

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vybraných
vzorcích koření**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Veronika Frková

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Hradec Králové

červen 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „*Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vybraných vzorcích koření*“ jsem vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu a seznam informací uvádím v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne:

.....
Veronika Frková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D., za vedení diplomové práce, konzultace a velmi ochotný přístup. Také bych dále chtěla poděkovat Mgr. Darině Pickové za spoustu užitečných praktických rad a za celkově příjemně strávený čas při práci v laboratoři.

Anotace práce:

Frková, V.: *Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vybraných vzorcích koření*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. 62 s. Diplomová práce

Koření je významnou součástí přípravy pokrmů i nápojů, ale současně může být také substrátem pro růst toxigenních plísní. Ochratoxin A je mykotoxin produkovaný především plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, které mohou kontaminovat potraviny i krmiva už při sklizni, nebo při nevhodném skladování. Ochratoxin A vykazuje významná zdravotní nebezpečí pro člověka, a proto je nutné minimalizovat jeho dopad na lidské zdraví. Na lidský organismus působí řadou nežádoucích účinků, jako jsou např. nefrotoxicita, hepatotoxicita, reprotoxicita, imunotoxicita, neurotoxicita, teratogenita, genotoxicita a karcinogenita.

Cílem diplomové práce bylo zjistit výskyt ochratoxinu A ve vybraných vzorcích koření, které jsou běžně dostupné na českém trhu. Data byla získána pomocí Enzymové imunoanalýzy po předchozí extrakci a separaci na imunoafinitních kolonkách.

Klíčová slova:

Ochratoxin A, OTA, koření, ELISA

Annotation:

Frková, V.: *Determination of mycotoxin ochratoxin A in selected spice samples*. Hradec Králové: Faculty of Science, University of Hradec Králové. 62 pp. Diploma thesis

Spices are an important part of meal and beverages preparations, but at the same time they can also be a substrate for the growth of toxigenic fungi. Ochratoxin A is a mycotoxin produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, which can contaminate food and feed either at harvest or during improper storage. Ochratoxin A represents a significant health risk and therefore its impact on human health must be minimized. It has a number of side effects to the human body, such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, reprotoxicity, immunotoxicity, neurotoxicity, teratogenicity, genotoxicity and carcinogenicity.

The aim of this thesis was to determine the occurrence of ochratoxin A in selected samples of spices that are commonly available on the Czech market. Data were obtained by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay after prior extraction and separation on immunoaffinity columns.

Keywords:

Ochratoxin A, OTA, spices, ELISA

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Ochratoxin A.....	11
2.1	Názvosloví OTA.....	11
2.2	Chemické a fyzikální vlastnosti OTA.....	12
2.2.1	Další formy ochratoxinu.....	12
2.3	Toxicita OTA.....	13
2.3.1	Nefrotoxicita.....	14
2.3.2	Imunotoxicita.....	14
2.3.3	Teratogenita.....	14
2.3.4	Karcinogenita.....	15
2.4	Toxikokinetika OTA.....	15
2.4.1	Absorpce.....	15
2.4.2	Distribuce a eliminace.....	15
2.4.3	Biotransformace.....	16
2.5	Producenti OTA.....	16
2.5.1	Rod <i>Penicillium</i>	17
2.5.2	Rod <i>Aspergillus</i>	18
2.6	OTA v potravinách.....	19
2.6.1	OTA v koření.....	21
2.6.2	Limity OTA v potravinách a koření.....	22
3	Koření.....	24
3.1	Kontaminace koření mykotoxiny.....	26
3.2	Zamezení výskytu mykotoxinů.....	28
4	ELISA - Imunochemická metoda stanovení.....	28
4.1.1	Kompetitivní ELISA.....	30
4.1.2	Nekompetitivní ELISA.....	30
5	Metodika.....	31
5.1	Stanovení OTA v koření metodou ELISA.....	31
5.1.1	Bezpečnost práce s OTA.....	31
5.1.2	Použité chemikálie, laboratorní a spotřební materiál, přístroje.....	31
5.2	Odběr koření.....	33
5.3	Postup přípravy vzorků a separace OTA na imunoafinitních kolonkách.....	33
5.4	Postup přípravy ke stanovení OTA metodou ELISA.....	38
6	Výsledky.....	43

7	Diskuze.....	46
8	Závěr	50
9	Seznam literatury.....	51

Seznam použitých zkratek

AF	Aflatoxiny
EFSA	European Food Safety Authority - Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EK	Evropská komise
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - Enzymová imunoanalýza na pevné fázi
EU	Evropská unie
FAO	Food and Agriculture Organization - Organizace pro výživu a zemědělství
FAOSTAT	Global Food and Agriculture Statistics of FAO - Statistická databáze Organizace pro výživu a zemědělství
EU SCF	Scientific Committee for Food of European Commission - Vědecký výbor pro potraviny Evropské komise
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point - Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů
HPLC	High-performance liquid chromatography - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAK	Imunoafinitní kolonka
IARC	International Agency for Research on Cancer - Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (Lyon)
ISO	The International Organization for Standardization - Mezinárodní organizace pro normalizaci
JECFA FAO	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - Spojený expertní výbor FAO/WHO k potravinářským přídatným látkám
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level - tj. nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek
LOD	Limit of Detection - Mez detekce
LOQ	Limit of Quantification - Mez stanovitelnosti
NCRI	Negligible Cancer Risk Intake - Zanedbatelný přívod pro riziko rakoviny
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level - Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek
OOVZ	Orgány ochrany veřejného zdraví
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
OT α	Ochratoxin α
PBS	Phosphate Buffered Saline - Fosfátový salinický pufr
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake - Prozatímní tolerovatelný týdenní přívod
PTDI	Provisional Tolerable Daily Intake - Prozatímní tolerovatelný denní přívod

PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake - Prozatímní maximální tolerovatelný denní příjem
RASF	Rapid Alert System for Food and Feed - Evropský systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
SCF	Scientific Committee on Food - Vědecký výbor pro potraviny
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TWI	Tolerable Weekly Intake - Tolerovatelný týdenní příjem
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
VSD	Virtually Safe Dose - Prakticky bezpečná dávka
WHO	World Health Organization - Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Mykotoxiny jsou chemicky různorodá skupina sekundárních metabolitů toxinogenních vláknitých mikroskopických hub - plísní (Ostrý, 1998). Plísně jsou mikroorganismy rozšířené celosvětově a velmi dobře se adaptují pro kontaminaci různorodých substrátů (Velíšek & Hajšlová 2009). Toxiny produkují pouze některé z nich, a to v závislosti na okolních podmínkách jako je teplota, vlhkost, pH či obsah dalších látek v substrátu (De Ruyck *et al.*, 2015). Projevy mykotoxikóz byly popisovány již od starověku, i když mykotoxiny jako jejich původci v té době ještě nebyly objeveny (Malíř & Ostrý, 2003).

Podle Malíře a Ostrého (2003) lze na téma mykotoxinů v potravinách aplikovat následující pravidla:

- Dva i více mykotoxinů mohou být produkovány určitým druhem plísní.
- Určitý mykotoxin může být produkován zástupci několika rodů plísní.
- Odhalení plísní v potravině vždy neznamená přítomnost mykotoxinů.
- Ne všechny kmeny potencionálně toxinogenních plísní jsou toxigenní.

Mykotoxiny se díky své všudypřítomnosti vyskytují prakticky na všech úrovních potravního řetězce u většiny živočichů (Velíšek, 2002). Příznaky různých mykotoxikóz závisejí na typu mykotoxinu, výši a trvání expozice, věku, zdraví a pohlaví exponovaného jedince (Modrá & Svobodová, 2009); na dalších faktorech, jako je např. genetika a interakce s jinými toxickými složkami (Benett & Klich, 2003). Z doposud známých mikroskopických hub jsou jen některé druhy schopny produkovat jeden a více mykotoxinů. Patří mezi ně i řada běžných druhů, které se vyskytují v okolním prostředí i na potravinách. Z toho důvodu je přítomnost plísně na potravinách spojena s určitým rizikem (Šilhánek, 2004). Různé mykotoxiny vyskytující se společně v přirozeném prostředí mohou mít synergické účinky, což může zesílit celkové nežádoucí toxické účinky (Malíř & Ostrý, 2003).

Kromě těchto nežádoucích účinků představují mykotoxiny také hrozbu pro bezpečnost potravin. Změny v zemědělských výrobních postupech a zpracování potravin spolu s globálními změnami v environmentální a veřejné politice nás vyzývají k vývoji a zdokonalování strategií a technologií k zajištění bezpečných potravin a zdravého životního prostředí (CAST, 2003).

Mykotoxiny představují závažné zdravotní nebezpečí pro zdraví člověka. Světová zdravotnická organizace (WHO, 2002) stanovila mezi hlavní rizikové kontaminanty potravin a krmiv několik mykotoxinů, např. ochratoxin A (OTA), aflatoxiny (AF) B1, B2, G1, G2, fumonisiny B1 a B2, deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin a zearalenon.

Pochopení mechanismu působení mykotoxinů na hostitele na buněčné i biochemické úrovni je důležité z hlediska celkového cíle – a to léčit či inhibovat působení mykotoxinů, čímž by se potenciálně dal potlačit rozvoj nemocí a úmrtí jim připisovaných (CAST, 2003).

2 Ochratoxin A

OTA patří podle Světové zdravotnické organizace (WHO) mezi jeden z pěti nejvýznamnějších mykotoxinů produkovaných toxinogenními plísněmi. Dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) náleží OTA do kategorie 2B, tedy možný karcinogen pro člověka (WHO, 1993).

OTA je od doby objevu znám jako přírodní kontaminant plesnivých surovin, potravin a krmiv. Mnohočetné toxické účinky OTA jsou skutečnou hrozbou pro člověka a zdraví zvířat (Malíř et al., 2016). OTA může být produkován mnoha druhy plísní rodu *Aspergillus*, a v našich mírných klimatických oblastech pak hojně rodem *Penicillium*. OTA je běžným kontaminantem různých potravin rostlinného i živočišného původu, včetně obilovin, koření, kávy, kakaa, piva, vína, rozinek, luštěnin, masa a masných výrobků (Ostrý et al., 2013).

OTA je termostabilní mykotoxin, který lze zničit až po několika minutách při teplotě vyšší než 250°C. Naopak při běžných úpravách pokrmů nedochází k jeho zničení (Modrá et al., 2014). Původ OTA vyskytujícího se v několika komoditách převládajících v lidské stravě i zvířecích krmivech, může být důvodem otravy - tzv. mykotoxikózy – konkrétně ochratoxikózy (CAST, 2003).

2.1 Názvosloví OTA

Dle IARC (1993):

Registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Services): 303-47-9

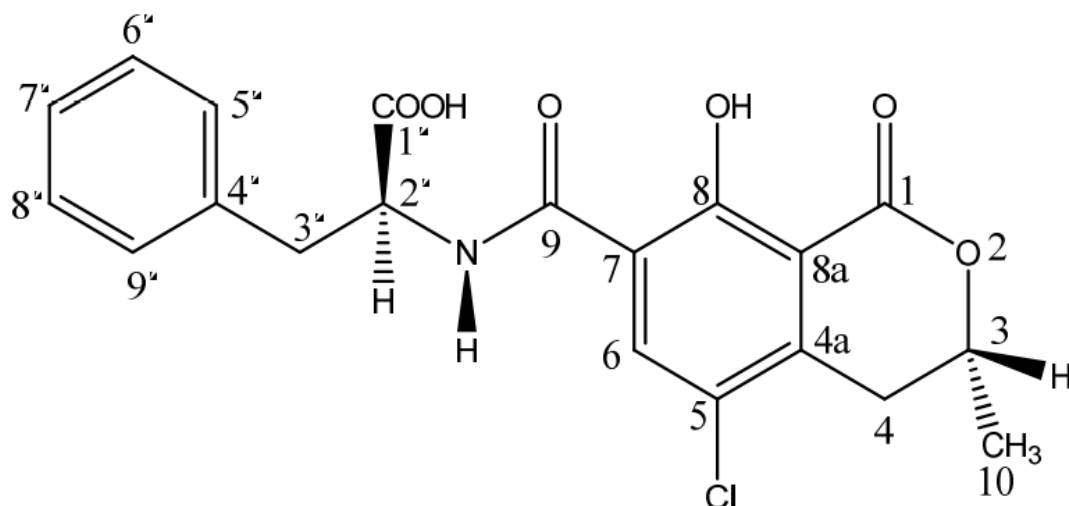
Název dle Chemical Abstracts: L-Phenylalanine, N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-, (R)-

Systematický název dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): N-[[[(3R)-5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phenyl-L-alanine

Synonymum názvu: (-)-N-[(5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl)carbonyl]-3-phenylalanine

Sumární (molekulový) vzorec: C₂₀H₁₈O₆ClN

Strukturní vzorec:



Obrázek 1: Strukturní vzorec OTA (Malíř et al., 2016).

2.2 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA

Z hlediska biosyntézy patří OTA mezi pentaketidy, obecně jej lze charakterizovat jako derivát izokumarinu vázaného na aminoskupinu L- β -fenylalaninu (Malíř & Ostrý, 2003).

Teplota bodu tání: 169 °C (IARC, 1993).

Molekulová hmotnost: 403,82 (Hrdina et al., 2004).

Popis: Bezbarvá až bílá krystalická látka bez zápachu (IARC, 1993), slabá organická kyselina (Khoury & Atoui, 2010), v přítomnosti kyseliny či zásady vyzařuje v ultrafialovém světle zelené až modré fluorescenční záření (IARC, 1993).

Stabilita: Velmi stabilní v pevných látkách, částečně degradován při běžných podmínkách vaření, roztoky ochratoxinu jsou zcela degradovány působením nadbytku roztoku chlornanu sodného (IARC, 1993).

Rozpustnost: Dobře rozpustný v organických rozpouštědlech (např. v chloroformu, ethanolu, methanolu a xylenu) (WHO, 1990; IARC, 1993), slabě rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v nasycených uhlovodících (Khoury & Atoui, 2010), rozpustný ve vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného (Ringot et al., 2006).

2.2.1 Další formy ochratoxinu

Bylo také identifikováno několik metabolitů souvisejících s OTA, zejména ochratoxin B (OTB) - dechlorovaný analog OTA, ochratoxin C (OTC) - jeho ethylester, izokumarinový derivát OTA - ochratoxin α a jeho dechlorový analog ochratoxin β (Khoury & Atoui, 2010).

Ve většině případů výskytu mykotoxinů dochází zároveň k produkci několika toxinů současně, například OTA, OTB nebo OTC. Tento současný výskyt může vést k synergickým toxickým účinkům – k adici a potenciaci (Ostrý *et al.*, 2013). Za netoxickou formu je považován OT α , vznikající štěpením peptidové vazby v OTA (Škarková *et al.*, 2013).

2.3 Toxicita OTA

Mykotoxiny, tedy i OTA, jsou velmi stabilní látky a jejich množství a také toxicita proto nebývají při běžném zpracování surovin a potravin podstatně sníženy. Následkem toho a v závislosti na biologickém poločase se mohou mykotoxiny kumulovat v organismu a díky jejich toxickému účinku může docházet k různým projevům onemocnění (Modrá & Svobodová, 2009).

Výsledný účinek mykotoxinů závisí na mnoha faktorech – nejvíce významné jsou délka expozice a její míra. Dále se uplatňuje živočišný druh, věk jedince, jeho tělesná hmotnost nebo expozice jinými toxiny. Mláďata bývají obecně k účinkům mykotoxinů citlivější, protože ještě nemají dostatečně vyvinutý imunitní systém (Modrá & Svobodová, 2009). Míra toxicity a orgánové specificity OTA je závislá na druhu metabolitu, který vznikne při biotransformaci OTA, a to jak u lidí, tak zvířat (JECFA, 2008).

Akutní mykotoxikózy vznikají po požití vysokých dávek mykotoxinů. Chronické mykotoxikózy jsou následkem dlouhodobějších expozic mykotoxinům – a to po přívodu menších či středně vysokých dávek mykotoxinů (Votava, 2003). Celosvětově hlášená vysoká míra výskytu mykotoxinů v nízkých koncentracích v potravinách i krmivech vede k závěru, že lidé i zvířata jsou často vystavováni na kratší či delší dobu nízkým dávkám rozličných mykotoxinů. Tento přívod nízkých dávek mykotoxinů může mít za následek poškození buněk, tkání a orgánů v různém rozsahu (Przybylska – Gornowicz *et al.*, 2015). Mezi pozdní toxické účinky OTA patří především genotoxicita, která zahrnuje mutagenní a karcinogenní účinky (Malíř & Ostrý, 2003).

V organismu se OTA chová jako kumulativní jed, který je rychle absorbován, ale pomalu vylučován (Malíř & Ostrý, 2003). Poločas vylučování u člověka je zhruba 35 dní (Malíř & Ostrý, 2003; Modrá *et al.*, 2014). OTA se hromadí v tukových tkáních a má velmi pomalý metabolismus (Pitt, 2000). Jakmile je absorbován, váže se na sérové proteiny a koluje organismem s krví. Může také procházet přes placentu do plodu (Magan *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že se OTA vylučuje i do mateřského mléka, může být nebezpečný i pro kojence (Modrá *et al.*, 2014).

Kőszegi & Poór (2016) mezi principy působení OTA na organismus uvádějí např. inhibici syntézy bílkovin a produkci energie, indukci oxidačního stresu, tvorbu DNA aduktů a dále mezi jeho toxické působení zahrnují apoptózu či nekrózu buněk a zastavení buněčného cyklu.

Podle Coronela *et al.* (2010) jsou cílovým orgánem toxicity OTA ledviny, což by mohlo souviset s tím, že jsou jeho eliminačním orgánem, ale zároveň zde dochází k jeho reabsorpci a částečně tak i další kumulaci. Vedle nefrotoxického účinku OTA také působí hepatotoxicky, teratogenně a imunosupresivně (Modrá & Svobodová, 2009). Předchozí studie dále ukázaly, že OTA působí neurotoxicky, embryotoxicky, genotoxicky a karcinogenně u různých živočišných druhů (Malíř *et al.*, 2013). Magan *et al.* (2004) uvádí, že OTA je absorbován do těla především v gastrointestinálním traktu a množství, které prostoupí do organismu, se liší v závislosti na živočišném druhu. Absorpce probíhá nejprve v žaludku a pak v tenkém střevě. Mimo ledvin se kumuluje také v játrech, svalech a tuku (Magan *et al.*, 2004).

Ochratoxikóza je celosvětově se vyskytující mykotoxikózou, která byla popsána u zvířat i lidí, která byla majoritně zapříčiněna především přívodem OTA v krmivu či potravinách. Četnost jejího výskytu závisí na různých faktorech, jako jsou geografické zóny, klima, roční doba a dietární zvyklosti (Malíř & Ostrý, 2003).

2.3.1 Nefrotoxicita

Chronická expozice je zodpovědná za nefrotoxicitu, a také může vést ke vzniku nádorů, což bylo potvrzeno studiemi u potkanů. Několik studií také prokázalo významnou souvislost expozice OTA s některými formami nefropatií. Chronická toxicita OTA se také dále podílí na mechanismu tvorby ledvinových nádorů (Malíř *et al.*, 2013).

Existují hypotézy o souvislosti vysoké incidence nádorů urogenitálního traktu v Bulharsku a Jugoslávii s výskytem Balkánské endemické nefropatie (BEN) a s výskytem OTA v kontaminovaných potravinách. V průběhu 50. let bylo v určitých oblastech Bulharska, Jugoslávie a Rumunska prokázáno fatální onemocnění ledvin u člověka. BEN popisuje Pfohl-Leszkowicz (2009) jako tubulointersticiální chronické onemocnění, kdy dochází k degeneraci tubulů, intersticiální fibróze a hyalinizaci glomerulů. Nelze však vyloučit kauzální roli i jiných nefrotoxických agens (Ruprich, 1997). Herink, Rychlík & Pelclová (2007) se domnívají, že v etiologii BEN mohou mít vliv ještě další toxické látky, jako např. nefrotoxický mykotoxin citrinin, který se často vyskytuje v zaplísňených krmivech spolu s OTA a může proto jeho účinek zesílit.

2.3.2 Imunotoxicita

OTA může negativně ovlivňovat humorální i buněčnou imunitu, inhibuje B a T lymfocyty, dále blokuje aktivitu NK buněk („*natural killer cells*“- lymfocyty specifické imunity) a produkci interferonu. Má se za to, že OTA by mohl být příčinou lymfopenie, způsobovat regresi thymu a obecně je schopný potlačit imunitní odpověď (Khoury & Atoui, 2010).

2.3.3 Teratogenita

OTA snadno prochází placentou a vyvolává různé morfologické anomálie u plodu. Závažnost malformací se liší podle způsobu podání OTA a v závislosti na gestačním období (Khoury & Atoui, 2010). OTA je navíc považován i za neurotoxickou sloučeninu. Kromě toho se v játrech, ledvinách a dalších tkáních u myšího potomstva tvoří OTA-DNA adukty (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993).

2.3.4 Karcinogenita

První studie na karcinogenitu indukovanou OTA byly prováděny na potkanech, myších a pstruzích (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Nádory ledvin se u člověka často vyskytují při denním dietárním přívodu nad 70 µg OTA/kg tělesné hmotnosti/den. V oblastech Balkánu byly u obyvatelstva, které bylo vystaveno působení OTA, nalezeny OTA-DNA adukty v renální tkáni a též i nádory (Pfohl-Leszkowicz, 2009). Vedle karcinomu ledvin je OTA spojován také se zvýšeným výskytem karcinomu varlat. Dalším možným cílem OTA by mohly být prsní žlázy, což bylo zkoumáno při studii, kdy u 56 % (28/50) testovaných samic potkana po konzumaci vysokých dávek OTA byl pozorován zvýšený výskyt fibroadenomu (nezhoubného nádoru) mléčných žláz (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

2.4 **Toxikokinetika OTA**

Toxikokinetiku OTA ovlivňují různé toxikokinetické i toxikodynamické pochody. Po absorpci z gastrointestinálního traktu je OTA vázán na sérové proteiny. Reakce adsorbce OTA ze střeva zpět do oběhu v důsledku recyklace žlučových cest napomáhá systémové redistribuci OTA směrem k různým tkáním. Kromě toho dochází k reabsorpci OTA v proximálních a distálních tubulech ledvin. K akumulaci dochází v krvi, ledvinách a játrech. Ledviny a játra jsou také hlavními orgány biotransformace OTA (Ringot *et al.*, 2006).

2.4.1 Absorpce

K absorpci OTA po perorálním podání dochází převážně pasivně z tenkého střeva v jeho neionizované formě, která je rozpustná v tucích. Pasivní absorpci podporuje vysoká afinita OTA k plazmatickým proteinům (Malíř *et al.*, 2013). Koncentrace toxinu a jeho metabolitů je závislá na řadě faktorů včetně dávky, cesty a délky podání a také na druhově specifických faktorech (Ringot *et al.*, 2006).

2.4.2 Distribuce a eliminace

Na základě *in vitro* studií byla prozkoumána podstata interakce mezi OTA a albuminem a z podkladu těchto dat bylo vyvozeno, že vazba na albumin zpomaluje eliminaci OTA omezením přenosu z krve do jaterních a ledvinových buněk (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993). Byla prokázána silná vazba toxinu na protein v krevním séru, na který se OTA váže mnohem specifičtěji než na albumin. Díky snadnému průchodu těchto molekul přes glomerulární membránu, by tato vazba mohla mít rozhodující význam v možné nefrotoxicitě OTA u savců (Škarková *et al.*, 2013).

Poločas vylučování po perorálním požití OTA (p.o.) je kratší než po intravenózní injekci (i.v.), což by mohlo být způsobeno díky průchodu játry a následné eliminaci žlučí před vstupem do systémového krevního oběhu. Účinnost každé vylučovací cesty je ovlivněna kromě cesty podání také dávkou, stupněm vazby na plazmatické proteiny a

enterohepatální cirkulací OTA. Kromě renálních a fekálních cest vylučování se OTA vylučuje též do mateřského mléka (Ringot *et al.*, 2006).

2.4.3 Biotransformace

Hlavními orgány biotransformace OTA jsou játra a ledviny (Ringot *et al.*, 2006).

V těle může být OTA metabolizován na hydroxylované deriváty např.: 4-R-hydroxyochratoxin A, 4-S-hydroxyochratoxin A, 10 OH-OTA, dále na nechlorovanou formu OTA (OTB), otevřenou laktonovou formu (OP-OTA), chinonovou formu (OTHQ), které se nacházejí v krvi nebo moči ve výše uvedených formách nebo jsou konjugovány na glutathion (Pfohl-Leszkowicz, 2009). U zmíněných metabolitů OTA se setkáváme s různou mírou toxicity. Forma OP-OTA byla nalezena u hlodavců a vykazuje dokonce vyšší toxicitu než samotný OTA. Naopak OTB je díky ztrátě chlóru méně toxický než OTA. Chininové a hydrochinonové (OTQ/OTHQ) formy jsou naopak výrazně toxičtější oproti OTA (Škarková *et al.*, 2013). OTHQ byl navíc prokázán jako hlavní metabolit odpovědný za tvorbu DNA-aduktů (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Malíř *et al.*, 2013).

2.5 Producenti OTA

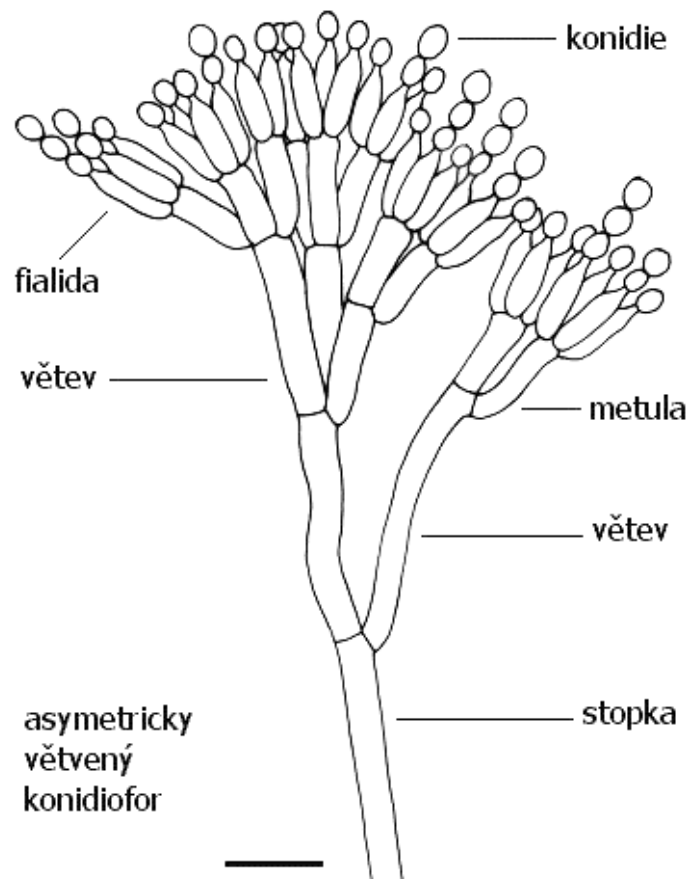
Stejně jako u jiných mykotoxinů ovlivňují hladinu produkovaného toxinu především substrát, úroveň vlhkosti, teplota a přítomnost konkurenční mikroflóry, kdy dochází k interakci (Benett & Klich, 2003). V průběhu pěstování kulturních plodin vzniká množství složitých vztahů a interakcí mezi rostlinou, mikroskopickými houbami, hmyzem a způsobem ošetřování rostlin. Tyto interakce pak ovlivňují produkci a obsah mykotoxinů, tedy i OTA, v potravinových surovinách (Malíř & Ostrý, 2003).

Při produkci OTA se uplatňují především rody *Penicillium* a *Aspergillus* (Samson & Pitt, 2000). Vlákňité mikromycety vyžadující pro svůj růst nejvíce kyslíku kontaminují povrch substrátu (Malíř & Ostrý, 2003). Plísně rodu *Aspergillus* často napadají plodiny především během jejich skladování. Rod *Penicillium* se uplatňuje jak na polích, tak při skladování plodin (Malíř & *et al.*, 2001). V teplejších tropických a subtropických oblastech je OTA v potravinách produkován zejména vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Aspergillus*. V mírnějších a chladnějších oblastech je OTA produkován především vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Penicillium* (Sweeney & Dobson, 1998). K produkci OTA u *Aspergillus ochraceus* dochází v teplotním rozsahu mezi 15-37 °C. Kmeny *Penicillium verrucosum* jsou schopny produkovat OTA již v rozmezí od 4 - 30 °C (Samson & Pitt, 2000). Jako optimální ekologické podmínky vhodné pro růst a produkci OTA u *P. verrucosum* se uvádějí teplota ve výši 25 °C a vodní aktivita 0,90–0,99 a pro *A. ochraceus* teplota 15–25 °C a vodní aktivita 0,93–0,95 (Magan & Aldred, 2005). Většina vláknitých mikroskopických hub potřebuje pro svůj rozvoj kyslík. Nicméně díky globálnímu oteplování dochází i zde k významným změnám ve výskytu producentů OTA a v závislosti na tom i k výskytu OTA - mnohdy již v polních podmínkách (Malíř & Ostrý, 2003).

2.5.1 Rod *Penicillium*

Taxonomie rodu *Penicillium* není pro nezasvěcené snadná a ve srovnání s rodem *Aspergillus* se jedná o rozmanitější rod, pokud jde o počet druhů a rozsah stanovišť (Pitt & Hocking, 2009). V rámci uvedeného rodu je v současnosti popsáno přes 200 druhů (Tan & Tatsumura, 2015). Na hojně větvených septovaných vláknech se tvoří konidiofory se zašpičatělými koncovými fialidami a oválnými či kulovitými konidii tvořícími řetízky. Konidiofor s fialidami a konidii tak vytváří dojem štětečku, a proto podle tohoto znaku dostal tento rod český název plíseň štětičková (Frágner, 1967). Historicky asi nejznámější druh, *Penicillium notatum* (později přejmenovaný na *P. chrysogenum* - Obrázek 2), je spojený se jménem sira Alexandra Fleminga a zahájením éry antibiotik objevem penicilinu (Tan & Tatsumura, 2015).

Penicillium chrysogenum



Obrázek 2: *Penicillium chrysogenum* (Kubátová, 2001).

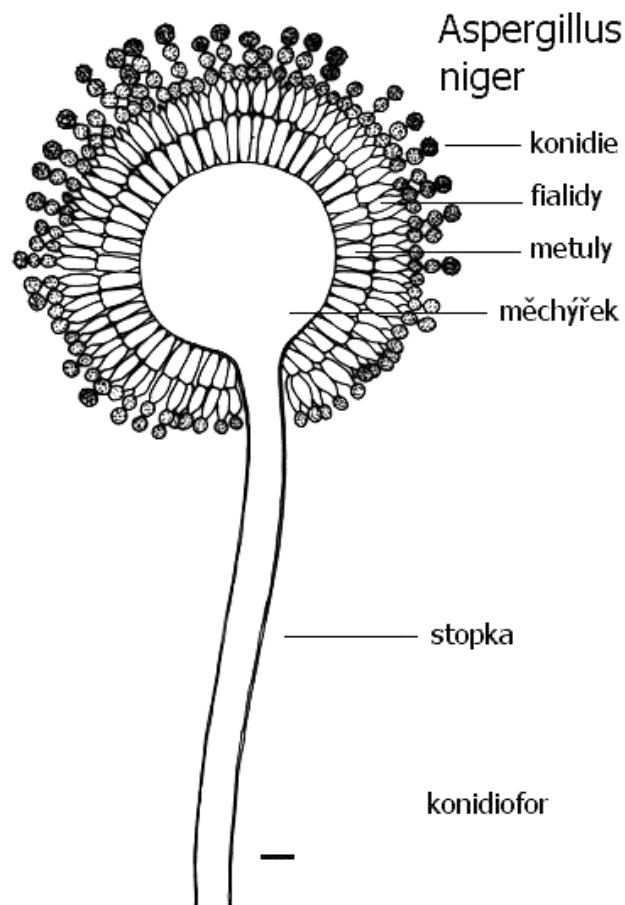
Příslušníci rodu *Penicillium* patří k nejrozšířenějším vláknitým mikromycetům mírného a teplého klimatu. Jejich spóry jsou téměř všudypřítomné, a proto jsou také velmi častými kontaminanty potravin (Malíř & Ostrý, 2003).

Druhy zahrnuté ve skupině *Penicillium* je obtížné od sebe odlišit a pro jejich identifikaci je obvykle nutné použít molekulární metody. Při identifikaci druhů *Penicillium*

produkcijících OTA používají autoři studií nesjednocené názvosloví, což v literatuře způsobuje zmatek (Cabañes *et al.*, 2010). V současné době jsou v tomto rodu jedinými známými a uznávanými producenty OTA druhy *P. verrucosum* a *P. nordicum*, a to navzdory některým zprávám o produkci OTA jinými druhy (Frisvad & Samson, 2004). Zmíněné dva druhy mají odlišné ekologicky nároky. *Penicillium verrucosum* je hlavním zdrojem kontaminace OTA v obilovinách a produktech z nich především v chladném a mírném podnebí. Naproti tomu *P. nordicum* se obvykle nachází na sušených masných výrobcích a sýrech a může být příčinou kontaminace OTA v těchto potravinách (Cabañes *et al.*, 2010).

2.5.2 Rod *Aspergillus*

Kolonie rodu *Aspergillus* vynikají pestrou škálou pigmentů (mohou být zbarveny v různých odstínech žluté, žlutozelené, zelenomodré, hnědé až černošedé), které mohou difundovat daleko do agaru (Votava, 2003). Aspergily jsou v okolním prostředí hojně rozšířeny, nacházejí se v půdě, ovzduší, na rostlinách a rozkládajících se organických látkách. V domácnostech bývají součástí prachu. *A. flavus* je nejčastějším druhem kontaminujícím potraviny, zejména dlouho skladované, jelikož přežívá i při nízkém obsahu vody v prostředí a vyšších teplotách (Jackson & Dobson, 2011).



Obrázek 3: *Aspergillus niger* (Kubátová, 2001).

Druhy rodu *Aspergillus*, které jsou schopny produkovat OTA (Tabulka 1), patří především do sekcí: *Circumdati* (skupina *A. ochraceus*), *Nigri* (*A. carbonarius* a *A. niger*) a *Flavi* (Hayat *et al.*, 2012).

<i>Aspergillus</i>	Sekce	Lokace	Zdroj
<i>A. affinis</i>	<i>Circumdati</i>	Itálie	rozkládající se listy, fluviální mykobiota
<i>A. albertensis</i>	<i>Flavi</i>	Kanada	výtěr z ucha
<i>A. alliaceus</i>	<i>Flavi</i>	USA, Austrálie, Indonésie	<i>Macrobasis albida</i> , velký bariérový útes, ořech kemiri, půda
<i>A. welwitschiae</i>	<i>Nigri</i>	Japonsko, Portugalsko, Španělsko, Itálie, Řecko	koji, hroznové víno
<i>A. carbonarius</i>	<i>Nigri</i>	Čína, Itálie, Austrálie, USA	hroznové víno, pivo, káva
<i>A. cretensis</i>	<i>Circumdati</i>	Řecko, Izrael	citrusy, půda
<i>A. flocculosus</i>	<i>Circumdati</i>	Slovinsko, Indie, Řecko, Nizozemsko	solivarna
<i>A. lacticoffeatus</i>	<i>Nigri</i>	Venezuela, Indonésie	kávová zrna, půda
<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Čína, Itálie, Španělsko, Německo, USA	hroznové víno, pivo, cereálie, káva, pšenice setá, kukuřice
<i>A. ochraceus</i>	<i>Circumdati</i>	Čína, Itálie, Portugalsko, Dánsko, Anglie, Francie, Japonsko	obiloviny, káva, nápoje, hroznové víno, kukuřice
<i>A. pseudoalegans</i>	<i>Circumdati</i>	Kostarika	půda
<i>A. roseoglobulosus</i>	<i>Circumdati</i>	Bahamy	rozkládající se listy kořenovníku obecného
<i>A. sclerotium</i>	<i>Nigri</i>	Indie	kávová zrna, zelená káva
<i>A. sclerotiorum</i>	<i>Circumdati</i>	USA, Thajsko, Čína	jabloň lesní, půda, ovoce
<i>A. steynii</i>	<i>Circumdati</i>	Indie, Čína, Austrálie, Panama, Argentina	zelené kávové zrno, rýže, areka obecná, sója
<i>A. sulphureus</i>	<i>Circumdati</i>	Indie, Čína	zásaditá půda
<i>A. westerdijkiae</i>	<i>Circumdati</i>	Jižní Afrika, Slovinsko, Čína, Indie	rýže, nápoje, zelená kávová zrna, soli, čirok, kukuřice, chilli, anýz, hroznové víno

Tabulka 1: Druhy rodu *Aspergillus* produkující OTA (Wang *et al.*, 2016).

2.6 OTA v potravinách

OTA mohou být nejčastěji kontaminovány obilniny jako ječmen, žito, pšenice, oves, kukuřice a rýže (Velíšek, 2002; Ostrý *et al.*, 2015), dále také sójové boby, fazole,

podzemnice olejná (Suchý & Herzig, 2005; Vlková *et al.*, 2009), ořechy, arašídny a bavlníková semena (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2009). Velíšek (2002) uvádí, že se OTA může nacházet v masu a uzenářských výrobcích a Magan *et al.* (2004) doplňuje, že se může vyskytovat také v mléce. Ke kontaminaci mykotoxiny může přispívat také využití mikroskopických vláknitých hub při výrobě plísňových sýrů a fermentovaných masných výrobků, nebo aditiv, např. vitaminy a technické enzymy (Velíšek & Hajšlová, 2009).

Míra expozice OTA (Graf 1) se procentuálně odhaduje u surovin následně: z obilovin (44 %), dále z vína (10 %), kávy (9 %), piva (7 %), kakaa (5 %), sušeného ovoce (4 %), masa (3 %), koření (3 %) a ostatních potravin (15 %) (Malíř *et al.*, 2005).



Graf 1: Míra expozice OTA z různých druhů potravin (Malíř *et al.*, 2005).

Mezi nápoje s obsahem OTA patří např.: pivo, víno, káva, zelená káva a kakao (Ostrý *et al.*, 2015). Otteneder & Majerus (2000) uvádějí, že bílá vína jsou méně kontaminovaná než vína červená, a dále že hroznové šťávy jsou kontaminované více než vína. To ve své studii vysvětluje Abrunhosa *et al.* (2005) tím, že během fermentace dochází ke snížení obsahu OTA, což je způsobeno jeho adsorpcí na pevnou fázi. Při pozorování nebyl prokázán rozklad OTA na jiné sloučeniny v důsledku metabolické aktivity kvasinek.

V letech 2011–2014 bylo analyzováno 132 českých piv. Výskyt OTA byl potvrzen u 81 % analyzovaných vzorků. Jeho průměrná koncentrace v nealkoholických pivech byla 9,0 ng/l, výčepních pivech 28,9 ng/l, ležácích 29,2 ng/l a ve speciálních pivech 16,9 ng/l (Běláková *et al.*, 2015). Lhotská *et al.* (2016) dodává, že v tmavých pivech byly hodnoty kontaminace nižší, což může být způsobováno pražením sladu při vyšších teplotách.

Pokud se týká čajů, tak Malíř *et al.* (2014) uvádí, že obsah OTA v nálevu čaje se liší od jeho obsahu v sušených listech. Z této studie vyplývá, že přechod OTA z listů do nálevu

je vyšší u černého čaje (v rozsahu mezi 7-59%) ve srovnání s ovocným čajem (2-24%). Jako faktory ovlivňující koncentraci OTA v nálevu kromě kvality původní suroviny uvádí také dobu kontaktu listů s vodou, dále pH a teplotu vody. Toman *et al.* (2017) v další studii potvrzuje, že přenos OTA do nálevu byl vyšší při přípravě černého čaje tureckým způsobem (41,5 % ± 7 %), kdy doba louhování lístků činila 15 minut. Obsah OTA v čaji může být také ovlivněn např. ovocnými příměsemi/příchutěmi.

2.6.1 OTA v koření

Dosavadní studie spojené s výskytem OTA či jeho producentů poukazují na výskyt u různých druhů koření.

Všechny vybrané testované vzorky koření z Alžírsko byly kontaminovány plísněmi; mezi nejvíce kontaminované druhy koření patřil - zázvor, paprika, kmín a šafrán (Azzoune *et al.*, 2015). Dále bylo zjištěno, že většina analyzovaných vzorků koření (např.: rozmarýn, skořice, fenykl, bílý a černý pepř a oregano) vykazovala širokou kontaminaci vláknitými mikroskopickými toxinogenními houbami, hřebíček byl výjimkou. Mezi hlavní identifikované houby patřily *Aspergillus* a *Penicillium* s přítomností potenciálně toxinogenních druhů *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus* a *A. carbonarius* (Garcia *et al.*, 2018). Chen *et al.* (2013) ve své studii provedené v Číně poukazuje na to, že podobnost osazení plísněmi mezi čerstvou a sušenou lékořicí je nízká. Výsledky ukazují přítomnost mikroskopických hub produkujících OTA na čerstvém koření lékořice a naznačují, že tyto houby mohou přežít po tradičním sušení kořene na slunci. *Penicillium chrysogenum* z okolního prostředí pravděpodobně stabilně přispívá k vysoké hladině OTA v lékořici. Výsledky studie Yang *et al.* (2017) ukázaly, že inkubace zázvoru s *A. flavus* a *A. carbonarius* po dobu 20 dnů vedla k produkci a akumulaci OTA. V brazilské studii, kterou provedli Silva *et al.* (2021), byly v černém pepři nalezeny tyto potenciálně ochratoxigenní druhy: *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* a *A. ochraceus*, proto je třeba v černém pepři kontinuálně sledovat jak tyto producenty, tak OTA.

Výskyt OTA byl potvrzen v koření - např. muškátový oříšek, sladká a pálivá paprika v prášku (Ostrý *et al.*, 2015), lékořice, kurkuma (Malíř *et al.*, 2002; Ostrý *et al.*, 2015).

Ve studii zaměřené na koření z malajského trhu uvádí Ali *et al.* (2015), že analyzované zpracované práškové koření (sušené chilli, fenykl, kmín, kurkuma, černý a bílý pepř, mák, koriandr, „garam masala“ a směs koření pro ryby, maso a kuřecí kari) mělo průměrnou koncentraci OTA ve výši 2,21 ng/g, koncentrace se pohybovaly v rozsahu 0,14 - 20,40 ng/g a výskyt pozitivních vzorků byl 79 %.

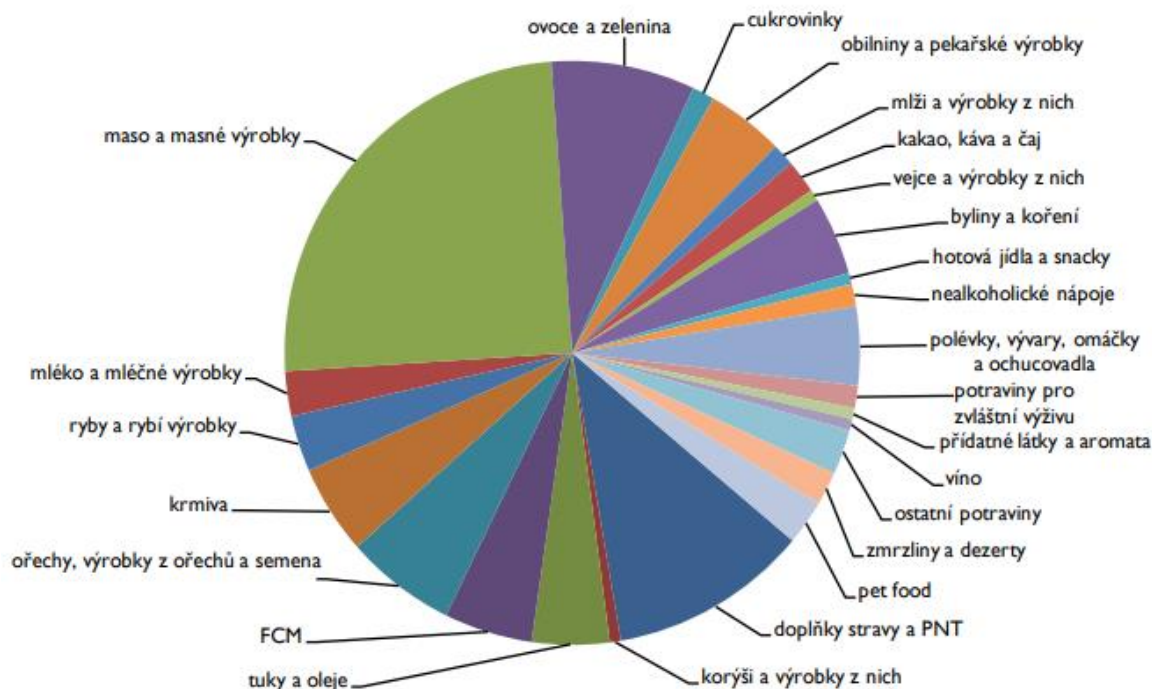
Darra *et al.* (2019) ve svém výzkumu dochází k závěru, že koření bylo ve srovnání s bylinami kontaminovanější. Kromě toho byla u některých neregulovaných koření a některých bylin prokázána významná kontaminace OTA, což nabádá k zamyšlení, že by bylo vhodné přidání těchto surovin do seznamu regulovaných koření.

2.6.2 Limity OTA v potravinách a koření

Toxicita mykotoxinů se projevuje už při požití nízkých dávek, a proto je nutné sledovat jejich výskyt v potravinách a krmivech. OTA vykazuje významná zdravotní nebezpečí pro člověka, a proto je nutné minimalizovat jeho dopad na lidské zdraví.

Podle nařízení evropské komise by se na trh neměly dostat produkty, které obsahují nadlimitní množství kontaminujících látek, a to ani jako složky jiných potravin. Dále je zakázáno míchat výrobky splňující limity s výrobky nevyhovujícími, aby se snížila úroveň kontaminace OTA. Dekontaminace plodin chemickým ošetřením je rovněž zakázána (Evropská komise, 2006).

K zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a krmiv v rámci Evropské unie (EU) přispívá tzv. Evropský systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). RASFF slouží k rychlému šíření informací o nebezpečných či kontaminovaných potravinách a krmivech (Obrázek 4), která mohou představovat zdravotní riziko pro spotřebitele - členy EU. Jedná se o informace na úrovni Evropské komise (EK), dále mezi členskými státy EU a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) (SZPI, 2011). Na národní úrovni je RASFF garantován Orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ), Státní veterinární správou (SVS) a Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI) (Malíř *et al.*, 2006).



Obrázek 4: Graf oznámení přijatých v roce 2019 dle kategorie nevyhovujícího výrobku z dat RASFF (RASFF, 2019).

EFSA v roce 2006 stanovil pro OTA tolerovatelný týdenní přívod (TWI) 120 ng/kg t. hm. (tj. v přepočtu na den 17,14 ng/kg t. hm.), tento stanovený TWI pro člověka byl odvozen z hodnot pro nefrotoxicitu, nikoliv i pro karcinogenitu (EFSA, 2006), ale tato

hodnota již není platná (EFSA, 2020). Nařízení Evropské komise č. 1881/2006 stanovuje povolené limity pro určité druhy potravin v rozmezí 0,5 – 10,0 ng/g (Tabulka 2). V současnosti je výskyt OTA v potravinách diskutovaným tématem. Mezi navrhované změny nařízení patří stanovení limitů u některých neregulovaných potravin jako např. sušené ovoce a bylinky, slunečnicová a dýňová semena, kakao a pistácie. U některých regulovaných potravin (např. káva, rozinky, lékořice) se navrhuje snížení maximálního limitu OTA (MZe, 2021).

Nařízení Evropské Komise	
Potraviny	Maximální limity OTA [ng/g]
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	0,50
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	0,50
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určené pro lidskou spotřebu	2,00
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2,00
Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,00
Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě (kromě obilných příkrmů, ostatních příkrmů určených pro kojence a malé děti a dietních potravin pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence)	3,00
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy	5,00
Pšeničný lepek neprodávaný přímo spotřebiteli	8,0
Rozpustná káva (instantní káva)	10,00
Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky)	10,00

Tabulka 2: Maximální limity pro OTA v potravinách/krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2012).

V případě některých léčivých rostlin a koření (Tabulka 3) má EU oficiální předpisy, které stanovují limity OTA konkrétně povolené pro zázvor, kurkumu, muškátový oříšek, pepř a lékořici, přičemž zákonná hranice se pohybuje od 15 ng/g do 80 ng/g (Evropská komise, 2015).

Nařízení Evropské komise	
Potravina	Maximální limity OTA [ng/g]
Koření: <i>Piper</i> spp. (plody, včetně bílého a černého pepře) <i>Myristica fragrans</i> (muškátový oříšek) <i>Zingiber officinale</i> (zázvor) <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)	15
Koření: <i>Capsicum</i> spp. (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kayenského pepře a papriky)	20
Směsi koření obsahující jedno z výše uvedených koření	15
Kořen lékořice, složka bylinného čaje	20
Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80

Tabulka 3: Maximální limity OTA v potravinách/krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2010; Evropská komise, 2015).

Je známo, že podmínky prostředí v místě růstu hub (teplota, vodní aktivita, složení matrice, obsah vlhkosti, pH média, fyzická kontaminace substrátu, antifungální vlastnosti a další faktory) hrají důležitou roli při akumulaci mykotoxinů v koření (Pitt & Hocking, 2009). Odpovědnost za udržování nezávadných dodávek koření musí být sdílena výrobcí, zpracovateli, regulačními agenturami, vědeckou komunitou a samozřejmě i přístupem spotřebitelů. Mykotoxiny jsou kontaminanty, které nelze kompletně eliminovat. Účinné monitorovací programy a regulační limity však mohou efektivně minimalizovat hladiny mykotoxinů ve spotřebních výrobcích (Iha & Trucksess, 2019).

3 Koření

Koření je neodmyslitelnou surovinou při přípravě a dochucování pokrmů ve všech částech světa. Jeho konzumace se liší podle geologických oblastí a kulturních zvyklostí, ale s globalizací světového trhu už jsou dostupné různé druhy koření celosvětově. Koření je významnou součástí přípravy pokrmů i čajových nálevů, ale může být taktéž substrátem pro růst toxinogenních plísní. Produkce koření pochází především z tropických a subtropických oblastí, jejichž klimatické podmínky rozvoji plísní nahrávají.

Podle vyhlášky 331/1997 Sb. se kořením rozumí části rostlin jako kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena nebo jejich části, v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivňování chutě a vůně potravin. Vyhláška č. 398/2016 Sb. upravuje jakostní požadavky na koření - jako jsou smyslové požadavky (na vzhled, barvu, vůni, chuť koření), fyzikální a chemické požadavky (např. maximální obsah vody, obsah popela, minimální obsah silice, maximální podíl příměsí).

Žáček (1981) popisuje koření jako všechny aromatické části rostlin, kromě měkké lodyhové části, používané pro ochucení potravin. Tyto části mohou být čerstvé, sušené nebo jinak upravené. Koření je zahrnováno do skupiny pochutin, které mají zanedbatelnou kalorickou hodnotu, mají však povzbudivé účinky buď přímo na trávicí

ústrojí či nepřímo na nervovou soustavu. Slouží k aromatizování a zvýraznění chuti a vůně potravin.

Valíček (2007) uvádí, že koření se neuzívá jen v kuchyni, ale prakticky ve všech odvětvích potravinářského průmyslu, zejména pak při úpravě a konzervaci masa a uzenin, v cukrářství, ale také v konzervování zeleniny, ovoce a v likérnictví. Některé druhy se též využívají nejen v tradiční medicíně, ale jsou i důležitou surovinou ve farmaceutickém průmyslu, kde se řada léků vyrábí právě z těchto surovin. Neugebauerová (2006) pak doplňuje, že často dochází k vzájemnému prolínání koření a léčivých a aromatických rostlin.

Egyptané, Číňané a Indové používali koření v léčivých přípravcích a procedurách počínaje kolem roku 2000 př. n. l. Po staletí nacházelo koření využití jako přísada do jídla k úpravě vůně a chuti konečných pokrmů (Iha & Trucksess, 2019). Koření je využíváno pro své jedinečné chuťové, barvicí a aromatizační vlastnosti a některé druhy také pro konzervační, antimikrobiální a antioxidační účinky (Kabak & Dobson, 2017).

Typickým rysem koření je jeho charakteristická vůně a chuť. Obsah přírodních látek v rostlině není dán pouze geneticky, ale jejich kvalita a množství závisí i na podmínkách okolního prostředí. Jedná se především o silice, hořčiny, třísloviny, glykosidy, alkaloidy, flavonoidy, fytoncidy, kumariny, minerální látky, pryskyřice, sacharidy, vitamíny a fytosteroly (Valíček, 2007).

Ve studii Szűcs *et al.* (2018) pomocí průzkumu zjistili, že pepř a paprika, stejně jako petržel a bazalka byly nejčastěji konzumovanými kořeními a bylinami v sedmi sledovaných členských státech Evropské unie. Údaje rovněž potvrdily zvyklosti specifické pro jednotlivé země, jako je častá konzumace pepře v Německu nebo papriky na Slovensku a v Maďarsku. Vysoká četnost spotřeby petrželky byla zaznamenána v Maďarsku, na Slovensku a v Rakousku. Studie dále poukázala na účinek rozšíření některých národních kuchyní, jako je např. italská, což mělo za následek vyšší spotřebu zelených bylin, jako je bazalka a oregano.

Zázvor má rostoucí celosvětovou oblibu díky svým pozitivním lékařským účinkům. Plísňová kontaminace a mykotoxiny však přinášejí problémy s udržováním kvality a bezpečnosti této komodity (Yang *et al.*, 2017).

Přestože koření je do příprav pokrmů používáno v menším množství, je uznáváno jako významný vektor plísni a mykotoxinů, zejména kvůli nevyhovujícím podmínkám panujícím v rozvojových zemích, kde je pěstováno nebo uváděno na trh (Motloun *et al.*, 2018). Kontaminované koření proto může být škodlivé pro zdraví lidí a zvířat (Iha & Trucksess, 2019).

V rozvojových zemích, kde panuje teplé a vlhké klima podporující růst plísni, je těžké zajistit dodržování správné zemědělské praxe, správné výrobní praxe a správné hygienické praxe (Marroquín-Cardona, 2014). Nevyhovující podmínky během fáze sušení, přepravy a skladování při výrobě koření mohou vést ke kontaminaci mykotoxiny. Kromě převládajících klimatických podmínek, také delší období sucha a vyšší obsah vlhkosti mohou způsobit rozvoj mykotoxinů v koření (Jalili, 2016).

OTA je po AF druhým nejčastěji analyzovaným mykotoxinem v koření. Pokud se týká OTA v koření, kde je jeho výskyt velmi vysoký nebo vysoký, tak mnohé studie nejčastěji zmiňují černý pepř, chilli, zázvor, fenykl a kurkumu (Picková *et al.*, 2020).

3.1 Kontaminace koření mykotoxiny

Plísně jsou mikroorganismy rozšířené po celém světě, velmi dobře adaptované pro kontaminaci různorodých substrátů. Toxiny produkují pouze některé z nich, a to v závislosti na okolních podmínkách (De Ruyck *et al.*, 2015). Kontaminace potravin je přirozený proces, kterému však lze pouze ale do určité míry zamezit při dodržování správné zemědělské, technologické a hygienické praxe (Malíř *et al.*, 2005; Malíř & Ostrý, 2012).

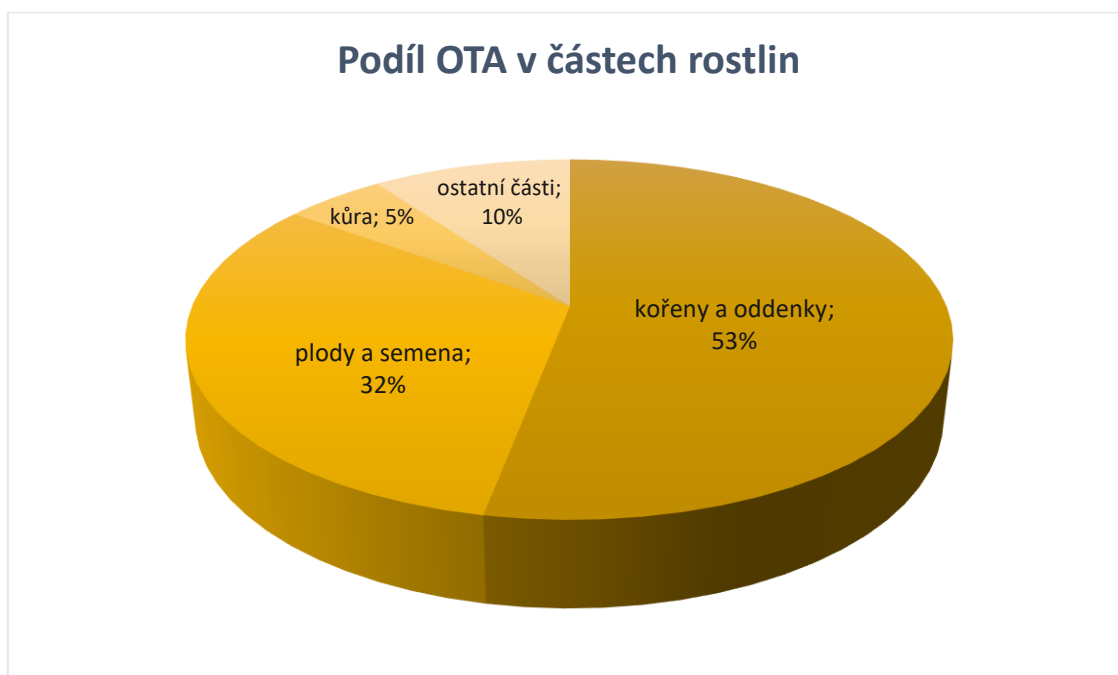
Plísně zodpovědné za kontaminaci OTA se liší v závislosti na plodině a místě výskytu (Ostrý *et al.*, 2013). Tvorba mykotoxinů závisí na řadě faktorů, jako jsou vlhkost, teplota, pH, přítomnost kyslíku (Malíř & Ostrý, 2003), poškození celistvosti způsobené mechanicky nebo hmyzem, teplotním poškozením a kvalitou houbového inokula stejně jako interakcí nebo konkurencí mezi liniemi hub (Suchý & Herzig, 2005). V oblastech zamořených hmyzem jsou suroviny daleko více náchylné ke kontaminaci mykotoxiny. Hmyz obecně poškozuje jejich povrchy, což usnadňuje penetraci inokula (Malíř & Ostrý, 2003). Rozsah kontaminace zemědělských plodin mykotoxiny je ovlivňován vlastní rezistencí daného kultivaru plodiny proti napadání plísněmi a mírou fyziologického stresu. Dalším faktorem je virulence a typ produkovaného mykotoxinu. V neposlední řadě také závisí na fázi vegetačního cyklu a schopnosti enzymových systémů rostliny transformovat mykotoxin na netoxickou látku (Velíšek & Hajšlová, 2009).

Scheuer & Gareis (2002) uvádí, že z hlediska porovnání - dle zeměpisného původu vzorků - nejvíce kontaminovaných vzorků koření na obsah OTA pocházelo z jihovýchodní Asie a Indie. Dále bylo zjištěno, že vysoce kontaminované vzorky papriky pocházely také z Izraele. Picková *et al.* (2020) ze zpráv RASFF uvádí procentuální zastoupení z oznámení výskytu OTA dle původu: Indie (38,5 %), dále následovaly Indonésie (13,6 %), Etiopie (11,7 %), Srí Lanka (9,9 %), Pákistán (5,9 %), Čína (4,0 %) a Nigérie (1,8 %) a další země.

Picková *et al.* (2020) uvádí, že v souladu s předchozími studiemi na OTA můžeme některé druhy koření podle míry výskytu OTA (% pozitivních vzorků) zařadit do různých kategorií:

- Velmi vysoký (nad 75 %): kari, muškátový ořech.
- Vysoký (do 75 %): muškátový květ.
- Mírný (do 50 %): anýz, kmín, kardamon, chilli, koriandr, fenykl, česnek, zázvor, lékořice, pískavice, majoránka, černý pepř, šalvěj, kurkuma.
- Nízký (do 25 %): bílý pepř, skořice, hořčice, rozmarýn.
- Žádný (0 %): oregano, bazalka, hřebíček, bobkový list, tymián, máta, petržel, šafrán, nové koření, cibule.

Qin *et al.* (2020) udává procentuální podíl zastoupení OTA u pozitivních vzorků bylin - a to v jednotlivých částech rostliny, běžně využívaných v čínské lidové medicíně (Graf 2).



Graf 2: Podíl OTA v částech rostliny (Qin *et al.* 2020).

Mykotoxiny mohou kontaminovat zemědělské komodity na poli nebo během skladování (Streit *et al.*, 2012). Pokud mykotoxiny kontaminují suroviny k výrobě potravin už před sklizní, mluvíme o kontaminaci primární, pokud dojde k růstu plísní při skladování, zpracování, balení či dalším nevhodným zacházením, mluvíme o produkci sekundární (Malíř & Ostrý, 2003).

Při sklizni, sběru, přepravě, sušení a skladování potravinářských entit by měla existovat vhodná opatření (Zahra *et al.*, 2018). K omezení výskytu mykotoxinů způsobených sekundární kontaminací lze využít některá preventivní opatření jako např. zabránit mechanickému poškození povrchu (při sklizni a uskladnění nebo jakékoliv manipulaci), kvalitní ošetření a uskladnění plodin po sklizni. Při skladování musí být komodita suchá, bez přístupu kyslíku (např. pomocí vakuování), fermentována nebo ošetřena chemikáliemi, které inhibují plísně (Suchý & Herzig, 2005).

Vývoj účinných strategií ke zmírnění toxicity vyvolané OTA je velmi složitý, protože mechanismus působení OTA stále není kompletně objasněn. Toxický účinek je výsledkem mnoha jeho působení, jako je inhibice syntézy proteinů, přímá genotoxicita a zastavení buněčného cyklu. Inhibice absorpce OTA a stimulace eliminace OTA, která by zabraňovala akumulaci OTA, se zdá jako slibný krok (Kószegi & Poór, 2016).

3.2 Zamezení výskytu mykotoxinů

Zamezení výskytu mykotoxinů v potravinovém řetězci vyžaduje pochopení strategií pro zvládnání mykotoxinů. Součástí této strategie je, aby komodity kontaminované mykotoxiny vůbec nevstupovaly do zařízení na zpracování potravin a krmiv. Toho lze dosáhnout zavedením kvalitního testovacího programu pro příchozí potravinové suroviny. Zahrnuje to také vedení platných záznamů o všech procesech a schopnost ekonomicky a obecně bezpečně odstranit veškerou kontaminovanou dávku materiálu, která byla neúmyslně přijata (CAST, 2003). Současná data naznačují, že některá koření mohou představovat zdroj expozice karcinogenním mykotoxinům. Z těchto důvodů je nutné přijmout opatření k produkci kvalitnějšího koření. Například zlepšení postupů po sklizni, jako jsou techniky sušení a podmínky skladování, které mohou být užitečné k minimalizaci růstu nejenom vláknitých mikroskopických hub, ale mohou i přispět k následnému snížení kontaminace koření mykotoxiny. Také kvalita balení se může významně podílet na dodávce nezávadného koření (Azzoune *et al.*, 2015).

Použití vědecky podloženého Systému analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP) pro všechny kroky před sklizní, během sklizně, po sklizni, během skladování, přepravy a balení může napomoci kontrolovat výskyt mykotoxinů v koření. Dekontaminační strategie by měly být použity jako poslední možnost ke snížení kontaminace mykotoxinů na přijatelnou úroveň pro lidskou (případně zvířecí) spotřebu. Správná hygienická praxe a fyzická separace tříděním koření jsou nejlepší kroky vedoucí ke snížení obsahu mykotoxinů právě na přijatelnou úroveň (Iha & Trucksess, 2019). Zpracování potravin může napomoci snížit expozici mykotoxinům - a to buď zničením či eliminací mykotoxinů, jejich transformací na méně toxické deriváty, adsorpcí mykotoxinů na pevné povrchy, nebo snížením jejich biologické dostupnosti v důsledku chemického připojení ke strukturám potravinové matrice. Úplné eliminace mykotoxinů z potravinového produktu zpracováním lze dosáhnout jen zřídka. Konečným cílem zmírnění vlivu mykotoxinů je zabránit nepříznivým účinkům na zdraví způsobených expozicí mykotoxinům v potravinách při zachování nutriční a organoleptické kvality potravin (Karlovsy *et al.*, 2016).

4 ELISA - Imunochemická metoda stanovení

Tato diplomová práce se zabývá výskytem ochratoxinu A ve vybraných vzorcích koření, které jsou běžně dostupné na českém trhu. Ke zjištění koncentrace OTA ve vzorcích se použila enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) za předchozí extrakce a separace na imunoafinitních kolonkách (IAK). Tato analytická metoda je založena na specifické interakci antigenu (v tomto případě OTA) a protilátky a využívá se ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Stanovení OTA ve vzorcích proběhlo spektrofotometricky.

Pro analýzu OTA se nejčastěji používají metody imunochemické a chromatografické. Imunochemické reakce jsou založeny na reakci antigenu a protilátky.

Metody chromatografické jsou založeny na separačních technikách. Principem je dělení složek, které se nachází mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je pohyblivá a druhá stacionární (Malíř *et al.*, 2003). Obecně se všechny chemické metody k analýze OTA sestávají z několika kroků (extrakce, čištění, separace, detekce, kvantifikace a potvrzení identity) (Van Egmond, 1991).

ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) neboli enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Stejskal *et al.*, 2008) se zakládá na reakci antigenu (mykotoxinu) s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky. Měření se provádí spektrofotometricky (Malíř *et al.*, 2003, Laciaková *et al.*, 2011). Jedná se o jednu z nejčastěji využívaných imunologických metod, která slouží k detekci a kvantifikaci protilátek a antigenu (Habuřtová *et al.*, 2011).

Byl vyvinut a optimalizován postup k rychlému a nákladově efektivnímu screeningu OTA na základě čistících tandemových imunoanalytických kolon a optimalizován pro detekci OTA v koření (Goryacheva *et al.*, 2006). Výsledky studie ukázaly, že směs methanolu a NaHCO₃ (50:50) pro extrakci a kompetitivní přímá metoda ELISA jsou schopny detekovat nízké koncentrace OTA v surovině, což bylo následně potvrzeno pomocí HPLC s fluorescenční detekcí (Espejo *et al.*, 2010).

Antigen

Antigeny jsou makromolekuly přirozeného i syntetického původu. Z chemického hlediska zahrnují proteiny, polypeptidy, polysacharidy a nukleoproteiny. Mezi jejich dvě základní vlastnosti patří, že navozují specifickou imunitní odpověď a specificky reagují s produkty této odpovědi (tj. protilátkami). Na povrchu molekuly antigenu se nacházejí tzv. epitopy, což je skupina atomů, která je schopna reagovat s vazebným místem protilátky (Janatková, 2014).

Protilátka

Protilátky jsou specifické látky vůči příslušnému antigenu či antigenům (Stejskal *et al.*, 2008).

Konjugát

Konjugát je označení pro spojení dvou či více látek pomocí chemické nebo jiné reakce (Fialová, 2013). Podle Habuřtové (2011) je to sekundární protilátka, na kterou je navázán enzym a reaguje s primární protilátkou. Primární protilátka se vůči sekundární protilátce chová jako antigen.

Stop roztok

Stop (zastavovací) roztok je slabý roztok kyseliny, kterým se po určité době zastavuje enzymová reakce. Jeho použitím dojde ke změně barvy z modré na žlutou, která je měřitelná na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm (Fialová, 2013).

Substrát

Substrát je chemická sloučenina, se kterou enzym specificky reaguje za vzniku barevného produktu (Crowther, 2000). Pokud v jamkách není navázán konjugát,

nedojde k barevné přeměně a obsah jamek se nezbarví (Fialová, 2013). Větší intenzita zbarvení je u negativního vzorku a má tedy i vyšší absorbanci. Ke zjištění koncentrace vzorku je nutné proměřit kalibrační závislost, která se získá změřením absorbance standardních roztoků (Stejskal *et al.*, 2008). Výsledný komplex je poté měřen pomocí spektrofotometru (Malíř *et al.*, 2003, Laciaková *et al.*, 2011).

Mezi jednotlivými kroky provádění testu ELISA je zapotřebí odstranit z jamek nenavázané složky nebo protilátky značené enzymem. Toto promývání se provádí naplněním jamek promývacím roztokem, který je pak odstraňován. Tento postup se několikrát opakuje. Pokud by nebyly vymyty protilátky značené enzymem, bylo by zbarvení ve všech jamkách stejné bez ohledu na množství specifických protilátek ve vzorcích. V jamkách se slepých vzorkem by se nemělo vyvinout viditelné zbarvení, neboť místo vzorku je použit ředící roztok, který neobsahuje žádné protilátky. Konjugát, který se nemá na co navázat, je odstraněn při promývání. Slabě žluté zbarvení může být způsobeno přítomností zbytku konjugátu, který byl nedostatečně vymyt (Fialová, 2013).

Metodu ELISA můžeme dělit na kompetitivní a nekompetitivní. Oba formáty lze použít jako přímou či nepřímou metodu (Stejskal *et al.*, 2008).

4.1.1 Kompetitivní ELISA

Pokud je značenou komponentou antigen jedná se o kompetitivní ELISA metodu (Laciaková *et al.*, 2011). Při kompetitivní metodě ELISA je využívána jedna protilátka, která je limitována svým množstvím. Kompetice probíhá o vazebná místa této protilátky mezi značeným antigenem, kterého je mírný nadbytek a neznačeným antigenem, jenž je v analyzovaném vzorku (Habuřtová *et al.*, 2011). U kompetitivní metody je měřeno množství navázaného značeného antigenu s protilátkou, lze ale také měřit množství nenavázaného značeného antigenu (Malíř *et al.*, 2003).

4.1.2 Nekompetitivní ELISA

Pokud je značenou komponentou protilátka jedná se o metodu nekompetitivní (Laciaková *et al.*, 2011). K reakci dochází pouze u jednoho antigenu, kterým je analyzovaná látka. Kvantifikace vazby protilátky-antigenu probíhá díky sekundární protilátce, která může být konjugována enzymem (Habuřtová *et al.*, 2011).

Podmínkou je přítomnost alespoň dvou vazebných míst na antigenu. Antigen je zachycován mezi dvě protilátky a vytvoří tak „sendvič“. Na imobilizované protilátce se zachytí antigen, po promytí se přidá druhá značená protilátka. Dalším promytím se pak odstraní nenavázané značené protilátky (Stejskal *et al.*, 2008). Pro nekompetitivní metodu ELISA platí, že množství antigenu navázaného na stěnu destičky musí být v nadbytku vzhledem k očekávanému množství protilátek. V případě nedostatečného množství antigenu by se některé protilátky v testovaných vzorcích neměly na co navázat a během promývání by byly odstraněny (Fialová, 2013).

5 Metodika

Separace OTA byla provedena na imunoafinitních kolonkách (modifikovanou metodou dle Zimmerli & Dick, 1995) s cílem zvýšení citlivosti dané metody. Vzorky přečištěné tímto způsobem byly následně analyzovány na ELISA readeru (fotometru). Certifikovaným referenčním materiálem (OTA v paprice) zakoupeným z Fapas® z Velké Británie byla ověřena správnost (resp. výtěžnost) metody a její přesnost (resp. opakovatelnost) v sérii a čase. Fapas® je světově uznávaný akreditovaný poskytovatel testování způsobilosti a jejich referenční materiály jsou generovány podle zásad Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO).

5.1 Stanovení OTA v koření metodou ELISA

Imunochemická metoda ELISA je založena na principu interakce antigenu a specifických protilátek, při které se vytváří imunokomplex antigen-protilátka. Ke stanovení se využívá značení enzymu na jednom z reaktantů (Habuštová *et al.*, 2011). Vytvořením této vazby vzniká produkt enzymatické reakce, který je detekován (Stejskal *et al.*, 2008).

5.1.1 Bezpečnost práce s OTA

Dle IARC (WHO) náleží OTA do kategorie 2B, tedy možný karcinogen pro člověka.

Malíř (2010) uvádí, že s OTA je nutné pracovat v ochranných rukavicích a pracovní úkony provádět v dobře větrané digestoři či v laminárním boxu. Všechny pracovní povrchy a pomůcky (včetně skla) musí být po skončení práce ihned dekontaminovány. Detoxikace ploch se provádí většinou chemickými metodami, a to za použití chlornanu sodného, který je schopen eliminovat OTA a další mykotoxiny, podobně jako RBS-35 při teplotě 50 °C (Malíř & Ostrý, 2003).

5.1.2 Použité chemikálie, laboratorní a spotřební materiál, přístroje

Použité chemikálie

- chloroform (CHCl₃)
- hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃)
- hydrogenuhličitan sodný (Na₂HPO₄)
- dihydrogenuhličitan draselný (KH₂PO₄)
- kyselina ortofosforečná (H₃PO₄)
- kyselina octová (CH₃COOH)
- kyselina mravenčí (HCOOH)
- chlorid draselný (KCl)
- chlorid sodný (NaCl)
- metanol (CH₃OH)
- ultračistá voda Milli Q plus

Použité roztoky

- **fosfátový salinický pufr PBS**
- naváží se 8 g NaCl, 1,2g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ a 0,2 g KCl. Tyto chemikálie jsou smíchány a rozpuštěny v 900 ml ultračisté vody Milli Q plus. Roztok lze uchovávat v ledničce přibližně 12 měsíců.
- **PBS s 15 % metanolem**
- do 100 ml odměrky se napipetuje 15 ml CH₃OH a po rysku doplní roztokem PBS.
- **roztok H₃PO₄ + NaCl**
- Do 1000 ml odměrky se napipetuje 33,7 ml 85% H₃PO₄ a přidá se 116,9 g NaCl, doplní se do 1 l vodou Milli Q a několika kapkami 0,5 M H₃PO₄. Hodnota pH se upraví na 1,6 (ověřeno pH metrem). Roztok je stabilní přibližně 6 měsíců.
- **2% roztok kyseliny octové v metanolu**
- **70% metanol**

Přístroje a pomocná zařízení

- ✓ spektrofotometr Epoch BioTek,
- ✓ promývačka BioTek ELx50,
- ✓ laboratorní centrifuga MPW – 351e,
- ✓ koncentrátor LAB-EVA,
- ✓ třepačka ReaxMulti,
- ✓ ultrazvuková lázeň FISHERBRAND,
- ✓ imunoafinitní kolonky OCHRAPEP,
- ✓ zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou BAKER SPE 12,
- ✓ prosávací pumpa MILLIPORE,
- ✓ vakuová jednotka BAKER SPE 12G vakuový manifold,
- ✓ analytické váhy KERN EW PCB 2000,
- ✓ zařízení pro úpravu ultračisté vody Milli Q plus,
- ✓ centrifugační nádoby,
- ✓ mikroreakční vialky 2 a 5 ml,
- ✓ mikropipety s proměnným objemem 20-200 µl a 200 – 1000 µl,
- ✓ pipety a špičky na pipety,
- ✓ Erlenmeyerova baňka,
- ✓ odměrný válec,
- ✓ papírové filtry,
- ✓ nálevka,
- ✓ kapátka,
- ✓ laboratorní sklo.

ELISA souprava – RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15

Součástí sady:

- ✓ mikrotitrační destička - 96 jamek pokrytých protilátkami proti OTA
- ✓ 6x OTA standard, 1,3 ml – o koncentraci 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt
- ✓ konjugát, 0,7 ml – peroxidásový konjugát OTA, koncentrát
- ✓ substrát/chromogen, 10 ml - látka měnící svou barvu po reakci s enzymem
- ✓ stop roztok, 14 ml – zastavovací roztok
- ✓ zřed'ovací pufr, 7 ml – pro přípravu 10 mM pufru, 0,05% roztok, hodnota pH 7
- ✓ promývací solný pufr – rozpustit sůl

5.2 Odběr koření

Na českém trhu bylo zakoupeno 54 druhů koření od různých dodavatelů a značek.

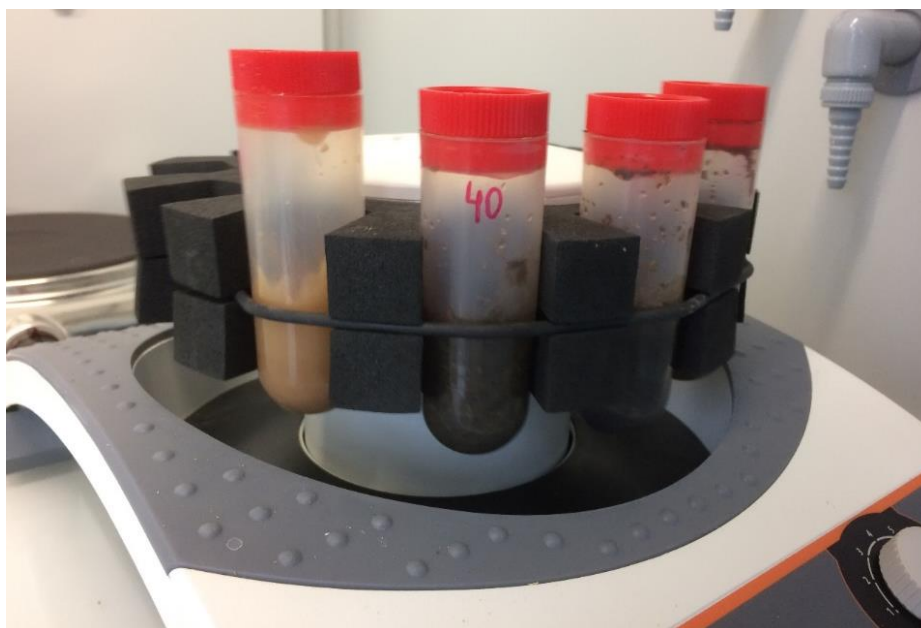
Distribuce mykotoxinů v balení je nehomogenní, a proto je nutný způsob odebrání vzorku z balení tak, aby vznikla homogenní směs vhodná pro testování na přítomnost mykotoxinů. Proto jsme použili metodu kvartace.

Uzavřená balení koření byla protřepána a poté vzorky z nich odebrány způsobem kvartace. To znamená, že celý obsah protřepaného koření byl vysypán na filtrační papír s naznačeným křížem, který papír dělil na rovnoměrné čtvrtiny. Na filtračním papíře se obsah koření důkladně promíchal a rovnoměrně rozprostřel. Z takto připraveného materiálu jsme postupně odebírali laboratorní lžičkou vzorky z náhodných míst každé čtvrtiny kříže. Takto byla připravena navážka 2 g od každého druhu koření. Mezi jednotlivými druhy koření se lžička oplachovala metanolem, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Filtrační papír se též pokaždém druhu koření měnil.

5.3 Postup přípravy vzorků a separace OTA na imunoafinitních kolonkách

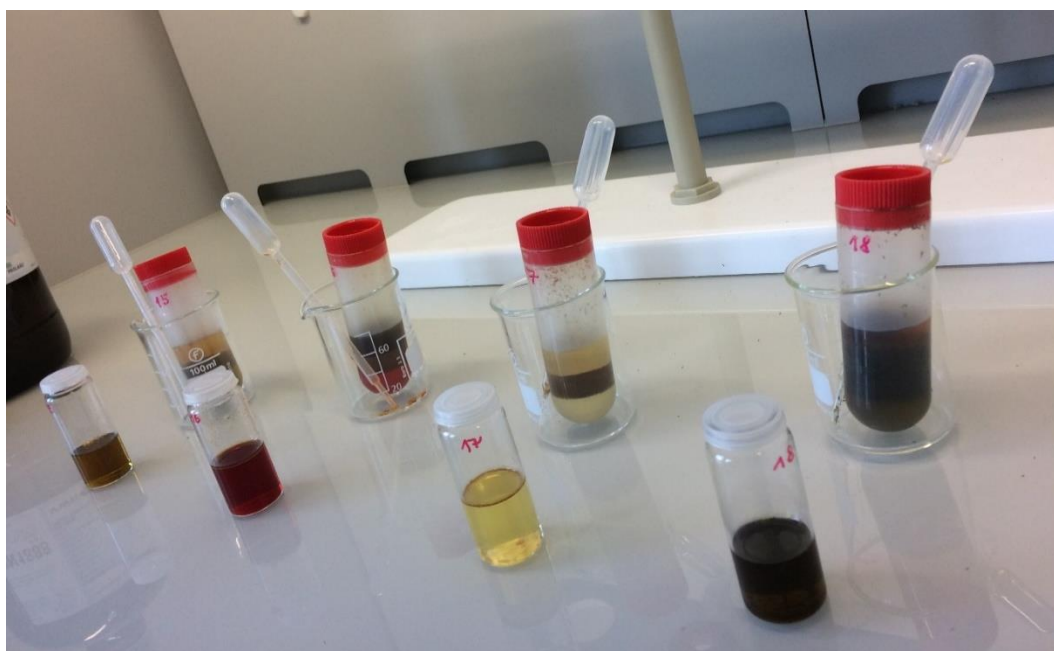
Příprava vzorků koření probíhala podle návodu Zimmerli & Dick (1995) s některými modifikacemi.

Do polypropylenové nádoby je umístěna navážka 2 g z vybraného druhu koření. K ní se přidá 10 ml pufru (H_3PO_4 a NaCl). Po dobu 1 minuty je směs intenzivně protřepána na třepačce ReaxMulti. Před vložením do třepačky je vhodné směs protřepat v ruce, odpustit nahromaděný plyn a víčko znovu pevně uzavřít.



Obrázek 5: Vzorky koření s PBS na třepače ReaxMulti.

Dalším krokem je extrakce pomocí CHCl_3 . Chloroform je přidáván celkem 4x po 5 ml a po každé je nutné nádobku po dobu 3 minut protřepat na ReaxMulti. Nádobky se umístí do centrifugy s rychlostí 4500 otáček za minutu, na dobu 15 minut. Následuje opatrné odpipetování spodní chloroformové fáze do skleněné nádoby o objemu 20 ml.



Obrázek 6: Extrakce pomocí chloroformu, odebírání spodní vrstvy.

Tato chloroformová fáze je následně odpařena pod proudem dusíku při teplotě do 45°C . Reziduum ve skleněné nádobce se spláchne kvantitativně dávkami chloroformu o celkovém objemu 5 ml. Nádobku poté vložíme na 3 minuty do ReaxMulti a 5 minut do ultrazvukové lázně.



Obrázek 7: Vzorky pro lepší rozpuštění umístěny v ultrazvukové lázni.

Poté je chloroformová fáze dvakrát extrahována 5 ml 3% NaHCO_3 . Směs je nutné po dobu 3 minut protřepat, následně je vložena do centrifugy na 5 minut s rychlostí 3500 otáček za minutu. Podíl NaHCO_3 z horní vrstvy, se stáhne do polypropylenové nádoby, ve které už je předem odpipetováno 1 ml CHCl_3 a 0,5 ml HCOOH .



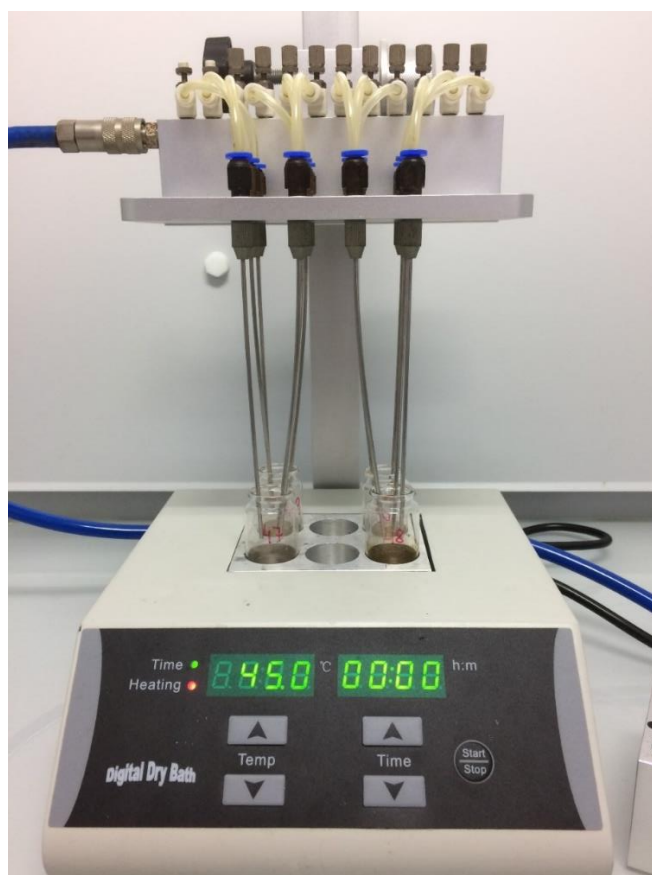
Obrázek 8: Extrakce pomocí hydrogenuhličitanu, stahuje se horní vrstva.

Vodná uhličitanová vrstva je reextrahována 2 x 2 ml CHCl_3 . Oba vzorky se dají třepat na 3 minuty a centrifugace probíhá 5 minut při 3500 otáčkách za minutu.



Obrázek 9: Vzorky umístěny v centrifuze.

Spodní chloroformová vrstva je opatrně odpipetována do skleněné nádoby a je odpařena pod proudem dusíku při teplotě 45°C.



Obrázek 10: Odpařování vzorků dusíkem při 45°C na koncentrátoru.

Dále probíhá přečištění na imunoafinitní kolonce.

Reziduum se nechá rozpustit v 5 ml roztoku PBS-metanol 15 %. Pro lepší rozpuštění můžeme vložit nádobku na 3 minuty do třepačky a na 5 minut do ultrazvukové lázně. Roztokem PBS-metanol 15 % se poté ještě 3x opláchnou stěny nádoby objemem 5 ml (na celkový objem 20 ml).

Zimunoafinitní kolonky se vytlačí pufr a krátce se prosaje vzduchem na prosávacím zařízení, ale pouze takovým způsobem, aby se filtr úplně nevysušil a zůstal zavodněný. Poté se všech 20 ml roztoku PBS-metanol 15 % umístí v nástavci nad adaptérem a roztok se prosaje přes kolonku rychlostí cca 2 ml/min (1 kapka/s). Opět se přes kolonku krátce prosaje vzduch (obdobně jako v předchozím případě). Potom se kolonka propláchne 20 ml vody Milli Q s rychlým prosátím vzduchu, protože je zapotřebí, aby protekla veškerá tekutina. Pokud by totiž prosátí vzduchem a odstranění tekutiny nebylo kompletní, mohlo by dojít k nežádoucímu naředění vzorku – a tudíž snížení naměřené koncentrace OTA.



Obrázek 11: Kolonky s násadcem naplněné pufrům PBS.

Pak se do nádoby nad adaptérem napipetuje 1 ml okyseleného metanolu a rychlostí 0,5 ml/min (nebo nižší rychlostí 1 kapka/2s) se provede eluce. Opět následuje prosátí vzduchu. Eluce vzorku se opakuje 5x do stejné nádoby a při poslední eluci se přidá 0,5 ml okyseleného metanolu.



Obrázek 12: Eluce OTA metanolem.

Vzorek se jímá do řádně označené vialky a nechá se odpařit při teplotě 45 °C proudem dusíku na koncentrátoru. Takto zpracované vzorky se nechají do analýzy uschované v chladničce. Před vlastní analýzou se vzorky temperují na pokojovou teplotu a rozpustí se v ekvivalentním množství metanolu.

5.4 Postup přípravy ke stanovení OTA metodou ELISA

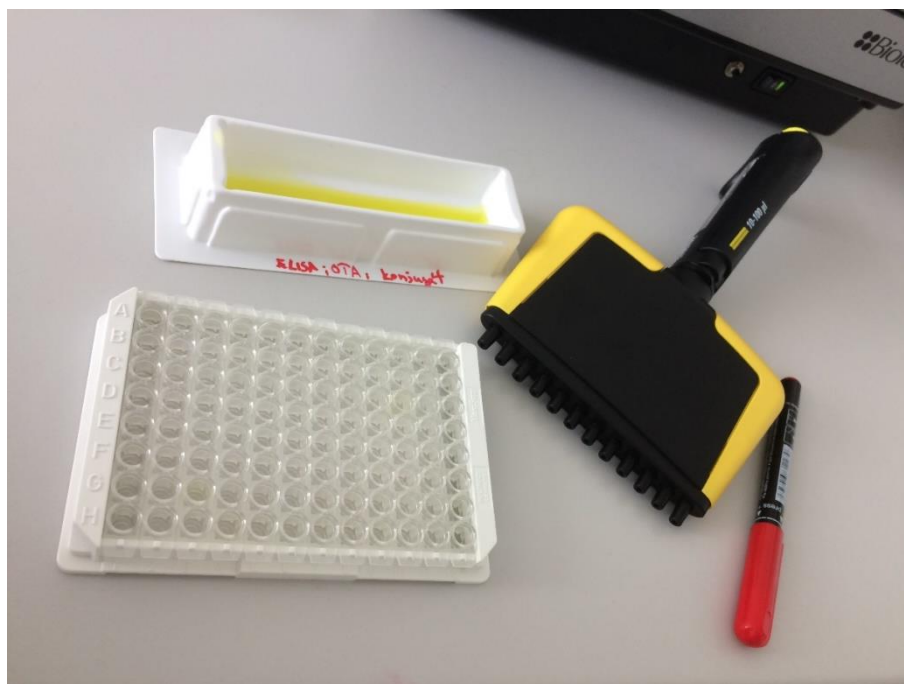
Ke stanovení ochratoxinu A byla použita sada RIDASCREEN, díky které lze získat přesnou koncentraci OTA v jednotkách ng/kg. Postup práce zahrnuje přípravu enzymového konjugátu, pipetování vzorků a standardů, pipetování konjugátu, inkubace, přípravu promývacího pufru využitého k promývání. Následuje pipetování chromogen substrátu a STOP substrátu a nakonec je použit ELISA reader (fotometr) pro vyhodnocení koncentrace (RIDASCREEN, 2014).

K promývání byla použita automatická promývačka stripů ELx50™ Biotek a postup práce byl proveden podle uživatelské příručky, která je dodávána s přístrojem.

Pro ELISA analýzu byl odparek, předem vyndaný z lednice a vytemperovaný, rozpuštěn v 0,5 ml pufru.

Příprava konjugátu

Červeně označená lahvička obsahuje enzymový konjugát, který se naředí do zkumavky v poměru (1:11) zředěným pufrům. Použije se takové množství pufru, které se předpokládá, že bude potřeba k měření vzorků. Při využití dvanácti-kanálové pipety, je možné připravit konjugát do vaničky.



Obrázek 13: Vanička s konjugátem, držák se stripů, pipeta.

Pipetování vzorků a standardů

Do držáku se umístí požadovaný počet stripů. Do každé zředovací jamky je odpipetováno 50 μ l vzorku nebo standardu. ELISA sada obsahuje standardy, které jsou v 6 lahvičkách o koncentracích 50, 100, 300, 900, 1800 ng/kg (ppt). Pro každý vzorek se používá nová pipetovací špička, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Pozice standardů a testovacích vzorků v mikrotitrační destičce se zapíše do tabulky (Tabulka 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Std 0	3	Std 0	13	Std 0	23	Std 0	33	Std 0	47
B	Std 50	4	Std 50	14	Std 50	24	Std 50	34	Std 50	48
C	Std 100	5	Std 100	15	Std 100	25	Std 100	35	41	49
D	Std 300	6	Std 300	16	Std 300	26	Std 300	36	42	50
E	Std 900	7	Std 900	17	Std 900	27	Std 900	37	43	51
F	Std 1800	8	Std 1800	18	Std 1800	28	Std 1800	38	44	52
G	1	9	11	19	21	29	31	39	45	53
H	2	10	12	20	22	30	32	40	46	54

Tabulka 4: Zapsané rozložení vzorků v mikrotitrační destičce. (Zkratka: Std – standardní roztok).

Pipetování konjugátu a inkubace

Předem připravený konjugát je pipetován do stripů o objemu 50 μ l. Po aplikaci konjugátu do všech jamek se obsah promíchá krouživým pohybem rámečku se stripy po podložce. Rámeček se stripy se poté umístí na místo bez přístupu světla a je inkubován po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20-25°C).

Fáze promývání

Pro fázi promývání je nutné připravit promývací pufr, který je součástí sady. Před zahájením promývání vzorků a standardů se spustí promývací program a 3x se nechají promýt pouze zkušební stripy, z důvodu pročištění jehlových trysek.

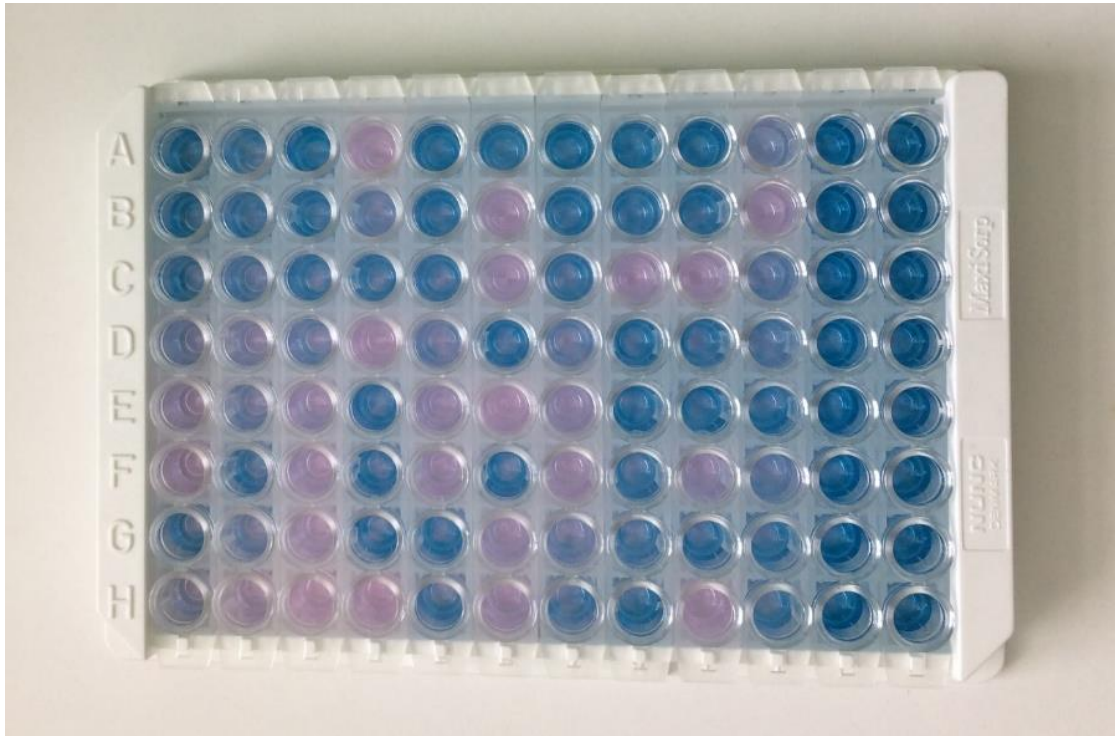


Obrázek 14: ELISA reader a promývačka stripů Biotek.

Po 30 minutách je z inkubovaných stripů odstraněna přebytečná tekutina. Následně se stripy umístí do promývačky a jsou 3x promyty. Po ukončení je znovu přebytečná tekutina odstraněna.

Chromogen substrát

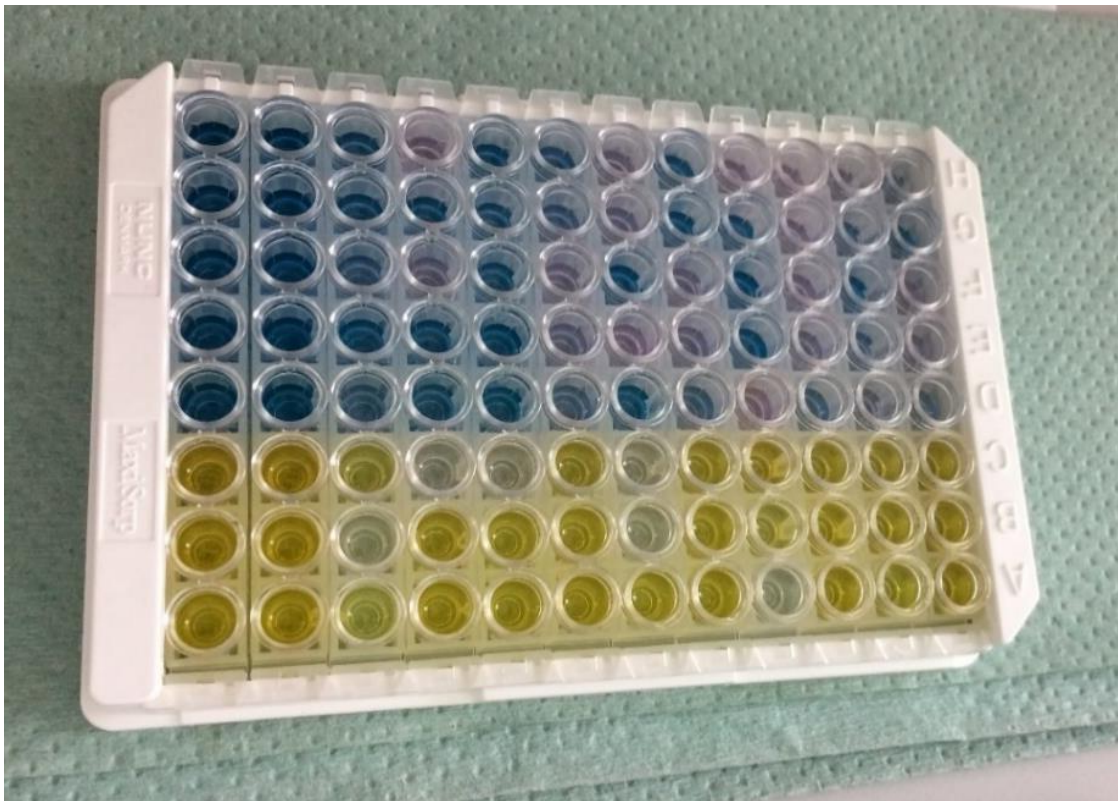
Do jednotlivých jamek se pipetuje chromogen substrát o objemu 100 μ l. Krouživým pohybem je rámeček se stripy opatrně promíchán a znovu umístěn na místo bez přístupu světla, kde inkubace probíhá po dobu 15 minut při pokojové teplotě. V tomto kroku dojde ke zbarvení pozitivních vzorků.



Obrázek 15: Rámeček se stripy po inkubaci s chromogen substrátem.

STOP substrátu

Po skončení inkubace je do každé jamky pipetováno 100 μ l STOP substrátu. Během tohoto procesu se mění barva z modré/fialové na žlutou.



Obrázek 16: Změna barvy (na žlutou) po aplikaci STOP substrátu.

Měření pomocí ELISA readeru

ELISA reader je fotometr, který měří absorbanci při vlnové délce 450 nm a koncentrace je měřena v jednotkách ppt (ng/kg) nebo ppb (ng/g). Vzorky je možné měřit nejdéle do 30 minut po přidání STOP substrátu.



Obrázek 17: Rámeček se stripy připraven ke čtení v ELISA readeru.

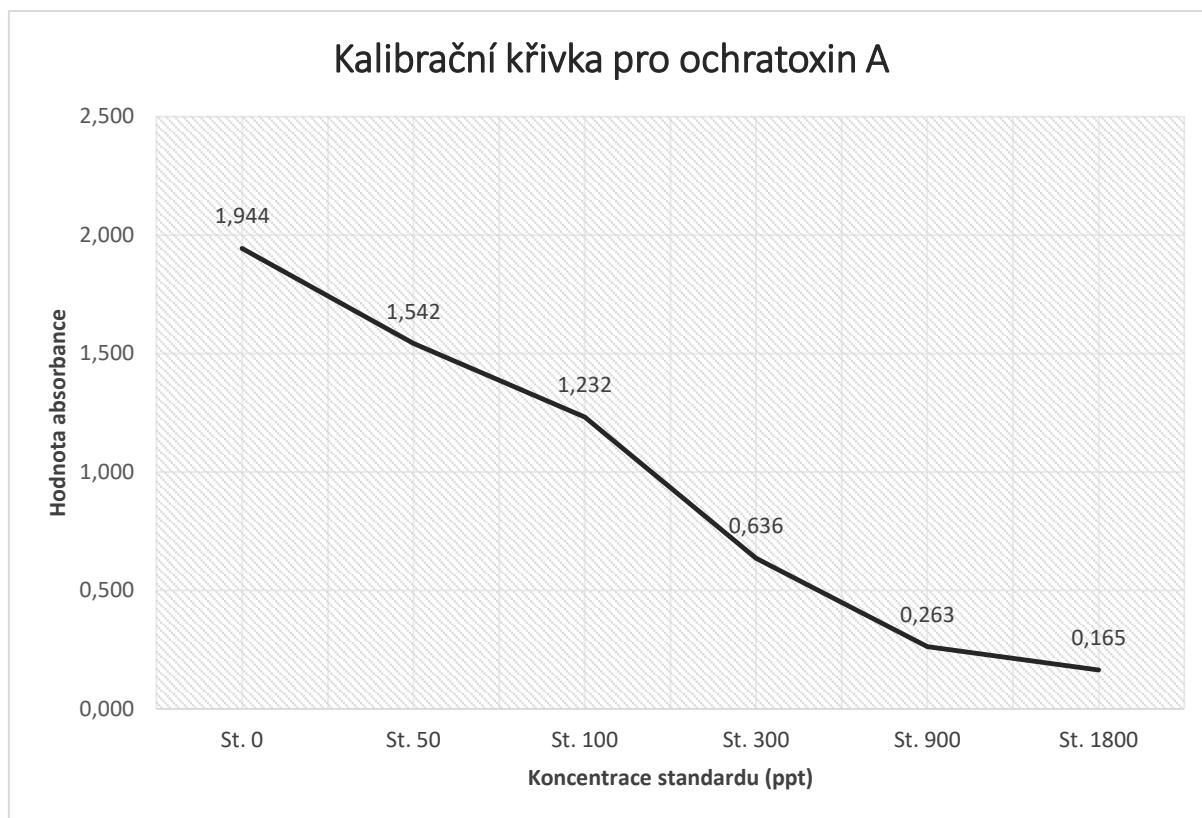
Fotometr je propojen s počítačem, kde jsou zaznamenány výsledky měření do softwarového programu Gen 5 (verze 1.10, BioTek). Do tabulky se zadá počet a umístění vzorků na destičce a přístroj začne měřit. Výsledky jednotlivých absorbancí při 450 nm program přepočte rovnou na odpovídající koncentraci v ppt.

6 Výsledky

Měření standardních vzorků slouží ke kalibraci přístroje ELISA. Ke stanovení ochratoxinu A byly použity standardy o koncentraci (0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt) z testovací sady. Měření probíhalo při vlnové délce 450 nm. Po změření jejich absorbance se získá kalibrační závislost (Tabulka 5). V logaritmickém měřítku jsou na jedné ose vyneseny hodnoty absorbance a na druhé ose hodnoty koncentrace a tím je získána kalibrační křivka (Graf 3).

Koncentrace standardů (ppt)	Hodnota absorbance
St. 0	1,994
St. 50	1,542
St. 100	1,232
St. 300	0,636
St. 900	0,263
St. 1800	0,165

Tabulka 5: Koncentrace standardů a jejich absorbance při 450 nm.



Graf 3: Měření standardní látky pomocí ELISA při vlnové délce 450 nm.

Celkem bylo každé měření opakováno třikrát (tj. v tripletu) a z hodnot jednotlivých měření byly vytvořeny průměry, které jsou zde uvedeny. Parametry z manuálu od výrobce pro metodu ELISA jsou uvedeny pro výtěžnost 100 % a specifita pro OTA je též 100 %.

Mez detekce pro cereálie a krmiva je podle výrobce 1.25 µg/kg. Přečištěním na imunoafinitních kolonkách se citlivost metody zvýšila a mez detekce pro naši metodu je 0,625 µg/kg. Návratnost metody je 65,9 % a relativní směrodatná odchylka je 0,5 %.

Z celkového počtu 54 vzorků jednodruhového koření (Tabulka 7) bylo shledáno 22 (40,74 %) vzorků OTA pozitivních.

U 11 (20,4 %) vzorků koření byla při prvním měření naměřena přítomnost OTA v koncentraci vyšší než 1800 ppt – chilli drcené se semínky, chilli mleté, kayenský pepř, kurkuma, muškátový květ, muškátový ořech, paprika sladká maďarská, pomerančová kůra, zázvor, kořen lékořice a mletá vanilka. Proto byly tyto vzorky zředěny a poté bylo měření zopakováno.

Výsledky koncentrace OTA u vzorků vyšší než 1,00 ng/g jsou uvedeny v Tabulce 6 a zpracovány v Grafu 4 uvedeném v příloze.

Koření	Latinský název	Č. vzorku	Koncentrace OTA (ng/g)
Lékořice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	46	260,73
Chilli mleté	<i>Capsicum annuum</i>	13	34,79
Muškatový květ	<i>Myristica fragrans</i>	24	30,81
Paprika mletá sladká	<i>Capsicum annuum</i>	27	23,86
Zázvor mletý	<i>Zingiber officinale</i>	41	19,17
Kayenský pepř	<i>Capsicum annuum</i>	16	17,79
Kurkuma	<i>Curcuma longa</i>	20	16,97
Vanilka	<i>Vanilla planifolia</i>	48	10,45
Muškatový ořech	<i>Myristica fragrans</i>	25	5,10
Chilli drcené	<i>Capsicum annuum</i>	12	5,09
Pomerančová kůra	<i>Citrus X sinensis</i>	35	4,01
Černý pepř	<i>Piper nigrum</i>	7	2,53
Hřebíček	<i>Syzygium aromaticum</i>	14	2,46
Hořčice	<i>Sinapis alba</i>	52	2,39
Kmín	<i>Carum carvi</i>	16	2,19
Bílý pepř	<i>Piper nigrum</i>	53	1,90
Bazalka	<i>Ocimum basilicum</i>	4	1,00

Tabulka 6: Výsledná koncentrace OTA v pozitivních vzorcích koření.

Povolené limity stanovené Evropskou Komisí (viz. 2.6.2 Limity OTA v potravinách) překročily z výše uvedených následující vzorky koření: kořen lékořice, chilli mleté, muškátový květ, paprika sladká, zázvor a kurkuma.

Vzorek	Český název	Latinský název
1	Anýz	<i>Pimpinella anisum</i>
2	Badyán	<i>Illicium verum</i>
3	Bazalka	<i>Ocimum spp.</i>
4	Bobkový list	<i>Laurus nobilis</i>
5	Citronela	<i>Cymbopogon citratus</i>
6	Citron	<i>Citrus limon</i>
7	Česnek	<i>Alium sativum</i>
8	Estragon	<i>Artemisia dracunculus</i>
9	Fenykl	<i>Foeniculum vulgare</i>
10	Hořčice bílá	<i>Sinapis alba</i>
11	Hřebíček	<i>Eugenia caryophyllata</i>
12	Chilli drcené se semínky	<i>Capsicum, Capsicum frutescens</i>
13	Chilli mleté	<i>Capsicum frutescens</i>
14	Jalovec	<i>Juniperus communis</i>
15	Kardamom	<i>Elateria cardamomum</i>
16	Kayenský pepř	<i>Capsicum frutescens</i>
17	Kmín mletý	<i>Carum carvi</i>
18	Kopr	<i>Anetum graveolens</i>
19	Koriandr	<i>Coriandrum sativum</i>
20	Kurkuma	<i>Curcuma longa</i>
21	Libeček	<i>Levisticum officinale</i>
22	Majoránka	<i>Majorana hortensis</i>
23	Medvědí česnek	<i>Alium ursinum</i>
24	Muškatový květ	<i>Myristica fragrans</i>
25	Muškatový ořech	<i>Myristica fragrans</i>
26	Oregano	<i>Origanum vulgare</i>
27	Paprika sladká	<i>Capsicum annuum</i>

Vzorek	Český název	Latinský název
28	Pažitka	<i>Allium schoenoprasum</i>
29	Pepř bílý	<i>Piper nigrum</i>
30	Pepř černý	<i>Piper nigrum</i>
31	Pepř růžový	<i>Schinus terebinthifolius</i>
32	Pepř zelený	<i>Piper nigrum</i>
33	Petržel	<i>Petroselinum sativum</i>
34	Pískavice	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
35	Pomeranč	<i>Citrus aurantium</i>
36	Rozmarýn	<i>Romarinus officinalis</i>
37	Saturejka	<i>Saturea hortensis</i>
38	Skořice	<i>Cinnamomum burmannii</i>
39	Šalvěj	<i>Salvia officinalis</i>
40	Tymián	<i>Thymus vulgaris</i>
41	Zázvor	<i>Zingiber officinale</i>
42	Nové koření	<i>Pigmenta officinalis</i>
43	Sečuánský pepř	<i>Zanthoxylum piperitum</i>
44	Římský kmín	<i>Cuminum cyminum</i>
45	Černucha (kmín černý)	<i>Nigella sativa</i>
46	Lékořice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
47	Sumah	<i>Rhus coriaria</i>
48	Vanilka	<i>Vanilla</i>
49	Galangal	<i>Alpinia glanga</i>
50	Asafoetida - čertovo lejno	<i>Ferula assa-foetida</i>
51	Kerblík	<i>Anthriscus</i>
52	Máta peprná	<i>Mentha piperita</i>
53	Celer	<i>Apium graveolens</i>
54	Šafrán	<i>Crocus</i>

Tabulka 7: Seznam 54 testovaných vzorků koření z českého trhu

7 Diskuze

V naší studii jsme u některých vzorků koření očekávali vyšší výskyt ochratoxinu A, s ohledem na výsledky předchozích studií zaměřených na přítomnost OTA a dalších mykotoxinů u vybraných druhů koření – např. u lékořice, mleté papriky, chilli, zázvoru, kurkumy a muškátového oříšku.

Celkem 54 (19,8 %) oznámení z RASFF o mykotoxinech souvisí s koncentracemi OTA v koření. Více než polovina (51,3 %) oznámení zahrnuje chilli (v prášku, celé a drcené), následované muškátovým oříškem (20,5 %). Každé z ostatních koření, jako je zázvor, pepř, kari a kurkuma, představuje méně než 5 % a kmín a muškátový květ dokonce méně než 1 % (Picková *et al.*, 2020).

Naše výsledky ukazují, že z celkového počtu 54 vzorků jednodruhového koření z českého trhu bylo shledáno 22 vzorků (40,74 %) pozitivních. Vyšší koncentrace byly zjištěny u koření, které už má stanovené limity pro přívod Evropskou komisí. Koncentraci nad 15 ng/g OTA obsahovalo 7 druhů (13 %) z celkového počtu 54 druhů koření, z čehož 6 vzorků překročilo limity povolené EK.

Na polském trhu bylo náhodně zakoupeno 79 různých komerčně dostupných vzorků koření a bylin k otestování na mykotoxiny. Četnost vzorků s OTA byla 49 % (Waškiewicz *et al.*, 2013). Ve studii z Malajsie, kde bylo testováno celkem 34 vzorků koření, byla průměrná hladina 2,21 ng/g, rozsah 0,14–20,40 ng/g a výskyt pozitivních vzorků OTA byl 79 % (Ali *et al.*, 2015). Výsledky studie z Iránu od Zareshahrabadi *et al.* (2020) uvádí, že z 80 vzorků koření bylo OTA kontaminováno 48 vzorků. Celkově bylo 29 z 92 (31,5 %) vzorků z Teheránu kontaminovaných OTA v rozmezí od 0,45 do 18,64 ng/g. Výsledky statistické analýzy prokázaly významný rozdíl v koncentracích OTA ($p < 0,05$) mezi druhy koření (Jalili, 2016). Průměrné koncentrace OTA byly 7,1 ng/g u OTA pozitivního koření a 7,0 ng/g u OTA pozitivních bylin (Darra *et al.*, 2019). Vyšší procento pozitivních vzorků a průměrné koncentrace mykotoxinů byly pozorovány u koření ve srovnání s bylinami (Gambacorta *et al.*, 2018). Darra *et al.* (2019) ve svém výzkumu dochází k závěru, že expozice člověka mykotoxinům v Libanonu prostřednictvím konzumace bylin a koření se ukazuje jako vysoká – 80 % analyzovaných vzorků bylo kontaminováno a 44 % obsahovalo více než jeden mykotoxin, proto nelze vyloučit synergické (souhlasné) účinky mykotoxinů. Z toho se OTA vyskytoval v černém pepři, chilli, červené paprice, kurkumě, kmínu, muškátovém ořechu, anýzu, a šalvěji.

Lékořice (*Glycyrrhiza glabra*) měla ze všech námi testovaných vzorků koření jednoznačně největší obsah OTA (260, 73 ng/g) a jeho hodnota byla několikanásobně vyšší než u ostatních vzorků.

Ariño *et al.* (2007) uvádí, že obsah OTA ve 30 vzorcích kořenů lékořice a odvozených produktů byl analyzován standardní HPLC technikou s fluorescenční detekcí. Bylo zjištěno, že všechny analyzované vzorky lékořice a odvozených produktů obsahují OTA, a některé z nich vykazují extrémně vysoké koncentrace až do 252,8 ng/g OTA.

Nejvyšší hladiny OTA byly nalezeny v sušeném kořenu lékořice v průměru 63,6 ng/g, zatímco průměrný obsah v čerstvém kořenu lékořice byl 9,2 ng/g. Úrovně ochratoxinu nalezené v lékořici a odvozených produktech jsou vyšší než hladiny uvedené v literatuře pro jiné potravinářské komodity. Huang *et al.* (2018) provedli současné stanovení mykotoxinů ve 31 různých druzích vzorků lékořice odebraných z drogerií a nemocnic v čínském Šanghaji. OTA byl zjištěn v lékořici, ale jeho míra kontaminace byla nízká, na rozdíl od zde výše uvedených výsledků studií. Vysvětlením může být to, že byl použit jiný zdroj či způsob skladování lékořice v různých regionálních oblastech.

Ariño *et al.* (2007) zjistili pomocí studie s přenosem OTA do čajů, že téměř 5 % OTA přítomných v sušeném kořenu lékořice je přeneseno do odpovídajícího čaje připraveného vařením, zatímco pouze 1 % OTA se přenáší v čajovém nálevu.

OTA byl naměřen u všech našich testovaných vzorků rodu *Capsicum* - v chilli mletém (34,79 ng/g), mleté sladké paprice (23,86 ng/g) i kayenském pepři (17,79 ng/g).

Scheuer & Gareis (2002) ve své studii v Německu detekovali OTA a OTB u 143 (21 %) a 68 (10 %) vzorků koření. Nejvyšší frekvence výskytu obou zjištěných mykotoxinů byla u chilli (100 % pro OTA a 55 % pro OTB) a papriky (41 % a 15 %). Gambacorta *et al.* (2018) testovali v Itálii 45 vzorků sladké papriky (*Capsicum annuum*) na výskyt různých druhů mykotoxinů a výskyt potenciálních toxigenních druhů mikroskopických vláknitých hub. Frekvence výskytu OTA a průměr pozitivních hodnot byly: 51 % a 29,5 ng/g, 5 vzorků bylo nad limit EU 20 ng/g. Ve své studii Motloun *et al.* (2018) pozorovali procentní výskyt OTA 14 % u papriky a 7 % u drceného chilli. Fazekas *et al.* (2005) uvádí procentní výskyt OTA 46 % u papriky a 20 % u chilli a Hierro *et al.* (2008) naměřili u papriky 67% výskyt. Jalili (2016) uvádí, že výskyt kontaminace OTA ve vzorcích koření z Teheránu u papriky a skořice byl významně vyšší než u černého pepře a kurkumy. Nejvyšší koncentrace OTA byla zjištěna ve vzorku papriky (18,64 ng/g). Fazekas *et al.* (2005) zjistili, že 32 ze 70 vzorků mleté červené papriky obsahovalo OTA, osm z nich v koncentraci převyšující „maximální limit“ 10 ng/g (v rozmezí 10,6-66,2 ng/g). Jeden vzorek chilli byl kontaminován OTA 2,1 ng/g. Kontaminace mletou červenou paprikou OTA přesahující „maximální limit“ byla způsobena velmi pravděpodobně smícháním dovezených šarží mleté červené papriky silně kontaminovaných OTA s červenou paprikou vypěstovanou v Maďarsku.

Dharmaputra *et al.* (2018) zjistili, že vhodné posklizňové zacházení s muškátovým oříškem (*Myristica fragans*) ovlivňuje jeho kvalitu, pokud jde o procento poškozených jader, plísňovou infekci a kontaminaci aflatoxiny, tj. muškátový oříšek by měl pocházet ze zralého muškátového ovoce, sušen kouřem a uložen ve skořápce. Muškátový oříšek získaný sběrem zralého ovoce ze stromu by neměl být mísen s tím, který spadl na zem. I přesto, že podle výsledků studie Qin *et al.* (2020) bývají podíly kontaminace květů méně časté než u plodů, z našich výsledků má muškátový květ (30,81 ng/g) vyšší obsah OTA než muškátový ořech (5,10 ng/g).

Hodnota OTA v našem vzorku zázvoru (*Zingiber officinale*) byla 19,17 ng/g.

Studie z Nigerie, kterou provedli Lippolis *et al.* (2017), analyzuje výskyt OTA v zázvoru a zjistila rozdílnou kontaminaci OTA, která je během období dešťů (OTA 77 %) významně vyšší než během období sucha (OTA 37 %). Průměrné hladiny OTA v pozitivních vzorcích byly 5,10 ng/g v období dešťů (rozmezí 0,20–9,90 ng/g) a 2,76 ng/g (0,17–12,02 ng/g) v období sucha. Thirumala-Devi *et al.* (2001) ve své studii naměřili dva vzorky z 25 vzorků zázvoru, které měly OTA vyšší než povolený limit 15 ng/g (23 ng/g a 80 ng/g).

Iha & Trucksess (2010) zjistili, že při 100 °C bylo v zázvorovém čaji nalezeno přibližně 20-30 % OTA z kontaminovaného zázvoru a celkové množství OTA v čaji se lišilo podle různých podmínek přípravy (teplota - 50 a 100°C, čas - 5 a 10 minut a objem - 100 a 200 ml) o méně než 5 %. Při teplotě 50 °C bylo v čaji nalezeno asi 10 % OTA.

U kurkumy (*Curcuma longa*) byl v rámci naší studie naměřen OTA 16,97 ng/g, což je nad stanoveným povoleným limitem EK.

Ve studii Thirumala-Devi *et al.* (2001) byl zjištěn obsah OTA nad 10 ng/g u 9 vzorků (v rozmezí 11-102 ng/g) z 25 vzorků kurkumy. Zareshahrabadi *et al.* (2020) uvádí, že z testovaných 20 vzorků kurkumy, byl u dvou vzorků pozitivní výskyt OTA v rozmezí 0.55–3.7 ng/g, ale žádný vzorek nepřesahoval povolený limit 15 ng/g.

Studie Zhai *et al.* (2020) provedená na kachňatech ukazuje, že kurkumin by mohl zmírnit oxidační poškození způsobené OTA a narušení metabolismu lipidů pomocí modulace mikrobioty slepého střeva.

V naší studii obsahoval černý pepř mírně vyšší koncentraci OTA (2,53 ng/g), než obsahoval bílý pepř (1,90 ng/g), ale oba výsledky byly pod povoleným limitem 15 ng/g. Tyto výsledky jsou také nižší, než uvádí předchozí studie zaměřené na výskyt OTA u pepře (*Piper spp.*).

Garcia *et al.* (2018) uvádí, že ve většině analyzovaných vzorků koření na OTA byly přítomny potenciálně toxinné houby, zejména u bílého a černého pepře. Scheuer & Gareis (2002) naměřili ve své studii u pepře 23% výskyt OTA a 44% výskyt OTB. Ve studii Thirumala-Devi *et al.* (2001) byl OTA detekován u 55 % vzorků černého pepře, hladiny se pohybovaly v rozmezí 0,05–13,15 ng/g. Ze 126 vzorků získaných z maloobchodních prodejen v Indii bylo zjištěno, že OTA překračuje 10 ng/g u 14 (v rozmezí 15-69 ng/g) z 26 vzorků černého pepře. Studie z Kamerunu od Nguégwouo *et al.* (2018) odhalila, že 10 % vzorků černého pepře a 40 % vzorků bílého pepře obsahovalo OTA v rozsahu mezi 1,15–1,91 ng/g a 1,81–4,89 ng/g. To je pod stanoveným limitem 15 ng/g stanoveným EK. Zareshahrabadi *et al.* (2020) v Iránu stanovili výskyt OTA přesahující povolený limit u všech dvaceti testovaných vzorků pepře v rozmezí 15.91–197.64 ng/g.

Na výskyt multi-mykotoxinů ukazuje studie Darra *et al.* (2019) u bylin (38 vzorků) a koření (94 vzorků) komerčně dostupných v Libanonu pocházejících z nejméně 15 zemí. Výsledky studie naznačují, že do nařízení ES by měly být zahrnuty některé byliny a koření, které dosud nebyly brány v úvahu. Khazaeli *et al.* (2017) tvrdí, že kontaminace koření mykotoxiny, a to i při nízkých koncentracích, může představovat vážnou hrozbu vzhledem k běžnému využívání koření při přípravě pokrmů. Proto se vzhledem k oblíbenosti

používání koření po celém světě velmi doporučuje pravidelné monitorování hladiny mykotoxinů v koření.

Z našich výsledků, které měly koncentrace OTA vyšší nad 1 ng/g, nejsou uvedeny limity např. pro vanilku (10,45 ng/g), pomerančovou kůru (4,01 ng/g), hřebíček (2,46 ng/g), hořčici (2,39 ng/g) a kmín (2,19).

Scheuer & Gareis (2002) v Německu zjistili, že jeden vzorek extraktu z vanilky (*Vanilla planifolia*) byl pozitivní na OTB při 15 ng/g. Střední hodnoty většiny vzorků se však ukázaly být pod detekčním limitem.

Nguegwouo *et al.* (2018) ve vzorcích hřebíčku (*Syzygium aromaticum*) OTA neobjevili. Hussein (2015) provedl studii za účelem vyhodnocení účinku krmiva pro drůbež kontaminovaného AF a OTA a dále vyzkoušel účinnost přidání slupek z granátového jablka a prášku z hřebíčku k detoxikaci mykotoxinů. Přidání 5 % slupek z granátového jablka a 2 % prášku z hřebíčku do kontaminované stravy způsobilo významné zvýšení hmotnosti kuřat a snížilo jejich úmrtnost.

V ruské studii Burkin *et al.* (2019) provedli výzkum na výskyt mykotoxinů v různých částech rostliny a různé vývojové etapě hořčice bílé (*Sinapis alba*) a zjistili výskyt celé řady mykotoxinů, mezi kterými byl i OTA. Nicméně Waškiewicz *et al.* (2013) uvádí, že z jejich testovaných vzorků byly bez mykotoxinů bílá hořčice a bobkový list.

Velmi nízký výskyt OTA na základě našich výsledků byl patrný u saturejky, oregana, rozmarýnu a petržele. Některé studie zkoumají vliv éterických olejů např. oregana a tymiánu jako inhibiční faktor na růst plísní.

Jeršek *et al.* (2014) uvádí, že thymol a karvakrol vykázal v závislosti na koncentraci vysoké inhibiční účinky na růst *Penicillium verrucosum* a produkci OTA. Pozorované antifungální účinky závisely na látce, použité koncentraci a době interakce mezi látkou a *P. verrucosum*. Výsledky jejich studie naznačují možnost použití oreganového éterického oleje jako náhrady za umělé konzervační látky v některých potravinách, ale s tím, že je zapotřebí dalšího výzkumu. Foltinová *et al.* (2017) z výsledků studie dochází k závěru, že oreganový a tymiánový éterický olej by mohly být použity jako přírodní konzervační látky užitečné v potravinářském průmyslu, neboť stoprocentně inhibovaly růst všech testovaných izolátů *Aspergillus flavus*. Citronový, eukalyptový a šalvějový éterický olej neměly významné inhibiční účinky na testované izoláty *Aspergillus flavus*, ale ovlivňovaly růst kolonií během kultivace. Alvaréz *et al.* (2020) potvrzuje, že oregano také významně snížilo rychlost růstu *P. nordicum* na sušených fermentovaných uzeninách a oregano i rozmarýn významně snížily akumulaci OTA. Tímto by koření umožnilo uspokojit současnou poptávku spotřebitelů po přírodních konzervačních látkách a současně minimalizovalo riziko spojené s přítomností OTA v uzených masech. Garcia *et al.* (2018) pozorovali, že oregano vykázalo vysoký počet izolátů komplexu *A. niger*, avšak pouze 2,04 % z nich bylo schopno produkovat OTA.

8 Závěr

I přesto, že koření představuje pro člověka nízký zdroj expozice OTA, je nutné jeho hladinu pravidelně monitorovat. Koření je sice konzumováno v menších objemech než běžné potraviny, což přímo nenahrává rozvoji akutních příznaků, ale za to se při přípravě pokrmů využívá nepřetržitě. Proto je důležité mít přehled o přívodu OTA, který je nebezpečný z hlediska chronické expozice.

Velká část koření pochází z různých tropických oblastí a rozvojových zemí, kde klimatické podmínky (období dešťů, zvýšená vlhkost a teplota) nahrávají rozvoji růstu toxinogenních plísní. Globální oteplování je dalším činitelem, který rozvoj plísní podporuje. Proto je potřeba kontrolovat dovážené, ale také domácí suroviny a udržovat aktuální přehled o kontaminaci OTA i dalšími mykotoxiny. Přestože u tuzemských výrobků není kontaminace potravin a koření vysoká, je důležité kontrolovat kvalitu surovin. Od sklizně po přípravu pokrmu je dlouhá cesta, při které se mohou koření a potraviny kontaminovat. V dosavadních studiích bylo zjištěno mnoho různých koncentrací OTA u stejného druhu koření, neboť se tato hodnota odvíjí od mnoha faktorů, které na komodity působí (geografický původ koření, způsob sušení a skladování, hygienické zásady atp.)

Je třeba řídit riziko u člověka, tj. minimalizovat zdravotní dopady dodržováním správné zemědělské praxe, výrobní a hygienické praxe a prováděním tzv. autokontroly. Důležitým prostředkem pro zesílení bezpečnosti potravin je sledovatelnost (*traceability*) produktu. Využíváním těchto postupů lze zajistit snížení ekonomických ztrát z koření.

Průběžné monitorování koncentrace OTA v koření je nezbytné, neboť podmínky růstu, sklizně, sušení, přepravy a skladování se liší u každé dodávané šarže. Zajištěním bezpečnosti a kvality koření se zvyšuje ochrana zdraví konzumentů.

Data o obsahu OTA v koření v této práci byla získána pomocí imunochemické metody stanovení ELISA za předchozí extrakce a separace na imunoafinitních kolonkách. Přечиštěním vzorků na imunoafinitních kolonkách se citlivost metody výrazně zvyšuje. V této práci jsme zjistili vyšší výskyt OTA u druhů koření, které už jsou nařízenými regulované (pepř, paprika, chilli, lékořice, kurkuma, muškátový oříšek), ale byl zaznamenán pozitivní výskyt i u některých dalších druhů koření, jako jsou např. hořčice, hřebíček, vanilka, pomerančová kůra. Některé druhy koření měly obsah OTA naopak velice nízký (saturejka, petržel, oregano), což by mohlo být předmětem dalších výzkumných studií. Bylo by též vhodné zajistit další přehled o studiích zaměřených na podíl OTA ze surového koření a jeho reálný přenos do hotových pokrmů či bylinných a kořeněných čajů.

9 Seznam literatury

1. ABRUNHOSA L., PATERSON R.R. & VENÂNCIO A. 2010: Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, 2(5),1078–1099.
2. AHLBERG S.H., JOUTSJOKI V. & KORHONEN H.J. 2015: Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87–102.
3. ALI N., HASHIM N.H. & SHUIB N.S. 2015: Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Additives & Contaminants*, 32(4), 518-532.
4. ÁLVAREZ M., RODRÍGUEZ A., NÚÑEZA F., SILVAC A. & ANDRADEA M.J. 2020: In vitro antifungal effects of spices on ochratoxin A production and related gene expression in *Penicillium nordicum* on a dry-cured fermented sausage medium. *Food Control*, 114, 107222.
5. AMEZQUETA S., GONZALEZ-PENAS E., MURILLO-ARBIZU M. & DE CERAIN A.L. 2009: Ochratoxin A decontamination. *Food Control*, 20, 326-333
6. ARIÑO A., HERRERA M., ESTOPAÑAN G. & JUAN T. 2007: High levels of ochratoxin A in licorice and derived products. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 366-369.
7. AZZOUNE N., MOKRANE S., RIBA A., BOURAS N., VERHEECKE C., et al. 2015: Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8 (1), 137-144.
8. BASILICO M.Z. & BASILICO J.C. 1999: Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 238–24.
9. BĚLÁKOVÁ S., BENEŠOVÁ K., MIKULÍKOVÁ R. & SVOBODA Z. 2015: The Occurrence of Ochratoxin A in Beers. *Kvasny Prumysl* [online]. 61(2), 34-37 [cit. 2020-09-12]. Dostupné z: <https://www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2015/02/02.pdf>
10. BENETT J.W. & KLICH M. 2003: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
11. BURKIN A.A., KONONENKO G.P. & MOSINA L.V. 2019: The first mycotoxicological investigation of white mustard (*Sinapis alba* L.). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54(1), 186-194.
12. CABAÑES F. J., BRAGULAT M. R. & CASTELLÁ G. 2010: Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. *Toxins*, 2(5), 1111- 1120
13. CAST: Council for Agricultural Science and Technology 2003: Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Ames, Iowa, USA, 199 p. ISBN 1-887383-22- 0
14. CONTE G., FONTANELLI M., GALLI F., COTROZZI L., PAGNI L. & PELLEGRINI E. 2020: Mycotoxins in Feed and Food and the Role of Ozone in Their Detoxification and Degradation: An Update. *Toxins*. 12(8), 486.
15. CORONEL M. B., SANCHIS V., RAMOS A. J. & MARIN S. 2010: Review. Ochratoxin A: Presence in human plasma and intake estimation. *Food Science and Technology International*, 16(1), 5-18.
16. Da SILVA A.R.P., FUNGARO M.H.P., SILVA J.J., MARTINS L.M., TANIWAKI M.H. & IAMANAKA B.T. 2021: Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Research International*, 142, 110207.

17. De RUYCK K., De BOEVRE M., HUYBRECHTS I. & De SAEGER S. 2015: Dietary mycotoxins, coexposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation research - Reviews in mutation research*, 766, 32-41.
18. DHARMAPUTRA O. S., AMBARWATI S., RETNOWATI I. & NURFADILA N. 2018: Determining appropriate postharvest handling method to minimize fungal infection and aflatoxin contamination in nutmeg (*Myristica fragrans*). *International Food Research Journal*, 25(2), 545-552.
19. EFSA 2006: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM] Related to Ochratoxin A in Food. *EFSA Journal*, 4(6), 1-56, ISSN 1831-4732.
20. EL DARRA N., GAMBACORTA L. & SOLFRIZZO M. 2019: Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon. *Food Control*, 95, 63-70.
21. EL KHOURY A. & ATOUI A. 2010: Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*. 2(4), 461-493.
22. ESPEJO F., VÁZQUEZ C., PATIÑO B. & ARMADA S. 2010: Ochratoxin A production in aniseed-based media by selected fungal strains and in anise fruits (*Pimpinella anisum* L.). *Mycotoxin Research*, 26(2), 75-84.
23. EVROPSKÁ KOMISE 2006. *Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách* [online]. Dostupné z WWW: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&qid=1626190125216&from=CS>.
24. EVROPSKÁ KOMISE 2010. *Nařízení Komise (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A* [online]. Dostupné z WWW: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0105&qid=1626190213923&from=CS>.
25. EVROPSKÁ KOMISE 2012. *Nařízení Komise (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách* [online]. Dostupné z WWW: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0594&qid=1626190459747&from=CS>.
26. EVROPSKÁ KOMISE 2015. *Nařízení Komise (EU) č. 2015/1137 ze dne 13. července 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limit ochratoxinu A v koření *Capsicum spp.** [online]. Dostupné z WWW: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1137&qid=1626189969301&from=CS>.
27. FAO 2001: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Fifty-sixth meeting. Geneva, Switzerland, pp. 6-15.
28. FAVILLA M., PASCALE M., RICELLI A., EVIDENTE A., AMALFITANO A., & ALTOMARE C. 2008: Inhibition of Species of the *Aspergillus* Section Nigri and Ochratoxin A Production in Grapes by Fusapyrone. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2248-2253.
29. FAZEKAS B., TAR A. & KOVÁCS M. 2005: Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22(9), 856-863.
30. FIALOVÁ V. 2013: Vybrané imunochemické metody [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK. [cit. 2020-03-05]. Dostupné z WWW: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1153/Imunochemie%20201314teorie.pdf>

31. FOLTINOVÁ D., TANČINOVÁ D. & CÍSAŘOVÁ M. 2017: Influence of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 322–331.
32. FRÁGNER P. 1967: *Mykologie pro lékaře*. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha. 348 s.
33. FRISVAD J.C. & SAMSON R.A. 2004: Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1–173.
34. GAMBACORTA L., MAGISTA D., PERRONE G., MURGOLO S., LOGRIECO A.F. & SOLFRIZZO M. 2018: Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 159-173.
35. GARCIA M.V., PARUSSOLO G., MORO C.B., BERNARDI A.O. & COPETTI M.V. 2018: Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. *Food Microbiology*, 73, 93-98.
36. GORYACHEVA I. Yu., De SAEGER S., LOBEAU M., EREMIN S.A., BARNA-VETRÓ I. & Van PETEGHEM C. 2006: Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, 577(1), 38-45.
37. GRENIER B., LOUREIRO-BRACARENSE A. P., LESLIE J.F. & OSWALD I.P. 2014: Physical and Chemical Methods for Mycotoxin Decontamination in Maize. In: *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, pp.116-129. Eds: John F. Leslie, Antonio F. Logrieco.
38. HABUŠTOVÁ, O., SEHNAL, F., SVOBODOVÁ, Z., & HUSSEIN, H. M. 2011: Optimalizace metodiky ELISA pro stanovení obsahu Cry3Bb1 toxinu v různých částech kukuřice pomocí komerčního kitu. České Budějovice. Biologické Centrum AV ČR, 27 s. ISBN: 978-80-86668-11-6.
39. HAYAT A., PANIEL N., RHOUATI A. MARTY, J.-L. & BARTHLELMES L. 2012: Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control*, 26, 401–415.
40. HERINK J., RYCHLÍK I. & PELCLOVÁ D. 2007: *Toxické poškození ledvin houbami: patogeneze, klinika, léčba*. Praha: Maxdorf, 303 s. ISBN 9788073451226.
41. HRDINA V., HRDINA R., JAHODÁŘ L., MARTINEC Z. & MĚRKA V. 2004: *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén, 302 s. ISBN 80-7262-256-0.
42. HUANG X., WANG S., MAO D., MIAO S., HU Q. & JI S. 2018: Optimized QuEChERS Method Combined with UHPLC-MS/MS for the Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Licorice. *Journal of AOAC International*, 101(3), 633-642.
43. HUSSEIN H.Z. 2015: Activity of Pomegranate Peels and Clove Powders in Detoxification of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A from Contaminated Poultry Diet. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(1), 249-251.
44. CHEN J.A., TANG D., ZHOU Y.Q., SUN B.D., LI X.J., WANG L.Z. & GAO W.W. 2013: Identification of Ochratoxin A Producing Fungi Associated with Fresh and Dry Licorice. *PLoS ONE*, 8(10), e78285.
45. IARC 1993: *IARC Monographs on the evaluation on of carcinogenic risk in human: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon, France. ISBN 92-832-1256-8.

46. IARC 1998: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lists of IARC evaluations*. Lyon, France, ISBN 92-832-1273-8.
47. IHA M.H. & TRUCKSESS M.W. 2010: Aflatoxins and ochratoxin A in tea prepared from naturally contaminated powdered ginger. *Food Additives & Contaminants*, 27(8), 1142-1147.
48. IHA M.H. & TRUCKSESS M.W. 2019: Management of Mycotoxins in Spices. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1732-1739.
49. JACKSON S. A. & DOBSON 2011: Yeasts and Molds: *Aspergillus flavus*. *Reference Module in Food Science*, 785–791.
50. JALILI M. 2016: Natural Occurrence of Ochratoxin A Contamination in Commercial Spices in Tehran. 2016. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(3), 25-30.
51. JANATKOVÁ I. 2014: Imunochemické metody [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. [cit. 2020-08-10]. Dostupné z WWW: <https://docplayer.cz/18643780-Imunochemicke-metody.html>
52. JECFA 2008: Ochratoxin A (addendum). In Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the 68th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, June 19-28, 2007, Geneva, Switz. *WHO food additive series*, Vol. 59, 169-180, 357-429, 454.
53. JERŠEK B., ULRIH N.P., SKRT M. & GAVARIC N. 2014: Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65(2), 199-208.
54. KABAK B. & DOBSON A.D. 2017: Mycotoxins in spices and herbs – An update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 18–34.
55. KARLOVSKY P., SUMAN M., BERTHILLER F., DE MEESTER J., EISENBRAND G., PERRIN I. OSWALD I.P., SPEIJERS G., CHIODINI A., RECKER T. & DUSSORT P. 2016: Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32, 179–205.
56. KHAZAELI P., MEHRABANI M., HEIDARI M.R., ASADIKARAM G. & NAJAFI M.L. 2017: Prevalence of Aflatoxin Contamination in Herbs and Spices in Different Regions of Iran. *Iran J Public Health*, 46(11), 1540-1545.
57. KÖSZEGI T. & POÓR M. 2016: Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8(4), 111.
58. KUBÁTOVÁ A. 2001: Miniatlás mikroorganismů. Multimediální elektronický výukový materiál [online]. Masarykova univerzita, Brno 2006 [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>
59. LACIAKOVÁ A., ČONKOVÁ E., MALÍŘ F., OSTRÝ V., PIPOVÁ M., MÁTÉ D., PIECKOVÁ E., TKÁČIKOVÁ S. & VÝROSTKOVÁ J. 2011: Mikroskopické vláknité huby a mykotoxiny v potravinách a krmivách. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Viena s. r. o., Košice, 1. vydanie, 298 s. ISBN 978-80- 8077-252-9.
60. LHOTSKÁ I., ŠATÍNSKÝ D., HAVLÍKOVÁ L. SOLICH P. 2016: A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 3319-3329.
61. LIPPOLIS V., IRURHE O., PORRICELLI A.C.R., CORTESE M., SCHENA R., IMAFIDON T., OLUWADUN A. & PASCALE M. 2017: Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in ginger (*Zingiber officinale*) from Nigeria. *Food Control*, 73, 1061-1067.

62. MAGAN N. & ALDRED D. 2005: Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, 1(1), 10-16.
63. MAGAN N. & OLSEN M. 2004: *Mycotoxins in food: detection and control*. Cambridge: Woodhead Publishing, 1st ed. 471 s. ISBN 1-85573-733-7.
64. MAGAN N., SANCHIS V. & ALDRED D. 2003: The role of fungi in seed deterioration, In: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*, pp. 311–23. Eds.: Arora D.K.
65. MALEKINEJAD H., FARSHID A.A. & MIRZAKHANI N. 2011: Liquorice plant extract reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 125-30.
66. MALIR F., OSTRY V. & NOVOTNA E. 2013: Toxicity of the mycotoxin Ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Review*, 32, 19–33.
67. MALIR, F., OSTRY, V., GROSSE, Y., ROUBAL, T., SKARKOVA, J. & RUPRICH, J. 2006: Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. *Molecular nutrition & food research*, 50(6), 513–518.
68. MALÍŘ F. & OSTRÝ V. (Eds.) 2003: *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno 2003.
69. MALÍŘ F. CHL ZÚ HK. 2010: SOP HK 302.05: *Stanovení ochratoxinu A (OTA) metodou HPLC-FLD*. 2. vydání, Hradec Králové, 1-13.
70. MALÍŘ, F. & OSTRÝ, V. 2010: Aflatoxiny – toxické účinky u člověka. *Kontakt*, 14(1), 85–93.
71. MALÍŘ, F., PSOTA V., ROUBAL T., SEVERA J., MAREČEK J. & HUBÍK K. 2001: Plísně a mykotoxiny v cereáliích a pivovarských surovinách, zásady způsobu odběru vzorků ke stanovení mykotoxinů. *Kvasný průmysl*. 47(6), 172-173.
72. MALÍŘ, F., ROUBAL, T., SEVERA, J., ŘIČAŘOVÁ, B., ROLEČKOVÁ, E. & MAREŠOVÁ, H. 2005: Některé toxikologicky významné mykotoxiny a možné zdravotní riziko. *Sborník přednášek*, 16(1), 75–78.
73. MARROQUÍN-CARDONA A.G., JOHNOSN N.M., PHILLIPS T.D., HAYES A.W. 2014: Mycotoxins in a changing global environment - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220–230.
74. MODRÁ, H. & SVOBODOVÁ, Z. & kol. 2017: *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Praha: Profi Press. 2. vydání, 279 s. ISBN 978-80-86726-83-0.
75. MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., ŠIROKÁ, Z., & BLAHOVÁ, J. 2014: *Toxikologie potravin – vybrané kapitoly*. Brno: Veterinární a farmaceutická fakulta Brno. 87 s. ISBN: 978-80-7305-751-0.
76. MOTLOUNG L., De SAEGER S., De BOEVRE M., DETAVERNIER C., AUDENAERT K., ADEBO O. A., & NJOBEH P.B. 2018: Study on mycotoxin contamination in South African food spices. *World Mycotoxin Journal*, 11(3), 401-409.
77. MZE 2021: Aktuální diskutovaná témata v oblasti kontaminantů v potravinách – říjen 2021 [online]. Ministerstvo zemědělství – Odbor bezpečnosti potravin. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/aktualni-diskutovana-temata-v-oblasti-kontaminantu-v-potravinach-rijen-2021.aspx>
78. NEUGEBAUEROVÁ J. 2006: *Pěstování léčivých a kořeninových rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 122 s. ISBN 80-7157-997-1.

79. NGUEGWOUO E., SONE L.E., TCHUENCHIEU A., TENE H.M., MOUNCHIGAM E., NJAYOU N.F. & NAMA G.M. 2018: Ochratoxin A in black pepper, white pepper and clove sold in Yaoundé (Cameroon) markets: contamination levels and consumers' practices increasing health risk. *International Journal of Food Contamination volume*, 5(1).
80. OSTRÝ V. 1998: *Vláknité mikroskopické houby (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka*. Státní zdravotní ústav, Praha, 20s. ISBN: 80-7071-102-7
81. OSTRÝ V., MALIR F. & RUPRICH J. 2013: Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 5(9), 1574-1586.
82. OTTENEDER, H. & MAJERUS, P. 2000: Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17(9), 793-798.
83. PETRUZZI L., BEVILACQUA A., BAIANO A., BENEDEUCE L., CORBO M.R. & SINIGAGLIA M. 2014: In vitro removal of ochratoxin a by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their performances under fermentative and stressing conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 60-70.
84. PFOHL-LESZKOWICZ A. & MANDERVILLE R.A. 2007: Ochratoxin A: An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 61-99.
85. PFOHL-LESZKOWICZ A. 2009: Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60(4), 465-482.
86. PFOHL-LESZKOWICZ A., GROSSE Y., KANE A., CREPPY E.E. & DIRHEIMER G. 1993: Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin, ochratoxin A. *Mutation Research*, 289(2), 265-273.
87. PICKOVA D., OSTRÝ V., MALIR J., TOMAN J. & MALIR F. 2020: A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. *Toxins*, 12(12), 789.
88. PITT J. I. 2000: Toxicogenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56(1), 184-192.
89. PITT J. I. & HOCKING A. D. 2009: Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic & Professional, 3rd Edition, 519 pp.
90. PRZYBYLSKA-GORNOWICZ B., TARASIUK M., LEWCZUK B., PRUSIK M., ZIÓLKOWSKA N., ZIELONKA L., GAJECKI M. & GAJECKA M. 2015: The Effects of Low Doses of Two *Fusarium* Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum. A Light and Electron Microscopic Study. *Toxins*, 7(11), 4684-4705.
91. QIN L., JIANGA J., ZHANGA L., DOUA X., OUYANGC Z., WANB L. & YANGA M. 2020: Occurrence and analysis of mycotoxins in domestic Chinese herbal medicines. *Mycology* 11(2), 126-146.
92. RINGOT D., CHANGO A., SCHNEIDER Y.-J. & LARONDELLE Y. 2006: Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18-46.
93. RUPRICH J. 1997: *Mykotoxin ochratoxin A: hodnocení nebezpečnosti a zdravotního rizika*. Praha: Státní zdravotní ústav
94. SALADINO F., LUZ C., MANYES L., FERNANDEZ-FRANZ M. & MECA G. 2016: In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*, 67, 273-277

95. SAMSON R.A. & PITT J.I. (Eds.) 2000: Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 524p. ISBN 9780367397968
96. SHANAKHAT H., SORRENTINO A., RAIOLA A., ROMANO A., MASIA P. & CAVELLA C. 2018: Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(11), 4003-4013.
97. SCHEUER R. & GAREIS M. 2002: Occurrence of ochratoxin A and B in spices. *Mycotoxin Research*. 18(2), 62-66.
98. STEJSKAL V., & HAJŠLOVÁ J. 2008: *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů*. Praha: Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, 52 s.
99. STREIT E., SCHATZMAYR G., TASSIS P., TZIKA E., MARIN D., TARANU I., TABUC C., NICOLAU A., APRODU I., PUEL O. & OSWALD P. I. 2010: Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed-Focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788-809.
100. SUCHÝ P. & HERZIG I. 2005: Plísně a mykotoxiny, Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. Vědecký výbor výživy zvířat [online]. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha 2005. [cit. 2020-10-09]. Dostupné z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Hezig-Such%C3%BD-Plisne-a-mykotoxiny-2005.pdf>
101. SWEENEY M.J. & DOBSON A.D.W. 1998: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 141-58.
102. SZPI 2011: Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. [cit. 2020-10-09]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&docType=ART&nid=11414>
103. SZÜCS V., SZABÓ E., LAKNER Z. & SZEKACS A. 2018: National seasoning practices and factors affecting the herb and spice consumption habits in Europe. *Food Control*, 83, 147-156.
104. ŠKÁRKOVÁ J., OSTRÝ V., MALÍŘ F., & ROUBAL T. 2013: Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 46(10), 1495-1504.
105. TAN S. Y. & TATSUMURA Y. 2015: Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Medicine Journal*, 56(7), 366-367.
106. THIRUMALA-DEVI K., MAYO M.A., REDDY G., TANGNI E.K., LARONDELLE Y. & REDDY D.V. 2001: Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives & Contaminants*, 18(9), 830-835.
107. TOMAN J., MALIR F., OSTRÝ V., KILIC M.A., ROUBAL T., GROSSE Y. & PFOHL-LESZKOWICZ A. 2017: Transfer of ochratoxin A from raw black tea to tea infusions prepared according to the Turkish tradition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 261-265.
108. VALÍČEK P. 2007: *Pochutiny a koření*. 1. vydání, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 84 s. ISBN 978-80-7375-049-7.

109. Van EGMOND H.P. 1991: Methods for determining Ochratoxin A and other nephrotoxic mycotoxins. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors. pp. 57–70. Eds.: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G.
110. VARGA J., KOCSUBÉ S., PÉTERI Z., VÁGVÖLGYI C. & TÓTH B. 2010: Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins*, 2(7), 1718–1750.
111. VELÍŠEK J. & HAJŠLOVÁ J. 2009: Chemie potravin 2. 3. vydání, Tábor: OSSIS, 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
112. VELÍŠEK, J. 2002: Chemie potravin 3. 2. vydání, Tábor: OSSIS, 368 s. ISBN 80-86659-03-8
113. VLKOVÁ E., RADA V. & KILLER J. 2009: Potravinářská mikrobiologie. 2. vydání, Praha: Česká zemědělská univerzita, 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2
114. VOTAVA M. 2003: Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vydání, Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5
115. WAŚKIEWICZ A., BESZTERDA M., BOCIANOWSKI J & GOLIŃSKI P. 2013: Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC-MS/MS method. *Food Microbiology*, 36(2), 426-31.
116. YANG Z., WANG H., YING G., YANG M., NIAN Y., LIU J. & KONG W. 2017: Relationship of Mycotoxins Accumulation and Bioactive Components Variation in Ginger after Fungal Inoculation. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 331.
117. YU J., SMITH I.N. & MIKIASHVILI N. 2020: Reducing Ochratoxin A Content in Grape Pomace by Different Methods. *Toxins*, 12(7), 424.
118. ZAHRA N., KHAN M., MEHMOOD Z., SAEED M. K., KALIM I., AHMAD I., & MALIK K. A 2018: Determination of Aflatoxins in Spices and Dried Fruits. *Journal of Scientific Research*, 10(3), 315-321.
119. ZARESHAHRABADI Z., BAHMYARI R., NOURAEI H. KHODADADI H., MEHRYAR P., ASADIAN F. & ZOMORODIAN K. 2020: Detection of Aflatoxin and Ochratoxin A in Spices by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Quality*, 2020, 8858889.
120. ZHAI S.S., RUAN D., ZHU Y.W., LI M.C., YE H., WANG W.C. & YANG L. 2020: Protective effect of curcumin on ochratoxin A-induced liver oxidative injury in duck is mediated by modulating lipid metabolism and the intestinal microbiota. *Poultry Science*, 99(2), 1124-1134.
121. ZIMMERLI B. & DICK R. 1995: Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food additives & contaminants*, 13(6), 655-668.
122. ŽÁČEK Z. 1981: Vůně koření. 2. vydání, Praha: Merkur, 207 s. ISBN 51-352-81

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Strukturní vzorec OTA (Malíř *et al.*, 2016).

Obrázek 2: *Penicillium chrysogenum* (Kubátová, 2001).

Obrázek 3: *Aspergillus niger* (Kubátová, 2001).

Obrázek 4: Graf oznámení přijatých v roce 2019 dle kategorie nevyhovujícího výrobku z dat RASFF (RASFF, 2019).

Obrázek 5: Vzorky koření s PBS na třepačce.

Obrázek 6: Extrakce pomocí chloroformu, odebrání spodní vrstvy.

Obrázek 7: Vzorky pro lepší rozpuštění umístěny v ultrazvukové čističce.

Obrázek 8: Extrakce pomocí hydrogenuhličitanu, stahuje se horní vrstva.

Obrázek 9: Vzorky umístěny v centrifuze.

Obrázek 10: Odpařování vzorků dusíkem při 45 °C na koncentrátoru.

Obrázek 11: Kolonky s násadcem naplněné pufrem PBS.

Obrázek 12: Eluce OTA metanolem.

Obrázek 13: Vanička s konjugátem, držák se stripy, pipeta.

Obrázek 14: ELISA reader a promývačka stripů Biotek.

Obrázek 15: Rámeček se stripy po inkubaci s chromogen substrátem.

Obrázek 16: Změna barvy (na žlutou) po aplikaci STOP substrátu.

Obrázek 17: Rámeček se stripy připraven ke čtení v ELISA readeru.

Obrázky 5 - 17 jsou autorská tvorba.

Seznam tabulek a grafů:

Tabulka 1: OTA produkující *Aspergily* (Wang et al., 2016).

Tabulka 2: Maximální limity pro OTA v potravinách/krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2012).

Tabulka 3: Maximální limity OTA v potravinách/krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2010; Evropská komise, 2015).

Tabulka 4: Zapsané rozložení vzorků v mikrotitrační destičce.

Tabulka 5: Koncentrace standardů a jejich absorbance.

Tabulka 6: Hodnoty vzorků s nejvyššími hladinami OTA po zředění.

Tabulka 7: Seznam testovaných druhů koření.

Tabulka 8: Seznam druhů koření a využívaných částí rostliny.

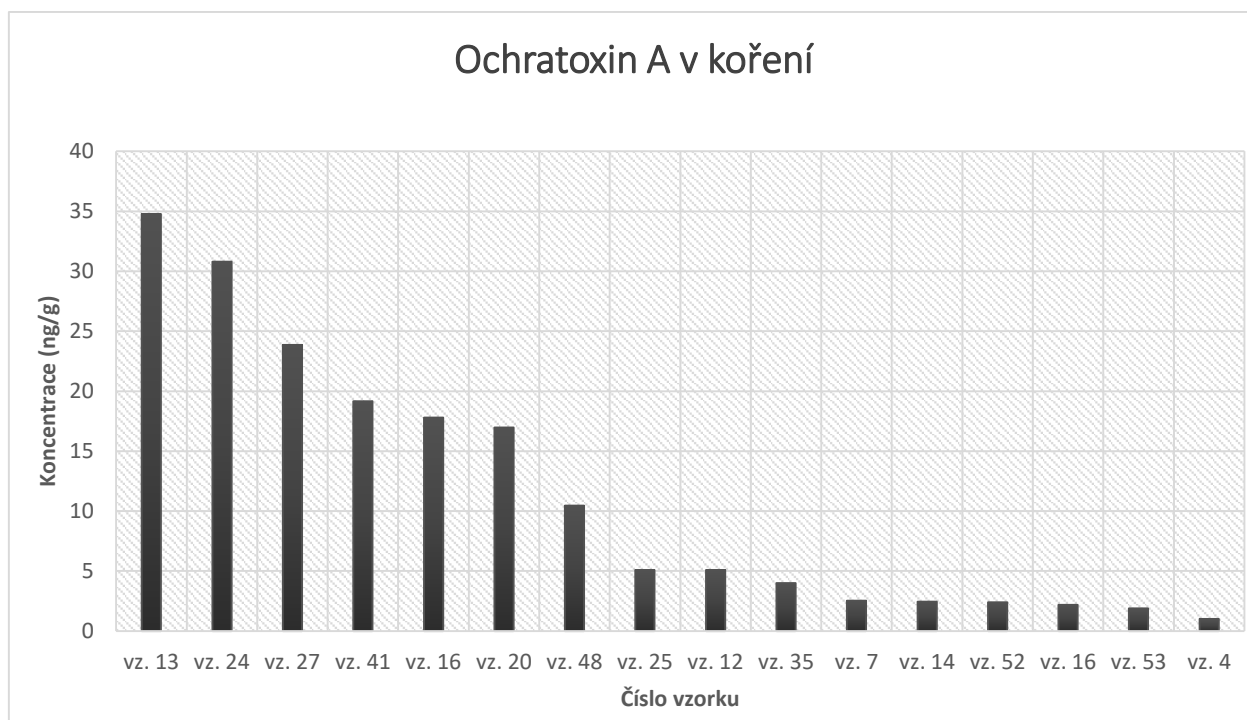
Graf 1: Míra expozice OTA z různých druhů potravin (Malíř *et al.*, 2005).

Graf 2: Podíl OTA v částech rostliny (Qin *et al.* 2020).

Graf 3: Měření standardní látky pomocí ELISA při vlnové délce 450 nm.

Graf 4: Koncentrace OTA po zředění. Z důvodu optimalizace grafu byla odlehlá hodnota lékořice (vz. 46) v grafickém zpracování vynechána.

Přílohy:



Graf 4: Koncentrace OTA po zředění. Z důvodu optimalizace grafu byla odlehlá hodnota vzorku lékořice (vz. 46) v grafickém zpracování vynechána.

Vzorek	Český název	Část rostliny
1	Anýz	Plod
2	Badyán	Plod
3	Bazalka	List
4	Bobkový list	List
5	Citronela	Výhonek
6	Citron	Oplodí
7	Česnek	Plod
8	Estragon	Nať
9	Fenykl	Plod
10	Hořčice bílá	Semeno
11	Hřebíček	Poupata
12	Chilli drcené se semínky	Plod a semena
13	Chilli mleté	Plod
14	Jalovec	Plod
15	Kardamom	Semeno
16	Kayenský pepř	Plod
17	Kmín mletý	Plod
18	Kopr	List
19	Koriandr	Plod
20	Kurkuma	Oddenek
21	Libeček	List
22	Majoránka	List
23	Medvědí česnek	List
24	Muškatový květ	Míšek
25	Muškatový ořech	Semeno
26	Oregano	List
27	Paprika sladká	Plod

28	Pažitka	Nať
29	Pepř bílý	Plod
30	Pepř černý	Plod
31	Pepř růžový	Plod
32	Pepř zelený	Plod
33	Petržel	List
34	Pískavice	Semeno
35	Pomeranč	Oplodí
36	Rozmarýn	List
37	Saturejka	List
38	Skořice	Kůra
39	Šalvěj	List
40	Tymián	List
41	Zázvor	Oddenek
42	Nové koření	Plod
43	Sečuánský pepř	Plod
44	Římský kmín	Plod
45	Černucha (kmín černý)	Plod
46	Lékořice	Kořen
47	Sumah	Plod
48	Vanilka	Plod
49	Galangal	Kořen
50	Asafoetida - čertovo lejno	Pryskyřice
51	Kerblík	Nať
52	Máta peprná	List
53	Celer	Kořen
54	Šafrán	Blizna

Tabulka 8: Seznam koření a využívaných částí rostliny