

Mykotoxiny v potravinách a stanovení produkce kyseliny cyklopiazonové v sýrech s bílou plísní na povrchu.

Zdeňka Foltýnová

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zdeňka FOLTÝNOVÁ**

Osobní číslo: **T090598**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Mykotoxiny v potravinách a stanovení produkce kyseliny cyklopiazonové v sýrech s bílou plísní na povrchu.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Výskyt mykotoxinů v potravinách.
2. Charakteristika mykotoxinů a způsob stanovení.

II. Praktická část

1. Stanovení kyseliny cyklopiazonové ve vybraných vzorcích sýra s bílou plísní na povrchu.
2. Sledování a vyhodnocení obsahu kyseliny cyklopiazonové během chladiřenského skladování.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. a kolektiv autorů, Vlákňité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka, 1. vyd. Brno: NCO NZO, 2003, 349 s., ISBN 80-7013-395-3
2. KÖPPEN, R., KOCH, M., SIEGEL, D., MERKEL, S., MAUL, R., NEHLSG, I.
Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations Appl Microbiol Biotechnol (2010) 86: 1595-1612

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Radmila Matějčková

Ústav analýzy a chemie potravin

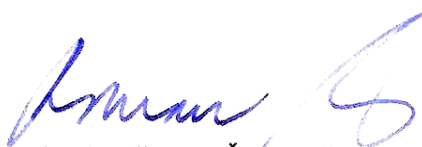
Datum zadání bakalářské práce:

6. ledna 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

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, považuji 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 10. 5. 2012



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 nevdělečně 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 výdětku 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 přihlíďne k výši výdětku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo kvalitativní stanovení kyseliny cyklopiazonové v sýrech s plísní na povrchu. Stanovení bylo provedeno bezprostředně po zakoupení a na konci doby trvanlivosti. Ke stanovení byla využita tenkovrstvá kapalinová chromatografie. Výskyt kyseliny cyklopiazonové nebyl u vzorků prokázán v průběhu chladiřenského skladování.

Klíčová slova: mykotoxiny, kyselina cyklopiazonová, chromatografie, sýry s bílou plísní, extrakce.

ABSTRACT

The aim of my bachelor thesis was to carry out qualitative determination of cyclopiazonic acid in cheeses with white surface mould. The determination was done immediately after the purchase of the cheeses and at the end of their best before dates by thin-layer liquid chromatography. Occurrence of cyclopiazonic acid in the samples was not established during the cooling storage phase.

Keywords: mycotoxins, cyclopiazonic acid, chromatography, cheese with white surface mould, extraction.

Za odborné vedení a cenné rady, podněty a připomínky při zpracování bych ráda poděkovala Ing. Radmile Matějčkové.

Dále chci poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při hledání cizojazyčné literatury a přípravy praktické části.

Děkuji mé dceři Kateřině Foltýnové za pomoc při elektronickém zpracování.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TOXINOGENNÍ PLÍSNĚ	12
1.1 ROD ASPERGILLUS	12
1.2 ROD FUSARIUM	13
1.3 ROD PENICILLIUM	14
2 CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH MYKOTOXINŮ	15
2.1 ROZDĚLENÍ MYKOTOXINŮ	15
2.1.1 Rozdělení podle chemické struktury	15
2.1.2 Rozdělení mykotoxinů podle biosyntézy	16
2.1.3 Rozdělení mykotoxinu podle toxicity	17
2.1.4 Rozdělení podle účinku na buňku	18
2.2 SKUPINY VÝZNAMNÝCH MYKOTOXINŮ	19
2.2.1 Aflatoxiny	19
2.2.2 Ochratoxiny	19
2.2.3 Fumonisinů	20
2.2.4 Zearalenony	21
2.2.5 Cyklopiazonová kyselina	22
2.3 LEGISLATIVNÍ LIMITY MYKOTOXINŮ	23
3 STANOVENÍ MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH	24
3.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	24
3.1.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)	24
3.1.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)	24
3.1.3 Plynová chromatografie (GC)	25
3.2 IMUNOCHEMICKÉ METODY	25
3.3 MIKROBIOLOGICKÉ METODY	25
4 VÝSKYT MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
5 CÍL PRÁCE	31
6 MATERIÁL A METODY	32
6.1 POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	32
6.1.1 Standard.....	32
6.1.2 Použité chemikálie	32
6.1.3 Laboratorní pomůcky a přístroje	32
6.2 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	32
6.3 EXTRAKCE	33
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	34
7.1 EXPERIMENT I	34
7.2 EXPERIMENT II	35
7.3 SOUHRNNÁ DISKUZE	36
ZÁVĚR	37
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	42
SEZNAM OBRÁZKŮ	43
SEZNAM TABULEK.....	44
SEZNAM PŘÍLOH.....	45

ÚVOD

V dnešní době je při výrobě potravin kladen velký důraz na jejich kvalitu, bezpečnost a zdravotní nezávadnost. Riziko výskytu zdravotně nebezpečných látek může vznikat při výrobě potravin, kde je nebezpečí kontaminace z výrobního prostředí anebo je spojeno s nežádoucími látkami, které vznikají během výroby přímo v potravině. Producenty mykotoxinů lze nalézt i mezi startetovými kulturami, které se využívají při výrobě potravin.

Teoretická část bakalářské práce je věnována charakteristice toxinogenních plísní, charakteristických mykotoxinů, jejich výskytu a možného stanovení v potravinách.

V praktické části bylo provedeno kvalitativní stanovení kyseliny cyklopiazonové u 5 vzorků sýrů s plísní na povrchu získaných z běžné obchodní sítě. U těchto vzorků byl sledován výskyt kyseliny cyklopiazonové během chladírenského skladování po dobu minimální trvanlivosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TOXINOGENNÍ PLÍSNĚ

Plísně jsou mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi houby (*Fungi*). Říše *Fungi* se dělí na 5 oddělení: *Myxomycota*, *Chytridiomycota*, *Hypochitridiomycota*, *Oomycota* a *Eumycota* neboli pravé houby. *Eumycota* má 5 tříd: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Endomycetes*, *Trichomycetes*. K houbám se řadí i několik dalších organismů, které jsou systematicky zařazeny do říše *Protozoa*. V širším slova smyslu není termín houby používán pro přesně vymezenou systematickou skupinu, ale pro dosti heterogenní skupinu organismů různorodého vzhledu. Houby můžeme obecně dělit na makroskopické a mikroskopické houby. Mezi mikroskopické houby patří kvasinky, kvasinkovité organismy a plísně. Botaničtí systematici používají název „plísně“ jen pro houby s nepřehrádkovaným myceliem, kam patří třída *Zygomycetes* a některé plísně rostoucí pouze za nízkých koncentrací organických sloučenin. Biotechnologové zahrnují do pojmu plísně i zbylé třídy [1,2,3].

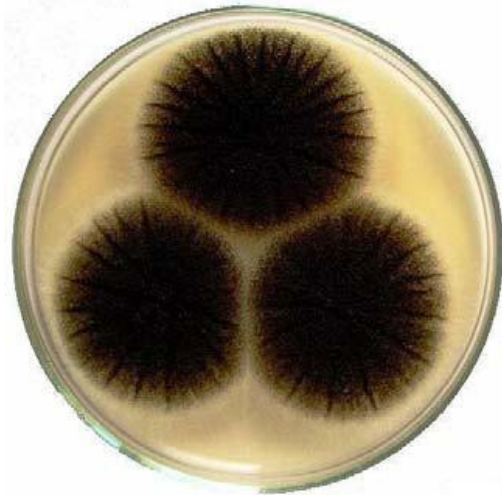
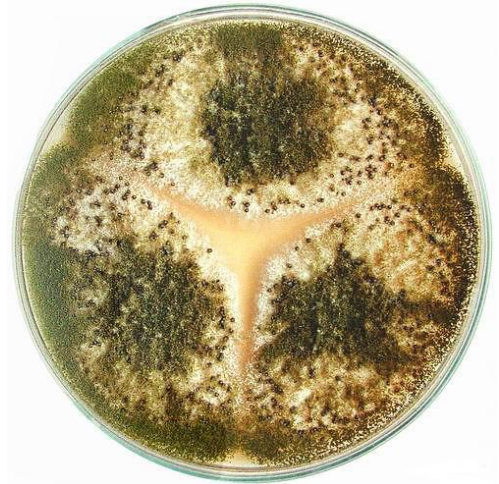
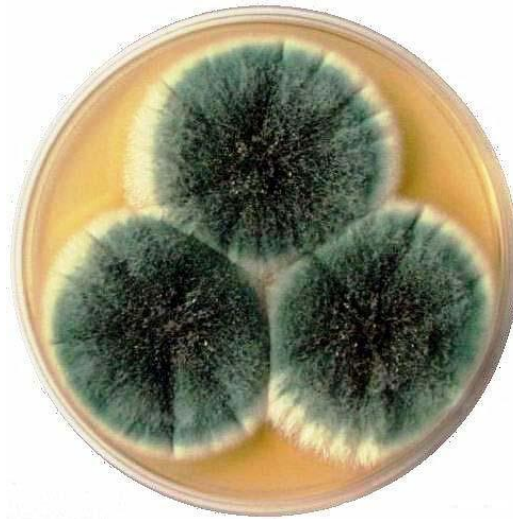
Mezi významné toxinogenní plísně patří rod *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium* [1,2,3].

1.1 Rod *Aspergillus*

Patří mezi nejvýznamnější zástupce řádu *Eurotiales*. V dnešní době obsahuje tento rod přes 221 druhů. Většina druhů rodu *Aspergillus* jsou saprofyty [1].

Z morfologického hlediska jsou pro tento rod typické konidiofory rozšířené na konci v kulovitý měchýřek, hustě pokrytý fialidy v jedné nebo více řadách; celek tvoří hlavičku [1-4].

Je známo přibližně 18 patogenních druhů. Za většinu případů infekce zodpovídají *A. fumigatus*, *A. flavus*, a *A. niger*, které jsou znázorněny na obrázku 1-3. Tito zástupci jsou producenty mykotoxinů (aflatoxin, ochratoxin, patulin) [2].

Obr. 1: *Aspergillus niger* [5]Obr. 2: *Aspergillus flavus* [6]Obr. 3: *Aspergillus fumigatus* [7]

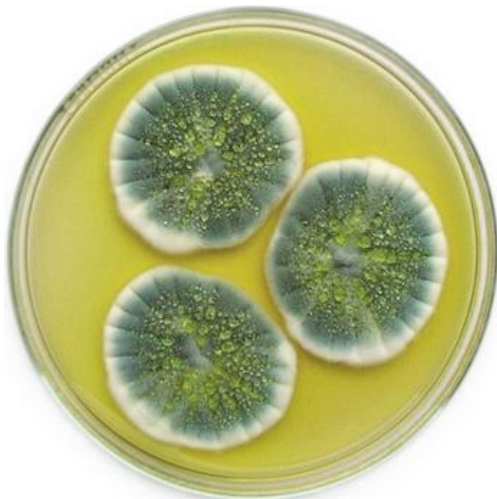
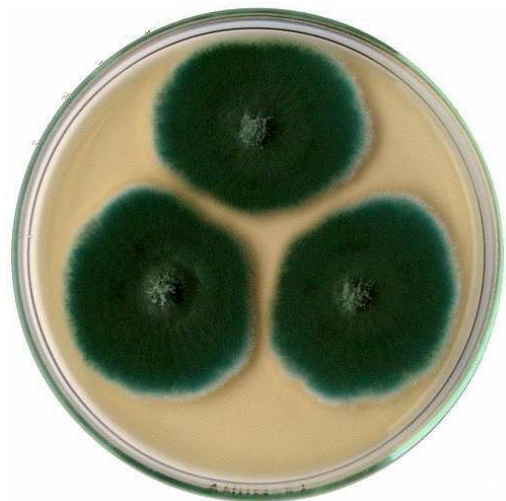
1.2 Rod Fusarium

Na rozdíl od předchozího rodu, v nichž převažují saprofytické druhy, jsou fusaria především parazité. Jsou však schopna i saprofytického růstu, proto je lze pěstovat na umělých půdách. Jsou ale zpravidla náročnější a obtížněji vytvářejí makrokonidie. V kulturách velice často vytvářejí bílé až narůžovělé mycelium, rostoucí ve snopcích od půdy k víčku misky. Některé kmeny zabarvují substrát do růžova až červena. Konidiofory fusarií jsou malé a nenápadné. Konidie jsou dvojí. Mikrokonidie jsou tvořeny zpravidla jednou buňkou. Makrokonidie mají srpovitý tvar, skládají se z většího počtu buněk a nesou důležité druho-ové znaky. Významným zástupcem tohoto rodu je druh *Fusarium culmorum*, který je zobrazen na obrázku 4. *Fusarium culmorum* je znám jako producent mykotoxinu zearalenonu [1-4].

Obr. 4: *Fusarium culmorum* [8]

1.3 Rod *Penicillium*

Tento rod patří mezi nejrozšířenější a nejrozsáhlejší. Jeho druhy tvoří kolonie s velkým množstvím žlutozelených až modrozelených konidií. Na potravinách jsou patrné jako zelené, sametové až moučné povlaky. Zástupci tohoto rodu mohou způsobovat nežádoucí kažení potravin, někteří mohou produkovat mykotoxiny. Někteří zástupci se využívají při výrobě potravin. Na obrázku 5-6 jsou zobrazeny dva zástupci tohoto rodu [1-4].

Obr. 5: *Penicillium chrysogenum* [9]Obr. 6: *Penicillium roqueforti* [10]

2 CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH MYKOTOXINŮ

Mykotoxiny jsou závažné kontaminanty krmiv a potravin, vznikají při normálním či narušeném metabolismu některých plísní. V současnosti je známo více než 400 mykotoxinů. Asi 20 mykotoxinů přítomných v krmivech a potravinách mohou představovat zdravotní rizika. Část mykotoxinů přechází z krmiva do vstupních surovin pro výrobu potravin. Dalším problémem je jejich stálost při vysokých teplotách a v kyselém prostředí. Běžné úpravy potravin a krmiv proto nemohou přítomné mykotoxiny odstranit. Řešením je prevence růstu toxinogenních plísní, zejména vytvoření anaerobního prostředí [3,11-13].

Mykotoxiny vytvářejí především plísně rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Často se vyskytuje více mykotoxinů současně [1,11]

2.1 Rozdělení mykotoxinů

Mykotoxiny lze rozdělit podle velkého množství kritérií. Žádné z dosud používaných však nelze považovat za univerzálně použitelné [12]. Mykotoxiny můžeme rozdělit podle chemické struktury, biosyntézy, toxicity a podle účinku na buňku.

2.1.1 Rozdělení podle chemické struktury

Nejjednodušší je rozdělení podle chemické struktury. Jeho výhodou je poměrně snadné a jednoznačné zařazení jakékoli látky o známé chemické struktuře [2,11]. Rozdělení mykotoxinů podle chemické struktury vidíme v tabulce 1.

Tabulka 1: Členění mykotoxinů podle chemické struktury [2,11].

Chemická struktura	Mykotoxin
Cyklické dipeptidy	Brevianamidy, fumitremorgen, gliotoxin, roquefortin, sporidesminy, verukulogeny atd.
Epoxytrichothecen	Deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenony, nivalenol, roridiny, satratoxiny, T-2 toxin, verukariny atd.
Furanofurany	Aflatoxiny, sterigmatocystin, versikolorin atd.
Griseofulviny	Griseofulvin
Nenasycené laktony	Alternariol, citreoviridin, kyselina mykofenolová, kyselina penicilová, ochratoxiny, patulin, psoralen, rubratoxin B atd.

Chemická struktura	Mykotoxin
Polycyklické substituované indolové deriváty	Kyselina cyklopiazonová, paspaliny, penitremy atd.
Substituované chinony	Luteoskyrin, rubratoxin, viridikatumtoxin, xanthomegnin atd.
Sub.pyreny a hydroxypyreny	Kyselina kojová, sekalonové kyseliny atd.
Mykotoxiny s jinou chemickou strukturou	Citrinin, curvularin, kyselina β -nitropropionová, moniliformin, PR-toxin, zearalenon atd.

2.1.2 Rozdělení mykotoxinů podle biosyntézy

V poslední době se objevuje i třídění podle způsobu biosyntézy. Jeho výhodou je velice dobré postížení vztahu k produkujícímu organismu a do určité míry respektuje i vztahy dané chemickou strukturou [2,11]. Rozdělení mykotoxinů je znázorněno v tabulce 2.

Tabulka 2: Členění mykotoxinů podle způsobu jejich biosyntézy [2,11].

Kategorie biosyntézy	Zástupce
Decaketidy	Aflatoxiny, erytroskyrin
Diketidy	Moniliformin
Diketopiperaziny jednoduché	Kyselina aspergilová, echinuliny
Diketopiperaziny modifikované	Brevianamidy, fumitremorgeny, roguefortin
Diterpeny	Aflatrem, lolitremy, pospalin, penitremy
Heptaketidy	Rugulosin, viriditoxin, xanthomegnin
Hexaketidy	Maltoryzin
Monoterpeny	Viridikatumtoxin
Nonaketidy	Citreoviridin, fumonisiny, zearalenon
Octaketidy	Luteoskyrin
Pentaketidy	Citrinin, Ochratoxiny
Peptidy	Ergotamin, phomopsiny, rhizonin
Seskviterpeny	Trichoteceny

Kategorie biosyntézy	Zástupce
Tetraketidy	Patulin, kyselina penicilová
Tetramická kyselina	Kyselina cyklopiazonová, kyselina tenuazonová

2.1.3 Rozdělení mykotoxinu podle toxicity.

Rozdělení podle toxicity je velmi důležité [2,11]. Toto rozdělení je shrnuto v tabulce 3.

Tabulka 3: Členění mykotoxinů podle toxicity – kvantitativní [2,11].

Silně toxické	Aflatoxiny, patulin, luteoskyrin, sporidesminy, ochratoxin A, cyklochlorotin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, citreoviridin, rubratoxiny, penitrem A
Středně toxické	Citrinin, kyselina penicilová, sterigmatocystin, kyselina cyklopiazonová
Slabě toxické	Griseofulvin, kyselina koji, trichoteceny, kyselina mykofenolová, chaetomin, zearalenon

Nejtoxičtější mykotoxiny mají LD_{50} pro běžná laboratorní zvířata blízkou KCN (tj. cca $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti). Této hodnotě se blíží např. penitrem A. Většina důležitých mykotoxinů má LD_{50} asi desetinásobnou. Existují ovšem vysoké toxicity vůči organismům v určité fázi vývoje (např. toxicita aflatoxinu B_1 vůči savčím a ptačím mládřatům bývá i více než desetinásobná proti toxicitě vůči dospělým), jiné jsou s to vyvolat v dávkách netoxických pro dospělé úhyn a resorpci plodu. Toxicita pro člověka je ovšem pouhým odhadem podle toxicity vůči různým živočichům a dalším biologickým objektům. Karcinogenní účinky se zpravidla projevují již při dávkách, které nemají jiné pozorovatelné účinky. U některých látek je nutné zohledňovat i chronické nekarcinogenní účinky. Na základě extrapolací je poté stanovována tolerovatelná denní dávka, tj. taková, která by ani při dlouhodobém příjmu neměla vyvolávat negativní účinky [2].

Tabulka 4: Členění mykotoxinů podle toxicity – kvalitativní [2,11].

Toxický účinek	Mykotoxiny
Dermatotoxiny	Trichoteceny, psoraleny, verukariny, sporidesminy
Estrogeny	Zearalenon
Genotoxiny	Aflatoxiny, sterigmatocystin, ochratoxin A, citrinin, zearalenon, patulin, trichoteceny, fumonisiny, fusarin C, griseofulvin
Hematotoxiny	Aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichoteceny
Hepatotoxiny	Aflatoxiny, luteoskyrin, sterigmatocystin
Imunotoxiny	Aflatoxiny, ochratoxin A, trichoteceny, patulin, gliotoxin, sporidesmin
Nefrotoxiny	Citrinin, ochratoxin A
Neurotoxiny	Penitrem A, fumitremorgeny, verukulogeny, fumonisiny
Toxiny gastrointestinálního traktu	Trichoteceny

2.1.4 Rozdělení podle účinku na buňku.

Dalším možným kritériem dělení je účinek na úrovni buňky, nitrobuňčných funkcí a systémů. Nevýhodou tohoto dělení je především to, že velké množství látek dosud podle tohoto kritéria není jednoduché zařadit [2,11].

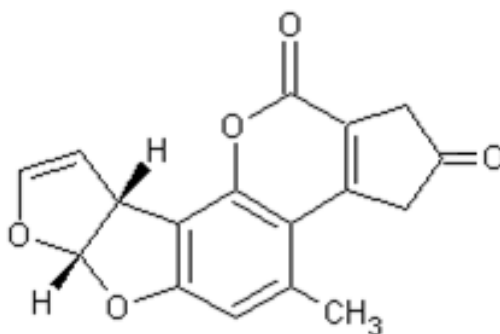
Tabulka 5: Členění podle účinku na buňku [2,11].

Inhibitory tvorby energie	Citreoviridin, luteoskyrin, xanthomegnin, kyselina sekalonová D, moniliformin
Inhibitory proteosyntézy	Trichotheceeny, ochratoxin A
Modifikátory cytoskeletu	Griseofulvin, cytochaalasin, cyclochlorotin
Estrogenní mykotoxiny	Zearalenon
Tremorgeny	Penitremy (A, B, C), fumitremorgeny (A a B), verruculogeny
Karcinogenní mykotoxiny	Aflatoxin B ₁ (dalších cca 10 mykotoxinů je z karcinogenity ve větší či menší míře podezřelých, ale jejich karcinogenita pro člověka není nepochybně prokázána)

2.2 Skupiny významných mykotoxinů

2.2.1 Aflatoxiny

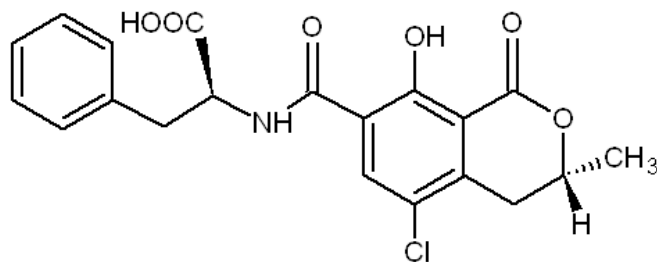
Aflatoxiny jsou mykotoxiny produkované toxigenními plísněmi rodu *Aspergillus* (asi 35 % kmenů produkuje aflatoxiny řady B), *A. parasiticus* (téměř 100 % kmenů je schopno produkovat aflatoxiny řady B i G), *A. argenincus* a *A. nomius*. Tyto látky působí jako hepatotoxiny a hepatokancerogeny. Byly identifikovány začátkem 60. let ve spojitosti s epidemií označovanou jako krutí X onemocnění, při které zahynulo na 100 000 krutích mláďat v okolí Londýna po zkonsumování krmiva s obsahem toxické arašídové mouky [14]. Zvýšený výskyt aflatoxinů je v tropických a subtropických oblastech, kde jsou optimální podmínky pro růst jejich producentů [14-16]. Postupně byly identifikovány 4 přirozené typy aflatoxinů: AFB₁, AFB₂, AFG₁ a AFG₂. Nejčastěji se vyskytuje AFB₁.



Obr. 7: Aflatoxin AFB₁ [11].

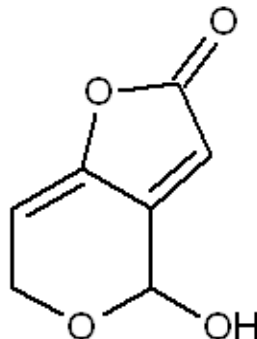
2.2.2 Ochratoxiny

Tato skupina mykotoxinů zahrnuje sedm izokumarinových derivátů vždy spojených s fenylalaninem produkovaných druhů rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotinum*) a *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. purpurascens*, *P. commune*, *P. viridicatum*). Nejvýznamnější látkou je ochratoxin A. Primárním cílovým orgánem ochratoxinu A je vyvíjející se centrální nervový systém. Ochratoxin A je vysoce nefrotoxický pro monogastriká zvířata a současně imunotoxický a teratogenní. Toxin je běžně detekován ve Skandinávii a na Balkáně, příležitostně i v USA, v komoditách jako je kukuřice, ječmen, pšenice, oves, rýže, burské oříšky, seno, zelená káva a jako reziduum ve vepřovém mase (především v ledvinách) [14].



Obr. 8: Ochratoxin A [11].

Mezi další významné ochratoxiny patří patulin. Je nenasycený lakton obvykle izolovaný z jablek a jejich produktů, jako metabolit parazitující houby *Penicillium expansum*, *P. patulinum*, *Byssochlamys nivea*. Je však dokazován i v mase včetně drůbežího, kde se koncentruje po zkrmování obilovin kontaminovaných *Aspergillus clavatus*. Je středně toxický, způsobuje poškození žaludeční sliznice (hemoragie, edémy). Patulin v potravinách je spíše indikátor špatných výrobních postupů – používání "plesnivých" vstupních surovin, než bezprostřední vážná hrozba zdraví člověka či zvířete, i když je třeba počítat i s chronickou intoxikací.



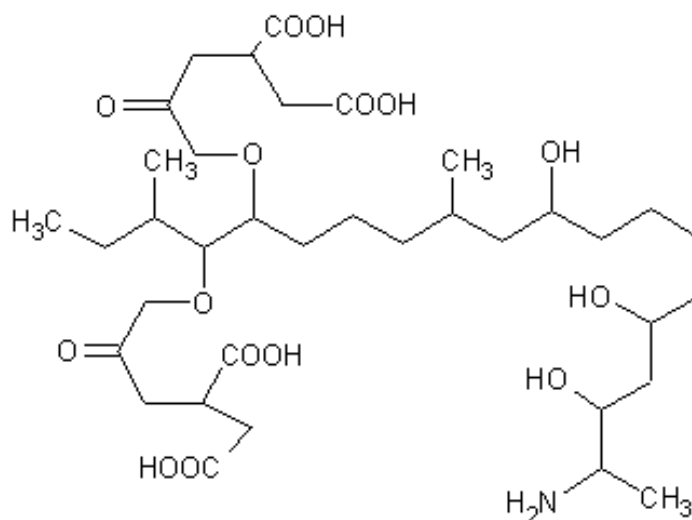
Obr. 9: Patulin [11].

2.2.3 Fumonisin

Fumonisin byly poprvé izolovány v roce 1988 z kultury *Fusarium verticillioides* skupinou vědců vedená Gelderblomem v Jižní Africe. Tato skupina mykotoxinů původcem leukoencephalomalacie u koní (ELEM), plicního edému prasat a je spojována s výskytem nádorů jícnu u významné části populace v Transkei v Jižní Africe a dalších částech světa [17,18].

Fumonisin je možné chemicky charakterizovat jako složité alifatické sloučeniny. Jedná se o skupinu diesterů propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny a 2-acetylamino nebo 2-amino-

2,16-dimetyl-3,5,10,14,15-penta-hydroxy-eicosan nebo jejich C-10 deoxy analogy. Dosud bylo izolováno 7 fumonisinů: A₁, A₂, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁. Nejvýznamnější z nich je fumonisin B₁. Prekurzorem biosyntézy fumonisinu B₁ mikroskopickou houbou *Fusarium moniliforme* je aminokyselina alanin [17,18].

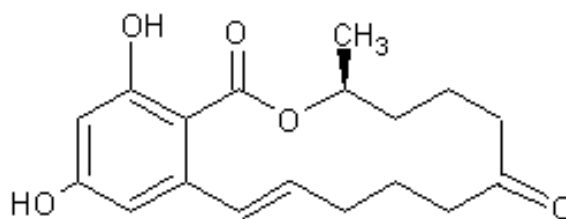


Obr. 10: Fumonisin B₁ [11].

Fumonisiny jsou podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny, Světové zdravotnické organizace (IARC - WHO) klasifikovány jako možné karcinogeny pro člověka (třída 2B) a jsou charakterizovány jako promotory karcinogenního procesu [17,18].

2.2.4 Zearalenony

Zearalenon (ZEA) je klasifikován jako nesteroidní estrogen, mykoestrogen či fytoestrogen a vzhledem ke své chronické toxicitě může představovat zearalenon zdravotní riziko pro člověka i hospodářská zvířata. Jeho název byl odvozen od jména houby *Gibberella zeae*, z níž byl poprvé izolován skupinou vědců pod vedení Stoba. Hlavním druhem v produkci zearalenonů je *Fusarium graminearum* (= *F. roseum*, nepohlavní forma *Gibberella zeae*). V současné době je izolováno 15 derivátů základní struktury zearalenonu (dříve označovaný jako F-2 toxin) [19-21].



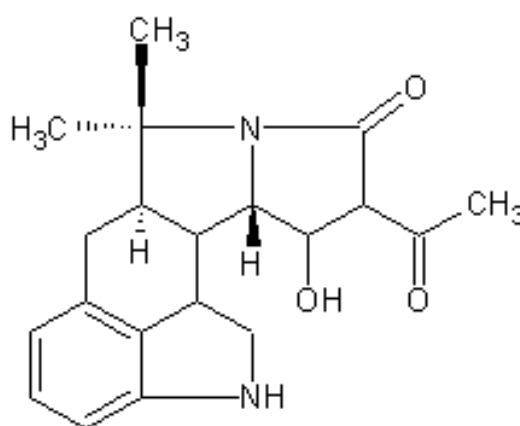
Obr. 11: Zearalenon [11].

2.2.5 Cyklopiazonová kyselina

Kyselina cyklopiazonová je mykotoxin střední toxicity, izolovaný a chemicky charakterizovaný Holzapfelem (1968) jako jeden z metabolitů *Penicillium cyclopium* Westling. Je produkována řadou mikroskopických hub rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Významná je produkce u *Penicillium camemberti*, kdy bylo zjištěno, že většina sbírkových kmenů produkuje uvedený mykotoxin. Bitoxinogenní kmeny *Aspergillus flavus* jsou schopny produkovat kyselinu cyklopiazonovou současně s aflatoxiny [22,23].

Kyselina cyklopiazonová je indoltetramový derivát. Kyselina cyklopiazonová je potenciálním inhibitorem syntézy bílkovin, kdy inhibuje přepis RNA při syntéze bílkovin a poškozuje orgány, které se účastní proteosyntézy. Inhibuje transport Ca^{2+} do endoplazmatického retikula, kdy tento transport hraje důležitou roli při svalové kontrakci. Poškozuje gastrointestinální trakt, ledviny, játra a další orgány. Byly pozorovány degenerativní změny myokardu a kosterního svalu [22,23].

Kyselina cyklopiazonová byla zachycena v sýrech camembertského typu, kukuřici, arašíděch, v krmných směsích, rýži a kroupách [22,23].



Obr. 12: Kyselina cyklopiazonová [11].

2.3 Legislativní limity mykotoxinů

V České republice platí Nařízení komise (ES) č. 2073/2005, kde limit pro výskyt mykotoxinů v potravinách není stanoven [24].

V 90. letech 20. století a v první části minulé dekády byly vyhláškou č. 298/1997 Sb. stanoveny limity pro Aflatoxin B₁, Aflatoxin M₁, Aflatoxiny (suma B₁, B₂, G₁, G₂), Sterigmatocystin, Deoxinivalenol, Patulin a Ochratoxin A. Skupiny potravin byly hlavně dětská a kojenecká výživa, pro Aflatoxin B₁ to dále byl arašídy, kakao, ořechy, koření, pro Aflatoxin M₁ byly limity stanoveny pro mléko a mléčné výrobky [25].

3 STANOVENÍ MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH

Stanovení mykotoxinů je důležité vzhledem jejich možné toxicitě a ke sledování zdravotní nezávadnosti potravin. Je to složitý proces, který se skládá z odběru vzorků, úpravy vzorků, extrakce mykotoxinu, přečištění extraktu, detekce mykotoxinu a kvantitativního stanovení [2,26].

Mykotoxiny v potravinách lze stanovit chromatografickými metodami (HPLC, GS, TLC), imunochemické metody (ELISA, RIA), mikrobiologickými metodami a elektromigrační metody (kapilární elektroforéza) [23,26,27].

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody patří mezi fyzikálně-chemické metody. Tyto metody využívají různé rychlosti prostupu jednotlivých látek unášených směsí rozpouštědel skrze vrstvu vhodného sorbentu. Nejznámější a nejčastěji používané úpravy chromatografie jsou TLC, HPLC, GC [28-30].

3.1.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Tenkovrstevná chromatografie je založena na vzlínání směsi rozpouštědel v tenké vrstvě sorbentu na povrchu vhodného nosiče. K vizualizaci fluoreskujících mykotoxinů (aflatoxiny, citrinin, ochratoxin A) dostačuje osvětlení UV zářením, ostatní detekujeme postříkáním chemickými činidly, které s toxiny tvoří barevné nebo fluoreskující sloučeniny [23,30-32].

Výhodou tenkovrstevné chromatografie je relativní odolnost vůči příměsím balastních látek [23]. Dále je tato metoda jednoduchá a finančně nenáročná [32,33].

Pro stanovení lze využít HPTLC (vysoce účinná tenkovrstevná chromatografie), která pracuje se speciálními deskami, jejichž sorbent je velmi jemný a zejména je zajištěna vysoká stejnorodost jeho zrn z hlediska velikosti a tvaru. Pracuje se s malými deskami a množství nanášeného vzorku je velmi malé [23,34].

3.1.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda HPLC patří mezi nejčastěji využívanou metodou pro stanovení mykotoxinů. V praxi převažuje použití chromatografie na obrácené „reverzní“ fázi RP-HPLC, která umožňuje separaci málo polárních látek, látek středně i silně polárních [2,30]. Stacionární fáze je složena z mikročástic silikagelu, na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Tato fáze je nepolární. Mobilní fáze je polární, většinou je používána směs vody s organic-

kými rozpouštědly (metanol a acetonitril). Stanovení lze ovlivnit pomocí pH, které má vliv na stupeň disociace a tím i na dělení složek mezi stacionární a mobilní fázi [2,30,34].

3.1.3 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je použitelná pro analýzu většiny mykotoxinů. Separované látky ze vzorku musí být odpařeny do nosného plynu a jsou dále unášeny přes vyhřívanou kolonu naplněnou stacionární fází. Velká část mykotoxinů není těkavá, je nutné vytvořit jejich těkavé deriváty. Plynovou chromatografii lze kombinovat s různými detektory například plamenově ionizačním detektorem (FID), detektorem elektronového záchytu (ECD) nebo hmotnostním detektorem (MS) [30,33,36]. GC vykazuje vyšší citlivost a přesnost než HPLC, ale vyžaduje selektivnější a náročnější postup přípravy vzorku [37].

3.2 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na imunitní reakci sledované látky s protilátkami. Mykotoxiny zpravidla nevyvolávají imunitní odezvu s tvorbou protilátek, ale působí jako hapteny. To znamená, že po navázání na vhodný nosič (např. bílkovinu) vyvolají tvorbu specifických protilátek. ELISA má proti RIA výhodu jednoduššího odečítání výsledku, ale do reakce zavádí další citlivou bílkovinnou molekulu (enzym), jejíž vlastnosti mohou být pozměněny balastními látkami ze vzorku a podílejí se na stárnutí analytického kitu (sady). Obě metody, RIA i ELISA, bývají zpravidla vypracovávány pro konkrétní přesně definované látky [23]. K výhodám metody ELISA kitů patří jednoduchost, rychlost a finanční nenáročnost lze je použít v provozu pro stanovení většího počtu vzorků.

Nevýhoda spočívá v dostupnosti těchto kitů jen pro některé typy mykotoxinů a mohou také vykazovat kvůli křížovým reakcím falešně pozitivní výsledky, které musí být dále potvrzeny jinými analytickými postupy [38].

3.3 Mikrobiologické metody

Mikrobiologické metody jsou relativně nenáročné, zejména z hlediska materiálního vybavení. Lze prokázat blokádu růstu testovacího kmene kolem disků s obsahem mykotoxinu. Podezření na konkrétní mykotoxin je dáno postupem přípravy vzorku (který vyloučí přítomnost některých mykotoxinů na disku) a použitím kmene se selektivně vysokou citlivostí k určitému mykotoxinu – skupině mykotoxinů [23].

V některých případech lze použít selektivní blokádu účinku mykotoxinů některými látkami. V literatuře je popsána blokáda účinku aflatoxinů kumarinovými preparáty a blokáda

patulinu a kyseliny penicillové látkami s -SH skupinami. Ve druhém případě se podařilo na LF MU vyvinout metodu stanovení patulinu, které spočívá v aplikaci dvou disků s hrubým etylacetátovým extraktem vzorku na půdu s citlivým mikroorganizmem, přičemž na jednom je vedle vzorku přidáno i standardní množství thioglykolátu sodného. Pro přítomnost patulinu je charakteristický výrazný rozdíl velikostí zón inhibice růstu použitého mikroorganismu kolem disků. Důležité u všech uvedených metod je konstantní tloušťka a rovnoběžnost vrstvy vylité půdy, což je technicky dosti náročné. Zdrojem chyb mohou být antibioticky působící látky, proto je použití metod omezeno především na substráty, kde není výskyt podobných látek obvyklý. Je možná úprava mikrobiologické metody k odečítání chromatogramů [23].

Uvedené metody mají svůj význam hlavně pro mikrobiologické laboratoře, nevybavené k použití složitějších chemických metod. Mohou mít svůj význam u těch toxinů, kde jsou nedostupné specifické chemické reakce, proveditelné přímo na chromatogramu, a látky je příliš málo pro její bližší určení fyzikálně chemickými metodami [23].

4 VÝSKYT MYKOTOXINŮ V POTRAVINÁCH

Plísně jako producenti mykotoxinů mohou růst na nejrůznějších substrátech. Plísně mají aerobní povahu, proto napadají povrch materiálu. Mohou rozkládat nejrůznější organický materiál, dále mají schopnost využívat vzdušnou vlhkost, rozmnožují se za poměrně nízké vodní aktivity prostředí a při nízkém pH. A proto jsou potraviny výhodným substrátem pro jejich růst [11,15,21,23,39].

Výskyt plísni v potravinářství je až na malé výjimky, kdy se používají jako čisté kultury, nežádoucí. Způsobují vady, až úplné znehodnocení potravin (máslo, sýry, zakysané mléčné výrobky, tvaroh, sušené výrobky, maso, cereálie a další), pokud jsou pro rozvoj plísni podmínky. Nejdůležitější z nich je přístup vzdušného kyslíku a delší doba. Prakticky využíváme plísně pro výrobu antibiotik, organických kyselin (kyselina citronová, šťavelová), nebo enzymových preparátů (proteasy, amylasy, celulosy) [11,15,21,23,39].

V mléce a v mléčných výrobcích mohou mykotoxiny pocházet buď z krmiva, a potravním řetězcem se dostat do mléka, nebo mohou být vyprodukovány toxinogenními plísněmi, např. při skladování mlékárenských výrobků, nebo při zrání sýrů [11,15,21,23,39].

Mykotoxiny jsou termostabilní. Pasterizací se jejich obsah v mléce prakticky nemění. Z organismu jsou částečně vylučovány s potravou, částečně přecházejí do krve a jsou rozkládány (detoxikovány) v játrech. Do masa a mléka dojnic jich přechází jen velmi málo. Závažně však poškozují zdraví zvířat, jejich reprodukční schopnost a zvyšuje se počet úhynů. Patogenní plísně způsobují onemocnění kůže, nehtů, sliznic, dýchacích cest i dalších vnitřních orgánů. Tyto choroby se označují jako mykózy. Často způsobují choroby z povolání u zemědělců, veterinárních pracovníků aj [11,15,21,23,39].

Alergické reakce bývají způsobeny přecitlivělostí organismu na vdechované spóry plísni. Např. při manipulaci s plesnivými potravinami, senem, ovocem, dřevem apod.

Projevují se kašlem, rýmou, oční přecitlivělostí apod. V technické praxi se plísně potlačují tzv. fungicidními látkami. Např. natamycin (známý pod obchodním názvem Delvocid), kyselina sorbová, sorbát draselný, kyselina benzoová, kyselina propionová. Na ochranu rostlin proti plísním se používá mnoho různých fungicidů, např. Fundazol.

Některé druhy plísni parazitují na hmyzu (např. druhy rodu *Beauveria* z čeledi *Moniliaceae*) a mohou být použity k ekologicky nezávadnému hubení škůdců.

Vědeckotechnický pokrok umožňují používat stále citlivější metody a dokonalejší přístroje. Postupně se objevují nové mykotoxiny. Vlivem mykotoxinů na zdraví lidí i zvířat se zabývá mnoho odborných pracovišť u nás i v zahraničí. Jednoznačně je dokázáno, že plesnivé potraviny a krmiva mohou vážně ohrozit zdraví konzumentů. Z těchto důvodů se celosvětově upouští od používání plísní při výrobě potravin – např. při výrobě trvanlivých salámů. Výjimku tvoří výroba plísňových sýrů. Zde se používají netoxinogenní kmeny a ani v průběhu zrání nejsou vhodné podmínky pro vznik mykotoxinů [11,15,21,23,39]. Přehled mykotoxinů v potravinách je shrnut v tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled a výskyt významných mykotoxinů v potravinách [11,23].

Mykotoxin	Potravina
Aflatoxiny (zejména aflatoxin B ₁)	Arašídová omáčka, pasta, směs, arašidy kandované, broskvová jádra, cereální snídaně, česnek nakládaný, čili papričky, čokoláda, fíky, kakaová drť, kari pasta, kokosové ořechy, pepř, kmín, kukuřičné výrobky, mandle, marcipán, olej, špagety, zázvor, zrno ječmene atd.
Aflatoxin G ₁	Stejně jako u AFB, navíc v semenech celeru
Aflatoxin G ₂	Stejně jako AFB, navíc citrony, pomeranče, sezamová semínka slunečnicová semínka, kurkuma, soja
Aflatoxin M	Jogurt, kukuřice bílá a žlutá, máslo, mléko pasterizované, sterilizované, sušené, velbloudí, pistáciové ořechy, Brie, Camambert, Cheddar, Cheshire, Chester, Cottage, Compe, Cream, Double Gloucester, Eidam, Emmental, Fresh, Gouda, Grana Padano, Mozzarella, Parmesan, Romadur, Samsoe, Stilton
Alternáriové mykotoxiny: Alternáriol, Altrnáriol metyleter, Kyselina tenuazonová	Rajčata, jablka, melouny, olivy, ječmen, oves, žito, pšenice, čirok
Deoxynivalenol	Obiloviny, dětská výživa z obilovin, ječmen a hotové výrobky na bázi ječmene, různé druhy kukuřice, pšenice a výrobky z ní, rýže, proso
Fumonisin B ₁	Kukuřice, extrudované kukuřičné výrobky
Kyselina cyklopiazonová	Kukuřice, arašidy, rýže, kroupy, sýry camambertského typu, měkké plísňové sýry
Ochratoxin A	Obiloviny, káva, pivo, luštěniny, koření, zelený čaj, sušené ovoce, vepřové maso, krev

Mykotoxin	Potravina
Patulin	Jablka, banány, grepy, broskve, meruňky, ananas, borůvky, plesnivé kompoty, hruškové džusy
Sterigmatocystin	Obiloviny, zelená káva, marihuana, tvrdé sýry, fenykl, hroznový a grepový džus
T-2 toxin	Obiloviny, fazole, koření, pivo
Zearalenon	Obiloviny, olej, pepř, fenykl, kari-pasta, kari, koriandr, chilli omáčka, banány, ořechy, boby, proso, rýže

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo kvalitativní stanovení kyseliny cyklopiazonové ve vybraných vzorcích sýra s bílou plísní na povrchu získaných z běžné obchodní sítě a sledovat změnu výskytu této kyseliny během chladírenského skladování.

Pro dosažení výše zmíněných cílů bylo nutné:

v teoretické části popsat:

- Výskyt kyseliny cyklopiazonové v potravinách,
- Charakterizovat vybrané mykotoxiny a popsat způsob jejich stanovení.

v praktické části bylo nutné splnit tyto dílčí cíle:

- Kvalitativně stanovit kyselinu cyklopiazonovou pomocí tenkovrstvé chromatografie ve vybrané skupině vzorků,
- Sledovat výskyt kyseliny cyklopiazonové během chladírenského skladování.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Pomůcky a chemikálie

6.1.1 Standard

Kyselina cyklopiazonová (*Penicillium cyclopium*), SIGMA-ALDRICH, C1530 – ≥ 98 % (TLC), powder

6.1.2 Použité chemikálie

Etanol, Agar, Hydrogenfosforečnan sodný, Dihydrogenfosforečnan draselný, Dietyléter, Kyselina octová, Koncentrovaný roztok amoniaku, Kyselina šťavelová, Metanol, Chloroform, Octan etylnatý, Síran sodný bezvodý, Tetrachlormetan, p-dimethylaminobenzaldehyd, Chlorid sodný, Kyselina sírová. Chromatografická deska: ALUGRAM

6.1.3 Laboratorní pomůcky a přístroje

Třecí miska, Erlenmeyerovy baňky, odměrný válec, odpařovací baňky, odpařovací misky, Petriho misky, nálevky, papírové filtry, mikropipety, kyvety pro chromatografii, kádinky, topné hnízdo, vodní lázeň, třepačka, sušárna.

6.2 Charakteristika vzorků

V experimentální části bakalářské práce byla stanovena přítomnost kyseliny cyklopiazonové ve vybraných vzorcích sýrů s plísní na povrchu. Sýry s plísní na povrchu byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Ke stanovení bylo použito 5 vzorků. Všechny vzorky byly skladovány po celou dobu experimentu (od zakoupení až do konce doby použitelnosti) v lednici při teplotě 6 ± 2 °C. Vzorky byly zakoupeny 19. 2. 2012.

Popis vzorků:

- Vzorek A, 90 g, Polsko, min. trvanlivost do: 12. 3. 2012
- Vzorek B, 100 g, Povltavské mlékárny ČR, min. trvanlivost do: 17. 3. 2012
- Vzorek C, 120 g, Pribina Přibyslav ČR, min. trvanlivost do: 9. 3. 2012
- Vzorek D, 120 g, Polsko, min. trvanlivost do: 27. 2. 2012
- Vzorek E, 340 g, Francie, min. trvanlivost do: 23. 2. 2012

Fotografie vzorků jsou přiloženy v příloze I.

6.3 Extrakce

Z povrchu sýra byla okrájena 1 – 2 mm silná povrchová vrstva. Bylo odváženo 30 g okrájené povrchové vrstvy, která byla dezintegrována v třecí misce a převedena do Erlenmeyerovy baňky. Bylo přidáno 100 ml etanolu a Erlenmeyerovy baňky byly umístěny na třepačku. Po 30 minutách byl extrakt převeden do čisté Erlenmeyerovy baňky. Extrakce byla provedena třikrát. První a druhý přídavek etanolu byl 100 ml, třetí přídavek byl 50 ml etanolu.

Extrakt byly spojeny a k nim bylo přidáno asi 15 g síranu sodného bezvodého a po 5 min. třepání zfiltrvány přes papírový filtr. Extrakt byl odpařen na topných hnízdech v odpařovacích baňkách na objem cca 3 – 5 ml.

Zahuštěný odparek byl rozetřen na povrch pufrovaného agarového gelu [30 g agarové řasy, 27 ml 0,15 M Na_2HPO_4 , 73 ml 0,15 M KH_2PO_4 , rozvařit v destilované vodě, doplnit na 1 litr destilovanou vodou a vylít do Petriho misek po 20 ml] a dosušen proudem vzduchu tak, aby povrch extraktu byl pokryt tukovou vrstvou. Tyto Petriho misky byly uloženy v lednici při teplotě 6 ± 2 °C na dobu 48 hodin.

Po 48 hodinách byl povrch agaru mechanicky očištěn, rozkrájen na drobné kostečky a převeden do Erlenmeyerovy baňky 250 ml.

Agar byl třikrát extrahován dietylerem po 30 minutách. První a druhý přídavek dietyleru byl 50 ml a třetí přídavek byl 25 ml. Éterové extrakt byly spojeny a odpařeny do sucha na vodní lázni

Vysušený extrakt byl naředěn na 200 μl octanem etylnatým a 50 μl extraktu byl nanesen na start chromatografické desky 20 x 15 cm. Deska byla před použitím vyvolána prázdná v roztoku etanol : kyselina octová (3 : 1) a po vysušení v roztoku etanol : koncentrovaný vodný roztok amoniaku (3 : 1). Poté byla tato chromatografická deska nasycena roztokem kyseliny šťavelové v metanolu o koncentraci 1 g v 10 ml a po usušení byly na tuto desku naneseny vzorky. Deska byla vyvolána v soustavě chloroform : octan etylnatý : tetrachlormetan (7 : 2 : 1). Po vyvolání byla deska detekována roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu (1 g ve 30 ml etanolu) a poté vystavena parám HCl. Deska byla vyjmuta ihned po vzniku modrofialových skvrn kyseliny cyklopiazonové.

Fotografie pracovního postupu jsou přiloženy v příloze I.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení bylo provedeno ihned po zakoupení vzorků – experiment I a po uplynutí minimální doby trvanlivosti – experiment II.

7.1 Experiment I

Bylo analyzováno 5 vzorků sýrů s plísní na povrchu ihned po nákupu. U žádného z těchto vzorků nebyla přítomnost kyseliny cyklopiazonové prokázána. Výsledek byl určen vizuálně z chromatografické desky, kterou lze vidět na obrázku 13. Standard, který byl na desku nanesen jako šestý vzorek, vykazuje zřetelně barevnou skvrnu. Tato skvrna se u vzorků nevyskytla. Toto tvrzení dokládají hodnoty retenčních faktorů R_f . Tyto hodnoty jsou shrnuty v tabulce 7. R_f je hodnota podílu vzdálenosti skvrny od startu a vzdálenosti čela a startu. I když nebyly skvrny zjištěny, není přítomnost kyseliny cyklopiazonové ve vzorcích vyloučena. Její množství může být pod mezí postřehu.



Obr. 13: Chromatografická deska – experiment I

Tabulka 7: Retenční faktor – experiment I

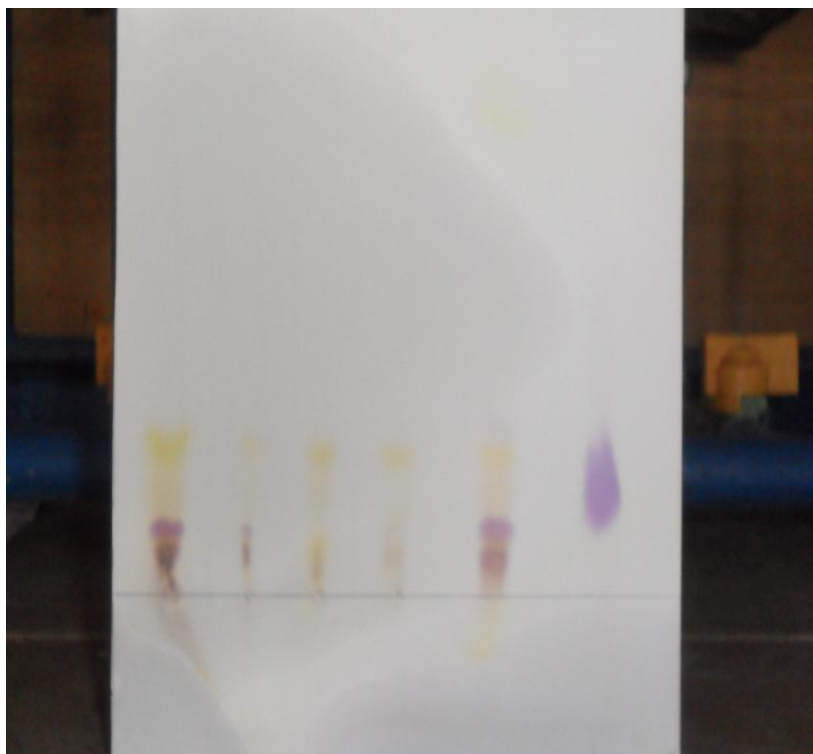
Vzorek	Rf
	Při nákupu
1.	0,138
2.	-
3.	-
4.	-
5.	0,115
Standard	0,231

7.2 Experiment II

Bylo analyzováno 5 vzorků sýrů s plísní na povrchu na konci minimální doby trvanlivosti. U žádného z těchto vzorků nebyla přítomnost kyseliny cyklopiazonové prokázána. Výsledek byl určen vizuálně z chromatografické desky, kterou lze vidět na obrázku 14. Standard, který byl na desku nanesen jako šestý vzorek, vykazuje zřetelně barevnou skvrnu. Tato skvrna se u vzorků nevyskytla. Toto tvrzení dokládají hodnoty retenčních faktorů Rf. Tyto hodnoty jsou shrnuty v tabulce 8. I když nebyly skvrny zjištěny, není přítomnost kyseliny cyklopiazonové ve vzorcích vyloučena. Její množství může být pod mezí postřehu.

Tabulka 8: Retenční faktor – experiment II

Vzorek	Rf
	Minimální doba trvanlivosti
1.	0,174
2.	0,122
3.	-
4.	-
5.	0,139
Standard	0,243



Obr. 14: Chromatografická deska – experiment II

7.3 Souhrnná diskuze

Kyselina cyklopiazonová nebyla zjištěna v žádném ze sledovaných vzorků sýrů s plísní na povrchu ani při založení skladovacího pokusu ani na jeho konci. Metoda TLC, která byla pro stanovení využita, patří mezi metody jednoduché a finančně méně náročné než metody instrumentální, ale je zde vyšší mez detekce. I když nebyla přítomnost této kyseliny ve vzorcích prokázána, neznamená to, že se v příslušných vzorcích nevyskytuje [23].

Velmi malé množství kyseliny cyklopiazonové ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu a možnost ovlivnění tohoto stanovení přítomností dalších balastních látek nás vede k tomu, že je pro stanovení lepší, využít přesnější instrumentální metody [23].

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na kvalitativní stanovení kyseliny cyklopiazonové v sýrech s plísní na povrchu zakoupené v běžné obchodní síti.

Úkolem této práce bylo sledovat výskyt kyseliny cyklopiazonové pomocí tenkovrstvé kapalinové chromatografie. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je možné přítomnost kyseliny cyklopiazonové prokázat pomocí tenkovrstvé chromatografie v závislosti na době skladování při chladírenských podmínkách.

Bylo zjištěno:

- Přítomnost kyseliny cyklopiazonové nebyla prokázána v žádném ze sledovaných vzorků
- Pro stanovení kyseliny cyklopiazonové je vhodnější použít přesnějších instrumentálních metod především vysokotlaké kapalinové chromatografie

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Redaktorka publikace Jitka Zykánová. 3. dopl. vyd. Praha: Akademie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. 1.vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. 349 s. ISBN 80-7013-395-3.
- [3] DE SAEGER, S. (ed.). *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. 2011. ISBN 978-0-85709-097-3.
- [4] VÁŇA, J. Systém a vývoj hub a houbových organizmů. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996. 158 s. ISBN 80-7184-175-7.
- [5] Obrázek 1 *Aspergillus niger*. Miniatlask mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Aspergillus%20niger%20CCF%201610%20CYA%205-25.jpg>
- [6] Obrázek 2 *Aspergillus flavus*, Miniatlask mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Aspergillus%20flavus%20CCF%203056%20CYA%2014-25.jpg>
- [7] Obrázek 3 *Aspergillus fumigatus*, Miniatlask mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Aspergillus%20fumigatus%20CCF%203227%20CYA%205-25.jpg>
- [8] Obrázek 4 *Fusarium culmorum*, Miniatlask mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Fusarium%20culmorum%20CCF%203229%20PGA%2014-25.jpg>
- [9] Obrázek 5 *Penicillium chrysogenum*, Miniatlask mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Penicillium%20chrysogenum%20CCF%202878%20CYA%2010-25.jpg>

[10] Obrázek 6 *Penicillium roqueforti*, Miniatlás mikroorganizmů [online]. 2004 [cit. 2011-11-17]. Dostupný z WWW:

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/kolonie/Penicillium%20roqueforti%20CCF%202310%20CYA%207-25.jpg>

[11] VELÍŠEK, J. Chemie potravin. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. p. 623. ISBN 978-80-86659-16-9.

[12] BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Mykotoxiny*. 1st ed. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska, 1996. 70 p.

[13] MAGAN, N., OLSEN, M (ed.). *Mycotoxins in food : detection and control*. 1st ed. 2004. ISBN 1 85573 733 7.

[14] *JEDY NIŽŠÍCH HUB (MYKOTOXINY)* [online]. 2007 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/obsah.php>

[15] BHAT, R., RAI, R., V., Mykotoxin in food and feed: Present status and future concerns

[16] MISHRA, H. N., DAS, CH. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, vol. 43, no. 3, p. 245–264.

[17] MOSS, M. Mycotoxin review – 2. Fusarium. *Mycologist*, 2002, vol. 16, no. 4, p. 158–161.

[18] JACKSON, L., JABLONSKI, J. Fumonisin. In Magan, N., Olsen, M. Mycotoxins in food - Detection and control, *Woodhead Publishing*, 2004, p. 471 367-405.

[19] BENNETT, JW., KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, vol. 16, no. 3, p. 497-516.

[20] BETINA, V. *Mykotoxíny – chémia-biológia-ekológia*, Alfa, Bratislava, 1990, p. 288.

[21] ZAIN, M. E., Impact of mycotoxins on humans and animals *Journal of Saudi Chemical Society*, 2010, article in press.

- [22] HEPERKAN, D. Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and co-occurrence of aflatoxin. 2012, *Food control*, vol. 21, no. 1, p. 82–86.
- [23] ŠIMŮNEK, Jan. *Mykotoxiny* [online]. 2003 [cit. 2011-12-09]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mt_anaob.htm
- [24] EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In Úřední věstník Evropské unie. 2005, L 338, s. 1-26.
- [25] Vyhláška č.298/1997 Ministerstva zdravotnictví.
- [26] KÖPPEN, R., KOCH, M., SIEGEL, D., MERKEL, S., MAUL, R., NEHLSG, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, 86:1595–1612
- [27] SHEPHARD, S., G., Determination of mycotoxins in human foods, *Chemical Society Reviews*, 2008, 37, 2468-2477.
- [28] ARDEY, RE. Chapter 2: Liquid Chromatography In. Antony Rowe Ltd. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Introduction*. Wiley, 2003, p.296 (7-32).
- [29] KODÍČEK, M. Chromatografie. In. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007, Dostupné na: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=chromatografie](http://www.vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=chromatografie)
- [30] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2nd ed. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 p. ISBN 80-86369-07-2.
- [31] NIESSEN, W.M.A. *Liquid chromatography–Mass Spectrometry*. Third Edition, CRC Press, 2006, p. 600.
- [32] LIN, L, et al. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 815, no. 1, p. 3–20.
- [33] DORNER, JW. Chromatographic analysis of mycotoxins, In. Shibamoto, T. *Chromatographic Analysis of Environmental and food toxicants*. CRC Press, New York, 1998, p. 113-168.
- [34] PATEL, P. Mycotoxin analysis: current and emerging technologies. In Magan, N., Olsen, M. *Mycotoxins in food - Detection and control*, Woodhead Publishing, 2004, p. 88-110.

- [35] MONTES-BAYÓN, M., DENICOLA, K., CARUSO, JA. Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1000, no. 1-2, p. 457–476.
- [36] TANAKA, T., et al. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 882, no. 1-2, p. 23–28.
- [37] SCHOLLENBERGER, M., et al. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography–mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase Extraction. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 815, no. 1, p. 123–132.
- [38] CAVALIERE, C., et al. Mycotoxins produced by fusarium genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, no. ,2, p. 700–710.
- [39] FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C., THRANE, U., Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 33, p. 85–102.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFB ₁	Aflatoxin skupiny B ₁
AFB ₂	Aflatoxin skupiny B ₂
AFG ₁	Aflatoxin skupiny G ₁
AFG ₂	Aflatoxin skupiny G ₂
ECD	Detektor elektronového záchytu
FID	Plamenově ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
LD ₅₀	Je v toxikologii označení pro množství substance, které je po podání určité látky smrtelnou dávkou pro daného živočicha v 50 % případů
LF MU	Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
MS	Hmotnostní detektor
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZEA	Zearalenon

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Aspergillus niger</i> [5].....	13
Obr. 2: <i>Aspergillus flavus</i> [6].....	13
Obr. 3: <i>Aspergillus fumigatus</i> [7]	13
Obr. 4: <i>Fusarium culmorum</i> [8].....	14
Obr. 5: <i>Penicillium chrysogenum</i> [9].....	14
Obr. 6: <i>Penicillium roqueforti</i> [10].....	14
Obr. 7: Aflatoxin AFB ₁ [11].....	19
Obr. 8: Ochratoxin A [11].....	20
Obr. 9: Patulin [11].	20
Obr. 10: Fumonisin B ₁ [11].	21
Obr. 11: Zearalenon [11].	22
Obr. 12: Kyselina cyklopiazonová [11].....	22
Obr. 13: Chromatografická deska – experiment I.....	34
Obr. 14: Chromatografická deska – experiment II	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Členění mykotoxinů podle chemické struktury [2,11].	15
Tabulka 2: Členění mykotoxinů podle způsobu jejich biosyntézy [2,11].	16
Tabulka 3: Členění mykotoxinů podle toxicity – kvantitativní [2,11].	17
Tabulka 4: Členění mykotoxinů podle toxicity – kvalitativní [2,11].	18
Tabulka 5: Členění podle účinku na buňku [2,11].....	18
Tabulka 6: Přehled a výskyt významných mykotoxinů v potravinách [11,23].	28
Tabulka 7: Retenční faktor – experiment I	35
Tabulka 8: Retenční faktor – experiment II.....	35

SEZNAM PŘÍLOH

P I FOTOGRAFIE K PRAKTICKÉ ČÁSTI

PŘÍLOHA P I: FOTOGRAFIE K PRAKTICKÉ ČÁSTI



Sýr s bílou plísní, Polsko



Sedlčanský hermelín, ČR



Král sýrů Hermelín, ČR



Král sýrů Kozí, Polsko



Val de Saone, Francie



Příprava vzorků 1



Příprava vzorků 2



Extrakce 1



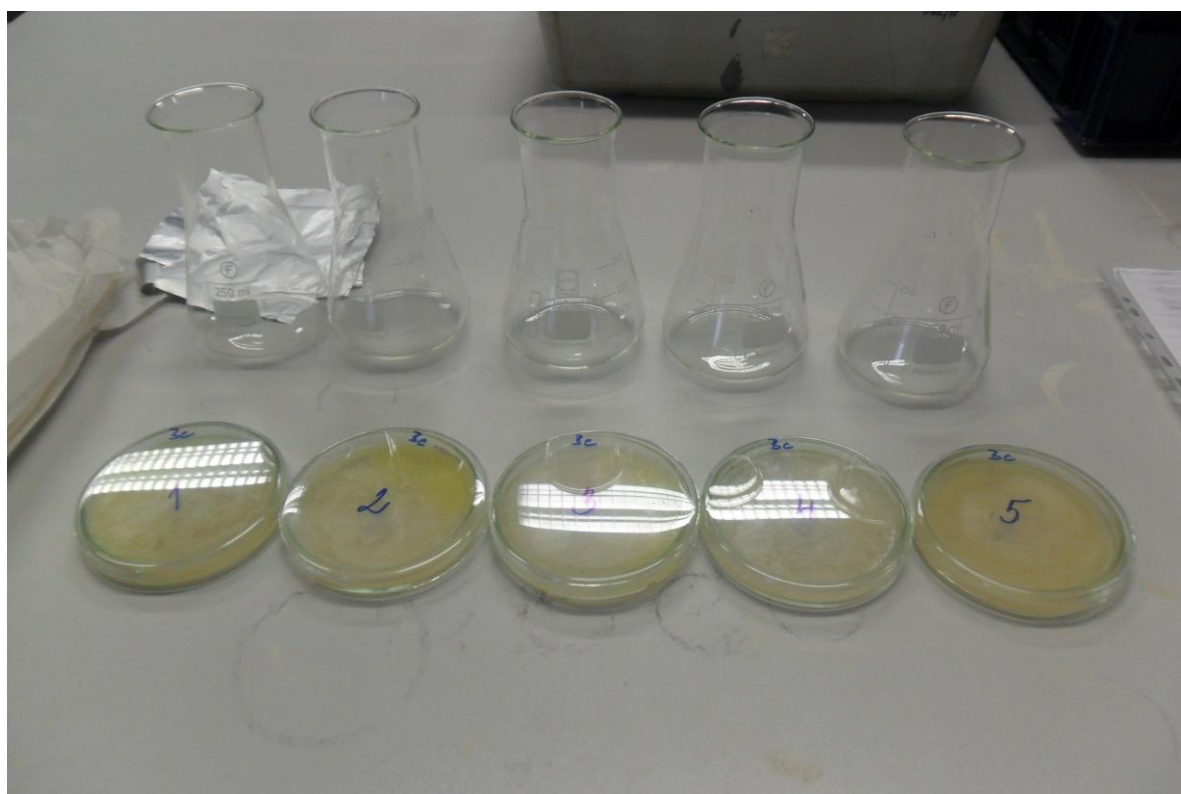
Vzorky po extrakci 1



Filtrace



Odpařování



Přenos vzorků na agar



Připravené vzorky na extrakci 2



Extrakce 2



Odpařování na vodní lázni