

Mykotoxiny produkované plísněmi v potravinách

Grégrová Renata

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Renata GRÉGROVÁ

Osobní číslo: T07176

Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie a řízení v gastronomii

Téma práce: Mykotoxiny produkované plísněmi v potravinách

Zásady pro vypracování:

- 1. Taxonomie, morfologie a ekologie toxin produkujících plísní**
- 2. Analytické metody detekce mykotoxinu v potravinách**
- 3. Intoxikace mykotoxiny z potravin**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Hrubý S., Turek B., Mikrobiologická problematika ve výživě, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně 1996, ISBN 80-7013-232-2
2. Gurner F., Valík L., Aplikovaná mikrobiológia požívatin, malé centrum Bratislava, 2004, ISBN 80-967064-9-7
3. Betina V., Mykotoxíny, Alfa Bratislava, 1990, ISBN 80-05-00631-4

Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

4. ledna 2010

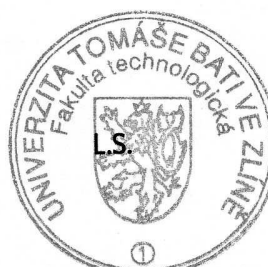
Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2010

dne **-8. 04. 2010**



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Grégrová Renata Obor: Technologie a řízení v gastronomii

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním 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 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;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji 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 – 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 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 bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem 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 28.5.2010



.....

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:

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 vzdělávacího 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

Tato bakalářská práce je zaměřena na mykotoxiny v potravinách. Má pozornost byla upřena nejen na mykotoxiny, ale i na plísně, kterými jsou produkovány. U plísni byla pozornost věnována morfologii, taxonomii a způsobům rozmnožování. U mykotoxinů byli zdůrazněny nejvýznamnější druhy mykotoxinů, jejich charakteristika, fyzikální a chemické vlastnosti, metody stanovení, jejich stanovené limity v rámci EU v jednotlivých potravinách.

Klíčová slova: plísně, mykotoxiny, aflatoxin, patulin, ochratoxin A, zearalenon, DON, T-2 toxin,

ABSTRACT

This Bachelor is focused on mycotoxins in food. My attention was focussed not only to the mycotoxins, but also to the fungi as their producers. The work deals with the morphology, taxonomy, and reproduction. The mycotoxins were highlighted the most important types of them, the characteristics, physical and chemical properties, methods of determining the limits laid down in the EU countries in individual kinds of food.

Keywords: moulds, mycotoxins, aflatoxin, patulin, ochratoxin A, zearalenon, DON, T-2 toxin

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věcné připomínky a věnovaný čas při zpracování bakalářské práce.

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

OBSAH

OBSAH	8
1 ÚVOD	10
2 CHARAKTERISTIKA VLÁKNITÝCH MIKROMYCET	12
2.1 MORFOLOGIE PLÍSNÍ	13
2.2 ROZMNOŽOVÁNÍ MIKROMYCET	14
2.2.1 Vegetativní rozmnožování.....	14
2.2.2 Pohlavní rozmnožování	14
3 VÝZNAMNÉ DRUHY MYKOTOXINŮ	15
3.1 AFLATOXINY.....	15
3.1.1 Historie objevu a izolace	16
3.1.2 Biosyntéza Aflatoxinů	16
3.1.3 Substráty a producenti aflatoxinů.....	16
3.1.4 Aflatoxin B ₁	17
3.1.5 Aflatoxin G ₁	17
3.1.6 Aflatoxin M ₁	18
3.1.7 Toxikologické hodnocení	18
3.2 PATULIN	19
3.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti	19
3.3 OCHRATOXIN A	20
3.3.1 Fyzikální a chemické vlastnosti	21
3.4 ZEARALENON.....	21
3.4.1 Vlastnosti	22
3.4.2 Výskyt v potravinách.....	22
3.5 TRICHOTHECENY.....	22
3.5.1 Vlastnosti	23
3.5.2 ZÁSTUPCI TRICHOTHECENŮ.....	23
3.6 CYKLOPIAZONOVÁ KYSELINA.....	25
4 ANALYTICKÉ METODY DETEKCE MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH	27
1. Odběr vzorků	27
2. Extrakce.....	27
3. Čištění.....	28
4. Analytické metody	29
5. PROBLEMATIKA HYGIENICKÝCH LIMITŮ MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH	33

5.1	<i>EXPOZIČNÍ LIMITY</i>	34
5.2	<i>REGULACE MYKOTOXINŮ V EU</i>	34
6	ZÁVĚR	37
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38
8	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	41
9	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK	42

1 ÚVOD

Využití hub, které je provázeno rozvojem lidské společnosti je velmi rozmanité. Nejde jen o konzumaci hub nebo jejich jedlých plodnic, které rostou převážně v lese, ale i další využívání některých druhů této rozsáhlé říše. V této práci se zaměřím na mikroskopické houby- plísně, a jejich metabolity- mykotoxiny.

Můžeme pozorovat jejich velmi zajímavý přechod od účinků, které můžeme považovat za příznivé, některé dokonce i léčivé až k projevům vysloveně toxickým a karcinogenním.

V současnosti se jejich příznivých účinků využívá při přípravě krmiv, dále látek významných v potravinářské technologii, fermentovaných potravin, sýrů (dodávají aroma plísňovým sýrům), antibiotik produkovaných plísněmi, steroidů, stimulatorů růstu rostlin, organických kyselin, enzymů využívajících se průmyslově v potravinářství, etanolu a alkoholických nápojů, vitamínů, droždí a při výrobě pracích prostředků. K produktům látkové přeměny plísní, které se mohou uplatnit příznivě, patří i látky, od kterých se odvozují velmi účinné léky- Lovastatin (z *Aspergillus terreus*) a Mevastatin (z *Penicillium citrinum*). Tyto látky snižují aktivitu reduktázy acetylkoenzymu A.

Na druhé straně ale mají houby významný podíl na nemocech člověka, rostlin a také zvířat. Nebo znehodnocování krmiv a potravin. Právě do této kategorie patří i toxinogenní houby a jejich sekundární metabolity- mykotoxiny.

Do 1. poloviny 20. století se o mykotoxiny projevoval malý zájem, až na výjimku ergotových alkaloidů. Až v 60. letech 20. století po záhadné nemoci Turkey X disease v Anglii, která způsobila obrovské ekonomické ztráty, došlo k úhynu asi 100 000 mladých krocanů a krůt, které byli krmené zplsnivělou moučkou z podzemnice olejné. Mikrobiologické a chemické vyšetření vedli k objevu aflatoxinu tvořeného plísní *Aspergillus flavus*, a projevil se velký zájem a začíná intenzivní bádání v této oblasti [1].

Už ve středověku byla známá souvislost mezi onemocněním lidí a konzumací chleba upečeného z plesnivého obilí. Až v 18. století se zjistilo, že jde o otravu způsobenou parazitem *Claviceps purpurea*. Právě s tímto parazitickým druhem rodu *Claviceps* souvisí nejstarší známé mykotoxikózy. Jejich toxické účinky byli příčinou masových otrav lidí a zvířat po celá staletí.

Z hlediska tvorby toxinů jsou nejvýznamnější rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*.

Přítomnost mykotoxinů v poživatinách může mít několik příčin. Může to být z důvodu kažení poživatin jejich plesnivěním, nebo zpracování polotovarů a meziproduktů s obsahem mykotoxinů ve výrobě potravin. Další příčinou může být zkrmování krmiv s obsahem mykotoxinů a jejich přechod do mléka a do masa. Nebo pomocí výroby poživatin za pomoci plísní produkujících mykotoxiny.

Protože je problematika mykotoxinů značně složitá, je pro všechny plísně se schopností tvořit mykotoxiny používán termín „potenciálně patogenní plíseň“. Jedná se o to, že za určitých podmínek může kmen daného druhu plísně získat schopnost produkovat toxické sekundární metabolity (mykotoxiny), a za jiných podmínek, dosud ne přesně definovaných, může tuto schopnost ztratit. to znamená, že není možné označit obecně všechny druhy plísní za toxinogenní, protože nejde o stálou vlastnost.

2 CHARAKTERISTIKA VLÁKNITÝCH MIKROMYCET

Vláknité mikromycety jsou spolu s jinými skupinami organismů, které společně sdílejí podobné vlastnosti, řazeny do samostatné říše hub.

Na základě velikosti rozeznáváme dvě skupiny hub. První skupina zahrnuje houby mikroskopické. Druhou skupinu pak tvoří houby makroskopické velikosti. Dosud bylo popsáno 100 tisíc druhů hub a předpokládá se existence více než 1,5 milionu druhů [3].

Mikroskopické houby dále dělíme na vláknité mikroskopické houby, kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy [4].

Vláknité mikromycety (plísňe) jsou aerobní - potřebují pro svůj růst kyslík. Proto rostou hlavně na povrchu jimi napadnutých materiálů. Jejich náročnost na kyslík je ale rozdílná. Závislost růstu plísni na kyslíku je spojena s výskytem esenciální složky steroidů (ergosterol) v cytoplasmatické membráně, které k syntéze kyslík potřebují. Plísňe jsou na rozdíl od bakterií přizpůsobivější k určitým extrémním podmínkám prostředí. Dobře snáší nižší hodnoty pH, nižší obsah vody a nižší teploty [5].

V současné době existuje několik systémů členění hub, které se shodují v klasifikaci pravých hub do čtyř velkých skupin: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. [1].

Klasifikace podle Váni (1998)[6]:

Říše: Houby

Oddělení: *Chytridiomycota*

Oddělení: *Eumycota* (vlastní houby)

Pododdělení: *Zygomycotina*

Pododdělení: *Ascomycotina*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pododdělení: *Basidiomycotina*

Houby obecně patří mezi eukaryota, což znamená, že mají pravé jádro, individualizované a oblaněné. Jsou heterotrofní (sami si mohou syntetizovat organické látky z látek anorganických a musí je proto přijímat z prostředí ve formě živin).

2.1 Morfologie plísní

Základem těla mikromycet je vegetativní vláknitý útvar- stélka Thales [4].

Stavební jednotkou stélky je duté vlákno- hyfa. Ta může být opatřena přehrádkou nebo je coenocytická (bez přehrádek). Typ přehrádky je charakteristický pro jednotlivá oddělení hub. Jednotlivé buňky hyfy mohou mít jedno jádro (monokaryotické mycelium), dvě jádra (dikaryotické mycelium) nebo více geneticky odlišných jader (heterokaryóza) [1].

Barva mycelia je způsobena pigmenty, které zbarvují nejen buněčnou stěnu vegetativní části plísní, ale hlavně jejich výtrusy-spory.

Tvrký polokulovitý útvar tvořený hustou spleťí hyf se nazývá sklerocium. Vyskytuje se hlavně u těch druhů, u nichž není známá tvorba pohlavních ani vegetativních spor. Kožovitá spleť hyf se nazývá stroma a nalézá se často u plísní parazitujících na ovoci a jiném rostlinném materiálu. U některých rodů plísní se kolem jednotlivých buněk mycelia může vytvořit velmi silný obal. Obsah buňky se pak zahustí a vytváří se chlamydospory, které jsou odolné proti nepříznivým podmínkám. Cytoplasma buněk obsahuje strukturní útvary- endoplazmatické retikulum a mitochondrie, rozeznatelné pouze elektronovým mikroskopem. Vakuoly, zrníčka polyfosfátů a kapičky tuku můžeme zjistit v cytoplazmě již ve světelném mikroskopu [7].

Některé houby mají schopnost růst v kvasinkové nebo vláknité formě. Tento fenomén se nazývá dimorfismus. Dimorfických je značný počet mikromycet patogenních pro živočichy [3].

2.2 Rozmnožování mikromycet

Plísně se rozmnožují jednak rozrůstáním hyf, jednak sporami. Spóry vznikají buď vegetativním způsobem (tj. nepohlavní spóry) nebo po spájení (pohlavní spóry) [7].

Jsou lehké, ve vodě odpudivé a velice snadno se uvolňují z rozmnožovacích útvarů do okolního prostředí a kontaminují tak i další povrchy předmětů [8].

2.2.1 Vegetativní rozmnožování

Vegetativní spóry se tvoří buď na vegetativních hyfách nebo na zvláštních fruktifikačních orgánech. Podle způsobu tvorby rozeznáváme oidie neboli artrospory, které vznikají rozpadem vláken v jednotlivé buňky. Fialospóry vznikají ze speciální lahvovité buňky neboli fialky. Jestliže je hyfa nesoucí konidie zřetelně odlišena od ostatních hyf, nazývá se konidiofor.

Endospory vznikající ve vakovitém útvaru zvaném sporangium se nazývají sporangiospóry. Sporangium je umístěno na sporangioforu. Z potravinářsky důležitých plísní se sporangia vyskytují pouze u třídy *Zygomycetes*. Sporangiospóry mají většinou více jader [7].

2.2.2 Pohlavní rozmnožování

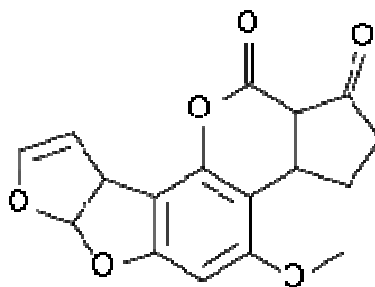
Většina pravých hub je schopna pohlavního rozmnožování jejímž výsledkem je tvorba ascospor, bazidiospor nebo zygospor. Pohlavní spóry vznikají u heterotalických druhů spojením jedinců s odlišným pohlavním typem u homotalických fúzí kmenů stejného pohlavního typu. [1].

Zygomycota jsou charakteristická vytvářením přeměněných hyf zvaných gametangia, která splynou do podoby tlustostěnného zoosporangia obsahujícího zygosporu. Ascomycota, neboli houby vřeckovýtrusné produkují pohlavní spóry ve vakovité struktuře zvané vřecko, spóry se nazývají askospory. Basidiomycota produkují své pohlavní spóry na stopkách- basidiích. [3].

3 VÝZNAMNÉ DRUHY MYKOTOXINŮ

3.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou primární toxické produkty *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* a jsou to heterocyklické sloučeniny. V lidském či zvířecím organismu mohou vznikat různé deriváty těchto primárních mykotoxinů jako jsou: hydrolyzovaný mykotoxin v mléce, označovaný jako M, demetylovaný derivát, nacházející v moči, označený jako P, dále Aflatoxin Q izolovaný z jaterní tkáně a dalších asi 10 metabolitů, B1, B2, G1, G2. . Písmena B a G pocházejí z označení jejich fluorescence v UV světle (blue= modrá, green = zelená) [10].



Obr.1 Aflatoxin B₁

Aflatoxiny jsou značně termorezistentní a jsou částečně inaktivované dlouhotrvajícím působením vyšších teplot (100-120°C) při sterilizaci potravin a při jejich pražení. Zvýšené teploty a čas jejich působení při pasteraci a při pečení chleba nezpůsobuje zpravidla úplnou inaktivaci.

Aflatoxiny jsou citlivější vůči silnějším kyselinám a zásadám. Přesto například při extrakci volných mastných kyselin hydroxidem sodným, nebo při rafinaci olejů ztrácejí tyto toxiny svoji aktivitu skoro úplně [6].

3.1.1 Historie objevu a izolace

Významným mezníkem v objevu aflatoxinů byl rok 1960 ve spojitosti s epidemií v Anglii, označovanou jako „onemocnění X“ u krůt po zkonzumování krmiva s obsahem kontaminované arašídové Rosetti moučky. Histopatologicky bylo zjištěno poškození jaterního parenchymu a proliferace epitelu žlučového. Brzy poté byla zaznamenána v USA další onemocnění- epidemie hematomu u pstruhů vyvolaná bavlíkovým olejem kontaminovaným aflatoxiny.

Aflatoxiny dostaly svůj název jako zkratku názvu- *Aspergillus flavus* toxins [2].

3.1.2 Biosyntéza Aflatoxinů

Laboratorní produkci Aflatoxinů ovlivňuje hlavně složení atmosféry, teplota (k produkci aflatoxinu je teplotní rozmezí od 12-42°C), vlhkost substrátu (u aflatoxinů je relativní vlhkost potřebná k produkci aflatoxinu nad 84%), a atmosféry.

Používají se chemicky definované i komplexní kultivační média, první z nich hlavně v biosyntetických studiích pro lehčí izolaci metabolitů. Komplexní média se skládají z roztoků sacharózy a kvasničného extraktu, nebo jsou to přirozené substráty jako rozdrčená podzemnice olejná a obilniny. v kapalných médiích s minerálními solemi, obohacených kvasničným extraktem nebo kukuřičným extraktem, se dosahují zvýšené výtěžky aflatoxinů. Optimální teplota pro produkci kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* je mezi 25-30°C [1].

Produkci aflatoxinu ovlivňují různé biochemické faktory- stopové prvky, nenasyčené mastné kyseliny a katabolická represe glukózou [13].

Byla také předložena hypotéza, že syntéza aflatoxinů probíhá po dobu dereprimované aktivity cyklu dikarboxylových kyselin, závislé na katabolismu vhodného sacharidu.

3.1.3 Substráty a producenti aflatoxinů

Klasickým substrátem pro tvorbu aflatoxinů je podzemnice olejná, arašíd. Dále se vyskytují v kukuřici, kakau, dalších druzích ořechů (para, kešu, vlašské, mandle, pistácie),

v koření, v meruňkových a broskvových jádrech, máku, kokosové moučce a různých obilovinách včetně rýže a sladu. Sušené mléko, sýry a výrobky z mléka pak obsahují též aflatoxin M. U syrové sóji je zjišťována inhibice tvorby aflatoxinu [10].

Z exotických poživatin je substrátem pro tvorbu aflatoxinu sladké brambory a kasa-va.

Plísně rodu *Aspergillus Flavus* a *Aspergillus parasiticus* jsou v půdě, v prachu, na rostlinách jejich plodech [6].

3.1.4 Aflatoxin B₁

Název podle Chemici abstracts: Cyclopenta (c) furo (3'2':4,5) furo (2,3-h) (1) benzopyran-1,11'-dione, 2, 3, 6a, 9a-tetrahydro-4-methoxy-, (6aR-cis)-

Jiný název: 6-methoxydifurokumaron

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₆

Molekulová hmotnost: 312

3.1.4.1 Vybrané fyzikální vlastnosti

Světložluté krystaly, emituje v UV světlo modrou fluorescencí

Bod tání: 268-269°C

Rozpustnost: nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech

3.1.5 Aflatoxin G₁

CAS: 1165-39-5

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇

Molekulová hmotnost: 328

3.1.5.1 Vybrané fyzikální vlastnosti

Bílý až světle žlutý prášek, emituje v UV světle modrozelenou fluorescenci

Bod tání: 244-246°C

Rozustnost: nerozustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech

3.1.6 Aflatoxin M₁

CAS: 6795-23-9

Název: 4-hydroxyaflatoxin B₁

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇

Molekulová hmotnost: 328

3.1.6.1 Vybrané fyzikální vlastnosti

Emituje v UV světle modrofialovou fluorescenci

Bod tání: 299°C

Rozpustnost: nerozpustný v hexanu, málo rozpustný v benzenu, rozpustný v metanolu, etanolu, acetonitrilu, chloroformu, ve směsi metanol+ether (1:1)

3.1.7 Toxikologické hodnocení

Mezi hlavní toxické účinky aflatoxinů patří hepatotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita.

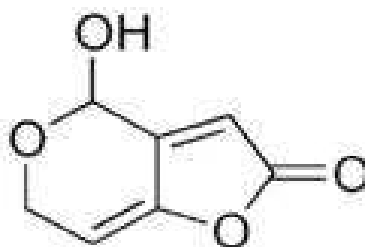
Aflatoxiny vykazují především toxický účinek na játra a ledviny. Vnímavé jsou všechny druhy hospodářských zvířat, především drůbež, mláďata březí samice. Nejčastějšími příznaky intoxikace jsou nechutenství, gastroenteritidy, podkožní krvácení, krvácení z tělních otvorů a úhyny. Játra uhynulých zvířat jsou zvětšená, vykazují známky nekrotických změn [11].

Výzkumy z poslední doby ukazují, že aflatoxiny se v těle hromadí v tělesných tekutinách a tkáních a jejich vylučování je pomalé a rozsahem omezené [12].

AFB₁: nejsilnější známý přírodní karcinogen a nejúčinnější hepatokarcinogen u zvířat, ačkoli účinky kolísají s druhem, věkem, pohlavím, výživovým stavem. Např. pstruzi, prasta, kachňata. Primárně postiženým orgánem jsou játra, byli však také pozorovány změny v jiných orgánech. Podání jediné dávky AFB₁ ve výši 75mg/kg těl.hmotnosti způsobí smrt.

AFB₂: karcinogen, vykazuje obdobné účinky jako AFB₁, ale s nižší toxickou schopností [2].

3.2 Patulin



Obr.2 Patulin

Patulin je nenasycený lakton obvykle izolovaný z jablek a jejich produktů, jako metabolit rodu *Penicillium expansum*, *Penicillium claviforme*, dále pak *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus* a *Byssosclamyces nivea*. Patulin vykazuje širokospektrální antibiotické vlastnosti, proto se ověřovalo jeho možné využití k léčbě, ale brzo se od toho upustilo. V pokusech na myších se zjistilo, že dráždí trávicí trakt (překrvení a krvácení, tvorba vředů), prokázali se i jeho karcinogenní účinky [14].

Je středně toxický, v potravinách je spíše indikátorem špatných výrobních postupů, používání plesnivých vstupních surovin. Pokud se použije v ovocné šťávě nebo jiných potravinách jako konzervační prostředek oxid siřičitý, patulin se ničí [15].

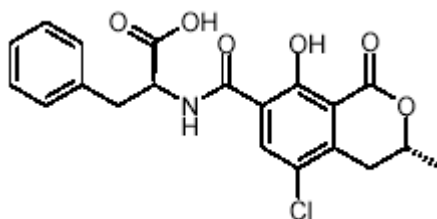
U Patulinu byli prokázány účinky karcinogenní, mutagenní a teratogenní [10].

3.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Patulin tvoří bezbarvé krystalky a je opticky inaktivní. Rozpustný je ve vodě, etanolu, acetonu, etylacetátu, dietyléteru a chloroformu. Nerozpustný je v benzínu a petroléteru. Patulin je stálý v kyselém prostředí a ztrácí aktivitu v alkalickém prostředí. Reaguje se skupinami SH cysteinu a jiných sloučenin [1].

3.3 Ochratoxin A

Ochratoxin A byl objeven v Jihoafrické republice při laboratorním vyšetřování toxinogenních hub izolovaných ze zemědělských plodin. Producenty těchto plodin byly plísňe *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium viridicatum*, a infikovaná kukuřice způsobila smrt pokusných zvířat [16].



Obr 3. Ochratoxin A

Vyskytuje se především na obilovinách jako ječmen, žito, oves, pšenice, rýže, proso a kukuřice. Dalším zdrojem jsou masné výrobky, což je dáno faktem, že ochratoxin A vytváří rezidua ve tkáních, např. význačným zdrojem ochratoxinu A je vepřová krev, v níž je ochratoxin vázán na albumin, v játrech koncentrace dosahují až stovek $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Dalším zdrojem ochratoxinu je též káva a podzemnice olejná [16].

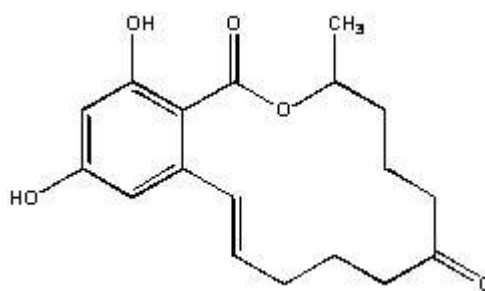
Ochratoxin A způsobuje poškození cytoplasmatických organel a přímo zasahuje do základních metabolických funkcí buněk, jako jsou tvorba energie a syntéza proteinů [17].

Výskyt ochratoxinu A v potravním řetězci představuje závažné riziko nejen pro hospodářská zvířata, zejména pro vepřový dobytek, ale jeho rezidua v masných výrobcích představují stejně závažné potenciální riziko i pro člověka. U ochratoxinu A byly potvrzeny imunotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky. Při ochratoxikóze dochází k výraznému podráždění sliznice trávicího ústrojí a k rozvoji akutní gastroenteritidy. Resorbované mykotoxiny vyvolávají toxickou nefropatii (poškození ledvin), která je provázena nechutenstvím, depresí, průjmy, horečkou, žíznivostí a častým a vydatným močením a postupnou dehydrací organismu [18].

3.3.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Ochratoxin A je bezbarvá krystalická látka, krystalizuje v benzenu jako solvát s teplotou varu 90°C. Je dobře rozpustný v polárních a organických rozpouštědlech a velmi málo rozpustný ve vodě [1].

3.4 Zearalenon



Obr. 4 Zearalenon

Hlavním producentem Zearalenonu je *Fusarium graminearum*, která široce infikuje krmivářské a potravinářské obilí a je schopna produkovat zearalenonu v koncentraci 1900 μ g/kg obilí. Pro tvorbu zearalenonu jsou významné teploty zejména v rozsahu 12-14°C, ale produkce byla prokázána již při teplotách nižších než 10°C a dokonce pod 0°C [2]. V současné době je izolováno 15 derivátů základní struktury zearalenonu, který se dříve označoval jako F-2 toxin. Tyto deriváty jsou méně toxické než jiné mykotoxiny.

Přestože nemá steroidní strukturu má účinky steroidních hormonů estrogenů. Může mít účinky estrogení, antiestrogení, antiandrogení a anabolický, které jsou u jeho derivátů různým způsobem zastoupeny. V organismu se metabolicky aktivuje, asi 5 % se vyloučí močí, zbytek stolicí, během laktace asi 40% mlékem [18].

Zearalenon aktivuje estrogení receptory, které působí změny ve funkci a morfologii reprodukčních orgánů. Z farmových zvířat jsou proti němu jako jedny z nejcitlivějších považovány prasata [19]. Nedospělé prasnice vykazují mnohem intenzivnější hyperestrogení symptomy způsobené zearalenonem než dospělá zvířata, charakteristickým projevem je zduření rodidel. Zearalenony jsou přenášeny i do mléka krav krměných kontaminovanou stravou, a to zvláště u dětí způsobuje velké riziko. Hyperestrogení symptomy způsobují

předčasnou pubertu mladých dívek, předčasný vývoj pohlavních sekundárních znaků. I když není karcinogenní, může však již vzniklý karcinom podpořit v růstu [2].

Největší problémy mohou vzniknout u zemědělců- samozásobitelů, kteří v případě napadení obilí konzumují vysoké koncentrace. U běžné populace se mykotoxiny z obilí míšením šarží zředí na velmi nízké koncentrace. Problémy mohou nastat též u konzumace naklíčeného obilí a dalších semen, kdy během klíčení mohou fusaria vyrůst a naprodukovat mykotoxiny [16].

V České republice nebyl zatím stanoven limit pro obsah zearalenonu v potravinách.

3.4.1 Vlastnosti

Zearalenon je bílá krystalická látka, tepelně stabilní do 180°C, rozpustná v mírně polárních rozpouštědlech. Při UV záření vykazuje v oblasti větších vlnových délek intenzivní fluorescenci (360nm žlutá, 260nm zelená). [20]

3.4.2 Výskyt v potravinách

Zearalenon je nacházen v potravinách, hlavně cereáliích a cereálních produktech zejména v oblasti s teplým podnebím. Vysoké koncentrace jsou důkazem nesprávného ošetření a uskladnění obilovin než vzniku před sklizní na poli.

Zearalenon byl nalezen také v následujících potravinách: ječmen, slad, kukuřice, žito, pšenice, oves, pivo, chléb, rýže, čirok, proso, ořechy, chilli koření, čili omáčka, korian-dr, kari, fenykl, pepř, olej, banány

3.5 *Trichotheceny*

Jsou to estery seskviterpenických alkoholů obsahujících trichothecenový bicyklický systém. Jsou největší skupinou mykotoxinů s více než 140 popsányými látkami. Produkují je houby rodu *fusarium*, *trichthecium*, *myrothecium*, *trichoderma* a *Stachybotrys*. Nejdůležitějšími látkami jsou deoxynivalenol (DON), T-2 toxin, diacetoxyscirpenol a nivalenol.

Přítomnost trichothecenů je spojována s výskytem různých onemocnění u zvířat a člověka. Mezi základní symptomy mykotoxikóz patří odmítání potravy, zvracení, krvácení zažívacího traktu, horečka, destrukce kostní dřevě, deformace plodů [20].

Na základě experimentů se zvířaty se některé z nich, zvláště T-2 toxin, považují za potenciálně karcinogenní a mutagenní [16] a při podávání T-2 toxinu myším se zjistily negativní účinky na plodnost a jeho teratogenní účinek.

Kromě akutní a chronické toxicity pro obratlovce mají trichotheceny další, poměrně široké spektrum biologických účinků. Jsou to antibakteriální, antivirové, antifungální, antiprotozoální cytostatické, insekticidní a fytotoxické vlastnosti. Znamená to, že mnohé trichotheceny mohou mít i praktické využití [1].

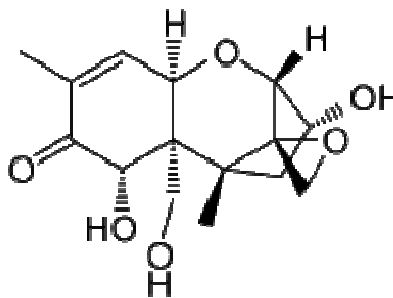
Trichotheceny byly zaznamenány v pšenici, kukuřici, prosu, ječmeni, ale také v sójových bobech, v semenech olejnin, v banánech a mangu, v pivu. Přenos trichothecenů do potravin živočišného původu je zanedbatelný.

3.5.1 Vlastnosti

Trichotheceny jsou bezbarvé, opticky aktivní, zpravidla krystalické pevné látky. Jsou tepelně stabilní do 120°C a rozpustný v mírně polárních rozpouštědlech.

3.5.2 ZÁSTUPCI TRICHOHECENŮ

Deoxynivalenol (DON)



Obr. 5 DON

Patrně nejfrekventovanější trichothecenem. DON objevili v roce 1973. Je pravděpodobně nejběžnější a nejznámější mykotoxin kontaminující potraviny a krmiva z obilovin. Vyskytuje se fakticky kdekoli na světě, kde se pěstují obiloviny. Kontaminace obilovin deoxynivalenolem může být při pěstování rostlin eliminována dodržováním zásad správné zemědělské praxe a použitím vhodných agrotechnických opatření a prostředků na ochranu rostlin. Jeho producenti jsou: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* [2].

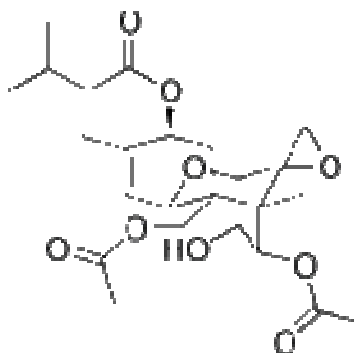
Toxicita

Postižená zvířata odmítají krmivo, zvrací a trpí průjmy. K dalším projevům intoxikace patří poruchy koordinace pohybů, hemoragie na sliznicích, aborty u březích samic nebo náhlý úhyn [18].

Výskyt v potravinách

DON byl nalezen v následujících potravinách: obiloviny a výrobky z nich, dětská výživa z obilovin, ječmen a hotové výrobky na bázi ječmene, různé druhy kukuřice, pšenice a výrobky z ní, triticales, rýže, proso, otruby, žitná mouka a otruby, chleba, špagety, myslí, nudle, pivo, čili prášek, koriandr, zázvor, sojové boby, česnek, brambory [16].

T-2 toxin



Obr. 6 T-2 toxin

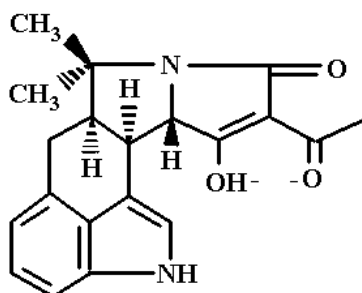
Charakteristickými příznaky intoxikace jsou kožní a slizniční nekrotické leze, zejména v horní části gastrointestinálního traktu po kontaktu s mykotoxinem. Tyto patologické změny byly pozorovány u drůbeže a rasat. U drůbeže je pozorováno zduření sliznice v koutku zobáku.

Jsou pozorovány gastroenteritidy, intestinální hemoragie, krváceniny v oblasti hlavy a pohlavních orgánů, pokles hladiny protilátek, poruchy krevetvorby, těžké průjmy. Byla prokázána i jeho extrakce mlékem [18].

3.6 Cyklopiazonová kyselina

Kyselina α -cyklopiazonová je metabolicky odvozená od aminokyseliny tryptofanu. Při podání této látky pokusným zvířatům dochází především k poškození trávicí trubice a jater. Při podání byli pozorovány křeče a úhyn. Kyselina cyklopiazonová je považována za karcinogen, zjistila se její mutagenita pro *Salmonella typhimurium* [1].

Kyselina cyklopiazonová byla izolována z *Penicillium cyclopium* [1]. Produkována je i jinými plísněmi rodu *Penicillium* a *Aspergillus* (*Pnc. Viridicatum*, *Pnc. Camemberti*, *Pnc. Commune*, *Pnc. Crustosum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarrii*, *Aspergillus versicolor*) [10].



Obr. 7 Kyselina cyklopiazonová

Vyskytuje se často spolu s dalšími mykotoxiny. Pokud jde o počet nálezů převládají sýry, kukuřice a jiné obiloviny, různé masné výrobky a také arašídů. Potenciálně toxinné plísně, které mohou vytvářet kyselinu cyklopiazonovou byly izolovány z mnoha potravin, například z obilovin a výrobků z nich, včetně těstovin, krmných směsí apod.

K prevenci výskytu kyseliny cyklopiazonové v sýrech je tedy nutná soustavná kontrola používaných kmenů na toxinogenitu i zjišťování náhodného výskytu tohoto mykotoxinu v sýrech. K její tvorbě nedojde při dodržování chladírenských teplot při skladování sýrů [10].

Kyseliny cyklopiazonová má určitou afinitu ke svalové tkáni včetně myokardu. V podstatě jde o degenerativní změny v buňkách svalu [9]. Závažné jsou také vaskulární léze s narušením integrity endotelu cév a změnami v dalších vrstvách stěny cévně.

Příznaky akutní otravy se projevují postižením svalstva (křeče, opistotonus, hypokinese), kromě toho ovšem též poškození jater, ledvin a jiných parenchymatózních orgánů. Vyskytují se i neurotoxické příznaky [10].

4 ANALYTICKÉ METODY DETEKCE MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH

Vzhledem na poměrně častý výskyt mykotoxinů v pracovním a životním prostředí, v krmivech a potravinách, jako i pro jejich biologické účinky je důležitá jejich rychlá detekce v různých materiálech.

Izolace a identifikace mykotoxinů přímo z podezřelého materiálu nebo z kultury hub pocházejících z takového materiálu může být užitečná, ale je obyčejně i náročná. Analytické metody používané na tyto účely můžeme rozdělit na chemické a biologické [1].

Stanovení mykotoxinů jde složeno z několika o sobě jdoucích kroků. Každý tento krok je důležitý a rozhoduje o výsledcích stanovení.

1. Odběr vzorků

Prvním a velmi důležitým procesem je odběr a zpracování vzorku. Vzorky potravinových surovin, potravin a krmiv jsou často nehomogenní, kusové a odběry se musí provádět z šarží o značné hmotnosti, či počtu jednotek.

Proto je velmi důležité objektivní vzorkování podle příslušné legislativy a dostatečně homogenizování zpracovaných vzorků [2].

2. Extrakce

Extrakce vzorku organickým rozpouštědlem se provádí nejlépe na laboratorní třepačce v Erlenmayerově baňce se zábrusem, uzavřené skleněnou zátkou proti uvolnění, nebo na homogenizátoru. Extrakční rozpouštědlo se volí podle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Vzhledem k charakteru a stálosti mykotoxinů probíhá jejich extrakce za laboratorní teploty a za neutrální nebo kyselé reakce.

K extrakci mykotoxinů se nejčastěji používá metanol, octan etylnatý, chloroform, aceton a acetonitril, popřípadě jejich vodné roztoky. Při použití 50-80% vodného roztoku metanolu jako extrakčního činidla může přídavek NaCl do vodné fáze podstatně zlepšit účinnost reakce. Z kyselého prostředí se extrahují do organických rozpouštědel mykotoxiny

kyselého povahy (ocharotoxin A, zearalenon, Carinin, kys. cyklopiazonová). Okyselení vzorku se provádí kyselinou chlorovodíkovou nebo fosforečnou [2].

3. Čištění

Čištění extraktu je nejpracnější a časově nejnáročnější částí postupu analytického stanovení mykotoxinů. Vzorky mohou být zpracovány následujícími způsoby:

a) Extrakce z kapaliny do kapaliny

Je to metoda, která byla používána při čištění extraktů pro stanovení některých mykotoxinů zejména v 70-80. letech 20. století. Je založena na různé rozpustnosti látek ve dvou nemísitelných kapalinách.

b) Imunoafinitní chromatografie (IAC)

V současné době se nejčastěji používá čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitní kolonce a to pro svoji vysokou specificitu, menší spotřebu organických rozpouštědel a menší časovou náročnost. Pro stanovení aflatoxinů B, G, M, ocharotoxinu A, deoxynivalenolu, fumonisinu B₁ a zearalenonu jsou komerčně dostupné imunoafinitní kolonky RIDA, VICAM, RHONE-POUENC.

Postup čištění extraktu na imunoafinitních kolonkách: Přefiltrovaný a zředěný extrakt mykotoxinu ve směsi metanolu s vodou se nechá pomalu prokapat imunoafinitní kolonkou. V této fázi dojde k reverznímu specifickému spojení mezi protilátkami v kolonce a mykotoxinem z extraktu. Po promytí kolonky speciálním promývacím pufrem je mykotoxin v procesu desorpce z kolonky eluován eluční směsí.

c) Extrakce na pevnou fázi (SPE)

Pro další mykotoxiny (patulin, sterigmatocystin, trichoteceny, zearalenon) se používá čištění na kolonkách SPE se sorbenty z různých nepolárních, středně polárních materiálů na bázi modifikovaného silikagelu, polymeru, nebo křemičitanu hořečnatého [2].

d) Gelová filtrace

Gelová filtrace je metoda separace složek z kapalného média. Princip separace spočívá v tom, že látky s vyšší molekulovou hmotností procházejí kolonou, zatímco menší molekuly přechodně vstupují do pórů gelu, a jsou tak zadržovány. Používá se pro separaci velkých molekul na základě rozdílné molekulové hmotnosti. V oblasti analýzy mykotoxinů

se používá především k odstranění lipidických sloučenin a rostlinných nebo živočišných pigmentů. V ČR je metoda využívána např. pro stanovení patulinu a zearalenonu.

4. Analytické metody

Mykotoxiny jsou nejčastěji stanoveny imunochemickými a chromatografickými metodami.

I. Imunochemické metody (ELISA, RIA)

Imunoenzymatická reakce (ELISA) je založena na reakci antigenu (mykotoxinu) s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky. Měření se provádí spektrofotometricky.

Mykotoxiny zpravidla nevyvolávají imunitní odezvu s tvorbou protilátek, ale působí jako hapteny [15]. To znamená, že k tvorbě protilátek dochází až po navázání na vhodný nosič (např. bílkovina) [24].

Imunochemické metody slouží pro screeningové stanovení vybraných mykotoxinů v potravinách a zemědělských komoditách a byli využity i k detekci duktů mykotoxinů s DNA nebo proteiny [23].

Imunoenzymatické metody mohou být kompetitivní nebo nekompetitivní.

Kompetitivní:



Většinou se měří množství komplexu značeného antigenu s protilátkou Ag^*AB , ale je rovněž měřit množství nenaznačeného antigenu.

Nekompetitivní:



Ve většině případů se měří množství navázané značené protilátky za účelem dosažení co nejvyšší citlivosti.

ELISA metody se používají v kombinaci s imunoafinitní chromatografií. RIA metody se používají pro stanovení mykotoxinů již omezeně. Imunochemické metody slouží pro screeningové stanovení vybraných mykotoxinů v potravinách a zemědělských komoditách a byli využity i k detekci duktů mykotoxinů s DNA nebo protein [2].

II. Chromatografické metody (TLC,HPLC,HPTLC, GC)

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických a anorganických látek. Je to separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do mobilní fáze. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že distribucí složky mezi dvě fáze lze popsat rozdělovací konstantou, která představuje poměr rovnovážných koncentrací složky v obou fázích. Trvalý pohyb mobilní fáze však zabrání dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posune molekuly látek k další části stacionární fáze, kde se znovu vytvoří přibližně rovnovážný stav. Interakce složky a chromatografických fází jsou určujícím faktorem pro rychlost migrace složky v chromatografickém systému. Rozdíly v rychlostech migrace potom umožňují rozdělení látek.

Chromatografické techniky jsou rozděleny podle toho, v jakém skupenství se nachází mobilní fáze a podle separačního mechanismu.

Chromatografie umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu směsi. Výsledkem kvalitativní analýzy je zjištění jaké látky jsou obsažené ve směsi a výsledkem kvantitativní analýzy je zjištění v jaké koncentraci jsou jednotlivé složky ve směsi obsažené [25].

METODA HPLC

High-Performance Liquid Chromatography zahrnuje soubor metod, založených na různém mechanismu separace, jejichž společným znakem je použití kapalně mobilní fáze vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu.

Vysoké účinnosti a rychlosti se u této metody dosahuje použitím kolon plněných náplněmi s velmi jemnými částicemi o velikosti 3-15 μ m a poměrně vysokých průtoků mobilní fáze, což však vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel a takové konstrukce celého přístroje, která odolává tlakům až do 30-60 MPa.

Pod pojmem dělicí systémy v kapalinové chromatografii se rozumí rozpouštědlová soustava mobilní a stacionární fáze s přihlédnutím na jejich vlastnosti vůči chromatografovaným látkám. V chromatografii se uplatňují v různé míře vzájemné interakce mezi molekulami stacionární a mobilní fáze a mezi molekulami vzorku, na čemž je založen chroma-

tografický proces. Volbou mobilní a stacionární fáze lze ovlivnit proces separace a tím měnit eluční hodnoty separovaných složek [2].

Ke zjišťování množství mykotoxinů se využívá většinou plochy píků, méně často i výšek píků, které se porovnávají se standardy. Přístroje jsou řízeny počítačem, který umožňuje přímou komunikaci pracovníka s přístrojem. HPLC je v současnosti nejrozšířenější metodou pro stanovení jednotlivých mykotoxinů.

Tabulka č.1:

Vybrané chromatografické podmínky pro HPLC některých mykotoxinů [2].

Stanovovaný analyt	Mobilní fáze (v/v) a jejich poměr	Detektor-excitace(nm) /emise(nm)
Aflatoxiny B,G	Voda:metanol:acetonitril (62:22:16)	FLD 362/425 B ₁ ,B ₂ FLD 362/455 G ₁ ,G ₂
Aflatoxin M ₁	Voda: acetonitril: metanol (50:30:20)	FLD 360/430
Deoxynivalenol	Acetonitril: voda (10:90)	UVD 218
Fumonisin	Metanol: 0,1mol dihydrogenfosforečnan sodný (77:23)	FLD 335/440
Ochratoxin A	Metanol:kys.octová led: voda (91:6,5:2,5)	FLD 390/440
Patulin	Voda	UVD 276
Sterigmatocystin	Acetonitril: kys.fosforečná- 3,3mmol (9:11)	UVD 325
Zearalenon,α- zearalenonu	Metanol:acetonitril:voda (125:205:250)	FLD 236/418

S výhodou lze HPLC spojit s tzv. hmotnostní detekcí pomocí hmotnostního spektrometru, nejčastěji kvadrupolové konstrukce. Hmotnostní spektrometrie je separační a současně analytická metoda. Její podstatou je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky (mykotoxinu), které vznikly ionizací molekul v elektrickém poli [2].

Příklady stanovení mykotoxinů- metody

- Aflatoxin M1- metodou HPLC
- Aflatoxin B1, B2, G1, G2- metodou HPLC a metodou TLC
- DON (vomitoxin)- metodami ELISA, HPLC
- Ocharotoxin A v krmivech a potravinách- metodami GHPLC, TLC
- T2 toxin- metodou ELISA
- Zearalenon v krmivech a potravinách- metodami ELISA, HPLC, TLC

5 . PROBLEMATIKA HYGIENICKÝCH LIMITŮ MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH

Tvorba regulačních opatření v oblasti mykotoxinů v potravinách je ovlivněna řadou faktorů.

Jedná se o:

1. Dostupnost toxikologických dat
2. Dostupnost dat o kontaminaci potravin mykotoxiny, získaných činností dozorových organizací
3. Dostupnost dat o kontaminaci potravin mykotoxiny, získaných získaných v projektech typu Monitoringu dietární expozice chemickým látkám z potravin
4. Dostupnost dat o kontaminaci potravin mykotoxiny, získaných na základě sledování biomarkerů mykotoxinů v moči a krevním séru populace- v projektech biologického monitoringu
5. Distribuci mykotoxinů v potravinách
6. Dostupnost metod pro stanovení mykotoxinů
7. znalost legislativních opatření v jiných zemích, s kterými státy udržují obchodní spojení
8. V neposlední řadě zabezpečení dostatečného množství zdravotně nezávadných potravin.

Základem pro určení hygienického limitu jsou:

- Znalosti o toxicitě mykotoxinu
- Znalosti o výskytu mykotoxinů v potravinách
- Znalosti o spotřebě potravin opulací a o individuální spotřebě
- Realita v praxi

5.1 Expoziční limity

Expoziční limity pro mykotoxiny byli v letech 1995-2001 stanoveny na zasedáních Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants v rámci Codex Alimentarius a Scientific Committee on Food of European Commission v rámci zemí EU. Hodnoty expozičních limitů jsou stanoveny na základě analýzy zdravotních rizik příslušných mykotoxinů. Hodnoty expozičních limitů příslušných mykotoxinů jsou uvedeny v Tabulce č. 3 [2].

5.2 Regulace mykotoxinů v EU

Základním předpisem Evropského společenství (ES) vztahujícím se ke kontaminujícím látkám obecně je nařízení Rady č. 315/93, kterým se stanoví postupy ES pro kontaminanty v potravinách. Toto nařízení v čl.1 vymezuje vlastní pojem kontaminující látky-kontaminanty. Podle čl.2 odstavce 1 nařízení pak nesmí být na trh uvedena potravina, která obsahuje kontaminující látku v množství, jež je nepřijatelné z hlediska veřejného zdraví a dosahuje toxikologické úrovně [2].

Tabulka č.2 Hodnocení vybraných mykotoxinů z hlediska expozičních limitů

Mykotoxin	Expoziční limity
Aflatoxin B ₁	ALARA-as low as reasonable- co nejnížší možný příjem (JEFCA FAO/WHO 1997)
Deoxynivalenol	1000ng/kg těl.hm./den (EU SCF 2000)
Nivalenol	0-700 ng/kg těl.hm./den (EU SCF 2000)
Fumonisin B ₁	200ng/kg těl hm./den (EU SCF 2000)
HT-2 toxin	60ng/kg těl. hm./den (JECFA FAO/WHO 2001)
Ochratoxin A	5ng/kg těl.hm./den (EU SCF 1998)
Patulin	0,4ng/kg těl. Hm./den (JEFCA FAO/WHO 1995)
T-2 toxin	60ng/kg těl. hm./den (EU SCF 2001)
Zearalenon	200ng/kg těl. hm/den (EU SCF 2000)

Nařízení dále v čl. 2 odst. umožňuje přijímat na úrovni celého ES speciální regulaci nejvyšších přípustných množství jednotlivých druhů kontaminantů, po konzultaci s poradním vědeckým orgánem Evropské komise pro potraviny, jímž je nyní vědecký výbor pro potraviny (Scientific Committee of food, SCF). V současnosti prochází celá oblast potravinového práva rozsáhlými reformami. Čerstvě publikované nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zakládá Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy ve věcech bezpečnosti potravin, jež má ambici stát se základem nového potravinového práva v ES, v čl.14 výslovně zakazuje uvádět na trh potraviny, pokud je nebezpečná, přičemž nebezpečnou se rozumí, že je škodlivá pro zdraví nebo nevhodná pro lidskou spotřebu. Toto nařízení počítá s existencí speciálních předpisů Společenství pro jednotlivé druhy potravin a zdravotních rizik. Pokud takové speciální předisy Společenství neexistují, uplatní se na potraviny speciální požadavky upravené právním řádem členských států v případě pokud existují.

Doposud v právu ES vznikla jen speciální regulace obsahu aflatoxinů a ocharotoxinu A. Připravuje se ovšem i speciální regulace obsahu dalších mykotoxinů na které se zatím v zásadě vztahuje jen obecný režim vyplývající z výše uvedených nařízení č.315/ 93 a č.178/2002.

Do současnosti byl obsah aflatoxinů v potravinách upraven nařízením Evropské komise č.194/97, kterým se stanoví maximální koncentraci některých kontaminantů v potravinách. Toto nařízení bylo opakovaně podstatně novelizováno. Kvůli přehlednosti i s ohledem na aktuální vývoj vědeckého poznání bylo nařízení č.194/97 s účinností od 5.dubna 2002 zrušeno a nahradilo jej nové nařízení Evropské komise č. 466/2001, kterým se stanoví maximální koncentrace některých kontaminantů v potravinách. Počátkem roku 2002 byla právní úprava obsahu aflatoxinů dále novelizována, a to nařízením Evropské komise č.257/2002, kterým se mění nařízení č.194/97 a nařízení č.466/2001. V nařízení č.472/2002 se poprvé stanoví maximální koncentrace ocharotoxinu A ve vybraných potravinách.

Právním ES byly rovněž harmonizovány metody odběru a analýzy vzorků v rámci kontroly bezpečnosti potravin, které uplatňují členské státy. Směrnice 98/53 ES stanoví metody odběru a analýzy vzorků potravin při oficiální kontrole koncentraceněkterých kontaminantů potravin. V nařízení 2002/26 EC jsou stanoveny metody odběru a analýzy vzorků potravin při oficiální kontrole koncentrace ocharotoxinu A.

Mykotoxinů, převážně aflatoxinů se ovšem dotýkají do určité míry i jiné předpisy ES. Bezpečnosti potravin jako nutnému předpokladu pro ochranu lidského zdraví je v ES věnována značná pozornost. V rámci probíhajících reforem, jež si kladou za cíl tuto bezpečnost posílit. Lze předpokládat, že zvýšená pozornost bude věnována i mykotoxinům jako látkám s velmi závažným účinkem na zdraví [2]. Legislativa EU stanovuje limity aflatoxinů v potravinách uvedené v Tabulce 4.

Tabulka č. 3 Hygienické limity aflatoxinů v EU.

Potravina	Aflatoxin ($\mu\text{g} / \text{kg}$)		
	B ₁	B ₁ +B ₂ + G ₁ +G ₂	M ₁
Arašídý, ořechy, sušené ovoce - k přímé spotřebě nebo k použití jako potravinová ingredience	2	4	-----
Arašídý - určené k třídění nebo fyzikálnímu ošetření před přímou spotřebou nebo k použití jako potr. ingredience	8	15	-----
Ořechy a sušené ovoce -určené k třídění nebo fyzik. ošetření před přímou spotřebou nebo k použití jako potr. ingredience	5	10	-----
Cereálie a z nich zpracované výrobky - k přímé spotřebě nebo k použití jako potr. ingredience	2	4	-----
Paprika, cayennské koření - sušené plody celé i mleté	5	10	-----
Pepř - sušené plody	5	10	-----
Muškatový oříšek, zázvor, kurkuma	5	10	-----
Mléko syrové	-----	-----	0,05

6 ZÁVĚR

V mé bakalářské práci jsem se zaměřila na základní charakteristiku významných mykotoxinů v potravinách. Na jejich výskyt, jejich fyzikální a chemické vlastnosti a plísň, které je produkují. Morfologii, taxonomii a způsoby rozmnožování těchto plísní. Na stanovení mykotoxinů, jejich legislativu a limity v potravinách v rámci EU i jednotlivých potravinách a analytické metody stanovení mykotoxinů.

V současné době je mykotoxinům věnována velká pozornost, hlavně pro jejich negativní účinky, které způsobují nejen člověku. Zjišťování všech jejich vlastností a účinků je proto stále aktuální, a troufám si říci, že ani do budoucna se naše pozornost vůči mykotoxinům nesníží, ba možná právě naopak se naše pozornost k nim obrátí ještě více. Stále se nachází nové druhy mykotoxinů, o kterých toho zatím ještě moc nevíme.

Také díky zvyšujícím se průměrným teplotám, vytvářejícím lepší podmínky pro mykotoxiny bude jejich výskyt častější. Proto se budeme muset zamyslet nad novými metodami jak se vyhnout napadení mykotoxinů, nebo jak odstranit mykotoxiny z potravin již napadených. Nevyhneme se pravděpodobně ani geneticky upraveným potravinám, například vyšlechtěním geneticky upravených obilovin či jiných potravin odolným vůči houbovým chorobám.

Téměř všechny mykotoxiny poškozují z dlouhodobého hlediska játra, ledviny, krevní oběh, negativní působení na imunitní systém. Mykotoxiny mohou mít účinky karcinogenní (rakovinotvorné), mutagenní (změna genetické informace), teratogenní (poškozující plod), genotoxické (poškozují genetický materiál), estrogenové (hormonální), imunotoxické (poškozující imunitu), hemoragické (krvácivé), neurotoxické (toxické pro CNS), cytotoxické (poškozují buňky), neurotoxické (poškozují ledviny), hepatotoxické (poškozují játra).

Vliv mykotoxinů na lidské zdraví je nesporné. Buď je patrný na první pohled jako různá mykologická onemocnění, nebo je jejich vliv zjevný až po hlubším zkoumání všech souvislostí. Příkladem může být hladomor v důsledku parazitismu hub na rostlinách nebo rozkladných procesů v potravinách.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BETINA, V., *Mykotoxiny-chémia-biológia-ekológia*, Alfa Bratislava, 1990, ISBN 80-05-00631-4, 285stran
- [2] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*, Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, ISBN 80-7013-395-3 , 349 stran
- [3] KLABAN, V., *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*, Hradec Králové: Gaudeamus, 2001, ISBN 80-7041-687-4, 416 stran
- [4] LEDERBERG, J., BLOOM, B. R., *Encyclopedia of microbiology*, San Diego: Academic Press, 2000, ISBN 0-12-226804-0, 1142 stran
- [5] OSTRÝ, V., *Nebezpečí, které na nás číhá v domácnostech: Toxinogenní plísně a mykotoxiny v potravinách* [online], 1998, dostupný z WWW: <http://www.chpr.szu/edukacce/plisne.html> (cit. 11.2.2008)
- [6] GÖRNER, F., VALÍK, L., *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*, Malé Centrum Bratislava, 2004, ISBN 80-967064-9-7, 528 stran
- [7] VÁŇA, J., *Systém a vývoj hub a houbových organismů*, 2.vyd., Karolinum Praha, 1998, ISBN 80-7184-603-1, 164 stran
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 3.vyd., Academia Praha, 2002, ISBN 80-200-1024-6, 363 stran
- [9] POLSTER, M., *Nižší houby v poživatinách* in Hrubý, S., a kol, *Mikrobiologie v hygieně výživy*, Avicenum Praha, 1984, str. 21-42
- [10] HRUBÝ, S., TUREK, B., *Mikrobiologická problematika ve výživě*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1996, ISBN 80-7013-232-9, 145 stran
- [11] MORAVCOVÁ, H., NEDĚLNÍK, J., *Mykotoxiny v objemných krmivech*, *Krmivářství č.4/2007*, str. 16-18
- [12] KALÁČ, P., MÍKA, V. *Přirozeně škodlivé látky v rostlinných krmivech*, Praha, 1997, ISBN 80-85120-96-8, 317 stran

[13] BUCHANAN, R. L., Lewis, D. F., Regulation of aflatoxin biosynthesis: effect of glucose on activities of various glycolytic enzymes., *Appl. Environmental Microbiology*, 48,1984, p. 306

[14] SWEENEY, M. J., DOBSON, A. D. W., Review, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int. J. Food Microbiol.* 43, 1998, pp. 141-158

[15] ŠIMŮNEK, J., *Plísňe a mykotoxiny* [online],
www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf , (citováno 20.4.2010)

[16] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 3*, Tábor, OSSIS 2002, ISBN 80-86659-02-X, 368 stran

[17] OSTRÝ, V., *Vláknité mikroskopické houby, mykotoxiny a zdraví člověka*, Státní zdravotní ústav v Praze, 1998, ISBN 80-7071-102-7, 20 stran

[18] SUCHÝ, P., HERZIG, I., *Plísňe a mykotoxiny, Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*, Vědecký výbor výživy zvířat - studie, www.bezpecnakrmiva.cz/soubory/2-studie_prof_sucheho.rtf,

[19] FINK-GEMMELS, J., MALEKINEJAD, H., Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone, *Animal Feed science and Technology* 137, 2007, p. 326-341

[20] RADOVÁ-SYPECKÁ, Z., HAJŠLOVÁ, J., Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, 2003 (www.phytopsanitary.org), projekt č. 4, citováno leden 2003

[21] ŠIMŮNEK, J., BŘEZINA, P., JEŽOVÁ, J., Riziko mykotoxinu kyseliny cyklopiazonové ze sýrů fermentovaných kulturní plísní *Penicillium camemberti*, Veterinární péče v potravinářském průmyslu 2/1990, str. 126-128

[22] ŠIMŮNEK, J., BŘEZINA, P., *Mykotoxiny*, Vysoká vojenská škola pozemního vojska, Fakulta ekonomiky obrany státu, Vyškov 1996, 70 stran

[23] GARNER, R. C., DVOŘÁČKOVÁ, I., TURSI, F., Immunoassay procedures to detect exposure to aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene in animals and man at the DNA level, *Int Arch Occup Environ Health* 60, 1988, pp.145-150

[24] DRASTICHOVÁ, K., *Faktory ovlivňující mykologickou kvalitu ovsa*, 2005, , ISBN 80-7040-834-0, 124 stran

[25] www.lf3.cuni.cz, (citováno 4.4.2008)

8 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1 vzorec Aflatoxin B ₁	15
Obr. 2 vzorec Patulin.....	19
Obr. 3 vzorec ochratoxin A.....	20
Obr. 4 vzorec zearalenon.....	21
Obr. 5 vzorec DON.....	23
Obr. 6 vzorec T-2 toxin.....	24
Obr. 7 vzorec kyselina cyklopiazonová.....	25

9 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tab. č.1 vybrané chromatografické podmínky pro HPLC některých mykotoxinů.....	31
Tab. č.2 Hodnocení vybraných mykotoxinů z hlediska expozičních limitů.....	34
Tab. č.3 Hygienické limity aflatoxinů v EU.....	36