteinový profil hovězího masa býka D	56
7.2.5	Proteinový profil hovězího masa býka E.....	57
7.2.6	Proteinový profil hovězího masa býka F.....	59
7.2.7	Proteinový profil hovězího masa býka G	60
7.2.8	Proteinový profil hovězího masa býka H	62
7.2.9	Proteinový profil hovězího masa býka I.....	64
7.3	DISKUZE.....	65
ZÁVĚR		68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		69
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		75
SEZNAM OBRÁZKŮ		76
SEZNAM TABULEK.....		77
SEZNAM PŘÍLOH.....		79

ÚVOD

Maso je součástí výživy nejméně 2 miliony let. Je nutričně velmi hodnotnou potravinou, sensoricky ceněnou a široce konzumovanou potravinou. Hovězí maso zaujímá ve výživě lidí celosvětově a dlouhodobě významnou pozici. V České republice se od roku 2001 pohybuje spotřeba hovězího masa zhruba na hodnotě 10 kg na průměrného obyvatele a rok. V roce 2009, který je zatím posledním statisticky hodnoceným rokem, je tato hodnota 9,5 kg na průměrného obyvatele a rok [1, 2].

Maso je velmi bohatý a univerzální zdroj živin a energie. Jeho primární význam spočívá v obsahu proteinů. Proteiny masa jsou označovány jako téměř plnohodnotné, jelikož obsahují všechny esenciální aminokyseliny a to ve vyváženém poměru z hlediska jejich využití pro stavbu tělních bílkovin člověka [3].

Maso je také významným zdrojem téměř všech vitaminů, nejvyšší podíl na krytí fyziologických potřeb lidského organismu zabezpečuje B₁₂ a další vitaminy skupiny B (riboflavin, niacin a pyridoxin). Z minerálních látek je maso zdrojem draslíku, vápníku, hořčíku a především železa, hovězí maso je navíc důležitým zdrojem zinku. Význam železa je dán zejména jeho vysokou využitelností oproti železu z rostlinných materiálů [9].

Maso jako potravinová surovina musí splňovat požadavky na zdravotní nezávadnost a požadavky nejen na kvalitu nutriční, ale také sensorickou, hygienickou, kulinární a technologickou. Maso jako potravinová komodita je materiálem velmi dynamicky se měnícím a spějícím ke zkáze. Všechny potravinářské technologie mají do svých postupů zařazeny také konzervační metody a principy, které vedou k udržitelnosti potravin nad jejich obvyklou mez. V případě masa je třeba velmi dobře znát průběh a dynamiku postmortálních biochemických změn [3].

U hovězího masa se v praxi jeví jako nejzávažnější problém jeho nedostatečné vyžrání. Hovězí maso zraje nejdéle z u nás využívaných zdrojů masa, což není příznivé z ekonomického hlediska, a proto se často vyskladňuje, distribuuje a zpracovává předčasně. Zkrácení doby zrání zhoršuje sensorické, technologické a kulinární vlastnosti hovězího masa [3, 13].

Kvalita českého hovězího masa je velice různorodá, má na ní podíl velký počet rozmanitých vlivů, zejména o jaký užitkový typ jde, zda mléčný či masný. Naším podmínkám vyhovuje kombinace obou těchto typů. Dalším vlivem je věk zvířat. Nejlepší sensorické a

kulinární vlastnosti vykazují jalovice a volci do dvou let věku. S prodlužujícím věkem krav se mění konformace kolagenu, textura masa se zhoršuje, maso se stává tužším a tvrdším. Také pohlaví ovlivňuje kvalitu, maso jalovic a volků bývá křehké a šŕavnaté s vyšším obsahem vnitrosvalového tuku, maso býků je sušší [1].

Maso dosahuje optimální kvality pro kulinární a technologické využití v různých časech *post mortem*, a to v závislosti na druhu masa a teplotě. Znalost, respektování a využití postmortálních změn je podmínkou optimálního uplatnění masa pro přípravu pokrmů v rodině nebo společném stravování a pro zpracování na bohatý sortiment výrobků z masa [4].

Diplomová práce se zabývá právě postmortálními změnami. Nejprve z teoretického hlediska je popsáno histologické a chemické složení masa, dále jsou popsány biochemické, strukturní a funkční změny svalové tkáně během zrání masa, zejména činnost endogenních enzymů. V praktické části jsou sledovány změny proteinových profilů devíti mladých býků. Proteinové profily byly zjištěny pomocí metody SDS-PAGE u lyofilizovaných vzorků masa syrového a tepelně opracovaného a následně prodiskutovány s dostupnou literaturou.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MASA

Za maso jsou považovány všechny části těl živočichů, včetně ryb a bezobratlých, v čerstvém nebo upraveném stavu, které se hodí k lidské výživě. V užším slova smyslu se však masem rozumí jen kosterní svalovina, a to buď samotná svalová tkáň nebo svalová tkáň včetně vmezeřeného tuku, cév, nervů, vazivových a jiných částí, které jsou ve svalovině obsaženy [5].

Nejčastějším zdrojem masa jsou domácí (domestikovaná) zvířata, zejména tzv. velká jatelná zvířata (skot, prasata, ovce, kozy) a drůbež (kuřata, slepice, kachny, husy, krůty, perličky), méně je využívána lovná zvěř, žijící volně nebo v chovu na farmách (jelen, srnec, prase divoké, zajíc, bažant) [7].

V nařízení evropského parlamentu a rady č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu se masem rozumí požitelné díly níže uvedených zvířat včetně krve:

- *Domácí kopytníci* – domácí skot, prasata, ovce, kozy a domácí lichokopytníci.
- *Drůbež* – domácí drůbež včetně ptáků, kteří nejsou považováni za domácí, ale jsou chováni jako domácí zvířata, s výjimkou běžců.
- *Zajícovci* – králíci, zajíci a hlodavci.
- *Volně žijící zvěř* – volně žijící kopytníci, zajícovci a jiní suchozemští savci, kteří jsou loveni k lidské spotřebě a jsou považováni za volně žijící zvěř dle právních předpisů daných členských států a také volně žijící ptáci, kteří jsou loveni k lidské spotřebě.
- *Farmová zvěř* – farmoví běžci (pštrosi) a suchozemští farmoví savci (daňci, jeleni, mufloni, divoká prasata), kteří nejsou uvedeni mezi domácími kopytníky.
- *Drobná volně žijící zvěř* – volně v přírodě žijící pernatá zvěř a zajícovci.
- *Velká volně žijící zvěř* – volně v přírodě žijící suchozemští savci, na které se nevztahuje definice drobné volně žijící zvěře [29].

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství České republiky č. 326/2001 Sb. v platném znění se rozumí hovězím masem maso mladého býka, býka, volka, jalovice a krávy. Pro účely této vyhlášky jsou definovány druhy hovězího masa:

- *Mladý býk* – nekastrované zvíře samčího pohlaví starší než 12 měsíců a do 24 měsíců včetně.
- *Býk* – nekastrované zvíře samčího pohlaví ve věku od 24 měsíců.
- *Volek* – kastrované zvíře samčího pohlaví starší než 12 měsíců.
- *Jalovice* – neotelené zvíře samičího pohlaví starší 12 měsíců.
- *Kráva* – zvíře samičího pohlaví starší 12 měsíců, která se již otelila [6].

Maso má složitou a velmi různorodou histologickou strukturu, proměnlivé chemické složení, technologické a organoleptické vlastnosti. Struktura i složení závisí na způsobu života, funkci jednotlivých částí těla a na řadě intravitálních vlivů (druh zvířat, plemeno, pohlaví, věk, způsob výživy, zdravotní stav), průběhu posmrtných změn i způsobu zpracování [8].

1.1 Histologická stavba masa

Struktura masa je tvořena buňkami uspořádanými do souborů – tkání. Tkáně jsou tvořeny populacemi buněk, které mají často podobnou morfológickou charakteristiku, jsou specializované pro vykonávání určité funkce a jsou stejného původu. Vznikají dělením a diferenciací buněk původních tkání. Prostor mezi buňkami vyplňuje mezibuněčná hmota. Je to tekutá až tuhá hmota, která obsahuje vlákna (fibrily) a lamely [5, 9].

V histologii masa rozdělujeme tkáně do pěti základních skupin:

- *Epitelová (výstelková) tkáň* – je to hraniční tkáň, která pokrývá povrch těla, vnitřních orgánů a tělních dutin. V mase tvoří epitel malý podíl.
- *Nervová tkáň* – je tvořena nervovými buňkami – neurony, jejichž výběžky tvoří nervová vlákna. Má fyziologickou schopnost dráždivosti. Vytváří nervovou soustavu (mozek, mícha, nervová vlákna). V těle jatečných zvířat zastoupena v malém množství.
- *Pojivová tkáň* – slouží jako mechanická opora, výplň, izolace, rezervoár tuku a minerálních látek, má i funkci exkretční a obrannou. Dle konzistence rozlišujeme tři typy – vaziva, chrupavky, kosti.

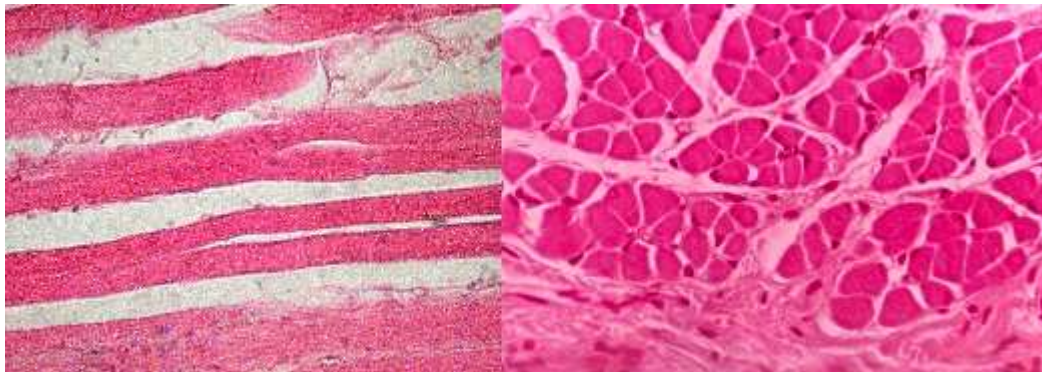
- *Svalová tkáň* – je to kontraktilní tkáň zvířat, má schopnost vykonávat pohyb orgánů. Tvoří převážnou složku masa.
- *Tkáňové tekutiny* [5, 7].

1.1.1 Svalová tkáň

Svalová tkáň (svalovina) je maso v užším slova smyslu. Při zpracování masa, jeho posmrtných změnách, vlastnostech apod. máme na mysli vždy především svalovou tkáň. Jejím základem jsou buňky nebo soubuní uspořádané do vyšších strukturálních úrovní. S její strukturou souvisí biochemické, organoleptické a technologické vlastnosti.

Základem její funkce je přeměna energie chemických vazeb na mechanickou práci. Podle buněčné stavby, vzhledu a způsobu inervace lze svalovou tkáň rozdělit do tří hlavních skupin:

- *Příčně pruhovaná svalovina* – je stavební tkání kosterních svalů.
- *Hladká svalovina* – je součástí vnitřních orgánů.
- *Srdeční svalovina* – tvoří jediný sval, srdce [5].



Obr. 1: Příčně pruhovaná svalovina (vlevo podélný řez, vpravo příčný řez) [10]

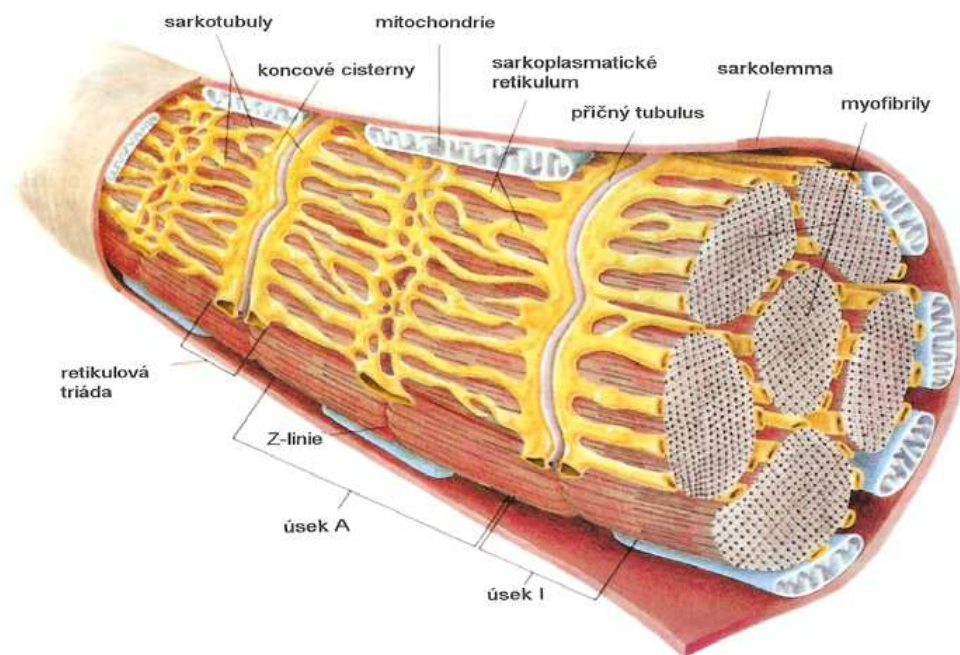
Příčně pruhovaná svalovina

Z technologického hlediska je příčně pruhovaná svalovina nejvýznamnější tkání, je masem v nejužším slova smyslu.

Příčně pruhovaná neboli žíhaná svalovina se vyvinula tam, kde se mohla upnout na pevný skelet a vytvářet s ním pohybový aparát. Je ovládána somatickým nervstvem, má příčné

pruhování, rychle kontrahuje, má krátkou dobu kontrakce a na kontrakci spotřebuje velké množství energie [5].

Příčně pruhované svaly mají složitou strukturu, vytváří se celá hierarchie několika strukturálních úrovní. Jednotlivé úrovně úzce souvisí s útvary pojivové tkáně, které tvoří vazivové obaly svalu a zajišťují úpon svalu na kost [5].



Obr. 2: Svalové vlákno [11]

Základní morfologickou a funkční jednotkou příčně pruhovaného svalu je svalové vlákno (viz obr.2). Dělíme je podle průměru na tenká (20 – 40 μm) a tlustá (až 100 μm). Tloušťka vláken závisí na druhu, pohlaví, věku, způsobu výživy apod., u skotu je průměrná tloušťka 40 – 70 μm . Délka svalových vláken je velmi variabilní a závisí na funkci svalu. Dosahuje až 15 cm, někdy se objevují i delší svalová vlákna až do 30 cm [5, 9].

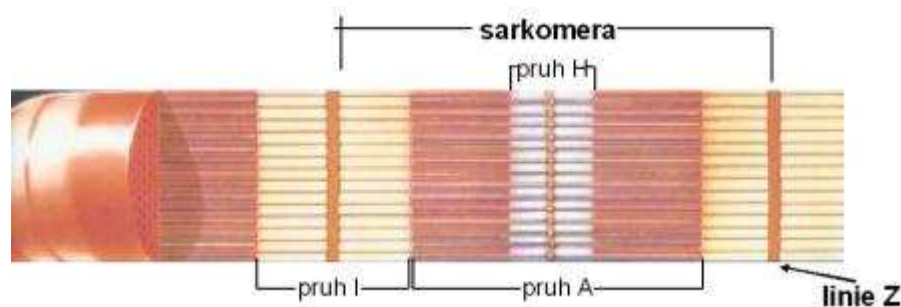
Povrch svalového vlákna obaluje souvislá membrána – sarkolema, její stěnu tvoří tři samostatné vrstvy. První vrstva je totožná s cytoplazmatickou membránou, střední je spojovací a třetí povrchová má charakter bazální membrány [9].

Cytoplazma svalového vlákna, sarkoplasma, obsahuje jednotlivé buněčné orgány a inkluze. Význam pro svalovou kontrakci má především sarkoplasmatické retikulum a mito-

chondrie. Z inkluzí jsou v sarkoplazmatu nejvíce zastoupeny myofibrily – vlastní kontraktilní vlákna, která vyplňují téměř celý objem svalového vlákna [5].

Myofibrily jsou základní funkční orgány svalového vlákna. Mají schopnost se smršťovat a svou stavbou podmiňují příčné pruhování kosterních svalů. Probíhají paralelně celým vláknem a v jednom svalovém vlákně jich je až tisíc [5, 9].

Základní jednotkou myofibrily je sarkomera (viz. obr. 3), který je složen z filament – vláknitých jednolomných (izotropních) a dvojlomných (anizotropních) úseků. Anizotropní, tmavý úsek myofibrily (A – pás), tvoří tlustá myozinová filamenta pozůstávající ze 400 molekul myozinu, naopak světlý úsek (I – pás) obsahuje tenká aktinová filamenta tvořená 600 molekulami aktinu, tropomyozinem a troponinem v podobě dvojité šroubovice. Uprostřed pásu A je světlejší zóna – Hensenův disk (H – pás), ve středu této zóny najdeme mezofragma (M – lini). Na obě strany je sarkomera ohraničena tenkými ploténkami, tzv. Z-linií. Při svalové kontrakci dochází k zasouvání aktinových filament do filament myozinových [5, 7, 9].



Obr.3: Stavba sarkomery [20]

Na povrchu myofibril se nachází hladké sarkoplazmatické retikulum, které se skládá z navzájem propojených trubic, zvaných sarkotubuly, které na koncích sarkomer ústí do prostorných vaků, které označujeme jako terminální cisterny. V systému těchto trubic je vysoká koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů, které jsou nezbytné pro realizaci svalové kontrakce. Význam sarkoplazmatického retikula spočívá ve funkci vápníkové pumpy. Vápník umožňuje dočasnou vazbu myozinových hlav na aktin [9, 12, 47].

Celkovým výsledkem svalové kontrakce je zkrácení myofibrily. Vzdálenost mezi Z-liniemi se zmenšuje zasunutím aktinových filament mezi myozinová, vzniká přechodný komplex aktomyozin. Kontrahovaná myofibrila ztrácí charakteristické příčné pruhování, a

v polarizovaném světle se jeví jako tmavá, anizotropní. Kontrakce končí tím, že se vápenaté ionty vrací zpět do trubic sarkoplazmatického retikula a myozinová hlava se odděluje od vazebného místa na aktiniovém vlákně. Po odeznění kontrakce se struktura myofibrily vrací k výchozímu stavu. Všechny myofibrily jednoho svalového vlákna se kontrahují současně [9, 12].

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ HOVĚZÍHO MASA

Složení masa kolísá v závislosti na druhu zvířete, plemene, pohlaví, věku, způsobu výživy a liší se i jednotlivé svaly jednotlivce (viz. tab.2). Struktura a složení svaloviny závisí dále na způsobu zpracování masa, které ovlivňuje biochemické, organoleptické a technologické vlastnosti masa [7].

Jatečně opracovaná těla zvířat obsahují velmi variabilní podíly svaloviny, tukových tkání a kostí, z těchto důvodů je nejčastěji uváděno chemické složení libové svaloviny, ale i v tomto případě je třeba uvádět výchozí sval nebo svalovou partii [13].

Samotná libová svalovina se skládá z vody, bílkovin, tuků, minerálních látek, vitaminů a extraktivních látek. Důležitým kritériem je poměr obsahu vody a bílkovin, tzv. Federovo číslo, které bývá u syrového masa poměrně stálé, má hodnotu přibližně 3,5. Důležitým ukazatelem je i poměr tuků a bílkovin (podíl T/B) [5, 7].

Základní složení libové svaloviny je v tabulce 1. Uvedené rozsahy hodnot lze chápat jako pásma nejčastěji zjištěných hodnot a nikoli jako striktní mezní hodnoty [13].

Tab. 1: Základní složení libové svaloviny [13]

Složka libové svaloviny	% hmotnosti
Voda	70 – 75
Bílkoviny	18 – 22
Tuky	2 – 3
Minerální látky	1 – 1,5
Extraktivní látky dusíkaté	≅ 1,7
Extraktivní látky bezdusíkaté	0,9 – 1,0

2.1 Voda

Voda je nejvíce zastoupenou složkou masa, má velký význam pro senzorickou, kulinární a především technologickou jakost masa [13].

Z hlediska technologie rozlišujeme vodu na pevnou a vázanou, a to podle toho, zda z masa volně vytéká za daných podmínek či nikoliv. Hlavní podíl v mase tvoří voda volná, avšak pouze její malá část je volně pohyblivá, zbývající část je imobilizovaná (znehynbná).

Imobilizovaná voda je ta část vody, která při naříznutí z masa samovolně nevytéká a k jejímu uvolnění je třeba použít zvýšeného tlaku [7].

Rozhodující podíl vody v mase je obsažen v myofibrilách, z celkového obsahu vody v mase je to 70 %, to znamená, že většina vody v mase je přítomna mezi tenkými a tlustými filamenti. 20 % vody je obsaženo v sarkoplasmě a asi 10 % v mimobuněčném prostoru. Toto rozdělení vody se může měnit, jednotlivé podíly vody mohou navzájem přecházet na principu difuze [13, 14].

Tab. 2: Obvyklé složení hovězího masa v závislosti na pohlaví, věku a typu svalu [5]

	Voda [%]	Bílkoviny [%]	Tuky [%]	Minerální látky [%]	Federovo číslo *	Podíl T/B **
Krávy	66,7	20,1	9,3	1,0	3,32	0,46
Jalovice	66,9	20,5	11,5	1,0	3,26	0,56
Voli	71,5	20,8	6,6	1,0	3,43	0,32
Býci	73,9	21,9	3,1	1,2	3,38	0,14
Plec	70,0	21,5	7,0	1,0	3,68	0,32
Kýta	73,4	20,3	5,0	1,1	3,63	0,25
Svíčková	72,0	19,4	7,4	1,1	3,72	0,38
Roštěnec	67,8	20,6	10,3	1,0	3,28	0,49
Krk	72,4	21,2	5,6	1,0	3,42	0,26
Kližka	70,9	21,7	6,7	1,0	3,27	0,26
Žebro	65,0	19,9	15,0	1,0	3,37	0,75
Bok	67,6	20,8	10,4	1,0	3,25	0,50

*Federovo číslo – poměr obsahu vody a bílkovin

**Podíl T/B – poměr tuků a bílkovin

2.2 Bílkoviny

Bílkoviny jsou nejvýznamnější složkou masa z nutričního i technologického hlediska. Jejich obsah v mase je velmi vysoký. Bílkoviny jednotlivých částí masa se liší svým obsahem, poměrným zastoupením i vlastnostmi (viz. tab. 3). Nejčastější technologické rozdělení bílkovin v mase do jednotlivých skupin vychází z jejich rozpustnosti ve vodě a solných roztocích. Rozdílná rozpustnost bílkovin má zásadní význam pro další technologii zpracování [9, 13].

Množství a podíl jednotlivých druhů bílkovin ve svalectech není během života zvířete stejný. U starých zvířat se zvyšuje podíl stromatických bílkovin. Dle podílu stromatických bílkovin se počítá obsah čistých svalových bílkovin, obvykle jako rozdíl obsahu všech bílkovin v mase a obsahu bílkovin stromatických. Stanovení stromatických bílkovin lze jednoduše určit např. dle obsahu hydroxyprolinu v kolagenu, který je relativně konstantní složkou kolagenu a v jiných bílkovinách se tato aminokyselina ve větším množství nevyskytuje [5, 9].

Tab. 3: Svalové proteiny savčího svalu ve stadiu rigor mortis [19]

Protein	Podíl v %*	
Myozin		29,0
Aktin		13,0
Titin		3,7
Tropomyozin		3,2
Troponin (C, I, T)		3,2
Aktinin (α -, β -, γ -)		2,6
Myomezin aj.		3,7
Dezmin aj.		2,1
Myofibrilární proteiny	celkem	60,5
Glyceraldehydfosfát dehydrogenáza		6,5
Aldoláza		3,3
Kreatinkináza		2,7
Jiné glykolytické enzymy		12,0
Myoglobin		1,1
Hemoglobin aj. extracelulární proteiny		3,3
Sarkoplazmatické proteiny	celkem	29,0
Kolagen		5,2
Elastin		0,3
Mitochondriální proteiny		5,0
Strukturní proteiny, proteiny organel	celkem	10,5

*Procentuální průměr z celkových proteinů typického savčího svalu ve fázi rigor mortis před dalšími postmortálními změnami.

2.2.1 Bílkoviny sarkoplazmatické

Sarkoplazmatické bílkoviny jsou rozpustné ve vodě a slabých solných roztocích. Jsou obsaženy převážně v sarkoplazmatu svalových buněk a mají převážně globulární stavbu. Zahrnoují na 50 jednotlivých bílkovin, z nichž nejvýznamnějšími jsou myogen, myoalbumin, globulin X a myoglobin [9, 13]. Mnohé jsou součástí glykolytických enzymů, řadíme sem např. katalázu, cytochromy, fosfotransferázy [5]. V technologii zpracování masa mají největší význam hemová barviva – myoglobin a hemoglobin, která způsobují červené zbarvení masa a krve [9].

Myoglobin slouží k dočasnému ukládání kyslíku ve svalech a jiných periferních tkáních, kde je kyslík spotřebováván buněčným metabolismem. Skládá se z jednoho polypeptidového řetězce, na němž je navázána jedna hemová skupina. V hemu je komplexně vázán atom dvojmocného železa [9, 15]. Molekulová hmotnost myoglobinu je 16,8 kDa [19].

Vazbou plynů na hemové jádro vznikají další deriváty myoglobinu. Oxidací myoglobinu např. vzdušným kyslíkem dochází k jeho přeměně na metmyoglobin, jehož podstatou je změna dvojmocného železa na trojmocné. Oxygenací vzniká oxymyoglobin – na centrální atom železa je navázána molekula kyslíku [9, 13].

Hlavním úkolem hemoglobinu je zachytit kyslík z krve procházející plícemi a uvolnit ho v kapilárách jiných tkání [15]. Ve svalu ho nacházíme zvláště při nedokonalém vykrvení zvířete. Podíl hemoglobinu závisí na obsahu myoglobinu, je-li myoglobinu málo, je podíl hemoglobinu z celkového obsahu hemových barviv vysoký. Při stejném stupni vykrvení bývají nalézány vyšší podíly hemoglobinu u vepřového masa než u masa hovězího [9]. Molekulová hmotnost hemoglobinu je 64,5 kDa [19].

2.2.2 Bílkoviny myofibrilární

Myofibrilární bílkoviny jsou rozpustné v roztocích solí. Mají vláknité molekuly a zahrnují více než 20 druhů bílkovin. Mezi nejčetnější patří myozin, aktin, titin, tropomyozin, troponin a nebulin, tvoří asi 90 % celkových myofibrilárních bílkovin. Dle jejich funkce je můžeme rozdělit na kontraktilní (aktin, myozin), regulační (tropomyozin, troponin, aktinin) a podpůrné (titin, nebulin, dezmin, myomezin) [9].

Jsou zodpovědné za svalovou kontrakci, váží největší podíl vody v mase, významně se podílejí na postmortálních změnách a rozhodují o vlastnostech masa [13].

Myozin je hlavní složkou myofibrilárních bílkovin, je obsažen v tlustých filamentech [9]. Je také bílkovinnou složkou enzymu adenozintrifosfatázy [13]. Jeho molekuly mají charakteristický tvar – kulovitou hlavu, ohebný krk a tyčinkovité tělo. Molekula je tvořena dvěma kolem sebe stočenými peptidovými řetězci, které přecházejí z rovné části (LMM – lehký meromyozin) přes podjednotku S-1 (kloub) na hlavičku. Podjednotka S-1 a hlavička tvoří tzv. těžký meromyozin (HMM) [5]. Prostřednictvím hlavy reaguje myozin s aktinem, kdy se hlavy myozinu zasouvají do aktinových vláken a vytváří příčné můstky [9, 12]. Relativní molekulová hmotnost myozinu je asi 470 kDa [17].

Aktin je hlavní složkou tenkých filament, v sarkomeře tvoří tenčí a početnější vlákna (poměr aktinových a myozinových filament je asi 4:1 až 6:1) [5, 12]. Je to jednořetězová globulární bílkovina o relativní molekulové hmotnosti 43,5 kDa (tzv. G – aktin), který polymeruje na vláknitou formu (F – aktin) [17]. G – aktin se uspořádává do dvojvláknové šroubovice, tyto vlákna jsou zakotvena v Z-liniích sarkomery a zasahují mezi tlustá myozinová filamenta [12, 17].

Titin (konektin) má mezi bílkovinami svalu nejdelší známou molekulu [12]. Ve svalových buňkách slouží jako šablona pro myozinová filamenta a jako pružný spojovací prvek mezi myozinovými filamenty a Z-linií sarkomery. Při protažení klade elastický odpor. Zajišťuje pevnost a soudržnost myofibril. Jeho relativní molekulová hmotnost je přibližně 3000 kDa [9, 18].

Nebulin je lokalizován především v izotropním úseku sarkomery, kde stabilizuje polohu aktinových filament. Při protažení také klade elastický odpor jako titin, ale jeho podíl na elasticitě sarkomery je menší [12]. Jeho relativní molekulová hmotnost je asi 800 kDa [18].

Tropomyozin je vázán na aktin a spirálovitě obtáčí aktinové vlákno v celé jeho délce [9]. Jeho funkce spočívá ve společném působení s troponinem. Tropomyozin brání interakci aktinu a myozinu v době, kdy troponin neváže kationty vápníku [21]. Relativní molekulová hmotnost tropomyozinu je 70 kDa [17].

Troponin je tvořen ze tří globulárních bílkovin, a to troponinu T, který umožňuje spojení s tropomyozinem, troponinu I, který je schopen inhibovat interakci mezi aktinem a myozinem a troponinu C, který je schopen vázat vápenaté ionty [5, 22]. Vazba troponinu s ionty vápníku je jedním ze spouštěcích mechanismů kontrakce a relaxace svalu. Při kontrakci svalu se ionty vápníku naváží na troponin C, uvolní se troponinový komplex, posunou se

molekuly tropomyozinu, a tím se přiblíží myozinové hlavy k aktinu. Relativní molekulová hmotnost troponinu C je 18 kDa, troponinu I 24 kDa a troponinu T 37 kDa [9, 17].

Tab. 4: Aminokyselinové složení svalových bílkovin v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ [13]

	Myozin	Tropomyozin	Aktin	Myoglobin	Hemoglobin	Kolagen	Elastin
Alanin	56	78	50	80	74	80	172
Arginin	64	66	59	22	36	81	13
Asparagová kys.*	58	102	94	82	106	61	9
Cystein	18	13	22	0	11	0	0
Glutamová kys.**	200	272	130	165	85	108	41
Glycin	22	7	38	58	56	207	210
Histidin	21	8	26	85	88	6	1
Hydroxylyzin	0	0	0	0	0	19	0
Hydroxyprolin	0	0	0	0	0	121	14
Izoleucin	48	33	64	52	0	15	35
Leucin	89	108	71	115	154	34	80
Lyzin	109	141	67	155	85	30	5
Methionin	29	21	39	17	10	7	0
Fenylalanin	40	5	43	59	77	22	56
Prolin	21	0	43	33	39	126	111
Serin	36	35	49	35	58	33	12
Threonin	42	28	60	46	44	20	13
Tryptofan	7	0	19	23	17	0	0
Tyrozín	29	24	52	24	30	6	13
Valin	42	38	42	41	91	24	137

*V naměřené hodnotě je zahrnut i amid kyseliny asparagové - asparagin.

** V naměřené hodnotě je zahrnut i amid kyseliny glutamové - glutamin.

Myomezin je hlavní složkou M – linie v tlustém filamentu sarkomery, podílí se na jeho fixaci a na spojování sousedních myofibril. Myomezin se silně váže na myozin a podílí se na soudržnosti myozinových molekul v tlustém filamentu. Jeho molekulová hmotnost je 165 kDa [19].

V Z – linii sarkomery byly lokalizovány proteiny: α -actinin s molekulovou hmotností 200 kDa, dezmin s molekulovou hmotností 55 kDa, vimentin s molekulovou hmotností 58 kDa a synemin s molekulovou hmotností 230 kDa. Dezmin společně s vimentinem spojují Z – linie sousedních myofibril [5, 19].

2.2.3 Bílkoviny stromatické

Stromatické bílkoviny nejsou rozpustné ve vodě ani solných roztocích. Jsou to skleroproteiny protáhlého vláknitého tvaru [13]. Nazýváme je také jako bílkoviny vazivové nebo bílkoviny pojivových tkání. Vyskytují se především ve vazivech, šlachách, kůži, chrupavkách a kostech. Jsou také nedílnou součástí svalů, kde tvoří různé membrány. Patří sem kolagen, elastin, retikulin, keratiny, muciny a mukoidy [9, 13].

Kolagen je glykoprotein, který obsahuje malé množství glukózy a galaktózy. Od ostatních bílkovin se liší svým aminokyselinovým složením (viz. tab. 4). Má vysoký obsah glycinu, prolinu a hydroxykyselin, zejména hydroxyprolinu a hydroxylyzinu. Naproti tomu neobsahuje tryptofan a cystein [5]. Složení a vlastnosti kolagenu ovlivňují křehkost masa [9]. Kolagenní vlákna jsou tvořena molekulami tropokolagenu, které se skládají ze tří α -řetězců stočených do šroubovice. Tropokolagen se spontánně slučuje a vznikají kolagenová vlákna. Relativní molekulová hmotnost tropokolagenu je 30 kDa [9, 19]. Existuje celá řada typů kolagenů, nejrozšířenějším typem je kolagen typu I, jeho molekulová hmotnost je asi 285 kDa [17].

Elastiny doprovází kolageny ve zvláště namáhaných pojivových tkáních [17]. Vyskytuje se především v elastických vláknech, která jsou velmi pružná a jejich délka se může až zdvojnásobit [9]. Tvoří pružné síťovité struktury, jejichž základní jednotkou je tropoelastin o relativní molekulové hmotnosti 70 kDa [17].

2.3 Ostatní složky masa

Mezi lipidy masa vysoce převažují tuky – triacylglyceroly vyšších mastných kyselin, především kyseliny palmitové, stearové a olejové. Podíl tuků z celkového obsahu lipidů činí asi 99 %. V malé míře jsou zastoupeny heterolipidy - zejména fosfolipidy, které mají schopnost emulgovat tuky a doprovodné látky lipidů – především cholesterol, který je ve svalovině a tucích jatečných zvířat obsažen v rozmezí 50 – 100 mg ve 100 g tkáně [5, 13].

Tuk v masě je významný z hlediska senzorického, je nosičem mnoha aromatických látek. Rozlišujeme tuk intramuskulární (vnitrosvalový) a depotní (extramuskulární, zásobní). Svalový tuk, především jeho intracelulární podíl, který je mezi svalovými vlákny ve formě žilek (tzv. mramorování), pozitivně ovlivňuje křehkost a chutnost masa [9, 13]. Mramorování masa je důležitý jakostní znak [17].

Extraktivní látky nazýváme ty látky, které můžeme extrahovat během zpracování masa a jeho analýzy za použití vody o teplotě 80 °C. Je to dle chemického složení nesourodá skupina, patří sem látky, které jsou např. součástí enzymů nebo jde o produkty odbourávání [5]. Vznikají zejména v průběhu postmortálních změn [9].

Obvykle je dělíme na sacharidy, organické fosfáty a dusíkaté extraktivní látky. Ze sacharidů je nejvíce obsažen glykogen a jeho produkty odbourávání – glukóza. Z organických fosfátů jsou to zejména nukleotidy a nukleové kyseliny a jejich rozkladné produkty [7, 9]. Především jde o nukleotidy na bázi adeninu. Adenozintrifosfát dodává energii pro svalovou kontrakci a jeho stupně odbourání mají vliv na chuť masa (hlavně kyselina inozinová) [5, 9]. Dusíkaté extraktivní látky jsou různorodá skupina, patří sem zejména aminokyseliny a některé peptidy. Z volných aminokyselin jsou zastoupeny nejvíce glutamin, kyselina glutamová, glycin, lyzin a alanin. Z peptidů je třeba zmínit karnozin, anserin a glutathion. Glutathion je silné redukční činidlo a jeho význam je především při vybarvování masných výrobků [9].

Tab. 5: Obsah minerálních látek v hovězím masě [19]

Prvek	Obsah prvku v čerstvé svalovině [%]	Prvek	Obsah prvku v čerstvé svalovině [%]
Draslík	0,25 – 0,4	Železo	0,001 – 0,005
Sodík	0,07 – 0,2	Zinek	0,001 – 0,008
Hořčík	0,015 – 0,035	Fosfor	0,30 – 0,55
Vápník	0,005 – 0,025	Chlor	0,04 – 0,10

Mezi minerální látky se zahrnují všechny látky, které zůstávají v popelu po spálení masa, tedy i mineralizované prvky. Většina minerálních látek je rozpustná ve vodě a ve svalovině se nachází ve formě iontů, železo, hořčík a vápník jsou částečně vázány na bílkoviny [9].

Maso je významným zdrojem draslíku, vápníku, hořčíku, železa, hovězí maso je zdrojem zinku [5]. Obsah minerálních látek je uveden v tabulce 5.

Maso je významným zdrojem vitaminů skupiny B, zejména významný je obsah vitaminu B₁₂, který se vyskytuje pouze v potravinách živočišného původu [13]. Do organismu dostávají vitaminy současně s bílkovinami, což je důležité při budování některých enzymů. Při nedostatku bílkovin se může objevit avitaminóza [5].

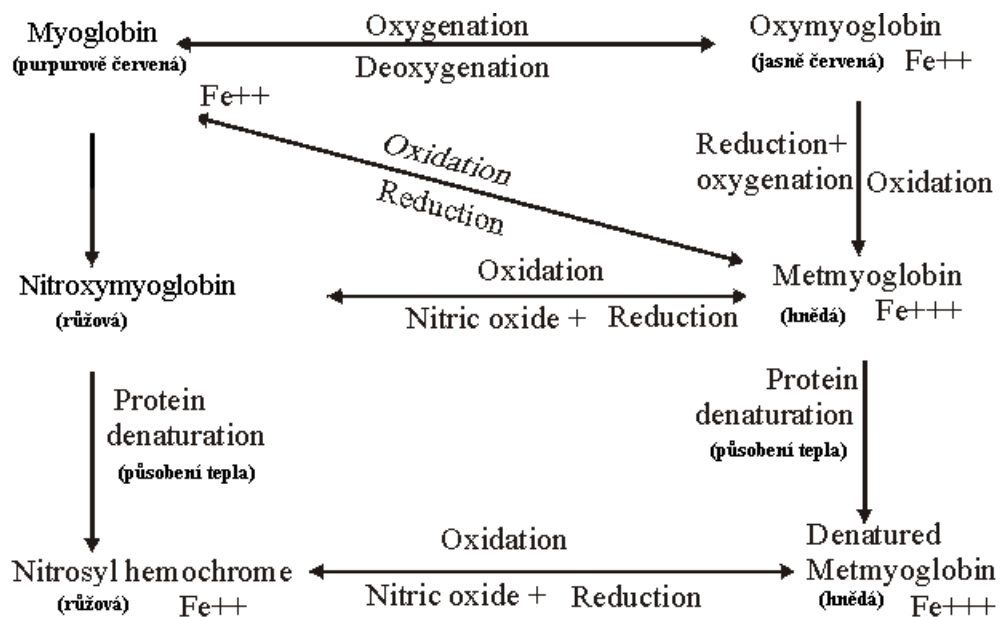
3 VLASTNOSTI MASA

Vlastnosti masa jsou ovlivněny jeho stavbou a chemickým složením. Mezi nejvýznamnější vlastnosti masa patří barva, vaznost, textura, křehkost a chutnost [23].

3.1 Barva

Barva masa souvisí především s obsahem hemových barviv, myoglobinu a hemoglobinu. Obsah hemových barviv v mase různých živočichů je obvykle v rozmezí 100 – 10000 mg·kg⁻¹. Podíl hemoglobinu závisí na tom, jak kvalitně je maso vykřveno. Při vyšším obsahu barviv je maso tmavší. Výrazně tmavší barvu má maso hovězí v porovnání s vepřovým, velmi světlé je maso drůbeže a většiny ryb [7, 23].

Změny barvy souvisejí s reakcemi atomu železa v hemové skupině (viz. obr. 4). Již při běžné koncentraci kyslíku ve vzduchu váže železo molekulární kyslík za vzniku rumělkově červeného oxymyoglobinu. Při vakuovém balení je oxymyoglobin na povrchu masa disociován na kyslík a myoglobin, poté následuje oxidace železa a myoglobin se mění na hnědý až šedohnědý metmyoglobin. Použití dusitanových solí směsí k výrobě salámů a masných výrobků vede k vytvoření růžového nitroxymyoglobinu, kdy se na centrální železo naváže oxid dusnatý [7, 23].



Obr.4: Změny myoglobinu působením kyslíku, dusitanů a vyšších teplot [38]

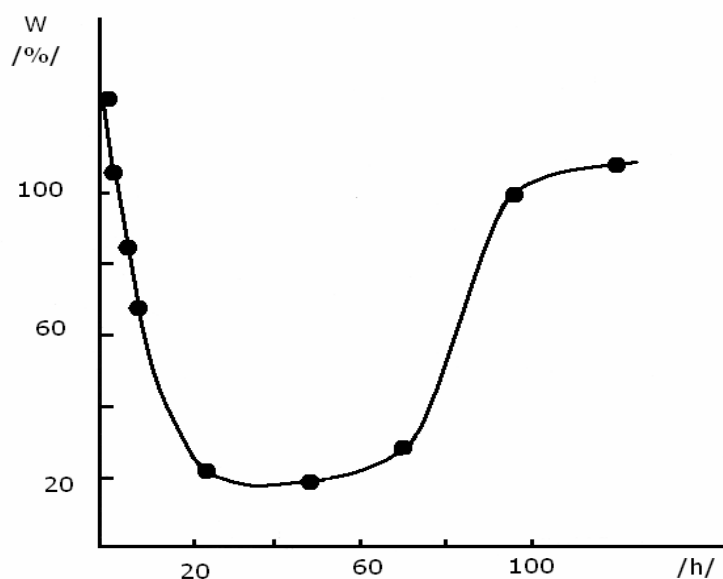
Působením vzduchu a peroxidu vodíku nebo činností enzymů či mikroorganismů dochází k dalšímu rozpadu hemových barviv. Pokračující oxidací metmyoglobinu vznikají zelená barviva, např. choleglobin, verdoglobin a verdohem. Dále vzniká modrozelený biliverdin, který se redukuje na červeně zbarvený bilirubin [7, 23].

3.2 Vaznost

Vaznost masa je schopnost masa udržet vodu vlastní i vodu přidanou. Obvykle vyjadřuje podíl vody vázané k celkovému obsahu vody v mase. Závisí na pH, obsahu solí, průběhu posmrtných změn, stupni dezintegrace vláken. Tyto faktory můžeme technologicky ovlivňovat, a tím dosáhnout žádoucí vaznosti [23, 25].

Vaznost masa je způsobená svalovými proteiny, největší vazností se vyznačuje myozin, naopak kolagenní bílkoviny se na vaznosti v podstatě nepodílejí .

Silný vliv na vaznost má pH, nejnižší vaznost je v izoelektrickém bodě (pH 5 – 5,3), kdy je na molekule bílkoviny vyrovnán počet kladných a záporných nábojů a opačně nabitě skupiny se přitahují maximální silou. Úpravou pH svaloviny směrem od izoelektrického bodu se změní rozložení kladných a záporných nábojů na molekule bílkovin, dojde k oddělování peptidových řetězců a v prostoru mezi nimi se imobilizuje více vody. Změny pH masa nastávají při posmrtných změnách (viz. obr. 5) a při některých technologických operacích. V mase a masných výrobcích se pH pohybuje mezi hodnotami 4 – 7 [23, 28].



Obr.5: Změny vaznosti hovězího masa v postmortálním období [16]

Vaznost se zvyšuje postupným rozmělněním, kdy dochází k uvolňování tkáně a bílkoviny mohou lépe bobtnat. Bobtnání je jednak oddálení aktiniových a myozinových filament a jednak i odpuzování peptidových řetězců myozinu v důsledku imobilizace vody.

Vaznost závisí i na teplotě, se stoupající teplotou klesá. Při 45 °C dochází k prudkému poklesu vaznosti vlivem denaturace bílkovin [7].

3.3 Křehkost

Křehkost masa je dána jeho strukturou, stavem a chemickým složením. Pro dosažení křehkosti je třeba maso nechat dostatečně dlouho uzrát, aby se uvolnila posmrtná ztuhlost. Křehkost závisí i na obsahu pojivové tkáně, zejména kolagenu, popřípadě dalších stromatických bílkovin, které zpevňují strukturu masa. K jejich uvolňování dochází enzymaticky při zrání masa.

Vliv na křehkost má také obsah intramuskulárního tuku, maso s jeho obsahem bývá křehčí [23].

4 POSTMORTÁLNÍ ZMĚNY BĚHEM ZRÁNÍ MASA

Svalová tkáň prochází po smrti živočichů mnoha biochemickými, strukturními a funkčními změnami [17]. V těle zvířat probíhají procesy, které vedou ke změně nativní svalové tkáně na maso. Průběh postmortálních změn ovlivňuje kvalitu masa, vytváří se křehkost a údržnost masa, probíhají děje vytvářející extraktivní složky masa [23].

Biochemické postmortální změny jsou souborem degradačních přeměn základních složek svalových tkání, především sacharidů a bílkovin. Rozkladné reakce jsou ireverzibilní a směřují přes stále jednodušší meziprodukty ke konečným degradačním produktům. Biochemické děje jsou katalyzované enzymy přirozeně obsaženými ve svalových tkáních (endogenní, nativní enzymy) [13]. Mezi tyto enzymy patří např. lysozomální katepsiny, proteazom, metaloproteináza a Ca^{2+} dependentní proteázy – kalpainy. Pro enzymatickou aktivitu *post mortem* byla potvrzena zejména úloha μ -kalpainu [31, 39].

Zmíněné biochemické a enzymatické procesy probíhají při vyšších teplotách rychleji. Z hygienických důvodů musí být maso vychlazené na +3 až +7 °C. Enzymatické procesy naopak ustávají při tvorbě krystalků ledu pod –1,5 °C. Maso musí být proto uchováno mezi těmito teplotními oblastmi [46].

Postmortální změny probíhají ve čtyřech stadiích:

- období před rigorem (*prae rigor*), tzv. teplé maso
- *rigor mortis*
- zrání masa
- hluboká autolýza [5].

Tyto stadia nejsou mezi sebou ostře ohraničeny a plynule přecházejí jedna ve druhou [13].

4.1 Prae rigor

Období *prae rigor* je charakterizováno dostatečným množstvím ATP, proto aktin a myozin zůstávají disociované. Po určitém čase začne klesat koncentrace ATP. Hodnota pH je v neutrální oblasti (6,9 – 7,2) [23]. Po usmrcení zvířete dochází k přerušení krevního oběhu a přívodu kyslíku. Ve svalech začínají převládat anaerobní přechody [5]. Při anaerobní glykolýze jsou odbourávány zásoby svalového glykogenu, který je přeměněn na kyselinu mléčnou [17, 24].

Maso ve fázi *prae rigor* označujeme za teplé, souvisí s jeho teplotou, která dosahuje 35- 40 °C. V tomto stadiu je maso velmi vhodné pro zpracování na mělněné výrobky nebo k zamražení. Maso není tuhé, neuvolňuje vodu a má vysokou vaznost (díky vzdálenosti hodnot pH od izoelektrického bodu a přítomností ATP) [16, 23].

Fyziologický stav jatečně upraveného těla ve fázi *prae rigor* je optimální pro maximální činnost Ca^{2+} dependentních proteáz - kalpainů, pro které je optimální neutrální pH a teplota okolo 37 °C [30].

4.2 Rigor mortis

Rigor mortis (posmrtná ztuhlost) nastává, když zásoby ATP klesnou na hodnotu přibližně 20 % původní koncentrace. Dochází ke spojení tenkých a tlustých filament a vytvoření příčných vazeb aktinu a myozinu za vzniku aktomyozinového komplexu [7, 23]. Nastává nejprve ve svalech na hlavě a šíří se pak po celém těle [5].

Mechanismus posmrtné ztuhlosti lze vysvětlit na základě mechanismu svalové kontrakce. Po vyplavení iontů vápníku ze sarkoplazmatického retikula se ionty Ca^{2+} vážou na aktinová filamenta a aktivují G-aktin. Změní se polohy tropomyozinu a zpřístupní se vazná místa na aktiniovém filamentu pro hlavy myozinu. Aktinomyozinová vazba aktivuje adenosintri-fosfatázu hlav myozinu, ATP se štěpí na ADP a fosfát. Tento proces je zdrojem energie pro svalovou kontrakci. Uvolněná energie táhne myozin podél aktiniových filament směrem k Z-linii a umožní, aby se hlava myozinu navázala na aktivovaná místa G-aktinu, spojením obou komponent vzniká aktinomyozinový komplex [9].

Tab. 6: Vliv druhu n a pokles teploty a pH během 24h post mortem [26]

Čas [h]	Hovězí		Jehněčí		Vepřové	
	Teplota [°C]	pH	Teplota [°C]	pH	Teplota [°C]	pH
0	39,4	6,86	39,6	6,89	39,3	6,40
3	25,3	6,47	14,0	6,66	19,3	6,44
6	15,6	6,12	4,7	6,42	10,9	6,00
9	10,4	5,87	1,5	6,28	4,8	5,78
12	7,2	5,77	0,7	6,04	1,6	5,51
24	1,5	5,63	-0,8	5,65	-0,4	5,42

Při svalové kontrakci k oddělení aktinu a myozinu dochází až po opětovném navázání ATP na hlavu myozinu. V důsledku poklesu a následného vyčerpání ATP k oddělení aktinu a myozinu nemůže dojít a nastává několik hodin po ukončení dodávky kyslíku *rigor mortis* [9].

Kyselina mléčná se hromadí ve svalu a neutrální pH klesá na hodnoty okolo 5,3 – 5,8 (viz. tab. 6), tento pokles závisí na řadě faktorů – na teplotě, zásobách glykogenu, druhu zvířete aj. [23, 24]. Pokles ATP a pH má negativní vliv na vaznost masa, pokles ATP ji ovlivňuje přibližně ze dvou třetin, pokles pH z jedné třetiny. Pozitivním důsledkem poklesu pH je zvýšení údržnosti masa [23, 25].

Maso ve stadiu *rigor mortis* je zcela nevhodné pro kulinární zpracování (příliš tuhé) i pro masnou výrobu (špatně váže vodu, hmotnostní ztráty vytékáním masové šťávy) [23].

U hovězího masa je *rigor mortis* úplný asi po 20 hodinách a trvá 24 – 48 hodin, u vepřového masa nastává do 6 hodin, u drůbeže do 1 hodiny [16].

4.3 Zrání masa

Zrání masa je fází, kdy se postupně uvolňuje ztuhlost svalu, zlepšuje se vaznost, mírně roste pH a zlepšují se organoleptické vlastnosti. Uvolnění rigoru mortis, a tím zvýšení křehkosti masa souvisí především s proteolýzou myofibrilárních bílkovin, zejména působením Ca^{2+} dependentních proteáz - kalpainů a některých katepsinů a také se štěpením kolagenu [23, 26]. Enzymy podílející se na zrání masa jsou uvedeny v tabulce 7.

Kalpainy jsou schopny degradovat titin a nebulin, což vede k oslabení interakce mezi tenkými filamenti a Z-diskem a k fragmentaci myofibril, přičemž myozin a aktin nejsou ovlivněny [32]. Také katalyzují degradaci dezminu, syneminu, troponinu-T a vinkulinu [18]. Aktivita kalpainu je určena aktivitou bílkoviny kalpastatin, čím vyšší je poměr systému kalpain/kalpastatin, tím můžeme získat křehčí maso [33, 34]. Štěpení troponinu-T vede k výskytu fragmentů o molekulové hmotnosti 30 kDa. Degradace dezminu během zrání masa způsobuje nárůst polypeptidu o molekulové hmotnosti 38 kDa [54, 55].

Aktivita kalpainů je vázána na přítomnost vápníku. Pravděpodobným důvodem spuštění aktivity kalpainů je vyčerpání energie ATP, pokles ATP vyvolá zastavení opětovného vstřebávání vápníkových iontů v sarkoplazmatickém retikulu a vápník je uvolněný do sarkoplazmy, kde dochází navázání kalpastatinu na kalpain. Jedna molekula kalpastatinu mů-

že inhibovat až čtyři molekuly kalpainu. Úroveň inhibiční činnosti kalpastatinu se během zrání snižuje. Pro spuštění činnosti μ -kalpainu dostačuje koncentrace Ca^{2+} přibližně asi 50-100 μM , pro m-kalpain je to koncentrace asi 1-2 mM [40, 41].

Dochází k disociaci aktomyozinového komplexu fosfatázami pomocí anorganických fosfátů, které se uvolňují štěpením nukleotidů a k degradaci myozinu kyselými katepsiny, zejména katepsiny B, L a D. Katepsiny B a L řadíme mezi cysteinové proteinázy, jsou katalyzovány cysteinem a histidinem. Katepsin D patří mezi aspartátové proteinázy, které mají ve svém aktivním místě dva zbytky kyseliny asparagové [23, 42]. Aktivita těchto enzymů je maximální při hodnotách pH 4 – 6 a započala již ve fázi *rigor mortis*, kdy maso dosahuje těchto hodnot pH [27, 31].

Tab. 7: Endogenní enzymy podílející se na zrání masa [37, 43]

Umístění	Proteináza	Typ*	Rozsah pH	Molekulová hmotnost	Působení enzymu
Sarkoplazma	μ -kalpain	cysteinová	6,5-7,5	110 kDa	uvolňuje α -aktinin,
	m-kalpain	cysteinová	6,5-7,5	110 kDa	odbourává dezmin, titin, nebulin, troponin T a I, C-protein, myomezin
Lyzozom	katepsin B	cysteinová	3,5-6,5	25 kDa	odbourává myozin, aktin, troponin T, kolagen
	katepsin L	cysteinová	3,0-6,5	28 kDa	odbourává myozin, aktin, troponin T a I, tropomyozin, α -aktinin, kolagen
	katepsin D	aspartátová	3,0-6,0	42 kDa	odbourává myozin, aktin, tropomyozin, troponin T a I, α -aktinin, kolagen

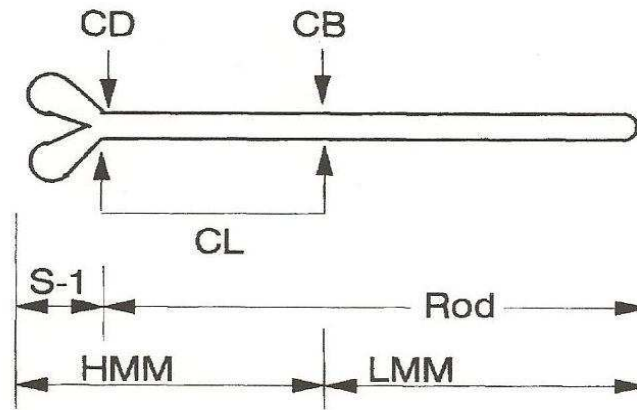
*Typ proteinázy dle katalytického centra

Katepsin L způsobuje fragmentaci myofibril a štěpení M-linie a Z-linie sarkomer. Katepsin D odbourává Z-linie a filamenta v blízkosti H-pásu. Katepsin L degraduje α -aktinin na fragmenty o přibližné molekulové hmotnosti 85 kDa [27, 42].

Myozin je dle obrázku 6 štěpen katepsinem D (CD) v místě, kde se spojuje hlava a tyčinkovité tělo na fragmenty o přibližné relativní molekulové hmotnosti 120 kDa a 90 kDa. Katepsin B (CB) štěpí myozin na tyčinkovitou část - lehký meromyozin (LMM) a na za-

hnutou část tyčinky s globulární částí – těžký meromyozin (HMM). Katepsin L (CL) štěpí myozin ve stejném místě jako katepsin D a dále degraduje myozin na několik rozpustných fragmentů o relativní molekulové hmotnosti 67-90 kDa [42].

Dále je štěpen aktin katepsiny B, D a L. Katepsin B a D ho štěpí na fragmenty o molekulových hmotnostech 35 a 12 kDa. Katepsin L aktin degraduje na fragmenty o velikostech 40, 37 a 30 kDa [42].



Obr.6: Štěpení myozinu katepsiny D, B a L [42]

Také dochází ke štěpení kolagenu a fragmentaci kolagenních vláken, které jsou zapříčiněny kolagenázami. Kolagenáza patří mezi zinek-dependentní metaloproteinázy (MMP), které se účastní většiny procesů degradujících pojivovou tkáň [27, 35, 36]. Do této skupiny patří MMP-1, MMP-8 a MMP-13, které mohou štěpit α -řetězec kolagenu na dvě specifické části, na čtvrtinové a tříčtvrtinové fragmenty. Ke štěpení dochází v místě, kde chybí hydroxyproliny a je více hydrofobních skupin a tudíž molekula má uvolněnou trojšroubovici [44, 45]. Kolagen denaturovaný ve svalu vzniklou kyselinou mléčnou může být hydrolyzován i dalšími enzymy, např. katepsinem B [17].

Během zrání masa dochází k degradaci nukleotidů a utváří se chuťové a aromové složky masa. Na charakteristické chuti masa se podílejí zejména produkty štěpení ATP – inozin, inozinfosfát a ribóza a také produkty proteolýzy – aminokyseliny a oligopeptidy [23, 27].

Doba zrání je závislá na teplotě, s rostoucí teplotou se zrání masa urychluje. U hovězího masa je optimální doba zrání při teplotě 0°C asi 10 – 12 dní, při teplotě 8 – 10 °C přibližně asi 5 – 6 dní a při teplotě 16 – 18 °C asi 3 dny [13, 16].

Vzhledem k možnostem mikrobiálního napadení probíhá zrání výhradně v chladírnách. Jelikož doba úplného zrání je dlouhá a také ekonomicky náročná, je maso vyskladňováno dříve, kdy ještě není zcela vyzrálé. V praxi se jeví jako největší problém nedostatečné vyzrání hovězího masa [5, 13].

Urychlit zrání je možné zvýšením teploty, což ale není hygienicky vhodné a přidavkem proteolytických enzymů rostlinného, živočišného nebo mikrobiálního původu, tzv. zkrěhčovačů - tenderizerů. Enzymy mohou být aplikovány několika způsoby, např. nástřikem povrchu, ponořením, vnitrosvalovým nástřikem. K umělému zkrěhčení lze použít i fyzikálních zákroků jako je natažení svalu, nařezání pojivové a svalové tkáně, ošetření ultrazvukem, použití vysokého tlaku a elektrostimulace. Tyto zákroky ovlivňují sensorickou kvalitu masa. Maso, u kterého je správně vedeno přirozené zrání vykazuje podstatně lepší sensorické vlastnosti [5, 13].

4.4 Hluboká autolýza

Hluboká autolýza je posledním stadiem postmortálních změn. Dochází ve větší míře k rozkladu bílkovin a tím k nadměrné akumulaci aminokyselin a peptidů. Peptidy a aminokyseliny se dále odbourávají na konečné rozkladné produkty – amoniak, aminy, sirovodík, merkaptany, které vedou k nepříjemným smyslovým vlastnostem masa. Začínají se rozkládat i tuky, dochází k jejich hydrolyze a oxidaci, což způsobuje nepříjemnou žluklou chuť. Často se připojuje i mikrobiální napadení a zkáza. Toto stadium je u masa jatečných zvířat nežádoucí [16, 27].

4.5 Abnormální průběh posmrtných změn

V průběhu posmrtných změn se vyskytují dvě hlavní anomálie, které vedou ke ztrátě kvality masa a ekonomickým ztrátám. Vznik uvedených odchylek je ovlivněn genetickým vybavením jatečných zvířat, způsobem zacházení zvířat před porážkou, ale i způsobem jatečního opracování. Změny vlastností masa se týkají především vaznosti a barvy [16, 23].

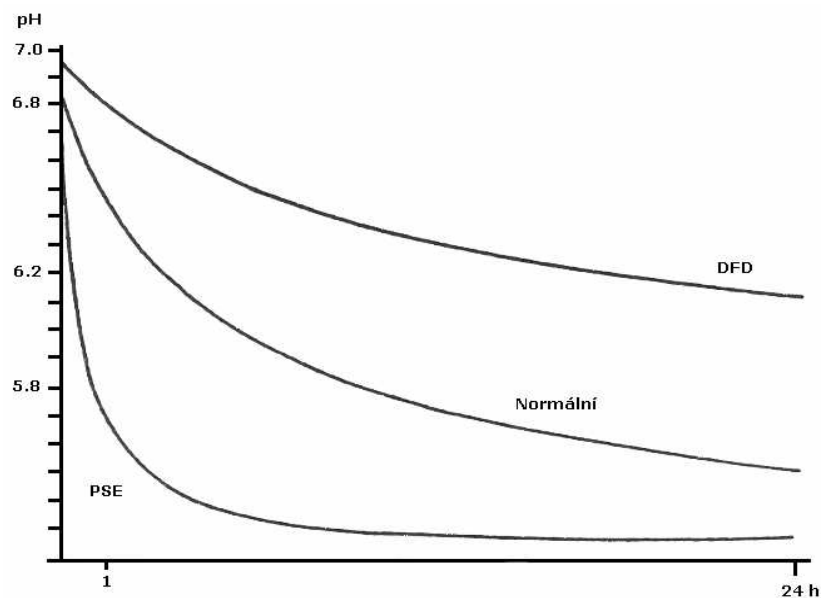
Uvedené anomálie se označují zkratkami z anglického jazyka, které vyjadřují vlastnosti obou typů masa:

- PSE maso – pale (bledé), soft (měkké), exudative (vodnaté)
- DFD maso – dark (tmavé), firm (tuhé), dry (suché) [23].

Pro projev PSE vady masa je rozhodující situace těsně před porážkou a bezprostředně po ní, kdy během první hodiny *post mortem* dochází k velmi rychlému a hlubokému poklesu pH na hodnotu 5,8 a nižší. Pokles pH nastává, kdy je v maso ještě vysoká teplota a dochází k částečné denaturaci bílkovin. Hluboký pokles pH i denaturace bílkovin vedou k tomu, že maso má výrazně nižší vaznost vody, tkáň je měkká a uvolňuje velké množství vody. PSE maso je nevhodné pro technologické a kulinářské použití. Vyskytuje se zejména u masa prasat [16, 23, 48].

Maso DFD má opačné vlastnosti, především po smrti zvířete dochází k velmi malému poklesu pH. Spolehlivým indikátorem DFD masa bývá hodnota pH po 24 hodinách *post mortem* 6,2 a vyšší. Může být způsobeno vyčerpáním zvířat - chybí glykogen nebo extrémně rychlou glykolýzou, kdy vytvořená kyselina mléčná přejde do krve a při vykrvení vyteče z těla ven (opožděné vykrvení). Vysoké pH má za následek i nedostatečný průběh zrání, malou údržnost a nevýraznou chuť a aroma. Díky vysoké vaznosti je však maso vhodné k výrobě mělněných tepelně opracovaných výrobků. Odchylna bývá častá u hovězího masa, zejména u býků vzhledem k jejich temperamentu [16, 23, 48].

Zvláštním případem je tzv. „Hampshire“ maso, kdy průběh posmrtných změn je normální, ale v důsledku vysoké počáteční hodnoty glykolytického potenciálu dochází k hlubokému okyselení. Projevuje se při hodnotě pH po 24 hodinách *post mortem* menší než 5,4. Maso se svými vlastnostmi podobá PSE masu [23, 48].



Obr.7: Průběh hodnoty pH vepřového masa v jakosti normální, PSE a DFD v prvních 24h post mortem [16]

Při chlazení masa může dojít k jevu, který nazýváme „cold shortening“. Je způsobený příliš rychlým zchlazením masa, které způsobuje vyplavení iontů vápníku ze sarkoplazmatického retikula s následným zkrácením sarkomer. Tento jev má za následek zvýšenou ztrátu odka-pem při chladírenském uchování masa a při tepelné úpravě je maso tuhé v důsledku přič-ného zesíťování pojivové tkáně. Je třeba mu předcházet při chlazení hlavně hovězího a skopového masa dodržením pravidla, že teplota v jatečně upraveném těle do 10 hodin po porážce by neměla být nižší než 10 °C. Doporučení vychází ze skutečnosti, že v prvních deseti hodinách po porážce se odbourávají energeticky bohaté sloučeniny – glykogen a adenzinotriřosfát, není – li pak ATP k dispozici v dostatečném množství, nemůžke ke zkrá-cení chladem dojít [46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo shrnutí současných poznatků o histologické a chemické stavbě hovězího masa, zejména o jeho proteinovém složení. Dalším cílem bylo získat poznatky o průběhu změn během zrání masa, především o působení proteolytických enzymů a o změně proteinového profilu. Cíl teoretické části je vyjádřen v následujících bodech:

1. Charakteristika chemického složení hovězího masa a jeho základních vlastností.
2. Popis průběhu postmortálních změn.

Pro zpracování praktické části práce bylo třeba splnit následující body:

1. Stanovení profilu molekulových hmotností vzorků hovězího masa v průběhu zrání pomocí SDS-PAGE.
2. Vyhodnocení výsledků využitím shlukové analýzy.
3. Porovnání vyhodnocených výsledků s dostupnou literaturou.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Použité přístroje a zařízení

Analýzy vzorků byly provedeny v laboratořích Ústavu technologie a mikrobiologie potravin na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a k jejich analýze byly použity tyto přístroje a zařízení:

- analytické váhy GH-200 EC (A&D)
- automatické pipety 5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml (Biohit, Merci)
- centrifugační zkumavky s víčkem
- elektroforetická vertikální aparatura (BIO-RAD)
- eppendorfkové zkumavky
- elektrický vaříč (ETA)
- hlubokomrazicí box MDF-U3286S (SANYO)
- chladnička (Gorenje)
- inkubátor INCU-LINE (VWR)
- laboratorní sklo
- lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC (Christ)
- odstředivka EBA 21 (Hettich ZENTRIFUGEN)
- pH metr Cyber Scan 510 (Eutech Instruments)
- třepačka (BioSan)
- zařízení pro deionizaci vody Aqua Osmotic 02 (AquaOsmotic)

6.2 Analyzované vzorky

Analýza proteinového profilu byla provedena u vzorků hovězího masa, které byly pořízeny z masa mladých býků. Vzorky masa byly použity buď čerstvé (24 hodin *post mortem*) nebo byly ponechány zrát po dobu 1 - 4 týdnů při teplotě 0 - 3 °C. Vzorky byly v této různé fázi zralosti ponechány v syrovém stavu a lyofilizovány nebo byly tepelně opracované působením teploty bodu varu vody po dobu 3 hodin a lyofilizovány až po tepelném opracování.

Lyofilizace vzorků byla provedena při teplotě $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlaku cca 12 Pa a po dobu 48 hodin. Lyofilizované vzorky byly uchovány při mrazírenské teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Charakteristika těchto vzorků je uvedena v tabulkách 8 až 16. Býci, ze kterých vzorky pocházejí jsou označeni písmeny A – I.

Tab. 8: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk A, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
6	AS0	24 hodin	syrové
4	AS2	2 týdny	syrové
5	AS3	3 týdny	syrové
7	AS4	4 týdny	syrové
8	AT2	2 týdny	tepelné
9	AT3	3 týdny	tepelné
10	AT4	4 týdny	tepelné

Tab. 9: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk B, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
38	BS0	24 hodin	syrové
39	BS2	2 týdny	syrové
37	BS4	4 týdny	syrové
13	BT0	24 hodin	tepelné
12	BT2	2 týdny	tepelné
11	BT4	4 týdny	tepelné

Tab. 10: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk C, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
43	CS0	24 hodin	syrové
44	CS2	2 týdny	syrové
45	CS3	3 týdny	syrové
32	CT0	24 hodin	tepelné
15	CT2	2 týdny	tepelné
14	CT3	3 týdny	tepelné
33	CT4	4 týdny	tepelné

Tab. 11: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk D, stáří 26 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
46	DS0	24 hodin	syrové
47	DS2	2 týdny	syrové
48	DS4	4 týdny	syrové
19	DT0	24 hodin	tepelné
21	DT2	2 týdny	tepelné
20	DT4	4 týdny	tepelné

Tab. 12: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk E, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
50	ES0	24 hodin	syrové
49	ES2	2 týdny	syrové
23	ES4	4 týdny	syrové
51	ET2	2 týdny	tepelné
22	ET4	4 týdny	tepelné

Tab. 13: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk F, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
53	FS0	24 hodin	syrové
54	FS1	1 týden	syrové
52	FS2	2 týdny	syrové
55	FS3	3 týdny	syrové
56	FS4	4 týdny	syrové
18	FT2	2 týdny	tepelné
16	FT3	3 týdny	tepelné
17	FT4	4 týdny	tepelné

Tab. 14: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk G, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
58	GS0	24 hodin	syrové
57	GS1	1 týden	syrové
59	GS2	2 týdny	syrové
60	GS3	3 týdny	syrové
61	GS4	4 týdny	syrové
31	GT1	1 týden	tepelné
24	GT2	2 týdny	tepelné
25	GT3	3 týdny	tepelné
30	GT4	4 týdny	tepelné

Tab. 15: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk H, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
40	HS0	24 hodin	syrové
41	HS2	2 týdny	syrové
42	HS3	3 týdny	syrové
26	HT1	1 týden	tepelné
27	HT2	2 týdny	tepelné
28	HT3	3 týdny	tepelné
29	HT4	4 týdny	tepelné

Tab. 16: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk I, stáří 17 měsíců

číslo vzorku	označení	doba zrání	opracování
2	IS0	24 hodin	syrové
1	IS2	2 týdny	syrové
3	IS4	4 týdny	syrové
35	IT1	1 týden	tepelné
34	IT2	2 týdny	tepelné
36	IT4	4 týdny	tepelné

6.3 Příprava vzorků

Lyofilizované vzorky masa pro kvalitativní analýzu byly naváženy do centrifugační zkumavky v množství 1 g, doplněny 9 ml deionizované vody a důkladně promíchány. Následně byly inkubovány při teplotě 40 °C po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky umístěny do centrifugy a odstředovány po dobu 10 minut. Vzniklá suspenze byla odpipetována v množství 100 µl do eppendorfkové zkumavky, bylo k ní přidáno 25 µl 20% SDS, 12,5 µl merkaptoetanolu a 115 µl vzorkového pufru. Vzorky byly dobře promíchány a inkubovány při 100 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C.

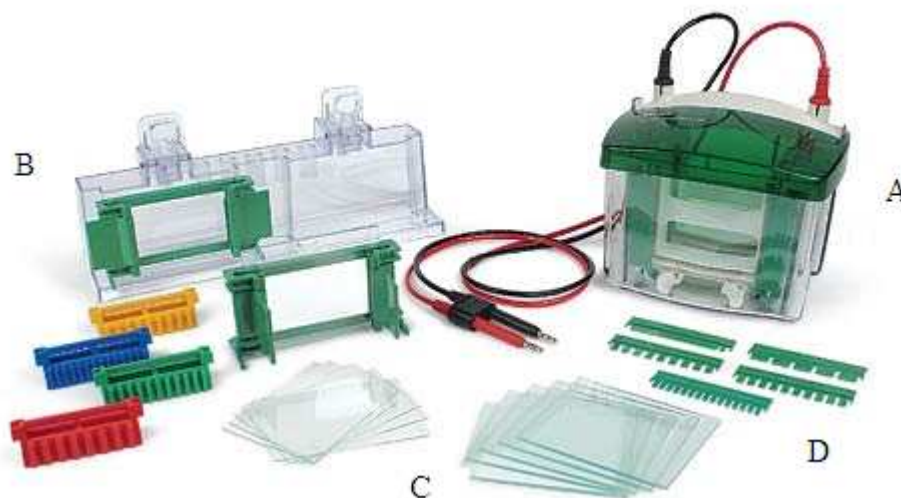
6.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforéza je polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Je to separační metoda ke stanovení proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti a na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli.

Podstatou separace je přítomnost aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který se váže na všechny bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkovin. Navázáním SDS mění proteiny svoji konformaci, tj. štěpí se disulfidické můstky v molekule proteinu (např. použitím merkaptoetanolu). Pro dokonalé navázání SDS na bílkovinu je třeba vzorky zahřát na vysokou teplotu.

Vzniká komplex SDS-bílkovina, která má záporný náboj a tím je umožněn pohyb všech molekul vzorku v elektrickém poli stejným směrem. Polyakrylamidový gel, připravený kopolymerací akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu, slouží jako porézní matice. Velikost pórů a tudíž i rozsah molekulových hmotností závisí na poměru mezi akrylamidem a bisakrylamidem. Pro analýzu vzorků se gely barví a následovně vyhodnocují příslušnými postupy [49, 50, 51].

Pro elektroforézu byla použita vertikální elektroforetická aparatura Mini PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD). Aparatura se skládá z vlastní vany, víka, dvou tvarovaných skel v párovém uspořádání, teflonového mezerníku (těsnění) a hřebínku (viz. obr. 8). Aparatura byla sestavena dle doporučení výrobce.



*Obr.8:Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD),
A-vlastní vana a víko, B-stojan a držáky skel, C-skla, D-hřebínky [53]*

Pro separaci proteinů byl použit 12% separační gel tloušťky 1,5 mm. Gel byl připraven smícháním následujících roztoků [52].

Před každou elektroforézou byl připraven čerstvý roztok persíranu amonného. Po přidání persíranu amonného a TEMEDu byl roztok dobře promíchán a ihned aplikován pomocí pipety mezi skla do výšky přibližně 3 cm od horního skla tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Pro získání hladkého povrchu a zamezení polymerace na vzduchu byl gel přelit destilovanou vodou. Polymerace probíhá při pokojové teplotě. Po 1 hodině byla destilovaná voda odstraněna filtračním papírem.

Po odstranění zbytků vody byl na separační gel aplikován 5% koncentrační gel, který byl připraven z následujících roztoků [52].

Všechny složky roztoku byly důkladně promíchány a roztok byl pipetou aplikován na ztuhlý separační gel až těsně pod hranu horního skla. Poté byl opatrně vsunut teflonový hřeben tak, aby byly odstraněny všechny vzduchové bubliny. Takto připravený gel byl i se stojanem vložen do vlhké komůrky, kde byl do druhého dne ponechán při pokojové teplotě polymerovat.

Roztoky použité při SDS-PAGE jsou popsány v příloze č.1.

6.4.1 Nanášení vzorků a vlastní elektroforéza

Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a odstraněn dolní mezerník. Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr a byly upevněna skla tak, aby byly eliminovány bubliny ve spodní části gelu. Do horní části vany byl nalit elektrodový pufr tak, aby došlo k převrstvení jamek, do kterých bude aplikován vzorek. Vzorky byly nanášeny pomocí automatické pipety v objemu 15 μ l. Kromě vzorků proteinů byl nanášen také molekulový hmotnostní standard Protein test Mixture 6 (SERVA).

Po nanesení vzorků byla elektroforetická vana překryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Proud byl nastaven na hodnotu 30 mA. Jakmile čelo elektroforézy vizualizované bromfenolovou modří doputovalo ke spodní hranici separačního gelu, byl dělicí proces ukončen. Elektroforéza trvala necelé 3 hodiny. Po jejím skončení byla od sebe opatrně oddělena skla, mezi kterými se nacházel gel. Z gelu byl odstraněn koncentrační gel a takto upravený gel byl fixován 30 minut fixačním roztokem samostatně v misce.

6.4.2 Barvení a hodnocení gelů

Po odstranění fixačního roztoku a opláchnutí destilovanou vodou byl přidán barvicí roztok a za stálého třepání barven alespoň 1 hodinu. Poté byl barvicí roztok odstraněn, opláchnut destilovanou vodou a přelit odbarvovacím roztokem.

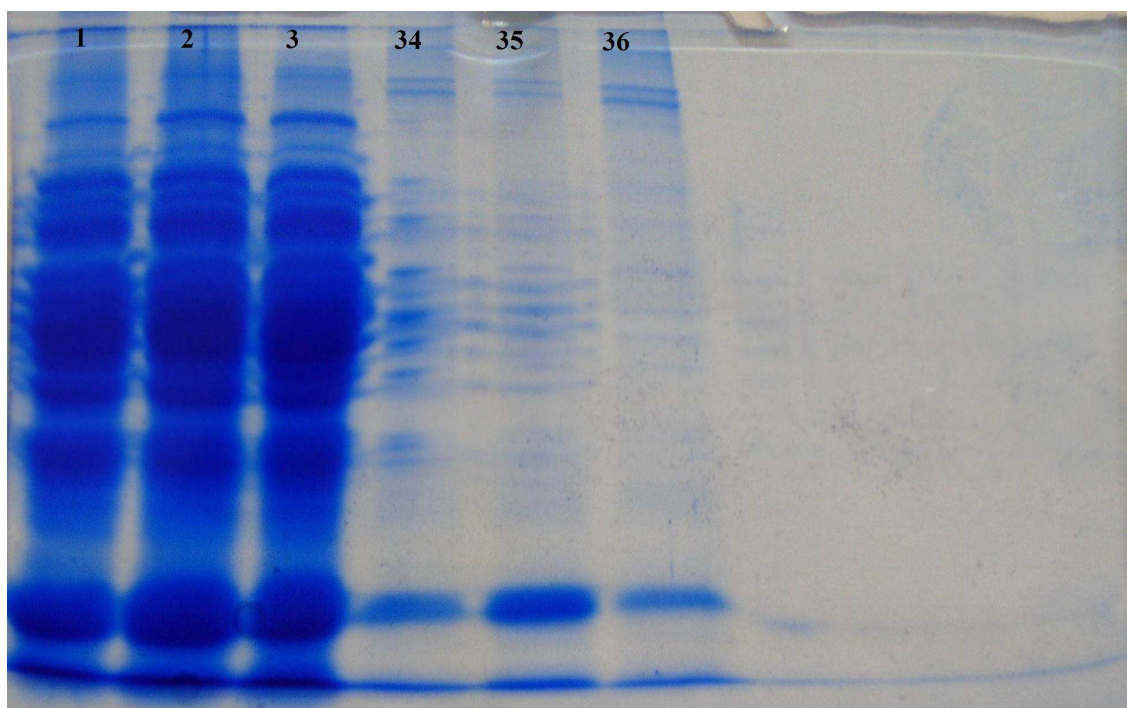
Takto připravený gel byl zdokumentován digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-4000 Zoom a vyhodnocen pomocí programu BIO-1D. Analyzované vzorky byly statisticky vyhodnoceny pomocí shlukové analýzy v programu Unistat verze 5.5.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

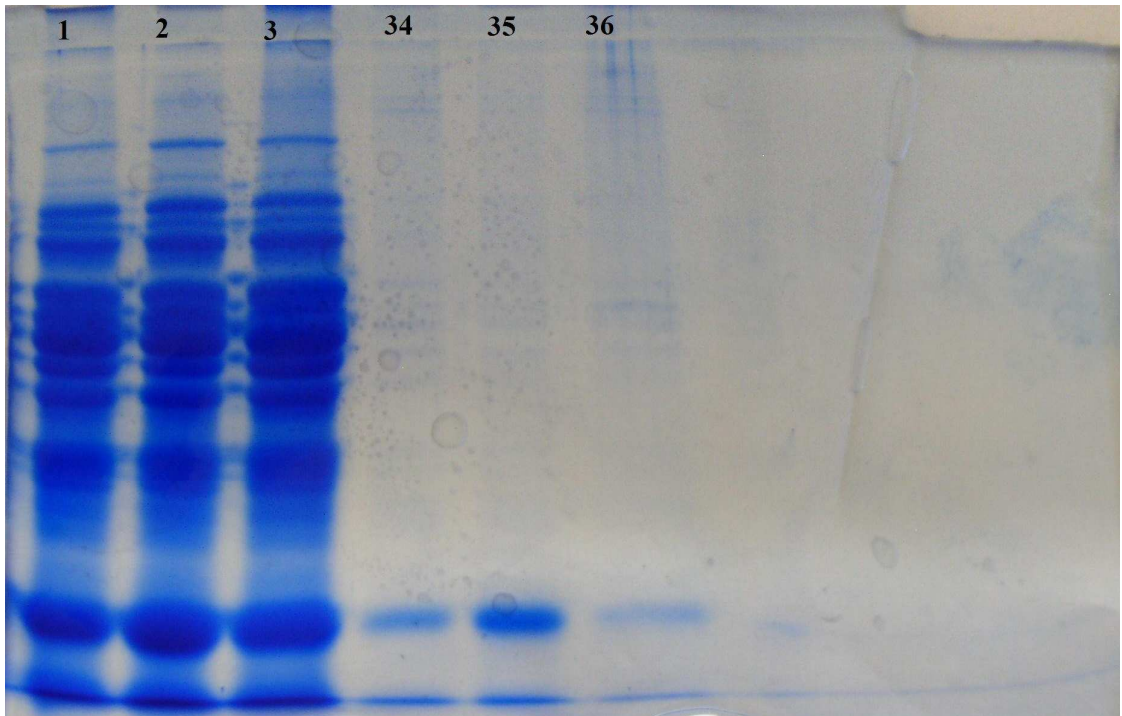
7.1 Optimalizace vzorků pro SDS-PAGE

Před samotným stanovením proteinového profilu bylo třeba určit, která koncentrace vzorků bude pro stanovení proteinů pomocí SDS-PAGE vhodná. Vhodná koncentrace byla určena experimentálně, a to provedením elektroforézy u vybraných vzorků. Analýza vzorků byla provedena u tří vzorků masa syrového (vzorek 1, 2, 3) a u tří vzorků masa tepelně opracovaného (vzorek 34, 35, 36). U každého vzorku byla provedena elektroforéza koncentrovaného vzorku a vzorku zředěného deionizovanou vodou v poměrech 1:1, 1:4 a 1:9 (viz. obr. 9, 10, 11, 12).

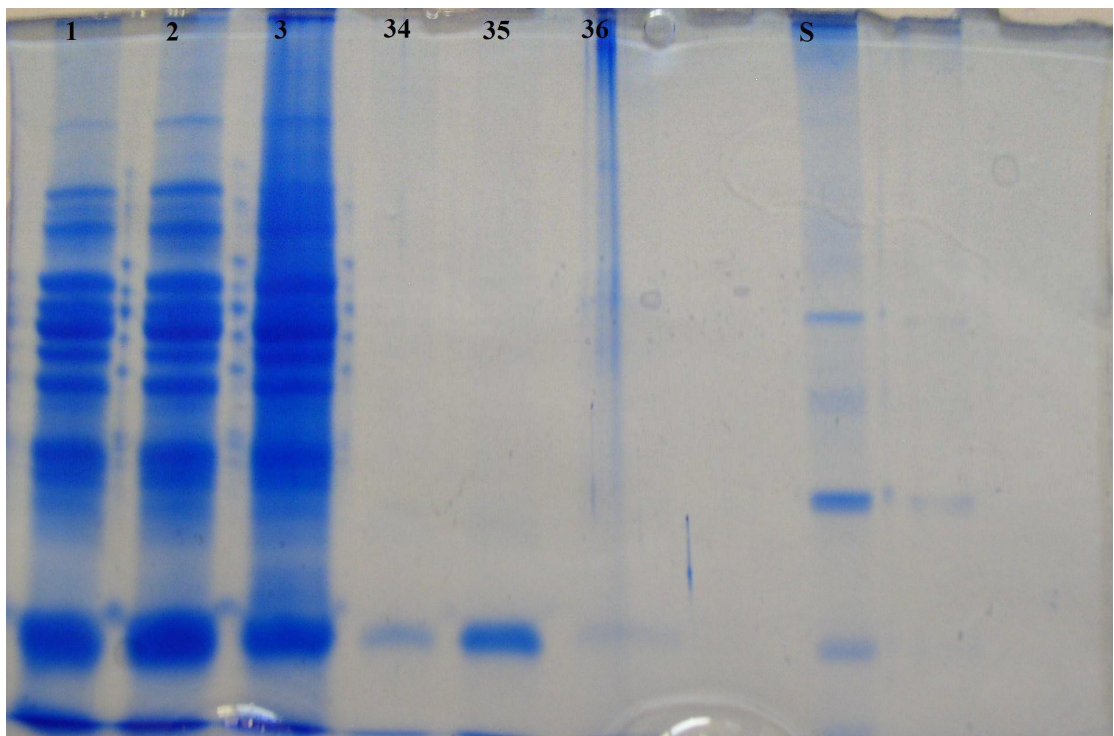
Po provedení SDS-PAGE všech vzorků byly gely obarveny, zdokumentovány a vizuálně porovnány. Dle porovnání bylo rozhodnuto, že pro stanovení proteinového profilu vzorky syrového masa budou ředěny v poměru 1:9 a vzorky tepelně upraveného masa budou ponechány v koncentrovaném stavu.



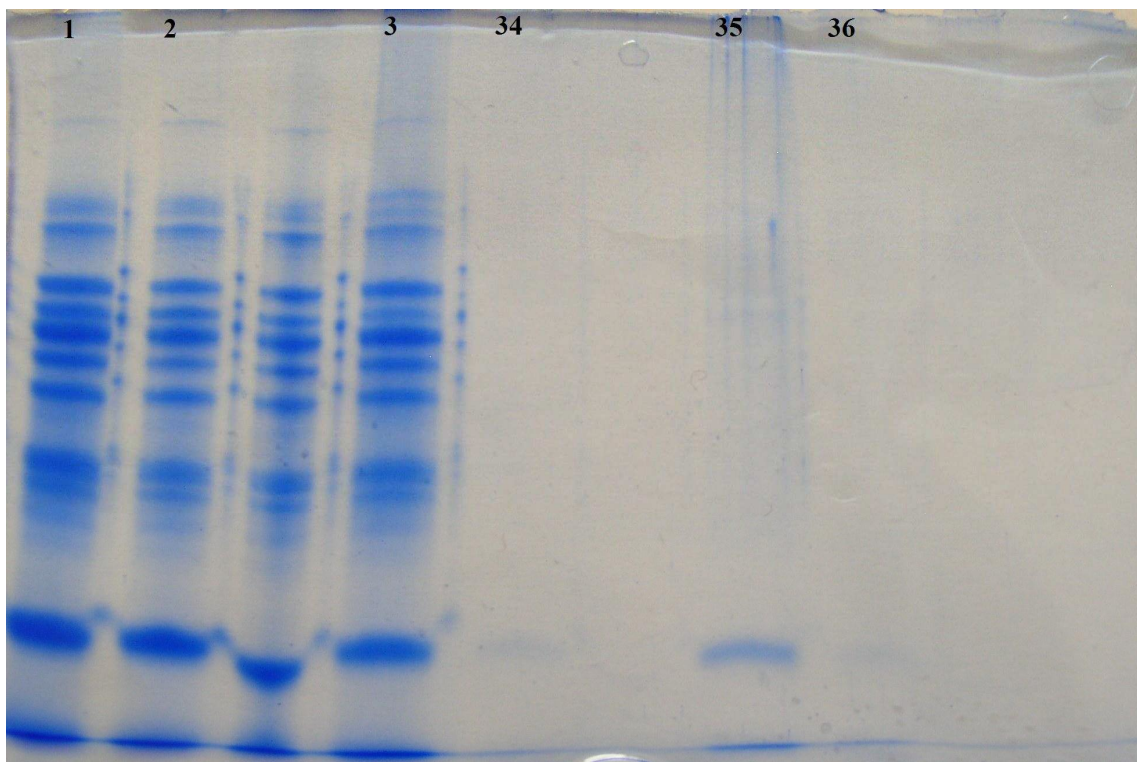
Obr.9: Proteinový profil koncentrovaných vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, 3: IS4, 34: IT2, 35: IT1, 36: IT4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Obr.10: Proteinový profil ředěných vzorků 1:1 získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, 3: IS4, 34: IT2, 35: IT1, 36: IT4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Obr.11: Proteinový profil ředěných vzorků 1:4 a vzorku molekulového hmotnostního standardu získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, 3: IS4, 34: IT2, 35: -T1, 36: IT4, S: molekulový hmotnostní standard. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Obr.12: Proteinový profil ředěných vzorků 1:9 získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, 3: IS4, 34: IT2, 35: IT1, 36: IT4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.

7.2 Výsledky proteinového profilu hovězího masa v průběhu jeho zrání

Elektroforetické stanovení proteinového profilu bylo provedeno v hovězím masa devíti mladých býků (býk A – I). Vzorky masa byly nanášeny na gel současně se standardem o známé molekulové hmotnosti. Elektroforetická analýza byla zaměřena na výskyt proteinů s molekulovou hmotností pod 100 kDa, kam patří i hydrolyzáty hlavních bílkovin. Vyšší molekulové hmotnosti nebyly analyzovány. S ohledem na tuto skutečnost byla zvolena následující velikost proteinových standardů: 12,5, 21, 29, 45 a 67 kDa. Elektroforézy vzorků byly provedeny duplicitně, snímky gelů všech analýz jsou zobrazeny v příloze 2

Srovnáním s molekulovým standardem byly pomocí programu BIO-1D vypočteny velikosti molekulových hmotností jednotlivých proteinů. Proteiny byly značeny manuálně a jejich správnost byla potvrzena přítomností píku v denzitometrické křivce dané dráhy.

Metodou SDS-PAGE byly ve vzorcích identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 8,9 až 93,2 kDa. Nejvyšší molekulová hmotnost, která byla byla identifikována u masa tepelně neopracovaného je hodnota 91,1 kDa a nejnižší 8,4 kDa. U masa tepelně opracovaného byla identifikována nejvyšší molekulová hmotnost 93,2 kDa a nejnižší 9,4

kDa. Počet identifikovaných proteinů se pohyboval v rozpětí od 4 až do 22 proteinů. U vzorků tepelně neopracovaných byl nejvyšší počet proteinů 22 a nejnižší 13. Vzorky tepelně opracované vykazovaly počty v rozmezí 4 až 12 proteinů.

Proteiny masa mají obvykle vyšší molekulovou hmotnost než jsme detekovaly ve vzorcích, ale z důvodu postihnutí rozkladných procesů byla zvolena kompromisní 12% koncentrace separačního gelu, která identifikuje proteiny s nižší molekulovou hmotností.

Proteinové profily býků byly také statisticky vyhodnoceny metodou shlukové analýzy, jejímž výsledkem jsou tzv. dendrogramy, kde jsou vzorky seskupeny dle podobnosti.

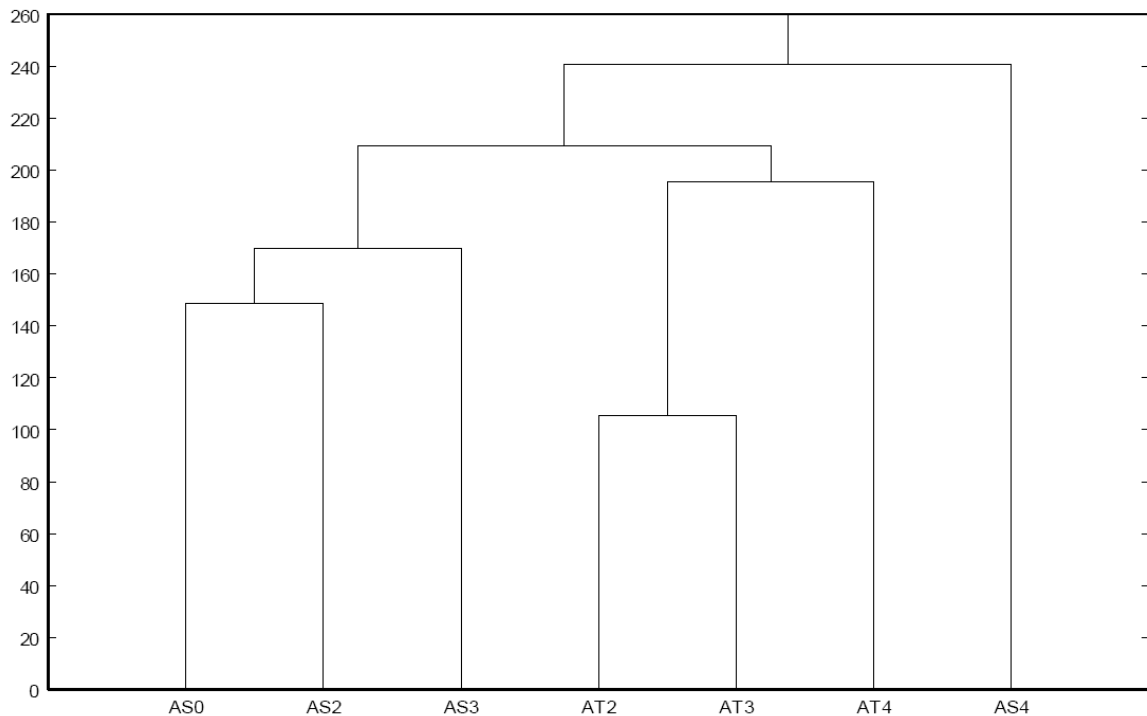
7.2.1 Proteinový profil hovězího masa býka A

V tabulce 17 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinů, které byly identifikovány metodou SDS-PAGE.

Tab. 17: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka A. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

AS0	AS2	AS3	AS4	AT2	AT3	AT4
77,0	84,5	81,8	81,1	87,6	91,3	89,3
71,0	82,2	68,9	76,6	81,1	83,8	86,2
67,9	78,5	44,5	71,0	78,2	80,8	80,6
62,3	72,9	40,6	68,4	33,1	52,0	78,0
57,8	70,1	30,7	61,1	29,9	31,1	10,2
44,6	64,2	28,3	57,6	25,6	26,0	
40,0	60,2	25,9	43,7	22,8	10,9	
30,6	48,7	24,4	40,1	10,7		
28,3	44,6	22,9	30,6			
25,7	42,0	20,7	28,2			
24,2	31,7	20,0	25,8			
22,9	28,7	18,4	24,3			
20,8	26,6	16,6	23,0			
19,8	24,7	10,2	20,8			
18,6	23,3		19,9			
17,2	21,0		18,4			
10,3	20,0		16,6			
	18,7		10,4			
	17,0					
	10,2					

Byly identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 10,2 – 91,3 kDa. Z tabulky je patrné, že u vzorků masa, které nebylo tepelně opracované, bylo detekováno mnohem více proteinů (14 – 20 proteinů) než u masa tepelně opracovaného (5 – 8 proteinů). Nejvíce proteinů bylo zaznamenáno u syrového masa zrajícího 2 týdny a nejmenší počet proteinů vykazoval vzorek tepelně opracovaný, který zrál 4 týdny.



Obr.13: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka A

Při shlukové analýze proteinového profilu býka A, jak je patrné na obrázku 13, se vytvořily 3 základní shluky. První shluk je tvořen vzorky syrového masa, které zrály 24 hodin (AS0), 2 týdny (AS2) a 3 týdny (AS3). Lze tedy předpokládat podobnost proteinového profilu těchto vzorků. Další podobnost lze sledovat u vzorků druhého shluku. Jedná se o vzorky masa tepelně opracovaného, které zrály po dobu 2 týdnů (AT2), 3 týdnů (AT3) a 4 týdnů (AT4). Samostatný shluk vytvořil vzorek syrového masa zrajícího 4 týdny (AT4). Lze z toho usuzovat, že tento vzorek má odlišný proteinový profil od vzorků tepelně ošetřených, ale také od ostatních vzorků tepelně neopracovaných.

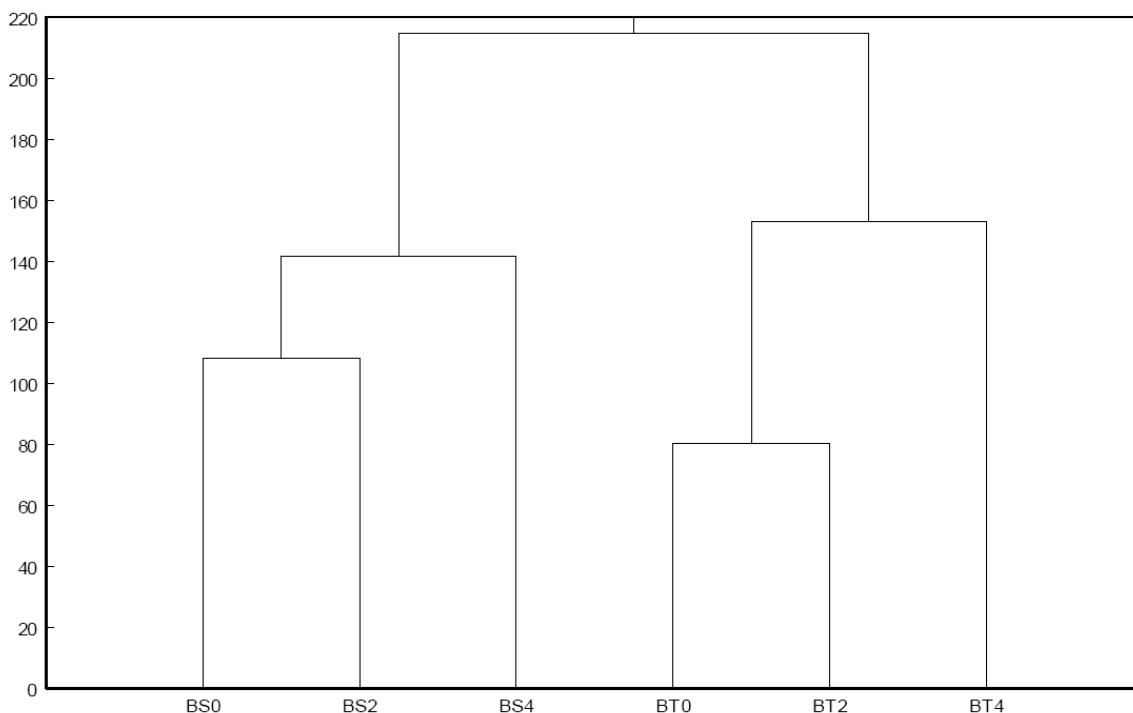
7.2.2 Proteinový profil hovězího masa býka B

Ve vzorcích masa býka B byly pomocí SDS.PAGE identifikovány proteiny v rozmezí molekulových hmotností 9,9 – 89,5 kDa. Nejvíce proteinů bylo detekováno ve vzorcích bez tepelné úpravy, a to u vzorků zrajících 24 hodin a 2 týdny, bylo zjištěno po 14-ti proteinech. U vzorků tepelně opracovaných bylo vyhodnoceno 9 proteinů u vzorku zrajícího 24 hodin a po 8 proteinech u vzorků, které zrály 2 a 4 týdny. Molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 18.

Tab. 18: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka B. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

BS0	BS2	BS4	BT0	BT2	BT4
83,4	70,9	79,9	88,7	89,5	89,3
71,6	51,5	71,9	84,4	84,3	83,8
51,0	48,0	52,3	81,4	81,0	80,5
47,1	42,6	43,3	57,4	56,2	54,5
42,6	31,6	32,1	45,4	46,6	44,3
31,6	29,0	28,8	34,5	35,3	34,4
29,0	26,1	26,5	27,7	28,5	27,8
26,0	25,5	26,0	25,2	12,5	12,3
25,2	24,3	24,5	12,0		
24,0	22,2	23,9			
22,2	21,1	22,2			
21,1	20,5	21,2			
20,5	9,9	20,6			
10,2		10,5			

Proteinový profil býka B vytvořil při shlukové analýze 2 základní shluky (viz. obr.14). První shluk je tvořen vzorky syrového masa zrajícího po dobu 24 hodin (BS0), 2 týdnů (BS2) a 4 týdnů (BS4). Druhý shluk vytvořily vzorky masa tepelně opracovaného, které zrály 24 hodin (BT0), 2 týdny (BT2) a 4 týdny (BT4). Můžeme tedy dle shlukové analýzy usuzovat, že vzorky masa tepelně neopracovaného a vzorky tepelně opracované mají odlišný proteinový profil.



Obr.14: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka B

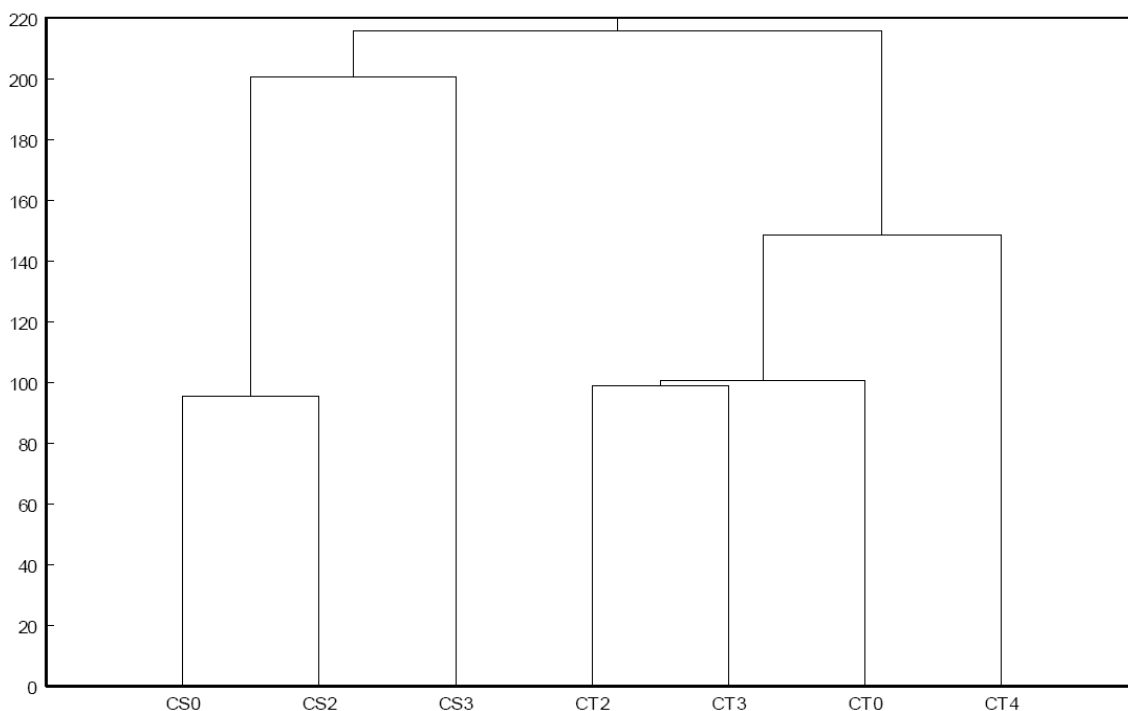
7.2.3 Proteinový profil hovězího masa býka C

V tabulce 19 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinů, které byly identifikovány pomocí metody SDS-PAGE. Byly identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 9,4 – 88,7 kDa. Z tabulky je patrné, že u vzorků masa, které nebylo tepelně opračované, bylo detekováno mnohem více proteinů než u masa tepelně opračované (5 – 8 proteinů). U vzorků syrového masa bylo prokázáno 14 proteinů, a to shodně u masa zrajícího 24 hodin, 2 týdny a 3 týdny. Nejmenší počet proteinů (5 proteinů) vykazovaly vzorky tepelně opračované s dobou zrání 24 hodin a 4 týdny.

Na obr.15 jsou zobrazeny výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka C. Vytvořily se 2 základní shluky. První shluk je tvořen vzorky masa tepelně neopracované, které zráló 24 hodin (CS0), 2 týdny (CS2) a 3 týdny (CS3). V tomto shluku vzorky zrající 24 hodin a 2 týdny vykazovaly vyšší podobnost proteinového profilu, vzorek zrající 3 týdny byl od předchozích vzorků oddělen, tudíž lze předpokládat, že se jeho proteinový profil od předchozích lišil. Druhý shluk byl tvořen vzorky masa tepelně opračované zrajícího 2 týdny (CT2), 3 týdny (CT3), 24 hodin (CT0) a 4 týdny (CT4). Proteinový profil vzorku zrajícího 4 týdny je pravděpodobně od ostatních vzorků masa tepelně opračované odlišný, jelikož jeho shluk je mírně oddělen.

Tab. 19: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka C. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

CS0	CS2	CS3	CT0	CT2	CT3	CT4
81,1	81,5	82,0	88,1	88,7	88,1	88,5
77,0	77,3	78,7	84,0	85,0	85,2	84,1
66,8	68,3	69,1	79,9	78,4	79,8	80,8
45,8	45,8	47,4	57,6	54,7	52,9	60,1
43,2	43,3	43,9	11,3	46,2	43,2	11,7
38,8	39,3	40,0		34,3	34,2	
30,2	30,2	30,9		28,0	27,5	
27,4	27,8	28,2		11,0	11,1	
25,4	25,4	25,7				
23,9	24,0	24,1				
22,7	22,7	22,8				
20,5	20,6	20,5				
19,5	19,5	19,7				
9,4	9,6	9,4				



Obr.15: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka C

7.2.4 Proteinový profil hovězího masa býka D

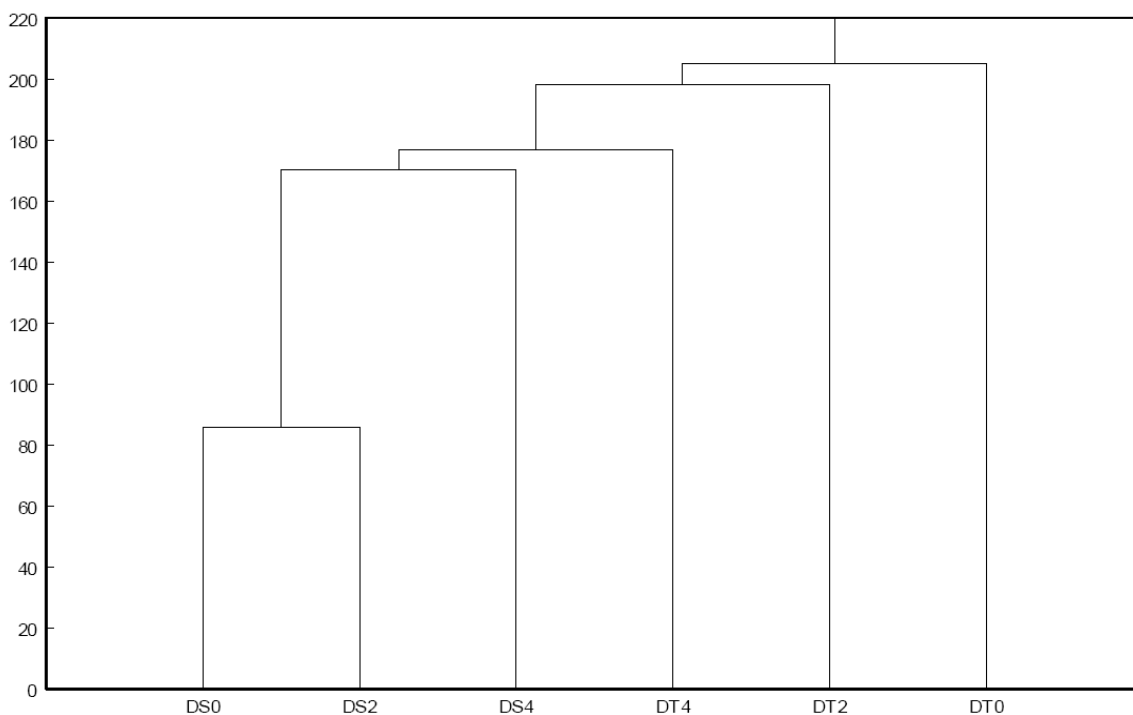
Ve vzorcích masa z býka D byly pomocí SDS.PAGE identifikovány proteiny v rozmezí molekulových hmotností 9,3 – 88,8 kDa. Nejvíce proteinů bylo detekováno ve vzorcích bez tepelné úpravy, a to u vzorků zrajících 24 hodin, bylo zjištěno 17 proteinů. Vzorky, syrového masa, které zrály 2 týdny, vykazovaly 16 proteinů a syrové vzorky zralé 4 týdny 14 proteinů. U vzorků tepelně opracovaných bylo vyhodnoceno nejvíce proteinů u vzorku zrajícího 24 hodin – 11 proteinů. U vzorků tepelně opracovaných, které zrály 2 týdny, bylo zjištěno 7 proteinů a u vzorků zralých 4 týdny bylo označeno 8 proteinů. Stanovené molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 20.

Tab. 20: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka D. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

DS0	DS2	DS4	DT0	DT2	DT4
85,8	83,3	66,2	84,4	87,7	88,8
83,5	69,0	43,4	79,8	85,4	85,3
68,4	47,8	39,6	75,4	81,0	82,8
47,8	44,2	30,1	71,8	48,8	50,6
44,4	40,3	27,6	46,6	40,4	38,2
40,1	30,4	25,4	42,3	26,3	30,3
30,6	27,6	23,7	31,4	9,7	27,7
27,4	25,4	22,6	28,6		9,4
25,4	23,8	21,9	24,7		
24,0	22,7	20,5	23,6		
22,7	21,9	20,0	10,1		
21,9	20,8	18,4			
20,6	19,8	16,1			
19,9	18,1	9,3			
18,2	16,3				
16,4	9,6				
9,5					

Při shlukové analýze proteinového profilu býka D, jak je patrné na obrázku 16, vykazují nejvyšší podobnost proteinových profilů vzorky masa tepelně neopracovaného, které zrály 24 hodin (DS0) a 2 týdny (DS2). Dále můžeme z výsledků pozorovat, že proteinové profily ostatních vzorků jsou v dendrogramu rovnoměrně umístěny a postupně kumulovány na vzorky již zmiňované, a to v tomto pořadí: vzorek tepelně neopracovaný zrající 4 týdny

(DS4), a vzorky tepelně opracované zrající 4 týdny (DT4), 2 týdny (DT2) a 24 hodin (DT0).



Obr.16: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka D

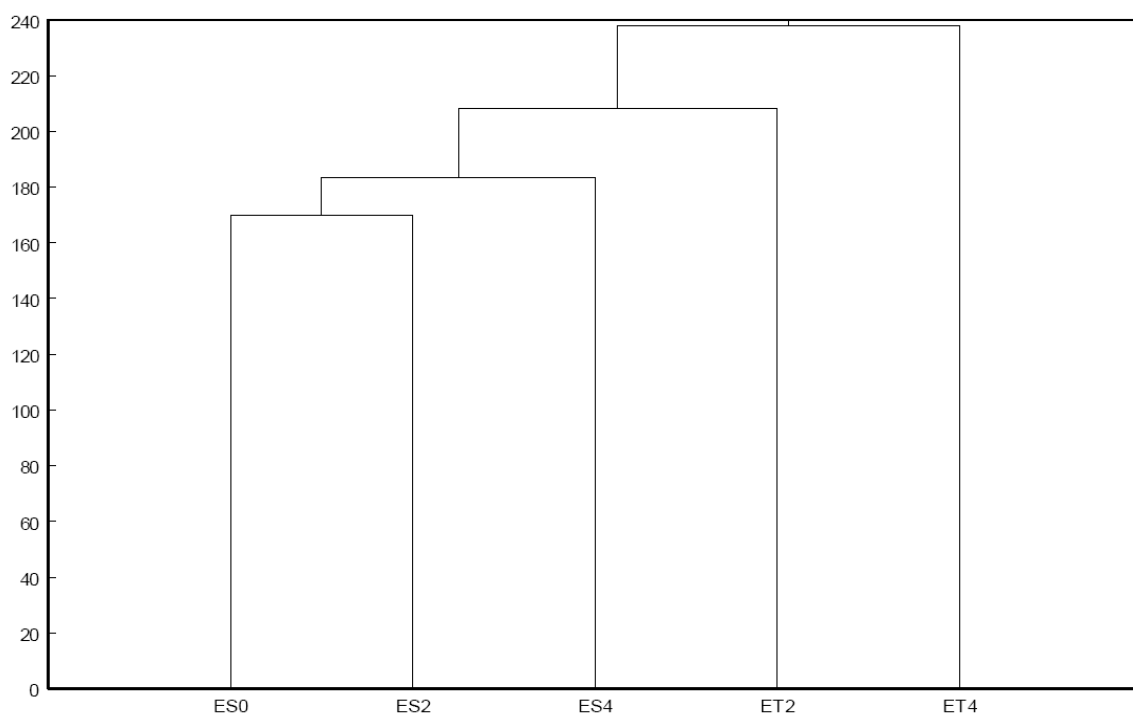
7.2.5 Proteinový profil hovězího masa býka E

V tabulce 21 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinů, které byly identifikovány pomocí metody SDS-PAGE. Byly identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 9,6 – 93,2 kDa. Z tabulky je patrné, že u vzorků masa, které nebylo tepelně opracované, bylo detekováno mnohem více proteinů než u masa tepelně opracovaného (8 – 12 proteinů). U vzorků syrového masa bylo prokázáno 18 proteinů, a to shodně u masa zrajícího 24 hodin a 2 týdny. Vzorek zrající 4 týdny vykazoval 13 proteinů. Nejmenší počet proteinů (8 proteinů) vykazoval vzorek tepelně opracovaný s dobou zrání 2 týdny.

Na obrázku 17 je zobrazena shluková analýza proteinového profilu býka E. Nejvyšší podobnost proteinových profilů vykazují vzorky masa tepelně neopracovaného, které zrály 24 hodin (ES0) a 2 týdny (ES2). Dále můžeme z dendrogramu pozorovat, že dalším nejvíce podobným proteinovým profilem je vzorek tepelně neopracovaný zrající 4 týdny (ES4). Další vzorky jsou umístěny v pořadí: tepelně opracovaný vzorek zrající 2 týdny (ET2) a tepelně opracovaný zrající 4 týdny (ET4).

Tab. 21: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka E. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

ES0	ES2	ES4	ET2	ET4
81,7	91,1	70,4	93,2	87,8
66,6	75,4	51,5	88,1	82,7
46,1	70,4	47,2	81,8	79,2
43,6	64,9	42,0	47,2	73,9
39,6	59,9	31,4	38,5	55,2
36,9	44,6	28,6	26,8	44,1
30,6	42,4	27,2	24,8	33,6
27,4	38,8	26,0	10,0	28,6
25,6	33,2	24,2		26,5
24,0	29,9	21,3		25,0
22,8	27,4	20,9		21,3
21,9	25,2	20,0		9,9
20,8	23,7	10,5		
19,9	22,6			
18,3	20,8			
17,4	19,9			
16,0	18,3			
9,9	9,6			



Obr. 17: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka E

7.2.6 Proteinový profil hovězího masa býka F

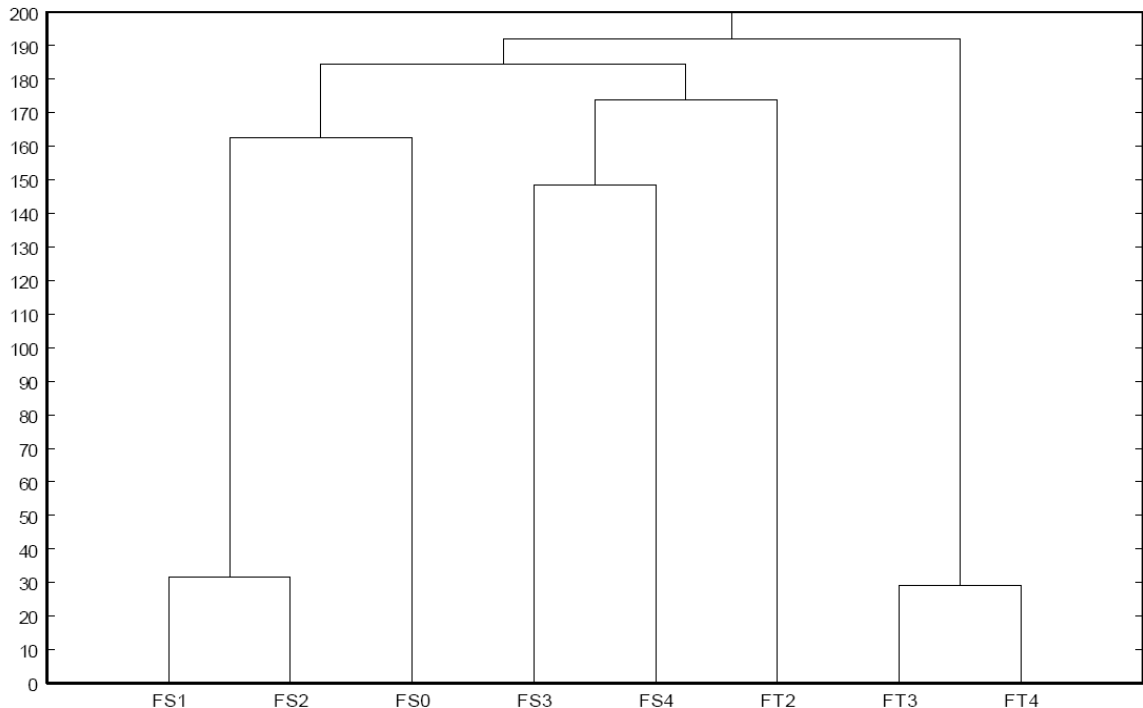
Ve vzorcích masa z býka F byly identifikovány proteiny v rozmezí molekulových hmotností 9,9 – 83,6 kDa. Nejvíce proteinů bylo detekováno ve vzorcích bez tepelné úpravy, a to u vzorků zrajících 2 týdny, bylo zjištěno 18 proteinů. Vzorek, syrového masa, který zrál 3 týdny, vykazoval 17 proteinů a u syrových vzorků zralých 24 hodin, 1 týden a 4 týdny bylo identifikováno shodně po 15- ti proteinech. U vzorků tepelně opracovaných bylo vyhodnoceno nejvíce proteinů u vzorku zrajícího 2 týdny – 10 proteinů. U vzorků tepelně opracovaných, které zrály 3 týdny, bylo zjištěno 6 proteinů a u vzorků zralých 4 týdny bylo označeno 5 proteinů. Stanovené molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 22.

Tab. 22: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka F. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

FS0	FS1	FS2	FS3	FS4	FT2	FT3	FT4
83,6	83,2	77,5	82,3	77,8	83,0	78,1	79,5
67,7	67,9	71,1	78,4	69,5	80,2	75,1	76,0
43,1	43,5	68,3	72,0	43,5	76,2	47,5	47,5
39,3	39,7	60,7	69,0	40,1	69,6	29,1	27,3
30,6	30,8	57,7	43,5	30,9	47,5	27,1	10,3
28,0	28,2	44,7	40,6	28,1	40,1	10,6	
25,9	25,8	39,5	31,0	26,1	25,2		
24,3	24,2	30,8	28,3	24,4	24,2		
23,0	23,0	27,7	26,1	23,0	21,6		
21,8	22,2	25,7	24,3	22,3	10,1		
20,8	20,9	24,2	23,1	20,8			
19,9	20,0	23,1	22,3	20,0			
18,1	18,3	22,2	20,9	18,8			
16,1	16,7	20,8	19,9	17,3			
10,1	10,5	19,9	18,7	10,1			
		18,4	16,8				
		16,7	10,0				
		9,9					

Při shlukové analýze proteinového profilu býka F, jak je patrné na obrázku 18, se vytvořily 3 základní shluky. První shluk je tvořen vzorky syrového masa, které zrály 1 týden (FS1), 2 týdny (FS2) a 24 hodin (FS0). Lze tedy předpokládat podobnost proteinového profilu těchto vzorků. Další podobnost lze sledovat u vzorků druhého shluku. Jedná se o vzorky masa

tepelně neopracovaného, které zrály po dobu 3 týdnů (FS3) a 4 týdnů (FS4) a vzorku masa tepelně opracovaného zrajícího 2 týdny (FT2). Další shluk vytvořily vzorky tepelně opracovaného masa zrajícího 3 týdny (FT3) a 4 týdny (FT4). Lze z toho usuzovat, že tyto vzorky mají odlišný proteinový profil od ostatních vzorků.



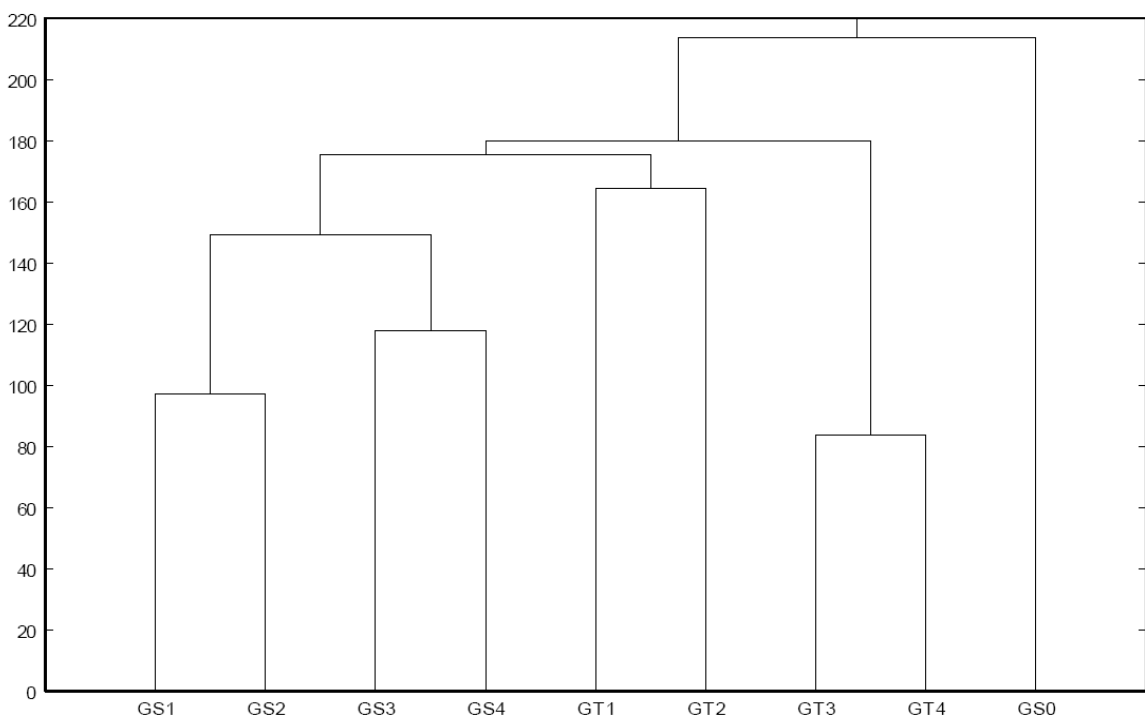
Obr.18: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka F

7.2.7 Proteinový profil hovězího masa býka G

V tabulce 23 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinů, které byly identifikovány pomocí metody SDS-PAGE. Byly identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 9,8 – 85,6 kDa. Z tabulky je patrné, že u vzorků masa, které nebylo tepelně opracované, bylo detekováno mnohem více proteinů než u masa tepelně opracovaného (7 – 8 proteinů). U vzorků syrového masa bylo prokázáno 18 proteinů, a to shodně u masa zrajícího 24 hodin a 1 týden. Vzorky zrající po dobu 2, 3 a 4 týdnů vykazovaly 17 proteinů. Nejmenší počet proteinů (7 proteinů) vykazoval vzorek tepelně opracovaný s dobou zrání 2 týdny. U vzorků zrajících 1, 3 a 4 týdny byl určen shodný počet 8 proteinů.

Tab. 23: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka G. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.

GS0	GS1	GS2	GS3	GS4	GT1	GT2	GT3	GT4
79,8	84,5	71,4	71,0	84,9	84,4	84,8	84,8	85,6
74,4	68,8	50,1	49,7	82,4	80,9	80,7	82,1	81,5
64,6	47,7	44,9	44,5	67,4	71,0	55,1	55,5	71,8
61,1	43,9	41,4	41,1	46,2	56,3	34,3	34,2	58,2
48,9	40,3	37,3	37,2	44,0	44,9	30,7	30,6	46,0
44,7	36,8	31,8	32,1	39,8	35,1	28,3	28,2	36,5
42,0	30,5	29,0	28,9	30,4	29,1	11,5	25,7	29,2
31,8	27,9	26,5	26,5	28,1	11,9		11,4	12,1
28,2	25,6	24,5	24,6	25,4				
26,5	23,9	23,0	23,1	23,6				
24,5	22,7	22,3	22,3	22,6				
23,3	21,9	20,4	20,5	22,0				
22,5	20,7	19,6	19,6	20,7				
21,0	19,8	17,7	17,6	19,9				
20,2	19,0	15,3	15,4	18,4				
18,6	17,3	12,7	12,6	16,5				
16,4	16,1	10,0	9,9	9,8				
10,2	10,0							



Obr.19: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka G

Proteinový profil býka G vytvořil při shlukové analýze 4 základní shluky (viz. obr.19). První shluk je tvořen vzorky syrového masa zrajícího po dobu 1 týdne (GS1), 2 týdnů (GS2), 3 týdnů (GS3) a 4 týdnů (GS4). Druhý shluk vytvořily vzorky masa tepelně opracovaného, které zrály 1 týden (GT1) a 2 týdny (GT2). Další shluk byl vytvořen tepelně opracovanými vzorky zrající 3 týdny (GT3) a 4 týdny (GT4). Samostatný shluk vytvořil vzorek syrového masa zrajícího 24 hodin (GS0). Lze z toho usuzovat, že tento vzorek má odlišný proteinový profil od vzorků tepelně ošetřených, ale také od ostatních vzorků tepelně neopracovaných.

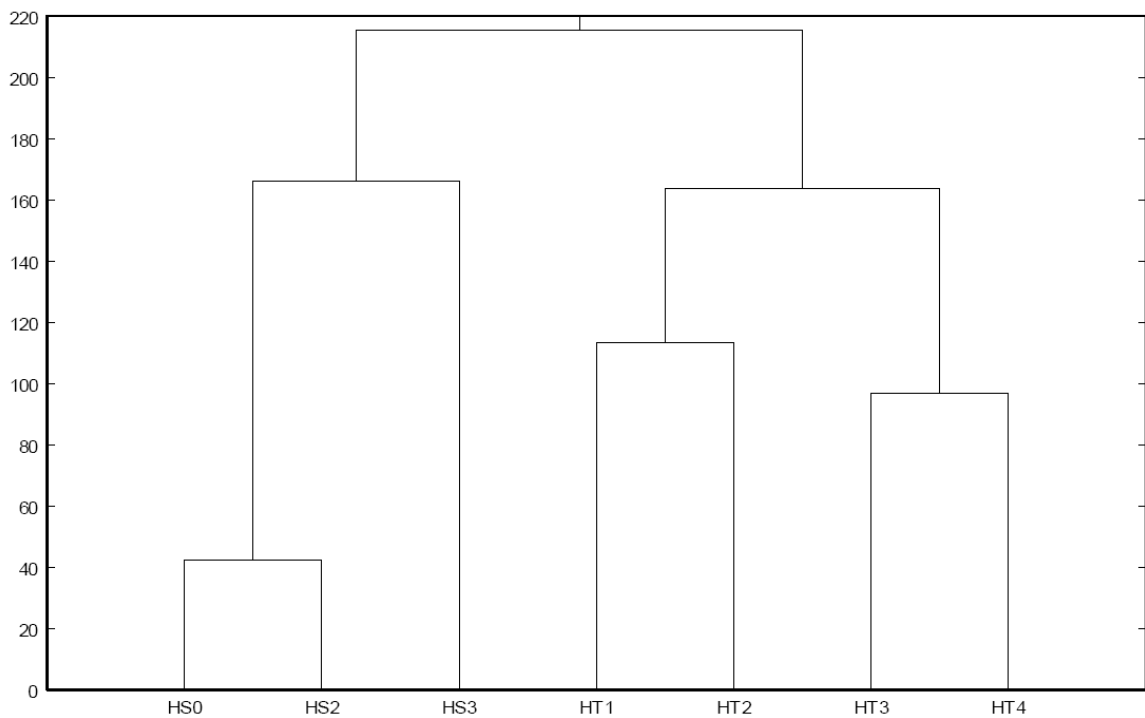
7.2.8 Proteinový profil hovězího masa býka H

V tabulce 24 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinů, které byly identifikovány pomocí metody SDS-PAGE. Byly identifikovány proteiny o molekulové hmotnosti v rozmezí 9,1 – 89,9 kDa. Z tabulky je zřejmé, že u vzorků masa, které nebylo tepelně opracované, bylo detekováno mnohem více proteinů než u masa tepelně opracovaného. U vzorků syrového masa bylo prokázáno nejvíce proteinů u masa zrajícího 3 týdny (17 proteinů). Vzorky zrající po dobu 24 hodin a 2 týdnů vykazovaly 14 proteinů. Nejmenší počet proteinů (6 proteinů) vykazovaly shodně vzorky tepelně opracované s dobou zrání 1, 2 a 3 týdny. U vzorků zrajícího 4 týdny byl určen počet 10 proteinů.

Na obr.20 jsou zobrazeny výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka H. Vytvořily se 2 základní shluky. První shluk je tvořen vzorky masa tepelně neopracovaného, které zrály 24 hodin (HS0), 2 týdny (HS2) a 3 týdny (HS3). V tomto shluku vzorky zrající 24 hodin a 2 týdny vykazovaly vyšší podobnost proteinového profilu, vzorek zrající 3 týdny byl od předchozích vzorků oddělen, tudíž lze předpokládat, že se jeho proteinový profil od předchozích lišil. Druhý shluk byl tvořen vzorky masa tepelně opracovaného zrajícího 1 týden (HT1), 2 týdny (HT2), 3 týdny (HT3) a 4 týdny (HT4). Lze tedy předpokládat, že proteinové profily vzorků masa tepelně neopracovaného a masa tepelně opracovaného jsou odlišné.

Tab. 24: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka H. Hodnoty jsou uvedeny v kDa

HS0	HS2	HS3	HT1	HT2	HT3	HT4
79,2	79,8	77,0	89,9	89,8	88,2	89,3
76,0	76,0	71,0	87,5	87,2	86,5	86,6
56,9	56,3	67,0	82,8	82,2	81,0	80,5
45,5	45,0	61,1	80,1	79,0	77,9	76,9
42,4	42,5	57,8	57,1	56,2	53,8	47,8
38,6	38,8	43,3	10,2	10,0	10,1	39,1
29,7	30,2	40,3				31,5
27,6	27,4	30,6				28,9
25,1	25,1	27,8				26,4
23,8	23,7	25,7				9,5
22,6	22,6	24,3				
20,3	20,4	23,0				
19,5	19,4	20,8				
9,2	9,1	19,9				
		18,5				
		16,5				
		10,2				



Obr.20: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka H

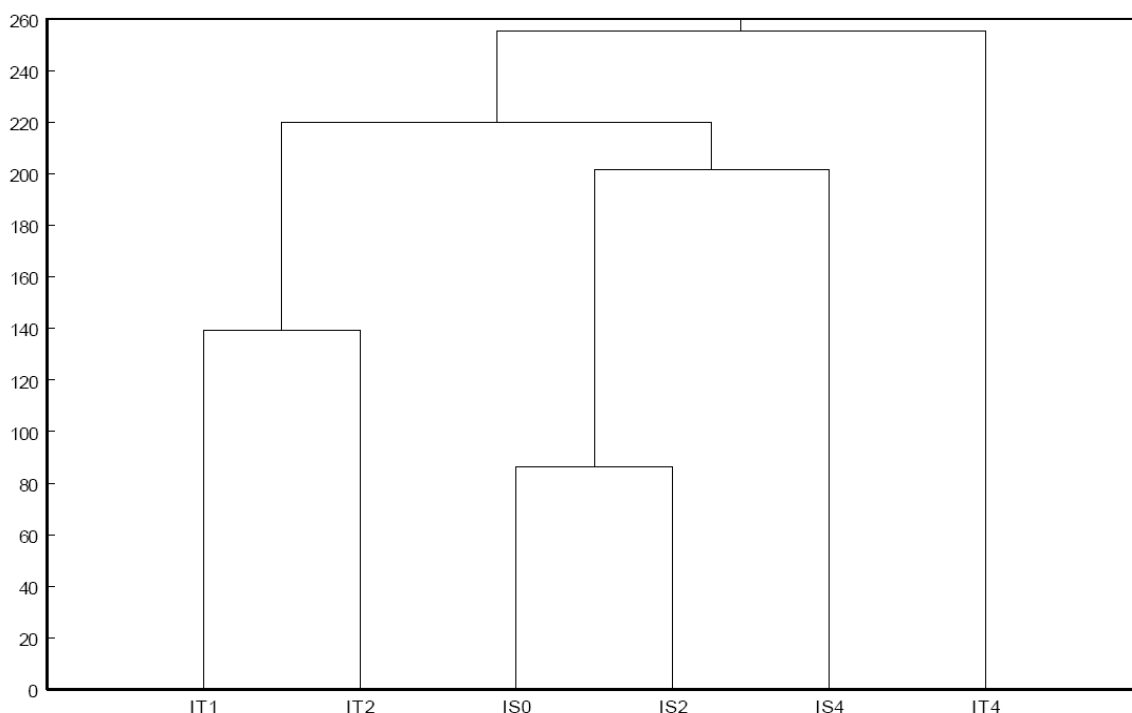
7.2.9 Proteinový profil hovězího masa býka I

Ve vzorcích masa z býka I byly pomocí SDS.PAGE identifikovány proteiny v rozmezí molekulových hmotností 8,9 – 90,4 kDa. Nejvíce proteinů bylo detekováno ve vzorcích bez tepelné úpravy, a to u vzorků zrajících 24 hodin, bylo zjištěno 22 proteinů. Vzorek, syrového masa, který zral 4 týdny, vykazoval 21 proteinů a u syrového vzorku zralých 2 týdny, bylo identifikováno 19 proteinů. U vzorků tepelně opracovaných bylo vyhodnoceno nejvíce proteinů u vzorku zrajícího 2 týdny – 8 proteinů. U vzorků tepelně opracovaných, které zraly 4 týdny, bylo zjištěno 6 proteinů a u vzorků zralých 4 týdny byly označeny pouze 4 proteiny. Stanovené molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 25.

Tab. 25: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka I. Hodnoty jsou uvedeny v kDa

ISO	IS2	IS4	IT1	IT2	IT4
88,8	87,2	85,0	89,0	89,0	90,4
84,5	81,6	82,8	83,8	83,6	87,8
82,4	69,9	71,8	81,0	80,8	82,7
70,7	47,7	60,2	9,9	56,0	79,8
65,8	42,4	50,2		45,8	54,9
60,2	32,3	47,4		35,0	10,0
54,9	29,4	42,3		28,3	
50,5	26,8	31,7		10,3	
46,3	24,7	29,3			
42,4	23,4	26,5			
32,3	22,4	24,3			
29,1	21,1	23,1			
26,8	20,4	21,0			
24,6	18,9	20,4			
23,2	18,5	19,8			
22,9	17,1	19,0			
21,0	14,5	18,4			
20,1	10,2	17,9			
18,3	9,7	15,3			
16,4		9,8			
9,7		9,0			
8,9					

Při shlukové analýze proteinového profilu býka I, jak je patrné na obrázku 21, se vytvořily 3 základní shluky. První shluk je tvořen vzorky tepelně opracovaného masa, které zrály 1 týden (IT1) a 2 týdny (IT2). Lze tedy předpokládat podobnost proteinového profilu těchto vzorků. Další podobnost lze sledovat u vzorků druhého shluku. Jedná se o vzorky masa tepelně neopracovaného, které zrály po dobu 24 hodin (IS0), 2 týdnů (IS2) a 4 týdnů (IS4). Samostatný shluk vytvořil vzorek tepelně opracovaného masa zrajícího 4 týdny (IT4). Lze z toho usuzovat, že tento vzorek má odlišný proteinový profil od vzorků tepelně neošetřených, ale také od ostatních vzorků tepelně opracovaných



Obr.21: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka I

7.3 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo zachytit změnu proteinového profilu v hovězím masu během jeho zrání. Změny proteinů byly sledovány v lyofilizovaných vzorcích čerstvého masa (24 hodin *post mortem*) a masa zrajícího po dobu 1 až 4 týdnů při teplotě 0 - 3 °C. Analyzované vzorky byly v různé fázi zralosti ponechány v syrovém stavu a lyofilizovány nebo byly tepelně opracované působením teploty bodu varu vody po dobu 3 hodin a lyofilizovány až po tepelném opracování.

U vzorků masa tepelně opracovaného bylo zjištěno, že počet detekovaných proteinů v rámci rozkladných procesů je nižší než u vzorků tepelně neopracovaných, jelikož během tepelného opracování došlo již ke změnám konformace a k chemickým změnám v molekulách proteinů [17].

Vyšší počet zjištěných proteinů u vzorků masa tepelně neopracovaného je výsledkem rozkladného procesu. Podstatný vliv na změny proteinů během zrání je prokázán a nejvíce prozkoumán u proteolytických enzymů – katepsinů a kalpainů. Účinkem jmenovaných enzymů dochází k destrukci bílkovinných makromolekul, což způsobuje posléze změkčení masa, které je nejvíce přisuzováno degradaci proteinů I-páso sarkomery, zejména Z-linie. Rozklad proteinů, zejména titinu a nebulinu, vede k fragmentaci myofibril a nakonec ke změkčení masa. Titin je degradován na fragmenty o molekulové hmotnosti 2400 kDa a 1200 kDa, vzhledem k jejich vysoké molekulové hmotnosti nebylo možno produkty jeho degradace zaznamenat. Nebulin je degradován na polypeptidy o molekulové hmotnosti v rozmezí 30 kDa až několik stovek kDa, některé produkty jeho rozkladu vzhledem k rozpětí molekulové hmotnosti bylo pravděpodobně možné detekovat [56, 57].

V hovězím mase se obecně často vyskytuje jako produkt rozkladu polypeptid o přibližné molekulové hmotnosti 38 kDa. Tento polypeptid je pravděpodobně produktem degradace dezminu. U několika vzorků masa tepelně neopracovaného byl detekován protein o takové molekulové hmotnosti a můžeme se domnívat, že se jedná tento degradační produkt dezminu. [56].

Dalším produktem degradace proteinů je fragment o molekulové hmotnosti 30 kDa, který je přisuzován rozkladu troponinu T. Troponin T je degradován na více fragmentů o molekulových hmotnostech 35, 30 a 28 kDa, ale důkazem rozkladu troponinu T je stabilní fragment o velikosti 30 kDa. Vzhledem k tomu, že troponin T je považován za regulátor reakce mezi aktinem a myozinem, můžeme výskyt těchto 30 kDa fragmentů považovat za ukazatel rozpadu ztuhlosti hovězího masa. Fragment přibližně o takové molekulové hmotnosti byl detekován téměř ve všech vzorcích masa tepelně neopracovaného [57, 58].

Dalším proteinem, jehož rozkladné produkty jsme mohli detekovat je tropomyozin. Ten je štěpen na fragment o velikosti 14 kDa a na několik menších polypeptidů. Synemin je dalším proteinem Z-linie a je rozkládán na velké množství polypeptidů o velikosti 40 – 220 kDa, hlavními fragmenty rozkladu jsou o velikosti 40, 45, 50, 66 a 200 kDa. Také jsme

mohli identifikovat fragmenty rozkladu vimentinu, který je rychle degradován na fragmenty o molekulové hmotnosti 40 a 42 kDa, ty jsou dále štěpeny na stabilní fragmenty o velikosti 27, 22, 20, 16 a 15 kDa [32, 56, 57].

Z nejvíce zastoupených proteinů masa – myozinu a aktinu bylo možno pravděpodobně pozorovat následující rozkladné produkty. U myozinu se jedná o fragmenty o molekulové hmotnosti 90 a 120 kDa, které byly dále degradovány na rozpustné fragmenty v rozmezí 67 – 90 kDa. Dále je štěpen aktin katepsinem B a D na fragmenty o molekulových hmotnostech 35 a 12 kDa a katepsinem L aktin na fragmenty o velikostech 40, 37 a 30 kDa [42].

Výše uvedené proteinové profily jednotlivých býků jsou výčtem molekulových hmotností, které byly v jejich mase v průběhu zrání detekovány. Můžeme se jen přibližně dle teoretických vědomostí domnívat, o které proteiny by se mohlo jednat. Vedle výše uvedených proteinů a jejich produktů rozkladu vzorky také dle předpokladu mohly obsahovat enzymy nebo jejich inhibitory bílkovinné povahy. Pro přesné určení proteinů by bylo například metodu SDS-PAGE kombinovat s jinou metodu detekce, např. imunoprecipitací, což je technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek. V této diplomové práci bylo cílem zachytit rozkladné procesy proteinů, a proto metoda SDS-PAGE byla pro tento účel dostačující.

ZÁVĚR

Studiem proteinového profilu hovězího masa během jeho zrání byly zjištěny rozdíly mezi vzorky masa tepelně neopracovaného a masa tepelně opracovaného. Jednotlivé závěry lze shrnout do několika bodů:

- Ve vzorcích masa tepelně neopracovaného byl metodou SDS-PAGE zaznamenán vyšší počet detekovaných proteinů než ve vzorcích masa tepelně opracovaného.
- Počet proteinů zjištěných ve vzorcích masa se pohyboval v rozmezí 4 až 22 proteinů. Nejvyšší počet proteinů detekovaných ve vzorcích masa tepelně neopracovaného byl 22 proteinů a nejnižší počet 13 proteinů. Ve vzorcích masa tepelně opracovaného byl nejvyšší počet 12 proteinů a nejnižší počet 4 proteiny.
- Hodnoty relativních molekulových hmotností detekovaných proteinů se nacházely mezi hodnotami 9,4 kDa až 93,2 kDa. Nejvyšší molekulová hmotnost ve vzorcích masa tepelně neopracovaného, která byla stanovena, je hodnota 91,1 kDa a nejnižší 8,9 kDa. U vzorků masa tepelně opracovaného byla zaznamenána nejvyšší molekulová hmotnost 93,2 kDa a nejnižší 9,4 kDa.
- Mezi vzorky masa tepelně neopracovaného vykazovaly nejbližší podobnost vzorky masa zrajícího 24 hodin a zrajícího 2 týdny. U vzorků tepelně opracovaných byla podobnost pozorována nejčastěji mezi vzorky zrajícími 1 týden a 2 týdny.

Pomocí metody SDS-PAGE, zvoleného hmotnostního molekulového standardu a zvolené koncentrace separačního gelu bylo možné identifikovat proteiny v rozmezí 9 až 93 kDa. Diplomová práce se zabývala zráním masa a jeho rozkladnými procesy, proto bylo takové rozmezí pro dané stanovení dostačující, neboť se předpokládal výskyt proteinů s nižší molekulovou hmotností.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] INGR, I. Jakou perspektivu má hovězí maso v naší výživě? *Výživa a potraviny*. 2004, sv. 59, č. 4., s. 103-105.
- [2] *Graf 2: Spotřeba masa v hodnotě na kosti (na obyvatele za rok)* [online] [cit. 2011-02-21] dostupný z WWW:
<<http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/tab/EA0049D182>>
- [3] INGR, I. Máme jíst maso? *Výživa a potraviny*. 2007, sv. 62, č. 6., s. 157-159.
- [4] INGR, I. Zrání masa a jeho praktický význam. *Výživa a potraviny*. 2003, sv. 58, č. 5., s. 147-148.
- [5] PIPEK, P. *Technologie masa I*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, 1993. 212 s. ISBN 80-7080-174-3.
- [6] *Vyhláška č. 326/2001 Sb.* Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.
- [7] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu* 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. 180 s. ISBN 978-80-7318-405-6
- [8] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [9] STEINHAUSER, L. a kol. *Produkce masa*. 1. vyd. Brno: Last, 2000. 464 s. ISBN 80-900260-7-9.
- [10] *II. Svalová tkáň příčně pruhovaná* [online] [cit. 2010-09-11] dostupný z WWW:
<<http://botany.upol.cz/atlasy/histologiezivocichu/tkane-svalove--svalovina-pricne-pruhovana.pdf>>
- [11] *Biochemie* [online] [cit. 2010-09-11] dostupný z WWW:
<http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0021_biochemie/distancni_text/M0021_

- biochemie_distancni_text.pdf>
- [12] DYLEVSKÝ, I., DRUGA, R., MRÁZKOVÁ, O. *Funkční anatomie člověka*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. 664 s. ISBN 80-7169-681-1.
- [13] INGR, I. *Technologie masa*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1996. 290 s. ISBN 80-7157-193-8.
- [14] OFFER, G., TRINICK, J. On the Mechanism of Water Holding in Meat: The Swelling and Shrinking of Myofibrils. *Meat Science*. 1983, č. 8, s. 245-281.
- [15] ZUBAY, G., L., PARSON, W. W., VANCE, D. E. *Principles of biochemistry*. 1. vyd. Dubuque: Wm. C. Brown Communications, Inc., 1995. 863 s. ISBN 0-697-14275-2.
- [16] *Potravinářská technologie I* [online] [cit. 2010-09-13] dostupný z WWW:
<http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0008_potravinarska_tehnologie_II/distancni_text/M0008_potravinarska_tehnologie_II_distancni_text.pdf>
- [17] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [18] HUFF - LONERGAN, E., PARISH, F. C., Jr, ROBSON, R. M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus Musile. *Journal of Animal Science*. 1995, č. 73, s. 1064-1073.
- [19] BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4. vyd. New York: Springer, 2008. 1070 s. ISBN 978-3-540-69933-0.
- [20] *I.1 .Kosterní svaly* [online] [cit. 2010-09-18] dostupný z WWW:
<<http://is.muni.cz/elportal/estud/fsps/js07/fyzio/texty/ch01s01.html>>
- [21] SYROVÝ, I. *Kontraktlní bílkoviny a funkční požadavky svalů*. 1. vyd. Praha: ČSAV, 1985. 112 s. ISBN 21-034-85.
- [22] TOLDRÁ, F. *Handbook of Meat Processing*. 1. vyd. Hardcover: Blackwell Publishing, 2010. 584 s. ISBN 978-0-8138-2182-5.
- [23] *Technologie masa* [online] [cit. 2010-09-25] dostupný z WWW:
<<http://web.vscht.cz/pipekp/ppv.pdf>>

- [24] HUI, Y. H. a kol. *Food Biochemistry and Food Processing*. 1. vyd. Hardcover: Blackwell Publishing, 2006. 796 s. ISBN 978-0-8138-0378-4.
- [25] CHICHESTER, C. O. *Advances in Food Research: vol. 20*. 1. vyd. New York, Londýn: Academic Press, 1973. 338 s. ISBN 978-0-1201-6420-2.
- [26] KOOHMARAIE, M., WHIPPLE, G., KRETCHMAR, D. H., CROUSE, J. D., MERSMANN, H. J. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*. 1991, č. 69, s. 617-624.
- [27] DAVÍDEK, J., VELÍŠEK, J., POKORNÝ, J. *Chemical Changes during Food Processing*. 4. vyd. Amsterdam: Elsevier, 1990. 448 s. ISBN 0-444-98845-9.
- [28] DEMAN, J. M. *Principles of Food Chemistry*. 3. vyd. New York: Aspen Publishers, 1999. 595 s. ISBN 978-0-8342-1234-3.
- [29] *Nářízení evropského parlamentu a rady č.853/2004*, ze dne 29.dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- [30] JOHNSON, M. H., CALKINS, C. R., HUFFMAN, R. D., JOHNSON, D. D., HARGROVE, D. D. Differences in cathepsin B + L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *Journal of Animal Science*. 1990, č. 68, s. 2371-2375.
- [31] DA CUNHA, R. G. T. Understanding meat maturation. *Meat International*. 2008, č. 2, s. 30-31.
- [32] TAYLOR, R. G., GEESINK, G. H., THOMPSON, V. F., KOOHMARAIE, M., GOLL, D. E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*. 1995, č. 73, s. 1351-1367.
- [33] HVÍZDALOVÁ, I. Působení enzymů během zrání masa s vlivem na jeho křehkost. *Meat International*. 2005, č. 2, s. 27.
- [34] NOWAK, M. Rola kalpain w procesie kruszenia miesa. *ZYWNOSC. Nauka. Technologia. Jakosc*. 2005, č. 1 (42), s. 5-17.
- [35] ZÍTKA, O., HÚSKA, D., ADAM, V., TRNKOVÁ, L., KIZEK, R. Elektrochemie jako nástroj pro studium interakce matrixové metalproteinázy-9 a kolagenu. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 216-220.

- [36] KUKAČKA, J., KIZEK, R., PRŮŠA, R. Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2008, č.3, s. 161-170.
- [37] JIANG, S.T. Contribution of Muscle Proteinases to Meat Tenderization. *Proceedings of the National Science Council, R.O.C. – Part B: Life Sciences*. 1998, ročník 22, č. 3, s. 97-107.
- [38] *Color of meat* [online] [cit. 2010-12-11] dostupný z WWW:
<[http://labs.ansci.illinois.edu/meatscience/library/cured%20meat%20reaction\(color\).gif](http://labs.ansci.illinois.edu/meatscience/library/cured%20meat%20reaction(color).gif)>
- [39] GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A.H., KOOHMARAIE, M. μ -calpain is essential for post-mortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*. 2006, č. 84, s. 2834-2840.
- [40] GÁBOR, M., TRAKOVICKÁ, A., MILUCHOVÁ, M., MORAVČÍKOVÁ, N. Genetic markers as one of tools for production of tenderness meat in cattle. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, s. 16-21.
- [41] SORIMACHI, H., ISHIURA, S., SUZUKI, K. Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal*. 1997, č. 328, s. 721-732.
- [42] ZEECE, M. G., WOODS, T. L., KEEN, M. A., REVILLE, W.J. Role of Proteinases and Inhibitors in Postmortem Muscle Protein Degradation. *American Meat Science Association: 45th Reciprocal Meat Conference*. 1992, s. 52-61.
- [43] TUCKER, G. A., WOODS, L. F. J. *Enzymes in food processing*. 1. vyd. Glasgow: Chapman & Hall. 1995. 327 s. ISBN 0-7514-0249-4.
- [44] PROCKOP, D. J., KIVIRIKKO, K. I. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annual Review of Biochemistry*. 1995, č. 64, s. 403-434.
- [45] NETZEL-ARNETT, S., FIELDS, G., BIRKEDAL-HANSEN, H., VAN WART, H. E. Sequence Specificities of Human Fibroblast and Neutrophil Collagenases. *Journal of Biological Chemistry*. 1991, č. 266, s. 6747-6755.
- [46] HONIKEL, K. O., JOSEPH, R. Very fast chilling. *Fleischwirtschaft*. 2002, roč. 82, č. 3, s. 116-121.

- [47] ČECH, S., HORKÝ, D. *Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 137 s. ISBN 80-210-3513-7.
- [48] INGR, I. Atypické zrání a kažení masa. *Výživa a potraviny*. 2003, sv. 58, č. 6., s. 174-176.
- [49] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981. 718 s. ISBN 04-814-81.
- [50] WALKER, J. W. *The Protein Protocols Handbook*. 2. vyd. New Jersey: Humana Press, 2002. 1146 s. ISBN 0-89603-941-2.
- [51] WALKER, J. W. *Basic protein and peptide protocols*. 1. vyd. New Jersey: Humana Press, 1994. 490 s. ISBN 0-89603-269-8.
- [52] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K. *Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints*. In Goodfellow, M., O'Donnell, A. G. *Modern microbial methods. Chemical methods in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. s. 493-521.
- [53] *Mini PROTEAN Tetra Electrophoresis system* [online] [cit. 2011-02-11] dostupný z WWW: <<http://www.miniprotean.com/>>
- [54] SOLTANIZADEH, N., KADIVAR, M., KERAMAT, J., FAZILATI, M. Comparison of fresh beef and camel meat proteolysis during cold storage. *Meat Science*. 2008, č. 80, s. 892-895.
- [55] VASILEVA, V., POPOVA, T. MARINOVA, P. Comparison of the postmortem changes in the myofibrillar structure of bovine m. *Longissimus dorsi*. *Archiva Zootechnica*. 2010, č. 13, s. 47-53.
- [56] LONERGAN, E. H., LONERGAN, S. M. Interaction between myofibril structure and proteolytic tenderization in beef. *Department of Animal Science*. [online] [cit. 2011-04-29] dostupný z WWW: <<http://www.icomst.helsinki.fi/ICoMST2008/CD%20Papers/Invited%20speakers/6.2.Lonergan.Interaction%20between%20myofibril%20structure%20and%20proteolytic%20tenderization%20in%20beef.pdf>>

- [57] GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., CONG, J. The calpain system. *Physiological Reviews*. 2003, č. 83, s. 731-801.
- [58] IWANOWSKA, A., IWANSKA, E., GRZES, B., MIKOLAJCZAK, B., POSPIECH, E., ROSOCHACKI, S., JUSZCZUK-KUBIAK, E., LYCZYNSKI, A. Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. *Animal Science Papers and Reports*. 2010, roč. 28, č.1, s. 13-25.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	Adenozindifosfát
ATP	Adenozintrifosfát
CB	Katepsin B
CD	Katepsin D
CL	Katepsin L
DFD	Dark, firm, dry (tmavý, tuhý, suchý)
HMM	Těžký meromyozin
kDa	Kilodalton
LMM	Lehký meromyozin
MMP	Matrix metaloproteináza
PSE	Pale, soft, exudative (bledý, měkký, vodnatý)
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TEMED	N,N,N',N'- tetra-metylendiamin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Příčně pruhovaná svalovina (vlevo podélný řez, vpravo příčný řez) [10].....	15
Obr. 2: Svalové vlákno [11].....	16
Obr. 3: Stavba sarkomery [20].....	17
Obr. 4: Změny myoglobinu působením kyslíku, dusitanů a tepla [38].....	28
Obr. 5: Změny vaznosti hovězího masa v postmortálním období [16].....	29
Obr. 6: Štěpení myozinu katepsiny D, B a L [42].....	35
Obr. 7: Průběh hodnot pH vepřového masa v jakosti normální, PSE a DFD v prvních 24h <i>post mortem</i> [16].....	37
Obr. 8: Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD) [53].....	46
Obr.9: Proteinový profil koncentrovaných vzorků získaných metodou SDS-PAGE.....	48
Obr.10: Proteinový profil ředěných vzorků 1:1 získaných metodou SDS-PAGE.....	49
Obr.11: Proteinový profil ředěných vzorků 1:4 a vzorku molekulového hmotnostního standardu získaných metodou SDS-PAGE.....	49
Obr.12: Proteinový profil ředěných vzorků 1:9 získaných metodou SDS-PAGE.....	50
Obr.13: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka A.....	52
Obr.14: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka B.....	54
Obr.15: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka C.....	55
Obr.16: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka D.....	57
Obr.17: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka E.....	58
Obr.18: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka F.....	60
Obr.19: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka G.....	61
Obr.20: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka H.....	63
Obr.21: Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu býka I.....	65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Základní složení libové svaloviny [13].....	19
Tab. 2: Složení hovězího masa v závislosti na pohlaví, věku a typu svalu [5].....	20
Tab. 3: Svalové proteiny savčího svalu ve stadiu <i>rigor mortis</i> [19].....	21
Tab. 4: Aminokyselinové složení svalových bílkovin v mg.g ⁻¹ [13].....	24
Tab. 5: Obsah minerálních látek v hovězím mase [19].....	26
Tab. 6: Vliv druhu n a pokles teploty a pH během 24h <i>post mortem</i> [26].....	32
Tab. 7: Endogenní enzymy podílející se na zrání masa [37, 43].....	34
Tab. 8: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk A, stáří 17 měsíců.....	42
Tab. 9: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk B, stáří 17 měsíců.....	42
Tab. 10: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk C, stáří 17 měsíců.....	42
Tab. 11: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk D, stáří 26 měsíců.....	43
Tab. 12: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk E, stáří 17 měsíců.....	43
Tab. 13: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk F, stáří 17 měsíců.....	43
Tab. 14: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk G, stáří 17 měsíců.....	44
Tab. 15: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk H, stáří 17 měsíců.....	44
Tab. 16: Charakteristika vzorků hovězího masa – býk I, stáří 17 měsíců.....	44
Tab. 17: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka A. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	51
Tab. 18: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka B. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	53
Tab. 19: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka C. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	55
Tab. 20: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka D. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	56
Tab. 21: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka E. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	58

Tab. 22: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka F. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	59
Tab. 23: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka G. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	61
Tab. 24: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka H. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	63
Tab. 25: Stanovený proteinový profil hovězího masa býka A. Hodnoty jsou uvedeny v kDa.....	64

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Seznam roztoků pro SDS-PAGE

Příloha II: Snímky gelů provedených analýz pomocí SDS-PAGE

PŘÍLOHA P I: SEZNAM ROZTOKŮ PRO SDS-PAGE

○ Tris pufr pro separační gel, pH 8,8 [52]

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 18,15 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upravit na hodnotu pH 8,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při 4 °C.

○ Tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8 [52]

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 6,0 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upravit na hodnotu pH 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při 4 °C.

○ 30% roztok akrylamidu, 2,67%C [52]

Akrylamid (SERVA) 29,2 g

N,N'-metylenbisakrylamid (SERVA) 0,8 g

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C.

○ Vzorkový pufr [52]

(0,062 M Tris-HCl, 5% merkptoetanol a 10% glycerol)

Tris-HCL (SERVA) 0,0977 g

Merkptoetanol (SERVA) 0,5 g

Glycerol (Lach-Ner) 1,0 g

Bromfenolová modř (SERVA) 0,01 g

Upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 10 ml.

- Elektrodový pufr

Elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA), ředění 1:9

- Fixační roztok [52]

(10% kyselina octová, 30% etanol)

Etanol, 96% (Lach-Ner) 30 ml

Kyselina octová (Lach-Ner) 10 ml

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

- Barvicí roztok [52]

0,25% Coomassie Blue R-250 (SERVA) v 50% (v/v) metanolu (Lach-Ner) a 10% (v/v) kyselině octové (Lach-Ner).

- Odbarvovací roztok [48]

25% (v/v) metanol (Lach-Ner) a 10% (v/v) kyselina octová (Lach-Ner).

- 12% separační gel

30% roztok akrylamidu 11,7 ml

Tris pufr, pH 8,8 7,8 ml

Deionizovaná voda 10,5 ml

10% SDS (SERVA) 0,3 ml

10% persíran amonný (SERVA) 120 μ l

N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (SERVA) 15 μ l

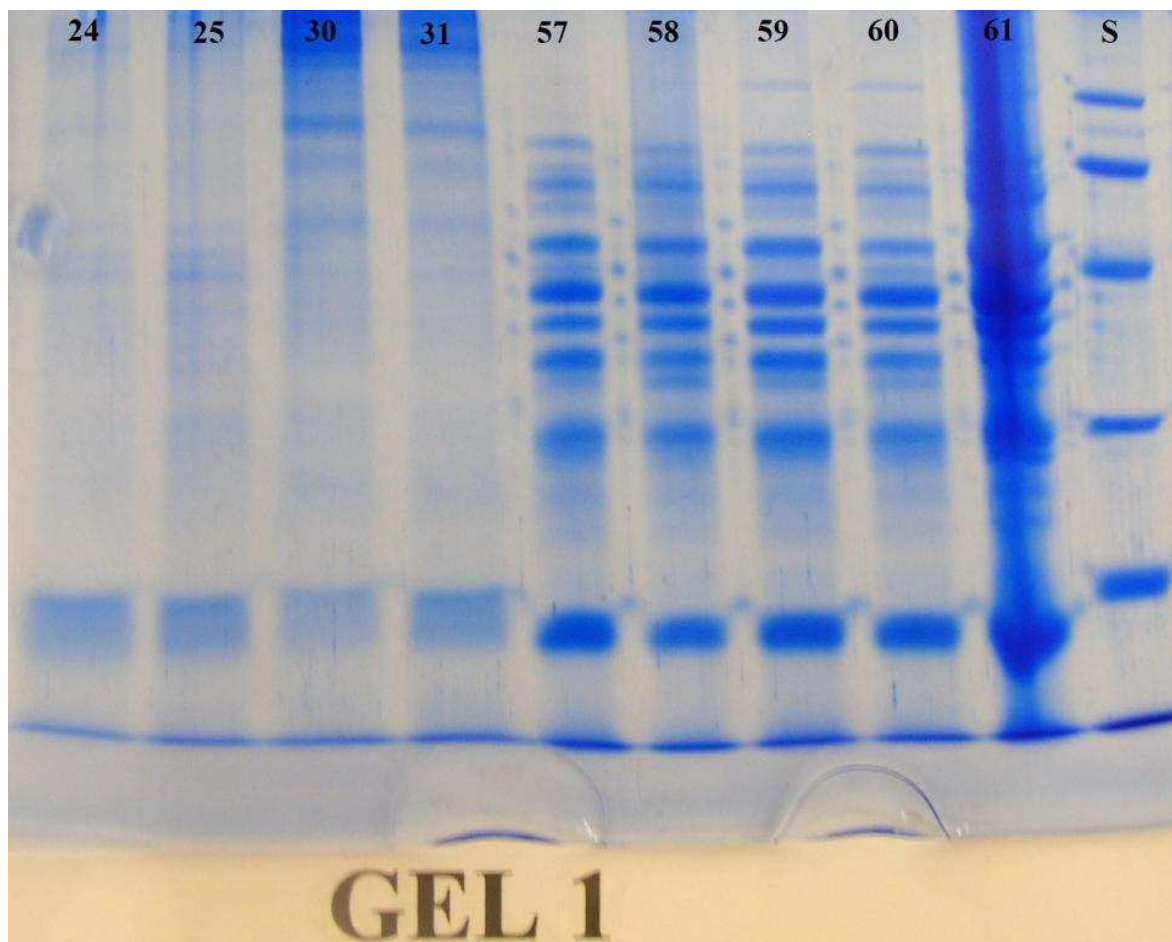
- 5% koncentrační gel

30% roztok akrylamidu 1,5 ml

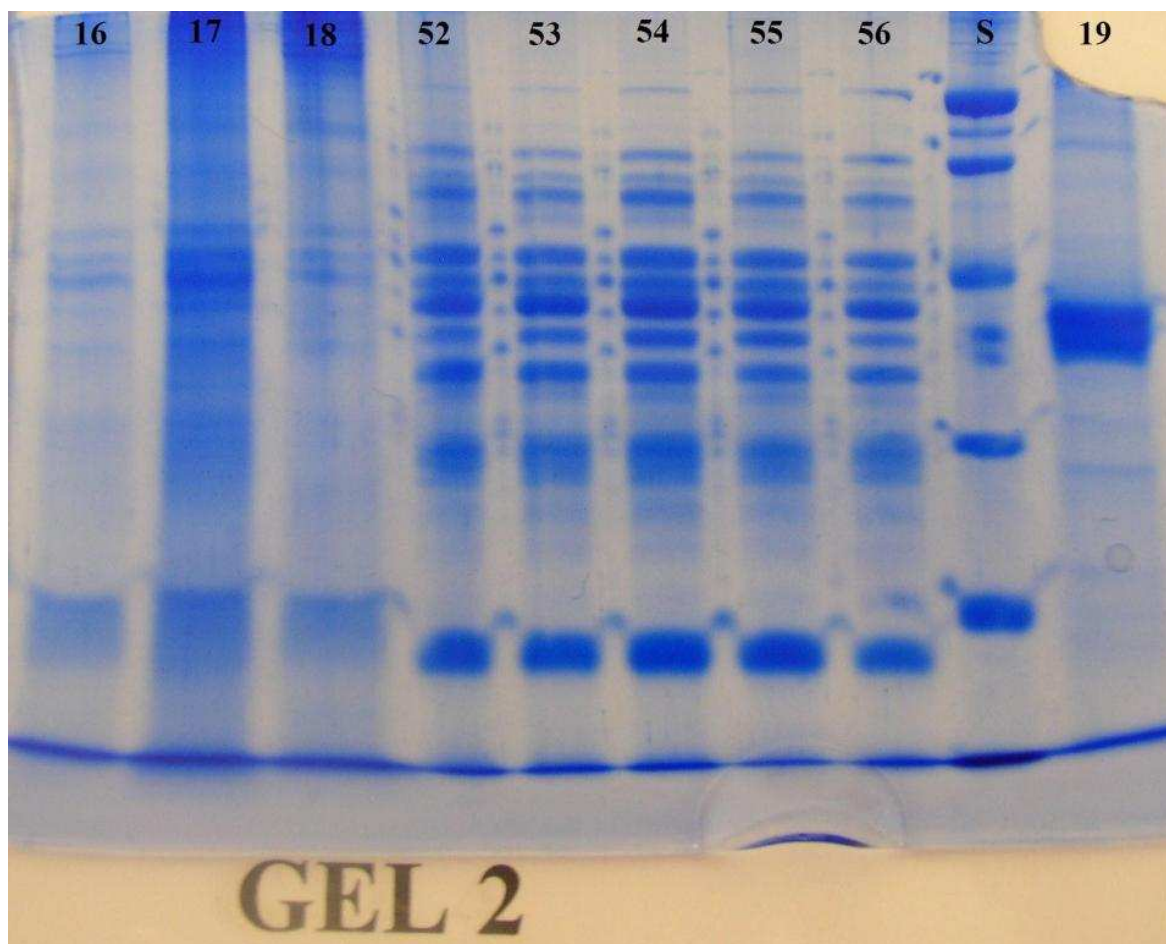
Tris pufr, pH 6,8 2,2 ml

Deionizovaná voda	5,1 ml
10% SDS (SERVA)	88 µl
10% persíra amonný (SERVA)	44 µl
<i>N,N,N',N'</i> -tetra-metylendiamin (SERVA)	11 µl

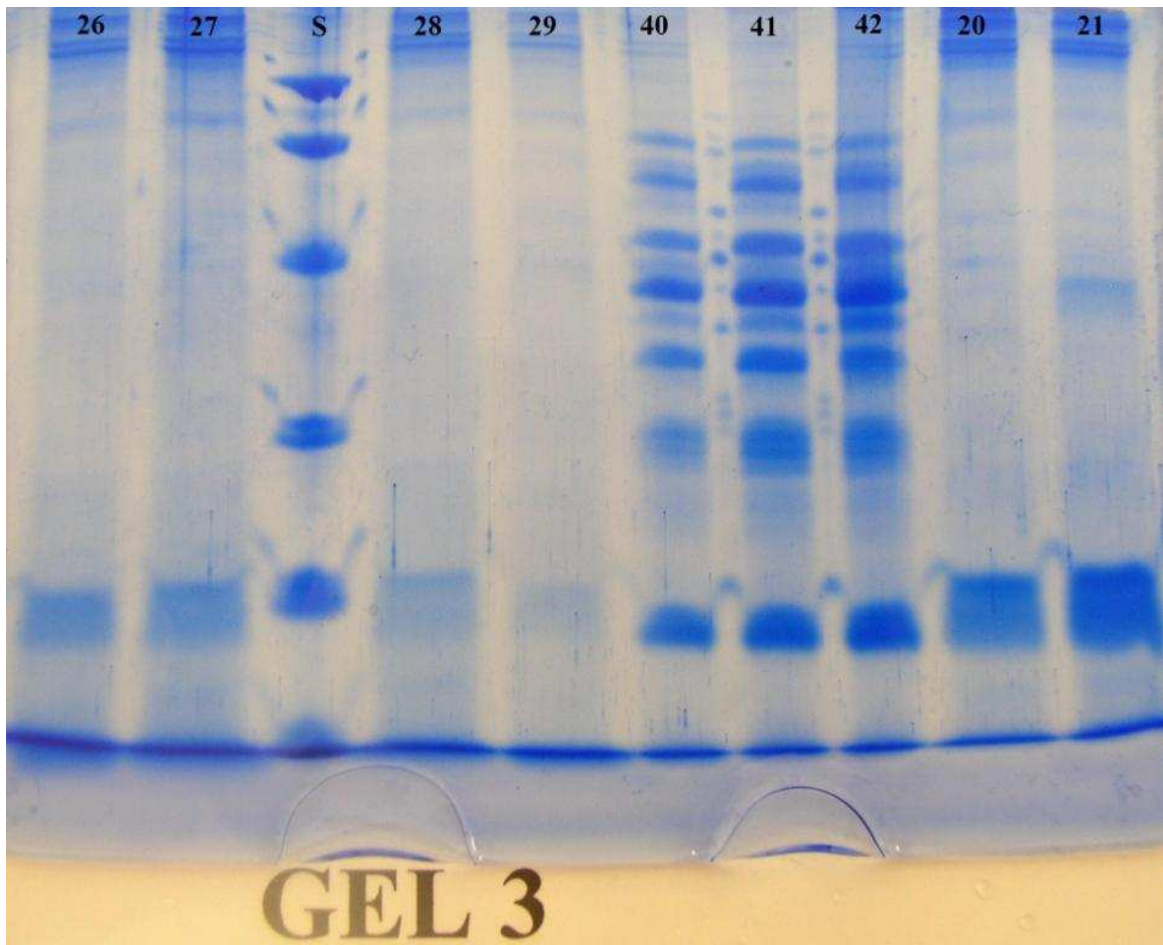
PŘÍLOHA P II: SNÍMKY GELŮ PROVEDENÝCH ANALÝZ POMOCÍ SDS-PAGE



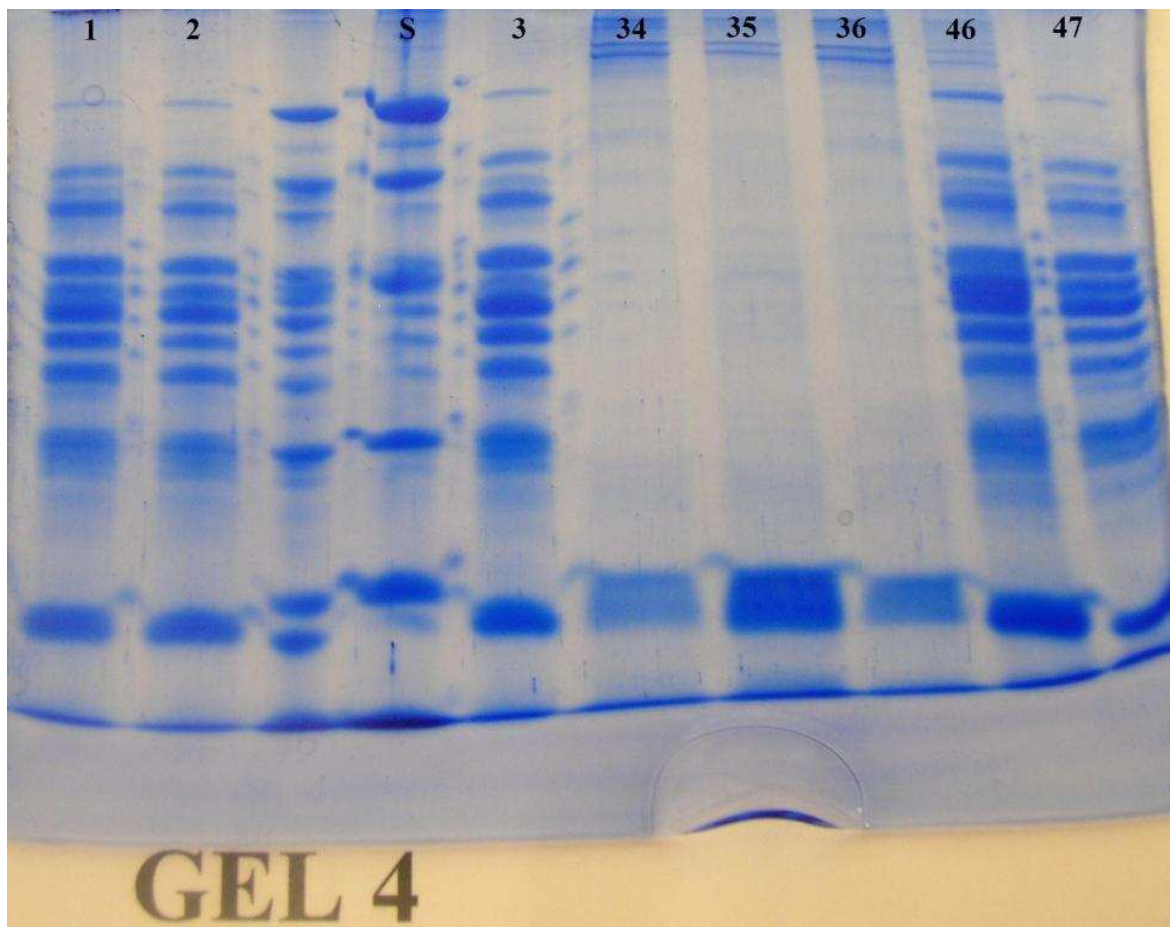
Gel 1: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 24: GT2, 25: GT3, 30: GT4, 31: GT1, 57: GS1, 58: GS0, 59: GS2, 60: GS3, 61: GS4, S: hmotnostní molekulový standard. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



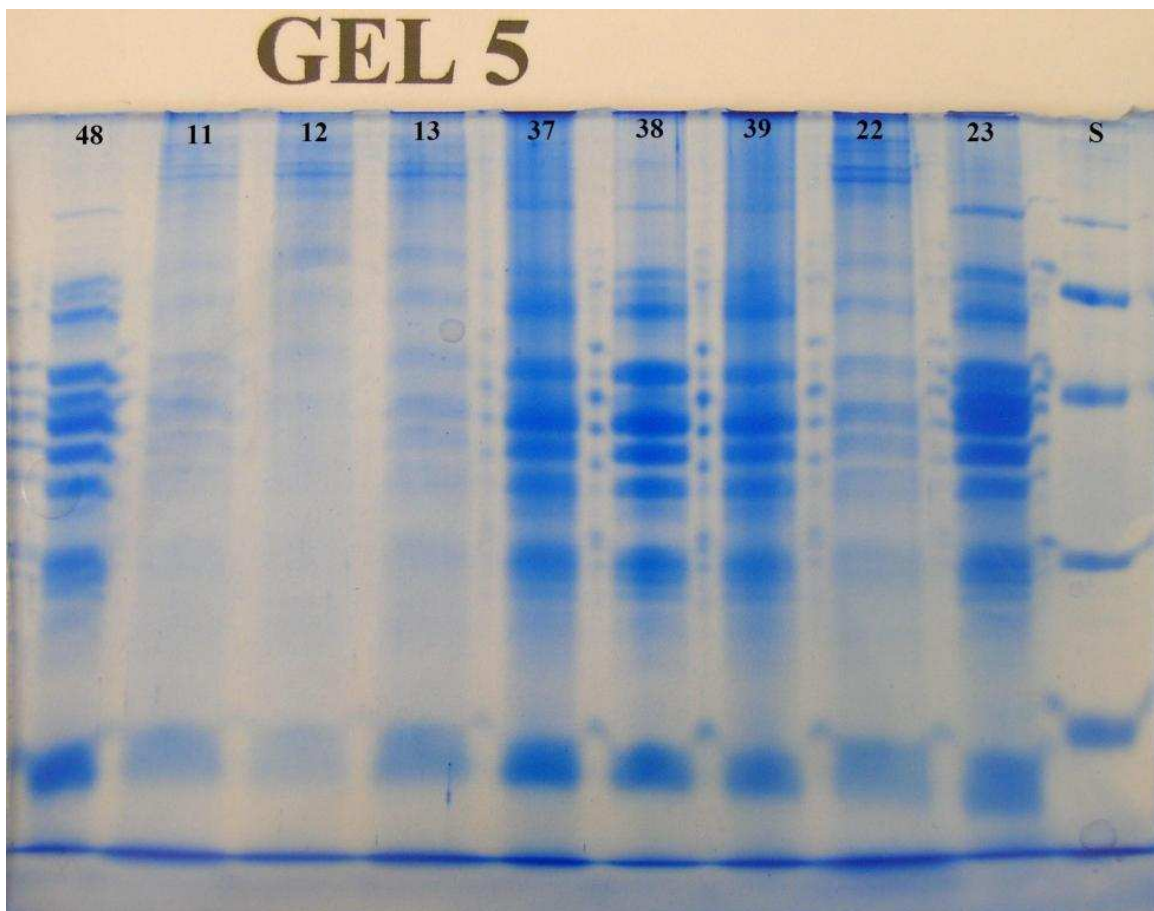
Gel 2: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 16: FT3, 17: FT4, 18: FT2, 52: FS2, 53: FS0, 54: FS1, 55: FS3, 56: FS4, S: hmotnostní molekulový standard, 19: DT0. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



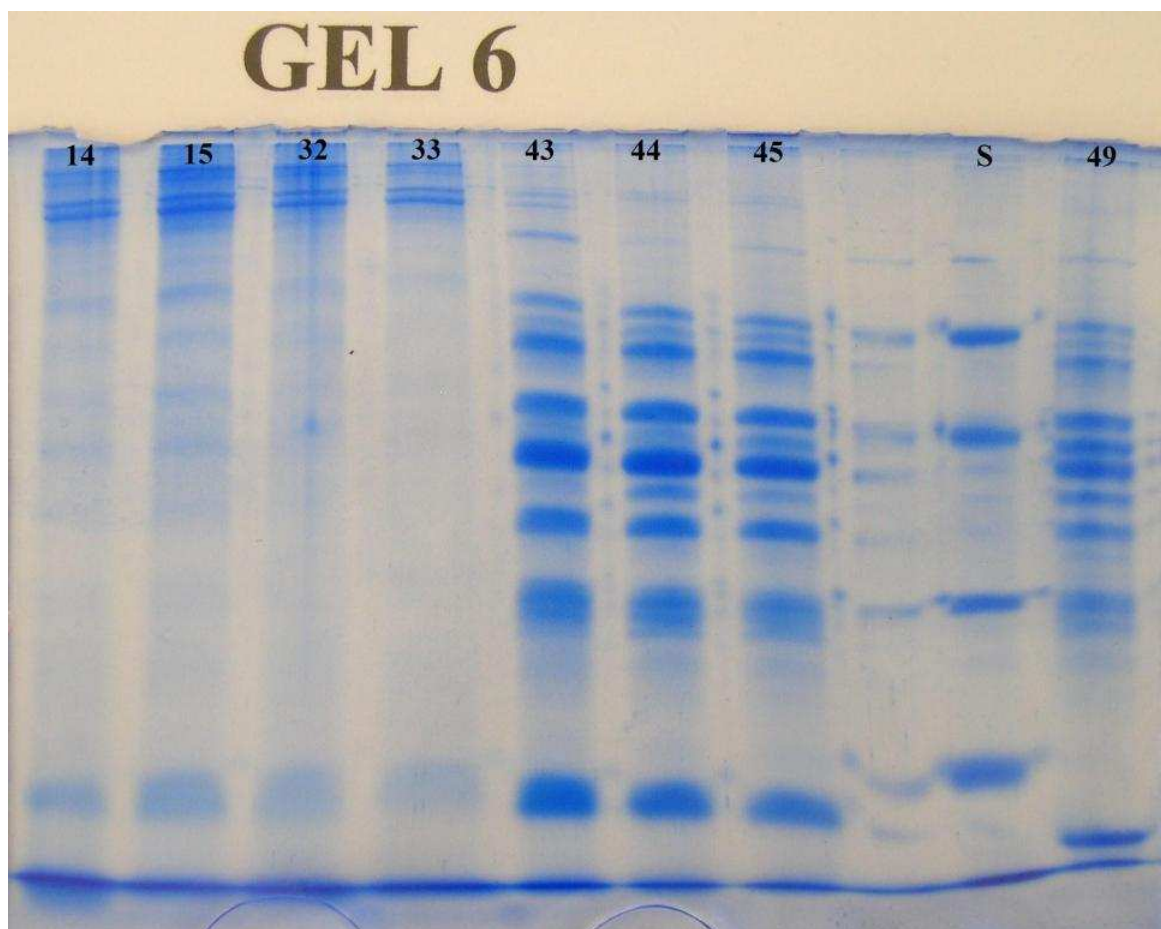
Gel 3: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 26: HT1, 27: HT2, S: hmotnostní molekulový standard, 28: HT3, 29: HT4, 40: HS0, 41: HS2, 42: HS3, 20: DT4, 21: DT2. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



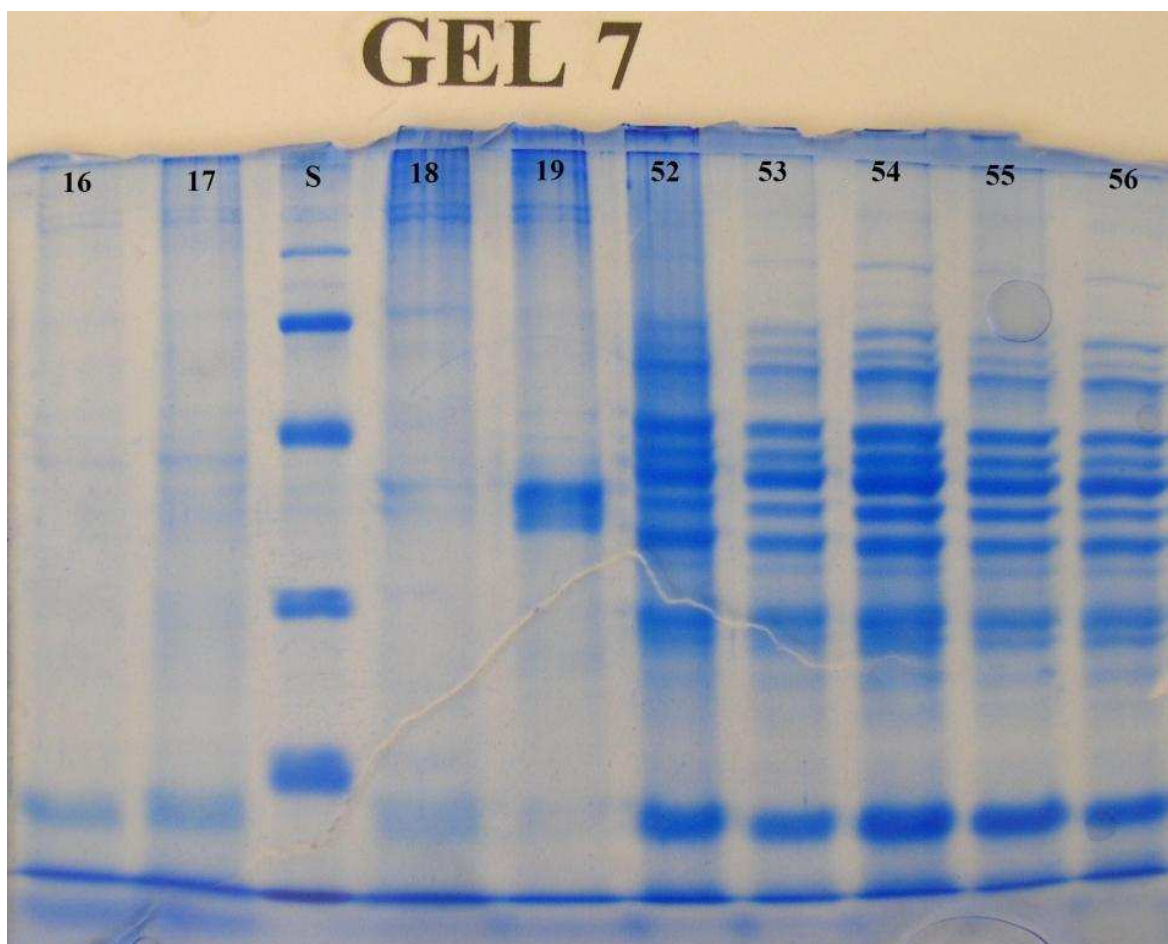
Gel 4: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, S: hmotnostní molekulový standard, 3: IS4, 34: IT2, 35: IT1, 36: IT4, 46: DS0, 47: DS2. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



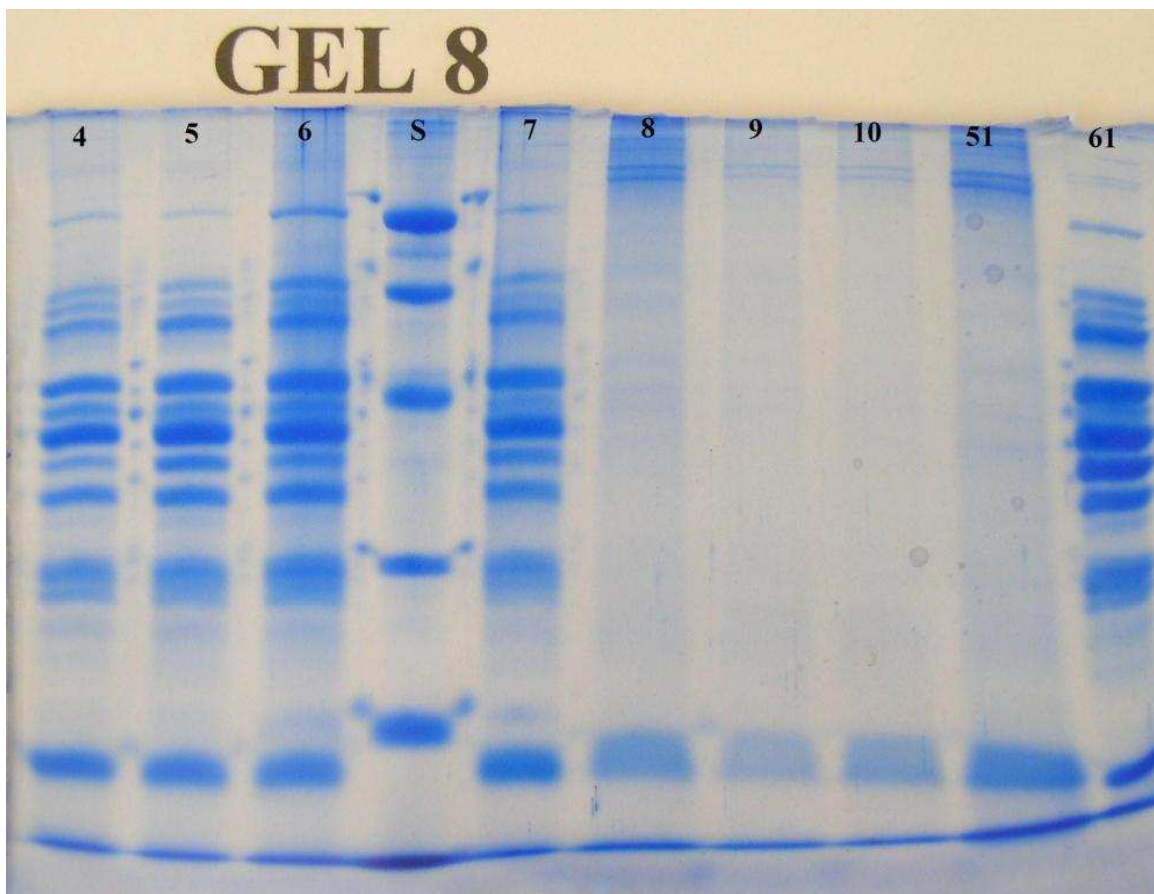
Gel 5: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 48: DS4, 11: BT4, 12: BT2, 13: BT0, 37: BS4, 38: BS0, 39: BS2, 22: ET4, 23: ES4, S: hmotnostní molekulový standard. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



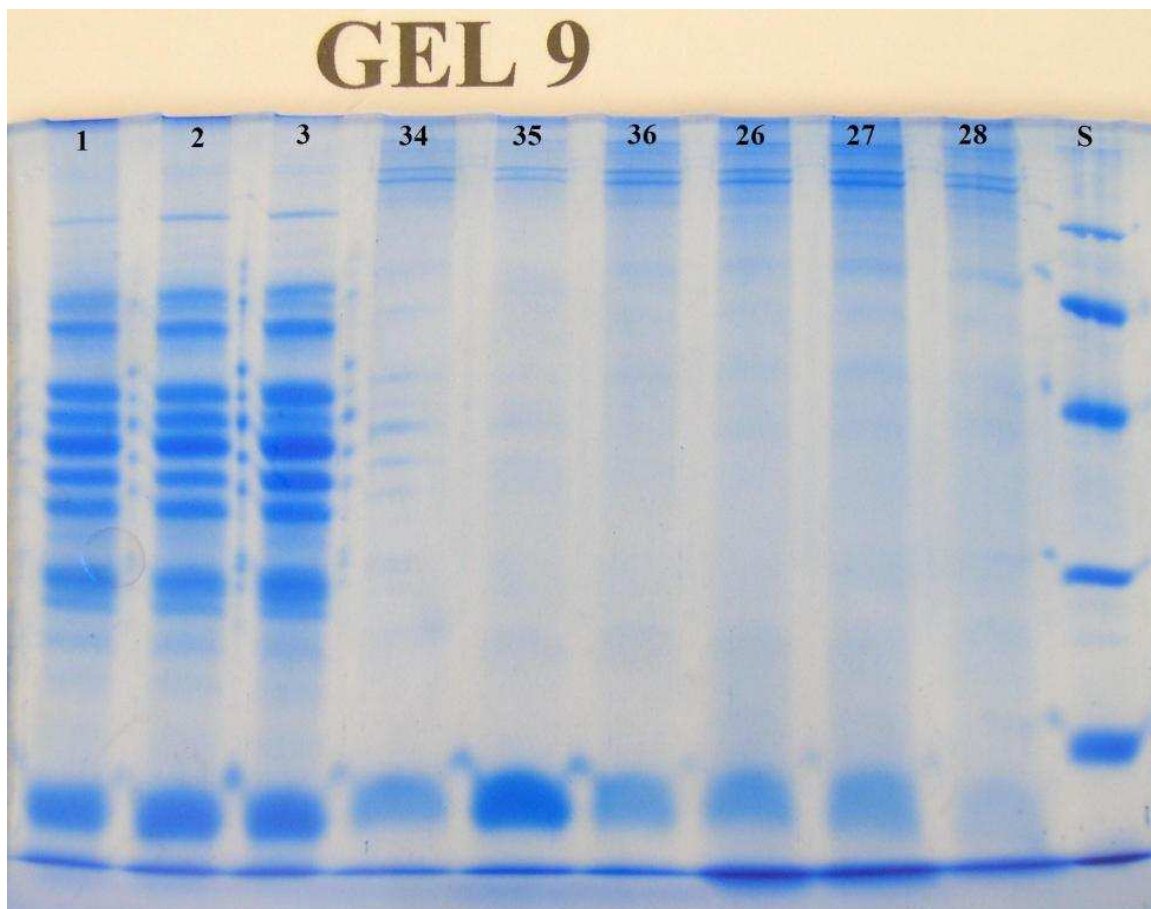
Gel 6: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 14: CT3, 15: CT2, 32: CT0, 33: CT4, 43: CS0, 44: CS2, 45: CS3, S: hmotnostní molekulový standard, 49: ES2. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



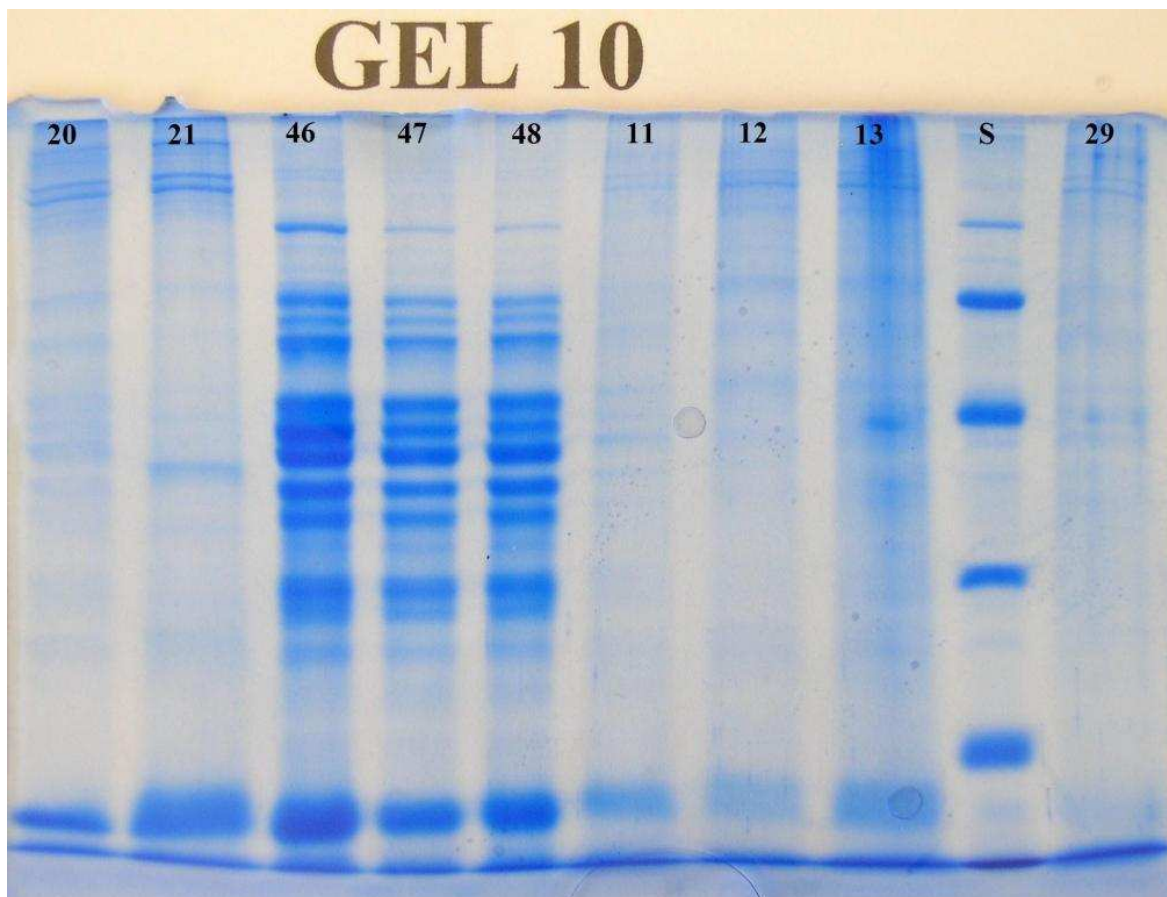
Gel 7: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 16: FT3, 17: FT4, S: hmotnostní molekulový standard, 18: FT2, 19: DT0, 52: FS2, 53: FS0, 54: FS1, 55: FS3, 56: FS4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



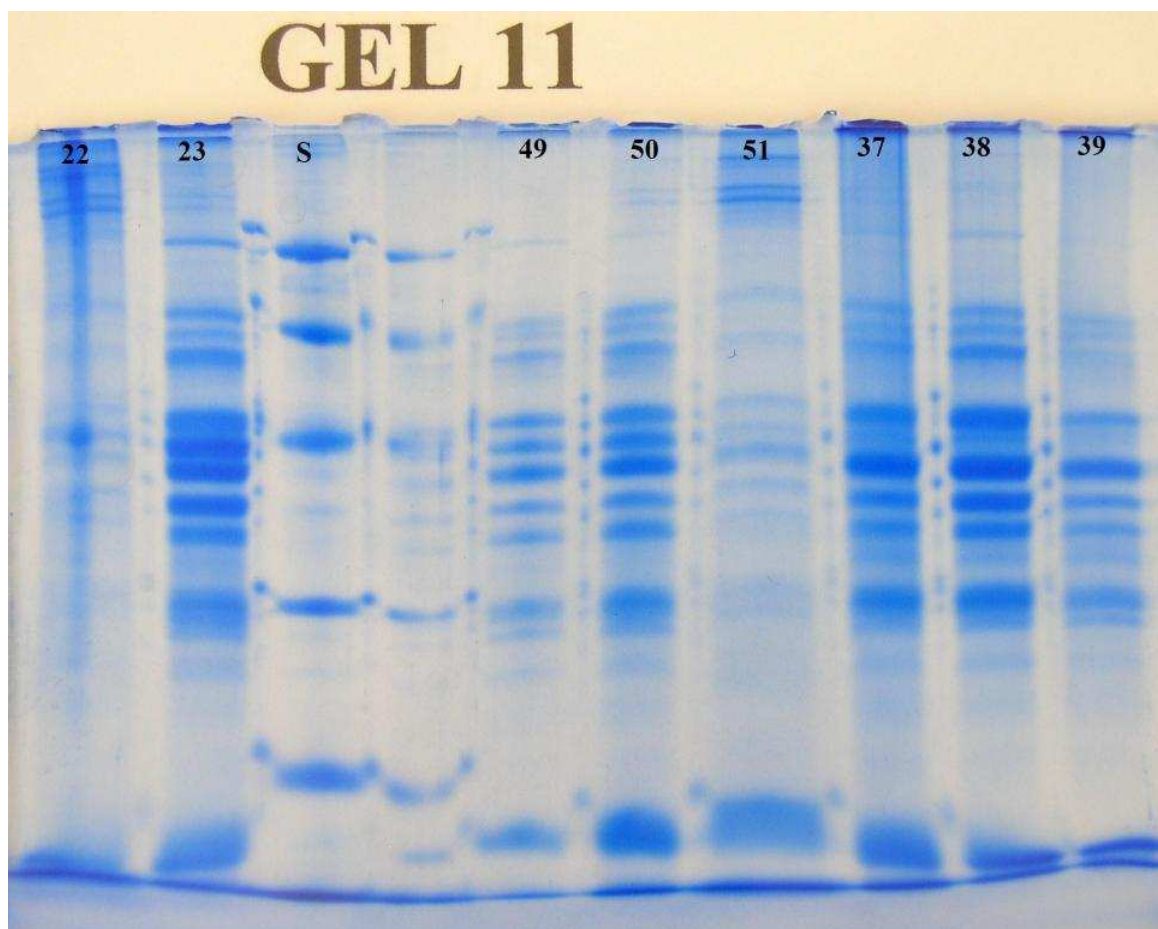
Gel 8: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 4: AS2, 5: AS3, 6: AS0, S: hmotnostní molekulový standard, 7: AS4, 8: AT2, 9: AT3, 10: AT4, 51: AT3, 61: GS4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



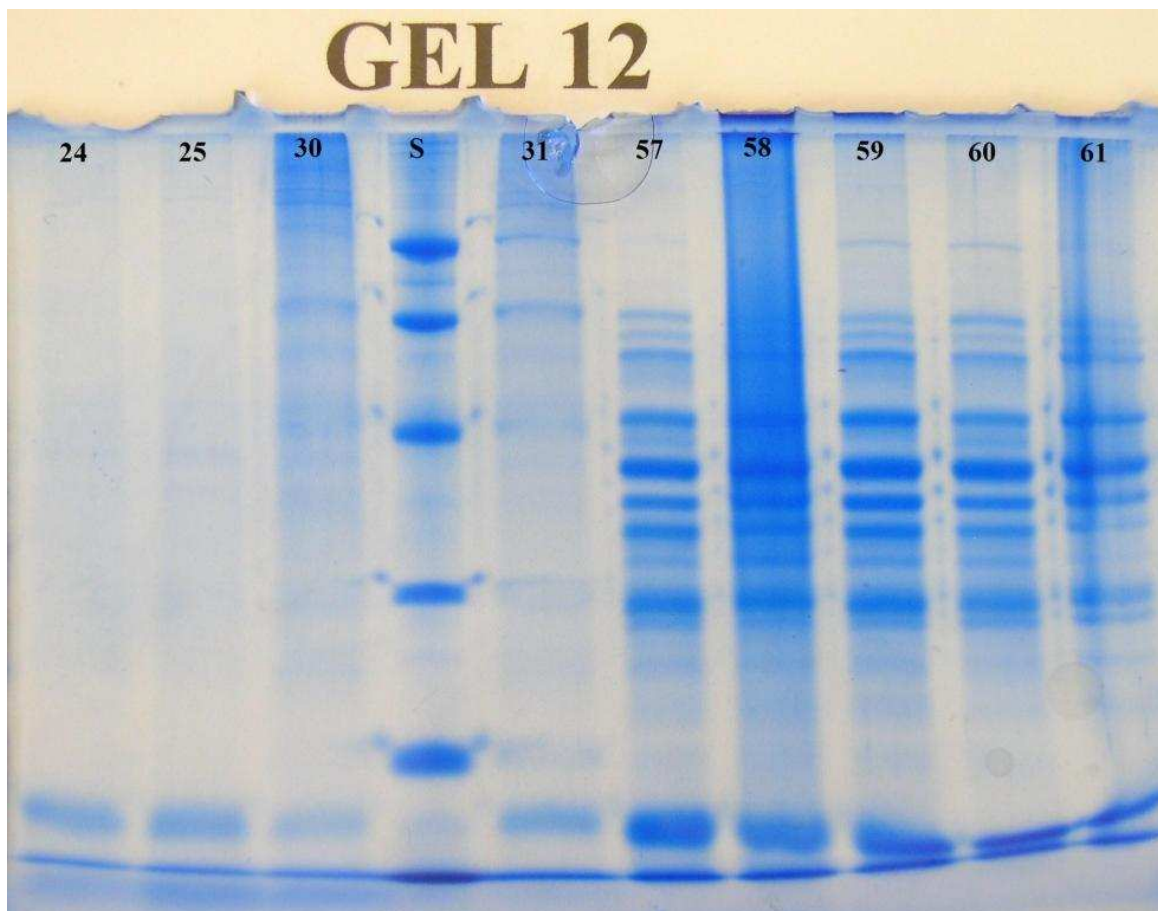
Gel 9: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 1: IS2, 2: IS0, 3: IS4, 34: IT2, 35: IT1, 36: IT4, 26: HT1, 27: HT2, 28: HT3, S: hmotnostní molekulový standard. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



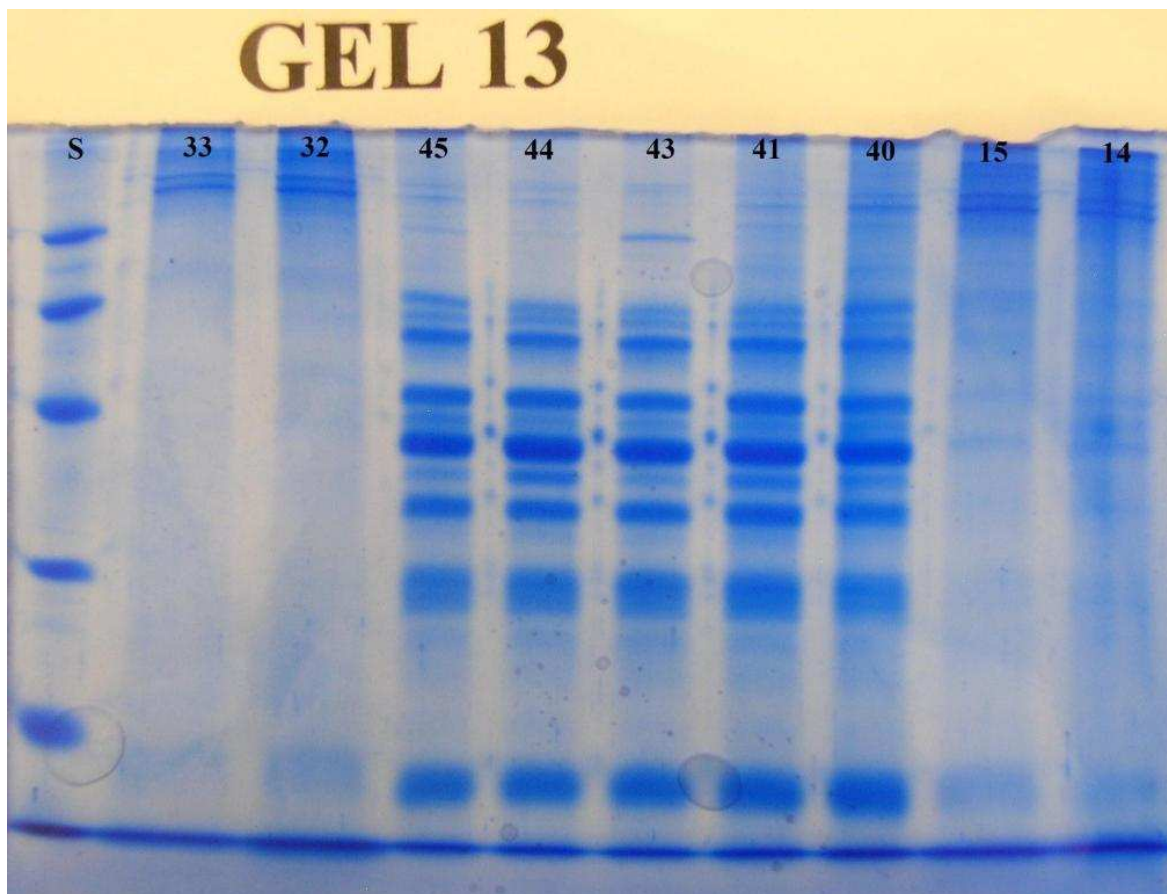
Gel 10: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 20: DT4, 21: DT2, 46: DS0, 47: DS2, 48: DS4, 11: BT4, 12: BT2, 13: BT0, S: hmotnostní molekulový standard, 29: HT4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



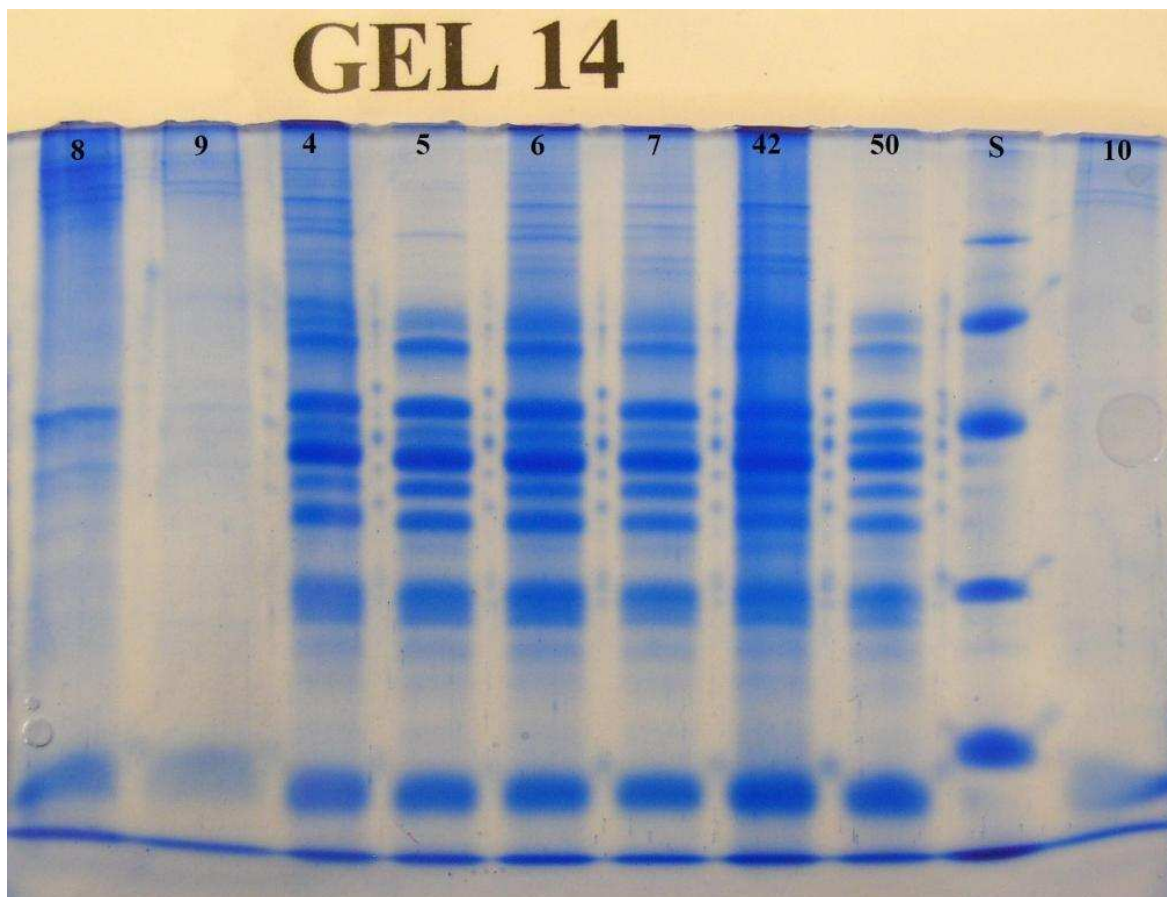
Gel 11: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 22: ET4, 23: ES4, S: hmotnostní molekulový standard, 49: ES2, 50: ES0, 51: AT3, 37: BS4, 38: BS0, 39: BS2. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



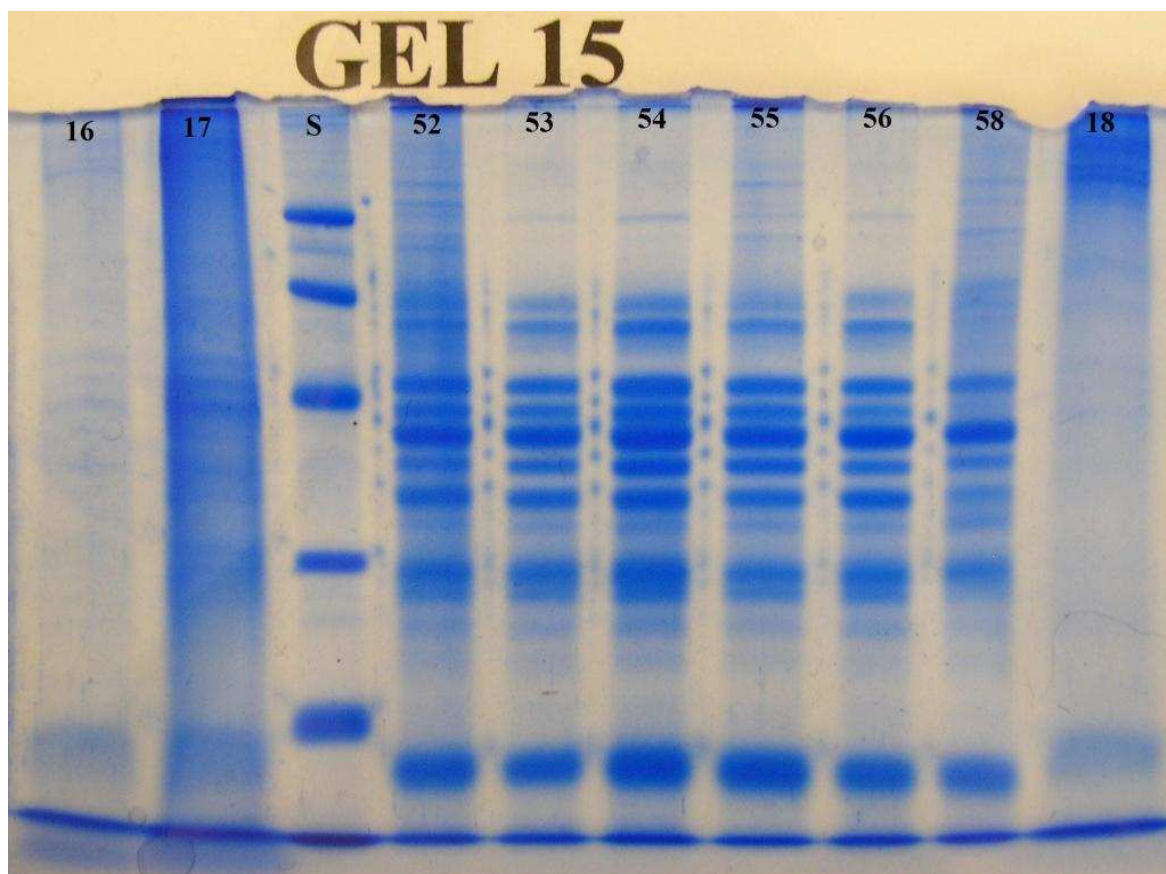
Gel 12: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 24: GT2, 25: GT3 30: GT4, S: hmotnostní molekulový standard, 31: GT1, 57: GS1, 58: GS0, 59: GS2, 60: GS3, 61: GS4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



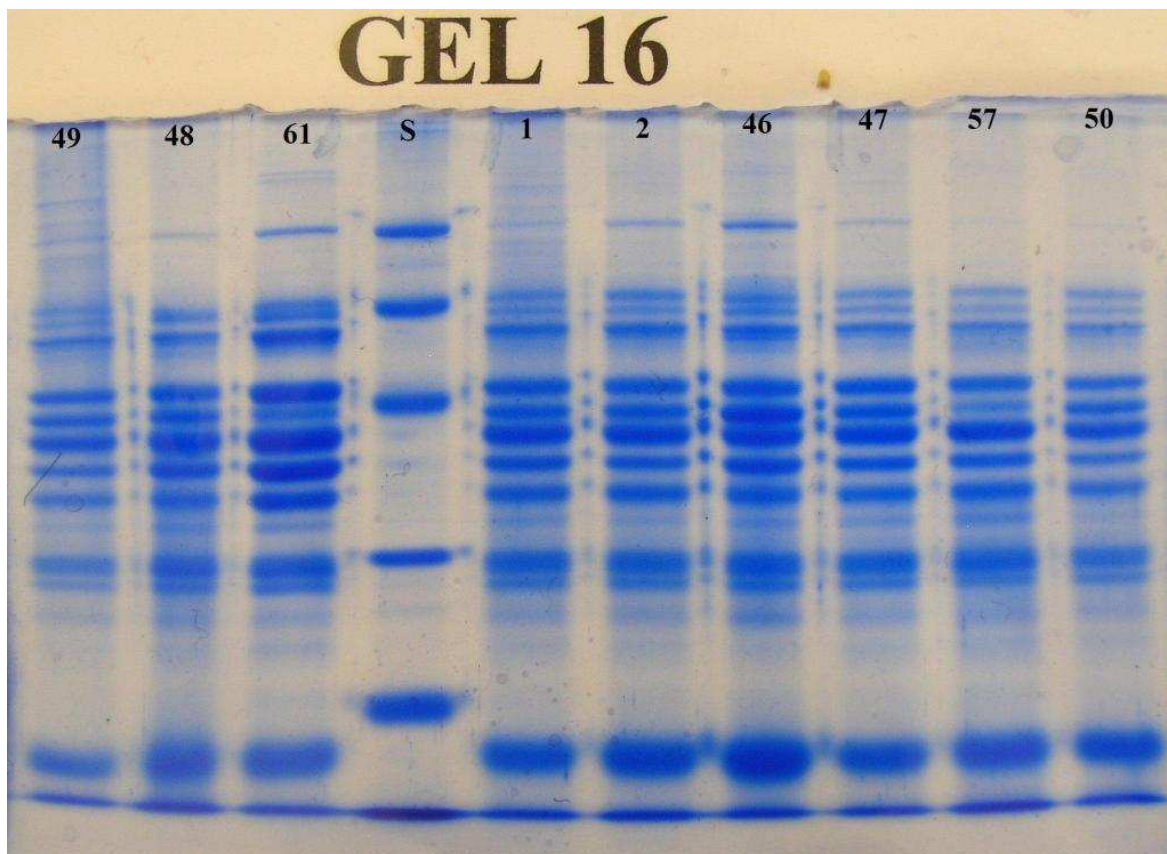
Gel 13: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: S: hmotnostní molekulový standard, 33: CT4, 32: CT0, 45: -S3, 44: CS2, 43: -S0, 41: HS2, 40: HS0, 15: CT2, 14: CT3. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Gel 14: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 8: AT2, 9: AT3, 4: AS2, 5: AS3, 6: AS0, 7: AS4, 42: HS3, 50: ES0, S: hmotnostní molekulový standard, 10: AT4. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Gel 15: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 16: FT3, 17: FT4, S: hmotnostní molekulový standard, 52: FS2, 53: FS0, 54: FS1, 55: FS3, 56: FS4, 58: GS0, 18: FT2. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.



Gel 16: Proteinový profil vzorků získaných metodou SDS-PAGE: 49: ES2, 48: DS4 61: GS4, S: hmotnostní molekulový standard, 1: IS2, 2: IS0, 46: DS0, 47: DS2, 57: GS1, 50: ES0. Označení vzorků je shodné s popisem metodiky v kapitole 6.2.