

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Detekce mikrobiální kontaminace molekulárně-
biologickými metodami v kořeninové paprice**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D

Vypracoval:

Zuzana Machálková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Detekce mikrobiální kontaminace molekulárně-biologickými metodami v kořeninové paprice** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Obrovský dík patří Ing. Tomášovi Vyhnánkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu celého zpracování bakalářské práce věnoval.

Dále chci poděkovat MVDr. Ing. Václavovi Trojanovi, Ph.D. za spolupráci při zpracování práce.

Také bych ráda poděkovala Ing. Pavlovi Hanáčkovi, Ph.D. za odborné vedení při zpracování praktické části.

Velký dík patří doc. Ing. Ivaně Šafránkové, Ph.D. za odbornou pomoc se zpracováním výsledků.

Nesmím opomenout poděkovat firmě Triumf International s.r.o. za poskytnutí vzorků.

Závěrem je mou milou povinností poděkovat své rodině za poskytnutí zázemí a umožnění studia a svému příteli za obrovskou psychickou podporu.

ABSTRAKT

Detekce mikrobiální kontaminace molekulárně-biologickými metodami v kořeninové paprice

Kořeninová paprika patří mezi jedno z nejvyužívanějších koření v mnoha částech světa. Přítomnost nežádoucích patogenů může být závažným problémem pro konzumenty. Zvláště kontaminace mikroskopickými houbami, z nichž někteří zástupci produkují mykotoxiny, představuje pro člověka velkou hrozbu. Dnešní konvenční metody pro určování kontaminací mikroorganismy jsou náročné na čas a některé méně časté druhy patogenů může být obtížné určit. V rámci bakalářské práce byly aplikovány metody molekulární biologie pro detekci kontaminace ve vzorcích kořeninové papriky. Pro sekvenaci byly vybrány ITS oblasti, které vykazují vysokou variabilitu u jednotlivých druhů organismů a jsou vhodným nástrojem pro jejich taxonomii. Díky sekvenační analýze ITS oblastí, byly identifikovány sekvence o vysoké podobnosti s ITS oblastmi mnoha zástupců mikroskopických hub zejména ze třídy *Ascomycotina*, *Deuteromycotina* a několika druhů kvasinek. V práci se jednalo o kvalitativní nikoli o kvantitativní detekci, která nevylučuje zdravotní nezávadnost vzorků, která je prokázána protokoly o zdravotní nezávadnosti.

Klíčová slova: *Capsicum*, paprika, sekvenování, PCR, mikroskopické houby

ABSTRACT

The detection of microbial contamination molecular-biological methods in spice paprika.

Dried pepper is one of the most used spice in many parts of the world. The presence of undesirable pathogens can be a serious problem for consumers. Especially contamination by microscopic fungi, some of which produce mycotoxins representatives, poses a great threat to humans. Today's conventional method for determining contamination by microorganisms are time consuming and some less common types of pathogens can be difficult to determine. In the context of this thesis were applied molecular biology methods for detection of contamination in samples of pepper. There were selected ITS regions for sequencing, which show high variability between species and organisms are an appropriate tool for the taxonomy. The sequence analysis of the ITS regions were identified by sequence high similarity with the ITS regions of many microscopic fungi especially representatives of the class of *Ascomycotina*, *Deuteromycotina* and several yeast species. The work was a qualitative rather than a quantitative detection, which does not exclude the wholesomeness of the samples, which is proven by health protocols.

Key words: *Capsicum*, pepper, sequencing, PCR, microscopic fungi

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍLE PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	<i>Capsicum</i>	11
3.1.1	Systematické zařazení druhu	11
3.1.2	Původ a rozšíření	12
3.1.3	Plody	12
3.1.4	Významné látky obsažené v paprice.....	13
3.2	Zpracování papriky	15
3.2.1	Zpracování koření	15
3.2.2	Využití koření	17
3.3	Kontaminace koření	17
3.3.1	Kontaminace mikroorganismy.....	17
3.3.2	Prevence.....	18
3.3.3	Detekce mikroskopických hub.....	19
3.4	Identifikace mikroskopických hub pomocí metod na bázi DNA.....	20
3.4.1	Hybridizace nukleových kyselin.....	20
3.4.2	Detekce pomocí metod na bázi PCR	20
3.4.3	Sekvenování.....	22
3.5	Houby.....	22
3.5.1	Třída <i>Ascomycotina</i> – houby vřeckaté.....	23
3.5.2	Přehled významných rodů	23
3.5.3	Kvasinky	24
4	MATERIÁL A METODY	25
4.1	Materiál	25

4.2	Metody	26
4.2.1	Izolace DNA	26
4.2.2	PCR amplifikace	26
4.2.3	Klonování.....	28
4.2.4	Vyhodnocení výsledků sekvenace	30
5	Výsledky a diskuze	31
5.1	Metodický postup (strategie).....	31
5.1.1	Izolace DNA	32
5.1.2	PCR amplifikace	33
5.1.3	Klonování.....	34
5.2	Interpretace sekvenačních dat	34
5.2.1	Vzorek č. 1 – Paprika sladká, 140ASTA	35
5.2.2	Vzorek č. 2 – Paprika pálivá, 80ASTA	36
5.2.3	Vzorek č. 3 – Paprika pálivá, 60ASTA	38
5.2.4	Vzorek č. 4 – Paprika sladká, 60ASTA	38
5.2.5	Vzorek č. 5 – Paprika pálivá, H0ASTA – sterilizovaná	40
5.2.6	Vzorek č. 6 – Paprika pálivá, 100ASTA	40
5.2.7	Vzorek č. 7 – Paprika sladká, 100ASTA – sterilizovaná.....	41
5.2.8	Vzorek č. 8 – Paprika sladká, 100ASTA	42
5.2.9	Vzorek č. 9 – Paprika sladká, 80ASTA	43
5.3	Nezávadnost zkoumaných vzorků.....	43
6	ZÁVĚR	45
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
8	SEZNAM OBRÁZKU A TABULEK	55
9	PŘÍLOHY	56

1 ÚVOD

Kořeninová paprika je významnou komoditou dnešního trhu. Využívá se především v potravinářství pro zkvalitnění chuti a vzhledu potravin. Plody i v sušeném stavu si zachovávají mnoho prospěšných látek pro zdraví člověka. Prospěšnost a výhody tohoto koření však mohou být významně ovlivněny případnou kontaminací mikroskopickými houbami. Kontaminace může vzniknout během růstu, skladování plodů i koření a ve zpracovatelském procesu. Nebezpečí plísni spočívá v produkci mykotoxinů, které některé druhy mohou produkovat. Mykotoxiny jsou jedovaté látky, často karcinogenní či jinak negativně ovlivňující organismus člověka. V zájmu producentů kořeninové papriky je předcházet a odstraňovat tyto kontaminace. Samotná detekce kontaminace není vždy snadná a konvenční metody nabízejí časově zdlouhavou a někdy nepřesnou identifikaci mikroorganismů. Je tedy třeba začít se zabývat rychlejšími a přesnějšími metodami pro kvalitativní i kvantitativní zjištění kontaminace.

Využití metod molekulární biologie může nabídnout přesnou a rychlou identifikaci patogenů. Detekce přítomnosti DNA plísni, s využitím sekvenačních metod, umožňuje objevení i málo známých či vzácných druhů mikroskopických hub, které by konvenční metody nemusely být schopny zachytit. Zajímavé je právě využití sekvenace ITS oblastí. Jedná se o nekódující oblast ležící na chromozomu mezi geny pro malou a velkou podjednotku ribozomu. Tyto oblasti vykazují u jednotlivých druhů velkou variabilitu v uspořádání nukleotidů. Pokud známe jejich sekvenci, umožňují nám bezpečně identifikovat a odlišit od sebe jednotlivé zástupce.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma využití metod molekulární biologie pro detekci zdravotně nezávadných potravin se zaměřením na koření a houbové patogeny.
- Izolace nukleových kyselin u vybraných vzorků kořeninové papriky a aplikace metod molekulární biologie pro studium potencionálních mikrobiálních (houbových) kontaminant v kořeninové paprice. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Capsicum*

3.1.1 Systematické zařazení druhu

Podle svých morfoložických a fyziologických znaků je paprika začleněna do následujícího taxonomického rozdělení.

Říše: *Plantae* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)

Třída: *Rosopsida* (vyšší dvouděložné)

Řád: *Solanales* (lilkotvaré)

Čeleď: *Solanaceae* (lilkovité)

Rod: *Capsicum* (paprika)

V dnešní době považujeme za domestikované těchto pět druhů: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* a *Capsicum pubescens*. Některé z těchto druhů mohou být dále seskupovány do druhových komplexů. Rozlišujeme tři druhové komplexy. Každý z nich se skládá z domestikovaných druhů a jejich planých příbuzných. Komplex *Capsicum pubescens* obsahuje málo známý druh *C. pubescens* a jeho plané příbuzné *C. eximium* a *C. cardenasii*. Komplex *Capsicum baccatum* zahrnuje domestikovaný druh *C. baccatum* a plané druhy *C. praetermissum* a *C. tovarii*. Nejpočetnější a nejznámější je komplex *Capsicum annuum*, pod který spadají domestikované druhy *C. annuum*, *C. frutescense*, *C. chinense* a plané druhy *C. chacoense*, *C. galapagoense* (BOSLAND et al., 2012). Existuje obrovské množství odrůd papriky. Každá z těchto odrůd je popsána podle zvyklostí v dané oblasti, původního jazyka a dialektu místní kultury, která se může lišit i na malém území, například od města k městu. Je proto velice složité klasifikovat odrůdy papriky (ADEBISI et al., 2014).

3.1.2 Původ a rozšíření

Dnes známá paprika roční (*Capsicum annuum*) pochází z planě rostoucích druhů, které se i dnes nacházejí na území celé Ameriky. Dle historických pramenů můžeme soudit, že již v 7. století př. n. l. byly využívány pálivé druhy papriky na území dnešního Mexika. Paprika patří mezi plodiny, které na svých cestách objevil Krištof Kolumbus. Díky španělským a portugalským dobyvatelům se pak rozšířila po celém světě. Do Evropy byla dovezena na přelomu 15. a 16. století (BIGGS, 1997). Díky vyšlechtění sladkých odrůd nastal v 19. století přelom v pěstování. Sladké odrůdy jsou někdy také nazývány jako zeleninová paprika (PETŘÍKOVÁ et al., 2012) V českých zemích se paprika začala významněji pěstovat až po roce 1945 (PETŘÍKOVÁ et al., 2006).

Dnes je paprika neodmyslitelnou součástí kuchyně po celém světě. Využívá se ve formě čerstvé (plody) nebo sušené (koření) (AIRAKI et al., 2012). Nejvíce se pěstuje v Americe, Evropě a Asii. Například produkce chilli je velice důležitá pro Chile, kde se pěstuje na více než 5000 ha a ročně je vyprodukováno více než 9000 t (CASTILLO et al., 2013). Nigérie je známá jako jeden z hlavních pěstitelů papriky na světě. Pouze produkce papriky zaujímá přes 50 % z celkové africké výroby. Po nigerijské paprice je velká poptávka díky její ostrosti a výborné chuti (ADEBISI et al., 2014). Sladká paprika (*Capsicum annuum* L.) je v dnešní době často pěstována v mírných oblastech střední Evropy (RASCHE et al., 2006).

3.1.3 Plody

Paprika se konzumuje buď sušená jako koření, nebo čerstvá jako zelenina. V obou případech se konzumují plody. Její plod se nazývá bobule. Obsahuje mnoho malých semen s typickým ledvinkovitým tvarem. Většina semen je zbarvena v odstínech žluté až bílé, tmavá semena zpravidla neklíčí (PETŘÍKOVÁ et al., 2012). Paprika je vysoce ceněná pro své atributy barvy, ostrosti a aromatu (LIU et al., 2010).

Barva je vizuálně nejvýraznější atribut. Plody papriky mohou mít různé barvy. Nejznámější jsou klasické barvy jako zelená, žlutá, oranžová a červená, některé však mohou nabývat i fialových až černých odstínů. Většina paprik v plné zralosti změní barvu ze zelené na některou z výše jmenovaných. Zabarvení paprik způsobují barviva ze skupiny karotenoidů a chlorofylů. Zelenou barvu plodů způsobuje hlavně přítomnost chlorofylu, který je obsažen v chloroplastu. V chloroplastech jsou obsažena i další barviva jako kyslíkaté karotenoidy nebo xantofyly, violaxanthin, neoxanthin,

lutein a β - karoten. Barviva typická pro rod *Capsicum* jsou kapsanthin, kapsorubin a kapsanthin-5,6-epoxid, která způsobují konečnou červenou barvu (u červených druhů paprik) (MARÍN et al., 2004).

3.1.4 Významné látky obsažené v paprice

Zelenina je obecně důležitým zdrojem vitamínů a minerálních látek, které by měly tvořit základní složky lidské stravy. Pravidelný příjem potravin rostlinného původu je nezbytný pro zdraví, správné fungování těla a celkovou pohodu. V dnešní době jsou hlášeny miliony lidí zvláště v rozvojových zemích, kteří trpí nedostatkem těchto živin ve stravě. Tento nedostatek vede k problémům, jako jsou hlad a podvýživa různých typů. V posledních desítkách let se výrazně zvýšilo povědomí o hodnotě zeleniny, zvláště v důsledku vystavení jiným kulturám a dostupnosti informací o správném a zdravém stravování (ADEBISI et al., 2014).

V plodech paprik nacházíme mnoho významných látek pro zdraví člověka. Jedná se o známé antioxidanty, jako jsou vitamíny a karotenoidy. Za pálivou chuť paprik jsou zodpovědné látky zvané kapsaicinoidy, patřící mezi alkaloidy, na které jsou bohaté zvláště pálivé druhy (MATERSKA, PERUCKA, 2005). Vliv na obsah látek v plodech může mít doba a způsob sklizení, skladování a další zpracování papriky (MARÍN et al., 2004).

3.1.4.1 Antioxidanty

Pojem antioxidant dnes můžeme velmi často slyšet ve spojitosti se zdravým životním stylem a správnou výživou člověka. Antioxidanty jsou látky, které jsou schopné vylučovat volné radikály v těle, a tím brání jejich negativnímu dopadu na lidské orgány a tkáně. Jejich funkce spočívá v neutralizaci vysoce reaktivních forem kyslíku, a tím zabraňuje oxidaci nukleových kyselin, proteinů, lipoproteinů a dalších molekul v organismu. Jejich role je však často přeceňována laickou veřejností a mnoho lidí chápe antioxidanty jako zaručený lék proti mnoha chorobám. Ačkoli mají nepopíratelně velký vliv na zdraví, je třeba je chápat jako pomocné látky, nikoli léky. Antioxidanty napomáhají tělu v boji proti rakovině, anémii, diabetu, kardiovaskulárním chorobám a mnoha dalším (ADEBISI et al., 2014).

Kapsaicinoidy jsou látky, které zodpovídají za pálivou pikantní chuť všech pálivých druhů a odrůd paprik. Jsou tvořeny a akumulovány v placentě. Z mnoha přírodních

kapsaicinoidů převládají právě dvě sloučeniny: kapsaicin (trans-8-ethyl-N-vanillyl-6-nonenamid) a dihydrokapsaicin (8-methyl-N-vanillylnonanamid). Tyto dva kapsaicinoidy představují 77–98 % ze všech přítomných kapsaicinoidů v paprice. Kapsaicinoidy obsažené v paprice v menším množství jsou: nordihydrokapsaicin, homokapsaicin, homodihydrokapsaicin, nonivamide a mnoho dalších látek. Kromě pálivosti mají tyto sloučeniny další vlastnosti, včetně biologických účinků na lidské tělo. Slouží například jako antioxidanty, mají antikarcinogenní účinky, v moderní době je jistě nepřehlédnutelná i regulace metabolismu tuků a mnoho dalších vlastností, které vedly k intenzivnímu výzkumu těchto látek (LIU et al., 2010; BARBERO et al., 2014).

V paprice jsou nejvíce zastoupeny vitamíny A a C (BOSLAND et al., 2012). Jejich koncentrace se však mohou významně lišit u jednotlivých odrůd paprik. Proto je nemožné vyjádřit koncentrace vitamínů bez bližšího nahlédnutí do této problematiky. Neustále probíhají výzkumy pro zjištění zastoupení vitamínů v plodech paprik různých odrůd. Ve studii ADEBISI et al. (2014) bylo zjištěno, že obsah vitamínu A je v porovnání s ostatními odrůdami nejmenší u paprik se zelenými plody, koncentrace byla pouze 0.50 ± 0.11 %. Sladké papriky a feferonky mají vyšší obsah a nejvyšší hladiny vitamínu A byly změřeny u kajenských paprik, nám spíše známých jako kozí rohy červené barvy, kdy koncentrace vitamínu A dosahovala až 6.68 ± 0.11 %. Zajímavé je, že v sušené paprice stejné odrůdy klesla koncentrace na 9.216 ± 0.65 %, tedy o skoro 45 % celkového obsahu v plodu. Koncentrace vitamínu C se již tolik nelišily u jednotlivých odrůd, jako tomu bylo u vitamínu A. Průměrná koncentrace u sledovaných vzorků byla 1,54 %. Koncentrací vitamínů s menším zastoupením, jako jsou vitamíny E, niacin (vitamín B₃), vitamin B₆, kyselina listová (vitamín B₉) a vitamín K, se zabýval výzkum EMMANUEL-IKPEME et al. (2014). Koncentrace byly porovnávány mezi třemi druhy paprik, a to: *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens* a *Capsicum genus*. Výsledky ukázaly, že koncentrace všech zmíněných vitamínů, kromě niacinu, je u *Capsicum annuum* prokazatelně vyšší než u zbylých dvou druhů. Koncentrace vitamínu E dosáhla hodnoty 0.71 ± 0.05 %, B₉ 8.14 ± 0.02 % a K 6.68 ± 0.05 %.

3.1.4.2 Minerální látky

Minerální látky jsou podobně jako vitamíny absolutně nezbytné pro správný vývoj a život člověka. Při nedostatku minerálních látek vystavujeme tělo velké zdravotní zátěži.

Obsah minerálních látek (vápníku, sodíku, hořčíku, draslíku, fosforu, mědi, zinku a niklu) byl také zkoumán ve studii EMMANUEL-IKPEME et al. (2014). Výsledky opět prokazatelně ukázaly, že v plodech *Capsicum annuum* je nejvyšší zastoupení těchto chemických prvků. Koncentrace vápníku byla 134.35 ± 1.24 %, sodíku 1.66 ± 0.01 %, draslíku 349.42 ± 0.04 %, fosforu 37.24 ± 0.03 %, mědi 26.92 ± 0.05 %, niklu 2.11 ± 0.05 %. Z uvedených koncentrací lze říci, že paprika je velmi bohatá na vápník a draslík.

3.2 Zpracování papriky

Hlavní využití plodů papriky je pro výrobu koření, barevných extraktů a oleoresinu. Oleoresin je extrakt z plodů paprik, používaný pro vylepšení chuti a barvy mnoha potravin. Čerstvé i sušené papriky jsou používány jako koření a přídatné látky do jídel. Čerstvá paprika je pak používána do salátů, konzumována jako dušená, přidává se na pizzu, do sekané nebo konzumována čerstvá jako obloha (PRAKASH, EIPESON, 2003).

Plody lze také konzervovat a nakládat. Nakládané papriky si v poslední době získaly na popularitě. Často bývají použity do různých jídel a omáček. Například salsa je kombinace papriky, rajčat a cibule a v některých zemích je používána častěji než kečup. Mexickou kuchyni si bez pálivých druhů paprik nedokážeme ani představit (SMITH et al., 1997). Pojmy chilli a paprika označují dehydratovanou formu plodů *Capsicum* sp. V České republice chápeme výrazy paprika a chilli jako rostlinu, plod i koření. V anglické literatuře se však výrazy paprika a chilli myslí pouze koření.

3.2.1 Zpracování koření

3.2.1.1 Příprava plodů před sušením

Plody paprik se sklízí ručně. Plody jsou omyty, vizuálně kontrolovány a rozděleny podle barvy a velikosti. Poté jsou odstraněny stonkové části, jádro plodu, semena a ostatní nechtěné části. Dále se přidávají siričítany pomocí spreje. Siričítany jsou látky

užívané v mnoha potravinách jako konzervanty, působí proti mikroorganismům a zabraňují ztrátě barvy (SMITH et al., 1997).

3.2.1.2 Sušení

Tradičně se plody sušily na slunci, dokud vlhkost nebyla redukována na 10 %, taková vlhkost je vhodná pro transport, skladování, distribuci a další zpracování. Tento způsob sušení trvá většinou 15–20 dní (PRAKASH, EIPESON, 2003). Sušení na slunci bylo běžně používáno v dřívějších dobách a v některých místech se využívá i dnes. Tato metoda je levná, ale vyžaduje příznivé počasí, dlouhé suché dny a dostatečně vysoké teploty (SMITH et al., 1997).

Během let byly vynalezeny metody, které lépe zachovávají ostrost, barvu a další funkční vlastnosti (PRAKASH, EIPESON, 2003). Moderní metody pro sušení jsou efektivnější. Doba sušení je díky nim zkrácena, je zlepšena kvalita produktu a celý proces můžeme lépe kontrolovat. K moderním metodám patří například sušení mrazem nebo sušení v horkovzdušných sušárnách (TONGYI et al., 2004).

Papriky se nejčastěji suší v horkovzdušných sušárnách. Pokud jsou plody větší či dužnatější, je možné je nakrájet na plátky. Některé papriky jsou však sušeny vcelku i se semeny. Počáteční teplota sušení by měla být okolo 80 °C, preferovanější je mezi 70–60 °C, při této teplotě vykazuje koření nejlepší zachování barvy (PRAKASH, EIPESON, 2003). SMITH et al. (1997) ve své publikaci uvádějí přesnou teplotu 76,7 °C. Počáteční teplota může být tedy variabilní a liší se v různých zpracovatelských procesech. V průběhu sušení je však dobré teplotu snižovat a konečná teplota by měla být 62,8 °C nebo nižší. Čím je sušení kratší, tím si výsledný produkt zachovává lepší chuť a barvu. Žádoucí je dosáhnout vlhkosti 5 %.

3.2.1.3 Mletí

V posledních letech se poptávka po mletém chilli rapidně zvýšila, převážně kvůli pohodlí při využívání. Výhodné je také to, že konečné rozemleté sušené různé druhy paprik můžeme smíchat a získat tak směs s požadovanými vlastnostmi. Mletím se také rapidně sníží velikost, ale zároveň zůstávají zachovány výborné vlastnosti plodů.

Pro mletí jsou využívány různé typy strojů. Zahrnují mlýny založené na principech fyzikálních procesů. Moderní mlýny na koření jsou schopné zvládnout velké objemy, bylo u nich optimalizováno dodávání materiálu a zároveň snížena produkce prachu

a hluku. S cílem snížit ztráty těkavých látek a zhoršení kvality bylo zkoušeno také kryogenní mletí (PRAKASH, EIPESON, 2003).

3.2.1.4 Balení

Skladování předpřipravených paprik pro sušení je v perforovaných polyetylenových sáčcích při 3 °C, díky těmto podmínkám je možné, aby se barva konečného produktu dobře vyvíjela.

Celé sušené chilli je baleno do jutových pytlů po 100 kg. Je potřeba zabránit polámání celých suchých plodů. Vlhkost je stále udržována na 10 %. Barva plodů může být tmavší vlivem působení teplotních vlivů. V obchodech se pak skladují v chladárnách.

Pro mleté vzorky je důležité zvolit správný typ balení, aby byla zachována jeho kvalita a funkční vlastnosti během skladování. Musí být zabráněno negativním efektům při absorpci vlhkosti, světelných efektů, oxidaci na vzduchu a vlivům teplot (PRAKASH, EIPESON, 2003).

3.2.2 Využití koření

Konečný produkt se využívá pro dochucování a zlepšování mnoha druhů jídel, včetně konzervovaných potravin. Některé plátky paprik jsou mixovány se solí pro lepší uchovávání při maximálním využití v různých zpracovatelských procesech (SMITH et al., 1997).

3.3 Kontaminace koření

3.3.1 Kontaminace mikroorganismy

Kontaminace potravin mikroorganismy může být závažný problém, pokud se tyto mikroorganismy projeví jako škodlivé pro člověka. Houby jsou převládající kontaminanty koření nejspíše proto, že méně odolné bakterie jsou odstraněny v procesu sušení a skladování. Kontaminace mikroskopickými houbami je nebezpečná zvláště proto, že plísně mohou produkovat mykotoxiny (GARCIA, 2009). Ty mohou způsobovat nižší výnosy, onemocnění nebo smrt (ABBAS, 2005). V koření často bývá nalézán aflatoxin produkováný rodem *Aspergillus*. Kontaminace aflatoxinem byla prokázána v několika zemích jako Etiopie, Itálie, Korea, Turecko a Portugalsko (CHAKRABARTI, ROY, 2003; GARCIA, 2009). Lidé se s těmito nebezpečnými

produkty plísní mohou setkat právě konzumací komodit, které byly vystaveny kontaktu s plísněmi během jejich růstu, zrání a skladování (KENSLETER et al., 2010)

Obecně nejvíce koření je produkováno v zemích s tropickým podnebím, což znamená celoročně vysoké teploty a vysokou vlhkost vzduchu. To je ideální prostředí pro růst plísní (HAMMAMI et al., 2014). Většina koření je významně kontaminována mikroorganismy, které jsou schopné sporulace, tedy vytváření spor, jako jsou právě mikroskopické houby. Vzhledem k hojnému využívání koření v kuchyni může být koření zdrojem spor, které nelze odstranit v procesu vaření a mohou pak napadat lidský organismus (GARBOWSKA et al., 2015). Například v letech 1973–2010 ve Spojených státech, Kanadě, Velké Británii, Francii, Německu, Dánsku a Norsku způsobila spotřeba kontaminovaného koření a bylinek 1946 případů otravy z jídla, 128 hospitalizací a 2 úmrtí (VAN DOREN et al., 2013).

Ačkoli kontaminace koření nebývá rozsáhlá, je třeba kontrolovat celý proces během sklizně, posklizňového zpracování a prodeje (CHAKRABARTI, ROY, 2003). Při hledání původu kontaminace daného vzorku je potřeba zvážit celý vývoj tohoto produktu. V případě kořeninové papriky lze tedy uvažovat již o kontaminaci semen. Rostliny mohou být kontaminovány mikroorganismy z volného prostředí. Kontaminace může vzniknout environmentálními vlivy, jako je hmyz, fekálie a dalším materiálem z hlodavců a ptáků. Nelze opomenout ani vodu, která může být také kontaminována, používanou k zavlažování (GARCIA, 2009). Rostlina však může být kontaminována i samotnými pěstiteli či agrotechnikou. Stejnou cestou mohou být kontaminovány plody při sklizni. Další možnosti, jak se mohou mikroskopické houby dostat k produktu, jsou během skladování plodů, při transportu, jejich zpracování a následnému skladování výsledného produktu. Dále ke kontaminaci může dojít i u odběratelů, v místech prodeje (supermarkety, obchody), a pak samotnými spotřebiteli.

3.3.2 Prevence

V USA reguluje produkci potravin, a tedy i koření, U.S. Food and Drug Administration, dále jen FDA. V roce 1998 vydala několik doporučení pro zlepšení bezpečnosti potravin pěstovaných na farmách. Tato doporučení fungují na sedmi základních principech (GARCIA, 2009):

1. Raději předcházet kontaminaci, než ji později odstraňovat.
2. Minimalizovat nebezpečí a praktikovat správné agronomické a správné procesy.
3. Čerstvé produkty mohou být kontaminovány v jakémkoliv bodu zpracovatelského řetězce.
4. Kvalita vody přímo ovlivňuje potenciální kontaminaci.
5. Živočišná hnojiva a komunální bioodpad musí být aplikovány s opatrností.
6. Důležité je dodržování hygienických a sanitárních předpisů pro pracovníky.
7. Dodržovat všechny zákony a nařízení.

Největší podíl koření je využíván pro masný průmysl, zde tedy vzniká potenciální možnost kontaminace plísněmi a mykotoxiny. Ovšem esenciální oleje přidávané do masných výrobků redukují plísně, a tedy mohou stejně tak dobře redukovat i produkci aflatoxinu (WEIDENBÖRNER, 2001).

3.3.3 Detekce mikroskopických hub

Houby z pěti rodů: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* a *Calviceps* jsou zodpovědné za produkci největší části mykotoxinů, které jsou agronomicky relevantní. Většina z těchto hub napadá rostlinu ještě před sklizní a mohou být tedy označovány jako fytopatogeny. Během procesů po sklizni, jako je skladování a zpracování, mohou při vhodných podmínkách dále růst.

Nejčastější a nejrychlejší metodou, jak zhodnotit daný produkt, je vizuální kontrola. Vzhled nám velmi často a snadno napoví, zda je potravina v pořádku. Není to však metoda příliš spolehlivá.

Běžně používaná metoda je izolace patogena jako axenickou kulturu. V některých případech byla selektivní média vynalezena přímo pro jednotlivé druhy hub. Kultivací může být provedeno několik, než je možné mikroorganismus identifikovat. Identifikace spočívá v charakteristice kolonie, konidií a buněk produkující konidie. Spolehlivá identifikace však vyžaduje značné zkušenosti a velmi ji znesnadňuje plasticita v rámci jednotlivých rodů.

V dnešní době bylo přijato několik vyspělých diagnostických testů, které překonávají mnohé obtíže tradičních metod. Tyto metody jsou založeny především na imunologických metodách a na metodách na bázi DNA, později hlavně

na polymerázové řetězové reakci (PCR) (MAGAN, OLSEN, 2004). V práci bude dále pojednáno pouze o metodách založených na bázi DNA.

3.4 Identifikace mikroskopických hub pomocí metod na bázi DNA

Vzhledem k rozsahu závěrečné bakalářské práce budou popsány pouze nejdůležitější a neznámější metody pro detekci mikroorganismů.

3.4.1 Hybridizace nukleových kyselin

Metoda hybridizace nukleových kyselin je běžně používaná metoda v laboratořích pro studium struktury genů a jejich funkce a nyní byla také adaptována pro identifikaci mikrobů a virů dle přítomnosti RNA nebo DNA (JACKSON, 2013). Tato metoda zahrnuje selekci, klonování a chemické značení (například biotinem digoxideninem nebo ^{32}P) sekvence daného organismu. Chemické značky jsou pak použity jako sondy pro detekci DNA nebo RNA patogenu. Tento test pak dále může zahrnovat detekci nukleové kyseliny na membráně nebo v některých případech využívat formát mikrodestiček podobně jako u imunoanalýz. Použití této metody je limitováno počtem vynalezených specifických DNA sond pro druhy hub. Většina sond byla vyvinuta pro několik druhů rodu *Fusarium* (MAGAN, OLSEN, 2004).

3.4.2 Detekce pomocí metod na bázi PCR

3.4.2.1 Polymerázová řetězová reakce PCR

PCR je základní metoda molekulární biologie. Umožňuje mnohonásobně amplifikovat vybraný úsek genomu. Umožňuje pouze kvalitativní stanovení přítomnosti mikroorganismů. Pro přesnější detekci se proto využívají její modifikace. V posledních výzkumech byly nejčastěji použity qPCR a RT-PCR.

3.4.2.2 Real-time qPCR

Kvantitativní PCR umožňuje kromě detekce daného genu také jeho kvantifikaci. Dnes je využívána modifikace PCR, díky které je možné přímo kvantifikovat PCR produkt v reálném čase, tedy v čase průběhu reakce. Přesná informace o počtu molekul DNA je důležitá při detekci patogenních mikroorganismů. Tato metoda využívá kvantifikace fluorescenčního signálu již ve speciálním termocykleru a není nutné reakci

vyhodnocovat pomocí elektroforézy. V zásadě se využívají tři obecné metody, které používají interkalační barviva vázající se na DNA, fluorescenčně značené sondy a fluorescenčně značené primery. Značení může být jednoduché, kdy jsou navázány pouze fluofory emitující světlo o určité vlnové délce nebo kromě fluoforů mohou také obsahovat zhášecí. Nejběžněji je používáno fluorescenční barvivo SYBR Green, které vydává fluorescenční signál, pokud se naváže na DNA. Dále jsou využívány oligonukleotidové sondy TaqMan. Tyto sondy mají fluorofor i zhášecí. Pokud se sonda naváže na vnitřní část přepisované molekuly DNA, je sonda rozložena za účasti termostabilní DNA-polymerázy, takže je ukončena aktivita zhášecí a fluofor může emitovat záření. Existuje ještě mnoho použitelných technologií jako je přenos FRET, molekulární majáky, Scorpions, AmpliFluor a technologie LUX (ŠMARDA et al., 2008). Kvantitativní PCR (qPCR) vyřešila omezení konvenční PCR, poskytuje nástroj pro přesnou a citlivou kvantifikaci cílové DNA (SARDINĀS et al., 2011). Ta pak může být použita pro kvantifikaci mikroskopických hub. Kvantitativní PCR značně zjednodušila postup vzhledem ke konvenčním kultivačním technikám. Zjednodušení spočívá v kontinuálním monitorování vzorků prostřednictvím amplifikace, což umožňuje snadnou identifikaci buď pomocí fluorescence nespecifických barviv, jako je například SYBR Green, nebo specifickou hydrolýzou sondy (TaqMan) (RODRÍGUEZ et al., 2012).

3.4.2.3 RT-PCR

Zpětná PCR (RT-PCR) umožňuje amplifikovat molekuly RNA. Díky této metodě lze RNA přepsat zpět do DNA, ta je pak označována jako copy DNA (cDNA). Pro přepis RNA do cDNA se využívá retrovirová zpětná transkriptáza a následně se přistoupí k postupu běžné PCR. Tato metoda přináší řadu omezení. Zpětné virové transkriptázy nejsou termostabilní a ztrácí svou funkci již při 42 °C. Dále se RNA často skládá do složitých sekundárních struktur, které znemožňují přepis do DNA (ŠMARDA et al., 2008).

V mykologii se využívá například pro detekci exprese genu pro aflatoxin, kdy je izolována RNA, následně přepsána do cDNA a pomocí qPCR vyhodnocena exprese tohoto genu, a tedy i produkce aflatoxinu. Bylo prokázáno, že exprese koreluje s výsledky chromatografie na tenké vrstvě pro aflatoxin. Přístup RT-PCR umožňuje

určit skutečnou expresi genů pro aflatoxin, což je často více vypovídající než stanovení samotné přítomnosti aflatoxinu (SCHERM et al., 2005).

3.4.3 Sekvenování

Pokud chceme identifikovat přesné druhy nebo alespoň rody mikrobiálních hub obsažených ve vzorcích, je potřeba přistoupit k sekvenování. Sekvenováním se rozumí čtení jednotlivých bází amplifikovaného genu, tedy zjišťování pořadí jednotlivých nukleotidů.

Od objevení možnosti sekvenování bylo vynalezeno bezpočet metod a postupů. Dnešní sekvenace probíhají ve speciálních přístrojích a specializovaných laboratořích. Sangerova metoda sekvenování je jednou ze základních používaných metod pro zjištění pořadí nukleotidů sekvence DNA. Při syntéze vlákna DNA se zabudovávají fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy, které terminují syntézu vlákna. Po dokončení reakce vznikne velký počet DNA fragmentů, jejichž konec je značený pomocí fluorescenčně značeného dideoxyribonukleotidu (OTOVÁ, MIHALOVÁ, 2013). V praxi probíhá zjištění požadované sekvence tak, že se získaný produkt PCR o co největší čistotě pošle do specializované laboratoře, která provede sekvenaci a pošle zpět vyhodnocené sekvence.

Tyto sekvence se dále porovnávají s databázemi. Nejpoužívanější databáze fungují pomocí algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nebo FASTA (Fast Alignment), které na základě podobnosti se sekvencemi již zadanými v databázi vyhodnocují nejpravděpodobnější možnost identifikace dané sekvence pro hledané organismy (ŠMARDA et al., 2008).

3.5 Houby

Houby jsou známé pod různými názvy, užívá se několika vědeckých názvů, jako jsou Fungi, Mycota, Mycetes nebo již nepoužívaný název Mycophyta. Některé jsou pozorovatelné pouze pomocí mikroskopu, jiné pouhým okem. Mycota žijí v nejrůznějších prostředích a na nejrůznějších substrátech. Pro tuto práci jsou významné především patogenní a fytopatogenní houby. Jako fytopatogenní houby označujeme houby, které mohou způsobovat choroby rostlin (KLABAN, 2011). Mezi houby se také řadí všechny kvasinky. Vzhledem k obsáhlosti tohoto tématu budou zmíněny pouze třídy a zástupci významní pro tuto práci.

3.5.1 Třída *Ascomycotina* – houby vřeckaté

Houby vřeckaté jsou také někdy nazývané zastaralým názvem *Ascomycetes*. Získaly svůj název podle vřecka neboli askus, ve kterém se tvoří jejich výtrusy. V této třídě se kromě saprofytických hub nacházejí také ty, které jsou schopné způsobovat choroby lidí, živočichů a rostlin (KLABAN, 2011).

3.5.2 Přehled významných rodů

3.5.2.1 Rod *Alternaria*

Druhy tohoto rodu způsobují poškození pěstovaných rostlin před a po sklizni. Jsou to přirození kontaminanti nadzemních částí rostlin, jsou schopni se rozmnožovat i při nižších teplotách na uskladněném ovoci a zelenině (PATRIARCA et al., 2014). *Alternaria alternata* je kosmopolitně rozšířený saprofyt na stárnoucích rostlinných pletivech. Spory alternarií jsou koncem léta a na podzim hojně zastoupeny ve vzduchu. *Alteranaria alternata* je spojována s rozvojem těžkého astmatu u lidí (GIL et al., 2013). *Alternaria arborescens* často parazituje na rajčeti (*Lycopersicum esculentum*). *Alternaria tenuissima* je saprofyt organických zbytků (SIMONS, 2007).

3.5.2.2 Rod *Aspergillus*

Zástupci tohoto rodu produkují známé mykotoxiny označované jako aflatoxiny. Aflatoxin B1 je jeden z nejnebezpečnějších mykotoxinů pro člověka a zvířata. Druhy *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus terreus* jsou termofilní druhy vyskytující se v široké škále přírodních substrátů (obiloviny, ořechy, potravinářské výrobky, rostlinné zbytky, uskladněné plodiny) (GORRAN et al., 2013). Konidiové stádium, tzv. anamorfa, má svůj vlastní název. Konidiová stádia rodu *Aspergillus* náleží houbám rodu *Eurotium* (KLABAN, 2011). *Eurotium amstelodami* je kosmopolitně rozšířený druh v půdě, v uskladněných nebo rozkládajících se potravinách, ovocných džusech, obilí, ořechích a různých sušených potravinách. *Eurotium niveoglaucum* může kontaminovat plodiny při skladování (LUGAUSKAS, STAKENIENE, 2002).

3.5.2.3 Rod *Fusarium*

Druhy rodu *Fusarium* jsou patogeny především obilovin ve všech fázích jejich vývoje od první fáze klíčení přes růst, sklizeň i skladování. Zvláště v teplých a vlhkých podnebních podmínkách je potřeba vybírat či vytvářet genotypy odolné proti rodu

Fusarium. Zástupci tohoto rodu produkují nebezpečný mykotoxin zvaný vomitoxin, který se může kumulovat v plodinách i krmivech (CHELKOWSKI, 2014). Mezi druhy rodu *Fusarium* patří *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Gibberella fujikuroi*, *Gibberella moniliformis*.

3.5.3 Kvasinky

Kvasinky patří mezi eukaryota a náleží mezi houby. Jejich taxonomie však není jasná. Obecně se zařazují podle způsobu pohlavního rozmnožování mezi třídy hub. U některých kvasinek však není způsob rozmnožování znám. Jeden z jejich největších významů je využití v průmyslu. Některé kvasinky však mohou u člověka a živočichů vyvolávat mykotická onemocnění. Jiné druhy mohou znehodnocovat potraviny (KLABAN, 2011). Například *Cryptococcus foliicola* byla nalezena na listech rostlin a produkuje krémově zbarvené kolonie (WANG et al., 2011a). Další kvasinky nalezené u rostliny jsou například *Cryptococcus heimaeyensis* nebo *Cryptococcus psychrotolerans*, často izolována z ledu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

Pro potřeby bakalářské práce dodala firma Trumf International s. r. o. devět vzorků pálivé a sladké kořeninové papriky (Obr. 1). Všechny tyto vzorky byly analyzovány. Detailní popis vzorků je uveden v tab. 1.



Obr. 1: Dodané vzorky paprik

Tab. 1: Přehled dodaných vzorků papriky.

Číslo vzorku	Název vzorku	Kolorimetrický index	Kód vzorku
1 .	Paprika sladká	140ASTA	EE600393
2 .	Paprika pálivá	80ASTA	EB 680124
3 .	Paprika pálivá	60ASTA	EA680103
4 .	Paprika sladká	60ASTA	EA600118
5 .	Paprika pálivá	H0ASTA steril	EA680095
6 .	Paprika pálivá	100ASTA	EC680090
7 .	Paprika sladká	100ASTA steril.	EC600376
8 .	Paprika sladká	100ASTA	EVESA
9 .	Paprika sladká	80ASTA	EVESA

Zkratky: steril.–sterilizovaná

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA

Každý vzorek poskytnutého koření byl použit pro izolaci DNA. Jednotná navážka pro izolaci byla 20 mg. Izolace DNA byla provedena pomocí komerčně dodávaného DNeasy Plant mini kitu vyráběného firmou Qiagen (QIAGEN, 2012). Tento kit je navržen pro izolaci DNA rostlin, ale protože se osvědčil v diplomové práci TROJAN (2009), byl použit pro izolaci plísňové DNA. DNA byla izolována přímo ze vzorku. Vzhledem ke konzistenci vzorku již nebyl dále mechanicky homogenizován. Při izolaci byl dodržen postup uvedený v DNeasy Plant Handbook. Kvantita a kvalita izolované DNA byla měřena pomocí přístroje UV-spektrofotometru (Picodrop). Pro měření byly použity 2 µl vzorku DNA. Vlnová délka byla zvolena 260 nm a 280 nm. Z poměru absorbance a vlnové délky byla zjištěna poměrně nízká koncentrace DNA (22-30,3 ng/µl) avšak o dobré kvalitě. Vzhledem k nízké koncentraci byly vzorky uchovávány v mrazáku při přibližné teplotě -18 °C, aby bylo zabráněno případné nežádoucí degradaci DNA.

4.2.2 PCR amplifikace

Pro PCR amplifikaci byla použita reakční směs (tab. 2). Pro každý vzorek bylo použito 24 µl reakční směsi a 1 µl templátové DNA. Celkový objem reakce byl tedy 25 µl. Celý obsah mikrozkušavky byl šetrně promíchán mikropipetou. Samotná reakce pak probíhala v termocykleru T3 od firmy Biometra. Teplotní profil byl převzat z práce TROJAN (2009) (tab. 3). Vysoký počet opakování byl zvolen kvůli nízké koncentraci DNA.

Tab. 2: Reakční směs pro PCR amplifikaci

Komponenty reakční směs	Objem pro 1 reakci (µl)
Deionizovaná voda	16,8
Puf	5
dNTP	0,1
Primery F + R	1 + 1
<i>Taq</i> -polymeráza	0,1

Zkratky: dNTP – dinukleotid trifosfát, Primer F + R – forward a reverse primer, *Taq* – *Thermus aquaticus*

Tab. 3: Teplotní profil PCR amplifikace

Fáze reakce	Teplota (°C)	Doba trvání	Opakování
Počáteční denaturace	94	3 min	1x
Denaturace	94	30 s	40x
Annealing	55	30 s	
Elongace	72	1 min	
Konečná elongace	72	10 min	1x

Pro PCR amplifikaci byly použity primery pro ITS (Internal Transcribed Spacer) oblasti. ITS oblasti jsou nejvíce využívány a jsou doporučovány jako univerzální sekvence pro mikroskopické houby, zároveň však vykazují vysokou variabilitu u jednotlivých druhů. Byly použity primery ITS1 a ITS4, které jsou specifické pro všechny skupiny mikroskopických hub. Sekvence primerů je uvedena v tab. 4.

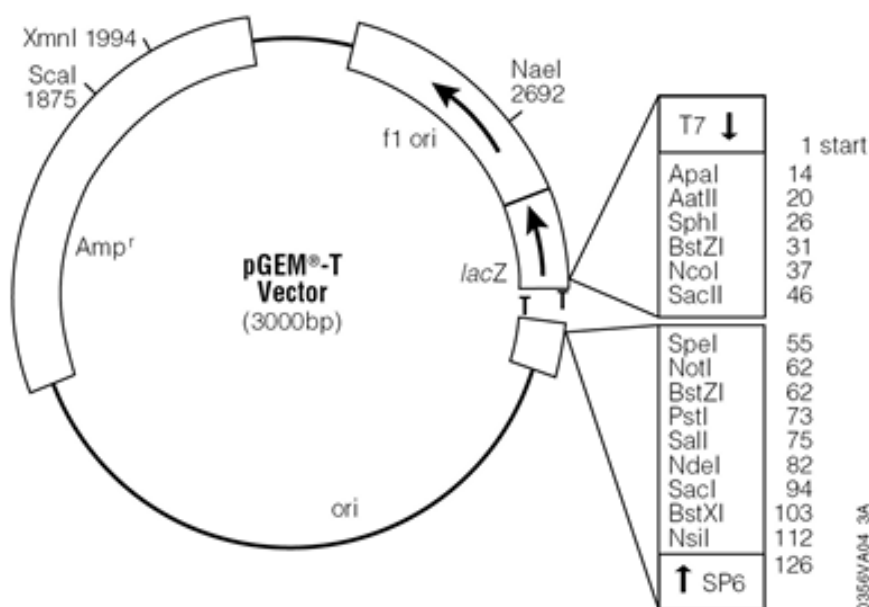
Tab. 4: Sekvence použitých primerů ITS1F a ITS4

Primer	Sekvence	Teplota nasedání (°C)
ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53

PCR amplifikace byla vyhodnocována pomocí gelové elektroforézy na 1 % a 2 % agarózovém gelu.

4.2.3 Klonování

Pro klonovací strategii bylo využito metody klonování pomocí pGEM-T vektoru (Obr. 2).



Obr. 2: pGEM-T vektor (PROMEGA, 2012)

4.2.3.1 Extrakce požadovaného produktu

Nejdříve byla provedena PCR reakce a vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy. Objem vzorků pro elektroforézu byl 23 μ l a byl použit 1 % agarózový gel. Následně byly pod UV světlem za použití ochranných pomůcek a skalpelu vyříznuty požadované produkty o velikosti přibližně 600bp. Velikost 600pb je velikost ITS oblastí u hub (HANÁČEK, 2015 ústní sdělení). Průměrná hmotnost vyříznutých fragmentů byla 0,8 g.

Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu proběhla pomocí protokolu pro Invisorb® Fragment CleanUp (INVISORB, 2014). Pro změření koncentrace vyextrahované DNA byla provedena gelová elektroforéza.

4.2.3.2 Ligace

Dále bylo přistoupeno k ligaci s pGEM-T vektorem (PROMEGA, 2012). Pro ligaci bylo použito 5 μ l vzorku. Poměr inzertu a vektoru byl vypočítán dle vzorce:

$$\frac{\text{hmotnost vektoru (ng)} \times \text{velikost inzertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (ng)}} \times \frac{1}{3} = \text{hmotnost inzertu (ng)}$$

Reakční směs je uvedena v tabulce 5. Reakční směs byla rozpipetována do PCR zkumavek o objemu 0,2 ml. Celkový objem reakční směsi pro 1 vzorek byl 6 µl. Reakční směs byla protřepána a po přidání inzertu ještě jemně promíchána pomocí mikropipety. Pro maximální výtěžek ligace byly vzorky uloženy na 2 dny do chladničky při teplotě 4°C.

Tab. 5: Reakční směs pro ligaci

Komponenty reakční směsi	Objem pro 1 reakci (µl)
2 x konc. pufr pro T4 DNA ligázu (Promega)	5
pGEM-T vektor (25ng)	0,5
T4 DNA ligáza	0,5

Byla provedena gelová elektroforéza pro kontrolu, zda ligace proběhla úspěšně. Dále byla DNA znovu purifikována pomocí Invisorb Fragment Clean Up (INVISORB, 2014).

4.2.3.3 Elektroporace

Pro klonování byly použity bakterie *Escherichia coli* kmen Top 10, které byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -70°C. Po rozmražení bylo k bakteriím přidáno 10 µl ligační směsi. Vzorek byl pomocí mikropipety přenesen do sterilní kyvety. Kyveta byla umístěna do elektroporátoru a reakce proběhla při 12,5 Kv/cm, 25 µF a 400 Ω. Poté bylo ke vzorku přidáno 1ml SOC média a byl přenesen do sterilní mikrozkušavky. Tyto kroky byly opakovány pro všechny vzorky. Mikrozkušavky pak byly kultivovány 30 minut na orbitální třepače při 60 rpm a 37°C.

4.2.3.4 Výsev bakterií

Pro výsev bylo použito selekční médium pro ampicilin (100 µg/ml) a komponenty pro modro-bílé zabarvení bakterií (Xgal – 20 µg/ml, IPTG 0,1 mM). Na medium v Petriho miskách bylo aplikováno přibližně 100 µl bakteriální kultury. Suspenze bakterií byla rozetřena skleněnou tyčinkou. Misky byly uzavřeny, zapáskovány a popsány. Bakterie byly kultivovány přes noc při 37 °C dnem vzhůru.

4.2.3.5 Vyhodnocení klonování

Po kultivaci narostly na médiu modré a bílé kolonie. Bílá barva značila, že klonování proběhlo úspěšně. Na některých miskách narostlo bílých kolonií jen málo. Bylo odebráno vždy osm modrých kolonií od každého vzorku, pokud to počet nakultivovaných bakterií dovozoval. Naamplifikované požadované produkty z těchto kolonií byly odeslány na sekvenaci do firmy Macrogen (Holandsko).

4.2.4 Vyhodnocení výsledků sekvenace

Pro lepší představu je uvedena konkrétní sekvence vzorku 1.

```
AAAAAATTAATCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCG  
GCCGCACTAGTGATTCTTGGTCATTAGAGGAAGTAA AAGTCGTAACAAGG  
TCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAAC  
CACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGA  
CCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACT  
TTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA AAAACTTTTAACAACGGATCT  
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA  
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG  
GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGC  
TTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGT  
CTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGG  
CTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG  
ATACCCGCTGAACTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA AATCCCGCGGCCAT  
GGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATATGGGTCGCT  
AATTA AAACCGGGCCCAAGCGCCAGGGGAGGAAGCAATATCAGGCCCTTC  
CCTAGAAGAGGGGGTTGTGAAAGCCCACTGGCTTCTTACCCTCCTGCCATTA  
ACA
```

V sekvenci byly nejdříve vyhledány sekvence vektoru, které jsou označeny fialově. Následně sekvence primerů, označené modře. Sekvence mezi nimi, je výsledná požadovaná sekvence. Tato sekvence byla zadána do internetové databáze NCBI – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), která je volně dostupná na internetu. Dále byl použit nástroj BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pro zjištění konkrétních mikroorganismů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Metodický postup (strategie)

Kořeninová paprika je jedno z nejpoužívanějších potravinářských aditiv na celém světě. Díky obrovské spotřebě tohoto koření je jeho kontaminace závažným problémem. Mikroskopické houby jsou převládající kontaminanty koření. Nežádoucí obsah mikroskopických hub může tvořit vážné riziko pro zdraví lidí i zvířat. Některé druhy hub parazitující na rostlinách mohou produkovat nebezpečné mykotoxiny (GARCIA et al., 2009). Je potřeba používat rychlé, spolehlivé a přesné metody pro určení mikrobiálních kontaminantů aby bylo možné identifikovat a rychle odstranit poškozené koření. Tuto možnost nám nabízí i metody molekulární biologie (MANDAL et al., 2011).

Dříve, ale i dnes běžné metody pro detekci biologických kontaminantů využívají izolaci mikroorganismů ze vzorků a následně jejich kultivaci na živném médiu. Ve výzkumu HASHEM, ALAMRI (2010) byla použita metoda kultivace pro několik vzorků koření. Jen samotná inkubace trvala 5-10 dní. Záleželo také na použitém médiu a specifitě nároků mikroorganismů na životní podmínky. Tato konvenční metoda je velmi citlivá, není náročná na finanční prostředky a podává kvalitativní i kvantitativní informaci o přítomných patogenech (DOYLE, BUCHANAN, 2012). Vyžaduje však intenzivní práci v laboratoři a je náročná na čas.

Vylepšení biologicko-molekulárních metod a bioinformatiky přináší pozitivní efekt při studii mikrobiologie v potravinách. Detekce mikroorganismů je rychlejší, citlivější a pohodlnější. Moderní metody jsou založeny na bázi nukleových kyselin jako je PCR, RFLP, DNA mikročipy a další (MANDAL et al., 2011). Metoda RFLP byla použita ve výzkumu GALLEGOS-ROBLES et al. (2008) pro detekci druhů *Salmonella* v produkčním systému chilli papriček. Pomocí této metody bylo nalezeno a identifikováno několik druhů rodu *Salmonella*. Ve studii SANTOS et al. (2011) byla potvrzena přítomnost několika druhů rodu *Aspergillus* pomocí PCR metody a následně jejího vyhodnocení pomocí elektroforézy. Využití multiplex PCR byla použita pro rychlé stanovení *Bacillus cereus* ve vzorcích sušené papriky. *Bacillus cereus* byl stanoven u více než 80 % vzorků (CHOO et al., 2007). Převládající kontaminanti ve výzkumu MARTÍN et al. (2005) byl rod *Cryptococcus*, dále byly nalezeny rody

Aspergillus, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Fusarium*. Detekce proběhla pomocí elektrokinetické kapilární chromatografie.

Využití amplifikace genů a sekvenování pomohli k objevení nových patogenů a umožnili jejich lepší klasifikaci. Identifikace na základě sekvence DNA je objektivnější a přesnější než konvenční metody. Zvláště u detekce méně častých či neobvyklých druhů je její využití nepopíratelné. Výklad sekvencí může být obtížný vzhledem k neustále rostoucím databázím a složité mikrobiální taxonomii. Navíc se tyto metody ukázaly jako alternativní a kulturně nezávislé. Využití těchto metod je také omezené kontaminací a někdy nedostatečnou citlivostí. I přes tyto nevýhody, je jejich aplikace ve výzkumech stále atraktivní (YAMAMOTO, HARAYAMA et al., 1995).

Ve studii HAMMAMI et al. (2014) byly identifikovány některé druhy rodu *Aspergillus* pomocí amplifikace a následné sekvenace ITS oblastí. Na základě uvedených informací jsme se rozhodli využít stejnou strategii s primery ITS1 a ITS4 i my. Sekvence byly vyhodnoceny pomocí NCBI a nástroje BLAST. Stejným postupem byla identifikována neškodná houba pro konzumenty *Nectria mauritiicola* v práci TROJAN (2009).

5.1.1 Izolace DNA

Koncentrace DNA, izolované přímo z rozemleté sušené červené papriky, byla měřena pomocí UV-spektrofotometru (Picodrop). Výsledné koncentrace a čistota jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 6.

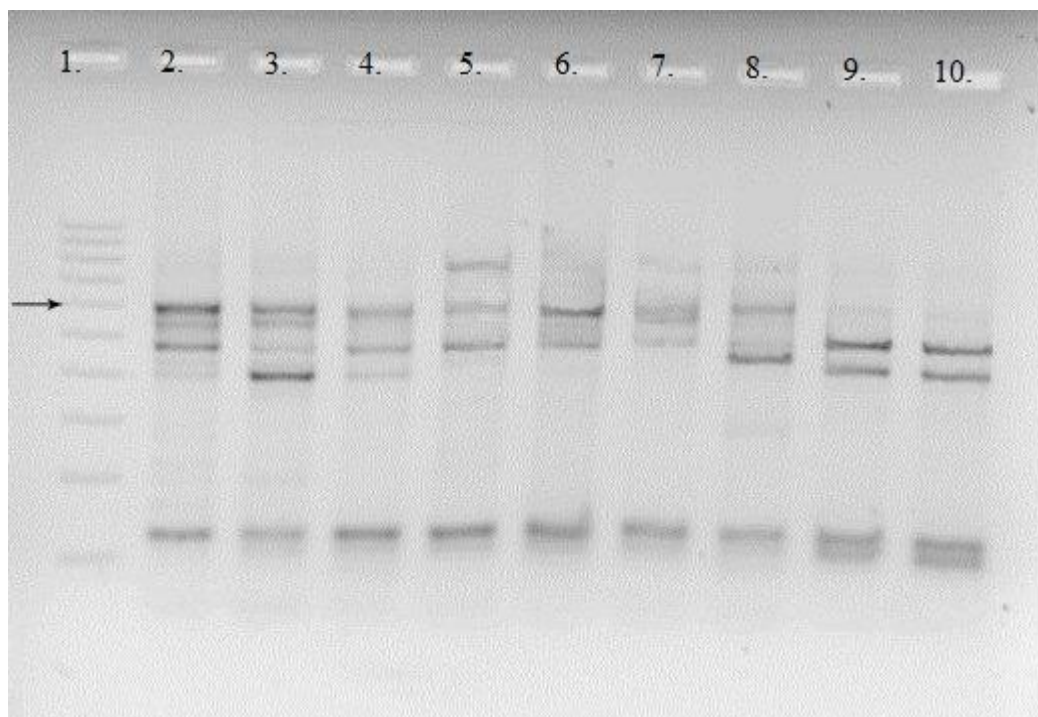
Tab. 6: Výsledné koncentrace a čistota izolované DNA jednotlivých vzorků

Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	Čistota
1	27,6	1,662
2	30,3	1,541
3	22,2	1,417
4	24,8	1,460
5	28,6	1,567
6	22,2	1,584
7	24,3	1,427
8	28,3	1,553
9	24,2	1,425

Výtěžnost nelze porovnat, protože použitý kit je koncipován pro rostliny a pro izolaci z mladých listů. Pro DNA mikroorganismů v DNeasy Plant Handbook (QIAGEN, 2012) nejsou uvedeny koncentrace. Izolovaná DNA vykazuje poměrně dobrou čistotu. DNeasy Plant Handbook uvádí, že purifikovaná DNA dosahuje čistoty 1.7–1.9 při vlnové délce A260/A280, která byla zvolena i při měření vzorků v této práci. Nižší čistota může být způsobena obsahem látek v kořeninové paprice, které negativně ovlivňují čistotu DNA a samozřejmě faktorem lidské chyby. V tomto případě nelze kvantifikovat poměr plísňové DNA a DNA papriky.

5.1.2 PCR amplifikace

Při PCR amplifikaci byly detekovány produkty houbové DNA. Požadovaná velikost produktů byla 600bp. Tato velikost je typická pro ITS oblasti plísni (HANÁČEK, 2015 ústní sdělení) (obr. 3). Na obr.3 lze vidět několik produktů u každého vzorku. Nespecifické produkty ITS oblastí by mohly znehodnotit vzorek pro sekvenaci. Proto bylo dále přistoupeno ke klonování.



Obr. 3: PCR produkty na gelové elektroforéze

1. 1 kb DNA ladder, 2. vzorek č. 1, 3. vzorek č. 2, 4. vzorek č. 3, 5. vzorek č. 4, 6. vzorek č. 5, 7. vzorek č. 6, 8. vzorek č. 7, 9. vzorek č. 8, 10. vzorek č. 9, šipka – vyznačuje produkt o velikosti 600bp charakteristický pro ITS oblast hub

5.1.3 Klonování

Klonování proběhlo pomocí pGEM-T plazmidového vektoru, který byl vložen do bakterií *E. coli*. Po kultivaci bakterií bylo zjištěno, že klonování bylo úspěšné a bylo vybráno až sedm bílých kolonií od každého vzorku. Tyto kolonie byly purifikovány a požadovaná DNA byla poslána na sekvenaci do firmy Macrogen (Holandsko). Dohromady bylo na sekvenaci posláno 45 vzorků. Počet vzorků (klonů) pro sekvenaci od každého vzorku papriky je rozepsán v tabulce 7. Menší počet u některých vzorků papriky byl způsoben nedostatečným nárůstem bílých kolonií bakterií. Nedostatečný nárůst bakterií v některých vzorcích mohl být způsoben nevratným poškozením bakterií při elektroporaci, malou úspěšností vložení vektoru do bakterie, případně faktorem lidské chyby.

Tab. 7: Počet vzorků DNA vybraných pro sekvenaci u jednotlivých vzorků papriky

Vzorek papriky	Počet vzorků DNA pro sekvenaci
1	7
2	7
3	4
4	5
5	7
6	4
7	4
8	4
9	3

5.2 Interpretace sekvenačních dat

V každém vzorku papriky bylo nalezeno několik druhů či rodů hub. Díky množství klonů, které byly poslány na sekvenaci bylo možné nalézt velké spektrum mikroorganismů. Každý vzorek bude popsán zvlášť a bude uvedena vždy sekvence s největší podobností v databázi NCBI. Pokud byla již sekvence uvedena u jednoho vzorku, byla u dalšího vzorku vybrána sekvence, která byla nejpodobnější jako druhá. Přehled identifikovaných sekvencí potencionálních kontaminant na základě srovnání sekvence ITS s databázi NCBI v jednotlivých vzorcích je v tab 8.

Tab. 8: Přehled nalezených hub ve vzorcích

Vzorek papriky	Mikroskopické houby vykazující největší shodu (99 - 100%) se získanými sekvencemi
1	Houby rodu <i>Alternaria</i> a <i>Eurotium</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
2	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Xeromyces bisporus</i>
3	Druhy rodu <i>Eurotium</i> a <i>Verticillium</i> . <i>Cladosporium cladosporioides</i>
4	Druhy rodu <i>Aspergillus</i> . <i>Plectosphaerella cucumerina</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Epicoccum nigrum</i>
5	Druhy rodu <i>Eurotium</i> a <i>Fusarium</i> .
6	<i>Cryptococcus psychrotolerans</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
7	<i>Colletotrichum coccodes</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Gibellulopsis nigrescens</i>
8	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Epicoccum nigrum</i>
9	Druhy rodu <i>Alternaria</i> . <i>Cladosporium cladosporioides</i> (shoda pouze 93%)

5.2.1 Vzorek č. 1 – Paprika sladká, 140ASTA

První sekvence ze sedmi získaných byla sekvence o velikosti 566bp, na základě srovnání v BLAST byla nejvyšší (99 %) podobnost se sekvencí hub rodu *Alternaria* (kód Genbank: KM268674.1) v databázi NCBI (RAJA et al., 2015).

AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAA
 ATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCA
 CCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGG
 ACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT
 TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
 GAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGT
 CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGC
 TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGC
 AGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTT
 TTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Druhy rodu *Alternaria* způsobují před a posklizňové poškození pěstovaných plodin. Jedná se o přirozené kontaminanty nadzemních částí rostlin. Mohou se vyskytovat i na uskladněných plodech (PATRIARCA et al., 2014). Některé druhy

mohou způsobovat skvrnitost paprik (NASEHI et al., 2014). V tomto rodu se však nacházejí i nebezpeční zástupci jako je *Alternaria alternata*. Jedná se o kosmopolitně rozšířenou saprofytickou houbu, vyskytující se na stárnoucích rostlinných pletivech. Spory jsou koncem léta a na podzim hojně zastoupeny ve vzduchu (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). Ke kontaminaci došlo nejpravděpodobněji během dozrávání plodů. *A. alternata* je spojena s mnoha alergiemi dýchací soustavy a rovněž s vývojem těžkého astmatu (GIL et al, 2013).

Dále byla získána sekvence s vysokým stupněm podobnosti s rodem *Eurotium* (AM901691.1) (PITKÄRANTA et al., 2008). Někteří zástupci jsou extrémně xerofilní a byli detekováni v sušeném ovoci i zelenině. Většina zástupců produkuje nebezpečné mykotoxiny (SAMSON et al., 2004). Také se nacházejí jako saprofyty na uskladněných částech rostlin nebo v půdě (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). Ke kontaminaci mohlo dojít během průběhu sušení a skladování koření.

Nejčastěji nalézaná 100 % shoda sekvencí byla u všech vzorků se sekvencí *Cladosporidium cladosporoides* (JX981454.1) (PAWŁOWSKA et al., 2014). Konidie *Cladosporium* spp. jsou nejčastější složkou spor hub vyskytující se ve vzduchu. *C. cladosporioides* je celosvětově rozšířený druh, zejména v oblastech mírného pásu na odumřelých či odumírajících rostlinných substrátech a organickém materiálu (GREGORY, 1973). *C. cladosporioides* bylo izolován z čerstvé zeleniny, pšenice, mouky, ječmene a sušených ryb (SAMSON et al., 2004), proto se těžko určuje doba kontaminace.

Poslední 100 % podobnost sekvence byla získána ve vzorku č. 1 se sekvencí ITS oblasti *Pichia kudriavzevii* (KM282167.1) (RATNA et al., 2014). Jedná se o kvasinku, která byla ve studii MOON et al. (2014) izolována z asijského pokrmu kimchi, jedná se o pokrm vyráběný z nakládané fermentované zeleniny. Způsobují zápach, kažení a změkčení struktury (MOON et al., 2014). Také byla izolována z tradičních fermentovaných afrických jídel. *Pichia kudriavzevii* se podílí na fermentaci (GREPPI et al., 2015). Nelze určit, kdy mohlo být koření touto kvasinkou kontaminováno.

5.2.2 Vzorek č. 2 – Paprika pálivá, 80ASTA

První ze šesti získaných sekvencí byla sekvence o velikosti 548bp, na základě srovnání s BLAST byla vyhodnocena s 99 % podobností pro *C. cladosporioides* (HQ380770.1) (WANG et al., 2011b).

AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTATAAGT
TCACCCAGGCTTGTACAGCTGGGGACTGACAACCCTTTGATTTCCGACTCTG
TTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTC
AAACTCTTGCGTAACCTTTCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA AAAAC
TTTTAACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTTTCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCACTT
CACC ACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCA
AATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGCTGTGGAACTATTCGCTA
AAGGGTGTTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Další získaná sekvence byla vyhodnocena se 100 % shodou jako *Xeromyces bisporus* (JF922073.1) (PETTERSSON et al., 2011). Tato houba je unikátní svou schopností růst i na velmi suchých substrátech s vodní aktivitou (aw) 0,62 (SU-LIN et al., 2011). Občas může způsobovat zkažení produktů s vysokým obsahem cukru (PITT, HOCKING, 2009). Kontaminace mohla vzniknout během uskladnění plodů nebo již hotového produktu, vzhledem ke schopnosti *X. bisporus* žít i na velmi suchých substrátech.

Jako poslední ve vzorku č. 2 byla nalezena sekvence se 100 % shodou s ITS oblastí nebezpečného druhu *Aspergillus fumigatus* (KP131567.1) (IRINYI et al., 2015). Jedná se o celosvětově rozšířený termofilní druh vyskytující se v půdě, na organickém materiálu, na vlhkém uskladněném zrní, mouce, pokrutinách a v silech. Produkuje fumitremorgeny, verukulogen a gliotoxin (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). Přítomnost druhů rodu *Aspergillus* v koření byla zkoumána ve studii HAMMAMI et al. (2014). Na rozdíl od ostatního koření obsahoval chilli prášek nejvíce houbových patogenů. Vybrané vzorky byly identifikovány pomocí amplifikace a sekvenace ITS oblastí (ITS1 a ITS4). Druhy rodu *Aspergillus*, včetně *A. flavus*, byly nejčastěji zastoupeny ve sledovaných vzorcích. Některé byly stále schopny produkovat mykotoxiny. V chilli byly rovněž detekovány mykotoxiny pomocí HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie), fluorescenční detekce a multiplex PCR. Ke kontaminaci mohlo dojít již během růstu rostliny nebo během uskladnění plodů.

5.2.3 Vzorek č. 3 – Paprika pálivá, 60ASTA

První ze čtyř získaných sekvencí ve vzorku č. 3 byla sekvence o velikosti 537bp, která byla identifikována pomocí BLAST se 100 % shodou s ITS oblastí *Verticillium dahliae* (HE972023.1) (TRAN et al., 2013).

```
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG
TATCTACTCATAACCCTTTGTGAACCATATTGTTGCTTCGGCGGCTCGTTCTG
CGAGCCCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATACCAACGATACTTCTGAGT
GTTCTTAGCGAACTATTTAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTAGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTATCCTGGGAGGC
ATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCAGTGGCCCGGTGTTGG
GGATCTACGTCTGTAGGCCCTTAAAAGCAGTGGCGGACCCGCGTGGCCCTT
CCTTGCGTAGTAGTTACAGCTCGCATCGGAGTCCCGCAGGCGCTTGCCTCTA
AACCCCTACAAGCCCGCCTCGTGCGGCAACGGTTGACCTCGGATCAGGTA
GGAATACCCGCTGAACTTAA
```

Zástupci rodu *Verticillium* mohou způsobovat vaskulární vadnutí papriky (KOIKE et al., 2007). Rod *Verticillium* je celosvětově rozšířen a zahrnuje druhy, které způsobují vaskulární vadnutí a předčasné stárnutí mnoha druhů rostlin. Jedná se o ekonomicky významné druhy, jako jsou vojtěška, salát, chmel, olivovník, rajčata, brambory, jahody a řepka (PEGG, BRADY, 2002). Ke kontaminaci mohlo pravděpodobně dojít již během růstu rostliny.

Dále byly sekvence identifikovány nejméně s 99% shodou jako ITS oblasti rodu *Eurotium* (AM901702.1) (PITKÄRANTA et al., 2008) a *Cladosporidium cladosporoides* (HQ380770.1) (WANG et al., 2011b).

5.2.4 Vzorek č. 4 – Paprika sladká, 60ASTA

První z pěti získaných sekvencí měla velikost 604bp ve vzorku č. 4 vykazovala 99 % podobnost s ITS oblastí dalšího nebezpečného druhu *Aspergillus terreus* (JQ697537.1) (ZHOU et al., 2011).

```
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAAGGATCATTACCGAG
TGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTT
```

CGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGACTCGCCCCGGGC
CCGTGCCCCGCCGAGACCTCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCT
GAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTG
TTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCG
GCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTANGC
CCGGCCGGCGCCCCGCCGACGCATTTATTTGCAACTTGTTTTTTTTCCACGTTG
GCCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Aspergillus terreus produkuje mykotoxiny. Nejčastěji se vyskytuje v půdě, na rostlinných zbytcích i uskladněných plodinách nebo v zapařeném organickém substrátu (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). Jeho přítomnost byla zjištěna i v práci MANDEEL (2005) v testovaných vzorcích kardamomu, sušeného citrónu, sušeného zázvoru, kurkumy a bobkového listu. V tomto výzkumu byla testována i paprika a chilli, ale tento druh v ní nebyl objeven. Kontaminace mohla vzniknout během růstu a uskladnění.

S 99 % shodou byla určena *Plectosphaerella cucumerina* (KC845226.1) (ARZANLOU et al., 2013). To je dobře známý patogen několika druhů rostlin. Postihuje ovoce, kořeny a může způsobit úmrtí rostliny. Obecně je hrozbou hlavně pro meloun (*Cucumis melo*) pěstovaný především v Itálii (CARLUCCI et al., 2012). Ve studii CARLUCCI et al. (2012) byla *Plectosphaerella cucumerina* izolována nejen z melounů, ale i z paprik a rajčat. Kontaminace mohla vzniknout během růstu rostliny.

Další získaná sekvence byla porovnána v nástroji BLAST a byla zjištěna 99 % shoda s druhem *Epicoccum nigrum* (AF455403.1) (BUZINA et al., 2003), jde o celosvětově rozšířeného saprofyta sekundárně osídlující odumřelé části rostlin, ale i půdu, semena, lepenku, textilie, hmyz, kůži lidí a sputum. (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). *E. nigrum* může způsobovat zhoršení kvality uskladněných komodit (SHUKLA et al., 2012). Kontaminace mohla vzniknout během růstu a uskladnění.

Opět byla získána sekvence 100% shodná s ITS oblastní druhu *C. cladosporoides* (JX981454.1) (PAWŁOWSKA et al., 2014).

5.2.5 Vzorek č. 5 – Paprika pálivá, H0ASTA – sterilizovaná

První z 6 získaných sekvencí měla velikost 554bp, která je z 99 % shodná se sekvencí pro ITS oblast rodu *Fusarium* (EU049288.1) (VEGA et al., 2010).

```
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG
TTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCA
GCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGT
TTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGCCATTTCAACCCTCAA
GCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGGCCC
CGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCC
TCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCCAACTTCTGAAT
GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
```

Velikost sekvence je 554 bází. Tato sekvence se vyskytuje u druhů rodu *Fusarium*. Zástupci rodu *Fusarium* se nacházejí v půdě, kde se zapojují do rozkladných procesů organických zbytků. Většina se ale vyvinula v patogeny rostlin. Některé druhy navíc produkují mykotoxiny (MALÍŘ et al., 2003). V práci JAMIOŁKOWSKA (2008) byly druhy rodu *Fusarium* izolovány ze semenáček sladké papriky, které vykazovaly jasné příznaky napadení houbovými patogeny, jako bylo poškození stonku, hniloba kořenů, chloróza listů a omezení růstu. Kontaminace s největší pravděpodobností vznikla již během růstu rostlin.

S velkou převahou zde byl nalezen rod *Eurotium* (AM901702.1) (PITKÄRANTA et al., 2008).

5.2.6 Vzorek č. 6 – Paprika pálivá, 100ASTA

První ze tří získaných sekvencí měla velikost 522bp a vykazovala 99 % podobnost s druhem *Cryptococcus psychrotolerans* (NR_111656.1) (DE GARCIA et al., 2012).

```
AAGTCATAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATGAT
GCCCTCGAAGTCTTTGGACTGGTAGGGTTTGTGTTCGGTCTCTTCGGAGTCGA
CCTTATCTCACACACCGTGAACCTGTGGCTTCGGCCATTTACACAAACTGTTA
GTAATGAATGTAAAATCATAACAAACAAATAACTTTTAACAACGGATCTCT
```

TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGT
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAACCTCACCCCACTTGGGT
TTTTGCCCGAGCGGTGGTGGATTGGGTGTTTGCCGTCACTGGCTCGCCTTAA
AAATATAAGCAACCTTGGATGTAATACGTTTCATCCTTCTGGGTGGCTGATA
CCAACCATAACTCATGATCTGGCCTCAATCAGGTAGGGCTACCCGCTGAACT
TAA

Cryptococcus psychrotolerans byl izolován z ledových oblastí v Patagonii a Norsku (DE GARCIA et al., 2012). Možnost kontaminace papriky nelze odhadnout. Někteří zástupci rodu *Cryptococcus* byly izolovány z listů ve studii WANG et al. (2011a). Dále byly tyto kvasinky nalezeny v uzeninách, kde byla přidána kořeninová paprika (MARTÍN et al., 2005). Kontaminace pravděpodobně mohla vzniknout během růstu.

Další získaná sekvence vykazovala 99 % podobnost s kvasinkou *Pichia kudriavzevii* (KM282167.1) (RATNA et al., 2014).

5.2.7 Vzorek č. 7 – Paprika sladká, 100ASTA – sterilizovaná

První ze čtyř získaných sekvencí ve vzorku č. 7 byla sekvence o velikosti 550bp a byla 100% shodná s ITS oblastí druhu *Gibellulopsis nigrescens* (HE972037.1) (TRAN et al., 2013).

AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG
TACTATAACTCATAACCCTTTGTGAACCTTCATACCTGTTGCTTCGGCGGCG
CGCCTCTCGGGGCGTGCCCGCCGGCATTATCAGAATCTCTGTTCGAACCCGA
CGATACTTCTGAGTGTTCTAAGCGAACTGTTAAAACCTTCAACAACGGATCT
CTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCA
GTATCCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCCG
TGGCCCGGCGTTGGGGACCTGCCAGGCAGTCCCCGAAAACCAAGTGGCGGA
CCCGACGGGCCCTTCCTTTGCGTAGTAACATCTGCCTCGCATCGGGAGCCCC
CGGGCTATCCGGCCTCTAAACCCCCCTCAAGCCCGCTCCGGCGGCACCAAG
GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

Gibellulopsis nigrescens nebo také *Verticillium nigrescens* je saprofytická houba žijící v půdě, která může parazitovat na rostlinách (ŠAFRÁNKOVÁ, 2015 ústní sdělení). Byla izolována například ze semen špenátu (IGLESIAS-GARCIA et al., 2013). Kontaminace může vznikat během růstu rostliny.

Další získaná sekvence je z 99 % shodná s *Colletotrichum coccodes* (KC436058.1) (CHENGDE et al., 2012). Tento druh způsobuje antraknózu papriky. Antraknóza je hospodářsky významné onemocnění rostlin v celém světě. Ve studii RAMDIAL, RAMPERSAD (2015) byly určeny jako původci antraknózy právě zástupci rodu *Colletotrichum*. Ve výzkumu HONG, HWANG (1998) bylo zjištěno, že míru patogenity a závažnost choroby silně ovlivňuje hustota a míra inokulace, délka promočení, stáří rostliny a rezistence kultivarů. Kontaminace tedy může vzniknout během růstu rostliny.

Poslední získaná sekvence vykazovala 99% podobnost s ITS oblastí *C. cladosporoides* (JX981454.1) (PAWŁOWSKA et al., 2014).

5.2.8 Vzorek č. 8 – Paprika sladká, 100ASTA

První získaná sekvence má velikost 566bp a je 100 % shodná se sekvencí ITS oblasti houby *Alternaria alternata* (AB369904.1) (SANO et al., 2007).

```
AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAA
ATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCA
CCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCCACCACTAGG
ACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT
TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGT
CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGC
TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGC
AGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTT
TTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
```

Alternaria alternata je zástupce rodu *Alternaria* produkující mykotoxiny. U papriky způsobuje skvrny na listech. Některé rostliny vykazují inhibiční účinky proti této houbě (SID et al., 2003). Může také tvořit nekrotické skvrny na zralých plodech paprik

(HALFON-MEIRI, RYLSKI, 1983). Rostlina byla napadena nejspíše během jejího růstu a zrání plodů.

Dále byly získány sekvence shodné se sekvencemi zástupců *Cladosporium cladosporioides* (JX981454.1) (PAWŁOWSKA et al., 2014) a *Epicoccum nigrum* (AF455403.1) (BUZINA et al., 2003).

5.2.9 Vzorek č. 9 – Paprika sladká, 80ASTA

V posledním vzorku byla získána jako první sekvence o velikosti 566bp, která je 100 % shodná s ITS oblastí rodu *Alternaria* (KM268674.1) v databázi NCBI (RAJA et al., 2015).

```
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAA
ATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCA
CCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCCACCACTAGG
ACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT
TACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGT
CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGC
TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGC
AGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTT
TTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
```

Také byla získána sekvence z 93 % shodná s ITS oblastí *Cladosporium cladosporioides* (JX981454.1) (PAWŁOWSKA et al., 2014).

5.3 Nezávadnost zkoumaných vzorků

Ke každému vzorku kořeninové papriky byl také poskytnut protokol o zdravotní nezávadnosti (příloha 1-9). V těchto protokolech je jasně uvedeno, že vzorky nejsou pro člověka nebezpečné. Stanovený obsah plísní v každém vzorku je méně než 10^3 KTJ (celkový počet životaschopných buněk) v 1 gramu vzorku. Laboratoř, která poskytla tyto protokoly, ovšem nepoužívala stejné metody, jako byly použity v této práci. Metoda použitá v této práci není schopna hodnotit životaschopnost nebo obsah buněk ve vzorku, pouze kvalitativně vyhodnotí, zda je DNA těchto mikroorganismů přítomna či nikoliv a následně lze pomocí sekvenačních metod určit na základě podobnosti

sekvencí druhy či rody přítomných plísní. Proto na základě této práce nelze říci, že jsou vzorky kořeninové papriky závadné. Detekovaná DNA mohla patřit již života neschopným mikroskopickým houbám, které nepředstavují nebezpečí pro člověka.

Otevírají se tedy další možnosti výzkumu, ve kterém by proběhla kvantifikace identifikovaných hub. Dále by se stanovila přítomnost a obsah mykotoxinů, které představují hlavní nebezpečí pro člověka. Kvantifikovat lze mikroskopické houby klasickými kultivačními metodami, lze ale využít i metody molekulární biologie. Například přítomnost rodu *Aspergillus* byla detekována a kvantifikována ve studii SARDIÑAS et al. (2011) pomocí metody qPCR. Metoda byla ve výzkumu optimalizována a její citlivost byla stanovena na 2,5 pq v reakci. Vyvinutá metoda by mohla určit i koncentraci spor s citlivostí od 10⁶ spor v 1 gramu. Metodou qPCR byly již pomocí exprese genů pro produkci mykotoxinů detekovány a kvantifikovány i aflatoxiny. Množství aflatoxinů je v přímé závislosti s expresí jejich genů (RODRÍGUEZ et al., 2012).

6 ZÁVĚR

V práci byly sledovány mikrobiální kontaminace ve vzorcích kořeninové papriky. Kořeninová paprika je jedním z nejvyužívanějších koření na světě. Pro její atributy chuti, barvy a aromatu se často přidává do potravin pro zvýšení atraktivity pro konzumenta. Zvláště pro její velkou oblibu je potřeba detekovat potencionální kontaminaci rychle a přesně. Velké nebezpečí představuje kontaminace plísněmi, z nichž někteří zástupci produkují mykotoxiny, které jsou závadné pro lidské zdraví.

Metoda detekce kontaminant byla částečně přejata z práce TROJAN (2009). Houbová DNA byla izolována přímo ze vzorků. Pro amplifikaci byly využity primery pro ITS oblasti. ITS oblasti jsou vysoce specifické oblasti v genomu. Díky znalosti jejich sekvence lze od sebe odlišit jednotlivé druhy a rody. Vzhledem k nedostačujícím výsledkům PCR amplifikace bylo využito klonování pomocí *E. coli*. Požadované amplifikované produkty byly zaslány na sekvenaci. Získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí databáze NCBI a nástroje BLAST.

Stěžejním výsledkem práce je identifikace mnoha druhů a rodů mikroskopických hub. Identifikace byla provedena na základě porovnání a shody získaných sekvencí s databází NCBI a nástroje BLAST. Mezi neškodnými druhy byly určeny i druhy produkující mykotoxiny. Je však třeba zmínit, že použitá metoda nemůže určit množství ani životaschopnost detekovaných mikroorganismů a tedy nelze říci, zda jsou vzorky závadné.

Tato práce je významná pro další výzkum a uplatnění molekulárně biologických metod v oblasti bezpečnosti potravin. Metody molekulární biologie stále nejsou konvenčně využívány i přes jejich přesnější výsledky a menší časovou náročnost než dnes běžně používané metody.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABBAS H.K., 2005, *Aflatoxin and Food Safety* [online], CRC Press, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
2. ADEBISI J. A., OYEWU E. B., JIBODU I. S., 2014. Vitamins A, C and Lycopene Contents of Some Varieties of Tomato and Pepper in the Southwest Region of Nigeria. *Advances in Life Science and Technology*, 23, 63-67. ISSN 2224-7181
3. AIRAKI M., LETERRIER M., MATEOS R.M., VALDERRAMA R., CHAKI M., BARROSO, J. B., CORPAS, F.J., 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 281-295. ISSN 0140-7791
4. ARZANLOU, M., TORBATI, M., KHODAEI, S., 2013. *Plectosphaerella cucumerina* on bamboo in Iran. Databáze online [cit. 2015-04-20], Dostupné na: ncbi.com
5. BARBERO G.F., RUIZB A.G., LIAZIDA A., PALMA M., VERAB J.C., BARROSOA C.G., 2014. Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 153, 200-206. ISSN: 0308-8146
6. BIGGS M., 1997, *Zelenina: Velká kniha zeleninových druhů*, Volvox Globator, Praha, 256 s. ISBN 8072070533
7. BOSLAND P. W., VOTAVA ERIC J., VOTAVA ERIC M., 2012, *Pepper: Vegetable and Spice Capsicums*, CABI, USA, 230 s.
8. BUZINA W., BRAUN H., FREUDENSCHUSS K., LACKNER A., HABERMANN W., STAMMBERGER H., 2003. Fungal biodiversity-as found in nasal mucus. *Medical Mycology*, 41(2), 149-161. ISSN: 1369-3786
9. CARLUCCI A., RAIMONDO M.L., SANTOS, J., PHILLIPS A.J.L., 2012. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, 34.
10. CASTILLO C., MORALES A., RUBIO R., BAREA J. M., BORIE F., 2013. Interactions between native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing fungi and their effect to improve plant development and fruit production by *Capsicum annuum* L., *African Journal of Microbiology Research*, 7 (26), 3331-3340. ISSN: 1996-0808

11. DE GARCIA V., ZALAR P., BRIZZIO S., GUNDE-CIMERMAN N., VAN BROOCK M., 2012. Cryptococcus species (Tremellales) from glacial biomes in the southern (Patagonia) and northern (Svalbard) hemispheres. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 523-539. ISSN: 0168-6496
12. DOYLE M.P., BUCHANAN R.L. (EDS.), 2012. *Food microbiology: fundamentals and frontiers* [online]. American Society for Microbiology Press. [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
13. EMMANUEL-IKPEME C., HENRY P., OKIRI, O.A., 2014. Comparative Evaluation of the Nutritional, Phytochemical and Microbiological Quality of Three Pepper Varieties. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2(3), 74-80. ISSN: 2330-7285
14. GALLEGOS-ROBLES M.A., MORALES-LOREDO A., ALVAREZ-OJEDA G., VELARDE, S., FRATAMICO P., 2008. Identification of Salmonella serotypes isolated from cantaloupe and chile pepper production systems in Mexico by PCR–restriction fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection*, 71(11), 2217-2222. ISSN: 0362-028X
15. GARBOWSKA M., BERTHOLD-PLUTAB A., STASIAK-RÓŻAŃSKA L., 2015. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp., *Food Microbiology*, 49, 1-5. ISSN: 0740-0020
16. GARCIA, J. S., 2009. *Microbiologically safe foods* [online], Canada: John Wiley & Sons, Inc., [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
17. GIL, M., CANIGA, M., ECKMAN, J., MCLEOD, R., MOY, L., WILHELM, A., CICMIL, M., 2013. *Alternaria alternata* induced inflammatory lung responses: a novel in vivo PK/PD model. *Journal of Inflammation*, 10(Suppl 1), P10. ISSN: 1476-9255
18. GORRAN A., FARZANEHB M., SHIVAZADA M., REZAEIANC M., GHASSEMPOUR A., 2013. Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae), *Food Control*, 31(1), 218-223. ISSN: 0956-7135
19. GREGORY P.H., 1973, *Microbiology of the Atmosphere*. 2nd edn. Aylesbury, Bucks: Leonard Hill
20. GREPPI A., KRYCH Ł., COSTANTINI A., RANTSIOU K., HOUNHOUGAN D.J., ARNEBORG N., JESPERSEN L., 2015. Phytase-producing capacity of yeasts

- isolated from traditional African fermented food products and *PHYPK* gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 81-89. ISSN: 0168-1605
21. HALFON-MEIRI A., RYLSKI I., 1983. Internal mold caused in sweet pepper by *Alternaria alternata*: Fungal ingress. *Phytopathology*, 73(1), 67-70. ISSN: 0031-949X
 22. HAMMAMI W., FIORIB S., THANIA R.A., KALID N.A., BALMASB V., MIGHELIB Q., JAOUAA S., 2014. Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices, *Food Control*, 37, 177-181. ISSN: 0956-7135
 23. HASHEM M., ALAMRI, S., 2010. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(2), 167-175. ISSN: 1319-562X
 24. HONG J. K., HWANG B. K., 1998. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease*, 82(10), 1079-1083. ISSN: 0191-2917
 25. CHAKRABARTI J., ROY B. R., 2003, Adulterants, contaminants and pollutants in *Capsicum* products [online], Amit Krishna De, *Capsicum: The genus Capsicum*, USA: Taylor & Francis, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
 26. CHELKOWSKI J., 2014. *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity*, New York: Elsevier, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
 27. CHENGDE Y., HONGXI, J., XIURON, C., LI X., CHONGJIAN P., XUEQIN T., XIANGRONG M., 2012. Identification of potato black dot disease caused by *Colletotrichum coccodes* and screening for fungicides in the laboratory in Gansu Province. *Plant Protection*, 6, 028.
 28. CHOO E., JANG S.S., KIM K., LEE K.G., HEU S., RYU, S., 2007. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *Journal of Food Protection*, 70(4), 917-922. ISSN: 0362-028X
 29. IGLESIAS-GARCIA A. M., VILLARROEL-ZEBALLOS M. I., FENG, C., TOIT L.J.D., CORRELL, J.C., 2013. Pathogenicity, virulence, and vegetative compatibility grouping of *Verticillium* isolates from spinach seed. *Plant Disease*, 97(11), 1457-1469. ISSN: 0191-2917

30. INVISORB, 2014. Invisorb Fragment CleanUp, [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.stratec.com/>
31. IRINYI L., SERENA C., GARCIA-HERMOSO D., ARABATZIS M., DESNOS-OLLIVIER, M., VU DSTUBBE D., 2015. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 53(4), 313-337. ISSN: 1369-3786
32. JAMIOLKOWSKA A., 2008. Pathogenicity of some isolates of *Colletotrichum coccodes* and *Fusarium* spp. to sweet pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. *Phytopathologia Polonica*, 49, 65-71.
33. JACKSON G.G., 2013, *Perspectives in Antiinfective Therapy*, Springer-Verlag: Elsevier, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
34. KENSLER T.W., ROEBUCK B.D., WOGAN G.N., GROOPMAN J.D., 2010, Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology, *Toxicological Sciences*, 120(suppl 1), S28-S48. ISSN: 1096-6080
35. KLABAN V., 2011, *Ekologie mikroorganismů*, Praha: Galén, 549 s. ISBN 9788072627707
36. KOIKE S.T., GLADDERS P., PAULUS A.O., 2007. *Vegetable Diseases: A Color Handbook*. USA: Academic Press, 448 s. ISBN 9780123736758
37. LIU L., CHENB X., LIUA J., DENG X., DUANA W., TAN S., 2010. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum annuum* and related products by capillary electrophoresis with a mixed surfactant system, *Food Chemistry*, 119(3), 1228-1232. ISSN: 0308-8146
38. LUGAUSKAS A, STAKENIENE J., 2002. Toxin producing micromycetes on fruit, berries, and vegetables, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 9(2), 183-197.
39. MAGAN N., OLSEN M., 2004. *Mycotoxins in Food*, USA: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, 488 s. ISBN: 9781855737334
40. MALÍŘ F., BARTA I., BUCHTA V., DVOŘÁČKOVÁ I., PAŘÍKOVÁ J., SEVERA J., ŠKARKOVÁ J., 2003. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*, Brno: Národní centrum ošetrovatelských a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 349 s. ISBN: 8070133953

41. MANDAL P.K., BISWAS A.K., CHOI K., PAL U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 87-102. ISSN: 1557-4571
42. MANDEEL Q.A., 2005. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159(2), 291-298. ISSN: 0301-486X
43. MARÍN A., FERRERES F., TOMÁS-BARBERÁN F.A., GIL M.I., 2004. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3861-3869. ISSN: 0308-8146
44. MARTÍN A., ARANDA E., BENITO M. J., PEREZ-NEVADO F., CORDOBA M. G., 2005. Identification of fungal contamination and determination of mycotoxigenic molds by micellar electrokinetic capillary chromatography in smoked paprika. *Journal of Food Protection*, 68(4), 815-822. ISSN: 0362-028X
45. MATERSKA M., PERUCKA I., 2005, Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750-1756. ISSN: 0308-8146
47. MOON S.H., CHANG M., KIM H.Y., CHANG H.C., 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 489-497. ISSN: 1673-1689
48. NASEHI A., KADIR J. B., ASHTIANI F. A., NASR-ESFAHANI M., WONG M.Y., RAMBE S.K., GOLKHANDAN E., 2014. *Alternaria capsicola* sp. nov., a new species causing leaf spot of pepper (*Capsicum annuum*) in Malaysia. *Mycological Progress*, 13(4), 1041-1048. ISSN: 1617-416X
49. OTOVÁ B., MIHALOVÁ R., 2013. *Základy biologie a genetiky člověka*, ČR: Karolinum Press, 228 s. ISBN 9788024621098
50. PATRIARCA A., MEDINA A., PINTO, V. F., MAGAN, N., 2014. Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal*, 7(3), 329-334. ISSN: 1875-0710
51. PAWŁOWSKA J., WILK M., ŚLIWIŃSKA-WYRZYCHOWSKA A., MĘTRAK M., WRZOSEK M., 2014. The diversity of endophytic fungi in the above-ground

- tissue of two *Lycopodium* species in Poland. *Symbiosis*, 63(2), 87-97. ISSN: 0334-5114
52. PEGG G.F., BRADY B.L., 2002. *Verticillium wilts* [online], UK: CABI, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
53. PETŘÍKOVÁ K. ET AL., 2006. *Zelenina: pěstování, ekonomika, prodej*, Praha: Profi Press, 240s. ISBN: 8086726207
54. PETŘÍKOVÁ K., ET AL., 2012. *Zelenina: pěstování, výživa, ochrana a ekonomika*, Praha: Profi Press, 190 s. ISBN: 9788086726502
55. PETERSSON O.V., SU-LIN L.L., LANTZ H., RICE T., DIJKSTERHUIS J., HOUBRAKEN J., SCHNÜRER, J., 2011. Phylogeny and intraspecific variation of the extreme xerophile, *Xeromyces bisporus*. *Fungal Biology*, 115(11), 1100-1111. ISSN: 1087-1845
56. PITKÄRANTA M., MEKLIN T., HYVÄRINEN A., PAULIN L., AUVINEN P., NEVALAINEN A., RINTALA H., 2008. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 233-244 ISSN: 0099-2240
57. PITT J.I., HOCKING A.D., 2009, *Fungi and Food Spoilage* (3rd ed.), Springer, New York
58. PRAKASH V., EIPESON W.E., 2003. *Post-Harvest handling and processing of Capsicum* [online], USA: Taylor & Francis, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
59. PROMEGA, 2012. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical manual, Databáze online [cit. 2015-04-25], Dostupné na: <https://worldwide.promega.com>
60. QIAGEN, 2012. DNeasy Plant Handbook. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/>
61. RAJA H.A., KAUR A., EL-ELIMAT T., FIGUEROA M., KUMAR R., DEEP G., OBERLIES N.H., 2015. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn.(milk thistle). *Mycology*, (ahead-of-print), 1-20.
62. RAMDIAL H., RAMPERSAD S.N., 2015. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. *Phytoparasitica*, 43(1), 37-49. ISSN: 0334-2123

63. RASCHE F., TRONDL R., NAGLREITER CH., REICHENAUER T.G., SESSITSCH A., 2006. Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.), *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), 1036-1045. ISSN: 0008-4166
64. RATNA M.T., PARAMESWAR, S., NURYASMIN R., 2014. Malaysian Candida Isolates, Databáze online [cit. 2015-04-20], Dostupné na: ncbi.com
65. RODRÍGUEZ A., RODRÍGUEZ M., LUQUE M. I., MARTÍN A., CÓRDOBA J.J., 2012. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods, *Food Microbiology*, 31(1), 89-99. ISSN: 0740-0020
66. SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., 2004. *Introduction to Food-Borne Fungi* [online], Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
67. SANO A., KAMEI K., TAKAYAMA A., YARITA K., TAKAHARA H., 2007. Molecular biological data of pathogenic fungi stored in Medical Mycology Research Center, Chiba University, JAPAN, Published Only in Database, Databáze online [cit. 2015-04-20], Dostupné na: ncbi.com
68. SANTOS L., MARÍN S., MATEO E.M., GIL-SERNA J., VALLE-ALGARRA F.M., PATIÑO B., RAMOS A.J., 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 270-276. ISSN: 0168-1605
69. SARDIÑAS N., VÁZQUEZ C., GIL-SERNA J., GONZÁLEZ-JAÉN M.T., PATIÑO B., 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR, *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 121-125. ISSN: 0168-1605
70. SHUKLA A.C., YADAV R. S., SHAHI S. K., DIKSHIT A., 2012. Plant secondary metabolites as an effective source for the management of post harvesting fungal pests: A Review. *Current Discovery*, 1(1), 33-45.
71. SCHERM B., PALOMBA M., SERRA D., MARCELLO A., MIGHELI Q., 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 201-210. ISSN: 0168-1605

72. SID A., EZZIYYANI M., EGEEA-GILABERT C., CANDELA M.E., 2003. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biologia Plantarum*, 47(4), 569-574. ISSN: 0006-3134
73. SIMONS E.G., 2007, *Alternaria An Identification Manual* [online], CBS Utrecht, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
74. SMITH D.S., CASH J.N., NIP W., HUI Y. H., 1997. *Processing vegetables: science and technology*, USA: Technomic Publishing Company, Inc, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
75. SU-LIN L. L., PETTERSSON O. V., RICE T., HOCKING A. D., SCHNÜRER, J., 2011. The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus*—growth and competition at various water activities. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 57-63. ISSN: 0168-1605
76. ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J., 2008. *Metody molekulární biologie*, Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 8021038411 .
77. TONGYI C., FANG C., JINGHUA Q., HUI Y.H., GHAZALA S., GRAHAM D.M., NIP W.K., 2004. Dehydrated oriental mushrooms, leafy vegetables, and food preparation herbs and condiments. *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*, 373-393.
78. TRAN V. T., BRAUS-STROMEYER S. A., TIMPNER C., BRAUS G. H., 2013. Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4467-4483. ISSN: 0175-7598
79. TROJAN, V., 2009, *Sledování mikrobiálních kontaminací pomocí molekulárně biologických metod ve vybraných surovinách pro výrobu koření*, Diplomová práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin. Vedoucí práce prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.
80. VAN DOREN J.M., NEIL K.P., PARISH M., GIERALTOWSKI L., GOULD H., GOMBAS K.L., 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices 1973-2010, *Food Microbiology*, 36(2), 456-464. ISSN: 0740-0020

81. VEGA F.E., SIMPKINS A., AIME M.C., POSADA F., PETERSON S.W., REHNER S.A., ARNOLD A.E., 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122-138.
82. WANG Q.M., BOEKHOUT T., BAI F.Y., 2011a. *Cryptococcus foliicola* sp. nov. and *Cryptococcus taibaiensis* sp. nov., novel basidiomycetous yeast species from plant leaves, *The Journal of General and Applied microbiology*, 57(5), 285-291.
83. WANG W., MA X., MA Y., MAO ., WU F., MA X., FENG, H., 2011b. Molecular characterization of airborne fungi in caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 726-731. ISSN: 0964-8305
84. WEIDENBÖRNER M., 2001, *Encyclopedia od Food Mycotoxins* [online], Germany: Springer-Verlag Bernling Heidelberg, Germany, [cit. 2015-03-10] Dostupné na: www.google.cz
85. YAMAMOTO, S., HARAYAMA S., 1995. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of Pseudomonas putida strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104-1109. ISSN: 0099-2240
86. ZHOU K., ZHANG X., ZHANG F., LI Z., 2011. Phylogenetically diverse cultivable fungal community and polyketide synthase (PKS), non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes associated with the South China Sea sponges. *Microbial Ecology*, 62(3), 644-654. ISSN: 0095-3628

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Dodané vzorky paprik

Obr. 2: pGEM-T vektor

Obr. 3: PCR produkty na gelové elektroforéze

Tab. 1: Přehled dodaných vzorků papriky, zkratky

Tab. 2: Reakční směs pro PCR amplifikaci

Tab. 3: Teplotní profil PCR amplifikace

Tab. 4: Sekvence použitých primerů ITS1F a ITS4

Tab. 5: Reakční směs pro ligaci

Tab. 6: Výsledné koncentrace a čistota izolované DNA jednotlivých vzorků

Tab. 7: Počet vzorků DNA vybraných pro sekvenaci u jednotlivých vzorků papriky

Tab. 8: Přehled nalezených hub ve vzorcích

9 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 1

Příloha č. 2: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 2

Příloha č. 3: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 3

Příloha č. 4: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 4

Příloha č. 5: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 5

Příloha č. 6: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 6

Příloha č. 7: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 7

Příloha č. 8: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 8

Příloha č. 9: Protokol o zdravotní nezávadnosti vzorku 9

Příloha č. 1:

QUALITY CERTIFICATE

1

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.

No. of consignment note:

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 140 ASTA sweet paprika powder (EE600393)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 14/04/2015.
Quantity: 4000 kg

Characteristics:

Moisture content : 9.71 %
Colour content : 4.60 g/kg 143ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Szeged, 206990
xljdfpoerjolfm
xoueroejlgj

Date: 15/10/2014.

signature

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.
E. E. NO. 110E1942
BUDAPEST, HUNGARY
HUNGARY
SWISS BODENSEE
01003300

Příloha č. 2:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.

No. of consignment note:

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

②

Product: 80 ASTA hot paprika powder (EB680124)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 14/04/2015.
Quantity: 500 kg

Characteristics:

Moisture content : 9.05 %
Colour content : 2.75 g/kg 86 ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Szeged, 206990
xljdfpoerjolfm
xoueroejlgj

Date: 15/10/2014.

signature

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.
EU ID NO: 11081942
Budapest Bank Nyrt.
"BAN-HU01" (010 2042 0060 200 01003300
SWIFT: BUDAHUHB

Příloha č. 3:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.

3

No. of consignment note:

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 60 ASTA hot paprika powder (EA680103)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 14/04/2015.
Quantity: 250 kg

Characteristics:

Moisture content : 8.79 %
Colour content : 2.13 g/kg 65 ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Szeged, 206990
xljdfpoerjolfmf
xoueroejpgj

Date: 15/10/2014.

signature

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.
EU ID NO: HU01042
Budapest Bank Nyrt.
IBAN: HU07 1610 3300 0000 01003300
SWIFT: BUDAHUHB

Příloha č. 4:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173.

④

No. of consignment note: 2014737

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 60 ASTA paprika powder sweet (EA600118)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 14/04/2015.
Quantity: 500 kg

Characteristics:

Moisture content : 8.71 %
Colour content : 2.12 g/kg 66 ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Date: 15/10/2014.

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173
EU ID NO: H081742
Budapest Bank Ltd.
IBAN: HU07 1010 2842 0960 0000 0000 0000
SWIFT: BUDAHU33

signature

Příloha č. 5:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173.

5

No. of consignment note: 2014438

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 40 ASTA hot paprika powder (EA680095)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 24/12/2014.
Quantity: 300 kg

Characteristics:

Moisture content : 7.39 %
Colour content : 1.51 g/kg 48 ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Date: 25/06/2014.

signature

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173.
EU ID NO. 11351942
Budapesti Bank Nyrt.
IBAN: HU07 1010 2242 09009900 01003300
SWIFT: BUDAHU33

Příloha č. 6:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.

No. of consignment note: 2014681

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 100 ASTA hot paprika powder (EC680090)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 22/03/2015.
Quantity: 2000 kg

Characteristics:

Moisture content : 9.62 %
Colour content : 3.32 g/kg 103ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Date: 24/09/2014.

signature

RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szöreg, Szerb u. 173.
Buyer: TRUMF International s.r.o.
75002 Prerov I
Szerb u. 173. 01.93300

Příloha č. 7:

QUALITY CERTIFICATE

Manufacture: RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173.

No. of consignment note: 2014681

Buyer: TRUMF International s.r.o. 75002 Prerov I

Product: 100 ASTA sweet paprika powder (EC600376)
Packing: polietilén+papírzsák
Best before: 22/03/2015.
Quantity: 1500 kg

Characteristics:

Moisture content : 9.17 %
Colour content : 3.22 g/kg 102ASTA
Milling fineness < 0.5 mm
Sand content < 0.5% (m/m)

Mikrobiological data:

Salmonella : negativ
E.coli/g : <10
Enterobacter/g : <10³
Mould/g : <10³
Total count : <10⁵

The product is not harmful to human health.
It does not contain genetically modified material, product is GMO free.
The product is free from heavy metals and pesticides.
Storage conditions: dry, cool places, protected from light,
the bags should be protected from damage.

Date: 24/09/2014.

signature

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó KFT.
H-6771 Szeged-Szőreg, Szerb u. 173.
Tel: +36 72 511 111
Fax: +36 72 511 112
E-mail: info@rubin.hu
www.rubin.hu
Cégjegyzékszám: 010903300

Příloha č. 8:



Pol. Ind. de Campamento,
Ctra. de las Industrias, 13, 14 y 15
11300 La Linea de la Concepción
Cádiz, Spain

+ (34) 956 698 070
+ (34) 956 698 006
E-mail: evesa@evesa.com
www.evesa.com

-CERTIFICATE OF ANALYSIS-

PRODUCT:	FCZA - 06178 PAPRIKA POWDER SWEET 100 ASTA XSU000494
REP.:	5.000 kg
P.O. N°:	N14001139
BATCH N°:	111014.30.100
REF. N°:	14/0661
PRODUCTION DATE :	2014.10.15
EXPIRY DATE:	2015.10
PACKING :	200 x 25 kg
MOISTURE :	< 12 %
COLOR :	109 ASTA
TOTAL ASH:	< 7 %
AFLATOXIN B1:	< 5 ppb
AFLATOXIN TOTAL:	< 10 ppb
OCHRATOXIN:	< 30 ppb
<u>MICROBIOLOGY:</u>	
TPC	< 2.000.000 cfu/g
Coliforms	< 1.000 cfu/g
E. Coli	< 1.000 cfu/g
Clostridium perfringens	< 1.000 cfu/g
Yeasts	< 10.000 cfu/g
Mould	< 10.000 cfu/g
Salmonella	Absent/ 25 g



EVESA
QUALITY CONTROL
17.10.2014

REGISTRO MERCANTIL DE MADRID, HOJA N° 19.431, FOLIO 33, TOMO 33, DOMO 2.151, SECCION 3 DE SOCIEDADES, C.I.F. A-2620510 / V.I. N° BKA-3620610

Příloha č. 9:



Pol. Ind. de Campamento,
Ctra. de las Industrias, 13, 14 y 15
11300 La Línea de la Concepción
Cádiz, Spain

+34 956 698 070
+34 956 698 006
E-mail: evesa@evesa.com
www.evesa.com

-CERTIFICATE OF ANALYSIS-

PRODUCT:	FCZA – 06179 PAPRIKA POWDER SWEET 80 ASTA XSU000495
REP.:	1.000 kg
P.O. N°:	N14001139
BATCH N°:	121014.30.080
REF. N°:	14/0622
PRODUCTION DATE :	2014.10.15
EXPIRY DATE:	2015.10
PACKING :	40 x 25 kg
MOISTURE :	< 12 %
COLOR :	83 ASTA
TOTAL ASH:	< 7 %
AFLATOXIN B1:	< 5 ppb
AFLATOXIN TOTAL:	< 10 ppb
OCHRATOXIN:	< 30 ppb
<u>MICROBIOLOGY:</u>	
TPC	< 2.000.000 cfu/g
Coliforms	< 1.000 cfu/g
E. Coli	< 1.000 cfu/g
Clostridium perfringens	< 1.000 cfu/g
Yeasts	< 10.000 cfu/g
Mould	< 10.000 cfu/g
Salmonella	Absent/ 25 g

9

REGISTRO MERCANTIL DE MADRID, HOJA N° 19.433, FOLIO 35, TOMO 2.151, SECCION 7 DE SOCIEDADES, C.I.F. A-3829510 / VAT N° ESA-3829510

EVESA
QUALITY CONTROL
17.10.2014