



# VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

<b>Klasifikace:</b> Draft	<input type="checkbox"/> <i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
Oponovaný draft	<input type="checkbox"/> <i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
Finální dokument	<input type="checkbox"/> <i>Pro oficiální použití</i>
Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Pro veřejné použití</i>

Název dokumentu:

## **Kontaminace vybraných surovin mykotoxiny**

Poznámka:

### **Zpracoval:**

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

ve spolupráci s Ing. Alexandrou Malachovou, Ing. Milenou Zachariášovou, Ing. Martou Kostelanskou a Doc. Ing. Vladimírem Kocourkem CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 -

**Ruzyně**

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

## Souhrn

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované širokou škálou mikroskopických vláknitých hub napadajících jak zemědělské komodity již v prvovýrobě, tedy při pěstování na poli či při nevhodném skladování, tak také již hotové potraviny. Jedná se především o mikromycety rodu *Alternarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Vláknité houby rodu *Fusarium* (většinou *F. culmorum* a *F. graminearum*) jsou nejběžnějšími producenty trichothecenů, fumonisinů a zearalenonu, dříve méně běžnější druhy *F. subglutinans* a/nebo *F. proliferatum* produkují další mykotoxiny jako jsou enniatiny a beauvericin. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius* produkují zejména aflatoxiny a ochratoxin A je nejčastěji produkován vláknitými houbami rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Rod *Penicillium* velmi často napadá také různé potraviny a krmiva, k jejichž výrobě se využívá fermentačních procesů. Kromě značného snížení technologické kvality pěstovaných cereálií, závažným problémem v potravinářství je hlavně přenos mykotoxinů do potravin, případně další uvolňování jejich tzv. „maskovaných“ forem, ke kterému běžně dochází při technologickém zpracování, zejména během sladařsko-pivovarské technologie.

Předkládaná studie shrnuje aktuální problematiku mykotoxinů a poskytuje nejnovější informace týkající se jejich výskytu v potravinách a krmivech, čímž doplňuje studii Fytosanitárního výboru realizovanou v roce 2009. Největší pozornost je věnována především mykotoxinům, které jsou v současné době předmětem zájmu evropského úřadu EFSA dohlížejícím na hygienicko-toxikologickou nezávadnost potravin. Předkládaný projekt je zaměřen především na případové studie realizované na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze v roce 2010. Tyto studie se týkají (i) výskytu mykotoxinů v lahvových pivech dostupných v maloobchodní síti ČR, (ii) dynamiky enniatinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie, (iii) identifikace dalších maskovaných forem mykotoxinů (polyglykosidy deoxynivalenolu), (iv) dynamiky deoxynivalenolu a jeho maskované formy deoxynivalenol-3-glukosidu v průběhu mlynářské a pekárenské technologie, (v) hladin kontaminace mykotoxiny v pekárenských výrobcích a moukách dostupných v maloobchodní síti ČR, (vi) zhodnocení mykotoxinové kontaminace ve výrobcích dostupných na evropském trhu se zvláštním zaměřením na dětskou a kojeneckou výživu a (vii) hygienicko-toxikologické kvality krmiv.

## **Summary**

Mycotoxins are the toxic secondary metabolites produced by wide scope of microscopic filamentous fungi affecting agricultural commodities during the growth on the field as well as during storage. Those are first of all *Alternarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* genera. Filamentous fungi genera *Fusarium* (mostly *F. culmorum* a *F. graminearum*) are most frequent producers of trichothecenes, fumonisins and zearalenone. Additionally, new emerging *F. subglutinans* and/or *F. proliferatum* can produce enniatins and beauvericin. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* produce aflatoxins and ochratoxin A is mostly produced by filamentous fungi *Aspergillus* and *Penicillium* genera. In addition to decreasing of technological quality of grown cereals, a serious problem of food safety is the carry-over of mycotoxins to processed foods, eventually further releasing of their “masked” forms, which is relatively common, especially in case of the malting and brewing industry.

This study summarizes the actual problematic of mycotoxins and provide the detail review concerning the mycotoxins occurrence in food and feed, whereas the most attention in this year is paid for mycotoxins, which are in the interest of European Food Safety Authority (EFSA). This Phytosanitary project is especially focused on a review of several case studies providing an overview of the latest research realized at the Department of Food Chemistry and Analysis of the Institute of Chemical Technology in Prague. Those studies concerning with (i) the occurrence of mycotoxins in bottled beers collected at the markets in the Czech Republic, (ii) dynamic of enniatins during the brewing technology, (iii) identification of new masked polyglycosides of deoxynivalenol, (iv) dynamic of deoxynivalenol and its masked form during bakery technology, (v) the occurrence of mycotoxins in bakery products and flours collected in the Czech Rep., (vi) evaluation of mycotoxins contamination levels in cereal products available on the European market with focusing on baby food (vii) hygiene-toxicological quality of feed.

<b>1. Úvod .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Skupiny mykotoxinů a jejich producenti .....</b>	<b>5</b>
2.1 Trichotheceny .....	5
2.2. Fumonisin a zearalenon zearalenon .....	8
2.3 “Emerging“ mykotoxiny.....	8
2.4. Konjugované formy mykotoxinů.....	9
2.5. Další sledované mykotoxiny dle EFSA.....	11
2.6. Nejběžnější mykotoxiny kontaminující fermentovaná krmiva.....	11
<b>3. Legislativa mykotoxinů.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Mykotoxiny v potravinách a krmivech .....</b>	<b>17</b>
<b>5. Případové studie.....</b>	<b>17</b>
5.1. <i>Případová studie 1</i>	
Výskyt mykotoxinů v pivech zakoupených na českém trhu v roce 2010.....	17
5.2. <i>Případová studie 2</i>	
Osud enniatinů v průběhu sadařské a pivovarské technologie.....	21
5.3. <i>Případová studie 3</i>	
Výskyt maskovaných mykotoxinů ve sladu a pivu.....	26
5.4. <i>Případová studie 4</i>	
Osud mykotoxinů v průběhu mlynářství a pekařství.....	28
5.5. <i>Případová studie 5</i>	
Výskyt mykotoxinů v pekárenských výrobcích zakoupených na českém trhu v roce 2010.....	31
5.6. <i>Případová studie 6</i>	
Výskyt mykotoxinů v potravinách určených pro děti.....	35
5.7. <i>Případová studie 7</i>	
Výskyt mykotoxinů v silážích a krmivech .....	42
<b>6. Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>51</b>

# 1. Úvod

Mykotoxiny patří mezi významné kontaminanty důležitých zemědělských a potravinářských komodit. Tyto sekundární metabolity produkované širokou škálou mikroskopických vláknitých hub mohou u člověka a hospodářských zvířat, která jsou vystavena jejich toxickému účinku, iniciovat vznik závažných alimentárních onemocnění. Nejrozšířenějšími rody těchto vláknitých hub jsou *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Spory těchto hub se běžně nacházejí v půdě, infikují zrna a prostřednictvím mízního systému pak celou rostlinu, čímž dochází ke znehodnocování pěstovaných plodin a ke snížení objemu zemědělské produkce. Tyto mikromycety se vyskytují prakticky ve všech klimatických pásech, kde podmínky dovolí pěstování kulturních plodin.

Podrobný výčet významných zástupců jednotlivých rodů mikromycet včetně jejich metabolitů byl uveden již v loňské studii Fytosanitárního výboru (1). Z toho důvodu je předkládaný projekt zaměřen na aktuální otázky a výzvy v oblasti mykotoxinové kontaminace specifikované evropskou institucí zabývající se dohledem nad bezpečností potravin – European Food Safety Authority (EFSA), (2).

Výzkum týkající se trichotheceenových mykotoxinů v posledních letech intenzivně studuje především vliv fermentačních technologií na mykotoxikologickou kvalitu cereálních výrobků. Zvláštní pozornost je věnována studiu mechanismu vzniku a uvolňování maskovaných forem mykotoxinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie. Značný důraz je kladen také na identifikaci doposud nepopsaných forem maskovaných mykotoxinů. Globální oteplování a klimatické změny přispívají k rozšiřování dříve méně běžných druhů fusarií. Nejběžnější trichotheceen deoxynivalenol (DON) začíná být v posledních letech zcela běžně doprovázen také dalšími ze skupiny trichotheceenů nivalenolem (NIV) a HT-2 a T-2 toxinem (HT-2 a T-2). Vedle trichotheceenových mykotoxinů se začaly objevovat také nové, jinak nazývané „emerging“ mykotoxiny, které byly dříve běžné spíše v chladnějších oblastech. Tyto mykotoxiny jsou také produkované zástupci rodu *Fusarium* a patří mezi ně mimo jiné, enniatiny, beauvericin či fusaproliferin (3). Úřad EFSA dále doporučil monitorovat ergotové alkaloidy, které jsou nejčastějšími kontaminanty žita napadeném paličkovici nachovou (*Claviceps purpurea*).

K zajištění hygienicko-toxikologické nezávadnosti potravin živočišného původu je však nezbytné dbát i na složení a kvalitu podávaných krmiv a tím udržovat chovná zvířata v dobré zdravotní kondici, což bylo v minulosti často opomíjeno. Také u krmiv totiž dochází ke kontaminaci přírodními toxiny a řadou dalších nežádoucích látek. Je důležité klást značný důraz na složení krmiv vzhledem k případnému transferu kontaminantů do masa a mléka, nemluvě o celkové „pohodě“ („welfare“) hospodářských zvířat vyžadované novou evropskou legislativou. Základním předpokladem pro zajištění kvality krmiv je jejich pravidelná kontrola, kterou není možné realizovat bez citlivých multireziduálních analytických metod.

## 2. Skupiny mykotoxinů a jejich producenti

Jak již bylo uvedeno výše, následující podkapitoly se budou zabývat mykotoxiny, které jsou v současné době předmětem zájmu Evropské unie. Dále budou zmíněny také méně známé toxiny kontaminující fermentovaná krmiva typu siláž a senáž.

### 2.1 Trichotheceny

Trichotheceny jsou nejpočetnější skupinou fusariových mykotoxinů. V současnosti bylo identifikováno a popsáno přes 150 trichothecenových mykotoxinů. Jde o tricyklické seskviterpeny charakterizované dvojnou vazbou mezi uhlíky č. 9 a 10 a jedním epoxy kruhem mezi uhlíky č. 12 a 13 a jsou tudíž klasifikovány jako 12,13-epoxytrichotheceny. Dle charakteristických strukturálních rozdílů jsou trichotheceny děleny do 4 skupin na trichotheceny typu A – D (4). Jednotlivé trichotheceny se odlišují různými substituenty na uhlících č. 3, 4, 7, 8 a 15 (**Obr. 1, 2; Tab. I, II**), (5).

- dělení trichothecenů (4,5):
  - typ A: na uhlíku č. 8 mají jinou funkční skupinu než ketonickou (HT-2 a T-2 toxiny, DAS, NEO, VER)
  - typ B: charakteristická ketonická funkční skupina na uhlíku č. 8 (DON, NIV, FUS-X, ADONs)
  - typ C: obsahují další epoxy-skupinu mezi uhlíky 7 a 8
  - typ D: obsahují charakteristický heterocyklus s dvěma esterovými vazbami

Trichotheceny typu A zahrnují T-2 toxin, HT-2 toxin, neosolaninol (NEO), diacetoxyscirpenol (DAS) a verrucarol (VER), mezi trichotheceny typu B patří

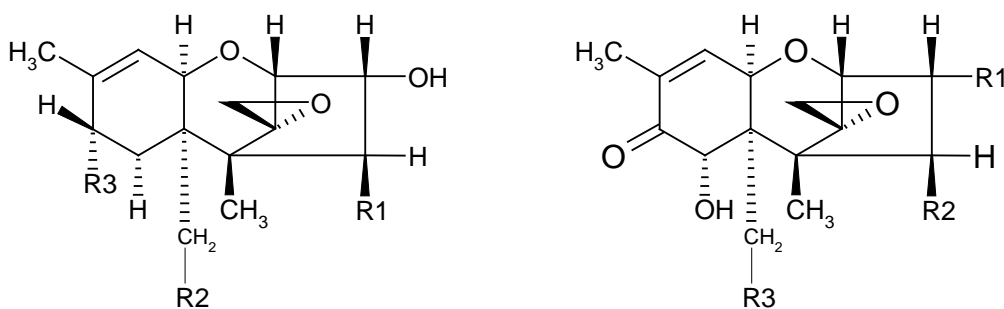
deoxynivalenol (DON), acetylované formy deoxynivalenolu 3-ADON a 15-ADON, nivalenol (NIV) a fusarenon X (FUS-X), (6).

Trichotheceny typu A jsou produkovány zejména kmeny *F. sporotrichoides* a *F. poae*, zatímco kmeny *F. graminearum* a *F. culmorum* produkují převážně trichotheceny typu B (6). Mezi nejčastěji kontaminované plodiny patří pšenice, ječmen a kukuřice (7).

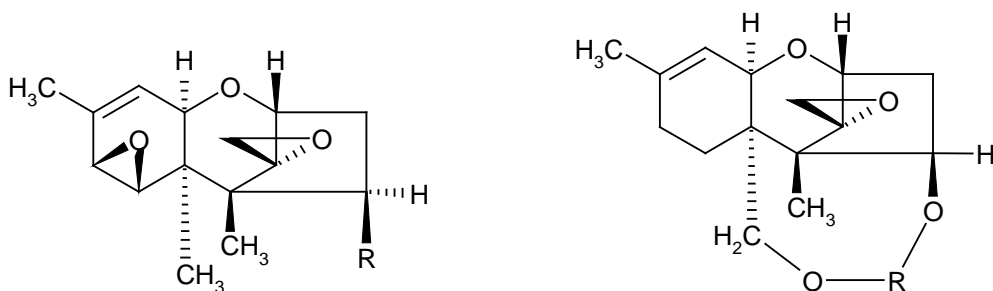
Trichotheceny typu A (T-2 a HT-2 toxiny, NEO, DAS) vykazují vyšší akutní toxicitu než trichotheceny typu B (DON, NIV), jejichž účinky jsou spojeny spíše s toxicitou chronickou. Možnými příznaky intoxikace trichotheceny jsou krvácení sliznice trávicího traktu a obecně zánětlivá odpověď organismu. Akutní intoxikace trichothecenovými mykotoxiny se projevuje zvracením, u hospodářských zvířat bylo pozorováno odmítání krmiva (4,8). Chronická toxicita trichothecenů se projevuje účinky jako jsou redukce hmotnosti, deficit některých živin a negativními účinky na imunologický systém (9).

Trichotheceny způsobují inhibici mitochondriálních funkcí, proteosyntézy a syntézy DNA a RNA *in vitro* a *in vivo*. Bylo též prokázáno, že trichotheceny typu A i B mají imunosupresivní účinky (oslabení imunity), (4,7).

Nejnižší akutní toxicitu ve srovnání s ostatními trichotheceny vykazuje DON, naopak nejvíce toxický trichothecen je T-2 toxin, jež má negativní vliv na funkce mnohobuněčných membrán a způsobuje tzv. apoptózu, řízenou buněčnou smrt (4,7).



**Obr. 1: Obecná struktura trichothecenů typu A a B (zleva), (8,10)**



**Obr. 2: Obecná struktura trichothecenů typu C a D (zleva), (8,10)**

**Tab. I: Trichotheceny typu A (7,8,10)**

<i>Mykotoxin</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
<b>T-2 toxin</b>	OH	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>HT-2 toxin</b>	OAc	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>neosolaninol</b>	OAc	OAc	OH
<b>T-2 triol</b>	OH	OH	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>T-2 tetraol</b>	OH	OH	OH
<b>3-hydroxy-T-2 toxin</b>	OAc	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>3-hydroxy-HT-2 toxin</b>	OH	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>4-deacetylneosolaninol</b>	OH	OAc	OH
<b>4-acetyltetraol</b>	OAc	OH	OH
<b>8-acetyltetraol</b>	OH	OH	OAc
<b>scirpentriol</b>	OH	OH	H
<b>15-monoacetoxyscirpenol</b>	OH	OAc	H
<b>4,15-diacetyloxyscirpenol</b>	OAc	OAc	H

**Tab. II: Trichotheceny typu B (7,8,10)**

<i>Mykotoxin</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
<b>deoxynivalenol</b>	OH	H	OH
<b>3-acetyldeoxynivalenol</b>	OAc	H	OH
<b>15-acetyldeoxynivalenol</b>	OH	H	OAc
<b>nivalenol</b>	OH	OH	OH
<b>fusarenon-X</b>	OH	OAc	OH

Jediným trichothecenem, pro který byly zavedeny Evropskou komisí nejvyšší přípustná množství pro určité potravinové komodity, je DON. Tento toxin byl dříve považován za marker mykotoxinové kontaminace, protože bývá detekován s největší frekvencí. V souvislosti s rozvojem moderních analytických metod bylo zjištěno, že jej stále častěji doprovázejí další, nejenom trichothecenové toxiny. V některých letech je dokonce DON zjišťován spíše minoritně a převládají toxiny jako jsou NIV, nebo trichotheceny skupiny A – HT-2 a T-2. Další doposud nezodpovězenou otázkou jsou jejich potenciální synergické toxické účinky.

Nejen z toho důvodu vydala v roce 2010 EFSA výzvu (11) o poskytnutí dat týkajících se kontaminace těmito toxiny, aby mohlo být projednáno případné zavedení legislativních limitů v potravinách.



## 2.2 Fumonisin a zearalenon

Fumonisin a zearalenon jsou dalšími fusariovými mykotoxiny, jejichž maximální přípustná množství jsou limitována legislativními předpisy (12,13). Podrobná charakteristika těchto toxinů byla uvedena již loňské studii Fytosanitárního výboru (1).

## 2.3 „Emerging“ mykotoxiny

Předchozí skupiny fusariových mykotoxinů jsou studovány již několik desetiletí, a proto je dostupných řada informací jak o jejich výskytu tak o toxickém působení těchto látek. V současné době se však začaly objevovat také jiné skupiny fusariových mykotoxinů tzv. „emerging“ mykotoxiny, o kterých je známo jen velmi málo. Zvláštní pozornost by měla být věnována především enniatinům (ENNs), beauvericinu (BEA), moniliforminu a fusaproliferinu (3). Významnými producenty těchto toxinů jsou *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* a *F. sambucinum* (3). Nejběžněji napadenou plodinou je kukuřice.

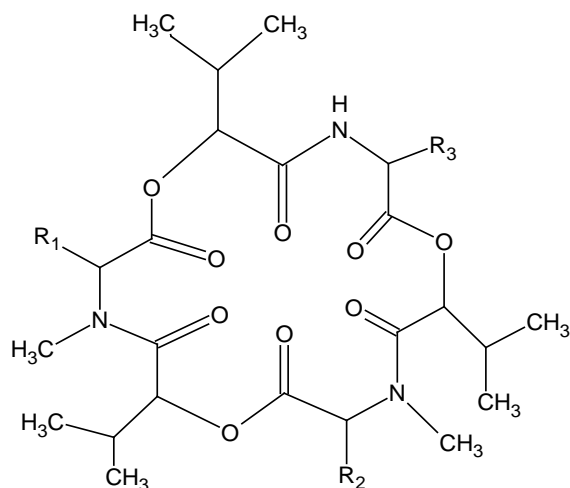
ENNs a BEA byly poprvé identifikovány v cereáliích pěstovaných ve Skandinávii (14), proto byly považovány spíše za kontaminanty chladnějších oblastí. Později však byly detekovány i v cereáliích ve Španělsku či Itálii (3,15).

Enniatiny A, A1, B, B1 a beauvericin mají podobnou chemickou strukturu. Jedná se o cyklické hexadepsipeptidy skládající se ze střídajících se jednotek D- $\alpha$ -hydroxy-isovaleryl- (2-hydroxy-3-methylbutanové kyseliny) a aminokyselin, viz. **Obr. 3** (3).

BEA byl poprvé izolován z agarových kultur *Beauverina bassiana* a enniatiny z *F. oxysporum*.

Toxické účinky těchto kontaminantů jsou přičítány jejich ionoforním vlastnostem, avšak jejich případná akutní ani chronická toxicita doposud nebyla potvrzena a toxické působení těchto látek je stále předmětem výzkumu.

Spolu s BEA byl v poslední době v cereáliích detekován také fusaproliferin. Jeho producenti *F. proliferatum* a *F. subglutinans* jsou nejčastějšími patogeny kukuřice. Pilotní toxilogické výzkumy ukázaly teratogenní a patologické účinky na buněčné kultury *in vitro* (16).



	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>BEA</b>	Fenylmethyl	Fenylmethyl	Fenylmethyl
<b>EN A</b>	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl
<b>EN A1</b>	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl	<i>iso</i> -propyl
<b>EN B</b>	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl
<b>EN B1</b>	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl	<i>sec</i> -butyl

**Obr. 3: Chemická struktura enniatinů a beauvericinu**

## 2.4 Konjugované formy mykotoxinů

Mykotoxiny mohou být stejně jako ostatní xenobiotika částečně metabolizovány za vzniku konjugovaných forem mykotoxinů. Konzumenti jsou tak prostřednictvím potravin kontaminovaných mykotoxiny vystaveni jak nativním tak částečně metabolizovaným formám mykotoxinů. Přestože informací o konjugovaných formách mykotoxinů neustále přibývá, stále jsou nedostupné informace týkající se přesného mechanismu jejich vzniku, výskytu a toxicity (17,18).

Konjugované mykotoxiny se mohou vyskytovat buď ve formě rozpustné (maskované mykotoxiny) či asociované v makromolekule (vázané mykotoxiny). Konjugované formy mykotoxinů vznikají v nejvyšší míře působením enzymových systémů rostlin, mohou též vznikat při zpracování potravin či v tělech savců jako konjugáty s aminokyselinami (cystein, lysin) či složkami krve (albuminy), (18,19).

Tvorbou konjugátů mykotoxinů se rostlina snaží docílit snížení toxicity mykotoxinu, princip spočívá ve zvýšení polaritě (rozpustnosti ve vodě) daného mykotoxinu navázáním polární molekuly (např.  $\beta$ -D-glukosy), čímž je usnadněno vyloučení vzniklého konjugátu do vakuoly (18).

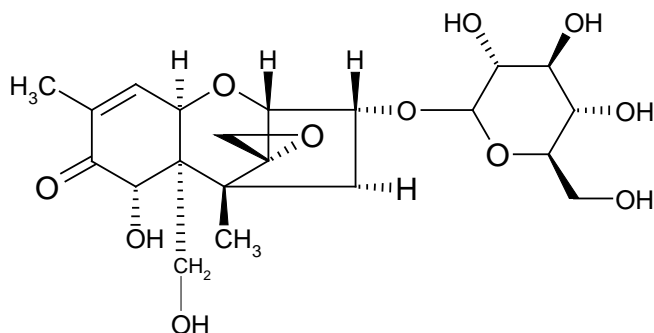
Několik konjugátů mykotoxinů je produkováno přímo fusariovými mikromycetami, nejznámějšími takovými mykotoxiny jsou 3-ADON a 15-ADON, jejichž společným prekurzorem je 3,15-diacetyl-DON. Některé kmeny *F. sporotrichoides* a *F. sambucium* produkují mimo dva výše uvedené mykotoxiny i 4-propionyl-HT-2 toxin, 8-hexanoyl-NEO, 8-butyryl-NEO, 8-isobutyryl-NEO a 8-pentenoyl-NEO. Předmětem spekulací je zařazení 4-laktyl-DON mezi přímé metabolity fusariových mikromycet či mezi konjugáty vznikající v obilovinách (18).

V roce 1988 (Engelhardt) byl objeven další přímý metabolit mikromycet - zearalenon-4-glukosid (Z4G), který se vyskytoval společně se ZON a tvořil přibližně 10 - 20% z celkové kontaminace ZON. Tento objev byl učiněn na uměle připravené kukuřičné kultuře transformací molekuly glukosy na nativní ZON (17). O tři roky později byl objeven další konjugát ZON - zearalenon-4-sulfát (Z4S), který je produkován společně se ZON v poměru 1:2 až 1:12, důležité faktory ovlivňující tento poměr jsou podmínky růstu obiloviny a druh kontaminující mikromycety. Stabilita tohoto konjugátu není značná, Z4S snadno podléhá rozkladu zpět na ZON buď působením sulfatas či hydrolyzou při extrakci (18).

Stanovení DON v meziproduktech zpracování obilovin prokázalo ve většině případů snížení hladiny DON, avšak v několika případech i jeho zvýšení. Tento objev vedl k myšlence existence metabolitu DON (18). První spekulace o existenci konjugovaných forem mykotoxinů se objevily v souvislosti s významnými změnami hladin DON ve studii Millera (1983), kdy bylo v období růstu uměle kontaminované pšenice *F. graminearum* dosaženo maxima hladiny DON, která poté klesala až do sklizně (17,18). Tuto teorii podpořila studie Younga (1984), kdy bylo působením kvasnic ve fermentovaných potravinách zaznamenáno více než dvojnásobné zvýšení hladiny DON ve srovnání s pšeničnou moukou použitou k jejich přípravě (20). V roce 1992 (Sevard) byl v buněčné kultuře kukuřice uměle kontaminované DON objeven hlavní metabolit DON - deoxynivalenol-3-glukosid (D3G; **Obr. 4**), avšak v přirozeně kontaminované pšenici a kukuřici byl tento metabolit DON objeven až v roce 2005 (17,19). Po konzumaci potravy či krmiva kontaminované D3G je osud tohoto konjugátu v organismech savců neznámý a měl by být proto považován za potenciálně nebezpečný pro zdraví člověka a zvířat, lze očekávat aditivní účinek DON a D3G po deglykosylaci v trávicím traktu (17). D3G je také jediným rostlinným maskovaným mykotoxinem, pro který je komerčně dostupný analytický

standard a tudíž je možné jej rutinně stanovovat. I přesto jej většina laboratoří běžně nestanovuje a data týkající se jeho výskytu jsou omezená. Na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze bylo poprvé na světě odhaleno uvolňování maskovaného D3G v průběhu sladařské a pivovarské technologie (21), kdy za nejkritičtější kroky těchto technologických operací jsou považovány klíčení (sladařství) a rmutování (pivovarství). V souvislosti s touto skutečností byly identifikovány i další maskované formy DON – DON-di-glukosid a DON-tri-glukosid v pivu vyrobeném z uměle infikovaného ječmene (22) a posléze také ve vzorcích sladu (doposud nepublikovaná data, Případová studie 3)

Fumonisin jsou další skupinou fusariových mykotoxinů, které podléhají konjugaci. První konjugované fumonisin byly objeveny v tepelně zpracovaných potravinách, kdy docházelo po tepelné úpravě ke konjugaci fumonisinů s cukry, aminokyselinami a bílkovinami (např. N-karboxymethyl-fumonisin B1). Existence rostlinných metabolitů fumonisinů byla potvrzena až v roce 2008 (Dall'Asta), kdy byly objeveny maskované fumonisin v nezpracované kukuřici (18).



**Obr. 4: Struktura maskovaného mykotoxinu D3G**

## 2.5 Další sledované mykotoxiny dle EFSA (2)

Jak již bylo uvedeno v úvodu, kromě fusariových mykotoxinů je doporučeno sledovat také další skupiny mykotoxinů – ergotové alkaloidy a alternariové toxiny. Obě skupiny jsou podrobně popsány v loňské studii Fytosanitárního výboru (1).

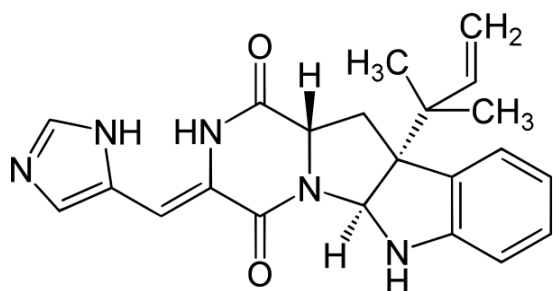
## 2.6 Nejběžnější mykotoxiny kontaminující fermentovaná krmiva

Krmiva mohou být napadena nejen epifytickými rody mikromycet, jako jsou *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus*, které napadají obiloviny a silážové směsi, ale také endofytickými druhy *Neothyphodium* a *Epichloë* převážně kolonizujícími traviny a pícniny

chladnějších regionů všech kontinentů (23). Tyto mikromycety produkují celé spektrum sekundárních metabolitů, jejichž toxický vliv pak závisí na typu a množství těchto toxinů v krmivu, zdraví hospodářských zvířat, fyziologické dispozici daného organismu (věk, pohlaví) a na způsobu chovu („farm management“). V následujících podkapitolách jsou shrnuty poznatky o toxinech, nejčastěji produkovaných rodem *Penicillium*, vyskytujících se ve fermentovaných krmivech.

### Roquefortin C

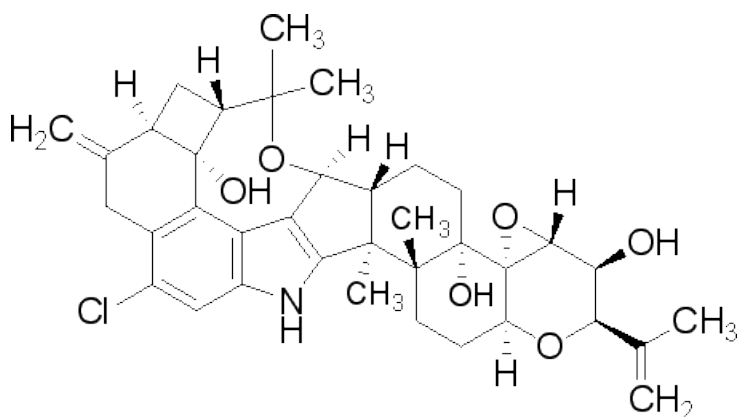
Kontaminace roquefortinem C (**Obr. 5**) je primárně spojována s producentem *Penicillium roqueforti*, který se běžně používá jako ušlechtilá plíseň při výrobě sýrů s modrou plísní. Nejčastěji bývá detekován v krmných cereáliích a silážích, v potravinách se přirozeně téměř nevyskytuje. Jeho akutní toxicita je velmi nízká a podle toxikologických účinků je klasifikován jako neurotoxin (24).



**Obr. 5: Chemická struktura roquefortinu C**

### Penitrem A

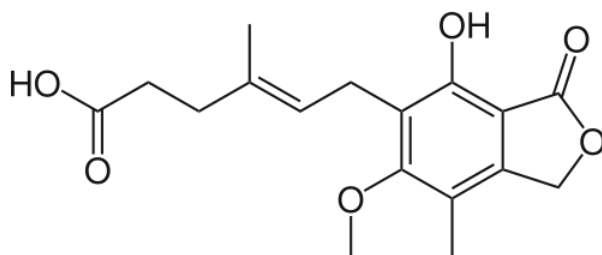
Na rozdíl od roquefortinu C může být penitrem A (**Obr. 6**) detekován v cereáliích. Častěji se však nachází v plesnivých tavených sýrech, oříšcích, plesnivém chlebu, rýži, dále také v kompostu a silážích. Nejčastějšími producenty jsou *P. crustosum*, *P. glandicola*, *P. clavigerum* a *P. janczewski*. Má podobné toxikologické účinky jako roquefortin C, vykazuje tedy neurotoxicitu (24).



**Obr. 6: Chemická struktura penitremu A**

### Mykofenolová kyselina

Dalším zástupcem penicilových mykotoxinů je mykofenolová kyselina. Chemicky se jedná o 6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-ftalanyl)-4-methyl-4-hexenová kyselina. (Obr. 7), (25). Přestože je její akutní toxicita nízká, je vysoce imunosupresivní a tak může napomáhat k další bakteriální a fungální infekci. Hlavními producenty je *P. roqueforti* a *P. carneum*. Oba dva druhy jsou schopny růst za podmínek mléčného kvašení a na jiných kyselých substrátech, z toho důvodu je tento toxin hlavním kontaminantem siláží a senáží (26).

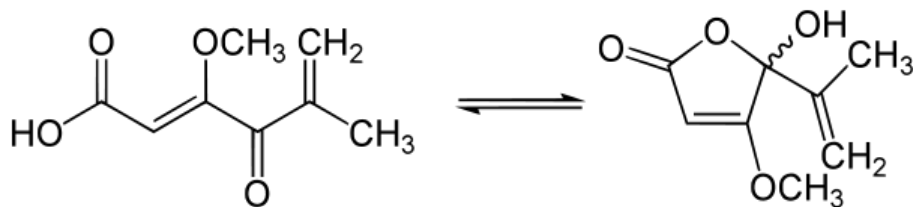


**Obr. 7: Chemická struktura mykofenolové kyseliny**

### Penicillová kyselina

Penicillová kyselina (Obr. 8) je malá toxická polyketidová sloučenina (5-hydroxy-5-isopropenyl-4-methoxy-furan-2-on), která může být produkována širokým spektrem mikromycet rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. Za nejvýznamnější producenty jsou považováni

*P. viridicata* a *P. verrucosum*. V zemědělských surovinách a potravinách často doprovází ochratoxin A a má synergický efekt na jeho toxicitu (24).



Obr. 8: Chemická struktura penicillové kyseliny

### 3. Legislativa mykotoxinů

Napadení potravinářských komodit v průběhu vegetačního období (polní podmínky), či skladování, vede nejenom k možné kontaminaci mykotoxiny představující zdravotní riziko pro konzumenty (ať již při konzumaci přímo, či při transferu do živočišných produktů), ale i ke značným ekonomickým ztrátám v důsledku snížení výnosů a kvality produkce či zhoršení zdravotního stavu a potažmo užitkovosti hospodářských zvířat (27).

Jak již bylo uvedeno výše, onemocnění, která vznikají v důsledku příjmu kontaminovaných potravin nebo krmiv toxickými mykotoxiny, se označují pojmem „mykotoxikózy“. Mykotoxiny jsou známy již po dlouhou dobu a až do šedesátých let minulého století nebyla jejich existence v potravinách a v krmivech nikterak regulována a jejich potenciálním negativním účinkům na zdravotní stav nebyla věnována zvýšená pozornost. Teprve od roku 1960, kdy byly objeveny aflatoxiny, bylo uznáno, že mykotoxiny vzhledem ke svým negativním účinkům představují významné zdravotní riziko pro lidi i hospodářská zvířata. Z těchto důvodů začaly být postupně navrhovány předpisy týkající se sledování výskytu mykotoxinů v potravinách a krmivech. První regulační opatření se týkala pouze aflatoxinů, které jsou považovány za nejtoxičtější mykotoxiny vůbec. Později se počet zemí, jež měly ve svých národních předpisech a nařízeních zakotvené regulační opatření pro mykotoxiny, zvyšoval. V roce 1981 jich bylo 33, v roce 1995 tento počet vystoupal na 77 a v roce 2003 čítal již 100 států (28).

Současná nařízení jsou založena na vědecky podložených stanoviscích a závěrech společného výboru expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva (JECFA – „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“) a Evropským úřadem pro bezpečnost

potravin (EFSA – „European Food Safety Authority“). Nejvyšší přípustná množství (NPM) těchto sekundárních metabolitů a dalších kontaminantů potravin, jsou stanovena pro danou potravinářskou komoditu v uvedených nařízeních (12,13, 29, 30).

- **Nařízení Komise č. 1881/2006 ES.** Limitovány jsou konkrétně: ochratoxin A, DON (deoxynivalenol), zearalenon, fumonisiny B1 a B2. Pro T-2 a HT-2 toxin zatím limity nejsou, ale připravují se.
- **Nařízení Komise č. 1126/2007 ES,** které mění předchozí nařízení a stanovuje maximální limity fusariotoxinů tj. fumonisinů, DON a zearalenonu v kukuřici a kukuřičných výrobcích.
- **Nařízení Komise č. 105/2010 ES,** které modifikuje nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým jsou stanoveny další maximální limity pro ochratoxin A v potravinách (konkrétně koření a lékořice). Toto legislativní omezení pro zmíněné druhy potravin přichází v platnost od 1.7.2010, resp. od 30.6. 2012.
- **Nařízení Komise č. 165/2010 ES,** kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006: stanovení maximálních limitů pro aflatoxiny: B1, suma B1, B2,G1,G2 a aflatoxin M1. Tento předpis vyšel v platnost 26.2.2010.

Aktuální předpisy zahrnují hygienické limity pro 11 druhů mykotoxinů nebo jejich sumy, které jsou vymezeny pro jednotlivé potravinové komodity. NPM pro T-2 a HT-2 nebyla zatím stanovena. Platné limity ustanoveny výše uvedenými nařízeními jsou podrobně zpracovány ve studii Fytosanitárního výboru z loňského roku (1).

V předkládaném studii Fytosanitárního výboru se zabývá jedna z případových studií (konkrétně Případová studie 6) výskytem mykotoxinů v dětské a kojenecké výživě. Z toho důvodu je tato kapitola týkající se legislativy zaměřena převážně na hygienické limity pro dětskou a kojeneckou výživu (viz **Tab. III-VIII**).



**Tab. III: Hygienické limity pro aflatoxiny (ES 165/2010)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>		
	<b>B1</b>	<b>Suma B1, B2, G1, G2</b>	<b>M1</b>
<b>Počáteční a pokračovací kojenecká výživa, včetně počátečního a pokračovacího mléka pro kojence</b>	-	-	<b>0,025</b>
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	<b>0,1</b>	-	-
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	<b>0,1</b>	-	<b>0,025</b>

**Tab. IV: Hygienické limity pro ochratoxin A (ES 1881/2006 a ES 105/2010)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	<b>0,50</b>
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	<b>0,50</b>

**Tab. V: Hygienické limity pro patulin (ES 1881/2006)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>
Jablečná šťáva a pevné výrobky z jablek, včetně jablečného kompotu a jablečného pyré, pro kojence a malé děti, takto označené a prodávané	<b>10</b>
Jiné než obilné příkrmy pro kojence a malé děti	<b>10</b>

**Tab. VI: Hygienické limity pro deoxynivalenol (ES 1126/2007)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	<b>200</b>

**Tab. VII: Hygienické limity pro zearalenon (ES 1126/2007)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>
Obilné příkrmy (kromě kukuřičných příkrmů) a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	<b>20</b>
Kukuřičné příkrmy pro kojence a malé děti	<b>20</b>

**Tab. VIII: Hygienické limity pro fumonisiny (ES 1126/2007)**

<i>Potravinové komodity</i>	<i>NPM (µg/kg)</i>
	<b>Suma B1 a B2</b>
Kukuřičné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	<b>200</b>

## 4. Mykotoxiny v potravinách a krmivech

Jak již bylo řečeno v úvodu a minulém ročníku Fytoprotekčním výboru zabývajícím se mykotoxiny (1), v posledních letech se zřetelně zvyšuje zájem spotřebitelů o kvalitní zemědělské produkty. I přesto, že projevovaná snaha o pěstování kvalitních zemědělských surovin v souladu se zásadami dobré zemědělské praxe je značná, přítomnost mykotoxinů v zemědělských komoditách úplně eliminovat nelze. Během technologického zpracování cereálií pak koncentrace mykotoxinů vzhledem k původním cereáliím klesá (díky „zředění“ původní suroviny během výroby potravin), avšak k významnější degradaci vzhledem k jejich tepelné a chemické stabilitě nedochází. Přítomnost určitých hladin mykotoxinů v cereálních produktech dostupných v obchodní síti je tedy běžná.

Následující kapitoly shrnují jednotlivé případové studie týkající se mykotoxinů, které byly realizovány v průběhu roku 2010 na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

## 5. Případové studie

### 5.1 Případová studie 1

#### *Výskyt mykotoxinů v pivech zakoupených na českém trhu v roce 2010*

Výroba piva, stejně jako produkce surovin pro jeho výrobu, má v České republice mnohaletou tradici. Bohužel, ječmen, stejně jako mnoho dalších cereálií může být napaden mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Claviceps purpure*, které produkují široké spektrum toxických sekundárních metabolitů, mykotoxinů. Výše kontaminace piv mykotoxiny závisí především na výběru vhodné vstupní suroviny, takže se hladiny mykotoxinů v této komoditě mohou rok od roku výrazně lišit. Z toho důvodu byl v roce 2010 stejně jako v minulých letech (31) opět proveden monitoring obsahu mykotoxinů v pivech z domácí produkce. Celkem bylo analyzováno 52 vzorků světlých, polotmavých a tmavých piv zakoupených v maloobchodní síti ČR. Konkrétně se jednalo o 13 vzorků nealkoholických piv, 20 piv s obsahem alkoholu 4-4,9%, 14 piv s obsahem alkoholu 5-5,9% a 5 piv s více než 6% alkoholu.

Z výsledků analýz vyplývá, že majoritními mykotoxiny vyskytujícími se v této komoditě jsou DON a jeho glukosylovaná forma D3G. Kromě těchto dvou nejčastějších mykotoxinů byly u některých vzorků detekovány také nivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, ochratoxin A, alternariol, alternariol-methylether, zearalenon, ergosin a ergocryptin (**Tab. IX**), jejich hladiny se však pohybovaly velmi nízko, většinou těsně nad hranicí limitu stanovitelnosti (LOD).

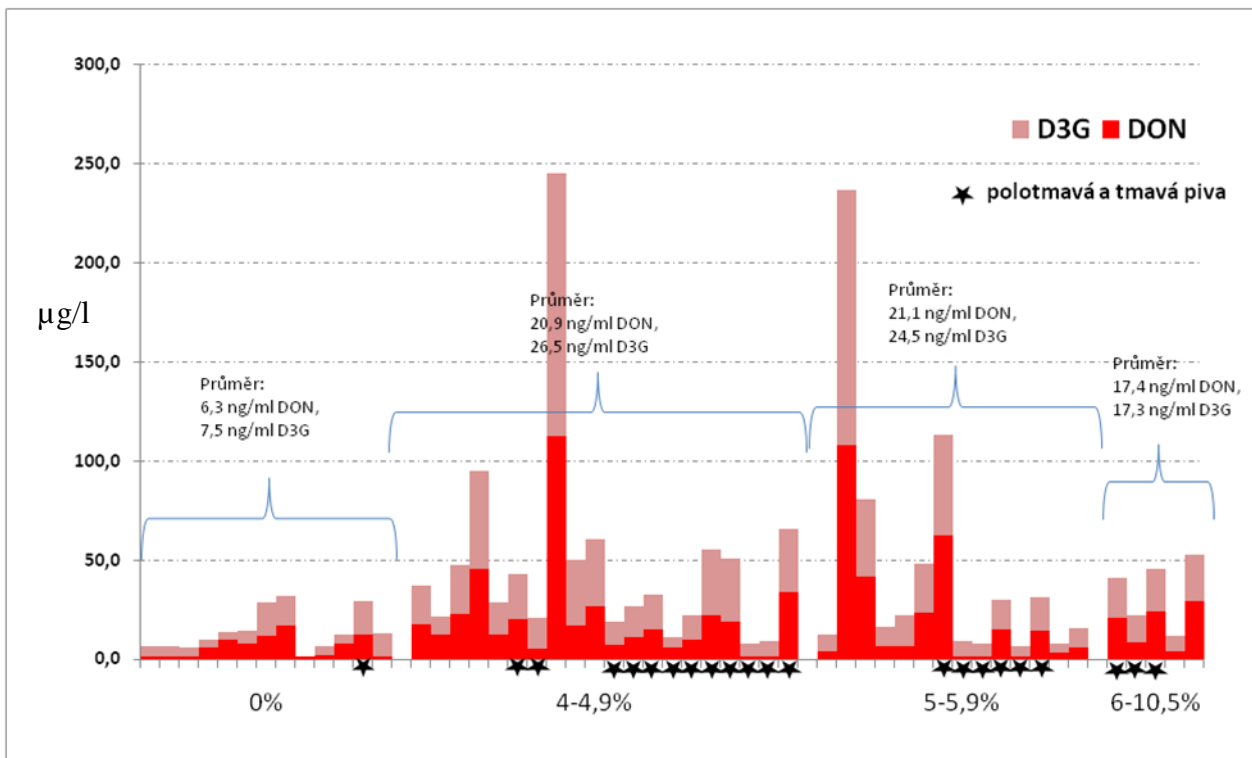
Co se týká incidence DON a jeho metabolitu D3G, jejich konkrétní hladiny v jednotlivých pivech jsou patrné z **Obr. 9** (koncentrace D3G je zde vyjádřena jako obsah samotného DON v glukosylované molekule). Nejnižší koncentrace zmíněných mykotoxinů obsahovala piva nealkoholická (6,3 µg/l DON a 7,5 µg/l D3G). Příčina zřejmě souvisí s technologií jejich výroby. Při produkci nealkoholických piv se totiž, buď uplatňují speciální kmeny kvasinek vykazující sníženou produkci alkoholu, nebo se tato piva vyrábí ředěním mladiny, čímž dochází k naředění extraktu, potažmo mykotoxinů. Nejvyšší průměrné hodnoty mykotoxinů vykazovala piva s 4 až 4,9% alkoholu (20,9 µg/l DON a 26,5 µg/l D3G) a piva s 5 až 5,9% alkoholu (21,1 µg/l DON a 24,5 µg/l D3G). Piva s více než 6% alkoholu pak obsahovala průměrně 17,4 µg/l DON a 17,3 µg/l D3G.

Vzhledem k hodnotě tolerovatelného denního příjmu (TDI) stanoveného pro DON na 1 µg/kg tělesné váhy (12,13), je oprávněné považovat přítomnost těchto mykotoxinů v pivu za závažnou. Vezmeme-li v úvahu průměrnou hodnotu DON a D3G v analyzovaných alkoholických pivech, tj. 19,8 DON a 22,7 D3G µg/l, člověk vážící 75 kg by dosáhl hodnoty tolerovatelného denního příjmu po vypití přibližně tří půllitrů. Výzkum objasňující faktory, které ovlivňují tvorbu mykotoxinů či jejich uvolňování z maskovaných forem během sladování a pivovarství, zatím nejsou úplně objasněny, avšak vědecký výzkum za podpory sladařsko-pivovarského průmyslu směřuje k odhalení příčin a následně k eliminaci tohoto fenoménu za minimální zásahu do tradičních českých sladařsko-pivovarských technologií.

**Tab. IX: Přehled mykotoxinové kontaminace vyšetřovaných vzorků pív, limity kvantifikace (LOQ) jednotlivých mykotoxinů**

Analyzované mykotoxiny	Počet pozitivních vzorků z celkem 52 vzorků	Průměr/median (µg/l) <sup>a</sup>	LOQ metody (µg/l)
Nivalenol	2	4,7/3	6
Deoxynivalenol	42	17,3/11,4	3
Deoxynivalenol-3-glucoside	51	32,7/24,2	2
3-Acetyldeoxynivalenol	5	4,3/4	8
Deepoxydeoxynivalenol	0	nevyhodnocováno	15
Fusarenon-X	0	nevyhodnocováno	4
Neosolaniol	0	nevyhodnocováno	2
Verrucarol	0	nevyhodnocováno	4
HT-2 toxin	0	nevyhodnocováno	4
T-2 toxin	0	nevyhodnocováno	2
Diacetoxyscirpenol	0	nevyhodnocováno	1
Zearalenon	3	0,7/0,5	1
α-Zearalenol	0	nevyhodnocováno	1
β-Zearalenol	0	nevyhodnocováno	2
Aflatoxin G2	0	nevyhodnocováno	2
Aflatoxin G1	0	nevyhodnocováno	4
Aflatoxin B2	0	nevyhodnocováno	1
Aflatoxin B1	0	nevyhodnocováno	2
Alternariol	8	1,1/0,5	2
Altenuene	0	nevyhodnocováno	1
Alternariol-methylether	5	0,7/0,5	1
Ochratoxin A	1	2,6/2,5	5
Ochratoxin α	0	nevyhodnocováno	31
Sterigmatocystin	0	nevyhodnocováno	0.5
Ergosin	7	1,7/1,5	3
Ergocornin	0	nevyhodnocováno	2
Ergosinin	0	nevyhodnocováno	2
Ergocryptin	1	1,0/1,0	2
Ergocristin	0	nevyhodnocováno	5
Ergocorninin	0	nevyhodnocováno	2
Ergocryptinin	0	nevyhodnocováno	2
Ergocristinin	0	nevyhodnocováno	5

<sup>a</sup> Vyjádřeno pouze pro analyty, jejichž nález byl nad LOQ alespoň u jednoho vzorku; pro vzorky s hladinou mykotoxinů pod LOQ bylo kalkulováno s hodnotou 1/2 LOQ.



Obr. 9: Hladiny DON a D3G v jednotlivých vzorcích piv (koncentrace D3G je zde vyjádřena jako obsah samotného DON v glukosylované molekule).

## 5.2 Případová studie 2

### *Osud enniatinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie*

Jak již bylo uvedeno v **kap. 2.3**, enniatiny jsou „novou“ skupinou fusariových mykotoxinů. Evropská instituce EFSA vydala dokument (2), ve kterém poukazuje na nutnost sledování enniatinů v zemědělských surovinách a jejich osudu v rámci celého potravního řetězce a technologického zpracování za účelem případného zavedení maximálních přípustných množství v potravinách. Z toho důvodu byla provedena v roce 2010 pilotní studie zaměřená na sledování enniatinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie.

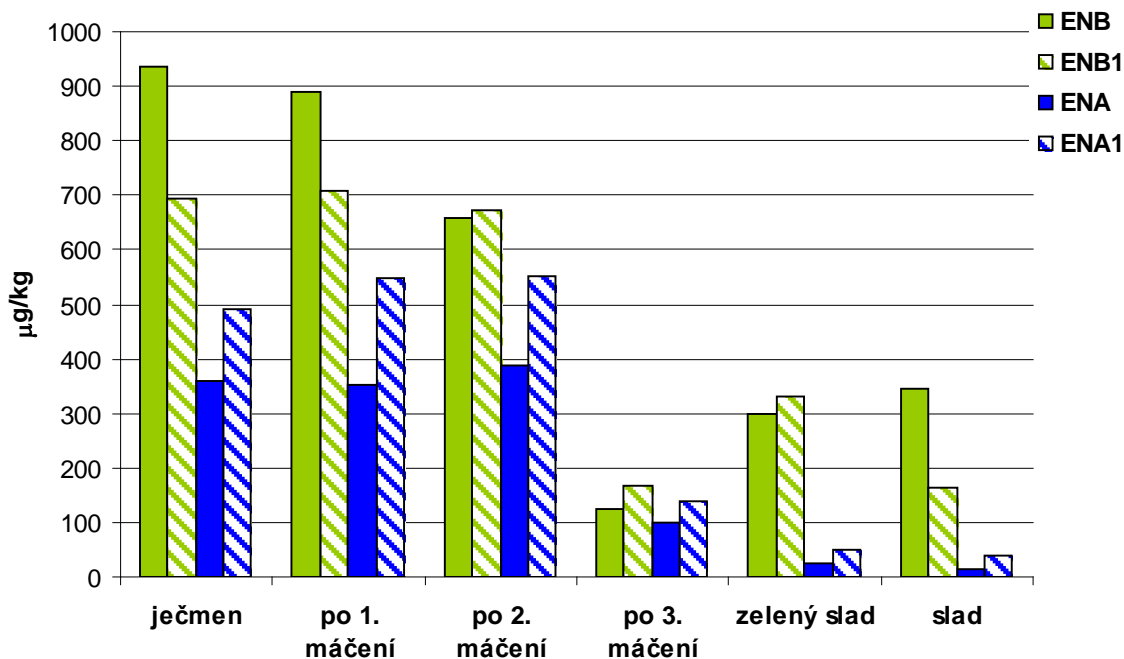
Ze sklizně roku 2009 byly vybrány dva vzorky ječmene jarního – sladařská odrůda Radegast ve dvou variantách: i) fungicidně ošetřeno a ii) bez chemického ošetření v průběhu vegetace. Obě varianty byly zesladovány standardní sladařskou technologií (32) a sladový šrot byl dále použit pro vaření piva. V průběhu sladařské a pivovarské technologie byly odebírány vzorky meziproduktů: i) sladařství – vstupní ječmen, ječmen po 1., 2. a 3. dni máčení, zelený slad, slad a sladový květ; ii) pivovarství – předek, sladina, mladina, mladé pivo, pivo a mláto.

#### **Sladařská technologie**

Všechny vzorky meziproduktů byly vyšetřeny na obsah enniatinů B, B1, A a A1 (EN B, B1, A a A1) byl sledován jejich osud v rámci celé technologie. Koncentrační hladiny jednotlivých enniatinů v meziproduktech sladování jsou shrnuty na **Obr. 10 a 11**.

Výchozí kontaminace enniatiny u obou variant ječmene byly téměř shodné s výjimkou EN B, jehož hladina byla vyšší (936  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) v ječmeni bez chemického ošetření vzhledem k ječmeni, který byl fungicidně ošetřen (715  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Avšak následující profil koncentračních změn v průběhu třídenního máčení se u obou variant lišil. U varianty ječmene bez chemického ošetření nedošlo v průběhu 1. a 2. dne máčení téměř k žádným změnám koncentračních hladin s výjimkou EN B, kdy po 2. dni máčení došlo k poklesu z 936 na 658  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Po třetím dni máčení došlo k poklesu všech enniatinů pod hladinu 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a po dalších 4 dnech, tedy v meziproduktu zeleném sladu bylo pozorováno navýšení EN B na 298  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a EN B1 na 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . EN A a EN A1 byly v zeleném sladu

detekovány na velmi nízkých hladinách (26  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Poté byl hvozdním, dotahováním a odklíčením získán světlý slad, ve kterém se hladiny enniatinů ve srovnání se zeleným sladem nezměnily. Výjimkou byl EN B1, který poklesl na polovinu své hodnoty (163  $\mu\text{g}/\text{kg}$  – fungicidně ošetřená varianta, 385  $\mu\text{g}/\text{kg}$  – varianta bez chemického ošetření).



**Obr. 10: Hladiny enniatinů v průběhu sladování ječmene bez chemického ošetření**

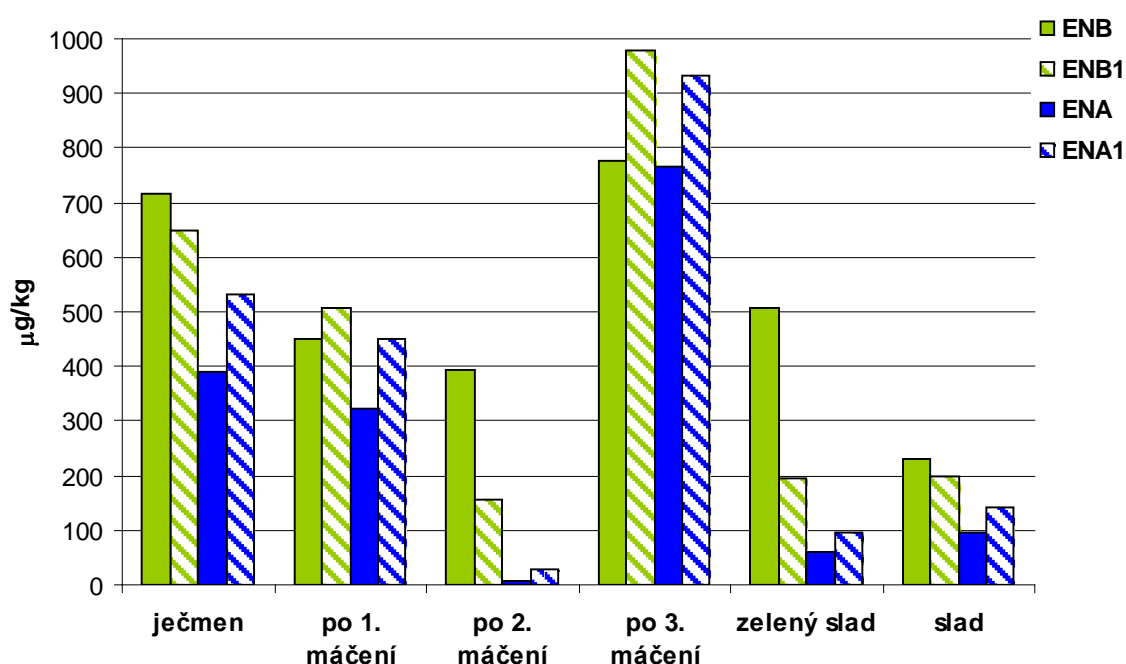
Změny hladin enniatinů při sladování fungicidně ošetřené varianty měly jiný profil ve srovnání s variantou bez chemického ošetření. K nejvýraznějšímu poklesu kontaminace došlo po 2. dni máčení, viz **Obr 11**. Po 3. dni máčení naopak koncentrace všech enniatinů narostly na svoji nejvyšší koncentrační hladinu v průběhu celé sladařské technologie (EN B 776  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ENB1 980  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , EN A 765  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a EN A1 931  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). V zeleném sladu došlo k poklesu všech sledovaných mykotoxinů a v konečném sladu došlo k dalšímu snížení už jenom EN B (na hladinu 230  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Jak již bylo zmíněno výše, na obsah enniatinů byl vyšetřen také odpadní produkt sladování (sladový květ), který se díky vhodnému nutričnímu složení využívá jako krmivo

pro hospodářská zvířata. Hladiny enniatinů ve sladovém květu pro obě varianty shrnuje **Tab. X.**

**Tab. X: Hladiny enniatinů ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ve sladovém květu**

varianta	mykotoxiny ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	EN A	EN A1	EN B	EN B1
sladový květ (bez chemického ošetření)	416	451	397	497
sladový květ (fungicidně ošetřeno)	367	595	783	793



**Obr. 11: Hladiny enniatinů v průběhu sladování fungicidně ošetřeného ječmene**

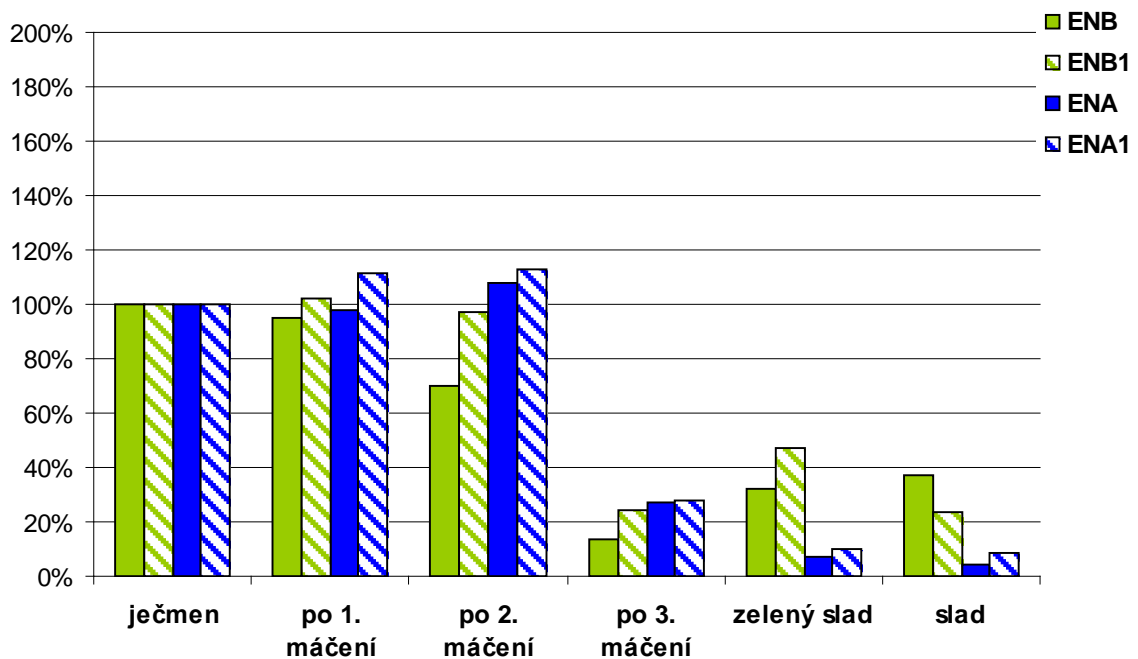
**Obr. 12 a 13** ukazují procentuální vyjádření osudu sledovaných mykotoxinů v průběhu sladování. Porovnáním obou variant ječmene je možné konstatovat, že v průběhu sladařské technologie dochází k poklesu všech enniatinů na cca 40% své původní hodnoty ve srovnání s výchozí surovinou.

### Pivovarská technologie

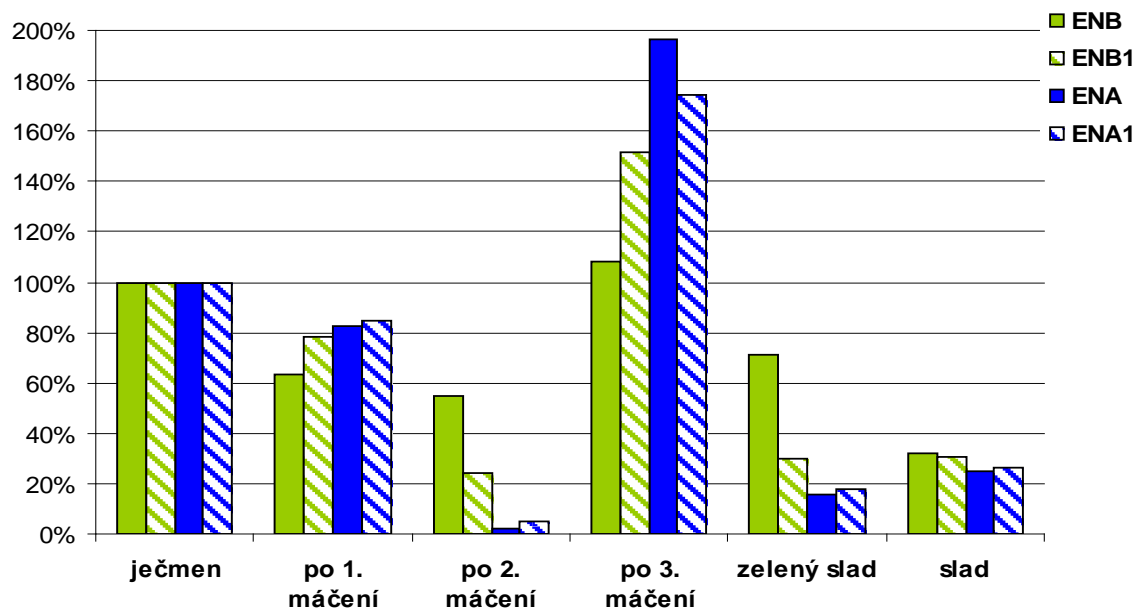
Oba vzorky sladu: i) slad vyroben z ječmene bez chemického ošetření a ii) slad, u něhož byla výchozím ječmenem varianta fungicidně ošetřená, byly použity pro výrobu piva, které bylo uvařeno infuzní technologií (32). **Obr. 14 a 15** dokumentují osud enniatinů



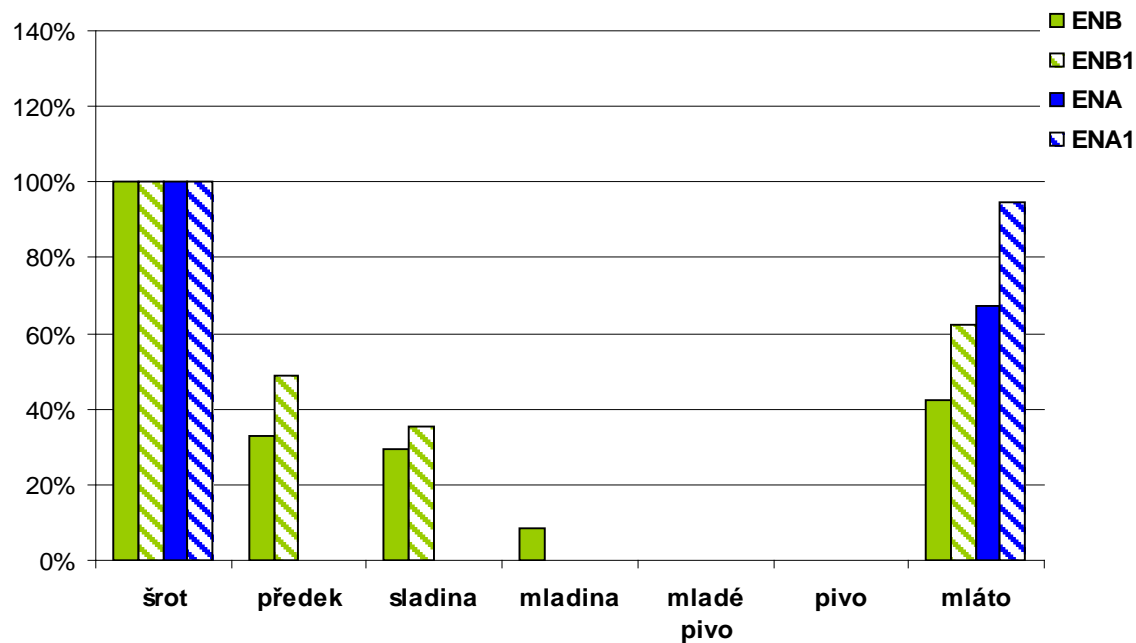
v průběhu pivovarské technologie. U obou variant tohoto pilotního pokusu je patrné, že enniantiny do piva přecházejí pouze minimálně (EN B a EN B1 byly detekovány pouze v předku a sladíně) a nejvyšší koncentrace zůstávají v odpadním produktu – mlátě. Koncentrační hladiny enniatinů v pivu není nutné uvádět, protože v průběhu technologie dochází k různému ředění jednotlivých meziproduktů a tyto bilance jsou již zahrnuty v poměrovém vyjádření.



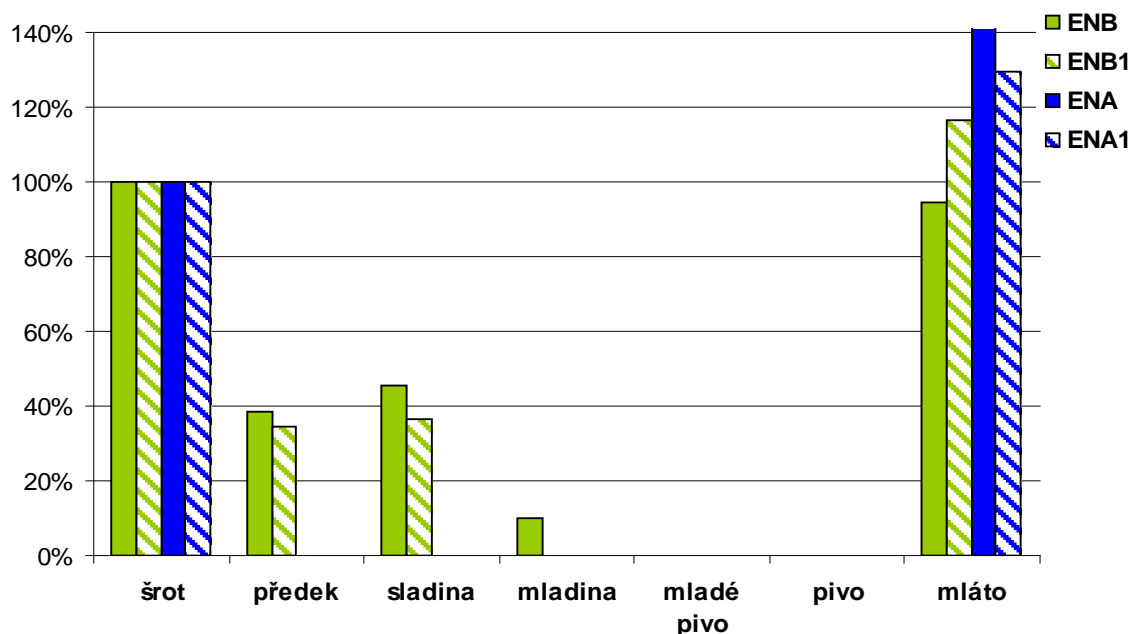
**Obr. 12: Bilanční změny enniatinů v průběhu sladování (varianta bez chemického ošetření)**



Obr. 13: Bilanční změny enniatinů v průběhu sladování (varianta fungicidně ošetřená)



Obr. 14: Bilanční změny enniatinů v průběhu sladování (varianta bez chemického ošetření)



**Obr. 15: Bilanční změny enniatinů v průběhu sladování (fungicidně ošetřená varianta)**

### 5.3 Případová studie 3

#### *Výskyt maskovaných mykotoxinů ve sladu a pivu*

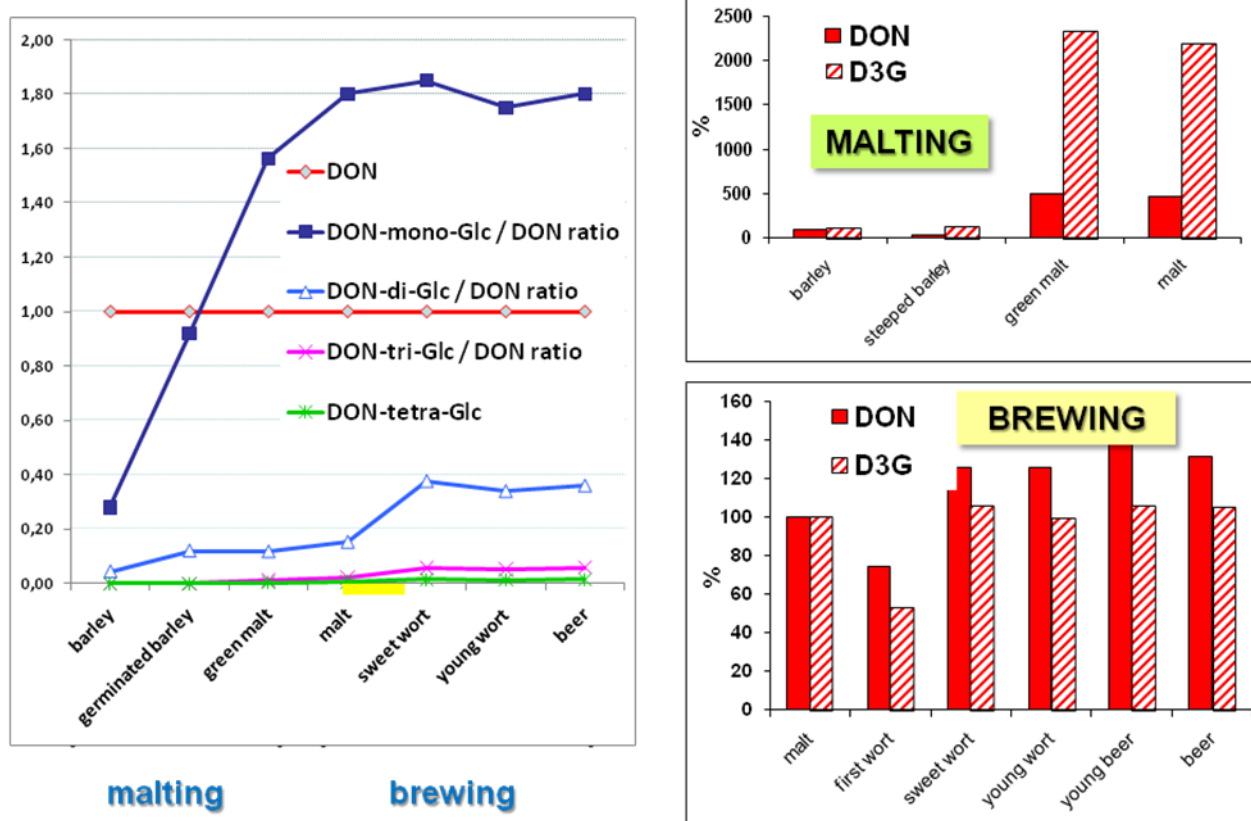
Jak již bylo uvedeno v **kap 2.4**, na Ústavu chemie a analýzy potravin byly poprvé identifikovány, kromě maskovaného mykotoxinu deoxynivalenol-3-glukosidu (D3G), který v současnosti lze již bez problémů kvantifikovat díky dostupnosti analytického standardu, i další formy maskovaných mykotoxinů, a to konjugáty deoxynivalenolu se dvěma či třemi jednotkami glukózy – deoxynivalenol-di-glukosidy (DON-3-diGlc) a deoxynivalenol-tri-glukosidy (DON-3-triGlc). Pro tyto látky doposud není k dispozici analytický standard, proto se pro jejich analýzu využívá vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie, která umožní jejich identifikaci na základě měření přesné hmoty a výpočtu elementárního složení.

Pro identifikaci „více glykosilovaných“ konjugovaných analogů DON bylo potřeba odstranit interferující koextrakty a maximálně zakoncentrovat hledané analyty. Z toho důvodu byl vzorek piva nebo vodného sladového extraktu prekoncentrován pomocí imunoafinitních kolonek, které jsou vhodné pro tyto účely. Poté byly analyty separovány

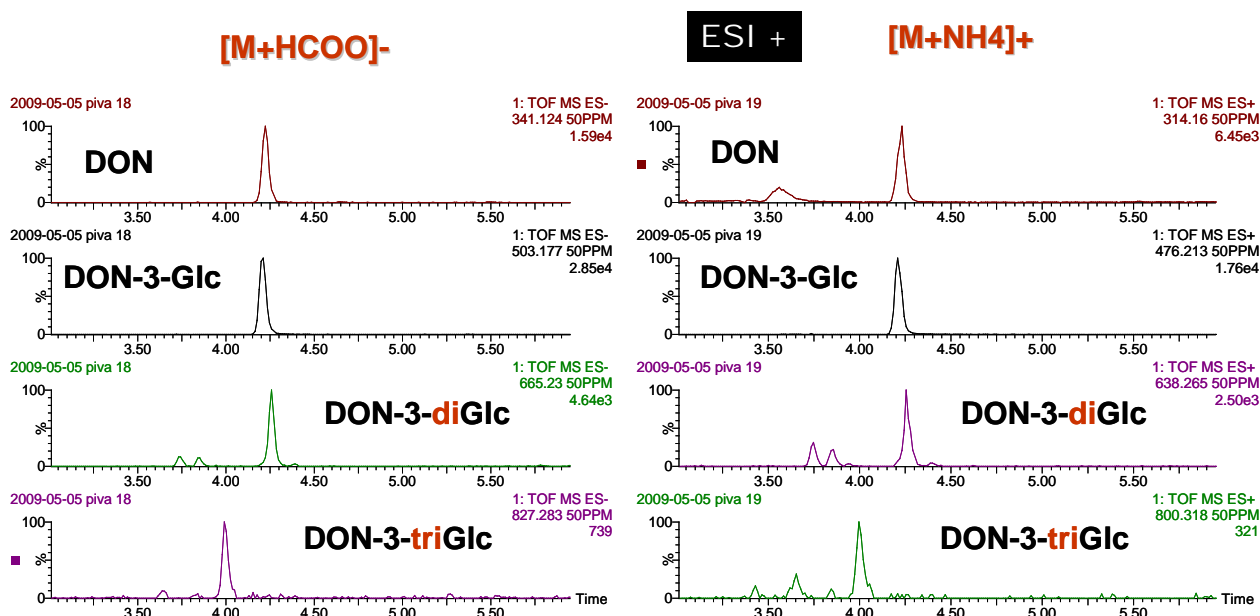
v systému vysokotlaké kapalinové chromatografie, detekce byla provedena vysokorozlišovacím hmotnostně-spektrometrickým systémem typu orbitální iontová past.

Deoxynivalenol-polyglukosidy vznikají v průběhu sladařské a pivovarské technologie jako důsledek enzymatické činnosti, a to pravděpodobně uvolňováním z vázaných forem na polysacharidy škrobu. Kritickými technologickými operacemi jsou v tomto případě klíčení ječmene v průběhu sladování a rmutování sladu při výrobě piva. Trendy popisující dynamiku maskovaných mykotoxinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie jsou pro modelový cíleně *Fusarium*-infikovaný ječmen zobrazeny na **Obr. 16**.

V letošním roce byl potvrzen výskyt těchto maskovaných forem potvrzen dokonce v šesti přirozeně kontaminovaných pivech získaných z české obchodní sítě a ve dvou vzorcích sladu získaných z tuzemských sladoven. Intenzity signálů DON-glukosidu, DON-di-glukosidu a DON-tri-glukosidu se vyskytovaly v poměru přibližně 1 : 0,1 : 0,01. Na **Obr. 17** je uveden příklad chromatogramu maskovaných mykotoxinů.



**Obr. 16:** Dynamika DONu a jeho maskovaných forem v průběhu sladařsko-pivovarské technologie (zpracování modelového ječmene cíleně infikovaného *Fusarii*), (40)



**Obr. 17: Deoxynivalenol a jeho maskované formy ve vzorku piva z české obchodní sítě (9,3 ng/ml DON; 22,4 ng/ml DON-3-Glc), detekce a konfirmace analytů při negativní a pozitivní ionizaci elektrosprejem (U-HPLC-orbitrapMS), (40)**

#### 5.4 Případová studie 4

##### *Osud mykotoxinů v průběhu mlynářství a pekařství*

Cereálie a cereální výrobky zaujímají jednu z nejdůležitějších položek spotřebního koše. Jejich kontaminace mykotoxiny je již několik desetiletí považována za závažný celosvětový problém v oblasti hygienicko-toxikologické nezávadnosti potravin. V současné době již byla publikována řada prací (33-36) týkající se osudu mykotoxinů v průběhu mlynářství a pekárenství, ale doposud žádná nediskutuje vliv těchto operací na hladiny maskovaného deoxynivalenol-3-glukosidu.

Cílem této studie bylo posoudit vliv mlynářství a pekárenství na hladiny DON a D3G.

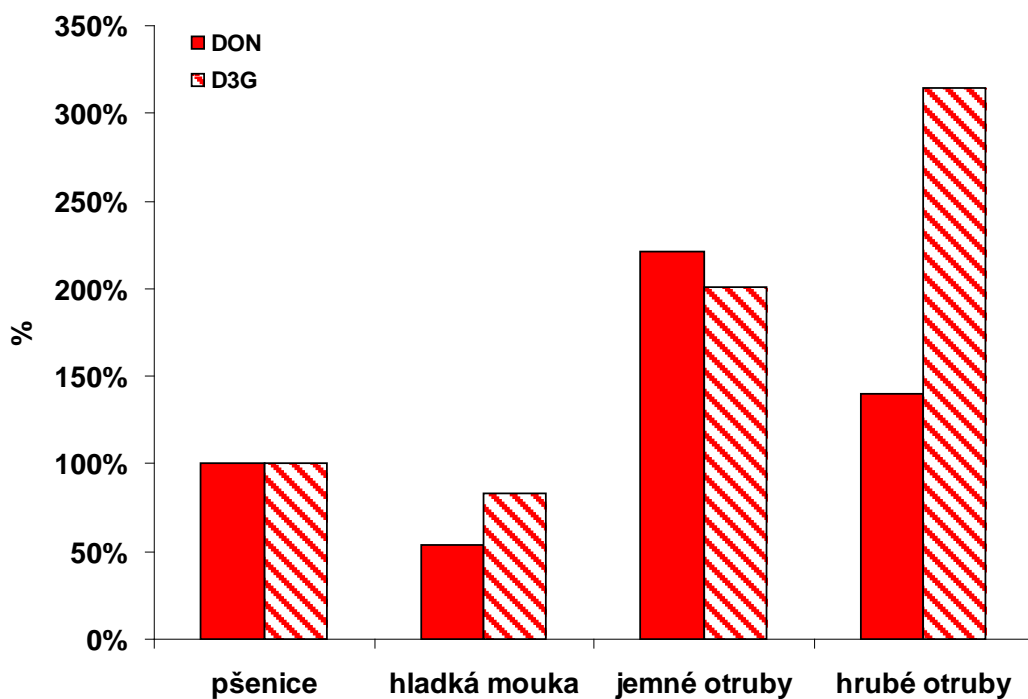
Vzorky pšenice ozimé vypěstované na pokusných parcelách České zemědělské univerzity v Praze (ČZÚ) byly dodány na Ústav chemie a analýzy potravin, kde byly vyšetřeny na obsah DON a jeho maskované formy D3G a poté byly vymlety odlišnými mlynářskými technologiemi na: (i) hladké mouky, kdy byly získány frakce hladkých mouk,

jemných a hrubých otrub a (ii) celozrnné mouky – v tomto případě dochází k semletí celého zrna a nedochází k rozdělení na frakce.

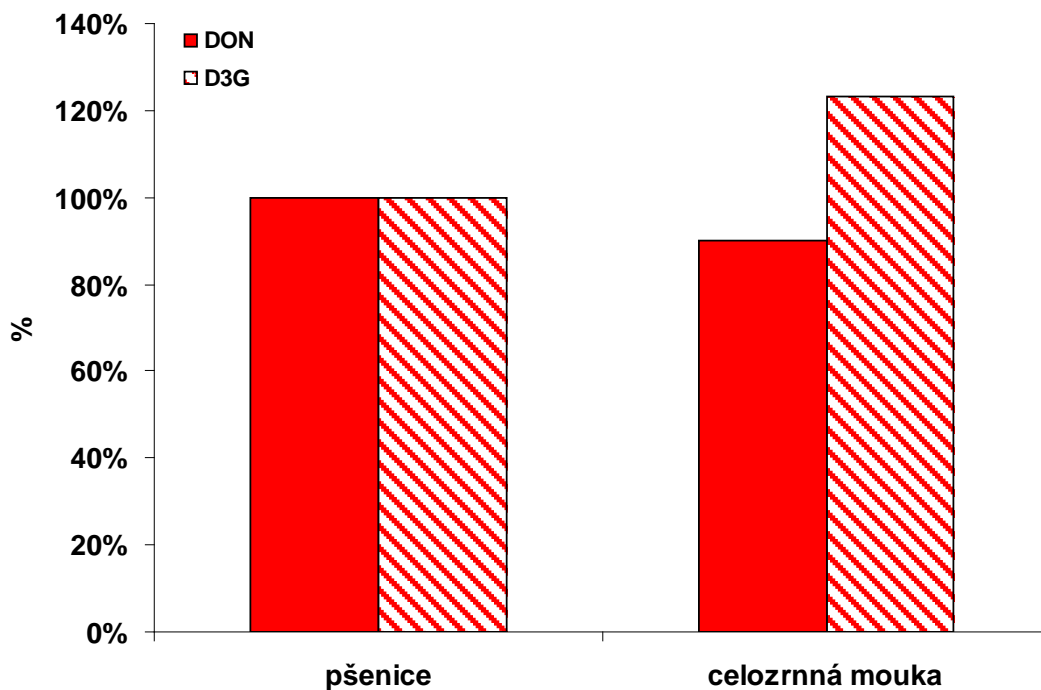
Při výrobě hladké mouky dochází k postupnému odstraňování obalových vrstev zrna (frakce jemných a hrubých otrub) a následnému drcení endospermu. Z **Obr. 18** je patrné, že malá část kontaminace DON i D3G může být redukována právě odstraněním pluch, protože obě frakce otrub obsahovaly mnohem vyšší hladiny kontaminace ve srovnání s původním zrnem. Přesto však 75 % DON a téměř 98 % maskovaného D3G zůstává ve finální mouce. Vyšší procentuální obsah D3G v endospermu potvrzuje závěry předchozích studií, že maskované mykotoxiny rostlina pravděpodobně zabudovává do makromolekul (41, 42).

V případě celozrnných mouk se nálezy obou sledovaných mykotoxinů v moukách shodovaly s úrovní kontaminace v původním zrně, viz **Obr. 19**.

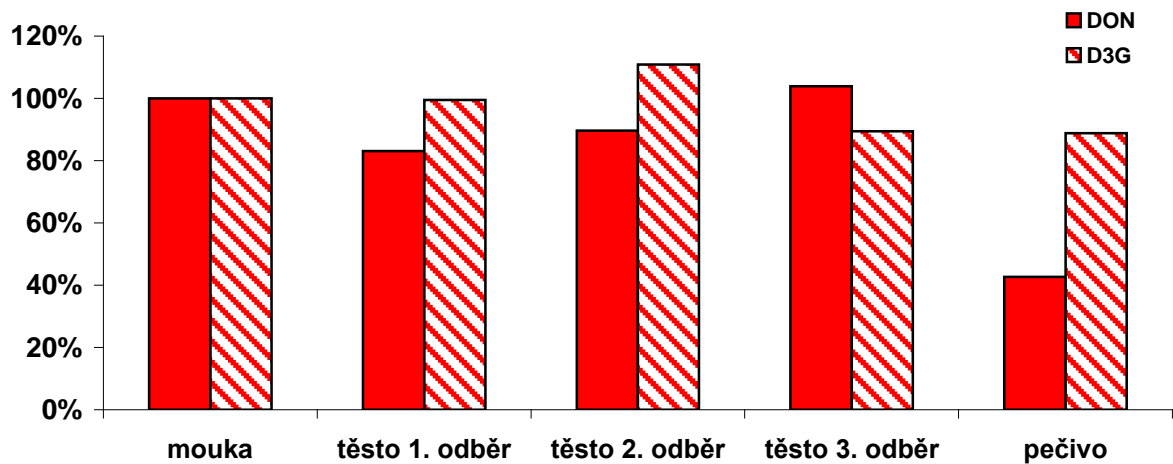
Bílé mouky získané v první části studie byly dále zpracovány standardní pekárenskou technologií na bílé pečivo a v průběhu procesu byly odebírány vzorky těst: (i) po zadělání, (ii) po 45 min. kynutí a (iii) po 95 min. kynutí – těsně před pečením. Hladiny obou sledovaných toxinů se během kynutí nijak výrazně neměnily. Pokles kontaminace byl pozorován až po upečení pečiva, kdy došlo k poklesu hladiny DON na poloviční množství ve srovnání s původní hladinou ve výchozích moukách. Toto pozorování může být způsobeno tepelnou degradací, která byla potvrzena již dříve v modelových experimentech simulujících tento proces (43). Naopak v případě D3G nedošlo během pekárenského zpracování k žádným změnám, což může být způsobeno jeho vyšší stabilitou za vysokých teplot nebo postupným uvolňováním ze škrobu. Bohužel modelové experimenty teplotní stability tohoto toxinu, které by potvrdily tuto domněnku, nebyly doposud realizovány. Na **Obr. 20** jsou ukázány změny hladiny obou toxinů v průběhu pekárenské technologie na modelovém vzorku pekárenské odrůdy Akteur.



Obr. 18: Distribuce mykotoxinů v průběhu mlynářského zpracování (hladká mouka)



Obr. 19: Distribuce mykotoxinů v průběhu mlynářského zpracování (celozrnná mouka)



Obr. 20: Dynamika mykotoxinů v průběhu pekárenského zpracování

### 5.5 Případová studie 5

#### *Výskyt mykotoxinů v pekárenských výrobcích zakoupených na českém trhu v roce 2010*

V návaznosti na předchozí studii týkající se dynamiky přechodu DON a maskovaného D3G byl proveden monitoring obsahu těchto toxinů ve vybraných vzorcích mouk a pekařských výrobců zakoupených v prodejnách maloobchodní sítě ČR. Celkem byl získán soubor vzorků, který obsahoval 19 vzorků mouk a 30 vzorků kusového pečiva, podrobný popis vzorků shrnují **Tab. XI** a **XII**. Soubor mouk obsahoval jak nejběžněji používané pšeničné mouky (hladké, polohrubé, hrubé), tak také mouky celozrnné či mouky z bioprodukce. Sortiment pekárenských výrobců zahrnoval běžné bílé pečivo, dále celozrnné pečivo, pečivo s přídavkem slunečnicových semínek a také pečivo vyšší cenové kategorie určené pro zdravou výživu a označované jako „vital“.



**Tab. XI: Seznam vzorků pečiva**

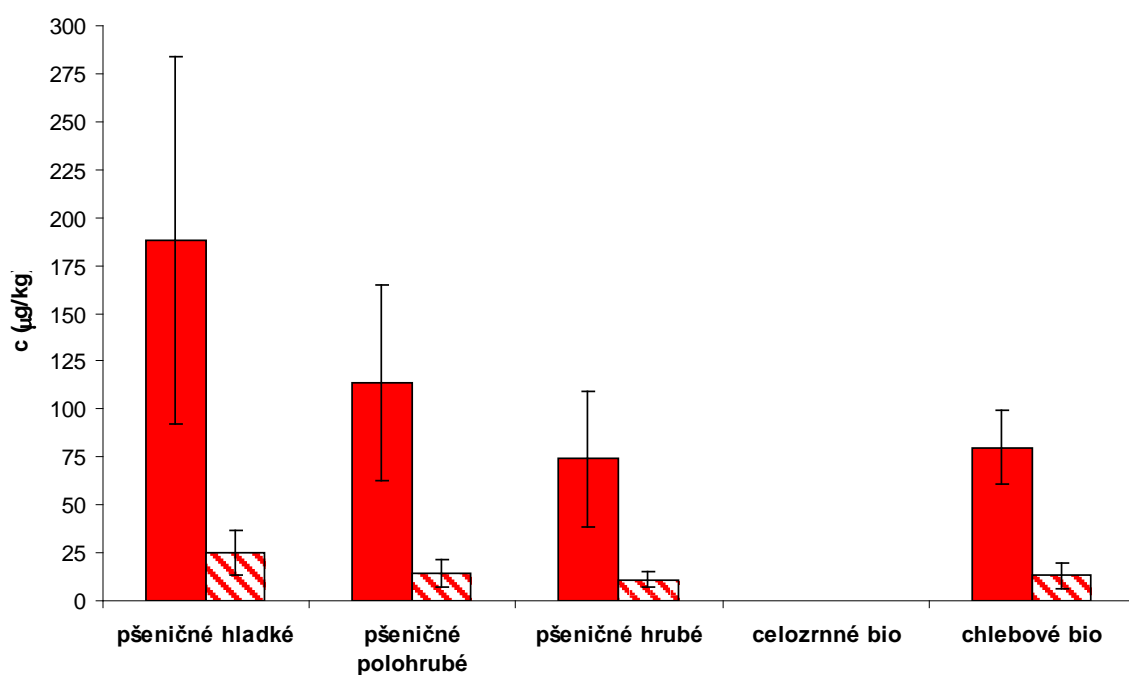
<b>č. vz.</b>	<b>vzorky pečiva</b>	<b>hmotnost [g]</b>	<b>místo nákupu</b>
1	rohlík slunečnicový	50	<b>hypermarket Albert (Ahold Czech Republic a.s.)</b>
2	kaiserka cereální	56	
3	kaiserka natural maková	56	
4	pletýnka velká	120	
5	rohlík pšeničný	43	
6	bageta cereální malá	55	
7	bageta tmavá malá	45	
8	cereální rohlík	60	
9	bageta pohanková malá	55	
10	dalamánek	95	
11	rohlík tukový	43	<b>hypermarket Interspar (SPAR ČOS s.r.o.)</b>
12	Spar rohlík vícezrnný	60	
13	rohlík pohankový	60	
14	rohlík tmavý	60	
15	kornbageta	110	
16	Spar rohlík grahamový	60	
17	uzel slaný	43	
18	starofrancouzské pečivo	73	
19	rohlík cereální	60	
20	bageta	105	
21	rohlík kornspitz	55	<b>hypermarket Globus (Globus ČR k.s.)</b>
22	královský rohlík hladký	65	
23	pšeničný rohlík	43	
24	fit bageta	125	
25	pletýnka maková	65	
26	vital houska	45	
27	slunečnicový rohlík	50	
28	mix rohlík	50	
29	dalamánek	55	
30	fit uzel	50	

**Tab. XII: Seznam vzorků mouk**

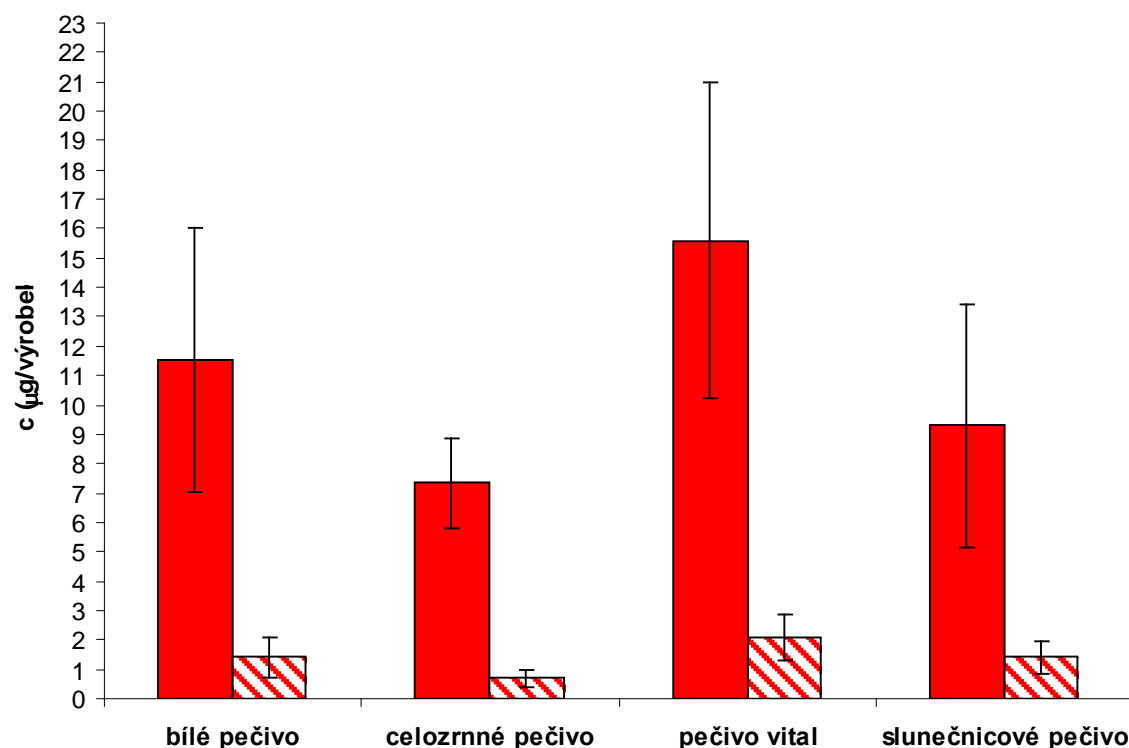
č. vz.	vzorky mouk	místo nákupu
1	mouka pšeničná hladká světlá 00 extra 1kg, Euroshopper	<b>hypermarket Albert (Ahold Czech Republic a.s.)</b>
2	mouka pšeničná polohrubá výběrová 1kg, Euroshopper	
3	mouka pšeničná hrubá Zlatý klas 1kg, Euroshopper	
4	pšeničná mouka hladká 1kg, Albert BIO	
5	celozrnná jemně mletá mouka špaldová 1kg, Albert BIO	
6	celozrnná jemně mletá mouka žitná 1kg, Albert BIO	
7	pšeničná mouka hladká světlá 1kg, Penam	
8	pšeničná mouka polohrubá výběrová 1kg, Penam	
9	pšeničná mouka polohrubá Zlatý klas 1kg, Penam	
10	pšeničná krupice hrubá 1kg, Penam	
11	pšeničná mouka chlebová 1kg, Biomlým	
12	žitná mouka chlebová 1kg, Biomlým	
13	pšeničná mouka hladká světlá SPAR 1kg	
14	pšeničná mouka polohrubá světlá SPAR 1kg	
15	pšeničná mouka hrubá světlá SPAR 1kg	
16	pšeničná mouka hladká světlá Veselka 1kg	
17	pšeničná mouka polohrubá světlá Veselka 1kg	
18	pšeničná mouka hrubá světlá Veselka 1kg	<b>hypermarket Globus (Globus ČR k.s.)</b>
19	pšeničná mouka hladká polosvětlá klasik 1kg, RAMILL	
20	pšeničná mouka hladká polosvětlá klasik 1kg, RAMILL	

DON byl detekován v 73 % mouk v rozmezí hladin 28 – 598  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a D3G v 68 % vzorků na hladinách 5 – 72  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Žádný z těchto toxinů však nebyl detekován v celozrnných a biomoukách, nelze však hovořit o žádném trendu, protože nakoupený soubor vzorků nebyl dostatečně reprezentativní (**Obr. 21**). Nutno však podotknout, že žádný z vyšetřovaných vzorků mouk nepřekročil hygienický limit (750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pro DON v mouce .

V případě pekárenských výrobků byl DON detekován u všech vyšetřovaných vzorků na hladinách v rozmezí 29 – 525  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , což odpovídá hladinám 3 – 39  $\mu\text{g}/\text{výrobek}$ . D3G doprovázel DON v 76 % případů v rozmezí hladin 11 – 69  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (0,45 – 3  $\mu\text{g}/\text{výrobek}$ ). Nejvyšší hladiny DON i D3G byly detekovány ve „vital“ pečivu, což je pečivo dražší cenové kategorie (**Obr. 22**). Jeden ze vzorků dokonce překročil hygienický limit pro DON 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ustanovený Evropskou komisí (12) a další dva vzorky obsahovaly hladiny DON velmi blízko k limitní hranici.



Obr. 21: Hladiny DON a D3G ve vzorcích mouk zakoupených v maloobchodní síti ČR



Obr. 22: Hladiny DON a D3G ve vzorcích pekárenských výrobků zakoupených v maloobchodní síti ČR

## 5.6 Případová studie 6

### *Výskyt mykotoxinů v potravinách určených pro děti*

Otázka mykotoxikologické kvality kojenecké a dětské výživy je dnes důležitým a často řešeným globálním tématem. Bohužel dodnes existuje jen velmi málo studií, které se zabývají stanovením široké škály mykotoxinů v potravinářských výrobcích určených pro děti s cereálním, ovocným nebo mléčným základem. V současné době je jedním z limitujících faktorů bezesporu náročnost komplexního vyšetření vzorků pro každou skupinu mykotoxinů. Analytická metoda LC-MS/MS je v současnosti celosvětově často používanou technikou v oblasti kontroly mykotoxinů v potravinách.

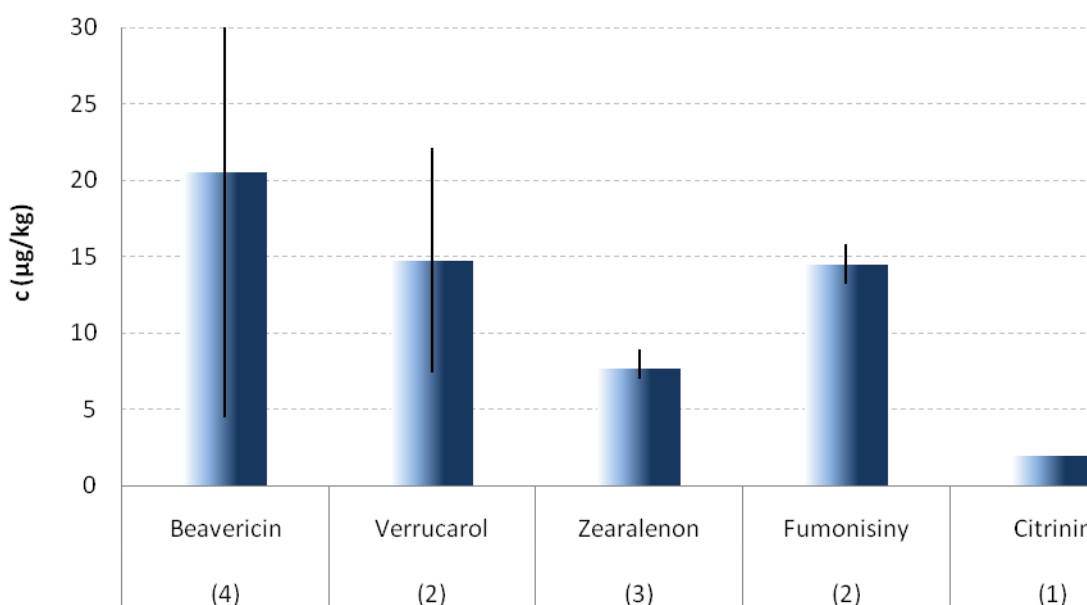
Cílem této případové studie bylo posoudit mykotoxikologickou kvalitu výživy určené pro malé děti od čtvrtého do dvanáctého měsíce věku a porovnat kvalitu produktů na českém a německém trhu. Celkem bylo pro tento účel vyšetřeno 76 vzorků dětské výživy různých obchodních značek, z toho bylo 52 vzorků nakoupeno v ČR a 24 v Německu v období březen - duben 2010. Sortiment potravinářských výrobků sledované dětské výživy byl složen z 25 vzorků dětských přesnídávek a příkrmů (18 vzorků z ČR a 7 vzorků z Německa) a to celkem od 7 výrobců, 19 vzorků sušenek (13 vzorků z ČR a 6 vzorků z Německa) pocházející od 9 výrobců a 32 vzorků dětských cereálních kaší (21 vzorků z ČR a 11 vzorků z Německa) vyrobené 9 producenty.

#### **Přesnídávky a příkrmy**

Testované přesnídávky a příkrmy byly převážně s ovocným základem, někdy také s cereální příměsí. Celkem 11 vzorků bylo pouze na bázi ovocné složky, 11 vzorků obsahovalo jak ovocnou tak i cereální složku a 3 vzorky byly vyrobeny ze zeleniny a masa. Převážná část těchto ovocně-cereálních a zeleninových příkrmů byla určena pro malé děti od čtvrtého měsíce věku.

Z celkového počtu 25 vzorků vyšetřených přesnídávek a příkrmů bylo kontaminováno 40 % (10 vzorků). ZON byl nalezen v 12 % případů cereálních přesnídávek s průměrnou kontaminací 8 µg/kg. Dále byly nalezeny ve dvou testovaných maticích fumonisinové mykotoxiny. Jednalo se o vzorky s ovocně-cereálním základem. V jednom vzorku byly nalezeny fumonisin B2 i B3 na hladinách 16 a 13 µg/kg. BEA byl nalezen v 16 % případů.

Složení kontaminovaných vzorků tímto mykotoxinem bylo různé, 2 vzorky obsahovaly pouze jablečnou složku a další 2 vzorky byly vyrobeny jak z cereální suroviny (pšenice), tak i z ovoce. Jeho průměrná hladina kontaminace činila 17,5 µg/kg. Verrucarol (VER) obsahovalo 8 % testovaných vzorků s průměrnou mírou kontaminace 14,8 µg/kg. Citrinin (CIT) byl nalezen pouze v jediném případě a to v přesnídávkě, která obsahovala ovoce a ovesné vločky. Jeho obsah v tomto vzorku byl 2,5 µg/kg. Souhrnný ilustrační graf pro tuto skupinu výrobků je uveden na **Obr. 23**.

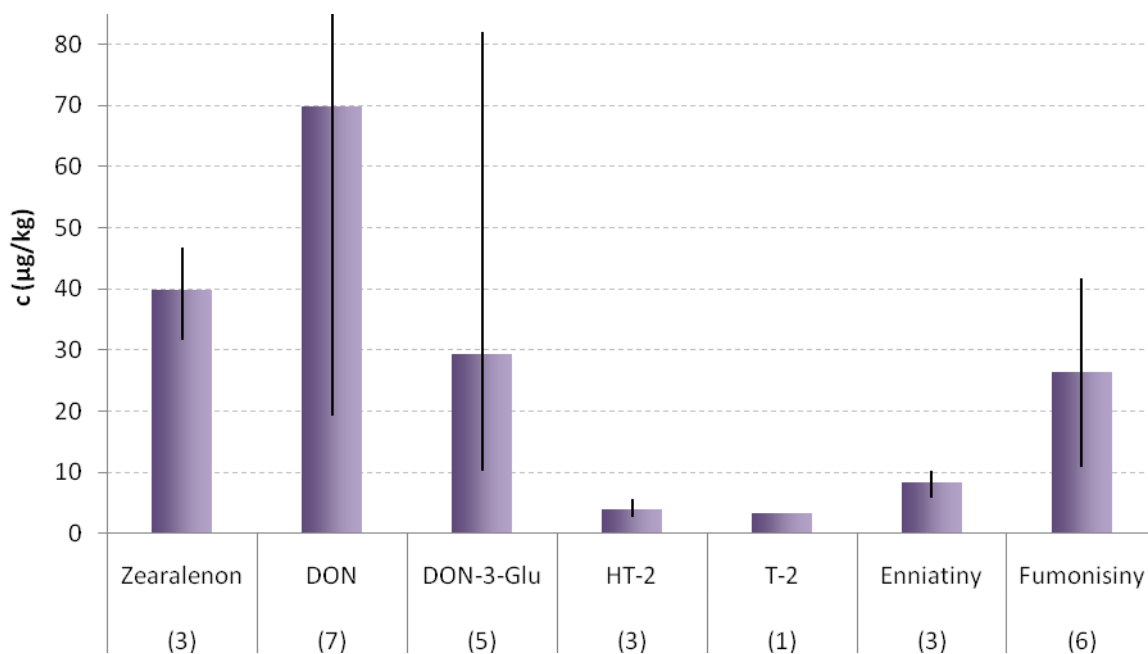


**Obr. 23: Hladiny mykotoxinů detekovaných v přesnídávkách a příkrmech, počet pozitivních vzorků, z celkového počtu 25**

### Cereální kaše

Cereální kaše měly v tomto monitoringu dětské výživy největší zastoupení. Celkem jich bylo vyšetřeno 32. Vyšetřované cereální kaše od 9 výrobců byly mléčného a cereálního složení. Některé z nich byly vyrobeny z více druhů cereálií a 11 vzorků kaší obsahovalo jako příměs ovoce. Vzorky nakoupených kaší byly určeny pro výživu dětí od 4 až 8 měsíců věku. Vyšetřované vzorky kaší obsahovaly trichotheceny, fumonisin a enniatiny. Celkově bylo kontaminováno 34 % cereálních kaší (11/32). ZON byl nalezen v 9 % případů a jeho průměrná hladina kontaminace byla 40 µg/kg. Vzorky kaší byly dále kontaminovány fusariotoxinem DON, jednalo se o výskyt u 22 % případů, a jeho konjugovanou formou D3G, 16 % pozitivních vzorků. Jejich hladiny kontaminace se pohybovaly mezi 19 až 134 µg/kg v případě DON a 10 až 81 µg/kg u D 3G. Dále byly stanoveny pozitivní nálezy zatím

legislativně neošetřených trichothecenových mykotoxinů řady A – HT-2 a T-2, pro které se v současné době legislativa připravuje. HT-2 toxin byl nalezen v 9 % případů s průměrnou kontaminací 4 µg/kg. T-2 toxin byl detekován pouze v jediném vzorku, který obsahoval jako hlavní složku jáhlovou mouku. Obsah T-2 toxinu byl detekován na hladině 3 µg/kg. V 9 % případů u vzorků kaší byly nalezeny i „nové“ a zatím jen krátce sledované mykotoxiny - enniatiny. Všechny vzorky kontaminované těmito mykotoxiny obsahovaly cereální složku, zejména ovesnou a pšeničnou mouku. V každém pozitivním vzorku byl detekován EN A1. Nejvyšší nalezená hladina o koncentraci 10,3 µg/kg patřila EN A. Průměrný obsah této skupiny mykotoxinů se pohyboval na hladině 8,4 µg/kg. Fumonisy, které byly nalezeny v přesnídávkách a příkrmech, byly detekovány i v cereálních kaších. Celkem bylo nalezeno 19 % případů vzorků s pozitivními nálezy fumonisinů. Tyto vzorky měly jedno společné - byly „multicereálního“ složení a obsahovaly kukuřici, která typickou komoditou pro výskyt mykotoxinů. Nejvyšší hladina kontaminace, v případě fumonisinů, byla nalezena ve vzorku bez obsahu mléčné složky s 8 druhy cereálií a to fumonisinu B2 o koncentraci 42 µg/kg. Průměrný obsah všech tří typů fumonisinů byl 26,5 µg/kg. Graficky zázorněné výsledky pro cereální kaše jsou uvedeny na **Obr. 24**.



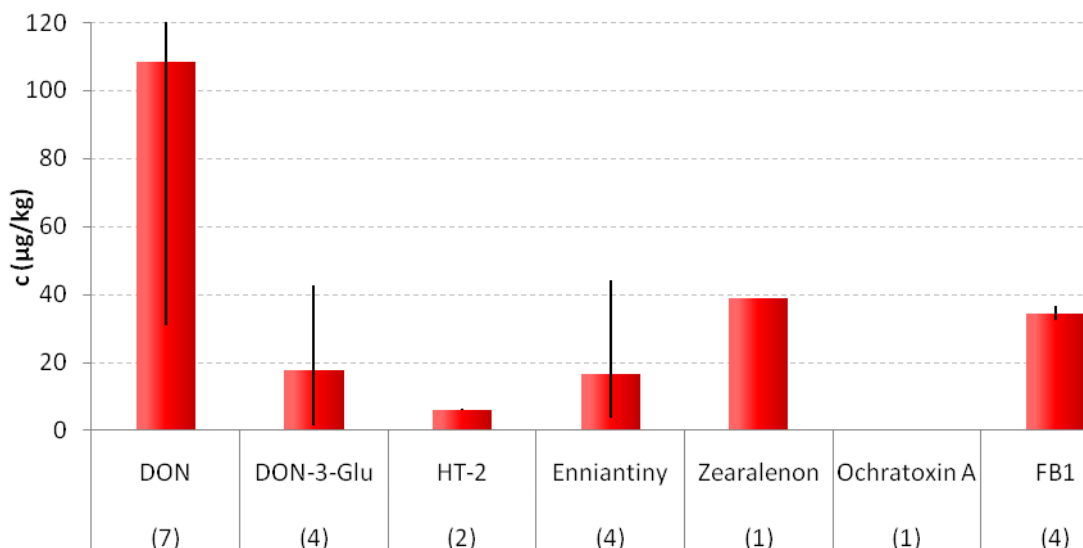
**Obr. 24: Hladiny mykotoxinů detekovaných v cereálních kaších; počet pozitivních vzorků z celkového počtu 32**

## Sušenky a keksy

Dětské sušenky a keksy byly pro tento účel monitoringu nakoupeny v celkovém počtu 19 vzorků. Téměř většina z nich byla vyrobena z pšeničné mouky, odtučněného sušeného mléka a ty, které byly „multicereálního“ složení, obsahovaly kromě jiného i kukuřici, rýži, oves ječmen a pohanku. Vesměš většina sušenek a keksů byla určena pro malé děti od šestého měsíce věku.

Z celkového počtu bylo 11 vzorků cereálních sušenek a keksů (58 %) kontaminováno trichotheceny, fumonisiny, enniatiny, ochratoxinem A a zearalenonem. Nejvyšší nálezy v této kategorii výrobků byly nalezeny v případě kontaminace mykotoxinu DON. Legislativní limit byl překročen pouze v jediném případě. Ve vzorku vedeným pod označením „SC-12“ byl detekován DON na hladině 345 μg/kg. To znamená, že legislativní limit zde byl překročen téměř 1,8 krát. Uvedený vzorek pochází z Polska a byl vyroben z pšeničné mouky. DON bylo kontaminováno dalších 6 vzorků sušenek. Průměrná hodnota kontaminace byla stanovena na hladině 109 μg/kg. Ve 4 vzorcích, které obsahovaly pozitivní nálezy DON, byla nalezena i jeho konjugovaná forma - D3G. Průměrný obsah tohoto „maskovaného“ mykotoxinu ve vyšetřených vzorcích činil 18 μg/kg. Jako další trichothecen byl v této skupině dětské výživy detekován HT-2, který byl nalezen ve dvou vzorcích. Jeden je již zmiňovaný vzorek z Polska, ve kterém byl obsah HT-2 6 μg/kg a druhý byl vzorek, ve kterém byl nalezen HT-2, což byly sušenky vyrobené ze špaldové mouky s označením BIO. Obsah zde byl 6 μg/kg. Ani kontaminace enniatiny nebyla ve všech vzorcích sušenek a keksů negativní. Tento nový druh mykotoxinů byl detekován v 21 % případů. Všechny pozitivní nálezy patřily EN A1 a ve dvou případech i EN B. Průměrný obsah těchto dvou mykotoxinů byl 16,5 μg/kg. ZON byl detekován v jediných sušenkách značky Nestlé, které byly nakoupeny a vyrobeny v Německu. Obsah ZON v tomto vzorku dosáhl hodnoty 39 μg/kg. Pouze v jediném případě vyšetřované dětské výživy pro účel této studie, byl nalezen velmi nebezpečný toxin – ochratoxin A, který se svou hladinou kontaminace velmi přiblížil k legislativně stanovenému limitu. Jeho obsah ve vzorku pocházející z české maloobchodní sítě byl 0,43 μg/kg. Celkem 4 vzorky (21 %) byly kontaminovány jedním mykotoxinem ze zástupců fumonisinů - fumonisinem B1. Kontaminované vzorky byly vyrobeny z pšenice, jeden z nich obsahoval i kukuřici. Do tohoto výčtu fumonisinem napadaných vzorků patří i již diskutovaný „problematický“

vzorek z Polska. FB1 zde dosahoval hodnot 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , což je téměř srovnatelné s ostatními kontaminovanými vzorky tímto mykotoxinem, protože průměrný obsah FB1 byl stanoven na hladině 34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Výsledky monitoringu této skupiny vzorků j sou shrnuty v grafu na **Obr. 25**.

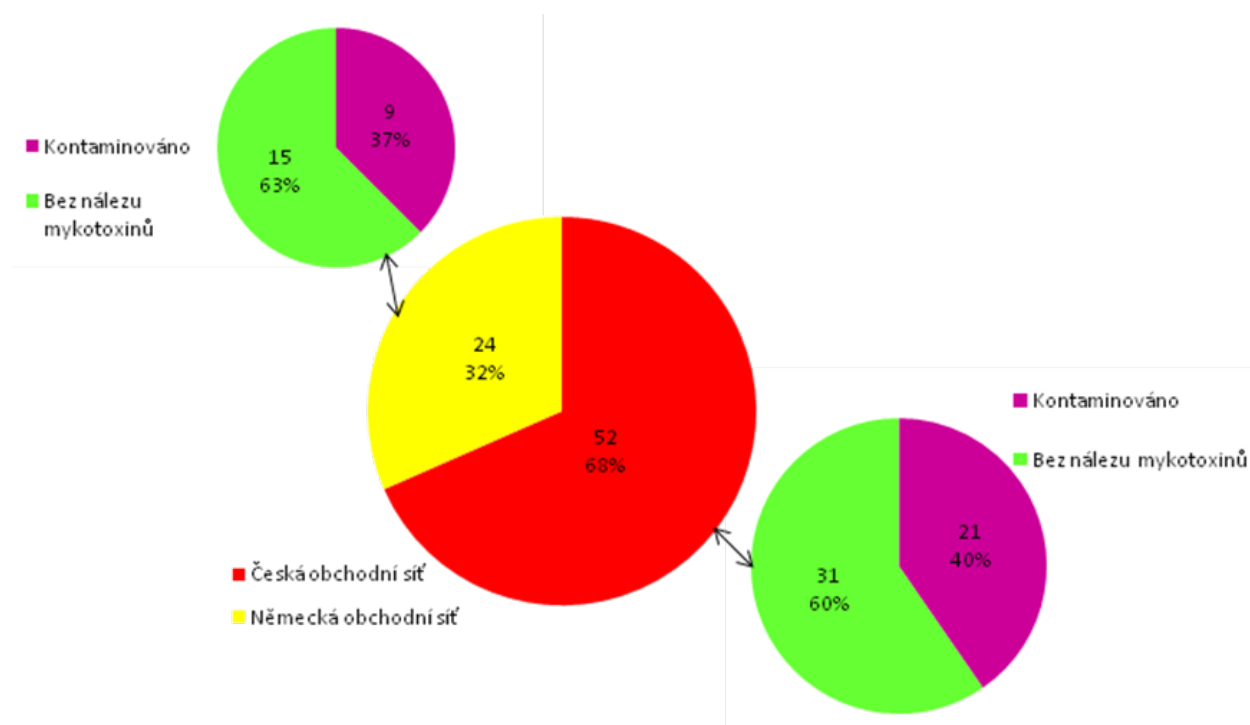


**Obr. 25: Hladiny mykotoxinů detekovaných v cereálních sušenkách a keksech a počet pozitivních vzorků, z celkového počtu 19**

### Srovnání dětské výživy podle výskytu mykotoxinů a původu pěstovaných surovin

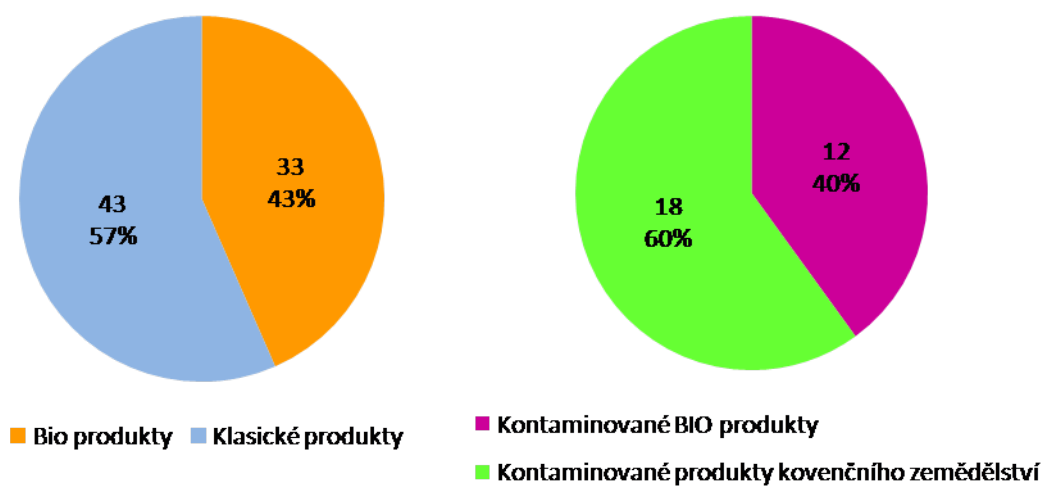
Jak již bylo uvedeno, vzorky dětské výživy nakoupené za účelem této analýzy, pochází ze dvou maloobchodních sítí - z české a německé. Z celkového počtu nakoupených vzorků tvoří 68 % vzorků nakoupených v České republice a 32 % v Německu. Porovnáním obou skupin a počtu pozitivních nálezů mykotoxinů ve vzorcích bylo zjištěno, že nelze jednoznačně říct, zda více kontaminovanějších vzorků pocházelo z českého nebo německého trhu. Na českém trhu bylo mykotoxiny kontaminováno celkem 40 % nakoupených vzorků a na německém 37 %. V obou případech těchto maloobchodních sítí je poměr pozitivních a negativních nálezů ve sledované dětské výživě prakticky shodný. Graf na **Obr. 26** graficky znázorňuje rozložení výskytu vzorků kontaminovaných a negativních na obsah mykotoxinů pro oba dva trhy.





**Obr. 26: Rozložení výskytu vzorků kontaminovaných a negativních na obsah mykotoxinů na českém a německém trhu**

Dále byl porovnán výskyt mykotoxinů v dětské výživě podle způsobu pěstování původních surovin, ze kterých byly dané produkty vyrobeny. Z celkového počtu 76 vzorků obsahovalo 43 výrobků suroviny, které byly pěstované konvenčním způsobem, a zbylých 33 výrobků bylo vyrobeno ze surovin z organického zemědělství. Stejný poměr byl zachován i při porovnání kontaminovaných vzorků. Z celkem 30 pozitivní případů výskytu mykotoxinů ve všech vzorcích dětské výživy pocházelo 60 % výrobků z konvenčního zemědělství a 40 % výrobků patřilo do kategorie BIO potraviny. Ani pomocí tohoto porovnání nelze sledovat trend závislosti výskytu mykotoxinů mezi výrobky, které nesou nebo nenesou označení BIO produkt. Na **Obr. 27** je zobrazeno celkové srovnání všech nakoupených produktů, dále mykotoxiny kontaminovaných produktů a jejich poměrné rozdělení do kategorie BIO produktů a produktů z konvenčního zemědělství.



**Obr. 27: Poměrné rozdělení všech nakoupených výrobků s označením a bez označení BIO a schéma kontaminace těchto vzorků**

## 5.7 Případová studie 7

### *Výskyt mykotoxinů v silážích a krmivech*

Výskyt mykotoxinů v silážích má výrazný nepříznivý efekt na zdraví a pohodu hospodářských zvířat. Bereme-li však v úvahu možnost přenosu těchto mykotoxinů a/nebo jejich metabolitů do konzumovatelných tkání, vajec či mléka, riziko spojené s mykotoxiny v krmivech se stává aktuálním tématem i v případě zdraví člověka.

Mykotoxikologická kvalita siláže je úzce spojována s technologií jejího zpracování. Za přístupu kyslíku dochází totiž ke změnám pH a rozrůstání houbové kontaminace, včetně toxikogenních druhů, a produkci mykotoxinů. Ačkoliv několik studií zabývajících se mykotoxinovou kontaminací siláží a senáží již bylo publikováno (36-38) ve srovnání s cereáliemi je znalost kontaminace těchto krmiv nesrovnatelně nižší. Jedním z důvodů je i náročnost jejich detekce, která souvisí s velkým množstvím koextraktů, které ze siláží a senáží pocházejí. Na Ústavu chemie a analýzy potravin však byla vyvinuta a plně validována metoda využívající k separaci analytů a koextrahovaných látek pomocí ultraúčinné vysokotlaké kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-orbitrapMS).

V rámci případové studie, zabývajících se monitoringem kontaminace krmiv a krmných směsí, bylo na přítomnost trichothecenových mykotoxinů, zearalenonů, aflatoxinů, alternariových toxinů, ergotových alkaloidů, enniatinů, fumonisinů, ochratoxinu A, roquefortinu C, sterigmatocystinu, penitremu A, beauvericinu, fumonisinů, mykofenolové a penicillové kyseliny analyzováno 10 silážních a senážních vzorků krmiv.

Spektrum vzorků zahrnovalo jetelotravní a vojtěškové siláže a senáže, pšeničný, sojový a kukuřičný šrot a krmné směsi pro dojnice.

#### **Analytická metoda**

Analytická metoda pro stanovení mykotoxinů v silážích, senážích a krmivech se skládá z jednoduché přípravy vzorku založené na principu QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), (38). K vlastní separaci mykotoxinů a složek matrice bylo využito ultra-účinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií typu orbitální iontová past.

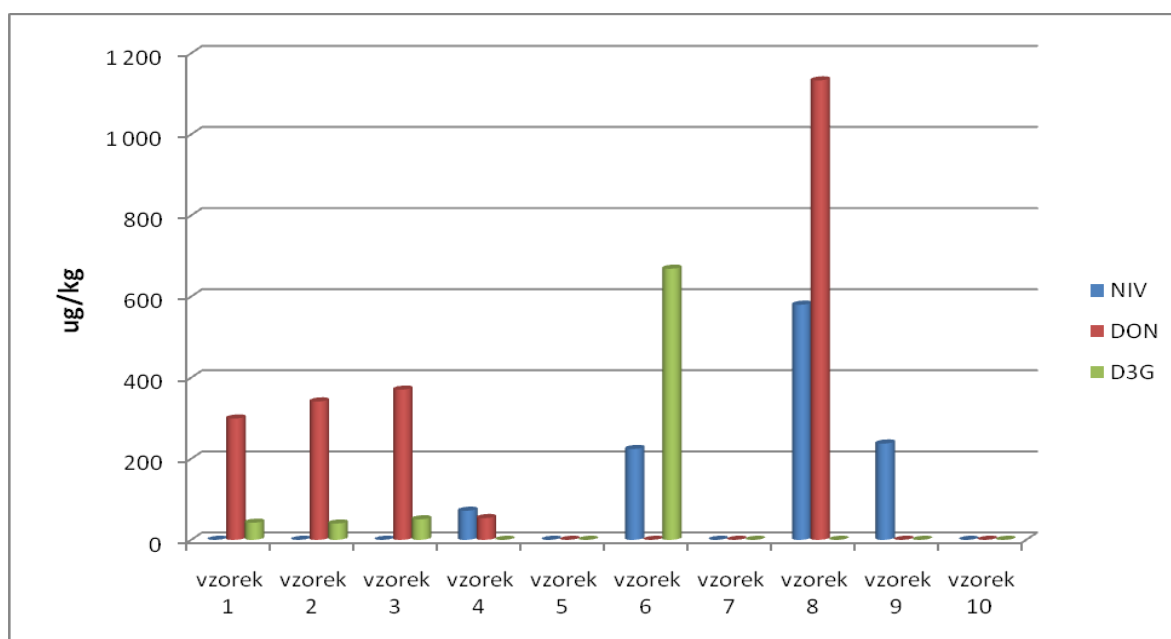
Výtěžnosti analytů se pohybovaly v rozmezí 66-138% s RSD do 16%, kvantifikační limity (LOQ) se lišily v závislosti na konkrétním analytu, jejich kompletní přehled uvádí **Tab. XIII**. Koeficienty lineární regrese kalibračních křivek ověřené v rozsahu LOQ-2500  $\mu\text{g/l}$  spadaly do intervalu 0,9958-0,9999.

**Tab. XIII: Pracovní charakteristiky U-HPLC-orbitrapMS metody pro stanovení mykotoxinů v silážích a senážích**

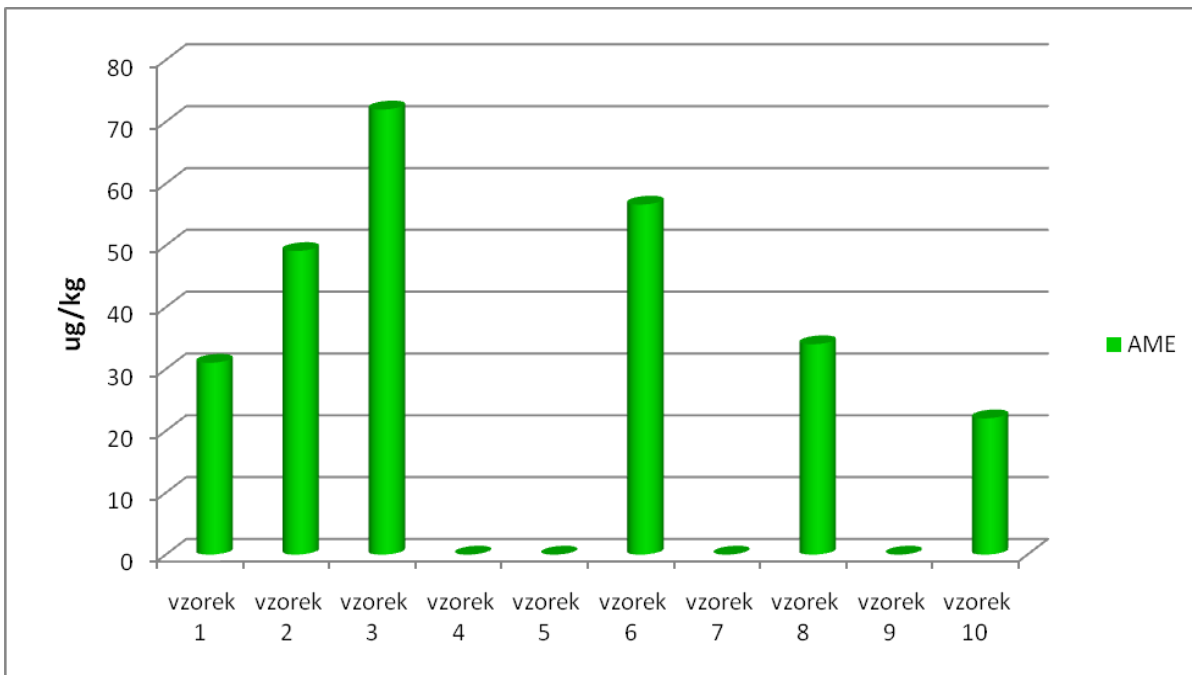
	Retenční čas (min)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	LOQ (ug/kg)
Nivalenol	1,3	82	8,0	155
Deoxynivalenol	1,9	93	3,8	75
Deoxynivalenol-3-glucosid	1,9	44	11,4	75
Fusarenon-X	2,5	117	3,8	155
Neosolaniol	2,9	66	5,3	40
3-acetyldeoxynivalenol	3,4	86	11,9	155
Penicilicová kyselina	4,6	104	4,8	75
Altenuene	5,3	99	7,1	40
Diacetoxyscirpenol	5,6	83	6,3	40
Aflatoxin G2	6,7	101	1,3	40
HT-2 toxin	6,8	84	13,2	75
Alternariol	6,9	95	4,7	20
Alfatoxin G1	7,0	114	1,3	40
Beta-zearalenon	7,2	108	4,8	155
T-2 toxin	7,4	83	5,7	40
Aflatoxin B2	7,4	101	2,0	40
Aflatoxin B1	7,7	111	3,1	40
Alfa-zearalenon	7,7	98	2,6	75
Roquefortin C	7,7	88	2,9	10
Ergosine	7,8	75	7,8	40
Zearalenon	7,9	103	3,1	40
Ergocornine	8,0	75	6,3	40
Sterigmatocystin	8,1	97	3,5	10
Ergosinine	8,1	117	7,8	155
Alternariolmethylether	8,2	99	1,6	75
Ergocryptine	8,2	77	16,1	20
Ergochristine	8,3	73	15,7	20
Ergocorninine	8,5	119	13,4	155
Fumonisin B1	8,5	73	4,5	40
Ergocryptinine	8,7	130	9,6	155
Penitrem A	8,7	91	7,2	20
Ergochristinine	8,7	138	8,7	315
Mycophenolová kyselina	8,8	94	4,4	75
Enniatin B	9,0	82	10,0	75
Ennitin B1	9,2	77	5,0	75
Fumonisin B2	9,2	82	2,3	40
Beuavericin	9,3	81	2,0	10
Enniatin A1	9,3	75	5,8	40
Ochratoxin A	9,4	122	0,9	75
Enniatin A	9,4	80	15,0	75

V analyzovaných vzorcích siláží, senáží a dalších krmiv byly vyhodnoceny pozitivní nálezy trichotheceenových mykotoxinů nivalenolu (NIV), deoxynivalenolu (DON) a jeho maskované formy, deoxynivalenol-3-glukosidu (D3G). Dále byla ve vzorcích detekována přítomnost alternariového mykotoxinu alternariolmethyleteru (AME), roquefortinu C (roqC), enniatinů B a B1 (EN B a EN B1), beauvericinu (BEA), penicillové a mykofenolové kyseliny a fumonisinů B1 a B2.

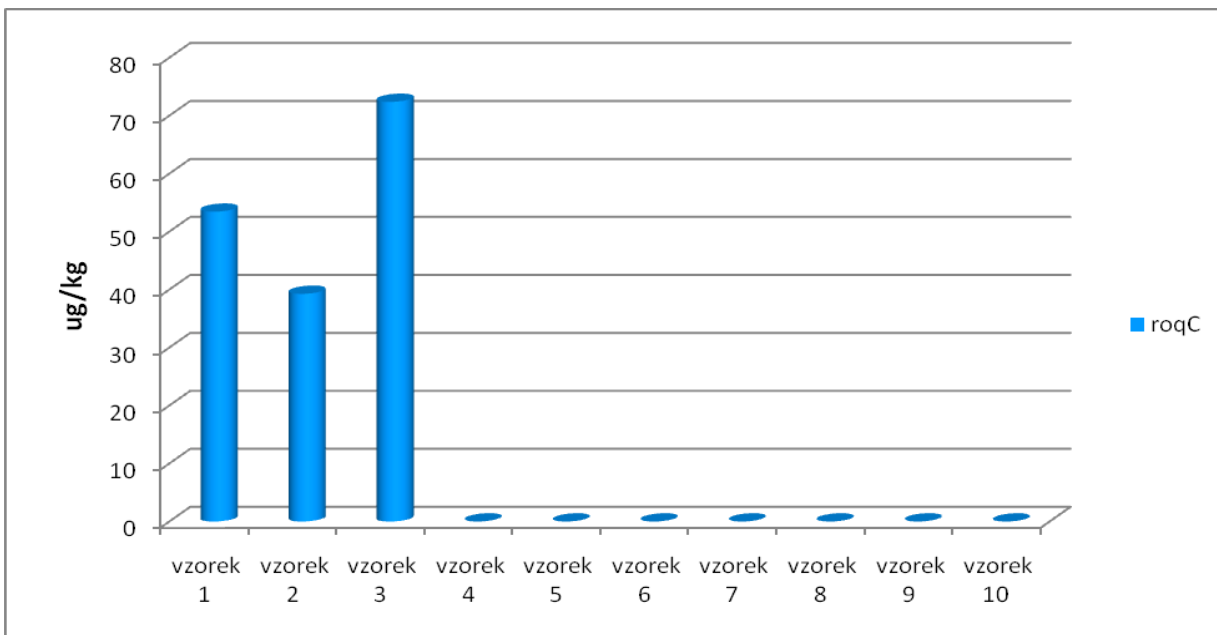
Konkrétní nálezy těchto detekovaných mykotoxinů jsou zdokumentovány na **Obr. 28-33**.



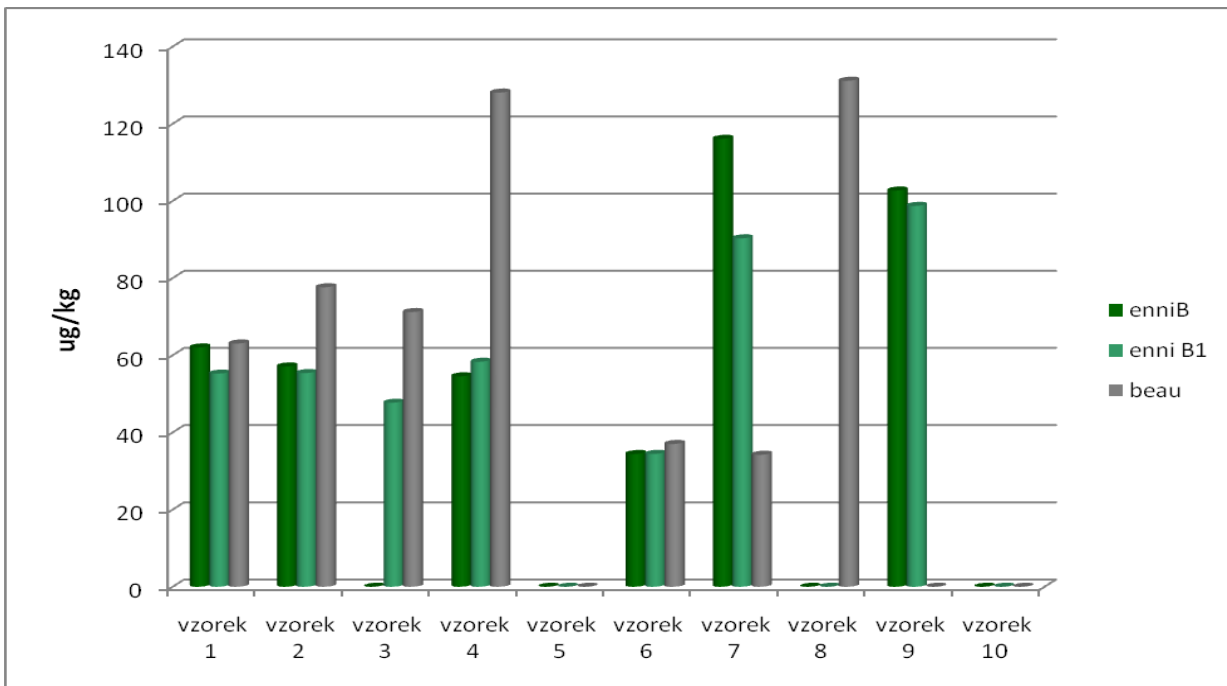
**Obr. 28: Hladiny trichotheceenových mykotoxinů ve vzorcích siláží, senáží a krmiv (µg/kg)**



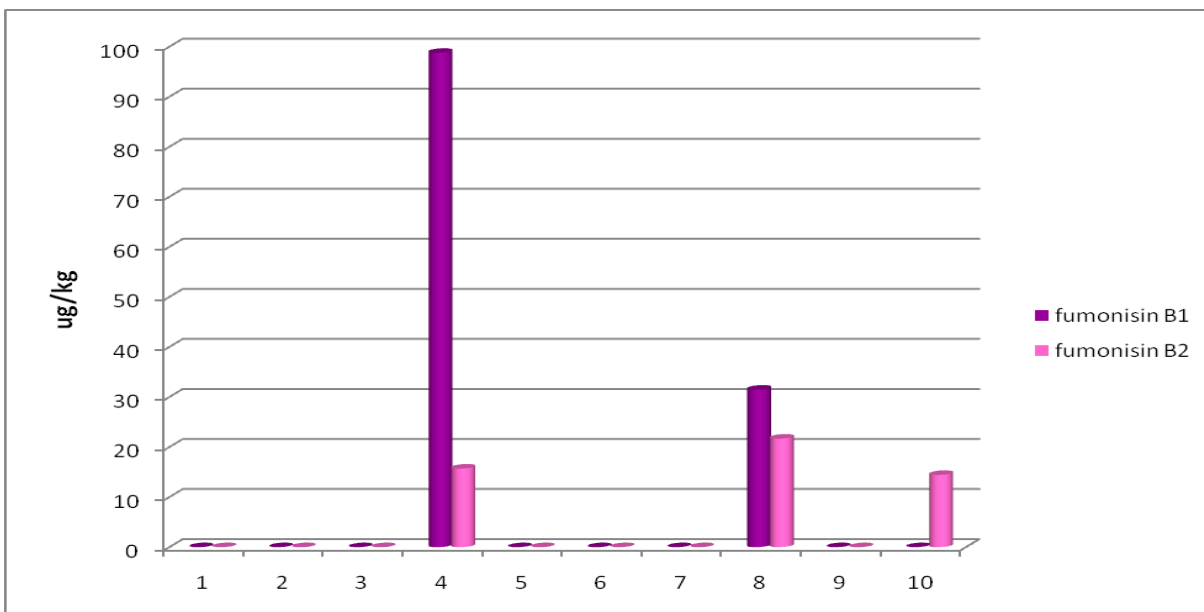
Obr. 29: Hladiny alternariolmethyleteru ve vzorcích siláží, senáží a krmiv ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



Obr. 30: Hladiny roquefortinu C ve vzorcích siláží, senáží a krmiv ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

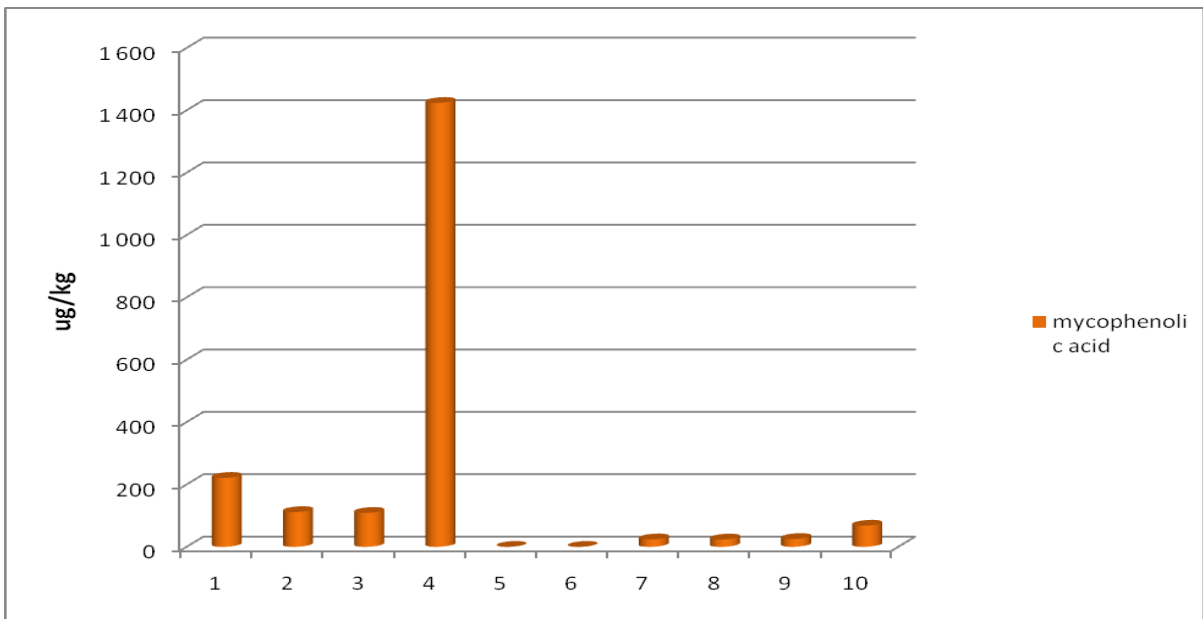


Obr. 31: Hladiny enniatinů B, B1 a beauvericinu ve vzorcích siláží, senáží a krmiv (µg/kg)



Obr. 32: Hladiny fumonisinů B1 a B2 ve vzorcích siláží, senáží a krmiv (µg/kg)





**Obr. 33: Hladiny penicilové a mykofenolové kyseliny ve vzorcích siláží, senáží a krmiv ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )**

## 6. Závěr

Mykotoxinová kontaminace zemědělských komodit určených jak pro potravinářské zpracování, tak také krmných surovin je závažným celosvětovým problémem. Dokládá to fakt, že EFSA - dozorčí organizace nad bezpečností potravin neustále žádá o nová data v této problematice. K minimalizaci mykotoxinové kontaminace potravin a krmiv je potřeba začít už od prvovýroby, tedy dodržováním správné zemědělské praxe (GAP - Good Agricultural Practice). Výsledky nejnovějšího výzkumu týkajícího se mykotoxikologické kvality potravin a krmiv byly dokumentovány v případových studiích předkládaného projektu. Byl zde zhodnocen výskyt mykotoxinů a hladiny jejich kontaminace v lahvových pivech dostupných na českém trhu v roce 2010 (více než 81 % incidence mykotoxinu DON a 98 % D3G) a dynamika volných a vázaných trichothecenových mykotoxinů v průběhu vaření piva (bilanční nárůst DON a jeho konjugované formy D3G, který je připisován uvolňování DON i jeho maskované formy vlivem enzymatických procesů v průběhu technologie). Volné a vázané trichothecenové mykotoxiny byly sledovány i v průběhu mlynářství a pekárenství. Na rozdíl od pivovarské technologie, zde k tak markantním nárůstům mykotoxinů nedochází. Kromě dynamiky trichothecenových mykotoxinů byl diskutován také osud nových „emerging“ mykotoxinů během sladování a pivovarování. Na rozdíl od DON a D3G, nedochází k uvolňování enniatinů v průběhu těchto technologií a díky jejich malé rozpustnosti ve vodě nepřecházejí do piva, ale zůstávají v odpadním produktu – mlátě. Dále byla zhodnocena incidence mykotoxinů v pekárenských výrobcích a moukách na českém trhu. Celkově se dá shrnout, že nejfrekventovanějším mykotoxinovým kontaminantem jsou DON a D3G. Z celkového počtu 30 vzorků kusového pečiva přesahoval DON hygienický limit 500 µg/kg pro pečivo jeden vzorek (1881/2006/ES). Vedle maskovaného D3G byly v pivu a sladu identifikovány také polyglykosidy DON, které vznikají pravděpodobně štěpením škrobu se zabudovaným DON.

Je však nutno zdůraznit, že kontaminace mykotoxiny je velice závažná hlavně v potravinách určených pro děti, protože ty ještě nemají dokonale vyvinutý detoxifikační potenciál. V souvislosti se vzrůstající poptávkou po zdravých a kvalitních potravinách živočišného původu začala být pozornost soustředěna také na nutriční složení a hygienicko-toxikologickou nezávadnost krmiv, která je obzvláště důležitá z hlediska transferu

metabolitů mykotoxinů do živočišných produktů. Efektivní a rychlou kontrolu těchto potravin a krmiv umožňují moderní citlivé multidetekční metody, na jejichž vývoj a optimalizaci je oprávněně kladen stále větší důraz. Tato studie by měla sloužit všem pracovníkům státních dozorčích orgánů i průmyslového zpracování potravin a krmiv, jichž se problematika bezpečnosti potravin a krmiv dotýká, a kteří mají možnost ji ovlivnit.

## 7. Literatura

- (1) Hajšlová J., Zachariášová M., Malachová A., Kostelanská M. a Kocourek V.: Nebezpečí maskovaných mykotoxinů, dostupné na <http://www.phytopsanitary.org/?link=cs/projekty/2009/>, (2009).
- (2) Verstraete F, EU food safety legislation with focus on contaminants: Challenges for food research, in Food Research in Support to Science – Base Regulations: Challenges for Producers and Customers. 21-22th April, Prague (2009).
- (3) Jestoi M., Rokka M., Jarvenpaa E., Peltonen K.: Determination of Fusarium mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A1, B, B1) in eggs of laying hens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Food Chem., 115 (3), 1120 – 1127 (2009).
- (4) Gutleb. A.C., Morrison E., Murk A.J.: Cytotoxicity assays for mycotoxin produced by Fusarium strains: A review, Env. Tox. and Pharm., 11, 309-320 (2002).
- (5) Hussein H.S., Brasel J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, Tox.Lett., 167, 101-134 (2001)
- (6) Placinta C.M., D’Mello J.P.F., Macdonald A.M.C: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins, An. Feed Sc. and Tech, 78, 21-39 (1999).
- (7) He J., Zhou T., Young J.C., Boland G.J., Scott P.M.: Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecenes mycotoxins in animal and human chain: A review, Tr. in Food Sc. & Tech, 1-10 (2009)
- (8) Kushiro M.: Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat, Int. J. Mol. Sci., 9, 2127-2145 (2009)
- (9) Larsen J.C., Hunt J., Perrin I., Ruckebauer P.: Workshop on trichothecenes with focus on DON: summary report, Tox. Lett., 153, 1-22 (2004).
- (10) National research council (U.S.): Protection against trichothecene mycotoxins, National Academy Press ISBN 0309034302, (1983).
- (11) EFSA call, informace dostupné na <http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/datex100729.htm> (2009)

- (12) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; Official Journal of the European Union, 2006, 5–24 (2006).
- (13) Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxin in maize and maize products; Official Journal of the European Union (2007)
- (14) Sorensen J. L., Nielsen K. F., Rasmussen P. H., Thrane U.: Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56 (21), 10439-10443 (2008).
- (15) Meca G., Zinedine A., Blesa J., Font G., Manes J.: Further data on the presence of Fusarium emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on Spanish markets. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1412 – 1416 (2010).
- (16) Munkvold G., Stahr H.M., Logriego A., Moretti A. and Ritieni A.: Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in Fusarium-contaminated livestock feed on Iowa, *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3923-3926, (1998).
- (17) Berthiller F., Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R.: Chromatographic methods for simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals, *Int. J. of Food Mic.*, 119, 33-37 (2007)
- (18) Berthiller F., Schuhmacher R., Adam G., Krska R.: Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, 1243-1252 (2009).
- (19) Berthiller F., Dall'Asta Ch., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R.: Masked mycotoxins: Determination of deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography - tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3421-3425 (2005).
- (20) Young J.C., Fulcher R.G., Hayhoe J.H., Scott P.M., Dexter J.E.: Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats, *J. Agric. Food Chem.*, 32, 659-664 (1984).

- (21) Lancová K., Hajšlová J., Poustka J., Krplová A., Zachariášová M., Dostálek P., Sachambula L.: Transfer of *Fusarium* mycotoxins and „masked“ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barely through malt to beer. *Food. Addit. Contam.*, 25 (6), 732-744, 2008.
- (22) Hajšlová J.: *Fusarium* mycotoxins: Transfer from field barley through malt to beer, 12th international symposium on mycotoxins and phytotoxins, Istanbul (2007).
- (23) Barug D. et al.: *The mycotoxin factbook, food and feed topics*, Wageningen Academic Publishers, ISBN-10: 90-8686-006-0, ISBN-13: 978-90-8686-006-7 (2004).
- (24) Dijksterhuis J., Samson R.A.: *Food Mycology, A multifaceted Approach to Fungi and Food*, CRC Press (Taylor & Farncis Group), ISBN 0849398185 (2007).
- (25) Wiederborner M.: *Encyklopedia of Food Mycotoxins*, Springer Verlag, (2001).
- (26) Bentley R.: Mycophenolic acid: A one hundred Odyssey from antibiotik to immunosuppressant, *Chem. Rev.* 100, 3801-3825 (2000).
- (27) Zdravotní ústavy se sídlem v Hradci Králové, Pardubicích a Liberci; staženo na stránkách Zdravotního ústavu se sídlem v Pardubicích dne 9.2.2010: <http://www.zupu.cz>
- (28) Oveisi M., Jannat B., Sadeghi N., Hajimahmoodi M., Nikzad A.: Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran; *Food Control*, 18, 1216–1218 (2007).
- (29) Commission Regulation (EC) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A; *Off. J. Eur. Commun.*, 7–8 (2010).
- (30) Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins; *Off. J. Eur. Commun.*, 8-12 (2010).
- (31) Kostelanska M., Hajslova J., Zachariasova M., Malachova A., Kalachova K., Poustka J., Fiala J., Scott P.M., Berthiller F., Krska R.: Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates, *J. Agric. Food. Chem.*, 57 (8), 3187-3194 (2009).
- (32) Kosař K., Procházka S.: *Technologie výroby sladu a piva*, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, ISBN 8090265863 (2000).

- (33) Lešnik M., Cencič A., Vajs S., Simončič A.: Milling and breadbaking techniques significantly affect the mycotoxin (nivalenol and deoxynivalenol) level in bread, *Acta Alim.*, 37, 471-483 (2008).
- (34) Pacin A., Ciancio Bovier E., Cano G., Taglieri D., Hernandez Pezzani D.: Effect of bread making process on wheat flour contaminated by the deoxynivalenol and exposure estimate, *Food Control*, 21, 492-495 (2009).
- (35) Neira M.S., Pacin A.M., Martínez E.J., Moltó G., Resnik S.L.: The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination, *Int. J. of Food Mic.*, 37,: 21-25 (1997).
- (36) Samar M., Resnik S.L., Gonzáles H.H.L., Pacin A.M., Castillo M.D.: Doexynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers, *Food Control*, 18, 1295-1299 (2007).
- (37) Panini, N.V., Bertolino, F.A., Salinas, E., Messina, G.A., Raba, J. Zearalenone determination in corn silage samples using an immunosensor in a continuous-flow/stopped-flow systéme, *Biochem. Eng. J.*, 51, 7-13 (2010).
- (38) Potkanski, A., Grajewski, J., Twaruzek, M., Selwet, M., Miklaszewska, B., Blajet-Kosicka, A., Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., Raczkowska-Werwinska, K. Chemical composition, fungal microflora and mycotoxin content in maize silages infected by smut (*Ustilago maydis*) and the effect of biological and chemical additives on silage aerobic stability. *J. Anim. Feed. Sci.* 19(1), 130-142 (2010).
- (39) Zachariasova M., Lacina O., Malachova A., Kostelanska M., Poustka J., Godula M., Hajslova J.: Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 662, 51–61 (2010)
- (40) Hajslova J., Zachariasova M., Godula M. Analytical challenges in determining 'masked' mycotoxins in foodstuffs. 124th AOAC annual meeting and exposition. Orlando, USA, September 26-30 (2010).
- (41) Berthiller F, Dall'Asta Ch, Corradiani R, Marchelli R, Sulyok M, Krska R and Adam G, Occurence of deoxynivalenol and its 3-β-D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit Contam A* 26: 507-511 (2009).
- (42) Lemmens M., Schulz U., Berthiller F., Dall'Asta C., Koutnik A., Schuhmacher R., Adam G., Buerstmayr H., Mesterházy A., Krska R. and Ruckebauer P.: The

Ability to Detoxify the Mycotoxin Deoxynivalenol Colocalizes With a Major Quantitative Trait Locus for Fusarium Head Blight Resistance in Wheat, *The Am. Phytopath. Soc.*, 18 (12), 1318-1324 (2005).

- (43) Bretz M., Beyer M., Cramer B., Knecht A., Humpf H.-U.: Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6445-6451 (2006).