

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

***Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů***

**Katedra chemie**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Bezpečnost potravin kontaminovaných mykotoxiny  
Bakalářská práce**

**Miroslav Najman  
Výživa a potraviny**

**Ing. Zora Kotíková, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Bezpečnost potravin kontaminovaných mykotoxiny" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D., vedoucí své bakalářské práce, za cenné poznámky, všestrannou pomoc a poskytnutý čas s obdivuhodnou trpělivostí. Také bych chtěl poděkovat své rodině za veškerou podporu v průběhu studia.

# Bezpečnost potravin kontaminovaných mykotoxiny

## Souhrn

Plísně jsou přirozenou součástí ekosystému. Rozkládají biologický materiál, čímž uzavírají koloběh recyklace živin. Infikují ale také potraviny, jelikož jsou přirozeně nutričně bohatým substrátem. Zdravotní riziko pro spotřebitele způsobují především tvorbou sekundárních metabolitů - mykotoxinů. Nejvýznamnějšími plísněmi kontaminujícími potraviny z hlediska produkce mykotoxinů jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*.

*Aspergillus* tvoří mikromycety, které napadají potraviny spíše v posklizňovém období. Charakterizovány jsou jako skladištní plísně. Pro svůj růst vyžadují vyšší teplotu a vlhkost než naše klimatické podmínky nabízí. Zvýšené nebezpečí v tomto ohledu představují dovážené skořápkové plody, obiloviny, olejniny, koření a káva. *Penicillium* je široká skupina mikromycet kontaminující potraviny ve všech fázích výrobního procesu. Tvoří toxigenní plísně, které jsou hlavním kontaminantem ovoce a zeleniny. *Fusarium*, označované jako polní plíseň, infikují obiloviny již ve vegetačním období. To vede k poklesu výnosu, snížení technologické jakosti zrn a infikování osiva. Fusariové mykotoxiny jsou hygienicky nezávažnějšími v ČR. *Penicillium* i *Fusarium* nacházejí ideální podmínky pro svůj růst v mírném podnebí.

Mykotoxiny jsou velmi odolné proti faktorům vnějšího prostředí, což ztěžuje jejich detoxikaci. V organismu jsou převáděny na hydrofilní formu pro snadnější vyloučení z organismu. Vznikat mohou látky s vyšší toxicitou jako je 8,9-epoxyafatoxin. Zvýšené riziko představují také mykotoxiny kumulující se v těle jako OTA nebo PAT. Onemocnění spojená s mykotoxiny jsou nazývána mykotoxikózami a jejich projevy v organismu jsou variabilní. Nejběžnějšími zdravotními poruchami pro jednotlivé mykotoxiny jsou: AF-karcinogenita s hlavním cílovým orgánem játry; OTA-nefrotoxicita; PAT-hepatotoxicita; ZON-estrogenní a anabolické poruchy; FB1-inhibice metabolismu sfingolipidů; DON-morfologické změny GIT; T-2 toxin imunotoxicita. Akutní mykotoxikózy se v dnešní době vyskytují jen výjimečně a spíše v zemích Asie a Afriky. Větší obavy vzbuzují pozdní toxické účinky. Společným znakem všech mykotoxinů, kterým byla věnována pozornost v této práci, je imunotoxicita. Dalšími častými projevy jsou hepatotoxicita, nefrotoxicita a teratogenita.

Mykotoxikózám je možné předcházet omezením výskytu mykotoxinů v potravinách. Základní podstatou jsou preventivní opatření, která redukují růst toxigenních plísní a tím i syntézu samotných toxinů. Velký důraz je kladen na správnou agrikulturní praxi zamezující kontaminaci v předsklizňovém období. V posklizňovém období se uplatňuje úprava vnitřního prostředí ve skladovacích prostorách. Tato preventivní opatření ale nejsou stoprocentní a ke kontaminaci může i tak dojít ve všech fázích výrobního procesu od prvovýroby až ke konzumentovi. Proto je důležité mapovat výskyt mykotoxinů analytickými metodami. Pozitivní vzorky je nutné zlikvidovat nebo dekontaminovat. Při dekontaminaci jsou mykotoxiny zcela eliminovány, redukovány na méně škodlivé deriváty nebo zbaveny toxigenních vlastností. Dostupné dekontaminační techniky se rozdělují na metody fyzikální, chemické a biologické.

**Klíčová slova:** mykotoxin, mykotoxikózy, vláknité mikromycety, prevence, detoxikace

# Safety of foodstuffs contaminated with mycotoxins

## Summary

Moulds are a common part of the ecosystem. They decompose biological material, which completes the nutrient recycling circulation. Furthermore, they infect food, as they are a naturally nutrient-rich substrate. The health risk is posed to consumers mainly through the formation of secondary metabolites - mycotoxins. The most important food-contaminating fungi in terms of mycotoxin production are the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*.

*Aspergillus* forms micromycetes that infect food more likely in the post-harvest period. They are characterized as storage moulds. For their growth, they require higher temperature and humidity than our climatic conditions offer. Increased risk poses imported nuts, cereals, oilseeds, spices, and coffee. *Penicillium* is a large group of micromycetes contaminating food at all stages of the production process. They create toxigenic moulds, which are the main contaminant of fruit and vegetables. *Fusarium*, known as the field mould, infects cereals already in the growing season. This leads to a decrease in yield, a reduction in the technological quality of the grain, and infection of the seeds. *Fusarium* mycotoxins are the most hygienically important in our country. Both *Penicillium* and *Fusarium* find ideal conditions for their growth in the temperate zone.

Mycotoxins are very resistant to environmental factors, which makes them difficult to detoxify. In the body, they are converted to a hydrophilic form for easier elimination from the organism. It may produce substances with higher toxicity such as 8,9-epoxyaflatoxin. Increased health risk poses mycotoxins accumulating in the body such as OTA or PAT. Diseases associated with mycotoxins are called mycotoxicosis and their manifestations in the organism are variable. The most common health disorders caused by individual mycotoxins are: AF-carcinogenicity with the liver as the main target organ; OTA-nephrotoxicity; PAT-hepatotoxicity; ZON-estrogenic and anabolic disorders; FB1-inhibition of sphingolipid metabolism; DON-morphological changes of the GIT; T-2 toxin immunotoxicity. Acute mycotoxicosis are rare nowadays and they are more likely to occur in Asian and African countries. The late toxic effects are of greater concern. A common feature of all mycotoxins addressed in this thesis is immunotoxicity. Other frequent manifestations are hepatotoxicity, nephrotoxicity, and teratogenicity.

Mycotoxicosis can be prevented by limiting the presence of mycotoxins in food. Essential are preventive measures that reduce the growth of toxigenic fungi and thus the synthesis of the toxins themselves. Great emphasis is placed on pre-harvest period as good agricultural practice. In the post-harvest period, the indoor environment is treated in storage areas. However, these precautions are not fully effective and contamination can still occur at all stages of the production process from primary production to the consumer. Therefore, it is important to detect the occurrence of mycotoxins by analytical methods. Positive samples must be disposed of or decontaminated. During decontamination, mycotoxins are completely eliminated, reduced to less harmful derivatives, or exonerate of their toxigenic properties. Decontamination techniques are divided into physical, chemical, and biological methods.

**Keywords:** mycotoxin, mycotoxicosis, filamentous micromycetes, prevention, detoxication

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Mykotoxiny</b> .....	<b>11</b>
3.1.1	Aflatoxiny .....	12
3.1.2	Ochratoxiny.....	16
3.1.3	Patulin .....	19
3.1.4	Zearalenon .....	20
3.1.5	Fumonisy.....	23
3.1.6	Trichotheceny .....	25
3.1.6.1	T-2 Toxin.....	26
3.1.6.2	Deoxinivalenol.....	27
<b>3.2</b>	<b>Zdroje Mykotoxinů</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Mikroskopické vláknité houby .....	29
3.2.2	Rod <i>Aspergillus</i> .....	31
3.2.2.1	<i>Aspergillus flavus</i> .....	32
3.2.2.2	<i>Aspergillus parasiticus</i> .....	32
3.2.2.3	<i>Aspergillus ochraceus</i> .....	33
3.2.2.4	<i>Aspergillus clavatus</i> .....	33
3.2.3	Rod <i>Fusarium</i> .....	34
3.2.3.1	<i>Fusarium culmorum</i> .....	34
3.2.3.2	<i>Fusarium graminearum</i> .....	35
3.2.3.3	<i>Fusarium sporotrichoides</i> .....	36
3.2.3.4	<i>Fusarium poae</i> .....	36
3.2.4	Rod <i>Penicillium</i> .....	37
3.2.4.1	<i>Penicillium verrucosum</i> .....	37
3.2.4.2	<i>Penicillium expansum</i> .....	37
<b>3.3</b>	<b>Prevence vzniku mykotoxinů v potravinách</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Dekontaminace potravin zasažených mykotoxiny</b> .....	<b>40</b>
3.4.1	Fyzikální metody detoxikace.....	41
3.4.2	Chemické metody detoxikace.....	43
3.4.3	Biologické metody detoxikace .....	44
<b>3.5</b>	<b>Analytické metody stanovení</b> .....	<b>48</b>
3.5.1	Imunochemické metody .....	49

3.5.2	Chromatografické metody.....	50
<b>4</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Reference Obrázků.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>60</b>

# 1 Úvod

Bezpečnost potravin je velkým celosvětovým tématem. Významným rizikovým faktorem jsou v tomto ohledu mykotoxiny. Ty se považují za jedny z nejnebezpečnějších kontaminantů potravin a krmiv. Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity plísní (mikroskopických vláknitých hub, mikromycet). Patří mezi významné toxiny přírodního původu, ale významných škod dosahují v antropogenním prostředí. Produkovány jsou houbami z oddělení *Ascomycota*, do které se řadí rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Claviceps*. Ty jsou rozšířeny po celém světě jako součást půdní biocenózy. Díky enzymatickému vybavení navíc kontaminují prakticky jakýkoliv substrát a snižují nutriční hodnotu různých potravin. Tyto toxigenní mikroskopické vláknité houby mohou mnohdy produkovat více typů mykotoxinů. Se zdravotními problémy pramenícími z dietární expozice plísní se člověk setkává odnepaměti. Zejména pak od dob, kdy se začal žít pěstováním plodin a přebytky skladoval. Nejstarší popsanou mykotoxikózou je ergotismus. Způsobován byl námelovými alkaloidy paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*), které se z žitné mouky dostávaly do chleba a vyvolávaly halucinace (Velíšek & Hajšlová 2009).

Záměrem této práce je popsat přirozený výskyt hlavních druhů mikromycet a biologická rizika jejich hlavních sekundárních metabolitů. Objeveno bylo již na 400 různých druhů mykotoxinů, ale podrobnější vědecké studie směřují k těm, které stále vykazují zdravotní riziko pro člověka a zvířata. Takovými jsou třeba aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, T-2 toxin, zearalenon, deoxynivalenol, fumonisin B1, nivalenol a citrinin. Ze všech objevených mykotoxinů existuje pouze malé množství, jež ohrožuje zdraví člověka (Fang et al. 2019).

Produkce těchto mykotoxinů závisí na teplotě, vlhkosti, aktivitě vody, pH a koncentraci kyslíku. Organizace pro výživu a zemědělství spojených národů (FAO) k roku 2013 uvedla, že 25 % obilovin po celém světě je kontaminovaných mykotoxiny. Riziko v tomto ohledu způsobuje přibližně 20 mykotoxinů, které se mohou nacházet na potravinách v toxikologicky závažných koncentracích. Podle Streit et al. (2013) je úroveň zamoření mykotoxiny mnohem vyšší. Z této studie prováděné převážně na území Asie a Evropy vyplývá, že z 17316 vzorků krmiv a krmných surovin byl pozitivní nález alespoň jednoho mykotoxinu v 72 % případech. I když většina z nich odpovídala maximálním limitům nebo směrným hodnotám EU pro mykotoxiny v krmivech, představuje tato kontaminace kromě zdravotních rizik i velkou ekonomickou zátěž. Výskyt a toxické působení mykotoxinů na člověka nelze podceňovat. Objevovat se mohou ve všech úrovních potravního řetězce člověka. Způsobovány jsou akutní i chronické onemocnění. Akutní otravy mají pohotový dopad na organismus a mohou se projevit například zvracením. Kdežto chronická otrava charakteristická požíváním malých dávek po delší dobu vykazuje řadu závažných onemocnění včetně vzniku rakoviny. Mykotoxiny nejsou vždy stejně jedovaté pro všechny živočichy, jejich toxicita se mění během metabolismu v závislosti na velikosti a délce expozice, věku, výživě, zdravotním stavu a druhu intoxikovaného organismu. Intoxikace mykotoxiny nemusí být způsobena pouze přímou konzumací napadené potraviny, podle Bbosa et al. (2013) mohou mykotoxiny negativně působit na člověka také z ovzduší s teplým a vlhkým podnebím v blízkosti ohniska výskytu.

## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární rešerši zaměřenou na výskyt mykotoxinů v potravinách. Charakterizovat hlavní rody a druhy mikroskopických vláknitých hub a jejich nejznámější a toxikologicky nejdůležitější sekundární metabolity - mykotoxiny. Popsat biologické účinky mykotoxinů na člověka a zdravotní rizika spojená s konzumací potravin kontaminovaných mykotoxiny. Uvést faktory, které mohou ovlivňovat výskyt mykotoxinů v potravinách, metody prevence vzniku a možnosti jejich dekontaminace z potravin. Dále také popsat nejdůležitější analytické metody využívané k jejich stanovení. Na základě zpracovaných informací poté vyvodit preventivní opatření pro zamezení vzniku nebo snížení mykotoxinů v potravinách.

### 3 Literární rešerše

Literární rešerše je zpracována na téma bezpečnosti potravin zasažených mykotoxiny. V následujících kapitolách budou charakterizovány hlavní rody a druhy mikroskopických vláknitých hub a jejich nejznámější a toxikologicky nejdůležitější sekundární metabolity - mykotoxiny. Následně budou popsány biologické účinky mykotoxinů na člověka a zdravotní rizika spojená s konzumací potravin kontaminovaných mykotoxiny. Nebudou opomenuty ani faktory, které mohou ovlivňovat výskyt mykotoxinů v potravinách, metody prevence vzniku a možnosti jejich dekontaminace z potravin. Dále budou v práci popsány analytické metody využívané k jejich stanovení. V závěru práce budou na základě zpracovaných informací vyvozeny preventivní opatření pro zamezení vzniku nebo snížení obsahu mykotoxinů v potravinách.

#### 3.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou produkty sekundárního metabolismu toxigenních plísní. Jsou to významné toxiny přírodního původu (Bretina V 1990). Identifikováno a částečně charakterizováno bylo již více než 400 mykotoxinů, ale pouze okolo 20 z nich se mohou vyskytnout v potravinách nebo v krmivech v toxikologicky závažných koncentracích (Velíšek & Hajšlová 2009). Mykotoxiny jsou stabilní molekuly s nízkou molekulární hmotností, ale velikou chemickou rozmanitostí. Což vede k rozdílným biologickým účinkům pro jejich konzumenty. Mykotoxiny vzbuzují řadu obav z důvodu jejich rozšíření a nepříznivým účinkům na zdraví člověka a zvířat. Ty se projevují jako akutní otrava ihned po požití nebo jako otrava chronická v delším časovém horizontu při opakovaném příjmu menších dávek. (Bennet & Klich 2003). Vymýcení mykotoxinů ze zemědělských produktů je složitý proces. Požití mykotoxinů může vyvolat chronické otravy jako různé imunitní a neurologické poruchy, poškození jater, ledvin nebo rakovinné bujení. Jejich účinky mohou být dále cytotoxické, genotoxické nebo teratogenní. K akutním příznakům patří nevolnost, zvracení, bolesti břicha, průjem, bolest hlavy, závratě nebo horečka. Míru toxicity jedovatých látek charakterizuje střední letální dávka (LD50), která udává, jaké množství toxinu usmrtí polovinu určité populace. Vysoká toxicita a celosvětové rozšíření mykotoxinů dalo vzniknout organizacím kontrolujícím možné kontaminace potravin, jako jsou JECFA (the Joint Expert Committee on Food Additives), SCF (Commission's Scientific Committee for Food) a společný výbor odborníků WHO a FAO (Yang et al. 2020). IARC (International Agency for Research on Cancer) rozděluje rizikové látky do pěti skupin v závislosti na důkazech o jejich karcinogenitě pro člověka. Jsou to skupiny: 1) karcinogenní pro člověka, 2A) pravděpodobně karcinogenní pro člověka, 2B) možná karcinogenní pro člověka, 3) karcinogenita pro člověka nelze posoudit, 4) pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka. Mykotoxiny nejsou stejně toxické pro všechny živočichy. S různými metabolickými pochody se může mírnit toxický efekt mykotoxinů nebo naopak mohou vznikat i škodlivější deriváty. Citlivost organismu závisí na věku, výživě, synergickém působení ostatních chemických látek a dalších faktorech (Cimbalo et al. 2020).

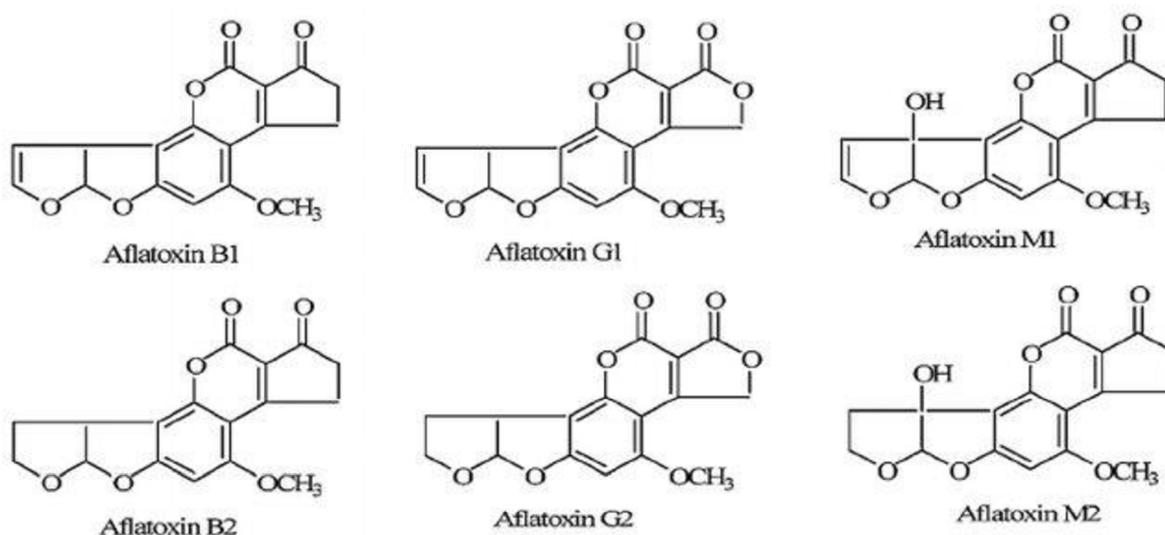
V ČR je obsah mykotoxinů v potravinách stejně jako dalších toxických látek kontrolován Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI) a Státní veterinární správou. Informace o zvýšeném výskytu mykotoxinů jsou oznámeny v Evropském společenství systémem rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Tento systém se využívá k identifikaci rizikových potravin v celé EU. To znamená, že ČR je přes národní kontaktní místo SZPI zpětně informována o kontrolních zjištěních z ostatních států EU (Fialka 2021).

### 3.1.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny (AF) jsou rozšířeny především v subtropických a tropických oblastech, v našich podmínkách je jejich četnost nižší (Suchý & Herzig 2005). Produkovány jsou několika druhy plísní. Hlavními producenty jsou plísně z rodu *Aspergillus*. Nejvíce aflatoxinů tvoří mikromycety *A. flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius*. Klíčovým ohniskem výskytu aflatoxinů jsou arašíd, kukuřice, rýže, obilí, ovoce, vejce a mléko (Luo et al. 2020). Maximální množství aflatoxinů v potravinách stanovené nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 je uvedené v tabulce 1. Chemická stavba aflatoxinů je odvozená od difuranokumarinového skeletu. Mají přes dvacet různých derivátů. Dva základní deriváty jsou aflatoxin B a aflatoxin G. Rozlišují se podle vyzářující barvy pod UV světlem. Aflatoxiny B fluoreskují modře, zatímco aflatoxiny G fluoreskují zeleně. Výše zmíněné aflatoxiny B a G je možné dále dělit podle nasycení terminálního furanu na aflatoxin B1, B2, G1 a G2. Fyzikální a chemické vlastnosti základních derivátů aflatoxinů s jejich významnými metabolity AFM1 a AFM2 jsou popsány níže:

- **Aflatoxin B1** se v potravinách a krmivech vyskytuje nejčastěji ze všech aflatoxinů. Je jedním z nejsilnějších přirozených karcinogenů a biologicky nejvýznamnější aflatoxin (Malíř & Ostrý 2012). Sumární vzorec AFB1 je C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (chemická struktura na obrázku 1). Je to pevná látka, která se jeví jako bílý prášek nebo nažloutlé krystaly. Může se tvořit vazba na prachové částice pomocí elektrostatického náboje krystalů a představovat inhalační nebezpečí. Ve vodě je málo rozpustný (16,14 mg/l), ale při současném UV záření může být rozpuštěn. Tání při teplotě 268 °C je doprovázeno špinavým kouřem. Střední letální dávka (LD50) pro potkany je při ústním podání 5 mg/kg tělesné váhy (Hrdina et al. 2004). U kachen je LD50 rovno 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti (Malíř & Ostrý 2012). Z masové otravy plesnivou kukuřicí v Indii v roce 1974 bylo stanoveno LD50 pro člověka, která se pohybuje v rozmezí 0,35-0,5 mg/kg. Akutní toxicitou AFB1 zemřelo zhruba sto lidí z tisíce (Velíšek & Hajšlová 2009).
- **Aflatoxin B2** má sumární vzorec C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> a může být také nazýván jako 8,9-dihydroaflatoxin B1 (chemická struktura na obrázku 1). Liší se od AFB1 nasycením dvojnásobné vazby v pozici 2, 3 terminálního furanu. Tím je zvýšena rozpustnost ve vodě, která je pořád velmi nízká (24,9 mg/l). Tvořen je bílými krystalickými jehlicemi, které tají při teplotě 310 °C. Pokračováním v zahřívání až do rozložení AFB2 se uvolní špinavý kouř a výpary. Orální dávka 1,7 mg/kg živé váhy je smrtelná pro polovinu jedinců populace kachen (LD50) (Hrdina et al. 2004).

- **Aflatoxin G1** má sumární vzorec C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> (chemická struktura na obrázku 1). Vyskytuje se ve formě krystalických bezbarvých jehlic. Je méně odolný vysokým teplotám než AFB. Taje při 258 °C. LD50 perorálního příjmu pro kachny je 0,79 mg/kg (Hrdina et al. 2004).
- **Aflatoxin G2** má sumární vzorec C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> (chemická struktura na obrázku 1). Je tvořen bezbarvými krystalickými jehlicemi, které tají při 237-240 °C. LD50 orálního příjmu pro kachny činí 2,45 mg/kg tělesné hmotnosti (Hrdina et al. 2004).
- **Aflatoxin M1** má sumární vzorec C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (chemická struktura na obrázku 1). Vzniká hydroxylací při detoxikačních procesech v játrech savců. Charakterizován je také jako 4-hydroxyaflatoxin B1. Jeho teplota tání je stanovena na 299 °C. Tvoří bezbarvé pravoúhlé destičky s modrou fluorescencí na UV světle (Hrdina et al. 2004).



Obrázek 1 Chemická struktura aflatoxinů (Zhang al. 2014).

Aflatoxiny jsou akutně toxické, imunosupresivní, teratogenní, mutagenní a karcinogenní. Podle toxicity a genotoxicity se dají základní aflatoxiny srovnat od nejvíce nebezpečných AFB<sub>1</sub>>AFG<sub>1</sub>>AFB<sub>2</sub>>AFG<sub>2</sub>. Z této posloupnosti je možné vyvodit, že deriváty s nenasyceným terminálním furanovým kruhem vykazují více toxickou biologickou aktivitu. Kromě základních aflatoxinů byly později objeveny i deriváty dalších řad. Příkladem jsou deriváty aflatoxiny D1 a D2. Ty vznikají při detoxikaci aflatoxinu B1 a B2 působením amoniaku (Bretina 1990). Aflatoxiny M<sub>1</sub> a M<sub>2</sub> byly poprvé identifikovány v kravském mléce. Jedná se o metabolity aflatoxinů B1 a B2 hydroxylované jaterním mikrozomálním cytochromem P450 (Haque et al. 2020). U dojnic se přes krevní řečiště dostávají do mléka, kde jsou vázány na bílkoviny. Z aflatoxiny kontaminovaného krmiva dojnic se dostává do mléka 0,3-6,2 % koncentrace v podobě hydroxylovaného toxinu. Podle nařízení Komise (ES) č. 1831/2003 je současné přípustné množství v mléce maximálně 0,05 µg/l (Tabulka 1). Od posledního příjmu aflatoxinů z krmiva se koncentrace AFM1 v mléce postupně snižuje 4 až 5 dní, než úplně vymizí. Z mléka se hydroxylované toxiny vázané na kasein dostávají i do sýrů, kde bývají v 3-5× vyšší koncentraci. AFM1 je desetkrát méně karcinogenní než AFB1. AFM2 je také méně karcinogenní a až o 97 % méně mutagenní než AFB1 (Kalhotka 2014).

Při dietárním příjmu jsou aflatoxiny velmi dobře vstřebávány. Krví se dostávají do jater, kde jsou primárně metabolizovány. Metabolické procesy v játrech jsou charakterizovány pěti detoxifikačními reakcemi. Jsou to redukce, hydroxylace, hydratace, O-demetylace a epoxidace. Výsledkem všech těchto metabolických přeměn je tvorba hydroxylové kyseliny, což umožňuje následnou konjugaci. Jako ostatní nepolární xenobiotika jsou i aflatoxiny redukovány v játrech cytosolickými enzymy a mikrozomálními oxidázami. Vzniklé deriváty jsou zpravidla dále detoxikovány konjugací s kyselinou sírovou nebo kyselinou glukuronovou. Většina konjugátů přechází do žlučových kyselin, které jsou vyloučeny stolicí. Ze zbylých konjugátů putuje část do ledvin, kde jsou vylučovány močí. (Hrdina et al. 2004). Během 90 minut je z organismu odstraněno 65 % přijatého AFB1. Problém nastává, pokud se aflatoxin nebo jeho deriváty zdržují v těle například při procesu epoxidace. Snaha organismu o detoxikaci AFB1 mikrozomálními cytochrom P-450 dependentními oxidázami vytvoří na terminálním furanu cyklický éter se třemi atomy v kruhu v poloze 2, 3. Vzniká reaktivnější derivát AFB1-8,9-epoxid, který se váže na bílkoviny, buněčné makromolekuly, RNA a DNA. Tato vazba na nukleové kyseliny propůjčuje AFB1 jeho mutagenní a karcinogenní vlastnosti. S DNA vytváří stabilní adukty vazbou v pozici N7-guaninu. AFB1-epoxid je odbouráván z nukleových kyselin tvorbou glutathionového konjugátu. Tento proces je zdlouhavý, od posledního příjmu aflatoxinu trvá i několik týdnů (Malíř & Ostrý 2012).

Aflatoxikózy jsou soubor všech akutních i chronických onemocnění způsobených aflatoxiny u lidí a zvířat. Akutní aflatoxikózy zapříčiněné příjmem většího množství aflatoxinů mají u člověka za následek vnitřní krvácení, akutní selhání jater, změny v trávení a metabolismu živin a případně smrt. Intoxikace aflatoxiny se podílí na akutní hepatitidě v zemích třetího světa, jako jsou Keňa, Uganda, Indie a další (Razzaghi-Abyaneh 2013). Při infekčním onemocnění hepatitidy B mají AF synergické účinky (Velíšek & Hajšlová 2009). V evropských podmínkách je riziko akutní toxicity minimální, větší riziko představují chronické následky otrav jako je karcinogeneze. Příčinou vzniku nádorů mohou být nízké koncentrace aflatoxinů v potravinách. I 1 ng/kg tělesné hmotnosti denně může mít pro organismus destruktivní účinky. Aflatoxikózy se projevují pocitem neklidu, úbytkem hmotnosti, nebo anorexií (Malíř & Ostrý 2012). Suchý a Herzig (2005) uvádí, že dalšími příznaky jsou nažloutlé bělmo očí a žaludeční křeče. Indikátorem, že se jedná právě o otravu aflatoxiny, je vzestup sérové alkalické fosfatázy. Závažnějšími chronickými aflatoxikózami jsou navození primárního hepatocelulárního karcinomu, Reyův syndrom (encefalopatie a tuková degenerace jater), rakovina jater, stagnace růstu dětí a potlačení imunity. Haque et al. (2020) uvádí, že aflatoxiny jsou původcem 4,6-28,2 % celosvětového výskytu hepatocelulárního karcinomu, třetího nejčastějšího karcinomu vedoucího ke smrti. Vzniká bodovou mutací kodonu 249 tumor supresorového genu p53 vlivem metabolitu AFB1-8,9-epoxidu. To způsobuje transverzi guaninu. Purinová báze guanin je substituována za pyrimidinovou bázi thymin (Lafaro et al. 2015). Vysokým zatížením jater při detoxikaci je také narušen metabolismus lipidů v játrech s poklesem obsahu vitamínu A. Negativní dopad může být posílen podvýživou, alkoholismem, vitaminovou deficiencí nebo infekčním onemocněním (Malíř & Ostrý 2012). Zmíněné potlačení imunity je dáno poklesem počtu T-lymfocytů a snížením fagocytární aktivity

monocytů hrající roli při nespecifické imunitě organismu. To je způsobeno také reaktivními AFB-8,9-epoxydy. Počty bílých krvinek jsou následně redukovány z krevní plazmy vlivem oxidativního poškození. Zaznamenán byl pokles lymfocytů v brzlíku i kostní dřeni (Razzaghi-Abyaneh 2013). Na myších bylo prezentováno, že kromě poklesu lymfocytů a jejich podmnožin IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-17 a IFN- $\gamma$  v krevní plazmě byla také inhibována jejich syntéza ve slezině. Aflatoxiny potlačují přirozenou obranyschopnost organismu, který se tak stává náchylný vůči různým bakteriálním infekcím nebo virovým onemocněním (Cimbalo et al. 2020).

Ze zvířat je nejcitlivější vůči aflatoxinům drůbež s naměřenými LD 50 = 0,3-0,6 mg/kg tělesné hmotnosti. Dalšími citlivými zvířaty jsou prasata a koně. Nejodolnější jsou přežvýkavci, ze kterých jsou nejvíce rezistentní především ovce. Ze všech zvířat jsou ohroženi především mladší jedinci. U dospělých populací jsou samci vnímavější vůči aflatoxinům než samice. Akutním projevem aflatoxikózy může být anorexie, anemie a krvácení nebo úhyn zvířete bez vedlejších příznaků. Tyto projevy jsou méně časté. Větší riziko způsobují chronické toxikózy, jakými jsou cirhóza jater, snížení obranyschopnosti vůči infekčním onemocněním, proliferace žlučových a pokles užitkovosti (Suchý & Herzig 2005). U krav klesá produkce mléka, a u nosnic je snížena produkce vajec. Společným znakem je ztráta hmotnosti, ztučnění jater, dysfunkce ledvin a náchylnost k infekcím. Selhání jater a neschopnost odbourávat amoniak vznikající z metabolismu bílkovin vede k hyperamonemii. Vysoké hladiny amoniaku se projeví v celém těle. V mozku mohou vést ke zvýšení syntézy neurotransmiteru glutamátu, což vede k jeho nadbytku a následnému toxickému působení. Stává se cytotoxický a vyvolává poškození mozku (Razzaghi-Abyaneh 2013).

*Tabulka 1: Maximální limity AF v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 doplněné nařízením Komise (EU) č. 165/2010 a (EU) č. 1058/2012 (EVROPSKÁ KOMISE 2012).*

Potraviny:	AFB1	Suma AF	AFM1
	Maximální hodnoty v $\mu\text{g}/\text{kg}$		
Arašídny a ostatní olejnatá semena*	8,0	15,0	
Pistácie, mandle a meruňková jádra*	12,0	15,0	
Lískové ořechy a para ořechy*	8,0	15,0	
Ostatní skořápkové plody*	5,0	10,0	
Arašídny a ostatní olejnatá semena**	2,0	4,0	
Pistácie, mandle a meruňková jádra**	8,0	10,0	
Lískové ořechy a para ořechy**	8,0	10,0	
Ostatní skořápkové plody**	2,0	4,0	
Sušené ovoce (kromě fíků)*	5,0	10,0	
Sušené ovoce (kromě fíků)**	2,0	4,0	
Sušené fíky	6,0	10,0	
Obiloviny a výrobky z obilovin	2,0	4,0	
Kukuřice a rýže*	5,0	10,0	
Mléko (syrové i tepelně ošetřené)			0,050
Koření (chilli, pepř, muškátový oříšek, zázvor, kurkuma)	5,0	10,0	
Obilné příkrmy, dětská a kojenecká výživa	0,10		

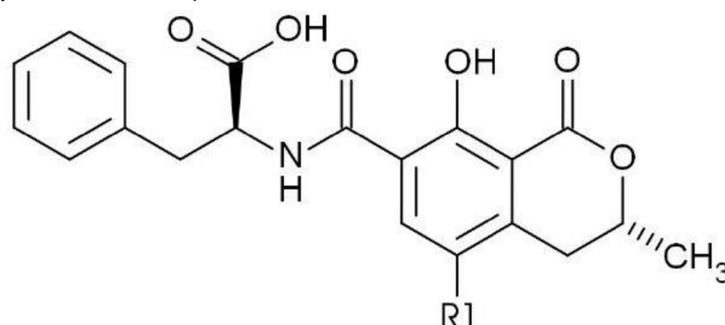
Potraviny:	AFB1	Suma AF	AFM1
	Maximální hodnoty v µg/kg		
Počáteční a pokračovací kojenecká výživa			0,025
Potraviny pro zvláštní lékařské účely určené pro kojence	0,10		0,025

\*které má být dále tříděné nebo fyzikálně upravované jiným způsobem než sušením

\*\*určené k přímé spotřebě

### 3.1.2 Ochratoxiny

Ochratoxin (OT) je jeden z nejběžněji se vyskytujících mykotoxinů. Příkladem jeho časté expozice může být studie Filali et al. (2002), kde 60 % vzorků od 309 Marockých dobrovolníků vykazovalo pozitivní nález. Dobrovolníci netrpěli žádnými zdravotními obtížemi, ale jejich průměrná koncentrace OTA v krevní plasmě činila 0,29 ng/ml. Ochratoxin je produkován plísněmi *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* a *Penicillium verrucosum*. V oblastech s chladnějším klima je OT tvořen plísněmi rodu *Penicillium*, kdežto v teplejších oblastech dominuje produkce plísněmi rodu *Aspergillus* (Malíř et al. 2002). Ochratoxin je syntetizován ve třech formách (A, B, C). Tyto formy se mohou tvořit současně na jedné plísní nebo zvlášť. Nejběžnější forma je ochratoxin A. Jedná se o izokumarovou část připojenou peptidickou vazbou k fenylalaninu. Systematický název této sloučeniny je L-fenylalanin-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-(R)-isokumarin (obrázek 2) (Velíšek & Hajšlová 2009). Ochratoxin B se liší od OTA pouze záměnou atomu vodíku za původní atom chloru. Ochratoxin C je etyl esterový derivát OTA. Toxický potenciál těchto derivátů je výrazně nižší než OTA. OTA je vysoce stabilní bílý krystalický prášek odolný proti vysokým teplotám a kyselinám. Proto je obtížné jej zcela odstranit z kontaminovaných potravin. Svoji stabilitu ztrácí na světle a na fluorescenčním světle je degradován. OTA v xylenu taje při teplotě 169 °C, v benzenu je jeho teplota tání nižší a to 95 °C. Na UV světle má v alkalickém prostředí modré fluorescenční zbarvení a v prostředí kyselém má fluorescenční zbarvení zelené. Jako slabá organická kyselina je středně rozpustný v organických rozpouštědlech. Ve vodě je málo rozpustný (0.4246 mg/l při 25 °C). Molární hmotnost OTA je 403.8 g/mol (Khoury & Atoui 2010).



Obrázek 2: Chemická struktura OTA (R1=Cl), OTB (R1=H) (Heussner et. Al. 2010).

Hlavní expozice OTA pro člověka je prostřednictvím dietárního příjmu, ale již byla prokázána i expozice inhalační (Malíř et al. 2002). K přímému vystavení ochratoxinu A dochází především z ječmene, pšenice, ova, žita, rozinek, sušeného ovoce, koření, vína, piva, čaje

a kávy. Na rozdíl od ostatních mykotoxinů je významnějším zdrojem intoxikací také příjem OTA z živočišných produktů. K té potom dochází z kontaminovaného masa, krve, mléka nebo vnitřností (Haque et al. 2020, Malíř et al. 2002). IARC (1993) uvádí, že významným zdrojem OTA může být vepřové maso a výrobky z něj. OTA byl nalezen v krvi chovných prasat s vysokou frekvencí. V Evropě se týdenní příjem tohoto toxinu pohybuje v rozmezí 15-60 ng/kg tělesné hmotnosti u dospělého konzumenta (Velíšek & Hajšlová 2009). Tato hodnota nepřevyšuje tolerovanou týdenní dávku, která je podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 stanovena na 120 ng/kg tělesné hmotnosti. Zvýšené riziko expozice OTA nad přípustné hodnoty platí i u dětí kojených mateřským mlékem před návykem na pevnou stravu, vzhledem k zvýšené bioakumulaci v těle matky (Degen et al. 2017). Maximální přípustné limity OTA v potravinách zobrazuje tabulka 2.

U člověka byl nalezen OTA v moči nejprve během organizované studie v Bulharsku. Byl zde zjištěn vyšší výskyt tohoto mykotoxinu v potravinách, které byly konzumovány osobami postiženými onemocněním ledvin (nefropatií) nebo nádory močových cest. U nemocných byl OTA také zjištěn ve vyšší koncentraci v krvi a v moči než u kontrolní skupiny, což poukazovalo na možnou korelaci mezi příjmem OTA a Balkánskou endemickou nefropatií (Castegnaro et al. 1991). Zvýšenou kumulaci OTA lze také předpokládat v ledvinách u skupin trpících touto nemocí, což by znamenalo zrychlení postupu stávající nefropatie (Malíř 2002). Balkánská endemická nefropatie je zprvu charakteristická modifikací buněk epitelu bez změny velikosti orgánu. Až po chronické expozici OTA dochází ke zmenšení ledvin. V konečném stádiu vede k poškození funkce ledvin, kdy nemocný má zvýšený výdej tekutin močí (přes 2,5 l), červený jazyk, žízeň a hořkou chuť (Plestina et al. 1991). Minoritním příznakem byly také nádory v močových cestách a ledvinách. U některých případů bylo rozpoznáno, že se jedná o rakovinné nádory. Nacházely se v renální pánvi ledvin. Vznik nádorů nebyl dostatečně prozkoumán (IARC 1993).

Po konzumaci je OTA až z 95 % vázán na plazmatické bílkoviny a v játrech je metabolizován na hydroxylované deriváty. V krvi je vázán velmi silně a to především na albumin. Byla také potvrzena vazba na makromolekulu neznámé struktury o relativní molekulové hmotnosti 20 000. Afinita této makromolekuly na OTA je sto šestkrát vyšší než u sérového albuminu. Vazba na plazmatické bílkoviny hraje významnou roli v organismu a podílí se na toxicitě OTA (Malíř et al. 2002). OTA účinkuje jako kumulativní jed. Rychle se absorbuje a pomalu vylučuje. Maximální koncentrace v krevní plasmě se objevuje 2-4 h po podání. Pravděpodobný poločas exkrece činí u člověka 35 dní. Jedna z příčin dlouhého působení je vstup do enterohepatálního cyklu a jeho následná častá reabsorpce. V organismu je distribuován krví hlavně do ledvin, jater, varlat, střev, svalů a tukové tkáně. Zde je také zadržován (Malíř et al. 2016). Malíř et al. (2002) uvádí, že u člověka probíhá detoxikace OTA v játrech přeměnou na glukuronové a sulfátové konjugáty, které konjugují s glutathionem. Ty mohou pak vést ke tvorbě elektrofilních sloučenin, které jsou genotoxické. Z těla je následně vylučován močí jako 4-hydroxyochratoxin A. Zde byl odhalen metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, která navíc umožňuje kvalitativní

stanovení tohoto metabolitu. 4-hydroxyochratoxin A se podobně jako OTA vyznačuje svými cytotoxickými a imunopresivními vlastnostmi (Malíř et al. 2002).

Ochratoxin A je nefrotoxický, neurotoxický, mutagenní, imunotoxický, karcinogenní a teratogenní (Khoury & Atoui 2010). Podle Luo et al. (2018) je OTA pro člověka a zvířata také genotoxický a hepatotoxický. Zvyšuje riziko výskytu novotvarů a může být zodpovědný za nádory močových cest. Spojován je s nádorovým onemocněním ledvin a varlat, ale mechanismus vzniku rakoviny zatím není dostatečně objasněn. Mezinárodním úřadem pro výzkum rakoviny byl OTA zařazen jako pravděpodobný karcinogen pro člověka do skupiny 2B. OTA je inhibítozem metabolismu vápníku. Brání toku vápníku přes buněčné membrány. Podle Malíře a Ostrého (2007) je OTA také inhibítozem celé řady dalších procesů jako mitochondriální respirace, tvorby ATP a proteosyntézy. K zastavení tvorby proteinů dochází při záměně fenylalaninové části OTA za esenciální aminokyselinu fenylalanin na t-RNA, což brání k navázání další aminokyseliny do peptidického řetězce a tím zastavení proteosyntézy. Inhibice proteosyntézy nastává u eukaryotických, prokaryotických i bezbuněčných systémů. Dále zvyšuje peroxidaci lipidů a poškozuje metabolismus cukrů. OTA má také vliv na rovnováhu biologicky aktivních látek v mozku. Při studii mozku myši byl zaznamenán pokles dopaminu a vzrůst adrenalinu, noradrenalinu a serotoninu. Z toho bylo vyvozeno depresivní působení mykotoxinu na centrální nervový systém (Betina 1990).

K nejčastějším incidencím spojeným s otravami OTA patří nefropatie prasat a drůbeže (Malíř et al. 2016). Drůbež a prasata jsou společně se psy také nejcitlivější zvířata na tento mykotoxin. Odolnější jsou přežvýkavci, kteří detoxikují zkonsumovaný OTA bachorovou mikroflórou. Hydrolýzou peptidické vazby je OTA štěpen na L-fenylalanin a ochratoxin  $\alpha$  (chlorovaný dihydroizokumarinový základ).  $OT\alpha$  není toxický, ale může mít genotoxické účinky při vyšších koncentracích. Z organismu je exkretován močí nebo mlékem. Do mléka se nakonec dostává 0,026 % přijaté dávky OTA, což nezpůsobuje velké riziko pro člověka (Suchý & Herzig 2005). Za určitých podmínek je OTA silně imunotoxický pro některá zvířata. Způsobovány jsou nekrózy lymfatických tkání a poškození látkové i buněčné imunity. Patrné jsou regrese brzlíku, redukce počtu lymfocytů a potlačení imunitní odpovědi (Khoury & Atoui 2010). Imunosuprese byla také potvrzena studií na kuřatech při dávce 1-2 mg/kg tělesné hmotnosti degenerací lymfoidních orgánů. Rovněž bylo zjištěno, že tomuto negativnímu dopadu otravy je možné zabránit přidáním L-karnitinu a vitamínu E (Cimbalo et al. 2020).

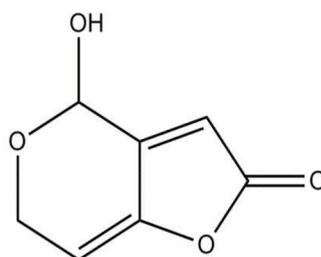
*Tabulka 2: Maximální limity OTA v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 doplněné nařízením Komise (EU) č. 105/2010, (ES) č. 594/2012 a (EU) č. 2015/1137. (EVROPSKÁ KOMISE 2015).*

Potraviny:	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Nezpracované obiloviny	5,0
Výrobky z obilovin určené k přímé spotřebě	3,0
Pšeničný lepek pro další zpracování	8,0
Sušené ovoce vinné révy (rybíz, rozinky a sultánky)	10
Pražená kávová zrna celá a mletá	5,0
Rozpustná káva	10,0

Potraviny:	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Víno (včetně ovocného a šumivého) a vinné nápoje do 15 % alk.	2,0
Šťáva, nektar a mošt z hroznů*	2,0
Koření (pepř, muškátový oříšek, zázvor, kurkuma)	15
Koření (chilli)	20
Kořen lékořice	20
Extrakt z lékořice	80
Obilné příkrmy, dětská a kojenecká výživa	0,5
Potraviny pro zvláštní lékařské účely určené pro kojence	0,5

### 3.1.3 Patulin

Hlavním producentem patulinu (PAT) jsou mikromycety rodu *Penicillium expansum*. Napadá především jablka, hrušky a produkty z nich vyráběné. Podle Luo et al. (2018) se PAT celosvětově vyskytuje asi v 50 % výrobků z jablek ve vyšších koncentracích zejména u těch, kde jsou využívána k jejich výrobě jablka ve vysoké zralosti, přezrálá nebo poškozená. Velíšek a Hajšlová (2009) uvádí, že PAT je indikátorem špatných výrobních postupů v ovocných nápojích. V EU je horní hranice patulinu v jablečných a ovocných šťávách stanovena na 50  $\mu\text{g}/\text{l}/\text{kg}$ . Dalšími producenty PAT jsou *Penicillium patulinum*, *Byssosclamyces nivea* a *Aspergillus clavus*. Tyto mikromycety se vyskytují na ovoci, zelenině a obilí. Nepřímou kontaminací se může objevit i v mase, především drůbežím, a sýrech, kam se dostává zkrmováním obilovin zasažených *A. Clavus* (Hrdina et al. 2004). Dalším významným zdrojem sekundární kontaminace jsou siláže (Velíšek & Hajšlová 2009). Maximální limity PAT v potravinách stanovuje nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (Tabulka 3). Expozice těmito potravinami by neměla přesáhnout toleranční denní příjem (TDI) mykotoxinu. Pro PAT doporučuje světová zdravotnická organizace TDI = 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tělesné hmotnosti (Degen et al. 2017).



Obrázek 3: Patulin (Loi et al. 2017).

Patulin je nenasycený lakton, jeho systematický název je 4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-on (obrázek 3). PAT má antibiotické vlastnosti, proto byl v minulosti studován jako možné antibiotikum proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Zároveň je PAT také mutagenní a karcinogenní, takže jeho možné využití jako antibiotikum bylo posléze zamítnuto. PAT je pevná, bílá krystalická látka bez zápachu. Taje při 111 °C, ale podle Suchého a Herziga (2005) se teplota tání zvyšuje přidáním vitamínu C. V jeho důsledku je PAT tepelně stabilizován proti sterilizaci. Relativní molekulová hmotnost patulinu je 154. Je rozpustný ve vodě a běžných organických rozpouštědlech, jako jsou etanol, aceton a chloroform. V kyselém

prostředí je relativně stabilní, ale v zásaditém prostředí svoji stabilitu ztrácí. Reaguje s thiolovou skupinou (-SH) u cysteinu a dalších sloučenin (Betina 1990, Hrdina et al. 2004).

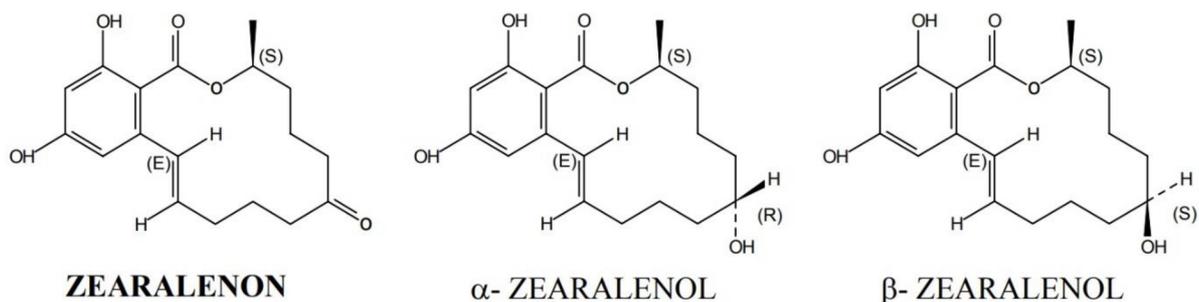
Patulin selektivně poškozuje DNA a vyvolává zlomy v molekulách DNA u lidských i zvířecích buněčných kultur. Patulin také inhibuje syntézu RNA. V iniciačním stádiu transkripce blokuje aktivitu RNA-polymerázy. Zásah do proteosyntézy je prováděn přímým blokováním enzymové frakce (Betina 1990). Inhibuje rovněž funkci enzymu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy. To je způsobeno buď přímo narušením K<sup>+</sup> vazby nebo nepřímo změnou prostorového uspořádání atomů v molekule enzymu (Hrdina et al. 2004). Podle IARC PAT není karcinogenní a řadí se do skupiny 3, tedy skupiny látek, o kterých není dostatečně dat pro jejich klasifikaci. Perorální střední letální dávka je pro myši a krysy 20-100 mg/kg tělesné váhy. Skutečná koncentrace PAT, kterému se živočichové mohou vystavit je ale mnohem menší. Akutní toxicita perorální expozicí PAT dávkou 1 mg/kg tělesné váhy způsobuje myším nevolnost, zvracení, žaludeční vředy, střevní krvácení, lézi žaludku a střev doprovázené poškozením ledvin. Patulin se kumuluje v erythrocytech a orgánech bohatých na krev, jako jsou slezina, ledviny, plíce a játra (Pal et al. 2017). Poškození jater, ledvin, střevních tkání a imunitního systému způsobuje zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku a oxidativním stresem. Patulin je také genotoxický a teratogenní (Cimbalo et al. 2020). Suchý a Herzig (2005) uvádí, že PAT také poškozuje respirační aparát a centrální nervovou soustavu. Intoxikace jsou nejčastěji vyvolávány u drůbeže. Otrava se projevuje paralýzou, ztrátou koordinace a degenerací neuronů mozkové kůry.

Tabulka 3: Maximální limity PAT v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (EVROPSKÁ KOMISE 2006).

Potraviny:	PAT (µg/kg)
Ovocné šťávy a nektary	50
Lihoviny, jablečný mošt a jiné jablečné kvašené nápoje	50
Pevné jablečné výrobky	25
Jablečná šťáva a pevné jablečné výrobky pro kojence a malé děti	10,0
Dětská a kojenecká výživa jiná než obilná	10,0

### 3.1.4 Zearalenon

Zearalenon (ZON) je běžně se vyskytující mykotoxin produkováný houbami rodu *Fusarium*. Jsou to *Fusarium graminearum*, *Fusarium colmorum*, *Fusarium cerealis* a *Fusarium equiseti*. Podle Baliukoniene et al. (2003) se nachází v 90 % vzorků obilovin odebraných ze zemí střední Evropy. Z obilovin napadá především kukuřici, ale také pšenici, ječmen, oves a někdy i koření. Jelikož je ZON relativně stabilní sloučenina přechází i do obilných produktů, jakou jsou chleba, slad, pivo a vzhledem k lipofilnímu charakteru se dostává i do rostlinných olejů, zejména klíčkových (Velíšek & Hajšlová 2009). Maximální přípustné limity ZON v potravinách definuje nařízení Komise (ES) č. 1126/2007 (Tabulka 4), která upravuje nařízení Komise (ES) č. 1881/2006.



Obrázek 4: Zearalenon, α-zearalenol, β-zearalenol (Radová-Sypecká & Hajšlová 2003). Upraveno.

ZON je nesteroidní estrogenní mykotoxin. Chemická struktura ZON je podobná ženskému pohlavnímu hormonu 17β-estradiolu. Má také podobnou afinitu a účinek na receptory pro tento hormon, což vede k problémům s plodností. Takovým cizorodým látkám se říká xenoestrogeny. Jejich vystavením jsou ohroženy kromě člověka i hospodářská zvířata (De Ruyck et al. 2015). Xenoestrogeny jsou endokrinně disruptivní. To znamená, že narušují transport, syntézu a funkci hormonů zodpovědných za homeostázu, růst a reprodukci. Xenoestrogeny mají tři mechanismy účinku. Prvním je napodobení endogenně se vyskytujících estrogenů, což může vést k iniciování stejné chemické reakce v těle. Druhým je blokování receptorů, což má za následek to, že estrogény neplní svoji funkci. Posledním mechanismem účinku je aktivace hormonům podobné látky. To má za následek atypickou funkci endogenních estrogenů (Rogowska et al. 2019). Tolerantní denní příjem ZON podle nařízení komise (ES) č. 1881/2006 je 0,2 μg/kg tělesné hmotnosti.

Po chemické stránce je ZON (4S,12E)-15,17-dihydroxy-4-metyl-3-oxabicyclo[12.4.0]oktadeca-1(14),12,15,17-tetraen-2,8-dion (Velíšek & Hajšlová 2009). Vyskytuje se ve formě bílého prášku. Jedná se o bílé mikrokrystaly čtrnáctičlenného laktonu sloučeného s 1,3-dihydroxybenzenem (obrázek 4). Tento lakton vzniká vnitromolekulární esterifikací kyseliny β-resorcylové. Patří mezi makrolidy, což jsou antibiotika bránící růstu mikrobů. Účinné jsou především proti G+ bakteriím stejně jako peniciliny. Komerčně není využíván pro jeho toxické a potenciálně karcinogenní vlastnosti. Bod tání ZON je stanoven na 164,5 °C. Je termostabilní (Bretina 1990). Podle Hajšlové et al. (2008) se rozkládá až při teplotách nad 180 °C přetrvávajících déle než 30 minut. Odolný je také proti hydrolýze. Je relativně dobře rozpustný v tucích, ale ve vodě je nerozpustný. Dále je rozpustný v alkoholech, benzenu, chloroformu, dietyléteru, etylacetátu a acetonitrilu. Má relativní molekulovou hmotnost 318. Přírodně se vyskytuje ve formě *cis*-, ale v ultrafialové oblasti fosforeskuje a izomeruje na *trans*-formu (Betina 1990, Hrdina et al. 2004). ZON je odolný proti mechanickému zpracování například při mletí obilí. Stabilní zůstává i při dalších výrobních procesech, jako jsou tepelné zpracování mouky nebo fermentace. Detoxikovat se dají kontaminované produkty alkalizací a použitím chlornanů (Hrdina et al. 2004).

Metabolismus ZON u člověka není dostatečně objasněn, ale ví se, že toxin je rychle vstřebáván v horní části střevního traktu enterocyty. U prasat je při perorální dávce 10 mg/kg vstřebáno 80 % ZON. Následné biotransformace v játrech se rozdělují na dvě metabolické dráhy. První způsob detoxifikace spočívá v redukci ZON dehydrogenázami, ze kterého vznikají α- a β-zearalenol (obrázek 4). Druhý mechanismus je konjugace ZON nebo jeho α- a

$\beta$ -metabolitů na zearalenonové glukoronoidy nebo sulfáty. Reakce v játrech mohou být mnohočetné. To znamená, že může dojít k více za sebou jdoucím redukcím následovaných konjugacími reakcemi. Druhou oxidační reakcí se z  $\alpha$ - a  $\beta$ -zearalenolu stává  $\alpha$ - a  $\beta$ -zearalenal, který je dále konjugován. Konjugované toxiny jsou skrz žlučové kyseliny snadněji vylučovány (Rogovska et al. 2019). Zearalenon a jeho  $\alpha$ - a  $\beta$ -deriváty mají anabolické a estrogení účinky. V minulosti byl ZON používán v USA pro podporu růstu ovcí a skotu. U potkanů poškozuje zárodek v době ontogenetického vývoje. Předpokládá se, že se podílí i na vzniku nádorů. Z testů na potkanech také vyplynulo, že ZON způsobuje poškození dělohy, varlat a dalších orgánů.  $\alpha$ -Zearalenol při těchto pokusech byl tři až šestkrát účinnější než ZON, kdežto  $\beta$ -zearalenol měl se ZON stejný účinek (Betina 1990). Podle Suchého a Herziga (2005) je estrogení aktivita v organismu  $\beta$ -zearalenolu mnohem větší. Rychlá metabolizace ZON vede k nízké bioakumulaci v organismu. Odlišná situace může nastat při společné expozici s dalšími mykotoxiny. Ta se ale nemusí jevit vždy negativně pro zdraví organismu. Antagonické účinky byly spatřeny při pokusech na krysách, kterým byl současně podáván ZON a OTA. Nefropatie indukované OTA byly výrazně sníženy. Podobně se jevila i společná expozice ZON s deoxynivalenolem (DON), kdy se antagonický efekt projevil na míře sérových imunoglobulinů, která by byla samotným působením DON mnohem nižší (De Ruyck et al. 2015).

Světová zdravotnická organizace a Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny našla pouze omezené důkazy o karcinogenitě ZON. U testů na zvířecích modelech vykazoval ZON karcinogenní účinky, kdežto u člověka se nedá karcinogenní vliv spolehlivě prokázat pro nedostatečné údaje. Proto byl ZON zařazen do skupiny 3 - neklasifikovatelný co se týče karcinogenity pro člověka (De Ruyck et al. 2015). Hrdina et al. (2004) uvádí, že ačkoliv ZON není karcinogenní, podporuje rozvinutý karcinom. ZON vykazuje silnou cytotoxickou a genotoxickou aktivitu. Zaznamenána byla i toxicita a indukovaná apoptóza s oxidativním stresem v embryonálních kmenových buňkách. Z toho vyplývá teratogenní působení ZON. Dalšími dopady tohoto toxinu na organismus jsou účinky hepatotoxické a hematotoxické (Rogowkska et al. 2019).

Na rozdíl od ostatních mykotoxinů je drůbež odolnější proti ZON. Více rezistentní jsou také přežvýkavci. Přesto jsou u dojnic pozorovány onemocnění mléčných žláz, poruchy plodnosti a zhoršení vitality narozených telat. Do mléka se dostává 0,01 % ZON (Suchý & Herzig 2005). Obecně u hospodářských zvířat způsobuje ZON syndrom hyperestrogenismu. Jedná se o zdravotní stav s nadměrným množstvím látek s estrogení aktivitou v těle. Nejcitlivější k tomuto syndromu jsou prasata. Nejvíce ohrožené jsou nedospělé prasnice. U skotu se poškození může objevovat až při zkrmování potravy s obsahem ZON 0,5-1,0 mg/kg. Příznaky hyperestrogenismu se projevují od 4-7 dne po podání kontaminovaného krmiva a mizí do čtyř týdnů od skončení jeho příjmu. Hyperestrogenismus se projevuje zduřením samičích pohlavních orgánů s kalným výtokem a zvětšením prsní žlázy. U samců dochází v těžkých případech k atrofii tkáně varlat. Samotná intoxikace ZON není smrtelná, ale k úhynu většinou dochází z důvodu bakteriální infekce vyřeznutých orgánů (Hrdina et al. 2004). Suchý a Herzig (2005) uvádí, že u prasníc se histologické změny na vaječnicích a děložní sliznici mohou objevit již při koncentracích 50  $\mu$ g/kg krmiva. Jedním z faktorů rozdílné citlivosti zvířat je způsob

jaterní detoxikace ZON. U prasat je hlavním metabolitem estrogenně aktivnější  $\alpha$ -zearalenol, zatímco u skotu vzniká především  $\beta$ -zearalenol (Rogowska et al. 2019).

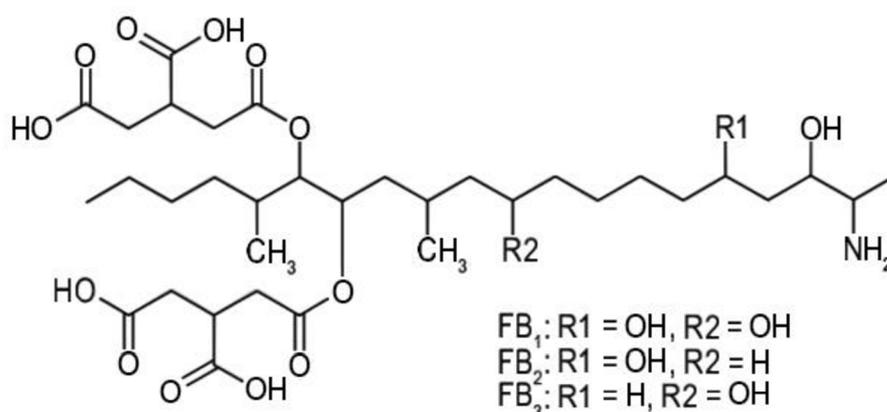
Tabulka 4: Maximální limity pro ZON v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1126/2007 (EVROPSKÁ KOMISE 2007).

Potraviny:	ZON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Nezpracovaná kukuřice, která není určena k mokrému mletí	350
Nezpracované obiloviny, jiné než kukuřice	100
Obiloviny, mouka, otruby a klíčky určené k přímé spotřebě	75
Rafinovaný kukuřičný olej	400
Chléb, pečivo, sušenky, snídaňové cereálie, cereální snacky	50
Kukuřice a snídaňové cereálie, cereální snacky na bázi kukuřice	100
Dětská a kojenecká výživa na kukuřičné bázi	20
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti $> 500 \mu$	200
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti $\leq 500 \mu$	300

### 3.1.5 Fumonisin

Fumonisin (F) jsou produkovány hlavně plísněmi *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum*, které se běžně nachází na kukuřici a dalších obilovinách. FAO/WHO v roce 2011 uvedla, že 63 % vzorků kukuřice a 80 % vzorků kukuřičných výrobků bylo kontaminováno tímto toxinem. Koncentrace toxinu se velmi liší v závislosti na zeměpisných faktorech. Podle Stockmann-Juvala a Savolainen (2008) se mohou na kukuřici nacházet i koncentrace 300 mg/kg, které byly naměřeny v Maďarsku a Spojených státech amerických. Dalšími kontaminovanými produkty mohou být čirok, pšenice, ječmen, sója, černý čaj a mléko (Luo et al. 2018). Přípustné koncentrace fumonisinů v potravinách udává nařízení Komise (ES) č. 1126/2007 (Tabulka 5). Podle Haque et al. (2020) je známo 28 významných analogů fumonisinů. Jsou rozděleny do čtyř hlavních skupin (A, B, C a P). Nejvíce rozšířený je fumonisin B1. Jeho výskyt je často doprovázen menším množstvím fumonisinů B2 a B3. Molekulární struktura těchto derivátů je téměř totožná s molekulární strukturou FB1, a tak je jejich toxický efekt na organismy považován za stejný. Význam derivátů je ale minoritní při otravě organismu vzhledem k jejich malým koncentracím. Molekuly patřící do skupiny přírodních fumonisinů B se skládají z dlouhého hydroxylovaného řetězce uhlovodíků. Jedná se o polární diestery propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny s metylem a primárním aminem v poloze 2 (Obrázek 5). Biologická aktivita fumonisinů je ovlivněna zejména přítomností a formou dusíkatých funkčních skupin. Deriváty fumonisinů se sekundárními nebo terciálními aminy jsou pro organismus výrazně méně škodlivé (Stockmann-Juvala & Savolainen 2008). Fumonisin jsou polární sloučeniny. To znamená, že jsou málo rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, ale dobře rozpustné ve vodě. Tím se liší od většiny mykotoxinů a činí je to také obtížnějšími pro další studie. Hydrofilní charakter má za následek také poměrně nízkou resorpci v gastrointestinálním traktu (GIT) člověka a zvířat (Suchý & Herzig 2005). Tvořeny jsou

většími molekulami než ostatní významné mykotoxiny. Sumární vzorec pro FB1 je C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub> (Bennet & Klich 2003).



Obrázek 5: Fumonisin B1, fumonisin B2, fumonisin B3 (Dall'Astra et al. 2008). Upraveno.

Fumonisy mohou způsobovat hepatotoxicitu, nefrotoxicitu nebo cytotoxicitu (Cimbalo et al. 2020). U člověka je FB1 spojován s poškozením nervové soustavy, defekty neurální trubice u dětí a iniciací rakoviny. Karcinogenní působení bylo zaznamenáno na jícnu a játrech (Luo et al. 2018). Vyšší výskyt FB1 koreluje s častějším výskytem rakoviny jícnu u člověka ze sběrných dat z jižní Afriky a Číny. Přispívajícím znakem souvztažnosti v těchto oblastech je i horší socioekonomický status obyvatel a méně pestrá strava skládající se převážně z kukuřice a pšenice (Haque et al. 2020). Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny je FB1 klasifikován ve skupině 2B, tedy jako pravděpodobný karcinogen pro člověka. Nejčastěji uváděným negativním účinkem FB1 je zasažení do metabolismu sfingolipidů (Cimbalo et al. 2020, De Ruyck et al. 2015, Stockmann-Juvala & Savolainen 2008). Ty jsou součástí myelinových pochev nervů, bílé hmoty mozkové a buněčných membrán. Jako tuková a proteinová izolační látka chrání nervové větvení proti poškození a zpomalení odpovědi. Mechanismus poškození sfingolipidového metabolismu je dán strukturní podobností FB1 s ceramidy, jež jsou podmnožinou sfingolipidů. Syntéza ceramidů je blokována FB1 inhibicí enzymu ceramid syntázy. Tím je i částečně inhibována *de novo* syntéza dalších sfingolipidů, protože ceramid hraje důležitou roli při tomto ději. *De novo* syntéza se dá popsat jako recyklace, kdy jsou sfingolipidy rozkládány na ceramidy, sfingosiny a další látky a poté opět syntetizovány (Stockmann-Juvala & Savolainen 2008). Suchý a Hezig (2005) tvrdí, že FB1 inhibuje také N-acetyl transferázu, která katalyzuje přímo syntézu sfingolipidů. Pro člověka by podle TDI neměly být škodlivé dávky fumonisinů 2 µg/kg tělesné hmotnosti denně (Degen et al. 2017).

U živočichů působí FB1 různými způsoby, společným jmenovatelem je zásah do jejich metabolismu sfingolipidů. Nejvíce postiženi bývají koně, u kterých způsobují leukoencefalomalacii. Onemocnění je lokalizované v mozku. Charakterním znakem nemoci je progresivní nekróza neuronů centrální nervové soustavy. Dalšími kritickými orgány jsou játra a ledviny. Projevem otrav je porucha koordinace a pohybu, vrávoravá chůze, paralýzy a natažený krk a končetiny. Tyto příznaky se objevují až po 7-35 dnech po intoxikaci (Suchý & Herzig 2005). Leukoencefalomalacie byla prokázána také u králíků. U prasat je projevem otrav

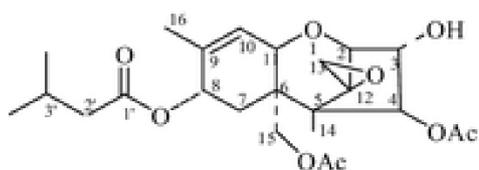
plicní edém a hydrothorax (Bennet & Klich 2003). Spíše než poruchy plicní tkáně jsou tyto poruchy dávány do souvislosti se srdeční dysfunkcí. Také jsou hlášeny poruchy jater prasat. Objevují se jaterní hyperpalzie současně s plicními problémy (Suchý & Herzig 2005). Cimbalo et al. (2020) uvádí, že k četným poruchám dochází i u střevních buněk lačníku. U laboratorních zvířat byly pozorovány hepatotoxické a karcinogenní účinky s apoptózami (Bennet & Klich 2003). U krys byly nalezeny cholangiokarcinom (nádorové onemocnění žlučových kanálků) a hepatocelulární karcinom po dvou letech podávání 50 ppm FB1 ve stravě. Játra jsou jedním z hlavních cílových orgánů FB1 indukované toxicity. Kromě nich jsou vážně ohroženy také ledviny a jícn (Stockmann-Juvala & Savolainen 2008). Koncentrace FB1 ve stravě pod doporučenými směrnými hodnotami způsobily narušení metabolismu sfingolipidů u krůt a prasat. Bylo prokázáno, že toxicita vyvolaná fumonisiny je zmírňována chemickými a biologickými metodami, použitím kyseliny fytové nebo bakteriálního kmene *Lactobacillus plantarum* (Cimbalo et al. 2020).

Tabulka 5: Maximální limity pro sumu FB1 a FB2 v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 doplněné nařízením Komise (ES) č. 1126/2007 (EVROPSKÁ KOMISE 2007).

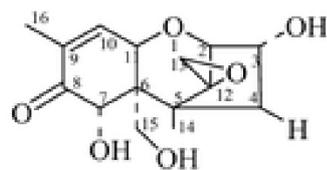
Potraviny:	Suma FB1 a FB2 (µg/kg)
Nezpracovaná kukuřice, která není určena k mokrému mletí	4000
Kukuřice a potraviny na bázi kukuřice určené k přímé spotřebě	1000
Kukuřičné snídaňové cereálie a snacky	800
Dětská a kojenecká výživa na kukuřičné bázi	200
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti > 500 µ	1400
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti ≤ 500 µ	2000

### 3.1.6 Trichotheceny

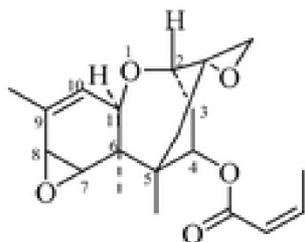
Trichotheceny jsou unikátní svou chemickou strukturou. Jsou to estery seskviterpenových alkoholů obsahující trichothecenový tricyklický systém. Všechny přírodně se vyskytující trichotheceny jsou nízkomolekulární látky s šestičlenným kruhem obsahujícím dvojnou vazbu na C9-C10 a epoxidovým můstkem na C12-C13, který výrazně přispívá k jejich toxickému potenciálu. Označovány jsou také jako 12,13-epoxytrichotheceny. Epoxidová skupina je zastoupena oxiranem (etylenoxid). Jedná se o cyklický éter s třemi atomy v kruhu se sumárním vzorcem C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O. Mezi trichotheceny patří přes 200 strukturálně podobných mykotoxinů produkovaných houbami rodu *Fusarium*, *Stachybotris*, *Myrothecium*, *Tricothecium*, *Cephalosporium* a *Verticimonosporium* (Hrdina et al. 2004).



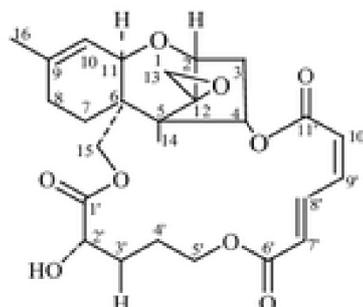
**Type A: T-2 toxin**



**Type B: Deoxynivalenol (DON)**



**Type C: Crotocin**



**Type D: Verrucarin A**

Obrázek 6: Hlavní skupiny trichothecenů (Wu et al. 2017).

Dle struktury se trichotheceny dělí na trichotheceny typu A (T-2, HT-2), B (nivalenol, deoxynivalenol), C (crotocin, bacharin), D (satratoxin, roridin) (obrázek 6). Trichotheceny typu A nemají v poloze C8 ketoskupinu. Trichotheceny typu B naopak mají v poloze C8 ketoskupinu. Typ C je charakteristický tím, že má dvě epoxidické skupiny a to na C9-C10 a C7-C8. Typ D obsahuje makrocyclický kruh mezi C4 a C15. Trichotheceny typu C a D jsou v zemědělských plodinách poměrně vzácné, na rozdíl od trichothecenů typu A a B, které jsou velmi rozšířené. Trichotheceny typu A se vyznačují nejvyšší toxicitou. Trichotheceny inhibují syntézu proteinů eukaryotických buněk. Vážou se na velkou podjednotku ribozomu 60s jako výsledek interakce s enzymem peptidyltransferázou (EC.2.3.2.12) a tím zasahují do translace. Také aktivace intracelulárního enzymu proteinkinázy může vést ke genové expresi a zvýšené apoptóze jako odpověď na ribotoxický stres. Primárním cílem trichothecenů jsou leukocyty. V závislosti na dávce, opakování a času expozice mohou způsobovat imunosupresi nebo imunostimulaci (Sudakin 2003).

Trichotheceny jsou odolné vůči environmentálním podmínkám, jako jsou světlo a teplota, ale mohou být deaktivovány silnou kyselinou nebo zásadou. Jejich chemickou strukturu mohou pozměnit také houby a bakterie a tím je detoxikovat. Tato vlastnost byla pozorována na T-2 toxinu. Efektivně detoxikovány jsou i metabolickými procesy zvířat. Dochází k otevření epoxidového kruhu a následné tvorbě glukuronidů (deriváty glukuronové kyseliny přecházející do moči). Sekundární kontaminace je proto pro člověka zanedbatelná (Velíšek & Hajšlová 2009).

### 3.1.6.1 T-2 Toxin

Hlavními producenty T-2 toxinu jsou *Fusarium poae*, *F. sporotrichoides* a *F. acuminatum* (Velíšek Hajšlová 2009), kterým se daří především v chladnějších regionech nebo při vlhčích skladových podmínkách (Li et al, 2011). Napadají především obiloviny včetně ovsa, ječmene, kukuřice a pšenice. Právě oves a ovesné výrobky obsahují nejvíce sumární

koncentrace T-2 a HT-2 toxinu podle evropského hodnocení spotřebního zboží v roce 2011 (De Ruyck et al. 2015). Maximální limity pro T-2 toxin a jeho deriváty v potravinách nejsou stanoveny. Podle Velíška a Hajšlové (2009) může kontaminace ovsu těmito toxiny dosáhnout až tisíce  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . HT-2 toxin je deacetylderivát T-2 toxinu vznikající metabolizací (Hrdina et al. 2004).

T-2 toxin je rozpustný v etanolu, chloroformu a dalších organických rozpouštědlech. Ve vodě je jen málo rozpustný. T-2 toxin tvoří bílé krystaly a taje při  $151,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Střední letální dávka pro potkany při perorálním příjmu je stanovena na  $4\text{ mg}/\text{kg}$  tělesné hmotnosti (Betina 1990).

T-2 toxin je obvykle rychle metabolizován a vyloučen po požití. Nedochozí k výrazným akumulacím v orgánech, ačkoliv byl nalezen v játrech a plicích slepic. U člověka je T-2 toxin hydrolyzován dvěma různými metabolickými cestami, kde jsou výsledkem primární metabolity HT-2 toxin a neosolaniol (Li et al. 2011). Expozice T-2 toxinu je spojena s různými patologickými stavy včetně podráždění kůže, gastrointestinálními problémy, zhoršení mitochondriální funkce a hypotrofie (omezení růstu) sleziny a brzlíku. Jistá spojitost tohoto toxinu je i s neurotoxickými účinky (De Ruyck et al. 2015). Při akutní otravě je pro T-2 toxin charakteristické dávení, nechutenství, zvracení a úbytky na váze. Pokusy na potkanech také ukázaly, že dochází ke zvýšení koncentrací serotoninu a tryptofanu v mozku a snížení adrenalinu v nadledvinách. Závažnějšími důsledky akutní otravy je degradace imunitního systému zahrnující snížení počtu lymfocytů v krvi. Ke chronickým otravám patří krvácení, nekrózy, apoptózy, krvácení a poškození kůže a chrupavek (Li et al. 2011). U člověka T-2 toxin způsobuje také alimentární toxickou aleukii. Primárními projevy onemocnění jsou záněty trávicího ústrojí, zvracení, průjemy a bolest hlavy. V další fázi nemoci dochází k zásadnímu snížení počtu bílých krvinek a krevních destiček. Poškození imunitního systému v poslední fázi je natolik rozsáhlé, že dochází k infekcím od samotné střevní mikroflóry, která je pro zdravého člověka neškodná (Velíšek & Hajšlová 2009). Podle Hajšlové et al. (2009) je T-2 toxin také potencionálním karcinogenem a mutagenem.

U zvířat je za kritickou koncentraci považováno  $0,5\text{ mg}/\text{kg}$ . U drůbeže a prasat byly pozorovány kožní a slizniční nekrotické léze. Nejvíce poškozené sliznice byly po přímém kontaktu s mykotoxinem, tedy v horní části GIT a v koutku zobáku drůbeže. Popsáno bylo také postižení brzlíku a burzy Fabricii. U myši byly pozorovány také teratogenní vlastnosti T-2 toxinu. U ostatních zvířat jsou vyvolávány také gastroenteritidy, krvácení v oblastech hlavy, trávicího traktu a pohlavních orgánů, poruchy krvetvorby a těžké průjemy (Suchý & Herzig 2005).

### 3.1.6.2 Deoxinivalenol

Deoxynivalenol (DON) se běžně vyskytuje v potravinářských výrobcích a krmivech mírného pásu. V krmivech je dokonce nejvíce frekventovaným mykotoxinem. Intoxikuje obiloviny, ze kterých to jsou především kukuřice, proso, pšenice a ječmen (Hajšlová et al. 2009; Suchý & Herzig 2005). Vzniká sekundární produkcí hub *F. graminearum* a *F. culmorum*. V příznivých podmínkách pro růst plísní může kontaminace potravin dosáhnout až  $10\text{ mg}/\text{kg}$ . (Velíšek & Hajšlová 2009). Vysoké kontaminace se projevují při odebrání vzorků, kde může

být detekován až ve 100 % případů. Proto je DON považován za přírodní marker upozorňující na přítomnost ostatních mykotoxinů (Suchý & Herzig 2005). Podle Cinar & Onbaşı (2019) se DON objevil v 81 % krmiv pro hospodářská zvířata odebraných z 81 zemí světa. Maximální limity pro DON v potravinách stanovuje nařízení Komise (ES) č. 1126/2007, které doplňuje nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (Tabulka 6). Mezní hodnoty jsou odvozené od tolerantního denního příjmu DON 1 µg/kg tělesné hmotnosti (Degen et al. 2017).

Strukturním názvem je DON 12,13-epoxy-3,7,15-trihydroxy-(3,7)trichothec-9-en-8-on (Velíšek & Hajšlová 2009). Molární hmotnost deoxynivalenolu je 296,3 g/mol. Vyskytuje se jako bezbarvý tenký krystal rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech, jako jsou etanol, metanol, chloroform a acetonitril. Podle oznámení WHO z roku 2001, je stabilní při 120 °C, mírně stabilní při 180 °C a částečně stabilní při 210 °C (Khaneghah et al. 2018). Taje v rozmezí teplot 151 a 153 °C. Pro živočichy je toxicita DON slabší než toxicita ostatních výše zmíněných mykotoxinů, což potvrzuje i střední letální dávka u myši 49 mg/kg (Betina 1990).

Významným derivátem DON je nejznámější maskovaný mykotoxin deoxinivalenol-3-β-D-glukosid (DON-3-Glc). V obilovinách se vyskytuje v rozmezí 10-30 % k volnému DON (Vidal et al. 2016). Maskované mykotoxiny jsou modifikované mykotoxiny metabolismem zvířat, mikroorganismů nebo rostlin ve snaze o jejich detoxikaci (Freire & Sant'Ana 2018). DON-3-Glc vzniká působením obranného mechanismu rostlin. Tyto procesy však nemusí nutně vést ke snížení zdravotního rizika pro konzumenty. DON-3-Glc je produktem glukosylace rostlinných buněk, které jej dále ukládají do buněčných vakuol. Charakteristickým znakem konjugace je zvýšení polaritativity (Hajšlová et al. 2008). Podle Boevrew et al. 2015 vykazují maskované mykotoxiny nižší toxicitu. Zvýšené riziko ale představují uvolněním původních mykotoxinů z konjugátů. Štěpení je u člověka zprostředkováno střevní mikroflórou, kde dochází k 90% konverzi DON-3-Glc na původní mykotoxin. Vzrůst koncentrace DON nebo samotného DON-3-Glc může nastat při technologickém zpracování potravin. Příkladem je výroba chleba, kde jsou štěpeny glykosidické vazby mezi mykotoxiny a polysacharidy (škrob) vlivem hydrolytických enzymů xylázy a α-amylázy (Vidal et al. 2016). Stejně enzymy působí i při fermentačních procesech výroby sladu nebo piva (Velíšek & Hajšlová 2009).

Deoxynivalenol je také nazýván vomitoxin na základě charakteristického příznaku otravy, kterým je zvracení (Hajšlová et al. 2009). Mezi hlavní zaznamenané toxikologické účinky deoxynivalenolu patří imunotoxicita, genotoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita, embryotoxicita, oxidativní stres a morfologické změny v organismu. Hlavními cílovými orgány toxikóz jsou orgány trávicího traktu, kde dochází nejvíce ke kontaktu s toxinem. Jsou jimi žaludek a celé tenké střevo. Dalšími orgány, kde dochází k výraznějšímu poškození, jsou játra, plíce, slinivka břišní, brzlík a krev (Cimbalo et al. 2020). V enterocytech vyvolává DON apoptózu a inhibuje syntézu bílkovin narušením aktivity ribozomální podjednotky 60S (De Ruyck et al. 2015; Suchý & Herzig 2005). Z hlediska karcinogenity je DON zařazen do skupiny 3 jako neklasifikovatelný karcinogen pro člověka pro nedostatek důkazů. Přičemž existuje *in vitro* (mimo živý organismus) studie, kde bylo prokázáno poškození řetězce DNA v jaterních buňkách (De Ruyck et al. 2015). Při intoxikaci DON dochází také k poklesu počtu leukocytů a snížení tvorby protilátek. U hospodářských zvířat se otravy deoxynivalenolem obecně

projevují gastroenteritidami, intestinálním krvácením, sníženým příjmem až odmítáním krmiva, zvracením a poklesu užitkovosti. Velmi citlivá jsou prasata, která jsou intoxikována již při koncentraci 0,25 mg/kg. U přežvýkavců vlivem intoxikace dochází ke specifické poruše GIT, kdy po 24 h od pozření kontaminovaného krmiva degraduje až 50 % bacheru (Suchý & Herzig 2005).

Tabulka 6: Maximální limity pro DON v potravinách podle nařízení Komise (ES) č. 1126/2007 (EVROPSKÁ KOMISE 2007).

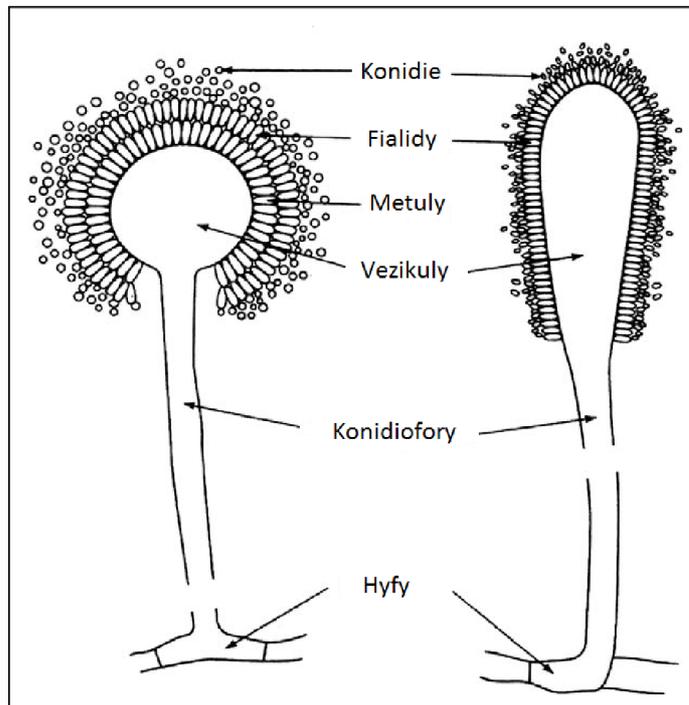
Potraviny:	DON (µg/kg)
Nezpracovaná tvrdá pšenice a oves	1750
Nezpracovaná kukuřice, která není určena k mokrému mletí	1750
Nezpracované obiloviny, jiné než tvrdá pšenice, oves a kukuřice	1250
Obiloviny, mouka, otruby a klíčky určené k přímé spotřebě	1750
Těstoviny (v suchém stavu)	750
Chléb, pečivo, sušenky, snídaňové cereálie a obilné přesnídávky	500
Dětská a kojenecká výživa na obilné bázi	200
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti > 500 µ	750
Mlýnské frakce kukuřice o velikosti ≤ 500 µ	1250

## 3.2 Zdroje Mykotoxinů

### 3.2.1 Mikroskopické vláknité houby

Mykotoxiny vznikají jako sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub. Mikromycety (mikroskopické vláknité houby) tvoří spolu s kvasinkami a kvasinkovými mikroorganismy skupinu mikroskopických hub. Mikromycety se taxonomicky klasifikují do oddělení vřeckovýtrusých hub (Ascomycota) kmene Houby (Fungi). Nejznámější mykotoxiny jsou produkovány 5 rody mikromycet. Jsou to *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* a *Alternaria*. Mikromycety jsou vícebuněčné, eukaryotní a chemoheterotrofní mikroorganismy. Jejich metabolismus získává energii a stavební materiál z látek organického původu, které jsou absorbovány po předchozím rozkladu extracelulárními enzymy. Přijímány jsou jako roztoky celým povrchem. Tento způsob příjmu se dá popsat jako osmotrofní. Způsob příjmu organických látek je buď saprofitický nebo parazitický, což znamená, že využívají organický uhlík rozkladem organických zbytků nebo soužitím s ostatními živými organismy. Jako saprofyty se vyskytují v půdě, nebo sestávají na rostlinných či živočišných zbytcích.

Mikromycety vytvářejí vatovité nebo plstnaté porosty bohatého vzdušného mycelia většinou světlých barev, které mohou být druhově velmi rozmanité (Ostrý 1998).



Obrázek 7: Morfologie vláknitých mikromycet (Klich 2009). Upraveno.

Primárním útvarem stavby mikromycet je houbová stélka. Je vláknitá a zodpovědná za růst a výživu organismu. Základem stélky je vlákno hub, které se nazývá hyfa. Hyfy jsou jednojaderné, dvoujaderné nebo mnohoaderné struktury. Mohou být jednobuněčné nebo vícebuněčné rozdělené v jednotlivé septy. Hyfy se větví a vzájemně proplétají, a tak vzniká společný soubor hyf tvořící podhoubí neboli mycelium. Pokud jsou hyfy rozvětvené a neshlukují se, tak se útvar nazývá kolonie. Mycelia se mohou dále rozlišovat podle specifického uspořádání. Soudržné mycelium v klubičku je nazýváno sklerocium. Vyznačuje se svou tvrdostí a schopností přežít nepříznivé vlivy. Stroma je označení pro shluk kožovitého a tuhého mycelia. Tvořeno je hlavně plísněmi parazitujícími na ovoci. Hyfy jsou zakončeny měchýřkem určeným pro nepohlavní rozmnožování, které převládá při rozmnožování vřecovýtusých hub. Konečný měchýřek hyf, ze kterého vznikají nepohlavní výtrusy (spory), se nazývá vezikula a hyfa, která nese měchýřek je nazývána konidiofor. U plísní rodu *Fusarium* se vezikuly nevyskytují a konidie rostou přímo z konidioforu. Mezi konidii a vezikulami se mohou formovat další útvary specifické pro jednotlivé rody plísní. Jsou to sterigmata, která mohou být jednovrstvá (fialidy) nebo dvouvrstvá (metuly a fialidy). Z vezikul vybíhají metuly, jež jsou podpůrné buňky pro buňky konidiogenní. To jsou buňky, na jejichž konci vznikají konidie, tyto buňky se nazývají fialidy. Konidie jsou exospory jednobuněčné nebo vícebuněčné. Jednobuněčné konidie jsou nazývány mikrokonidie a vícebuněčné konidie jsou makrokonidie. Jejich tvar a jejich umístění na konidioforu je mezi druhy variabilní. Zvláštním typem spor jsou chlamydo-spory. Nejsou tvořeny všemi druhy plísní, spíše jen u těch s jednobuněčnými hyfami. Jsou to nepohlavní výtrusy s vysokou odolností proti nepříznivým podmínkám. Nepohlavní výtrusy mohou být tvořeny také jako endospory. Jsou nazývány sporangiospory a vznikají ve speciálních váčcích, sporangii. Plísně produkující sporangia mají odlišnou morfologickou

strukturu od plísni tvořících konidie. Obdobou konidiofor jsou sporangiofory. Na těch mohou vznikat váčky nebo rozšířený konec nazývaný kolumela. Pokud se na sporangioforu nachází více kolumel tvořících váčky, tak vzniká útvar zvaný sporangiola. Pohlavními výtrusy jsou askospory. Nachází se v plodnicích v řetězcích (vřecku) obvykle po osmi. Plísně mohou tvořit tekutý výpotek (exsudáty). Morfologická stavba plísni je ilustrována na obrázku 7 (Kalhotka 2014).

Mykotoxiny jsou syntetizovány v myceliu mikromycet a jsou vylučovány do substrátu, který napadají. Kromě toho se mykotoxiny mohou vyskytovat i na sporách, které kontaminují prostředí člověka (Velíšek & Hajšlová 2009).

V potravinách má svůj význam 114 druhů mikromycet, ze kterých je 65 druhů toxigenních. Platí, že toxigenní mikromycety mohou produkovat dva i více mykotoxinů, a že zástupci několika různých rodů toxigenních mikromycet mohou produkovat stejný mykotoxin. Výskyt toxigenních mikromycet na potravinách ještě neznamená, že jsou zde přítomny mykotoxiny a zároveň odstranění plísni z potravin, neznamená odstranění plísni vytvořeného mykotoxinu (Ostrý 2000).

Škodlivé působení mikromycet je dáno především jejich přizpůsobivostí, vhodnými podmínkami pro růst, rozmnožováním a produkcí mykotoxinů. Právě přizpůsobivost vytváří velkou morfologickou rozmanitost, která umožňuje výskyt mikromycet v nejrůznějších ekologických podmínkách. Výskyt jednotlivých druhů ovlivňují klimatické podmínky. Na těch závisí přežití a další rozšíření spor či fragmentů hyf do prostředí. Spory se mohou nacházet v půdě, na povrchu živých a odumřelých organismů, ve vodě nebo v ovzduší. Řada mikromycet obsahuje sadu různých enzymů, jež jim umožňuje rozkládat rozmanité substráty a materiály a využívat je pro svoji výživu a růst (Ostrý 1998). Mikromycety mohou vyvolávat imunitní odpověď organismu (alergie) na látky, které produkují. Na druhou stranu mikromycety produkují také řadu organických látek potřebných pro výrobu určitých potravin, jako jsou hermelín nebo niva (Velíšek & Hajšlová 2009).

### 3.2.2 Rod *Aspergillus*

Plísně rodu *Aspergillus* jsou tvořeny septovým myceliem. Ze substrátového podhoubí nebo ze vzdušných hyf vyrůstají konidiofory, které jsou zakončeny rozšiřující se zakulacenou hlavou (měchýřkem). Tvar měchýřků je závislý na směru růstu fialid. Paprscitě rostoucí fialidy tvoří oválný měchýřek a rovnoběžně rostoucí fialidy tvoří měchýřek sloupcovitý. Fialidy vyrůstají na celém povrchu měchýřku, jsou to konidiogenní buňky zvané primární fialidy. Ty zpravidla pokračují v další řadu buněk vytvářejících soustavu metul s distálními fialidami. Jsou tenčí a menších rozměrů než fialidy primární. Poslední řady fialid jsou zúžené na distálních koncích a produkují konidie v řetězcích. Rozmnožování je především nepohlavní, pomocí konidií. Od mikromycet rodu *Penicillium* se liší tím, že fialidy rostou na celém povrchu měchýřku současně (Ostrý 1998).

Rod *Aspergillus* byl dlouhou dobu vnímán jen jako plísně různé barvy, dokud je v roce 1729 podrobněji nezačal zkoumat italský botanik P. A. Micheli. Na mikromycetách rozlišoval

konidiofory a hlavy. Pod mikroskopem vyzoroval, že sporové řetězy nebo kolonie vytváří nerovné povrchy s drsnými hlavami. Proto tento rod pojmenoval *Aspergillus* (drsná hlava).

Živná půda ovlivňuje finální vzhled plísní a tak je nutné definovat, na které živné půdě můžeme pozorovat konkrétní znaky. Všechny zde uvedené charakteristiky jednotlivých druhů plísní rodu *Aspergillus* byly sledovány na Czapkově agaru (CDA). Ten se skládá ze sacharózy (30 g/l), dusičnanu sodného (2 g/l), hydrogenfosforečnanu draselného (1 g/l), síranu hořečnatého (0,5 g/l), chloridu draselného (0,5 g/l), síranu železnatého (0,01 g/l), a agaru (15 g/l) (Fassatiová 1979). Jednotlivým druhům rodu *Aspergillus* bude věnována pozornost v následujících podkapitolách.

### 3.2.2.1 *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* tvoří bílé až světle žluté kolonie. Jejich povrch je nejprve vločkovitý, ale s dozráváním konidií se stává zrnitý a zbarvuje se do slámově žluté, citrónově žluté či zelenožluté. Konidiofory měří 400 až 600  $\mu\text{m}$  (šířka 5-13  $\mu\text{m}$ ), vyrůstají ze substrátových hyf a vyčnívají z kolonie. Konidiofory jsou řidší v místě produkce sklerocií. Mají šedo zelenou nebo žlutozelenou barvu. Sklerocia jsou produkována pouze některými druhy, jsou zprvu bílé, ale brzo ztvrdnou a zbarví se do červeno hnědé až černé. Měchýřek je zprvu protáhlý, se stářím se zakulacuje. Fialidy vyrůstají v jedné nebo ve dvou řadách. Ty tvoří žlutozelené kulovité nebo hruškovité konidie s ostny a tenkou stěnou. Bývají různé velikosti. Právě konidie bývají dobrým rozeznávacím znakem mezi *A. flavus* a *A. parasiticus*. Pro svou podobnost bývají tyto plísně často zaměňovány (Pitt & Hocking 2009).

Plísně *A. flavus* se rychle rozrůstají po substrátech. Hojně se vyskytují obzvláště v tropech. Z fyziologického hlediska je pro *A. flavus* spodní hranice pro růst 10 °C a horní hranice je 48 °C. Vodní aktivita potřebná pro přežití této plísně je 0,78 při 33 °C a s klesající teplotou se zvyšuje. Kyselost negativně neovlivňuje růst *A. flavus* až do krajních extrémů. Vyskytuje se v rozsahu od 2,1 do 11,2 pH (Wheeler et al. 1991). Produkuje aflatoxiny B a také větší množství metabolitů, ze kterých je zhruba 60 % toxických pro člověka. Některé kmeny syntetizují sloučeniny jako kyselinu cyklopiazonovou. *A. flavus* je také jedním z hlavních původců alergické aspergilózy plic (Pitt & Hocking 2009). *A. flavus* je nacházen ve všech možných druzích potravin. Celosvětově je hlášen jako plíseň nejčastěji přenášená potravinami. Zvláště silnou afinitu má k ořechům a olejnatým semenům. Dalšími kontaminovanými produkty bývají obiloviny, koření, zelená káva, ovoce a zelenina (Pitt & Hocking 2009).

### 3.2.2.2 *Aspergillus parasiticus*

Kolonie plísní *Aspergillus parasiticus* jsou zelené, žlutozelené až hnědozelené barvy. Okraj je světle hnědý. *A. parasiticus* má nízkou a zrnitou texturu, kde se může utvářet paprscitě rýhování. Konidiofory jsou dlouhé 300-600  $\mu\text{m}$  (10-12  $\mu\text{m}$  široké) bezbarvé a hladké, zakončené lehce zploštělým kulovitým měchýřkem. Ten pokrývá jedna řada fialid tvořící jasně žlutozelené kulovité a jemně ostnitě konidie (Fassatiová 1979).

Byly zaznamenány tvorby kulovitých sklerocií. Sklerocium je bílé, později se zbarvuje do černa a dorůstá 400-800  $\mu\text{m}$  v průměru. Roste v rozmezí teplot 12-42  $^{\circ}\text{C}$  s teplotním optimem ve 30  $^{\circ}\text{C}$ , což odkazuje spíše na tropické a subtropické oblasti. Minimální aktivita vody v teplotním optimu činí 0,81. S klesající teplotou se dále zvyšuje potřebná aktivita vody pro růst. Ideálním substrátem pro růst bývají kyselé až mírně zásadité podklady (Wheeler et al. 1991). Při překročení hranice pH 2,2 přestává plíseň růst. Nejčastěji napadá arašidy, ale může se vyskytovat i na skořápkových plodech, obilovinách, sóje nebo zpracovaném masu (Pitt & Hocking 2009).

*A. parasiticus* ve velkém množství produkuje aflatoxiny B1, B2, G1, G2. S klesající teplotou se zvyšuje syntéza AFG (Pitt & Hocking 2009). Kromě těchto dvou aflatoxinů syntetizuje *A. parasiticus* další metabolity jako kyselinu kojovou. Produkce metabolitů je více homogenní než u *A. flavus*. Kmeny neprodukující mykotoxiny jsou jen velmi vzácné. K produkci mykotoxinů jsou vyžadovány téměř stejné teplotní podmínky co pro růst, ale vlhkost substrátu je potřeba vyšší než  $a_w=0,86$  (Tran-Dinh et al. 1999).

### 3.2.2.3 *Aspergillus ochraceus*

*Aspergillus ochraceus* vytváří na Czapekovi agaru nízké okrově žluté nebo oranžové kolonie s bezbarvým nebo purpurovým okrajem. Textura je zrnitá, zpravidla se soustřednou vrstevnatostí. Mohou se vyskytovat čiré exsudáty. Konidiofory rostou pouze z povrchu hyf, mají v dolní části zoubkovitý povrch. Jsou nažloutlé až hnědé a dorůstají až 1,5 mm. Konidie jsou elipsoidní a drsné, mají stejnou barvu jako konidiofory (Fassatiová 1979).

*Aspergillus ochraceus* je klasifikován jako mezofilní druh. Objevuje se v rozmezí teplot 8 až 40  $^{\circ}\text{C}$ . Optimum pro růst sahá spíše k vyšším teplotám a to 24-31  $^{\circ}\text{C}$ . Teplota je pro *A. ochraceus* důležitým faktorem, protože ovlivňuje nárůst biomasy více než živné medium. Tato plíseň je rezistentní proti slabšímu gamma záření do 4 kGy a vyššímu obsahu  $\text{CO}_2$  v prostředí. Odolává také nízké aktivitě vody, růst je možný až do  $a_w=0,76$ . *Aspergillus ochraceus* je hlavním producentem ochratoxinu A a jeho derivátů ochratoxinu B a C. Kontaminovány jsou hlavně sušené a skladované potraviny. Škála konkrétních potravin je veliká. Z nich to jsou především zelené kávové boby a ječmen. U těchto potravin byly naměřeny největší hodnoty produkce OTA a to přes 2 mg/g u zelených bobů kávy a 1 mg/g u ječmene. Zdravotní nebezpečí vzniká i u dalších produktů, které tyto komodity využívají jako vstupní suroviny výroby. Může se jednat o kávu nebo pivo (Pitt & Hocking 2009).

### 3.2.2.4 *Aspergillus clavatus*

Kolonie na Czapekovi agaru jsou bílé do začátku sporulace, kdy se v porostu objevují jednotlivé modrozelené konidiální hlavice. Okraje zůstávají bezbarvé. Tvoří se exsudáty a někdy i méně výrazný hnědý pigment. Mycelia jsou řidší vlnaté a až 3 cm vysoké. Konidiofory jsou hladké, čiré a dorůstají až 1,3 mm. Od ostatních druhů rodu *Aspergillus* se liší dlouhým elipsoidním měchýřkem a absencí metul. Měchýřek je dále hustě porostlý jednou řadou fialid tvořící hladké a elipsoidní konidie (Fassatiová 1979).

Pitt a Hocking (2009) uvádí, že minimální teplota pro růst této plísně činí 5 °C a maximální teplota je 42 °C. Teplotní optimum jako u většiny mikromycet je 25 °C. Minimální vodní aktivita slučitelná s růstem činí 0,88. Hlavní produkovaný mykotoxin je zde patulin. K jeho tvorbě je nejvíce limitujícím aspektem vodní aktivita, která musí dosahovat 0,99. Patulin vyžaduje vysokou vodní aktivitu ke svému vzniku i u ostatních mikromycet. Například *Penicillium patulum*, stejně významný druh produkující tento mykotoxin, syntetizuje patulin nejméně při  $a_w=0,95$  a to pouze v malém množství. *A. clavatus* se vyskytuje u ječmene během skladování především při vyšších teplotách. Sám je schopný zvyšovat teplotu sladu až do jeho samovznícení. Dále se vyskytuje na obilovinách, moukách a rýži. V menší míře napadá i červené papriky, pekanové ořechy a sušené solené ryby.

### 3.2.3 Rod *Fusarium*

Plísně rodu *Fusarium* se obvykle rychle rozrůstají. Mycelium je septované. Z plstnatého vzdušného mycelia různé barvy vyrůstají konidiofory. Ty jsou větvené s různou četností. Na povrchu konidiofor se tvoří protáhlé fialidy soustředně v prstenci složeném ze tří nebo více částí. Mohou se dále větvit nebo vytvářet konidie. Konidie mohou být dvojího typu - mikrokonidie a makrokonidie. Jednobuněčné mikrokonidie jsou oválné a tvoří řetězce nebo shluky na konci fialid. Makrokonidie jsou vícebuněčné typického srpovitého tvaru. Makrokonidie se tvoří z puchýřků sporodochia. U některých druhů vznikají i chlamydospory na konci vláken nebo mezi buňkami. Plísně rodu *Fusarium* jsou schopné přežít nepříznivé podmínky tvorbou tvrdých kulovitých útvarů z kompaktního mycelia hub – sklerocia (Kalhotka 2014).

*Fusaria* jsou spíše polní plísně. Útočí na kulturní rostliny a způsobují širokou škálu chorob. Napadeny mohou být všechny části obilovin od hniloby kořenů a stonků, vadnutí cév, padlí po hnilobu klasů (běloklasost). Rod *Fusarium* se vyskytuje také v půdách a skladech. V půdách se chovají saprofiticky a rozkládají celulózní zbytky rostlinných materiálů. Do skladů se dostávají na zemědělských produktech napadených před sklizní, kde způsobují skladištní hniloby ovoce, zeleniny, obilovin a luštěnin (Pitt & Hocking 2009).

#### 3.2.3.1 *Fusarium culmorum*

*Fusarium culmorum* tvoří kolonie, které dávají vzniknout bílému vločkovitému myceliu se žlutým nebo červeným okrajem. Ten postupně přebarvuje celé mycelium směrem ke středu. Spodní část je hnědá až červenohnědá. Makrokonidie jsou rozděleny třemi až pěti přehrádkami a měří 26-36  $\mu\text{m}$ . Jsou krátké, široké a mírně zakřivené. Jejich bazální buňky mají mírný vrub. Makrokonidie jsou dobrým rozeznávacím znakem. Mikrokonidie se u tohoto druhu netvoří. Chlamydospory jsou oválné, většinou hladké, ve shlucích nebo v řetězcích. *F. culmorum* roste při teplotách 5 až 35 °C. Při teplotách nad 35 °C neroste. Požadující aktivita vody pro růst je 0,87, ale aby bylo schopné produkovat mykotoxiny, musí být aktivita vody v rozmezí 0,96 a 0,995. *F. culmorum* je velmi tolerantní vůči nepříznivým vlivům prostředí. Vyskytuje se i v oblastech s nízkým parciálním tlakem nebo mírnou radiací. Záření o síle

0,8 kGy způsobovalo desetinásobné snížení počtu spor, nikoliv však jejich likvidaci (Fassatiová 1979; Pitt & Hocking 2009).

Tento druh tvoří přes 40 mykotoxinů a dalších sloučenin. Hlavními jsou ketotrichotheceny a jejich deriváty. Podle toho, zda daný druh produkuje jeden nebo druhý mykotoxin, se dělí dále na chemotypy. Chemotyp produkující DON se vyskytuje častěji. Jenings et al. (2004) uvádí, že ze 153 jednosporých izolátů *F. culmorum* shromážděných z Anglie a Walesu se vyskytovalo 59 % vzorků s chemotypem DON a zbylých 41 % s chemotypem NIV. Zjištěny byly i rozdíly v distribuci těchto chemotypů. Chemotyp DON se vyskytoval spíše na severu a východě Anglie a Walesu, zatímco chemotyp NIV dominoval na jihu a západě. *F. culmorum* je rozšířen po celém světě, především pak v oblastech s mírným podnebím. Chová se jako půdní saprofyt a patogen obilovin a dalších zemědělských produktů. Parazituje na jednoděložných i dvouděložných rostlinách a na kulturních trávách. Na pšenici a ječmenu se napadené klasy krátce po infekci předčasně zbarvují do žluta. Choroba se označuje jako FHB (fusarium head blight). Kontaminovaná zrna jsou charakteristická sníženou hmotností a pekárenskou kvalitou. Napadá také triticales, kukuřici, banány, jablka a hrušky (Pitt & Hocking 2009).

### 3.2.3.2 *Fusarium graminearum*

Na glukózo-bramborovém agaru se porosty zpočátku objevují jako bílé vzdušné mycelium, které se dále zbarvuje do šedorůžové až jasně červené barvy. Později tyto plísně tmavnou do hnědočervené s prosvítajícími bílými nebo šedožlutými oblastmi. Kolonie se rychle rozrůstá a zaplňuje celou Petriho misku. Vzhled plísně a její zbarvení jsou závislé na typu živné půdy a pH. Například na sladínovém agaru se vytváří červené husté mycelium, kdežto na bramboro-mrkvovém agaru je mycelium bílé a řídké. Na myceliích se také mohou tvořit stromatické útvary, které vznikají ze shluků naduřelých buněk. Na jednoduchých nebo větvených konidioforech se tvoří srpovité makrokondie s protáhlou apikální buňkou a stopkovitou bazální buňkou. Mají 3-7 přepážek a jsou poměrně rovné a silnostěnné. Mikrokonidie se netvoří. Chlamydostry bývají kulovité, tlustostěnné čiré nebo světle hnědé (Fassatiová 1979; Pitt & Hocking 2009).

Optimální pH pro růst bývá 6,7-7,2. Krajiní hodnoty pH pro přežití této plísně jsou 2,4 na spodní hranici a 10,2 na horní hranici stupnice. Optimální teplota pro pevné i tekuté povrchy je 24-26 °C. Minimální vodní aktivita pro růst v optimální teplotě je 0,9. Bylo zaznamenáno přes 50 toxických sloučenin, které mohou být tvořeny touto plísní. K nejvýznamnějším patří deoxinivalenol a jeho deriváty, nivalenol a jeho deriváty, zearalenon, T-2 toxin, HT-2 toxin a fusarin C. Na základě produkce mykotoxinů se *F. graminearum* dělí na chemotyp I a chemotyp II. Chemotyp I označuje producenty DON a vyskytuje se spíše v Severní Americe, Argentíně, Číně, Japonsku, Polsku a na Ukrajině. Kdežto chemotyp II je označení pro producenty NIV, kteří se vyskytují hlavně v Jižní Americe, Koreji, Austrálii a Novém Zélandu.

*F. graminearum* je patogenem hlavně travnatých rostlin. Objevuje se ale také na rostlinách okrasných a užitkových, jako jsou hrách, jetel a lilek brambor. Napadá kukuřici, cukrovou řepu, sóju, triticales, banány, ječmen a sušené maso (Pitt & Hocking 2009).

### 3.2.3.3 *Fusarium sporotrichoides*

Mycelium sestává z bílých, světle růžových až hnědých vlněných chomáčků. Okraje jsou nahnědlé. Plíseň se rychle rozšiřuje, na Czapkově agaru s kvasničným extraktem zaplňuje celou Petriho misku. Konidiofory jsou hustě uspořádány do tuhého útvaru s povrchovou částí tvořenou konidiiemi. Toto uspořádání je označováno jako sporodochium. Hojně tvoří makrokonidie, které jsou mírně zakřivené s třemi nebo pěti přehrádkami se špičatými apikálními buňkami. Mikrokonidie jsou oválné a jsou tvořeny ve velkém množství. Jsou produkovány polyfialidy sídlícími ve vzdušném myceliu. Mají elipsoidní tvar. Polyfialidy jsou dobrým rozlišovacím znakem od ostatních plísní rodu *Fusarium* (Pitt & Hocking 2009).

*F. sporotrichoides* je odolné i proti mírným mrazům. Ještě při teplotě  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  je schopné syntetizovat toxické izoláty. Horní hranice pro růst je  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vodní aktivita musí dosahovat alespoň 0,88. Nevyskytuje se tak běžně jako například *F. culmorum* nebo *F. graminearum*, ale je důležité pro svou vysokou toxicitu. Častěji se objevuje v chladnějších oblastech. Je hlavním producentem trichothecenů typu A. Jsou to T-2 toxin a HT-2 toxin. Tvoří také neosolaniol (NEO), fusarin C (F-C), butenolid, beauvericin (BEA) a aurofusarin (AUF). *F. sporotrichoides* je považováno také jako hlavní příčina rozmachu ničivé nemoci Aleukie (ATA) v bývalém USSR po druhé světové válce. Z potravin napadá téměř výhradně obiloviny. Historicky byl tento druh v Evropě spojován s žitem. Nyní je známo, že napadá také pšenici, kukuřici, čirok, divokou rýži, cukrovou řepu a sójové boby (Pit & Hocking 2009).

### 3.2.3.4 *Fusarium poae*

*Fusarium poae* tvoří bílé, bíločervené nebo červené vzdušné mycelium. Roste velmi rychle, izoláty zaplňují celou Petriho misku při kultivaci. Na substrátech je zbarvené trochu odlišně, tvoří se tmavě červená, okrově žlutá až hnědá. Makrokonidie jsou srpovitě se zužující se vrchní buňkou a se slabě vytvořenou nožkou. Jejich délka se liší podle počtu buněk, třibuněčné jsou častější, měří 17-28  $\mu\text{m}$ . Pětibuněčné jsou delší o 8-20  $\mu\text{m}$ . Mikrokolonie mají hruškovitý tvar. Jsou produkovány v řetězcích z baňkovitých fialid. Ty se nachází ve vzdušném myceliu tvořeném hutně větvenými konidiofory. Mikromycety mají specifický sladký nebo ovocný zápach (Fassatiová 1979; Pitt & Hocking 2009).

Minimální teplota potřebná pro růst je  $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  s maximem při  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *F. poae* je psychrotrofní plíseň. Vyskytuje se především v mírném pásmu. Minimální aktivita vody pro růst je 0,90. Produkce mykotoxinů je velmi variabilní. Tato plíseň syntetizuje nivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenon X, monoacetoxyscirpenol, aurofusarin, fusarin C, beauvericin a culmoriny. Tento mykotoxin byl nalezen v 8,2 % vzorků. Podle Velíška a Hajšlové (2009) jsou produkovány touto plísní také HT-2 toxin a zearalenon. Některé kmeny syntetizují i T-2 toxin. *F. poae* napadá sazenice, dřevnaté byliny a obilniny. Z obilnin napadá hlavně kukuřici, kde způsobuje hnilobu klasu v chladnějších oblastech. Na ovsu setém způsobuje padlí. Další zemědělské produkty, které bývají kontaminovány plísní *F. poae*, jsou sója, ječmen, pšenice, cukrová třtina, rýže a skladované citrusové plody (Pitt & Hocking 2009).

### 3.2.4 Rod *Penicillium*

Mycelium plísni rodu *Penicillium* je tvořeno vícebuněčnými hyfami s přepážkami. Konidiofory se mohou nepravidelně větvit nebo růst přímo. Na jejich koncích nevznikají vezikuly. Namísto toho se větví v primární sterigmata lahvicovitého tvaru, které mohou pokračovat ve větvení v sterigmata sekundární. Většina druhů tvoří pouze primární sterigmata. Na jejich konci se odškrucují kulovité jednobuněčné konidie. Shlukovány jsou v řetězcích.

*Penicillium* je celosvětově rozšířený rod plísni vyskytujících se ve všemožných biotopech od půdy, vegetace, vzduchu až po vnitřní prostředí a potraviny. V přírodě zastává funkce dekompozice organických látek a patogenu, přičemž napadá potravinářské plodiny, kde způsobuje ničivé hniloby. Některé plísně mohou mít i pozitivní dopad. Toho je využíváno v potravinářském, lékárnickém nebo dalších odvětvích průmyslu. Příkladem mohou být plísně *P. camemberti* a *P. roqueforti* při výrobě sýrů nebo *P. chrysogenum* pro výrobu penicilinu.

#### 3.2.4.1 *Penicillium verrucosum*

Mycelium *P. verrucosum* bývá bílé se žlutohnědým až tmavě hnědým okrajem. Roste pomalu oproti ostatním plísním. Povrch je sametový nebo vločkovitý s paprscitými rýhami. Produkuje čisté nebo světle žluté exsudáty. Konidiofory vyrůstají z povrchu nebo z podloží hyf. Jsou dlouhé 200-500  $\mu\text{m}$ , robustní a mají jemné stěny. Konidie se tvoří pomaleji v náhodných řetězcích. Obvykle jsou kulaté, šedo zelené až matně zelené s jemným povrchem (Pitt & Hocking 2009).

*P. verrucosum* je endemická plíseň chladnějších oblastí. Její krajní teplota pro růst je 0 až 31 °C. Teplotní optimum je 20 °C. Minimální aktivita vody pro růst a rozmnožování této plísně je 0,80. *P. verrucosum* je hlavní producent ochratoxinu A z rodu *Penicillium*. Dalšími syntetizovanými toxiny jsou podle IARC (1993) verrucosin a citrinin. Produkce OTA a růst samotné plísně jsou inhibovány zvýšením koncentrace CO<sub>2</sub>. Tento toxin je tvořen na komoditách i za nízkých teplot, především pak na obilovinách. *P. verrucosum* je endemita kanadského a evropského obilí (ovsa, ječmene a žita). Jen vzácně se vyskytuje v teplejších oblastech a mimo obilniny. Může se také vyskytovat i na zvířecích tkáních ledvin a jater (Pitt & Hocking 2009).

#### 3.2.4.2 *Penicillium expansum*

Zbarvení kolonie *P. expansum* v době plné sporulace je modrozelené nebo sivě zelené s bílými okraji. U starších plísní se mohou okraje zbarvovat do žlutohnědá. Textura mycelia je zrnitá s pozorovatelnou soustředěnou vrstevnatostí přecházející do paprscitého rýhování směrem ke krajům. Mohou se tvořit bezbarvé nebo světle oranžové exsudáty. Konidiofory rostoucí z povrchu nebo podloží hyf jsou hladké 150-400  $\mu\text{m}$  dlouhé. Uspořádání štětiček je těsné a asymetrické. Z nich vyrůstá 5-8 fialid. Charakteristická je tvorba konidií, které jsou matně zelené, hladké a elipsoidní (Fassatiová 1979; Pitt & Hocking 2009).

*Penicillium expansum* je psychrofilní plíseň, roste tedy i za nízkých teplot. Objevuje se ve skladech potravin, kde je nízká teplota vyžadována. Tyto podmínky nezastaví růst plísně, pouze ji zpomalí. V případě jablek vzniká plíseň při skladování z poškozených nebo přezrálých kusů. Důvodem je běžný výskyt spor na zdravém ovoci, které čekají na vhodné podmínky pro růst. Takovými může být mechanické poškození jablek nebo nakousnutí hmyzem, po kterém začne plíseň růst a produkovat toxiny. Inhibovat růst *P. expansum* je možné zvýšením obsahu oxidu uhličitého. Spory této plísně se inaktivují v umělé atmosféře s obsahem CO<sub>2</sub> 13 % a vyšším. Teplotní optimum *P. expansum* je mezi 24 a 27 °C. Teplotní rozmezí, ve kterém je schopna růst, se pohybuje od -3 do 35 °C. Minimální aktivita vody pro tvorbu plísně je 0,82. Produkuje mykotoxiny patulin a citrinin. Tvorba těchto mykotoxinů je náročnější proces. Pro produkci patulinu vyžaduje *P. expansum* minimální vodní aktivitu 0,95 a teplotu od 0 do 31 °C (Fassatiová 1979; Pitt & Hocking 2009).

Tento druh plísně se nejvíce objevuje na ovoci, především na jablkách. V menším měřítku napadá zeleninu jako cibule, mrkve a zelí. Destruktivní činnost je přisuzována cytolytickým enzymům. Zpočátku se projevuje měkkou hnilobou, později vytvoří svazčité konidiofory (Fassatiová 1979). Ostrý (1998) zaznamenal výskyt této plísně na kukuřici, pšenici, rýži, potravinách z obilovin, malvicových plodech, jablkách, hruškách, rajčatech, jahodách, avokádu, mangu, vinné révě, cibuli, karotce, olivách, sójových bobech, kávových bobech, arašídech, pekanových a pistáciových ořechách, masu a masných výrobcích.

### 3.3 Prevence vzniku mykotoxinů v potravinách

Bezpečnost potravin je klíčovým prvkem v oblasti veřejného zdraví a mykotoxiny jsou významným zdravotním rizikem především v rozvojových zemích. Důvodem jsou nesprávné agrotechnické postupy a nevhodné skladování potravin (Cinar & Onbaşı 2019). Na evropském trhu dochází k překročení hygienických limitů zcela ojediněle, a to jsou limity stanovené tak, aby nebyly škodlivé ani při chronické (celoživotní) expozici. Jsou ovšem situace, kdy i přes dodržování těchto limitů nelze onemocnění mykotoxikózami zcela vyloučit, a tak je vhodné držet kontaminace mykotoxiny na co nejnižších úrovních (Velíšek & Hajšlová 2009). Aby byla zajištěna bezpečnost potravin, je prevence důležitějším a efektivním způsobem, jak omezit růst plísní a tím i produkci mykotoxinů (Cinar & Onbaşı 2019). Potravinu mohou být kontaminovány mykotoxiny ve všech fázích předcházejících jejich konzumaci (Velíšek & Hajšlová 2009). Omezení vzniku mykotoxinů na potravinách se nejlépe dosáhne prevencí růstu plísní. Obrana tohoto typu je založena na vytvoření takových podmínek, při kterých bude toxigenním plísním znemožněn jejich růst.

K tomu je v prvním kroku zapotřebí správná agrotechnika pěstování rostlin v před sklizňové prevenci (Bryden 2012). Ohrožené plodiny jsou především cereálie, olejniny, ovoce a zelenina (Velíšek & Hajšlová 2009). Jelikož jsou půdy přírodním rezervoárem plísní, je vhodné je před sadbou zpracovat a využívat protiplísňově ošetřená osiva mořená v různých fungicidech. Při výsevu by se měly dodržovat meziřádkové vzdálenosti doporučené pro konkrétní odrůdy, aby nahuštěné rostliny nevytvářely ideální mikroklima pro plísně. Střídáním

plodin v osevních postupech je zamezeno negativnímu vlivu předplodin a napadení nových plodin. Luo et al. (2018) uvádí, že je vhodné používat k rotaci plodin dvouděložné plodiny, jelikož nejsou hostiteli toxigenních plísni rodu *Fusarium*. Využití jako „čistící plodina“ nachází len (Hajšlová et al. 2008). Obzvláště nebezpečná předplodina je v tomto pohledu kukuřice. Volba rostliny by měla být učiněna podle struktury půdy a produkční kapacity, aby rostliny nebyly vystavovány vysoké míře fyziologického stresu. Výběrem vhodné odrůdy nebo hybridu se sníží riziko následného napadení plísni. Zvyšování odolnosti plodin se dá docílit šlechtěním nebo genetickou modifikací. Některé rostliny mají schopnost modifikovat mykotoxiny na netoxické produkty pomocí svých enzymových systémů, přičemž ale mohou vznikat maskované mykotoxiny. Pozornost by měla být věnována i odolnosti plodin proti ostatním škůdcům a chorobám, protože skrz mechanická poškození rostlin se mohou rostliny stát snazším cílem plísni. Porosty by měly být udržovány obecně v dobrém zdravotním stavu. Opomenut by neměl být ani boj proti plevelům, jelikož to jsou rezervoární organismy mikromycet. Dodržovány by měly být všechny agrotechnické zásady při pěstování kulturních plodin. Kromě zmíněných preventivních opatření proti plísni to jsou například vyrovnaná výživa porostů, úměrná doba zavlažování, správné provedení hnojení a použití insekticidů, pesticidů a fungicidů (Cinar & Onbaşı 2019; Suchý & Herzig 2005). Poslední opatření výskytu mykotoxinů na plodinách při pěstování, které se stále více uplatňuje, je využití netradičních přístupů. Kromě zmíněného genetického inženýrství se například jedná o využití biokompetitivních činitelů (atoxigenních kmenů plísni). Ty mohou na základě mezidruhové konkurence vyloučit plísňově toxigenní (Radová-Sypecká & Hajšlová 2003). Účinným uplatňováním preventivních opatření správné zemědělské praxe bylo dosaženo omezení výskytu námelových alkaloidů plísňově *Claviceps purpurea* (Velíšek & Hajšlová 2009).

Sklizeň je dalším rizikovým faktorem pro výskyt toxigenních plísni a produkci mykotoxinů. Před jejím zahájením by měla být posouzena kvalita zrnin odběrem reprezentativních vzorků. Následně by měla být izolována sklizeň z polehlých nebo podezřelých porostů na vyšší stupeň infekce patogeny *Fusarium* (Evropská Komise 2006). Zabráněno by mělo být mechanickému poškození zemědělských produktů. Poškozením vnější vrstvy zrn je narušena přirozená bariéra proti plísni. Touto cestou mohou spory plísni snadno získat potřebné živiny pro růst, které jsou obsažené ve vnitřních částech zrn. Větší zrna jako kukuřice jsou obecně častěji napadána plísni než menší zrna jako pšenice a rýže (Velíšek & Hajšlová 2009). Pozornost proti mechanickému poškození by měla být věnována kromě sklizně i při uskladnění a jakékoliv další manipulaci s potravinami a krmivy (Suchý & Herzig 2005). Termín sklizně je také velmi důležitý, protože na něm nejvíce závisí vlhkost semen. Sklizeň by měla probíhat ve vhodných obdobích při plné zralosti a nízké vlhkosti. Přezrálá zrna obilí jsou více citlivá na růst plísni. Kromě toho je třeba mít k dispozici vhodné sklizňové zařízení a postupy (Cinar & Onbaşı 2019). Takovými postupy mohou být sušení, provzdušňování a obracení obilí před nebo během skladování (Bryden 2012). Obiloviny by měly být sušeny tak, aby jejich vlhkost zamezila růst plísni během skladování. Dosažení tohoto cíle je možné sražením vodní aktivity do 0,65, čemuž odpovídá vlhkost pod 15 %. Suchý a Herzig (2005) uvádí, že po sklizni obilovin by měla být snížena jejich vlhkost pod 14 % do 48 hodin.

Skladovací podmínky hrají důležitou roli v kontrole mykotoxinů, protože ovlivňují celkový růst plísní. Dva hlavní faktory kontroly jsou teplota a vlhkost vzduchu. Eliminována by měla být možnost rekondenzace vody (Radová-Sypecká & Hajšlová 2003). Vlhkost ve skladovacích prostorách může být zvýšena respirací mikroorganismů a hmyzu, proto je vhodné oba faktory odstranit. Dalším způsobem, jak je zvyšována vlhkost při skladování, je kondenzace. Ta souvisí s výkyvy teplot. Teplota by tedy měla být stabilní a držena na nižších stupních. Kondenzace nastává také při skladování zrnin v silech, kdy se zrna v krajní části sila ochlazují rychleji než středová zrna a dochází tak k migraci vlhkosti a vzniku horkých míst. Účinnou prevencí je provzdušňování sil (Bryden 2012). Obiloviny mohou být skladovány také v pytlech. V tom případě je nutné zajistit, aby byly suché, čisté a uloženy na paletách, aby vznikla pro vodu od podlahy nepropustná vrstva (Evropská Komise 2006). Skladování komodit po menších kusech, například balením, také snižuje růst plísní a hromadění mykotoxinů. V rozvojových zemích v důsledku nevhodných skladovacích postupů vznikají ztráty 20-50 % (Agriopoulou et al. 2020). Prevence růstu plísní ve skladech je možné docílit úpravou vnitřního prostředí ve skladových prostorách, kterým je také složení plynné atmosféry. To je možné upravit uskladněním v hermetických kontejnerech, kde by měla být vysoká hladina oxidu uhličitého a nižší hladina kyslíku. Možné je využít i chemické prevence pro inhibici růstu plísní v průběhu skladování. Velmi úspěšné jsou organické kyseliny, ze kterých je používána samotná kyselina propionová nebo v kombinaci s kyselinou mravenčí či kyselinou octovou (Bretina 1990). Další dostupná a vyžadovaná chemická prevence je dezinfekce. Příkladem může být chlornan sodný (NaClO) (Cinar & Onbaşı 2019). Určitá studie vyzdvihuje také aplikaci antioxidantů jako resveratol, butylhydroxyanisol, parabenol nebo skořicová silice, kdy byla akumulace DON snížena až o 90 % (Hajšlová et al 2008). Preventivních opatření je dosahováno i při výrobě potravin. Zpracovatelský průmysl využívá různé druhy fyzikálních metod, které zajišťují prodloužení údržnosti. Ty lze brát také jako preventivní opatření proti růstu plísní, protože jsou při nich inaktivovány nebo úplně likvidovány spory. Mezi tyto metody patří mrazení, pasterizace, sterilace, vakuové balení a případně ozařování (Radová-Sypecká & Hajšlová 2003). Posledním a zásadním preventivním opatřením by mělo být implementování systému HACCP. Jedná se o systém, který se zabývá bezpečností potravin prostřednictvím analýzy, monitorování a kontroly chemických a biologických rizik od prvovýroby po výrobu, distribuci a spotřebu hotového výrobku. Mykotoxiny jsou v tom systému charakterizovány jako biologické riziko. U HACCP je nejdůležitější stanovit limity kritických kontrolních bodů a ty průběžně sledovat (Cinar & Onbaşı 2019).

### **3.4 Dekontaminace potravin zasažených mykotoxiny**

Jelikož nelze zcela zabránit tvorbě mykotoxinů ani s použitím nejvyspělejších preventivních opatření, musí existovat postupy technologického zpracování, které snižují výslednou expozici člověka na minimální úroveň. Míra kontaminace potravin určuje, zda se kontaminované potraviny musí vyřadit nebo zda je možné tyto potraviny ještě zachránit použitím některé z dekontaminačních metod. Detoxikace potravin je možným řešením

vzniklého problému. Aby dekontaminace potravin zasažených mykotoxiny byla úspěšná, musí splnit pět hlavních zásad, jsou to:

- Dekontaminované potraviny již dále nesmí být zdraví škodlivé. Toho je docíleno zničením mykotoxinu, transformací jeho chemické stavby nebo absorbováním do nevstřebatelné makromolekuly.
- Dekontaminace musí zlikvidovat i spory a mycelia, aby nedaly vzniknout dalším zdraví škodlivým mykotoxinům.
- Potraviny si musí zachovat svoji chuť a nutriční vlastnosti.
- Fyzikální vlastnosti potravin by neměly být výrazně změněny.
- Proces dekontaminace napadených potravin musí být ekonomicky výhodný. To znamená, že hodnota kontaminované komodity by měla být vyšší než proces dekontaminace.

Metody využívané k dekontaminaci potravin se rozdělují do tří kategorií. Jsou to metody fyzikální (čištění a mytí, třídění a separace, záření, sorpce), chemické (ozón, kyseliny, zásady) a biologické (bakteriální kmeny, houby, kvasinky, enzymy, rostlinné produkty, nanotechnologie) (Bata & Lásztity 1999).

### **3.4.1 Fyzikální metody detoxikace**

Pevná chemická struktura většiny mykotoxinů je velmi stabilní, způsobuje jejich odolnost vůči vysokým teplotám, mrazu a nízkému pH. Kombinací více degradačních faktorů působících na mykotoxiny je možné dosáhnout jejich eliminace. Vysoké teploty mohou narušit chemickou strukturu mykotoxinů současně za vysokého tlaku. Spojení těchto dvou faktorů lze dosáhnout při běžném výrobním procesu potravin. Kombinace vysokého tlaku a teplot jsou základním parametrem pro extruzi, která se využívá například při výrobě těstovin. Tlak a teploty vyšší než 150 °C redukují výrazně obsah fumonisinu a zearalenonu. Částečně jsou při tomto procesu redukovány i aflatoxiny a deoxynivalenol. Dalšími tepelnými úpravami potravin, které mírně snižují koncentrace méně stabilních mykotoxinů, jsou pečení, smažení, pražení a vaření (Čolović et al. 2019). Podle Cinar a Onbaşı (2019) je redukce mykotoxinů použitím vysokých teplot výrazně vyšší. Uvádí, že při teplotě 120-160 °C je redukováno 66-83 % ZON a při působení 190 °C po 60 minut nebo 220 °C po 25 minut je redukováno 60 až 100 % fumonisinů. Velíšek a Hajšlová (2009) uvádí, že 40-95 % patulinu může být redukováno pomocí mikrovlnného ohřevu. Menší efektivitu vykazují tradiční konzervační technologie. Sterilizace při 135 °C (1 s) snižuje obsah AF v mléce pouze o 19 %, zatímco pasterace (72 °C po 45 s) likviduje téměř dvojnásobný obsah toxinů (35 %). Tento vztah také ukazuje důležitost dalších parametrů ovlivňujících životnost toxinů kromě teploty (Velíšek & Hajšlová 2009).

Před použitím pokročilejších metod detoxikace by měla proběhnout základní opatření pro snížení množství kontaminovaných produktů. Mechanické odstranění závadných potravin a krmiv společně s dalšími nečistotami z primární produkce, skladovacích prostor a technologických linek snižuje celkový obsah toxinů. Částečná dekontaminace mykotoxinů probíhá při procesech čištění a mletí zrn v pekárenských podnicích. Mletí zrn má výraznější vliv na redukci fusariových mykotoxinů, obzvláště pak pokud se jedná o mokré mletí kukuřice.

Při tomto způsobu mletí dochází k odstranění povrchových vrstev, které bývají nejvíce kontaminovány. Podle Vidal et al. (2016) mykotoxiny nejsou eliminovány, ale pouze redistribuovány mezi jednotlivé frakce. Mykotoxiny tedy končí převážně v krmných produktech. U bílé mouky, kde je využíváno pouze moučné zrno bez dalších vrstev, je redukován obsah ZON na 30-50 % výchozího obsahu (Velíšek & Hajšlová 2009). V průmyslových podnicích je redukováno 32 % fumonisinů z kukuřice během výrobního procesu (Cinar & Onbaşı 2019). **Čištěním a mytím** lze u surové kukuřice dosáhnout snížení obsahu mykotoxinů až o 32 % (Suchý & Herzig 2005). Tato detoxikační metoda je účinná zejména proti trichothecenům. Cinar a Onbaşı (2019) uvádí, že omýváním zrn pšenice je redukováno 62 % T-2, 53 % HT-2 a 50 % DON. Lepších výsledků aplikovatelných i pro ostatní fusariové mykotoxiny je možné dosáhnout přidáním uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

**Třídění** nahnilých a nekvalitních plodů může výrazně snížit obsah mykotoxinů v zemědělských produktech. Tato jednoduchá metoda je především účinná u ovoce napadeného patulinem. V určitých případech může snížit jeho množství až o 99 %. (Scudomore & Banks 2004). Separace se využívá také u obilovin, u kterých přispívá ke snížení koncentrace aflatoxinů a fumonisinů. Podle Agriopoulou et al. (2020) tříděním infikované kukuřice se snižuje koncentrace fumonisinů až 93 %. K separaci kontaminovaných zrn obilí je možné využít jejich odlišných fyzikálních vlastností. Plesnivá zrna mají nižší hustotu, kterou je možné využít ponořením do vody. Vyhozením plovoucích frakcí jsou se kromě kontaminovaných zrn odstraněny i další nečistoty. Použitím přístroje určeného k ponoření, mytí a následné třídění nečistot je možné odstranit až 80 % aflatoxinů. Tento postup je možné využít i k odstranění ochratoxinů (Luo et al. 2018). Běžněji používanou metodou k redukcí AF je u obilovin třídění pomocí UV světla (Agriopoulou et al. 2020).

Účinnou metodou dekontaminace aflatoxinů, T-2 toxinu nebo deoxynivalenolu je **záření**. To je také efektivní pro inhibici růstu plísní. Aflatoxin B1 může být degradován ultrafialovým zářením. Vystavením AFB1 UV záření po dobu 30 minut došlo k redukcí původního toxinu o 77 % v chilli. 60 minut záření způsobilo degradaci 86 % toxinu (Tripathi & Mishra 2010). Vysokou efektivitu nachází UV záření při eliminaci PAT z jablečných džusů nebo cidrů (Agriopoulou et al. 2020). UV záření bylo také účinné pro degradaci ochratoxinu A u drůbežního krmiva. Působící ultrafialové záření po dobu 60 minut snížilo kontaminaci OTA z 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  na přípustný limit 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Stejných výsledků je možné dosáhnout osmi hodinami na slunečním svitu. Silnější gamma záření při dávce 10 kGy je schopné kontaminaci AFB1 zcela odstranit. Paprsky gamma společně s paprsky alfa, beta, rentgenovým a protonovým zářením jsou označovány jako ionizující záření. Toto záření má vysokou energii, která ionizuje potraviny vyražením elektronů z atomových obalů. Ionizující a ultrafialové záření je účinné proti již zmíněným mykotoxinům, ale kromě nich jsou destruovány i nutriční látky v potravinách a krmivech. Ozářené potraviny by měly být značené a sledované podle legislativy. Společným výborem odborníků pro ozařované potraviny FAO/IAEA/WHO bylo doporučeno použití maximální dávky záření o síle 10 kGy. Vyšší dávky záření podle Agriopoulou et al. (2020) ovlivňují kvalitu ovocných džusů. Doporučení FAO/IAEA/WHO nemusí být následováno výrobcí, a proto si jednotlivé státy musí samy stanovit povolené

množství záření. To se může od doporučeného množství výrazně lišit. Například v Japonsku je maximální povolená dávka ozáření potravin až 150 kGy (Luo et al. 2018; Suchý & Herzig 2005).

Mykotoxiny mohou být také filtrovány nebo absorbovány **sorbenty**. Navázáním funkční polární struktury mykotoxinů na sorbenty nasycené molekulami vody dojde k zabránění jejich absorbování a stravení v tenkém střevě. Sorbenty jsou minerální i organické látky. Jejich schopnost izolovat toxiny je závislá na jejich molekulární struktuře a čistotě. Obecným absorbentem je živočišné uhlí. Má rozsáhlý povrch a skvělé absorpční vlastnosti ve vodním prostředí. Tomu napomáhá jeho pórovitá struktura. Živočišné uhlí je schopné absorbovat rezidua aflatoxinů, patulin, zearalenon, deoxynivalenol a nivalenol. Bentonitové jíly vážou ve vodním prostředí AFB1 a AFM1. V mléce je obsah těchto mykotoxinů snížen o 79 % (Luo et al. 2018). Dalšími anorganickými sorbenty jsou například hydratované sodno-vápenaté hlinitokřemičitany, zeolity a kaolin. Organickým sorbentem může být vláknina. Konkrétní organické sorbenty využívané ve výživě zvířat jsou vláknina z vojtěšky, vláknina z ovsy, beta-D-glukanová frakce ze stěn kvasinek nebo extrahovaná frakce buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae* (Haque et al. 2020). Smícháním více sorbentů je možné redukovat více cílených mykotoxinů. Nevýhodou metody sorbentu je snížení biologické hodnoty potravin narušením příjmu živin a jejich sorpce společně s toxiny. V praxi jsou sorbenty běžně využívány u zvířecích krmiv. Efekt sorbentů je zde podpořen enzymovou degradací. Funkční skupiny mykotoxinů jsou štěpeny enzymem esterázou a epoxidázou. Enzym esteráza degraduje laktonový kruh zearalenonu a enzym epoxidáza detoxikuje trichotheceny štěpením 12,13-epoxy skupiny (Suchý & Herzig 2005).

### 3.4.2 Chemické metody detoxikace

Ekonomicky přijatelný způsob detoxikace kontaminovaných produktů je dosažitelný použitím chemických metod. Jsou proto hojně využívány v řadě průmyslových odvětví. Pro použití těchto metod v zemědělských systémech je nutné zohlednit obavy spotřebitele ohledně jejich nezávadnosti. Nevýhodou chemických metod je jejich omezená účinnost a nízká šetrnost k nutričním látkám, jež se v potravinách nacházejí. Použitím na plísň také může vznikat rezistence. Chemikálie jsou také ekonomicky nákladnější a mohou být korozní (Bata & Lászity 1999). Některé chemické metody využívané k výrobě pokrmů mohou detoxikovat mykotoxiny, aniž by to byl jejich původní záměr. Příkladem je výroba speciálních kukuřičných výrobků *nachos* a *tortillas*. Přidáním vápenného mléka do kontaminované kukuřičné mouky má za následek snížení FB1 o 40-100 % (Velíšek & Hajšlová 2009).

Použití **ozónu** (O<sub>3</sub>) je běžná konzervační technika používaná u ovoce a vody. Účinná je pro likvidaci mikroflóry, detoxikaci mykotoxinů a snížení hladiny etylenu ve skladech, který urychluje dozrávání ovoce. Pro spotřebitele ozón není nebezpečný, protože má nízkou stabilitu a je tak přeměňován na nereaktivní kyslík. Ozón je vysoce reaktivní plyn. Je silný oxidant, který je obzvláště efektivní při rozkládání dvojných vazeb. Je také známo, že dvojná vazba terminálního furanu AFB1, AFG1 a AFM1 je náchylná na oxidaci. Ozón oxiduje tuto dvojnou vazbu, čímž dané mykotoxiny deaktivuje. Aflatoxiny B2, G2 a M2 nemají tuto dvojnou vazbu a jsou proto proti ozónu rezistentní (Kabak et al. 2006). Detoxikace ozónem byla

nejčastěji používána u syrových potravin a krmiv. Výhodou je, že po jeho aplikaci nejsou pozměněny výživové, fyzikální ani sensorické vlastnosti potravin. Degradace ozónem byla potvrzena u již zmíněných aflatoxinů, patulinu a zearalenonu. U kontaminované kukuřice vystavené ozónu po 92 hodin byl snížen obsah AFB1 o 95 %. Ozón redukuje i koncentrace deoxynivalenolu, avšak tato reakce nedosahuje takového účinku jako u výše zmíněných mykotoxinů. Kromě ozónu jsou pro detoxikaci efektivní další oxidační činidla jako například peroxid vodíku (Luo et al. 2018; Suchý & Herzig 2005). Podle Čolović et al. (2019) desetiprocentní roztok peroxidu vodíku v zearalenonem kontaminovaném obilí snižuje jeho celkovou koncentraci o 84 %. Těto redukce bylo dosaženo po 16 hodinách za teploty 80 °C.

Mykotoxiny je možné redukovat také použitím silných **zásad**. Jako báze jsou využívány hydroxid amonný ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ) nebo uhličitan amonný ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ). Tato detoxifikační metoda je natolik účinná, že je možné redukovat aflatoxiny, fumonisiny a ochratoxiny z širokého spektra zemědělských produktů na množství obtížně detekovatelné analytickými přístroji. Inaktivace AFB1 spočívá v hydrolýze laktonu následované dekarboxylací. Vznikají dvě netoxické sloučeniny, kterými jsou aflatoxin D1 a cyklopentenon. Navzdory vysoké účinnosti tato metoda není povolena v Evropském společenství (EC) pro potraviny určené k lidské výživě (Luo et al. 2018). K dosažení maximální efektivity dekontaminace aflatoxinů touto metodou se využívá zvýšeného tlaku a teploty během reakce. Reakce za zvýšeného tlaku také zkrátí reakční dobu a vyžaduje menší množství reaktantu (amoniaku). Pro porovnání slouží následující dvě reakce. Reakce aflatoxinu B1 a amoniaku za atmosférického tlaku při pokojové teplotě detoxifikovala po 24 hodinách 88 % původního AFB1. Zatímco stejná reakce probíhající za vysokého tlaku a teploty (121 °C/2 bar) inaktivovala 99 % celkového AFB1. V praxi tato reakce probíhá v rozmezí 80-120 °C a 35-50 psi. Ve státech Severní Ameriky, Francii, Senegal a dalších je metoda silných zásad hlavní metodou používanou k detoxikaci krmiva a dalších zemědělských produktů, jako jsou arašíd, kukuřice a bavlna (Kabak et al. 2006).

Aflatoxiny AFB1 a AFG1 je možné částečně inaktivovat **kyselinami** konverzí na poloacetáty AFB2A a AFG2A. Podle Hajšlové et al. (2009) dochází v jejich přítomnosti k adici vody na dvojnou vazbu furanového kruhu. Tento postup využívá kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a kyselinu sírovou ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Aflatoxin B1 je redukován na aflatoxin B2A za pomoci kyseliny chlorovodíkové. Tato reakce je málo efektivní. Za 24 hodin působení je možné konvertovat 19,3 % AFB1. Pouze 18 % aflatoxinu G1 je přidáním 1% roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konvertováno na aflatoxin G2A. Důvodem nízké konverze mykotoxinů je jejich obecně vysoká stabilita proti nízkému pH (Kabak et al. 2006).

### 3.4.3 Biologické metody detoxikace

Biologická detoxikace funguje na bázi rozkladu nebo enzymatické detoxikace. Cílem je přeměnění mykotoxinů na méně toxické sloučeniny pomocí acetylace, glykosylace, štěpení kruhů, hydrolýzy, deaminace nebo dekarboxylace (Haque et al. 2020).

Jedna z možností biologických metod pro redukci mykotoxinů je použití **bakteriálních kmenů**. Bakterie jsou stejně jako mikromycety velmi variabilní a flexibilní mikroorganismy.

Jejich detoxikační účinky jsou často omezené na konkrétní mykotoxiny. Proces dekontaminace je bezpečný a ekonomicky nenáročný, ale je vyžadována dlouhá doba inkubace. Bakterie jsou izolovány z různých zdrojů, jako je bacherová a střevní mikroflóra, půda nebo dokonce voda. Využívány jsou například v potravinářském, chemickém nebo lékařském průmyslu. Speciální pozornost přitahují bakterie mléčného kvašení (BMK). Ty jsou běžně využívány pro fermentaci potravinářských výrobků. Znamé jsou také pro inhibici růstu plísní a částečně i vazbu aflatoxinů do specifických matric v závislosti na environmentálních podmínkách. Vzniklé vazby jsou závislé na kmeni a době inkubace BMK, matrix, teplotě a pH. Jsou silné, ale stále reverzibilní. Zpevněny mohou být solemi, které obecně ovlivňují náboje buněčného povrchu. Vazba do matrice je povrchovým jevem, na kterém se podílejí peptidoglykany a sacharidy. Toxický efekt mykotoxinů zmírňují BMK tím, že zabraňují jejich vstřebání v GIT člověka a zvířat, stejně jako tomu je u sorbentů. Důvodem inhibice růstu plísní je kompetice o zisk živin ze substrátu mezi mikromycetami a BMK. Bakterie převažují nad mikromycetami proto, že se jedná o jednodušší organismy s rychlejším metabolismem. To znamená, že se rychleji přizpůsobí, přijmou více živin ze substrátu na úkor hub a vytvoří také více buněčné biomasy. Inhibice se týká i syntézy aflatoxinů. Ta je způsobena kromě kompetitivního vztahu i produkcí určitých látek způsobujících zpoždění jejich biosyntézy. Jsou to xylóza, kaseinový hydrolyzát a proteázové peptony. Syntézu těchto látek je možné excitovat přidáním glukózy a kuchyňské soli (Ahlberg et al. 2015). Bakterie mléčného kvašení *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* a *Lactococcus* se vážou do matric s aflatoxinem B1 i aflatoxinem M1, zatímco *Lactobacillus rhamnosus* váže pouze AFB1. Využití může mít *Lactobacillus rhamnosus* při výrobě chleba vazbou AFB1 z kontaminované mouky. Přidání BMK do krmiva kromě inhibice růstu plísní a mykotoxinů také zlepšuje vstřebatelnost obsažených nutričních látek. BMK produkují hydrolytické enzymy rozkládající sacharidy a zvyšují enzymovou aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy, sacharázy, maltázy a dalších enzymů zvířete (Haque et al. 2020). Kmeny *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium* rozkládají kromě AFB1 také OTA. Kyselina mléčná vznikající bakteriemi mléčného kvašení snižuje mutagenní potenciál AFB1, AFB2 a AFG1 v rozsahu 56,6-77,4 %. Fermentací mléka obsahujícího 600-1400  $\mu\text{g}$  AF/kg je možné zredukovat 90-97 % AFM1 (Kabak et al. 2016).

Bakterie izolované z fermentovaných sójových bobů (*Bacillus licheniformis*) jsou schopné redukovat 92,5 % OTA během 48 h působení při 37 °C. Ochratoxin A může být také degradován různými druhy *Brevibacterium*. Tento proces je specifický v hydrolýze amidových vazeb. Zearalenon je degradován bakteriemi *Bacillus licheniformis* z pevného média a *Bacillus natto* a *Bacillus subtilis* z média tekutého. Po 36 h inkubace půdního *Bacillus licheniformis* na ZON bylo redukováno 98,1 % tohoto toxinu a po 48 h byl ZON zcela odstraněn. Podobně efektivní proti ZON je *Bacillus subtilis*, u kterého bylo prokázáno, že je schopný redukovat až 99 % ZON. Redukce deoxinivalenolu je složitější. Jeho negativní efekt na zdraví může být pomocí bakterií výrazně snížen, ale nemůže být zcela vymýcen. Účinnými antagonisty DON jsou bakterie *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis* (Luo et al. 2021). Aflatoxiny mohou být odstraňovány bakterií *Flavobacterium aurantiacum*. Výhodou je, že tato bakterie působí na tekutém i pevném médiu. Účinnost byla potvrzena u mléka, rostlinných olejů, arašídů,

arašídového másla a kukuřice bez zanechání toxických meziproductů. Použití *F. aurantiacum* v potravinářství nebo při fermentaci krmiv je omezené vzhledem k jeho jasně oranžové pigmentaci (Kabak et al. 2016).

Mykotoxiny mohou být rozkládány také **houbami** rodů *Absidia*, *Alternaria*, *Armillariella*, *Aspergillus*, *Candida*, *Dactylium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Pleurotus*, *Rhizopus*, *Trichosporon*. *Trichosporon mycotoxinivorans* je houba používaná k dekarboxylaci a detoxikaci zearalenonu a ochratoxinu A. Minerální medium s obsahem 400 ppb OTA je redukováno na netoxický OT $\alpha$  po 2,5 h inkubace této houby. Směs s obsahem *T. mycotoxinivorans* je komerčně používána u krmných směsí (Luo et al. 2018). *Aspergillus tubingensis* izolovaný z hlíny má schopnost degradovat DON, ale sám je možným producentem jiného mykotoxinu. 25 % zkoumaných izolátů produkuje OTA (Pitt & Hocking 2009). Houba *Pichia caribbica* výrazně redukuje biosyntézu patulinu. Inhibuje růst několika plísní včetně hlavního producenta patulinu *Penicillium expansum*. *Pichia anomala* potlačuje expresi genu patogenních plísní produkci 2-fenyletanolu, čímž brání v jejich růstu. 2-fenyletanol je také zodpovědný za inhibici AFB1 u *Aspergillus flavus*. *Clonostachys rosea* je houba antagonická proti houbovým a rostlinným patogenům jako je *Fusarium graminearum*. Produkuje enzym zearalenon laktonhydrolázu, který zamezuje tvorbě ZON. Tvorba tohoto enzymu závisí na koncentraci ZON v médiu. Pro obilniny by tak mohlo být použito *C. rosea* jako biokontrolní agens (Luo et al. 2018).

**Kvasinky** jsou další biologickou metodou používanou k rozkladu mykotoxinů. Inhibují růst toxigenních plísní a zabraňují syntéze mykotoxinů. *Saccharomyces cerevisiae* se účastní procesu fermentace ovocných džusů, kterým také redukuje tvorbu patulinu. Tento proces může odstranit již vyskytující se patulin během 2 týdnů inkubace (Luo et al. 2018). *S. cerevisiae* patří do skupiny lihovarnických kvasinek společně s *Candida parapsilosis* a *Candida guilliermondii*. Vznikají jako vedlejší produkt fermentace melasy a jsou bohatým zdrojem živin. Obsahují esenciální aminokyseliny lysin a tryptofan, vlákninu, železo, manan, beta-glukany a vitamin C. Právě manan a beta-glukany jsou vázány s aflatoxinem B1 v závislosti na jejich obsahu v buněčné stěně kvasinek. Zachyceno může být až 90 % AFB1. Lihovarnické kvasinky zabraňují vstřebání mykotoxinů v gastrointestinálním traktu a také zmírňují jejich imunotoxické účinky. Používány jsou jako přísada pro krmnou směs drůbeže. Další kvasinky rozkládající OTA s vysokou účinností jsou *Yarrowia lipolytica*, *Phaffia rhodozyma* a *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Jejich praktické využití je prozatím limitováno pro nedostatek dat (Haque et al. 2020).

**Enzymy** je možné purifikovat z mikrobiálních systémů. Jejich využití pro degradaci mykotoxinů záleží na chemické stavbě toxinů. Enzymy nejsou aplikovatelné na všechny mykotoxiny a jejich použití je vysoce specifické. Výhodou je, že jsou bezpečné a zachovávají potravinám jejich vzhled a kvalitu. Použity mohou být laktázy, reduktázy, esterázy, karboxylesterázy, aminotransferázy a laktonhydrolázy. Bakterie rodu *Sphingopyxis* produkuje enzymy rozkládající fumonisiny v následujících krocích. Nejdříve je fumonisin B1 hydrolyzován karboxylesterázou na HFB1. V druhém kroku je hydrolyzovaný fumonisin B1 deaminován enzymem aminotransferázou. Vzniklé složky ztrácí svoji toxicitu. Tento postup probíhá

v podmínkách s omezeným obsahem kyslíku. Mohl by tak najít využití u siláží nebo přímo ve střevním traktu zvířat. Aflatoxiny je možné štěpit očištěnými extracelulárními enzymy z myxobakterie *Myxococcus fulvus*. Myxobakterie jsou aerobní gram negativní bakterie s potenciální biosyntetickou a biokatalytickou aktivitou. Enzym je označován jako MADE (myxobacteria aflatoxin degradation enzyme) a může efektivně odstraňovat AFB1, AFM1 a AFG1 z roztoku. Úspěšnost detoxifikace byla pro AFM1 95,80 % a pro AFG1 96,96 % při ideálních podmínkách 35 °C a pH 6. Aktivita enzymu MADE je také ovlivněna volnými kationty v médiu. Kationty  $Mg^{2+}$  zvyšují aktivitu enzymu, zatímco kationty  $Zn^{2+}$  ji silně inhibují. OTA je štěpen proteolytickým enzymem karboxypeptidázou (Zhao et al. 2010). Ten je velmi aktivně produkován bakteriemi rodu *Brevibacterium* druhů *B. epidermidis*, *B. iodinum* a *B. casei*. Karboxypeptidáza s dalšími minoritními enzymy získané z tekuté kultury *Bacillus subtilis* jsou schopné redukovat 74.8-84.9 % celkového množství OTA (Haque et al. 2020). U trichothecenů je známo, že jejich toxicita je způsobena 12,13-epoxidovým můstkem. Odstranění epoxidové skupiny může výrazně snížit toxický efekt. Enzym epoxidáza z gram pozitivní bakterie *Eubacterium* redukuje DON na pět set krát méně toxický metabolit deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1). Kmen *Eubacterium* byl izolován z bachorové tekutiny skotu. Detoxikační účinek tohoto kmene byl prokázán ve studii *in vitro* a následně také na živém organismu (*in vivo*) a stal se prvním bakteriálním kmenem používaným jako aditivum k deaktivaci trichothecenu v krmné směsi (Schatzmayr et al. 2005).

**Rostlinné produkty** nebo různé aromatické a léčivé byliny mohou zmírnit mykotoxikózy. K léčbě jsou používány rostlinné výtažky, koření, aromatické oleje nebo plody rostlin. Extrakty, kterými jsou olej z máty peprné, olej z tymiánu nebo rýžové slupky, byly používány jako alternativní redukční metoda mykotoxinů v Hubbardově dietě u brojlerových ptáků. Pozitivní efekt tohoto přírodního detoxikantu dopadal i na vyšší denní přírůstek brojlerů a zlepšení enzymatického a mikrobiálního profilu v gastrointestinálním traktu bez negativního dopadu na játra (El-hack et al. 2018). Částečnou ochranu brojlerů před aflatoxiny je možné zajistit přidáním kurkumy (*Curcuma longa*) do krmné směsi. Etanolvý extrakt přírodního laxativa Kassie pravé (*Cassia senna*) a metanolvý extrakt *Cassia tora* snižují mutagenní efekt aflatoxinu B1. Hepatotoxicity a genotoxicity AFB1 je snižována alkoholickým macerátem listů *Piper argyrophyllum* a *Thonningia sanguinea*. Biosyntéza tohoto toxinu na plísni *A. flavus* je inhibována bazalkou indickou (*Ocimum tenuiflorum*). K redukcí AFB1 namísto zmírnění jeho toxikóz byly *in vitro* osvědčeny výtažky z listů bylin mučenky křídlaté (*Passiflora alata*), jahodového stromku (*Psidium cattleianum*), rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) a oregána (*Origanum vulgare*). Snížení nefrotoxického a hepatotoxického efektu krmiva brojlerů kontaminovaného OTA je možné přidáním rostlinných aditiv ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) a vitánie snodárné (*Withania somnifera*). Dalšími bylinami s prokázaným účinkem detoxikace mykotoxinů jsou zelený čaj, skořice, heřmánek, zázvor, černý pepř, koriandr, lékořice, česnek, cibule a semena bazalky (Haque et al. 2020). Spousta rostlinných produktů využívá k redukcí mykotoxikóz antioxidanty. Vysoká efektivita je dána prevencí oxidačního stresu vyvolaného mykotoxiny a tím zamezení rozsáhlejšího poškození buněk.

Prospektivní metodou dekontaminace jsou **nanotechnologie**. Jsou cenově dostupné, efektivní a nabízí ekologicky šetrný způsob kontroly toxigenních hub a mykotoxinů v potravinářském průmyslu (González-Jartín et al. 2019). Principem této metody je absorpce mykotoxinů. Pohlcováním mykotoxinů na povrch magnetických nanočástic, je možné následně odstranění komplexu z potravin. Absorpce a uvolnění je ovlivňováno pH a koncentrací mykotoxinů. Uhlíkové magnetické nanokompozity z kukuřičného odpadu vykazují sorpční eliminaci 90 % AFB1 během 180 minut při pH 7 (Luo et al. 2018). Selenové nanočástice (SNP) získané z fungicidní houby *Trichoderma harzianum* snižují obsah DON o 76 % a FB1 o 63 %. Vhodnou dekontaminační metodu PAT z ovocných šťáv nabízí chitosan potažený oxidem železnato-železitým ( $Fe_3O_4$ ). Magnetické částice vykazovaly vysokou absorpční schopnost bez toxické odezvy (Haque et al. 2020). González-Jartín et al. (2019) testovali rozdílné magnetické nanostrukturní látky pro detoxikaci DON, FB1, ZEN a AF. Ukázalo se, že  $Fe_3O_4$  s bentonitem, aktivním uhlím, oxidem hlinitým ( $Al_2O_3$ ) je možné eliminovat přes 80 % FB1, ZEN a AF z vodných roztoků se sorpční kapacitou 400 ng mykotoxinů na mg nanočástice. Využití mohou nanočástice najít při vaření piva nebo dekontaminaci dalších nápojů.

### 3.5 Analytické metody stanovení

Stanovení mykotoxinů se obecně rozděluje do několika kroků, které na sebe postupně navazují. Stanovení začíná odběrem a úpravou vzorku. Podle Suchého a Herziga (2005) je 90 % chyb při stanovení mykotoxinů způsobeno chybným vzorkováním a odběrem reprezentativního vzorku. Správný odběr vzorku se provádí podle technických norem vypracovaných pro jednotlivé druhy potravin (Nařízení Komise 401/2006/ES) (Hajšlová et al. 2009). Dalším krokem analýzy je extrakce. Cílem je získání mykotoxinu z matrice. Dle povahy a rozpustnosti mykotoxinu a matrice se volí vhodné extrakční rozpouštědlo. K tomuto procesu se u mykotoxinů nejčastěji používá metanol, voda, acetonitril, etylacetát, aceton nebo chloroform (Stehlíková 2007). Po extrakci následuje přečištění. Tím jsou odstraněny interferující látky, jakými jsou třeba barviva. Používanými metodami k přečištění vzorku jsou imunoafinitní chromatografie (IAC), gelová chromatografie (GPC) a extrakce na pevnou fázi (SPE). Poslední fází je identifikace a kvantifikace (Hajšlová et al. 2009).

Ke stanovení mykotoxinů v potravinách se používají imunochemické nebo chromatografické metody. Imunochemické metody jsou zpravidla metodami kvalitativními, což znamená, že slouží k detekci mykotoxinů ve vzorku, ale neuvádějí jeho přesné množství. Využívanými metodami jsou ELISA, radiometody nebo screeningové metody prováděné proužkovými testy. Používané chromatografické metody jsou až na tenkovrstvou chromatografii (TLC) metodami kvantitativními. Jsou využívány pro úřední kontrolu potravin (Hajšlová et al. 2009). Výsledky jsou vysoce přesné, citlivé a napomáhají k validitě jiných metod. Mezi nejběžněji používané chromatografické metody patří vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Hajšlová et al. 2009; Haque et al. 2020).

### 3.5.1 Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je reakce mezi antigenem a protilátkou. (Stehlíková 2007).

ELISA se využívá obecně ke kvalitativnímu stanovení antigenů (mykotoxinů) reakcí s protilátkou (imunoglobuliny), ale může být využita i pro stanovení kvantitativní. Na antigen nebo protilátku je kovalentně navázán enzym. V reakční směsi se vyskytuje substrát, který je tímto enzymem přeměňován. Výsledkem katalýzy je barevný produkt, který je stanoven spektrofotometricky nebo na základě fluorescence. Koncentrace barevného produktu je přímo úměrná protilátce nebo antigenu v analytu. Reakce probíhá na dně jamky, kde je antigen nebo protilátka zakotvena sorpcí nebo kovalentní vazbou na nerozpustném nosiči. To usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. Výhodou je, že vzorky vyžadují minimální čistící postupy. ELISA je u mykotoxinů prováděna přímou, nepřímou a kompetitivní metodou.

Při přímé metodě je antigen nejdříve absorbován na pevné fázi. Následně se přidají enzymaticky značené protilátky, které se vážou na antigen. Dále se dodá substrát, který reaguje s enzymem a způsobuje barevnou změnu. Nakonec se použitím stop roztoku zastaví reakce enzymu se substrátem a dojde k další barevné změně, která je detekována spektrofotometricky. Mezi každým krokem je nutné promytí soustavy. Tato metoda je rychlejší ale s vyšším šumem pozadí. Nepřímá metoda začíná stejně jako metoda přímá, imobilizací antigenu na pevný povrch jamky. Liší se tím, že kromě primární protilátky bez enzymu se používá sekundární protilátka, která nese enzym. Výhoda spočívá v možnosti navázání sekundární protilátky na více různých primárních protilátek. V dalších krocích se od sebe metody neodlišují. Obě metody mohou být adaptovány na kompetitivní stanovení. Rozdíl ale spočívá v zahájení metody. Při kompetitivní analýze je nejdříve ke vzorku přidána protilátka, čímž dochází ke spojení mezi antigenem ze vzorku a protilátkou. Vzorek je vložen do jamky, kde je na pevný povrch imobilizován referenční antigen. Smícháním preinkubovaného vzorku se volné protilátky vážou na referenční antigen. Pokračování reakce se liší podle toho, zda je kompetitivní metoda prováděna přímo nebo nepřímou. Varianta přímá již obsahuje enzym na navázané protilátce, zatímco při nepřímé kompetici musí být protilátka s enzymem přidána. Naposledy je přidán substrát, který vyvolá barevnou změnu prostředí. Koncentrace antigenu je měřena interferencí signálů (Tománek 2019). Podle Zheng et al. (2006) je pro mykotoxiny nejběžněji využívána přímá kompetitivní ELISA. K detekci se používá enzym křenová peroxidáza (HRP). Peroxidázová aktivita HRP zesiluje katalýzu  $H_2O_2$  na hydroxylový radikál ( $OH\bullet$ ) reagující s bezbarvým chromogenním substrátem 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinem (TMB), který zbarvuje roztok do modré barvy. Použitím jiných substrátů mohou vznikat odlišné zbarvení roztoků. Po zastavení enzymatické reakce kyselinou je modrý roztok přeměněn na žlutý s maximem absorbance při 450 nm. Intenzita barvy roztoku je nepřímou úměrná koncentraci mykotoxinu ve vzorku nebo standardu. Měřena je UV/VIS spektrofotometrií nebo čtečkou mikrotitračních destiček (Liang et al. 2021).

Ke kvantifikaci mykotoxinů se prodávají předpřipravené kity na konkrétní mykotoxiny, kde bývá stanoven rozsah potravin, které mohou být analyzovány. Hlavní výhodou je, že se touto metodou může testovat více vzorků najednou. Běžně obsahují mikrotitrační destičky 96 jamek, což znamená možnost testovat 96 vzorků včetně kontrol. ELISA může být také využita ke zjištění koncentrace aflatoxinu v krvi. Stanovení je založeno na metabolitu AFB1, kterým je AFB1-lysin. Detekovat je možné hladiny AFB1 od 5 pg/mg albuminu (Kumar et al. 2017).

### 3.5.2 Chromatografické metody

Chromatografické techniky jsou jednou z nejpoužívanějších metod kvantifikace mykotoxinů.

Chromatografie je separační technika využívající odlišných fyzikálně-chemických vlastností látek. Soustavy se skládají ze tří složek. Jsou to stacionární fáze (nepohyblivá), mobilní fáze (pohyblivá) a vzorek. Rozdílná rychlost pohybu složek vzorku na stacionární fázi v soustavě je hlavním principem chromatografie. Různé složky vzorku jsou různou rychlostí unášeny po stacionární fázi, čímž dochází k jejich separaci. Různá rychlost pohybu složek je dána tím, jakou silou se jednotlivé složky poutají ke stacionární nebo mobilní fázi. Složky, které se silně poutají ke stacionární fázi, jsou málo pohyblivé (Záruba et al. 2016). K měření separovaných vzorků se využívají detektory, které využívají různé fyzikálně-chemické vlastnosti mykotoxinů. Finálním záznamem analýzy je chromatogram. Skládá se ze dvou os  $x$  a  $y$ . Osa  $x$  ukazuje retenční čas, je zde vidět rozdělení jednotlivých složek vzorku ve formě píků v závislosti na rychlosti průchodu kolonou. Osa  $y$  ukazuje odezvu detektoru, která je závislá na koncentraci jednotlivých složek vzorku.

#### 1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Stacionární fází je tenká vrstva sorbentu nanosená na podložce. Má vyznačené dvě linie na opačných koncích, kterými jsou startovací linie a čelo. Na startovní linii je nanesen vzorek. Mobilní fáze je pak polární nebo nepolární rozpouštědlo umístěné ve vyvíjecí komoře. Destička je vložena do stacionární komory a vztláním rozpouštědla je vzorek separován směrem k čelu destičky. Látky s vysokou afinitou k rozpouštědlu jsou lokalizované v čele destičky a látky s vysokou afinitou k sorbentu se nachází u startovní linie (Záruba et al. 2016). Pro další stanovení se používá ultrafialový detektor (UV). Tato metoda je nejdostupnější z hlediska finanční náročnosti a přístrojového vybavení. Je vhodná pro rychlá kvalitativní stanovení (Stehlíková 2007). Metoda tenkovrstvé chromatografie je akceptována pro měření aflatoxinů, ale je nahrazována přesnější metodou HPLC (Singh & Mentha 2020). TLC s UV detektorem identifikuje aflatoxiny podle jejich absorpčního a emisního spektra. Nejvyšší absorbance se objevuje při 360 nm pro všechny aflatoxiny, ale emisní vlnové délky se liší. AFB se projevují modrou fluorescencí při 425 nm, zatímco AFG vykazují zelenou fluorescenci při 540 nm (Kumar et al. 2017). Ostatní mykotoxiny, které nejsou přirozeně fluorescenční, vyžadují aplikaci dalších vizualizačních činidel. Pro kvantifikaci DON se využívá chlorid hlinitý ( $AlCl_3$ ) a pro FB1 fluorescamin (Cigić & Prosen 2009).

## 2. Plynová chromatografie (GC)

Tato metoda je specifická tím, že jako mobilní fáze je použit plyn. Nejvíce využívané plyny jsou helium a dusík. Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná směs v koloně. Proud plynu unáší vzorek přes chromatografickou kolonu. Separace je silně závislá na teplotě, proto je celá kolona situovaná v termostatu, kde je možné teplotu regulovat. Důležité je, aby používaný plyn byl čistý a neovlivňoval měření. Proto se do soustavy přidávají trapy, které nečistoty jako uhlovodíky a kyslík zachycují (Razzaghi-Abyaneh 2013). Nevýhodou plynové chromatografie je, že mohou být analyzovány pouze těkavé a tepelně stabilní mykotoxiny (Stehlíková 2007). Takovými jsou například DON, T-2 toxin a ZON. Těkavost může být zvýšena se současným snížením polarity použitím derivatizace. Tímto způsobem mohou být analyzovány i ostatní mykotoxiny (Cigić & Prosen 2009). GC se využívá především pro měření trichothecenů. Výhodou je, že umožňuje měření více mykotoxinů ze vzorku. Je zároveň rychlá, citlivá a přesná s vysokým rozlišením. K detekci separovaných složek vzorku u této metody jsou nejčastěji používány hmotnostní detektory (MS). Tyto detektory nejsou závislé na fyzikálně-chemických parametrech jako absorbance nebo fluorescence, což umožňuje stanovit více mykotoxinů najednou (Hajšlová et al. 2009). Princip spočívá v detekci iontů vzniklých ionizací analytů, což umožňuje jejich identifikaci na základě jejich hmotnostních spekter. Detektor je univerzální, citlivý a vysoce selektivní (Záruba et al. 2016). Dalšími méně využívanými detektory při této metodě jsou elektronový záchyt (ECD) a plamenoionizační detektor (FID) (Haque et al. 2020). ECD detekuje změny hodnoty elektrické veličiny. Může to být elektroodový proud, potenciál nebo kapacita. Změny hodnot jsou vyvolané průchodem látky průtokovou celou detektoru (Záruba et al. 2016). ECD je selektivní detekční metodou pro látky obsahující elektronegativní atomy, jelikož zachycují elektrony a snižují velikost ionizačního proudu (Záruba et al. 2016). FID funguje na bázi spalování a hydrogenaci látek vystupujících z kolony. Vznikají ionty způsobující zrod elektrického proudu, který je měřen mezi dvěma elektrodami s vloženým stejnosměrným napětím (Záruba et al. 2016).

## 3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Princip metody je založen na protékání mobilní fáze stacionární fází, kde dochází k opakovanému stanovení rovnováhy dělených složek vzorku mezi těmito fázemi. Mobilní fáze unáší vzorek chromatografickou kolonou, kde je zakotvena fáze stacionární. Interakce vzorku mezi fázemi postupně rozděluje jeho jednotlivé složky. Kapalinovou chromatografií se stanovují polární, nerozpustné a termálně labilní mykotoxiny. K stanovení mykotoxinů se používají C-18 kolony s reverzní fází. Jsou tvořené silikagelem s oktadecylovými řetězci, které zajišťují nepolární interakce s analyty (Yang et al. 2020). Mezi nejpoužívanější detektory navazující na tuto separační metodu patří detektory ultrafialové (UV), fluorescenční (FLD), hmotnostní (MS) a detektory diodového pole (DAD) (Haque et al. 2020). FLD využívá detekci emisního záření po excitaci analytu primárním zářením Záruba et al. (2016). Singh a Mentha (2020) uvádí FLD detekci jako nejcitlivější metodu ze všech zde zmíněných detekčních metod. Je 10-1000 krát citlivější než UV detekce pro látky absorbující toto záření. Používaná je zejména k měření ochratoxinů. Pro OTA jsou citlivé

metody vyžadovány vzhledem k jejich nižším přípustným množství v potravinách a krmivech. Podle Malíře et al. (2002) ochratoxin A excituje při vlnové délce 340 nm a emituje záření o vlnové délce 465 nm. Detekční metodu je možné použít i na aflatoxiny a zearalenon. Aflatoxiny vykazují absorpční maximum při vlnové délce 365 nm a vyzařují 460 nm. ZON emituje při stejné vlnové délce, ale excituje při 235 nm (Irakli et al. 2017). V současné době nepoužívanější metodou stanovení mykotoxinů v potravinách je HPLC ve spojení s hmotnostním detektorem LC-MS/MS. Pomocí LC-MS/MS je možné stanovit i maskované mykotoxiny. Maskované mykotoxiny unikají standardním detekčním technikám jako UV nebo FLD, což podhodnocuje celkový obsah mykotoxinů v kontaminovaných produktech. Jsou také hůře extrahovatelné z matrice, protože mají vyšší polaritu než volné formy mykotoxinů. (Freire & Sant'Ana 2018).

## 4 Závěr

Mykotoxiny představují výrazný rizikový faktor, co se týče bezpečnosti potravin. Syntéza mykotoxinů je ovlivněna především vhodnou teplotou (4-40 °C), pH (5-7), aktivitou vody (0,8 a více) a přítomností kyslíku. Největší zdravotní riziko představují pro člověka AF a OTA. Produkovány jsou vláknitými mikromycetami spíše v tropických a subtropických oblastech. Ve střední Evropě je nejčastějším kontaminantem potravin DON.

Ke snížení mykotoxinů v potravinách je důležité především jejich trasování ve všech fázích výrobního procesu od pole až ke spotřebiteli. Je třeba vytyčit kritické body, na které je nutné efektivně reagovat. K tomu dopomáhá implementace systému HACCP. V polních podmínkách představují největší hrozbu fusariové mykotoxiny, které jsou také nejčastějším kontaminantem potravin v ČR. Vzhledem k vysoké obtížnosti eliminace mykotoxinů z kontaminovaných komodit, jsou preventivní opatření nejlepším řešením. Účinnou strategií pro snížení kontaminace fusariových mykotoxinů je správná agrikulturní praxe. Střídání zemědělských plodin v osevních postupech a zvyšování jejich odolnosti šlechtěním a aplikací fungicidních přípravků jsou hlavními pilíři polní prevence mykotoxinů. Kromě konvenčních způsobů mohou pomoci novější metody jako očkování netoxigenními mikrobiálními antagonisty. Sklizeň by měla být prováděna v plné zralosti za nízké vlhkosti a ideálně již tříditi zemědělské komodity podle kvality. Při skladování potravin se nejvíce využívá znalostí ekologické niky mikromycet, jelikož na rozdíl od polních podmínek je ve skladových podmínkách možné kontrolovat abiotické faktory pro růst plísní. Ty by měly být cílené proti kontaminantům potravin posklizňového období rodům *Aspergillus* a *Penicillium*. K zamezení růstu se aplikují fungistatické látky, snižuje se teplota, koncentrace kyslíku a upravuje pH, ale neúčinnější je redukce vlhkosti. Prostory je nutné pravidelně čistit a dezinfikovat. Další výrobní postupy v rámci preventivních opatření využívají konzervační techniky.

Použití všech výše uvedených metod stále nezaručuje potravině nulový výskyt mykotoxinů. Je nutné průběžné monitorování a aplikace účinné detoxifikační strategie k odstranění vzniklých ohnisek. Eliminace mykotoxinů je složitý proces, kvůli jejich vysoké odolnosti a stabilitě. V současnosti se nejvíce využívají fyzikální metody dekontaminace. Prvním stupněm detoxikace by měla být vždy separace vysoce infikovaných komodit. Ozařování potravin se ukázalo efektivní proti AF, OTA a PAT. Fusariové mykotoxiny jsou redukovány mytím obilí. Sorbenty se využívají jako přídatek krmných směsí, čímž je zabraňováno sekundární kontaminace živočišných produktů. Chemické detoxikační metody jsou rychlé a účinné, ale jejich využití je regulováno nařízením evropské komise (ES) č. 1881/2006. Perspektivním způsobem detoxikace potravin se do budoucna jeví biologické metody, jelikož mohou být efektivnější, vysoce selektivní a nedochází k ničení nutričních látek.

Plísně vznikají také přímo u konzumentů v domácnosti. Je nutné skladovat potravinu v suchu, chladu, v neporušených obalech a dodržovat pokyny pro skladování od výrobce. Nahnílé potraviny je třeba zlikvidovat, protože se mykotoxiny mohou dostávat hluboko do substrátu.

## 5 Literatura

Zdroje:

Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T. 2020. advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods* **9**:137 Available from: <https://doi.org/10.3390/foods9020137>

Ahlberg SH, Joutsjoki V, Korhonen HJ. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology* **207**:87-102

Baliukoniene V, Bakutis B, Stankevicius H. 2003. Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Annals of agricultural and environmental medicine* **2**:223-227

Bata Á, Lásztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* **10**:223-228

Bbosa GS, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW, Kyegombe DB. 2013. *Aflatoxins-recent Advances and Future Prospects*. IntechOpen, London

Bennet JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **3**:497-516

Betina V. 1990. *Mikotoxíny chémia - biológia - ekológia*. ALFA. Bratislava

Boevre MD, Graniczowska K, Saeger SD. 2014. Metabolism of modified mycotoxins studied through in vitro and in vivo 3 models: An overview. *Toxicology Letters* **233**:24-28

Bryden WL. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* **173**:134-158

Castegnaro M, Maru V, Petkova-Bocharova T, Nikolov I, Bartsch H. 1991. Concentrations of ochratoxin A in the urine of endemic nephropathy patients and controls in Bulgaria: lack of detection of 4-hydroxyochratoxin A. *IARC Scientific Publications* **115**:165-169

Cigić IK, Prosen H. 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* **10**:62-115

Cimbalo A, Garrido A, Font G, Manyes L. 2020. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology* **137**:111161. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111161>

Čolović R, Puvača N, Cheli F, Avantaggiato G, Greco D, Duragić O, Kos J, Pinotti L. 2019. Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *Toxins* **11**:617 Available from: <https://doi.org/10.3390/toxins11110617>

De Ruyck K, De Boevre M, Huybrechts I, De Saeger S. 2015. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutation Research* **766**:32-41

Degen GH, Partosch F, Muñoz K, Gundert-Remy. 2017. Daily uptake of mycotoxins - TDI might not be protective for nursed infants. *Toxicology Letters* **277**:69-75

El-Hack MEH, Samak DH, Noreldin AE, El-Naggar K, Abdo M. 2018. Probiotics and plant-derived compounds as eco-friendly agents to inhibit microbial toxins in poultry feed: a comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research* **25**:31971-31986

EVROPSKÁ KOMISE. Doporučení Komise č. 2006/583/ES ze dne 17. srpna 2006 k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin L 234/35. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0583>

EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (ES) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj/eng>

EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32007R1126>

EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (EU) č. 1058/2012 ze dne 12. listopadu 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity aflatoxinů v sušených fících. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32012R1058>

EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (EU) č. 2015/1137 ze dne 13. července 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limit ochratoxinu A v kořeni *Capsicum* spp. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32015R1137>

Fang J., Zhu P., Yang Z., Peng X., Zuo Z., Cui H., Oujang P., Shu G., Huang C. Liu W. 2019. Selenium ameliorates AFB 1– induced excess apoptosis in chicken splenocytes through death receptor and endoplasmic reticulum pathways. *Biological Trace Element Research* **187**:273-280.

Fialka J. 2021. Zpráva o činnosti systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2020. eAGRI. Available from: [https://eagri.cz/public/web/file/684460/RASFF\\_2020.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/684460/RASFF_2020.pdf)

Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayada A, Soulaymani R., Creppy EE. 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Human & Experimental Toxicology* **21**:241-245

Freire L, Sant'Ana AS. 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects, *Food and Chemical Toxicology* **111**:189-205

González-Jartín JM, Alves LC, Alfonso A, Piñeiro Y, Vilar SY, Gomez MG, Osorio ZV, Sainz MJ, Vieytes MR, Rivas J, Botana LM. 2019. Detoxification agents based on magnetic nanostructured particles as a novel strategy for mycotoxin mitigation in food. *Food Chemistry* **294**:60-66

Hajšlová J, Zachariášová M, Malachová A, Kostelanská M, Kocourek V, Poustková J, 2008. Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech. Výzkumný ústav rostlinné výroby 2008/1 Available from: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2008/projekt1.pdf>

Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, He C. 2020. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review . *Microbial Pathogenesis* **142**:104095 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>

Hrdina V, Hrdina R, Jahodář L, Martinec Z, Měrka V. 2004. Přírodní toxiny a jedy. Galén, Praha

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1993. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 56.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513574/>

Irakli MN, Skendi A, Papageorgiou MD. 2017. HPLC-DAD-FLD Method for Simultaneous Determination of Mycotoxins in Wheat Bran. *Journal of Chromatographic Science* **7**:690-696

Kabak B, Dobson ADW, Var I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**:593-619

Kalhotka L. 2014. Mikromycety, vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky v prostředí člověka. Mendelova univerzita, Brno

Khaneghah AM, Martins L, Morgan von Hertwig A, Bertoldo R, Sant'Ana AS. 2018. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing. *Trends in food science & technology* **71**:13-24

Khoury A, Atoui A. 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins (Basel)* **4**:461-493

Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. 2017. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>

Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. 2015. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Surgical Oncology Clinics of North America* **1**:1-17

Li Y, Wang Z, Beier RC, Shen J, De Smet D, De Saeger S, Zhang S. 2011. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**:3441-3453

Liang M, Zhang Q, Peiwu L. 2021. Advances in Visual Immunoassays for Sensitive Detection of Mycotoxins in Food-A Review. *Chemistry proceduring*. Available from: <https://doi.org/10.3390/CSAC2021-10443>

Luo Y, Liu X, Li J. 2018. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control* **89**:123-132

Malíř F, Ostrý V. 2007. Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Ochratoxin A v potravinách. Státní zdravotní ústav 14/2006 Available from: [http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info\\_2006\\_14\\_OTa\\_deklas.pdf](http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_14_OTa_deklas.pdf)

Malíř F, Ostrý V. 2012. Aflatoxiny - toxické účinky u člověka. *Journal of nursing and social sciences related to health and illness* **14**:85-93

Malíř F, Ostrý V, Pfohl-Leszkowicz A, Malíř J, Toman J. 2016. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins* **8**:191 Available from: <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>

Malíř F, Roubal T, Severa J, Černá M, Brndiar M. 2002. Stanovení ochratoxinu a (OTA) v lidských ledvinách. Vojenské zdravotnické listy 2002/1. Available from: <https://mmsl.cz/pdfs/mms/2002/01/08.pdf>

Ostrý V. 1998. Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní ústav, Praha

Ostrý V. 2000. Mikroskopické vlákňité houby Účinky mykotoxinů na lidské zdraví. Vesmír **79**:187-189

Pal S, Singh N, Ansari KM. 2017. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. Toxicological Research **6**:764-771

Pitt JI, Hocking AD. 2009. Fungi and food spoilage. Springer, New York

Plestina R, Stavljenic A, Ceovic R, Fuchs R. 1991. Haematological features of the population of the area of Croatia, Yugoslavia, endemic for Balkan nephropathy. IARC Scientific Publications **115**:43-46

Radová-Sypecká Z, Hajšlová J. 2003. Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření. Vědecký výbor fytosanitární a životní prostředí 4/2002 dostupné z: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2002/vvf-04-02.pdf>

Razzaghi-Abyaneh M. 2013. Aflatoxins - recent advances and future prospects. InTech, Rijeka

Rogowska A, Pomastowska P, Sagandykova G, Buszewski B. 2019. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. Toxicon **162**:46-56

Schatzmayr G, Zehner F, Taubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP, Binder EM. 2005, Microbiologicals for deactivating mycotoxins. Molecular Nutrition & Food Research **50**:543-541

Scudomore KA, Banks JN. 2004. The fate of mycotoxins during cereal processing. Proceedings of the Second World Mycotoxin Forum Available from: [https://www.researchgate.net/publication/283548803\\_The\\_fate\\_of\\_mycotoxins\\_during\\_cereal\\_processing](https://www.researchgate.net/publication/283548803_The_fate_of_mycotoxins_during_cereal_processing)

Stehlíková J 2007. Zavedení stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA. Buletin NRL 1/2007 dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/220117/Bulletin\\_NRL\\_12007.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/220117/Bulletin_NRL_12007.pdf)

Stockmann-Juvala H, Savolainen K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. Human & Experimental Toxicology **27**:799

Streit E, Nahrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G. 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. Journal of the Science of Food and Agriculture **12**:2892-2899

Sudakin DL 2003 Trichothecenes in the environment: relevance to human health. Toxicology Letters **143**:97-107

Suchý P, Herzig I. 2005. Plísňe a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. VÚŽV Praha. Available from: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Herzig-Such%C3%BD-Plisne-a-mykotoxiny-2005.pdf>

Tománek R. 2019. Metoda ELISA aspekty jednotlivých uspořádání. Available from: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/> (accessed March 2022).

Tran-Dinh N, Pitt JI, Carter DA 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research* **103**:1485-1490

Tripathi S, Mishra HN. 2010. Enzymatic coupled with UV degradation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Journal of food quality*, **33**:186-20

Velišek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II*. OSSIS, Tábor

Vidal A, Sanchis V, Ramos AJ, Marín S. 2016. The fate of deoxynivalenol through wheat processing to food products. *Current Opinion in Food Science* **11**:34-39

Wheeler KA., Hurdman BF., Pitt JI 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* **12**:141-150

Yang Y, Li G, Wu D, Liu J, Li X, Luo P, Hu N, Wang H, Wu Y. 2020. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* **96**:233-252

Záruba K, Král V, Mestek O, Řezanka P, Setnička V, Urban Š, Volka K. 2016. *Analytická chemie 1. díl*. Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, Praha

Zhao LH, Guan S, Gao X, Ma QG, Lei YP, Bai XM, Ji C. 2010. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* **110**:147-155

Zheng MZ, Richard JL, Binder J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* **161**:261-273

## 6 Reference Obrázků

Obrázek 1: Zhang X, Kuca K, Dohnal V, Dohnalová L, Wu Q, Wu C 2014. Military potential of biological toxins. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/262878341\\_Military\\_potential\\_of\\_biological\\_toxins](https://www.researchgate.net/publication/262878341_Military_potential_of_biological_toxins)

Obrázek 2: Heussner A, Auslander S, Dietrich DR. 2010. Development and Characterization of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin B and Its Application in ELISA. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/45267349\\_Development\\_and\\_Characterization\\_of\\_a\\_Monoclonal\\_Antibody\\_against\\_Ochratoxin\\_B\\_and\\_Its\\_Application\\_in\\_ELISA](https://www.researchgate.net/publication/45267349_Development_and_Characterization_of_a_Monoclonal_Antibody_against_Ochratoxin_B_and_Its_Application_in_ELISA)

Obrázek 3: Loi JD, Zhou T, Tsao R, Marcone MF. 2017. Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/316866233\\_Mitigation\\_of\\_Patulin\\_in\\_Fresh\\_and\\_Processed\\_Foods\\_and\\_Beverages](https://www.researchgate.net/publication/316866233_Mitigation_of_Patulin_in_Fresh_and_Processed_Foods_and_Beverages)

Obrázek 4: Radová-Sypecká Z, Hajšlová J. 2003. Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření. Available from: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2002/vvf-04-02.pdf>

Obrázek 5: Dall'Astra C, Galaverna G, Aureli G, Dossenra A, Marchelli R. 2008. A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in corn and corn-based products. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/250302458\\_A\\_LCMSMS\\_method\\_for\\_the\\_simultaneous\\_quantification\\_of\\_free\\_and\\_masked\\_fumonisins\\_in\\_corn\\_and\\_corn-based\\_products](https://www.researchgate.net/publication/250302458_A_LCMSMS_method_for_the_simultaneous_quantification_of_free_and_masked_fumonisins_in_corn_and_corn-based_products)

Obrázek 6: Wu Q, Wang X, Nepovimova E, Wang Y, Yang H, Li L, Zhang X, Kuca K. 2017. Antioxidant agents against trichothecenes: New hints for oxidative stress treatment. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/321448990\\_Antioxidant\\_agents\\_against\\_trichothecenes\\_New\\_hints\\_for\\_oxidative\\_stress\\_treatment](https://www.researchgate.net/publication/321448990_Antioxidant_agents_against_trichothecenes_New_hints_for_oxidative_stress_treatment)

Obrázek 7: Klich M. 2009. Health effects of Aspergillus in food and air. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Health-effects-of-Aspergillus-in-food-and-air-Klich/755985f5eab550369f2a1f4969e55f0ca590632e>

## 7 Seznam použitých zkratek a symbolů

- (AFB1) aflatoxin B1
- (AFB2) aflatoxin B2
- (AFG1) aflatoxin G1
- (AFG2) aflatoxin G2
- (ATA) Alimentární Toxická Aleukie
- (Aw) aktivita vody
- (DON) deoxynivalenol
- (ECD) detektor elektronového záchytu
- (FB1) fumonisin B1
- (FID) plamenoionizační detektor
- (GC) plynová chromatografie
- (GIT) gastrointestinální trakt
- (HPLC) Vysokoučinná kapalinová chromatografie
- (IARC) Imunoafinitní chromatografie
- (*In vitro*) mimo živý organismus „ve skle“
- (*In vivo*) na živém organismu
- (LC-MS/MS) tandemové hmotnostní spektrometrie
- (LD50) střední letální dávka
- (MS) Hmotnostní spektrometrie
- (OTA) ochratoxin A
- (PAT) patulin
- (TDI) tolerantní denní příjem
- (TLC) tenkovrstvá chromatografie
- (UV) Detekce v ultrafialové části spektra
- (ZON) zearalenon