

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Markéta Koubová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemická detekce mykotoxinů

Markéta Koubová

Bakalářská práce

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta KOUBOVÁ**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**

Název tématu: **Elektrochemická detekce mykotoxinů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :


- 1) Charakterizujte nejsledovanější mikrobiální toxiny. Zaměřte se na toxiny plísní a zpracujte přehled nejdůležitějších mykotoxinů a jejich producentů.
- 2) Popište metody detekce a stanovení mykotoxinů.
- 3) Zaměřte se na použití biosenzorů pro detekci mykotoxinů - typy a jejich principy.
- 4) Uveďte konkrétní příklady elektrochemických biosenzorů využitelných pro detekci nejdůležitějších mykotoxinů.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jarmila Vytřasová, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Petra Šněvajsová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**
Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**


prof. Ing. Petr Lošák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25. 6. 2009

Markéta Koubová

SOUHRN

První část bakalářské práce je zaměřena na bakteriální toxiny. Jsou zde uvedeny hlavní toxiny a jejich producenti ohrožující zdraví člověka a zvířat.

Ve druhé části bakalářské práce jsou představeny hlavní toxiny produkované různými rody plísní. Jsou zde uvedeny potraviny, ve kterých se vyskytují a jejich vliv na zdraví člověka.

V závěrečné části práce jsou uvedeny metody pro stanovení nejdůležitějších mykotoxinů. Práce se zaměřuje především na použití elektrochemických biosenzorů.

Klíčová slova: bakteriální toxiny, mykotoxiny, elektrochemický biosenzor

SUMMARY

The first part of thesis is focused on bacterial toxins. There are summarized the main producers of toxins and their threat to human health and animals.

In the second part of thesis are presented the main toxins produced by different genera of fungi. Food in which fungi are occur are summarized and also their effect on human health.

In the final part of the work are given the most important methods for the determination of mycotoxins. It focuses on the use of electrochemical biosensors.

Keywords: bacterial toxins, mycotoxins, electrochemical biosensors

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Doc. Ing. Jarmile Vytřasové, CSc. za odborné vedení a pomoc při vypracování bakalářské práce, také bych chtěla poděkovat Ing. Petře Šnévajsové za připomínky a cenné rady.

Obsah:

1 Úvod	10
2 Toxin.....	11
3 Rozdělení toxinů.....	11
3.1 Toxiny produkované bakteriemi.....	11
3.1.1 Endotoxiny.....	11
3.1.2 Exotoxiny	11
3.1.2.1 Toxiny pronikající do tkání.....	12
3.1.2.2 Cytolysiny	12
3.1.2.3 Toxiny pronikající do buňky	14
3.1.2.4 Superantigen.....	17
3.2 Toxiny produkované plísněmi- mykotoxiny	19
3.2.1 Toxiny produkované plísní rodu <i>Aspergillus</i>	20
3.2.1.1 Aflatoxiny	20
3.2.1.2 Ochratoxin.....	26
3.2.1.3 Cyklopiazonová kyselina	28
3.2.1.4 Sterigmatocystiny	28
3.2.1.5 Dekontaminace a detoxikace.....	29
3.2.2 Toxiny produkované plísní rodu <i>Penicillium</i>	31
3.2.2.1 Patulin	31
3.2.2.2 Citreoviridín	32
3.2.2.3 Citrinin	32
3.2.2.4 Kyselina penicilová	33

3.2.2.5 PR toxin	34
3.2.3 Toxiny produkované plísní rodu <i>Fusarium</i>	34
3.2.3.1 Zearalenony.....	35
3.2.3.2 Deoxinivalenol	36
3.2.3.3 Fumonisinyl.....	37
4 Stanovení Mykotoxinů.....	37
4.1 Analytické metody.....	38
4.1.1 HPLC.....	38
4.1.2 Plynová chromatografie	38
4.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě.....	39
4.2 Screening metody	39
4.2.1 Metody založené na imunologických testech.....	39
4.2.1.1 ELISA.....	40
4.2.2 Biosenzory	41
4.2.2.1 Elektrochemické biosenzory	42
4.2.2.2 Optické biosenzory	44
4.2.2.3 Převodníky pro bioafinitní senzory	46
4.2.3 Příklady použití elektrochemických biosenzorů.....	46
5 Závěr	51
6. Literatura.....	52

1. Úvod

Kontaminace surovin při výrobě potravin a krmiv biologickými toxiny představuje vážné nebezpečí pro zdraví lidí, zvířat i životního prostředí. Bakteriální toxiny způsobují různá nebezpečná onemocnění a to od průjmů, zvracení, tonických křečí svalů až po paralýzy svalů. Mezi nejvíce potenciálně škodlivé toxiny patří mykotoxiny. Tyto plísňové metabolity jsou schopny vyvolávat toxické a karcinogenní účinky u člověka. Objevují se v hlavních potravinářských produktech, jako jsou obiloviny, ovoce, mléko aj. Proto je vynakládána velká snaha na rozvoj nových citlivějších metod pro jejich detekci.

Nové přístupy vyžadují rychlou detekci a sledování toxinů u klinických tekutin, vzorků životního prostředí, potravin a pitné vody za účelem urychlení vhodného protiopatření. Tradiční metody pro detekci těchto toxinů vyžadují nákladné vybavení a vyškolený specializovaný personál. Příznivé vlastnosti elektrochemických biosenzorů by mohli být vhodné pro nové rychlejší detekce pro jejich citlivost, jednoduchost, přenositelnost a nízké náklady na analýzy.

2. Toxin

Toxin může být definován jako látka, která vzniká syntézou v různých druzích rostlin, zvířat, nebo mikroorganismů, která je škodlivá pro jiný organismus [Turner a kol., 2009].

3. Rozdělení toxinů

3.1 Toxiny produkované bakteriemi

U bakterií rozlišujeme tzv. endotoxiny tj. toxiny vázané buňkou a exotoxiny tj. toxiny vylučované do prostředí [Šilhánková, 1995].

3.1.1 Endotoxiny

Lipopolysacharid (LPS zvaný též endotoxin nebo nepřesně O-antigen) je vázán ve vnější membráně gram-negativních bakterií, ale i cyanobakterií a snad i dalších bakterií. Endotoxin je zodpovědný za řadu biologických účinků, které jsou v korelaci s jeho strukturou: určuje antigenní vlastnosti bakterií, výrazné jsou jeho toxické až letální účinky, je pyrogenní, obvykle s charakteristickým dvouvlňovým průběhem tělesné teploty, výrazně ovlivňuje humorální i celulární imunitu, vyvolává lokální zánětlivou reakci, při vyšší koncentraci v krvi může vyvolat až endotoxinový šok [Julák, 2006].

3.1.2 Exotoxiny

Bakteriální exotoxiny jsou proteiny vylučované z bakteriálních buněk do okolí a schopné vazby na specifické receptory cílových buněk, které následně různými mechanismy poškozují. Jejich úloha v metabolismu vlastních bakterií není zcela jasná, velmi významné jsou naproti tomu v medicíně, neboť jsou mezi nimi nejsilnější a nejnebezpečnější ze všech známých toxických látek. Při klasifikaci exotoxinů podle mechanismu působení se rozlišují následující kategorie: toxiny pronikající do tkání, cytolysiny, toxiny pronikající do buňky. Zvláštní postavení mají superantigeny a několika mechanismy působící komplexní antraxový toxin [Julák, 2006].

3.1.2.1 Toxiny pronikající do tkání

Typickými příklady jsou hyaluronidasa, rozkládající mezibuněčný tmel a streptokinasa (fibrinolysin), rozkládající fibrin, které produkuje *Streptococcus pyogenes*, jakožto i kolagenasy a elastasy produkované klostridiiemi a *Pseudomonas aeruginosa* [Julák, 2006].

3.1.2.2 Cytolysiny

Mechanismus jejich působení je rozklad membránových fosfolipidů, kterým působí např. lecitinasa (fosfolipasa C) *Clostridium perfringens*, nebo sfingomyelinasa (hemolysin β) *Staphylococcus aureus* [Julák, 2006].

Clostridium perfringens lze rozdělit do pěti toxických typů (A, B, C, a D), podle produkce čtyř takzvaných hlavních toxinů, alfa (CTA), beta (CTB), epsilon (ETX) a jota (ITXA a ITXB). V organismu produkuje řadu dalších toxických extracelulárních molekul, které zahrnují beta 2 toxin (CPB2), enterotoxin (CPE), perfringolysin, colagenasu a další [Ferrarezi a kol., 2008].

Alfa toxin (α toxin) hlavní letální toxin *C. perfringens* je multifunkční fosfolipasa, produkovaná v různém množství téměř všemi izoláty *C. perfringens*. Způsobuje hydrolýzu membránových fosfolipidů u různých buněk, což má za následek lysis. Beta toxin (β toxin) je vysoce citlivý trypsinový protein. Epsilon toxin (ϵ toxin) je silný toxin odpovědný za letální enterotoxaemii u hospodářských zvířat [Gurjar a kol., 2008]. *Clostridium perfringens* jota toxin představuje jeden ze čtyř „hlavních“ letálních a dermonekrotických toxinů produkovaných touto všudypřítomnou anaerobní bakterií, a je složen ze dvou imunologicky odlišných proteinů [Stiles a kol., 2002]. Je známo, že jota toxin zvyšuje cévní propustnost, je dermonekrotický a usmrcující myši ve vyšších dávkách [Gurjar a kol., 2008].

Do skupiny toxinů vázajících se na cholesterol buněčných membrán za vzniku pórů patří např. pneumolysin *Streptococcus pneumoniae*, streptolysin O *Streptococcus pyogenes*, listeriolysin O *Listeria monocytogenes*, cereolysin O *Bacillus cereus* aj. [Julák, 2006].

Hemolytický toxin listeriolysin je už dlouho uznávaným důležitým faktorem virulence *Listeria monocytogenes*. Jsou to všudypřítomné gram-positivní mikroorganismy, které jsou odpovědné v jeho nejpřísnější podobě za meningoencefalitidu u zvířat a lidí [Leimeister-Wächter a kol., 1990].

Pneumolysin je multifunkční cytolysin. Patří do rodiny příbuzných thiol-aktivovaných toxinů syntetizovaných gram-positivními bakteriemi z různých rodů. Pneumolysin hraje důležitou roli především při pneumokokové pneumonii [Balachandran a kol., 2001].

Streptolysin 0 (SLO) je membránu poškozující proteinový toxin [Sekiya a kol., 1993]. Streptolysin O (SLO) ze *Streptococcus pyogenes* je jedním z nejlépe charakterizovaných thiol-aktivovaných toxinů a je často považován za prototyp této skupiny [Pinkney a kol., 1989].

Cereové toxiny

Bacillus cereus je znám především jako významný původce kažení potravin. Na počátku 20. století byla prokázána jeho schopnost produkovat toxiny způsobující dvě etiologicky odlišné formy alimentárních onemocnění (intoxikace): emetickou (vyvolávající zvracení) a diarrhogenní (vyvolávající průjmy) [Šrámová a kol., 2005].

Emetická forma onemocnění vzniká po konzumaci nízkomolekulárního toxinu. Jedná o termostabilní protein (odolává 121 °C po dobu 90 minut), produkováný v průběhu tvorby spor. Jeho účinek je obdobný stafylokokovým enterotoxinům. Inkubační doba se pohybuje od 1-6 hodin po konzumaci kontaminované potravin. Klinické příznaky zahrnují nevolnost, zvracení a pocit neklidu. Komplikace jsou vzácné, k uzdravení dochází zpravidla do 24 hodin [Šrámová a kol., 2005].

Diarrhogenní formu onemocnění způsobuje enterotoxin, který vzniká v průběhu klíčení spor. Jedná se o termolabilní protein, který je inaktivován teplotou 45 °C. Jeho účinek je podobný choleroým toxinům. Inkubační doba je 8-16 hodin. Klinické příznaky zahrnují abdominální bolesti, křeče a silný vodnatý průjem, zvracení a horečka se objevují vzácně. K uzdravení dochází do 24 hodin. U rizikových skupin (oslabení a staří jedinci) může při těžkém průjmu docházet k dehydrataci organismu [Šrámová a kol., 2005].

Riziko otravy spočívá v požití kontaminovaných potravin nebo pokrmů, které byly po uvaření dlouhodobě skladovány za pokojových teplot. Pokrmy je nutné po uvaření udržovat při teplotě 60 °C nebo rychle zchladit či zamrazit. U emetické formy onemocnění jsou významným vehikulem rýže a další cereálie a těstoviny, mléčné pudinky a pasterovaná smetana. U diarrhogenní formy jsou to především masové a zeleninové pokrmy, polévky, omáčky, dušená masa a dezerty [Šrámová a kol., 2005].

3.1.2.3 Toxiny pronikající do buňky

Skládají se často z několika různých proteinových subjednotek, z nichž některé zajišťují adhezi a vazbu na buněčné receptory, další pronikají do buňky a ovlivňují její metabolismus. Ovlivněna přitom může být tvorba cAMP typickým zástupcem těchto toxinů je cholerový enterotoxin *Vibrio cholerae*. Stejným mechanismem působí i termolabilní enterotoxin enterotoxických kmenů *Escherichia coli*, metabolismus cAMP ovlivňuje i perkusový toxin *Bordetella pertusis*. Odlišným mechanismem působí toxiny pronikající do buněk nervové tkáně (neurotoxiny) [Julák, 2006].

- Cholerový toxin

Toxigenní kmeny *Vibrio cholerae* mohou produkovat řadu toxinů jako faktorů virulence. Nejvýznamnějším toxinem je cholerový enterotoxin (cholerový toxin, CT, dříve též cholergen) [Julák, 2006]. Patogenní *Vibrio cholerae* způsobují nemoci kolonizující lidské tenké střevo, kde produkují silný enterotoxin [Herrington a kol., 1988]. *Vibrio cholerae* produkuje enterotoxin, který se při uvolnění do organismu rychle váže na střevní povrch sliznice [Strombeck a Harrold, 1975].

- Enterotoxiny *Escherichia coli*

Kmeny, které produkují enterotoxiny a jsou spojeny s průjmem u turistů, kojenců a dětí v rozvojových zemích se označují enterotoxigenní *E.coli* (ETEC). Kmeny, které nevytvářejí enterotoxiny a jsou obvykle spojeny s infantilní gastroenteritidou v rozvinutém světě se označují enteropatogenní *E.coli* (EPEC). *E coli* spojené s onemocněním úplavice, jsou označeny jako enteroinvasivní (EIEC), přičemž ty, které jsou spojeny s haemorrhagickou kolitidou a HUS (hemolytický-uremický syndrom) se označují Vero-cytotoxiny-produkující *E.coli* (VTEC), nebo enterohaemorrhagické *E.coli* (EHEC) [Sussaman, 1997].

Enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*

Enteropatogenní kmeny EPEC, zvané též dyspeptické nebo enteroadherentní, neprodukují enterotoxiny, ale jsou schopny pevné vazby na povrch buněk epitelu tlustého střeva pomocí antigeních adhesinů zvaných bundleforming pilus (BFP) [Julák, 2006].

Enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*

Enterotoxigenní kmeny ETEC nejsou invazivní a jsou charakterizovány produkcí enterotoxinů. Mají též zvláštní pili, zvané colonization-factor antigens (CFA) [Julák, 2006]. CFA vzájemně reagují s receptory na hostitelské střevní epitelové buňky, což umožňuje přilnavost ETEC na střevní sliznice [Güereña –Burgueño a kol., 2002].

Enterotoxiny mohou být různých typů a zhruba se rozlišují na termostabilní nízkomolekulární enterotoxiny typu ST, a termolabilní, dvěma jednotkami tvořené enterotoxiny typu LT, které mají větší molekulovou hmotnost a jsou imunogenní [Julák, 2006].

Odhaduje se, že je 7,5 milionů případů těžkých průjmů a 400 000 úmrtí ročně na celém světě u kojenců a dětí způsobeno enterotoxigenní *E. coli* (ETEC). ETEC je nejčastější příčinou akutních průjmových onemocnění mezi cestovateli do rozvojových zemí a ETEC je stále velkým problémem pro vojenský personál rozmístěný v těchto zemích [Güereña –Burgueño a kol. 2002].

Enteroinvasivní kmeny *Escherichia coli*

Enteroinvasivní kmeny (EIEC), zvané též Shigella-like, se podobají shigellám např. tím, že nemají bičíky, respektive H-antigeny a jsou nepohyblivé, podobný je i mechanismus a průběh onemocnění [Julák, 2006].

Enterohaemorrhagické kmeny *Escherichia coli*

Nejdůležitějším charakteristickým virulentním rysem kmene EHEC je jeho schopnost vytvářet a uvolňovat cytotoxiny, známé jako verotoxiny, protože jejich vliv na Vero buňky je cytotoxický, nebo jako Shiga toxiny (STX) z důvodu příbuznosti s toxiny z *Shigella dysenteriae*. Toxin lze rozdělit do dvou hlavních skupin: Stx1 (což je téměř totožný s STX produkovaným *Shigella dysenteriae*) a Stx2 [Orth a kol., 2009]. Infekční dávka EHEC je velmi malá (jen několik desítek bakterií), zdrojem infekce je nejčastěji infikované a nedostatečně tepelně opracované hovězí maso, ale i mléko a další potraviny. Bakterie adherují na epitelové buňky tlustého střeva, do kterých rychle pronikají a vyvolávají akutní zánětlivou reakci spojenou s destrukcí tkáně, projevující se vodnatými průjmy s příměsí krve a částí odlouplého epitelu. Bakterie často pronikají do hlubších tkání a krevního oběhu,

generalizace vede k hemolyticko-uremickému syndromu (HUS), charakterizovanému trombocytopenií, hemolytickou anemií a selháváním ledvin [Julák, 2006].

- Toxiny produkované bakteriemi rodu *Shigella*

Shigella (Shiga) toxin je proteinový exotoxin produkováný *Shigella dysenteriae* typu 1 a dalšími členy rodu *Shigella* a může být důležitým faktorem při bakteriální virulenci úplavici člověka [Lindberg a kol., 1987]. Blízce příbuzný toxin produkují i enterohaemorrhagické kmeny *Escherichia coli*. Produkují toxin zvaný Shiga-like toxin nebo Vero-toxin. *Shigella* dále produkují různé enterotoxiny, např. u *Shigella flexneri* byly prokázány enterotoxiny označované ShET1 a ShET2; zvláště druhý z nich se vyskytuje i u ostatních druhů rodu *Shigella*, kde je jeho produkce kódována na plasmidech [Julák, 2006].

Shigella toxin je zvláště zajímavý, protože několik různých biologických účinků je zprostředkováno stejnými vysoce čistými molekulami [Jacewicz a kol., 1986]. Shiga toxin, uvolňovaný z lýzovaných buněk *Shigella dysenteriae* sérovar 1, působí jako enterotoxin (na kličce králičího střeva), jako neurotoxin (na myších) a jako cytotoxin (na buněčných kulturách buněk Hela a Vero) [Julák, 2006].

- Pertusový toxin

Nejvýznamějším toxinem bordetel je pertusový toxin s výjimečnými vlastnostmi [Julák, 2006]. Skládá se z pěti různých subjednotek, pojmenovaných S1 až S5 podle jejich klesající molekulové hmotnosti [Alouf a Popoff, 2006]. Pět subjednotek tvoří kruh, který se naváže na povrch buňky a transportuje do ní aktivní katalytickou subjednotku S1, tj. ADP-ribosyltransferasu. Podstatou mechanismu jejího působení na epitelální buňky je vazba na regulační protein G1 vázaný na buněčné membráně, který zajišťuje inhibici adenylátcykly a sekreci velkého množství hlenu [Julák, 2006].

- Neurotoxiny

Neurotoxická klostridia *Clostridium tetani* a *Clostridium botulinum* produkují velmi účinné neurotoxiny tetanospasmin a botulotoxin [Julák, 2006].

Nejúčinnějším neurotoxinem je botulotoxin, produkováný bakterií *Clostridium botulinum* [Šilhánková, 1995]. Je původcem botulismu což je otrava z potravy, v níž byl přítomen botulotoxin, také nazývaný jako klobásový jed. Botulotoxin působí na nervový systém, dochází k přerušení vedení nervových vzruchů a vnikají chabé

obrnny [Ryšková, 2007]. Alimentární onemocnění, resp. otravy botulotoxinem jsou dodnes pro vznik botulismu typické, zdrojem nákazy jsou zejména podomácku připravované konzervované potraviny, a to nejen masové, ale i zeleninové konzervy, kompoty a jiné, jakožto i nevhodně uchovávané a nedostatečně tepelně upravené zbytky potravin [Julák, 2006].

Další formou onemocnění je tzv. kojenecký botulismus, při němž se v tlustém střevu kojenců do 9 měsíců, kteří ještě nemají vyvinutou ochrannou střevní mikroflóru, mohou klostridia přemnožit a produkovat toxin [Julák, 2006].

Tetanospasmin vede ke klinickému syndromu tetanu [Cook a kol., 2001]. K infekci dochází typickým poraněním a kontaminací půdou, vzácně je možná i endogenní infekce z osídlení střeva nebo vagíny [Julák, 2006]. Tetanus je dnes vzácná choroba v rozvinutých zemích. Nicméně je i nadále významnou příčinou úmrtí na celém světě a je spojena s případy vysoké úmrtnosti, zejména v rozvojových zemích [Cook a kol., 2001].

3.1.2.4 Superantigen

Superantigeny (SAGs) jsou bakteriální a virové proteiny, které mají schopnost aktivovat velkou část T-lymfocytů. Pro superantigeny jsou nejcharakterističtější stafylokokové enterotoxiny [Schad a kol., 1995].

Superantigeny vyvolávají řadu závažných onemocnění nebo se na nich podílejí, jako je syndrom toxického šoku, toxické epidermolýzy, spála, arthritida, revmatická horečka aj. [Julák, 2006].

- Stafylokokové enterotoxiny

Stafylokokové enterotoxiny (SE) tvoří skupinu strukturně příbuzných, ale sérologicky odlišných proteinů produkovaných některými kmeny *Staphylococcus aureus* [Fleischer a Schrezenmeier, 1988]. *S. aureus* může produkovat velké množství různých enterotoxinů (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R a U), ale 95 % otrav jsou způsobeny klasickými enterotoxiny: A, B, C, D a E. Stafylokokové enterotoxiny jsou termostabilní a také odolné vůči gastrointestinálním proteasám jako je pepsin. Nejčastěji produkováný je enterotoxin A. [Pelisser a kol., 2009]

SE jsou nejčastější příčinou otravy člověka potravinami. Kromě toho jsou SE nejúčinnější známé mitogeny efektivně stimulující lidské nebo myší lymfocyty v koncentraci menší 10^{-9} M. [Fleischer a Schrezenmeier, 1988].

Ukázalo se, že SEA má schopnost vázat zinek, což má zásadní význam pro jeho interakci s hlavním histokompatibilitním komplexem MHC II třídy [Schad a kol., 1995].

SEB byly zobrazeny jako vázající nezpracované bílkoviny hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) II. třídy na molekule antigen-prezentujících buněk a následně aktivace T- buněk prostřednictvím interakce s variabilní částí T-buněčného receptoru β -řetězce. To má za následek, aktivaci 2-15% všech T-buněk, což v konečném důsledku vede k rozšířené produkci cytokinů stejně jako vyjádření cytotoxické aktivity [Schad a kol., 1995].

- Antraxový toxin

Antraxový toxin je jedním ze dvou dominantních faktorů virulence produkovaný *Bacillus anthracis*. Tento toxin je složen ze tří podjednotek; edemogenní faktor (EF), letální faktor (LF) a protektivní antigen (PA). EF je kalmodulin-dependentní adenylátcyklasa zvyšující intracelulární hladinu cAMP [Abrami a kol., 2003]. LF je komplex zinek-dependentních proteas, jejichž proteolytickou aktivitou jsou destruovány buňky a uvolňovány mediátory zánětu. PA je schopen se vázat na plasmatickou membránu eukaryotních buněk a tvořit komplexy s faktory EF a LF [Julák, 2006].

Tyto tři komponenty toxinů nemají žádné známé biologické účinky při podávání samostatně na pokusných zvířatech, ale působí-li v binární kombinaci, vyvolávají dvě odlišné reakce [Blaustein a kol., 1989]. Letální faktor (LF) s ochranným antigenem (PA), společně označovány jako letální toxin (LT), rychle vytváří plicní edém a smrt u potkanů a jiných zvířat. Edemogenní faktor (EF) a PA, kombinací určeného edém toxinu, způsobuje otoky [Klimpel a kol., 1994].

3.2 Toxiny produkované plísněmi- mykotoxiny

Název mykotoxin je kombinací řeckého slova houba 'mykes' a latinského slova „toxicum” jed [Turner a kol., 2009]. Mykotoxiny jsou sekundární metabolity hub toxické pro bakteriální, rostlinné, houbové nebo živočišné buňky, které vyvolávají toxické reakce tzv. mykotoxikózy a jsou příčinou různých onemocnění od alergických reakcí přes imunosupresivní účinky až po vznik karcinomu [Lisalová a Machariková, 2005]. Všechny mykotoxiny jsou nízkomolekulární přírodní látky [Richard a kol., 2009]. Mezi nejvýznamnější toxigenní mikromycety patří zástupci rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* [Lisalová a Machariková, 2005].

V současné době je známo přes 300 mykotoxinů a nadále jsou objevovány a chemicky charakterizovány nové [Stehlíková, 2007].

Mykotoxiny představují zvýšené zdravotní riziko v potravinářském průmyslu, zejména pokud jde o zpracování ořechů, arašíd, a kukuřice. Mykotoxiny jsou také hrozbou bioterorismu [Pohanka a kol., 2007].

Tvorba mykotoxinů je podmíněna biologickými a chemickými faktory. Obsah mykotoxinů pak závisí na následujících faktorech: vlhkosti, teplotě, délce skladování, poškození obalu zrna, přítomnost kyslíku, oxidu uhličitého, složení substrátu, mykologickém profilu toxinogenních vláknitých mikromycetů, sporulaci, mikrobiálních interakcích a přítomností hmyzu [Mrkvicová, 2007].

Mykotoxiny patří celosvětově k významným toxinům přírodního původu s akutními, chronickými, ale i pozdními toxickými účinky. Dělí se podle míry akutní toxicity na silně toxické (aflatoxiny, ochratoxin A, T-2 toxin), středně toxické (citrinin, sterigmatocystin), slabě toxické (trichotheceny, zearalenon). Mykotoxiny můžeme dělit dále podle toxicity k cílovým orgánům na dermatotoxiny, genotoxiny, hematotoxiny, hepatotoxiny, imunotoxiny, neurotoxiny, toxiny gastrointestinálního traktu aj. Další dělení je možné podle biologických účinků, podle účinků na buněčné úrovni atd. [Mrkvicová, 2007].

3.2.1 Toxiny produkované plísní rodu *Aspergillus*

3.2.1.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou bezesporu nejstudovanější a nejlépe prozkoumanou skupinou mykotoxinů [Patočka, 2004]. Objev aflatoxinu byl výsledkem hledání příčin výskytu onemocnění drůbeže („Turkey X disease“) v Anglii roku 1960, které způsobilo uhynutí desetitisíc mladých krůt, bažantů a kachen [Betina, 1990]. Tenkovrstvou chromatografií se tento aflatoxin rozdělil na čtyři složky: dvě měly modrou fluorescenci a dostaly označení aflatoxin B1 a B2 další dvě fluoreskovaly tyrkysově a dostaly označení aflatoxin G1 a G2 [Betina, 1990]. Jedná se o skupinu chemicky příbuzných látek s difuranokumarinovým skeletem, z nichž nejznámější jsou aflatoxiny B1 a G1 [Patočka, 2004].

Aflatoxiny patří mezi významné toxiny přírodního původu, což jsou toxické sekundární metabolity toxinogenních vláknitých mikromycetů (plísní) rodu *Aspergillus* (např. *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* a *A. tamarii*), které se běžně vyskytují na celém světě [Malíř a Ostrý, 2004]. *Aspergillus flavus* produkuje aflatoxin B1 a aflatoxin B2 [Yu a kol., 2004]. *Aspergillus flavus* může růst v rozmezí teplot (10-45 °C), optimální teplota je 30 °C. Jelikož je požadovaná relativní vlhkost 80%, je kontaminace aflatoxinem spíše problémem v oblasti vlhkých tropů [Parker a Tothill, 2009]. *Aspergillus parasiticus* produkuje aflatoxin B1, G1, B2 a G2 [Yu a kol., 2004]. V extraktech z mléka krav krměných podzemnicovou moučkou se izolovaly další dva aflatoxiny – aflatoxin M1 a M2. Aflatoxiny P1 a Q1 jsou metabolity aflatoxinu B1 [Betina, 1990].

Aflatoxiny představují závažné riziko pro zdraví člověka i jiných živých organismů, a to zvláště prostřednictvím potravního řetězce, do kterého vstupují jako častý kontaminant potravin a krmiv [Malíř a Ostrý, 2004]. Aflatoxiny patří s ohledem na svoji extrémně vysokou toxicitu mezi nejvíce sledované mykotoxiny [Ježková a kol., 2007]. Aflatoxiny vykazují významnou hepatotoxicitu, imunotoxicitu, mutagenitu, karcinogenitu a teratogenitu. Toxicita aflatoxinů klesá v následujícím pořadí: aflatoxin B1 > aflatoxin M1 > aflatoxin G1 > aflatoxin B2 > aflatoxin G2 [Malíř a Ostrý, 2004].

Aflatoxin B1 byl klasifikován jako lidský karcinogen 1. skupiny a aflatoxiny G1, G2 a B2, patří do skupiny lidských karcinogenů [Owino a kol., 2008].

Kontaminace aflatoxinem byla spojena se zvýšenou úmrtností hospodářských zvířat. Výrazně snižuje hodnotu zrna jako i krmiv a zemědělských plodin [Bennet a Klich, 2003].

Hlavní komodity, které jsou nejčastěji kontaminovány aflatoxiny, jsou kukuřice, burské oříšky (arašídy), pistácie, paraořechy, různé druhy dalších ořechů a bavlníková semena

[Malíř a Ostrý, 2004]. Olivы a jejich deriváty, zejména olivový olej mohou být kontaminovány aflatoxiny, protože jsou často skladovány týdny v podmínkách, které podporují růst plísní. Vzhledem k tomu, že olivy a olivový olej jsou významnou a všudypřítomnou složkou ve středomořské stravě, může i nízká úroveň kontaminace představovat riziko pro veřejné zdraví [Rejeb a kol., 2009].

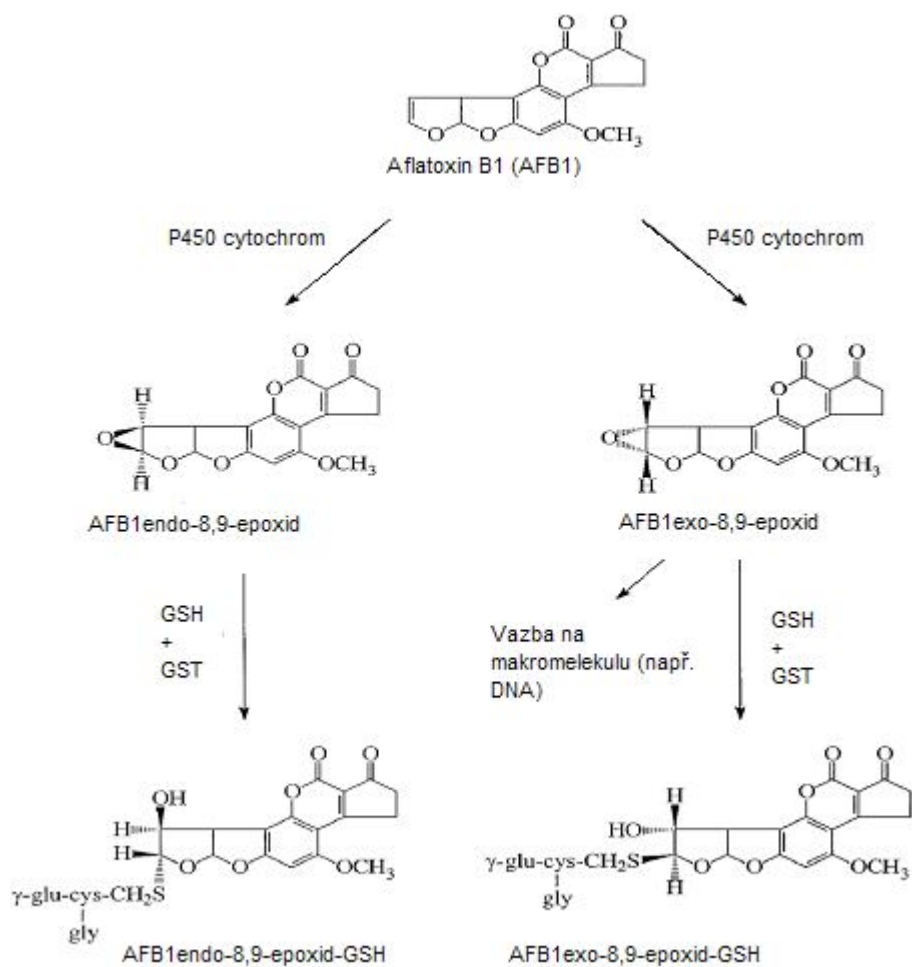
Míra "zaplísněnosti" suchých skořápkových plodů, podobně jako u jiných surovin a potravin závisí zejména na jejich stáří (tj. době, která uplynula od sklizně) a na podmínkách jejich skladování [Malíř a Ostrý, 2004].

Nejúčinnějším postupem, jak snížit kontaminaci potravinových surovin aflatoxiny, je aplikace preventivních opatření, které předchází sklizni zemědělských plodin [Malíř a Ostrý, 2004].

- Aflatoxin B₁ (AFB₁)

Cílovým orgánem účinku AFB₁ jsou játra [Patočka, 2004]. Mutagenita a karcinogenita AFB₁ je výsledkem především jeho cytochrom P450-zprostředkované bioaktivace na AFB₁-8,9-epoxid Obr. č. 1. [Loe a kol., 1997]. Tato epoxidová forma AFB₁ je velmi reaktivní a váže se na buněčné makromolekuly, bílkoviny RNA a DNA [Patočka, 2004]. Existují dva endo- a exo-stereoizomery z AFB₁-8,9-epoxidu, a přestože jsou oba produkovány v nejrůznějších tkáních, pouze exo-AFB₁-8,9-epoxid se efektivně váže na DNA a je schopen vyvolat přeměnu G-T in vitro [Loe a kol., 1997]. V případě DNA se váže preferenčně na pozici N7 -guaninu a vytváří stabilní adukt s touto bází, který je zodpovědný za mutagenní a karcinogenní účinky AFB₁ [Patočka, 2004].

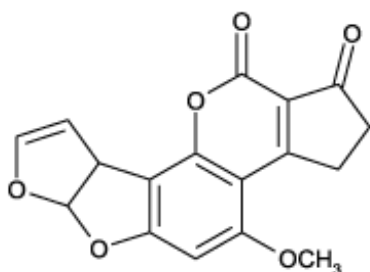
Obrázek č. 1. Biotransformace AFB1 na exo- a endo-epoxydy [Loe a kol., 1997]



Chemické a fyzikální vlastnosti AFB1[http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_B1.htm]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{12}O_6$

Strukturální vzorec:



Molekulová hmotnost: 312 g/mol

Popis: bílý prášek, modrá fluorescence

Rozpustnost: Může být rozpustný v DMSO (dimethylsulfoxidu) nebo methanolu

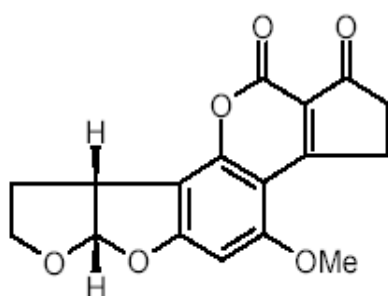
Bod tání: 267 °C

- Aflatoxin B₂ (AFB₂)

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_B2.htm]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₆

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 314 g/mol

Popis: bílý prášek, modrá fluorescence

Rozpustnost: v DMSO nebo metanolu

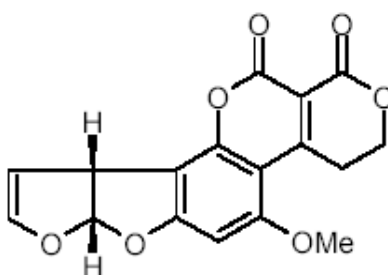
Bod tání: 303- 306 °C

- Aflatoxin G₁

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_G1.htm]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 328,3 g/mol

Popis: bílý prášek, modro-zelená fluorescence

Rozpustnost: v DMSO nebo methanolu

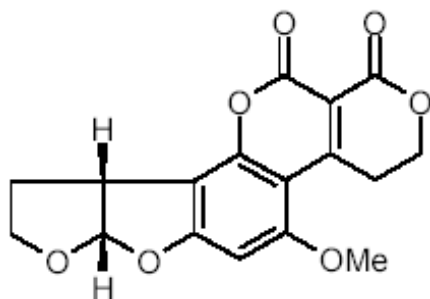
Bod tání: 257-259 °C

- Aflatoxin G2

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_G2.htm]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₇

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 330,3 g/mol

Popis: bílý prášek, modro-zelená fluorescence

Rozpustnost: v DMSO nebo methanolu

Bod tání: 237-240 °C

- Aflatoxin M1 (AFM1)

AFM1 byl nalezen v kravském mléce v roce 1960, jeho strukturální vzorec byl objasněn ale až v roce 1966 [Moravcová a Nedělník, 2005]. AFM1, byl zjištěn v lidské moči a může být užitečný ukazatel spotřeby AFB1 [Wise a kol., 1978].

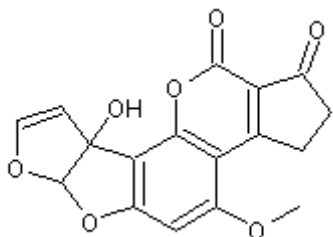
AFM1 je vázán na proteinovou složku mléka, proto v sýrech je většinou zaznamenávám vyšší obsah než v mléce. K expozici člověka dochází pitím mléka a konzumací mléčných výrobků. Významné mohou být expozice u dětí s vysokou spotřebou mléka, které mají relativně nízkou tělesnou hmotnost, výrazně vyšší buněčnou aktivitu a zatím nedostatečně vyvinutý imunitní systém [Moravcová a Nedělník, 2005].

AFM1 lze nalézt v mléčných výrobcích, jako jsou sýry, jogurty a počáteční kojenecká výživa a také v mateřském mléce [Parker a Tothill, 2009].

Chemické a fyzikální vlastnosti: [http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_M1.htm]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{12}O_7$

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 328 g/mol

Popis: bílý prášek, modro-fialová fluorescence

Rozpustnost: v DMSO, methanolu

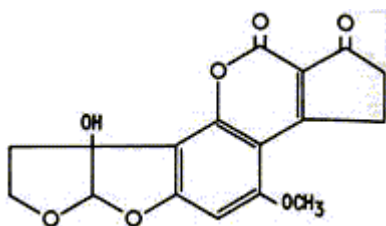
Bod tání: 299°C

- Aflatoxin M2

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_M2.htm]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}O_7$

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 330,29 g/mol

Popis: bílý prášek, modro-fialová fluorescence

Rozpustnost: v DMSO nebo metanolu

Bod tání: 293°C

3.2.1.2 Ochratoxin

Ochratoxin produkuje několik plísňí rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Ochratoxin byl poprvé objeven v roce 1965 jako metabolit hub, který jevil toxické účinky na zvířata [Turner a kol., 2009].

Ochratoxiny byly nalezeny jako metabolity z mnoha různých druhů rodu *Aspergillus*, včetně *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus* a *Aspergillus niger*. Protože *Aspergillus niger* se používá běžně při výrobě enzymů a kyseliny citronové k lidské spotřebě, je důležité, aby se zajistilo, že průmyslové kmeny budou neproduktivní [Bennett a Klich, 2003].

Do skupiny ochratoxinů patří ochratoxin A, B, C, D a α [Malíř a Ostrý, 2007].

- Ochratoxin A (OTA)

OTA je dobře známým nefrotoxickým mykotoxinem, který má také karcinogenní, teratogenní a imunotoxické vlastnosti [Bragulat a kol., 2008]. OTA narušuje buněčnou fyziologii mnoha způsoby, ale zdá se, že primární účinky jsou spojené s enzymy podílejícími se na metabolismu fenylalaninu, většinou zamezováním enzymu, jenž se podílí na syntéze tRNA komplexu z fenylalaninu [Bennett a Klich, 2003].

OTA vstupuje do enterohepatálního cyklu, který je zčásti odpovědný za dlouhý biologický poločas vylučování toxinu z organismu. Poločas vylučování OTA u člověka činí pravděpodobně 35 dní. OTA se chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Krevní cestou je OTA distribuován v organismu. Hlavními místy retence jsou ledviny, játra, varlata, střevo, rezervu pak tvoří svaly a tuková tkáň [Malíř a Ostrý, 2007].

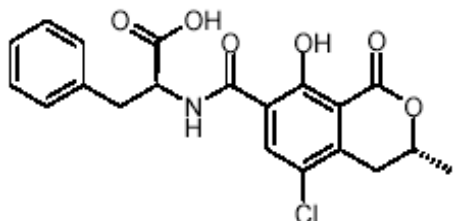
Přirozený výskyt OTA byl hlášen z mírného až tropické podnebí v různých potravinářských plodinách, jako jsou obiloviny, káva, sušené ovoce, víno a hroznová šťáva. Více OTA bylo nedávno objeveno v oblasti lidských a zvířecích tekutin, masu, pivu a vínu [Turner a kol., 2009].

Teplotní rozsah pro produkci OTA např. u *Aspergillus ochraceus* byl zjištěn v rozmezí 15 -37 °C, optimální teplota se pohybuje okolo 28 °C. V chladnějších oblastech je OTA produkován vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Penicillium*. Kmeny *Penicillium verrucosum* jsou schopny produkovat OTA již v rozmezí od 4 - 30 °C [Ostrý, 2005].

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/ochratoxin_A.htm]

Sumární vzorec: $C_{20}H_{18}ClNO_6$

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 403,8 g/mol

Popis: žluté krystaly, modrá fluorescence

Rozpustnost: DMSO, metanol, ethanol

Bod tání: 105-110 °C

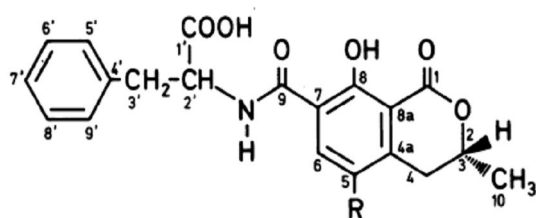
- Ochratoxin B (OTB)

OTB se liší strukturou od OTA v nepřítomnosti chloru na 5-pozici molekuly. Byl uváděn jako méně toxický než OTA [Størmer a kol., 1985].

Chemické a fyzikální vlastnosti

Sumární vzorec: $C_{20}H_{19}O_6N$

Strukturní vzorec: R=H [Størmer a kol., 1985]



Popis: bezbarvá krystalická látka [Betina, 1990]

Bod tání: 169°C z xylenu

3.2.1.3 Cyklopiazonová kyselina (CPA)

Kyselinu α -cyklopiazonovou izoloval Holzapfel z *Penicillium cyclopium* [Betina, 1990]. Produkce CPA byla následně zjištěna u *Penicillium patulum*, *P. viridicatum*, *P. puberulum*, *P. crustosum*, *P. camemberti*, *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *A. oryzae* [Dorner a kol., 1983].

Mnohé druhy *Penicillium*, které produkují CPA, byly izolovány z masa, jako je šunka, klobása a párky [Dorner a kol., 1983]. Přírodní výskyt toxinu v zemědělských plodinách byl poprvé zaznamenán v roce 1978, kdy v kukuřici, která byla kontaminována *A. flavus* bylo zjištěno, že obsahuje CPA [Dorner a kol., 1983].

Chemické a fyzikální vlastnosti

Popis: krystalizuje z metanolu v podobě bezbarvých jehliček [Betina, 1990]

Bod tání: 245-246°C

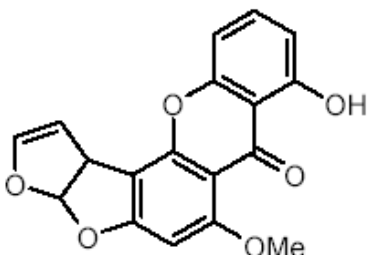
3.2.1.4 Sterigmatocystiny

Sterigmatocystiny produkují toxigenní kmeny *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus biolaris* [Betina, 1990]. Jejich účinky jsou velice podobné AFB₁, primárním místem účinku jsou játra. Podobné účinky jako sterigmatocystin mají i jeho deriváty, methylsterigmatocystin a dihydrosterigmatocystin. Jsou rovněž hepatotoxické, způsobují rakovinu jater a vyskytují se ve stejných potravinových zdrojích jako aflatoxiny [Patočka, 2004]. I když je známo, že sterigmatocystin je méně toxický než aflatoxin, v některých případech je uvedeno, že způsobuje u jater vyšší genotoxicitu [Yu a Leonard, 1995].

Chemické a fyzikální vlastnosti [<http://www.fermentek.co.il/sterigmatocystin.htm>]

Sumární vzorec: C₁₈H₁₂O₆

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 324,3 g/mol

Popis: světle žluté jehličky

Rozpustnost: DMSO, ethanol, aceton, methanol

Bod tání: 240-246°C

3.2.1.5 Dekontaminace a detoxikace

K dekontaminaci a detoxikaci jsou ve studii Malíře a Ostrého (2004) zabývající se zejména problematikou suchých skořápkových plodů doporučovány následující postupy:

- Fyzikální separační metody odstranění aflatoxinů a detoxikace

Mechanická separace (oddělení) - cílem postupu je oddělit zaplesnivělé a poškozené arašidy a pistácie od zjevně nepoškozených.

Třídění na základě měrné hmotnosti- Postup zahrnuje třídění např. jader a zrn pomocí flotace. Biologicky poškozené arašidy kontaminované aflatoxiny mají nižší měrnou hmotnost než jakostní a nepoškozené arašidy, a proto se ve vodě vznášejí.

Mokrý mletí- využívá se zejména pro dekontaminaci obilí, hlavně kukuřice a obilné mouky. Za výhodu při vlhkém mletí je považována možnost přidávání chemikálií.

Suché mletí – metoda byla otestována u kukuřice přirozeně kontaminované aflatoxiny, dále u rýže a u pšenice, kde došlo ke snížení koncentrace aflatoxinů až o 47 %. Nejvyšší hodnoty AFB1 při suchém mletí byly nalezeny v klíčcích a v otrubách.

- Fyzikální dekontaminace

Tepelná inaktivace- Aflatoxiny jsou relativně termostabilní, a proto se u nich tepelná inaktivace nepoužívá.

Záření- UV záření nevyvolalo žádnou viditelnou změnu fluorescence nebo toxicity testovaného vzorku arašídů. Bylo popsáno snížení koncentrace aflatoxinů v kontaminovaném arašídovém oleji po střídavé aplikaci krátkovlnného a dlouhovlnného UV záření. V testovaném arašídovém oleji však došlo po expozici UV záření ke zvýšení mutagenity.

Adsorpce z roztoků a kovalentní/nekovalentní vazba – k adsorpci se používá speciálních materiálů např. aktivního uhlí a aluminosilikátů. Byly použity např. pro dekontaminaci arašídového oleje a krmiva pro skot. Patří mezi vhodné metody

- Biologická dekontaminace

Testuje se metoda využití netoxigenního kmene ke snížení produkce aflatoxinů kmeny toxigenních hub. Bylo zjištěno, že některé kvasinky, plísně a bakterie mohou aflatoxiny modifikovat nebo inaktivovat. Bakterie rodu *Flavobacterium aurantiacum* syntézou odstraňují aflatoxiny z tekutého média, bylo prokázáno již i odstranění AFB₁ z kontaminovaného arašídového mléka

- Chemická inaktivace

Čpavkování- čpavek je vysoce účinný agens, které ovlivňuje toxicitu a karcinogenitu aflatoxinů v potravinových surovinách (např. v arašíděch, kukuřici, bavlníkových semenech). Nejúčinnější je při vysoké teplotě a tlaku. Čpavkování s využitím plynného čpavku nebo hydroxidu amonného za kontrolovaných podmínek dokázalo snížit hladinu aflatoxinů o více než 99 %. Studie prokázaly, že sloučeniny vzniklé po reakci aflatoxinů se čpavkem mají minimální nebo žádný vliv na zdraví zvířat, krmených kukuřicí, arašídami a bavlníkovým semenem, které obsahovaly aflatoxiny, ošetřené čpavkováním.

Chemická inaktivace kyselým siřičitanem sodným- vznikají ve vodě nerozpustné sloučeniny.

Ozonizace- plynný ozón rozložil a detoxikoval AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂

[Malíř a Ostrý, 2004]

3.2.2 Toxiny produkované plísní rodu *Penicillium*

3.2.2.1 Patulin

Patulin jako antibiotický metabolit *Penicillium patulum* objevili Anslow a kol., ale ještě před ním ho izolovali Chain a kol. pod názvem kaviformín z *P. claviforme* [Betina, 1990].

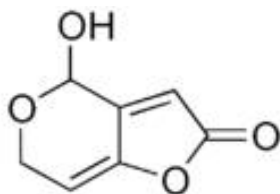
Patulin je sekundární metabolit hub, patřících do rodů *Penicillium*, *Aspergillus* a *Byssochyلامys* [McLaughli a kol., 2009]. Přestože byl patulin původně považován za antibiotikum, má nepříznivé účinky na zdraví [Özsoy a kol., 2008]. Patulin inhibuje syntézu RNA a proteosyntézu a je silně hepatotoxický [Patočka, 2004]. Výskyt, toxicita a karcinogenní vlastnosti patulinu ho řadí mezi významné mykotoxiny [Betina, 1990].

Mykotoxin se nachází jako kontaminant ovoce, především jablek a jablečných výrobků, ale byl také nalezen v zelenině, uskladněných sýrech a obilných produktech [McLaughli a kol., 2009].

Chemické a fyzikální vlastnosti [<http://www.fermentek.co.il/patulin.htm>]

Sumární vzorec: $C_7H_6O_5$

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 154,1 g/mol

Popis: Tvoří bezbarvé krystalky a je opticky aktivní.

Rozpustnost: Rozpustný je ve vodě, etanolu, acetonu, ethylacetátu, diethyléteru a v chloroformu. Nerozpustný je v benzenu a petroleji [Betina, 1990].

Bod tání: 110- 111°C

3.2.2.2 Citreoviridín

Tento polyenový cukerný derivát pyranonu sytě žluté barvy je produkt plísně *Penicillium citreoviride*, která roste velmi často na rýži a dodává jí charakteristickou žlutou barvu. Je proto znám také pod označením „yellowed rice toxin“ [Patočka, 2004]. Zjistilo se, že citreoviridín je silným inhibitorem aktivity mitochondriální ATPázy [Betina, 1990].

Chemické vlastnosti

Sumární vzorec: $C_{23}H_{30}O_6$

Molekulová hmotnost: 412 g/mol

Popis: Krystalizuje z methanolu, tvoří oranžovožluté jehličky [Betina, 1990].

Rozpustnost: Je rozpustný v benzenu, acetonu a v chloroformu, nerozpustný je v hexanu a vodě [Betina, 1990].

Bod tání: 110-111°C

3.2.2.3 Citrinin

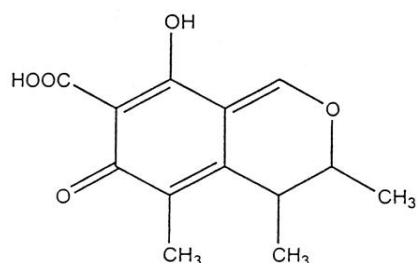
Citrinin je sekundární metabolit produkovaný několika druhy hub, které patří hlavně do rodu *Penicillium* a *Monascus* [Yu a kol., 2006]. Citrinin byl poprvé izolován z *Penicillium citrinum* před druhou světovou válkou, následně bylo uvedeno přes tucet druhů *Penicillium* a několik druhů rodu *Aspergillus* (např. *Aspergillus terreus* a *Aspergillus niveus*), včetně některých kmenů *Penicillium camemberti* (používané k výrobě sýrů) a *Aspergillus oryzae* (používané k výrobě sojové omáčky) [Bennett a Klich, 2003].

Poprvé byl uveden jako silné antibiotikum, ale později bylo zjištěno, že způsobuje poškození ledvin testovaných zvířat, zpomalení růstu a nakonec smrt [Wu a kol., 1974]. Je všeobecně považován jako nebezpečný kontaminant potravin a krmiv, včetně kukuřice, pšenice, rýže, ječmene a ořechů [Yu a kol., 2006]. Proto svou přítomností na potravinách a krmivech by mohl představovat nebezpečí pro člověka a zvířata [Wu a kol., 1974]. U zvířat citrinin působí jako nefrotoxin, poškozuje proximální tubuly v ledvinách [Martin a kol., 1986]. Citrinin je také embryotoxický, teratogenní a genotoxický [Bragulat a kol., 2008]. Patologické změny, které způsobují v ledvinách, se zdají být podobné těm, které vyvolává ochratoxin A [Martin a kol., 1986]. Citrinin může působit synergicky s ochratoxinem A a potlačovat RNA syntézu v myších ledvinách [Bennett a Klich, 2003].

Chemické a fyzikální vlastnosti

Sumární vzorec: $C_{13}H_{14}O_5$

Strukturní vzorec: [Bennett a Klich, 2003].



Molekulová hmotnost: 250,25 g/mol

Popis: Žlutá krystalická pevná látka [<http://www.fermentek.co.il/citrinin.htm>]

Rozpustnost: Rozpustný je v etanolu, ethylacetátu, benzenu, acetonu a chloroformu, málo rozpustný je v diethyleteru, petroleji a etanolu. Nerozpustný je ve vodě [Betina, 1990].

Bod tání: 175 °C

3.2.2.4 Kyselina penicilová

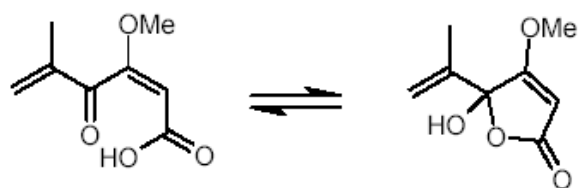
Kyselina penicilová byla první známý mykotoxin. Byla izolovaná z *Penicillium puberulum* v roce 1913 a dnes je známo, že je produkována mnoha druhy rodů *Penicillium*, i členy ze skupiny *Aspergillus ochraceus* [Magan a Olsen, 2004].

Kyselina penicilová vyvolává trvalé jednořetězcové zlomy v DNA, má mutagenní účinky a inhibuje ATPázu aktivovanou ionty Na a K [Betina, 1990].

Chemické a fyzikální vlastnosti [http://www.fermentek.co.il/penicillic_acid.htm]

Sumární vzorec: $C_8H_{10}O_4$

Strukturní vzorec:



Molární hmotnost: 170,2 g/mol

Popis: bezbarvé krystalky

Rozpustnost: Je mírně rozpustná ve studené vodě a benzenu, dobře rozpustná v horké vodě, etanolu, diethyletheru a chloroformu, nerozpustná je v pentanu a hexanu [Betina, 1990].

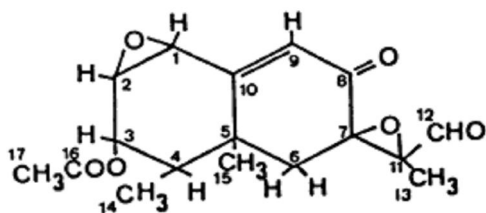
Bod tání: 86-87°C z petroletheru, 58-64°C z vody

3.2.2.5 PR toxin

PR toxin je sekundární metabolit houby *Penicillium roqueforti* [Chang a kol., 1993]. PR toxin je smrtelný pro potkany, myši a kočky pokud je podáván ústně, intraperitonálně, nebo intravenózně. PR toxin inhibuje syntézu RNA, proteinů, činnosti DNA polymeras α , β a γ , mitochondriální činnost HCO_3^- - ATPázy, mitochondriální respiraci a oxidativní fosforylaci u živočišných buněk [Chang a kol., 1991].

Chemické a fyzikální vlastnosti

Strukturální vzorec: [Chang a kol., 1993]



Popis: bezbarvé krystalky

Rozpustnost: Je rozpustný v chloroformu, methanolu, a acetonu, nerozpustný je v hexanu a vodě [Betina, 1990].

3.2.3 Toxiny produkované plísní rodu *Fusarium*

Skupina trichothecenových mykotoxinů, jako jsou T-2 toxin nebo deoxynivalenol a mnohé další patří mezi nejznámější toxiny produkované plísněmi rodu *Fusarium* [Betina, 1990].

Velká část mykotoxinů analyzovaných v krmivech je vyprodukována již během vegetace před sklizní a uskladněním. Patogenní mikroorganismy, především zástupci rodu *Fusarium* byly izolovány ze všech částí rostlin. V průběhu fytopatogenního procesu dochází ke kontaminaci hostitelských rostlin mykotoxiny, které jsou v tomto období již detekovatelné.

Obsah mykotoxinů narůstá v posledních týdnech před silážní zralostí, přičemž napadení je častější na odumřelých pletivech. Maximální úrovně obsahu toxinů jsou zaznamenávány v období sklizně a dále se významněji nemění [Nedělník a kol., 2006].

Maximální přípustné hodnoty jsou v souladu s nařízením Komise (ES) č. 466/2001 (včetně novely č.856/2005) pro deoxinivalenol 1250 µg/kg (ppb) a zearalenon 100 µg/kg. Některé trichotheceny (např. deoxinivalenol a zearalenon) byly nalezeny v travách v koncentracích přibližně 2 mg/kg. Silážní kukuřice také obsahovala deoxinivalenol a zearalenon v různém množství, a to v rozpětí od 0,005 do 13,75 mg/kg [Nedělník a kol., 2006].

3.2.3.1 Zearalenony

Zearalenon (F-2 toxin) je z hlediska chemické struktury lakton kyseliny β-ressorcylové [Stehlíková, 2007].

Zearalenony produkují zejména toxinogenní kmeny rodu *Fusarium*. Hlavním druhem v produkci zearalenonů je *Fusarium graminearum* (= *F. roseum*, nepohlavní forma *Gibberella zae*), která široce infikuje krmivářské a potravinářské obilí a je schopna produkovat až 1900 µg/kg toxinu v sušině. V současné době je izolováno 15 derivátů základní struktury zearalenonu [Stehlíková, 2007].

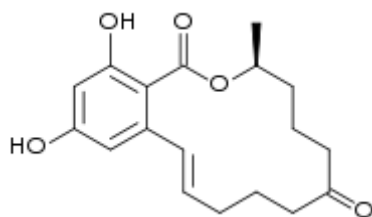
Při kontaminaci zrna fuzárií dochází často k souběžnému výskytu zearalenonu a trichothecenových toxinů [Stehlíková, 2007].

Zearalenon byl nalezen například v obilovinách a výrobcích z nich- ječmen, slad, pivo, kukuřice, oves, pšenice, dále v ořechách, banánech ale i v koření, olejích a podobně. Zearalenon je ve skladovaných komoditách velmi stabilní a jeho koncentrace se výrazně nemění ani po tepelném zpracování či fermentaci [Stehlíková, 2007].

Chemické a fyzikální vlastnosti: [<http://www.fermentek.co.il/zearalenone.htm>]

Sumární vzorec: C₁₈H₂₂O₅

Strukturální vzorec:



Molekulová hmotnost: 318,4 g/mol

Popis: bílý prášek

Rozpustnost: množství asi 0,002 g zearalenonu je rozpustné ve 100 ml vody, je mírně rozpustný v hexanu, více v metanolu a acetonu.

Bod tání: 159-163 °C

3.2.3.2 Deoxynivalenol

Deoxynivalenol objevili Yoshizawa a Morooka. Produkuje ho *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. roseum* a *Fusarium spp.* [Betina, 1990].

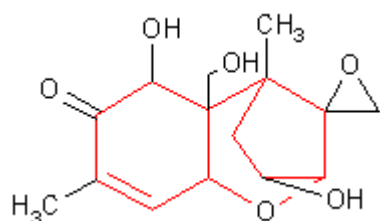
Deoxynivalenol (DON) je mykotoxin, který běžně kontaminuje obilné potraviny na celém světě. *F. graminearum* roste na ječmeni na poli nebo v průběhu klíčící fáze v pivovarnictví, což má za následek velmi nízkou úroveň DON v pivu. [Pestka a Smolinski, 2005].

Ve vztahu k toxicitě existují u zvířat značné rozdíly podle druhů, prase je nejcitlivější vůči DON, následuje hlodavec > pes > kočka > drůbež > přežvýkavci. S pouhými 0,05 až 0,1 mg / kg tělesné hmotnosti lze vyvolávat zvracení u prasat a psů [Pestka a Smolinski, 2005].

Chemické a fyzikální vlastnosti: [<http://www.fermentek.co.il/deoxynivalenol.htm>]

Sumární vzorec: C₁₅H₂₀O₆

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 296,3 g/mol

Popis: bílá krystalická pevná látka

Rozpustnost: je rozpustný v běžných polárních organických rozpouštědlech (metanol) lehce rozpustný ve vodě.

Bod tání: 151-153 °C

3.2.3.3 Fumonisin

Fumonisin jsou skupina mykotoxinů produkovaných několika druhy hub včetně *Fusarium moniliforme*, která je běžným kontaminantem kukuřice v mnoha částech světa. Produkce fumonisinů se může vyskytovat během růstu kukuřice, skladování nebo přepravě. V současné době označujeme fumonisin, FB1, FB2 a FB3 a jsou nejškodlivějším přirozeným kontaminantem potravin a krmiv [Mullett a kol., 1998].

Ukázalo se, že FB1 vyvolává širokou řadu negativních biologických účinků, včetně smrtelných leukoencefalomalacie u koní, plicního edému u prasat a rakoviny jater u potkanů. Rovněž jsou toxické pro krůty, kuřata a brojlerů [Mullett a kol., 1998].

4. Stanovení mykotoxinů

Skutečnost, že většina mykotoxinů je toxických při velmi nízkých koncentracích vyžaduje citlivé a spolehlivé metody pro jejich detekci. Vzhledem k odlišné struktuře těchto sloučenin není možné použít standardní metodu k odhalení všech mykotoxinů, protože každý bude vyžadovat jinou metodu [Turner a kol., 2009].

Analytické metody používané ke stanovení mykotoxinů jsou velmi rozmanité. Důležitou součástí metody je správný odběr vzorku, homogenizace, mletí, extrakce a přečištění, zkoncentrování, případně derivatizace. Každý z těchto na sebe navazujících kroků rozhoduje o výsledku analýzy [Mrkvicová, 2007].

Nejstarší, ale stále často používaná technika pro přípravu vzorku je rozpouštěcí extrakce, v případě kapalných vzorků, také nazývaná extrakce kapalina-kapalina [Cigic'a Prosen, 2009]. Extrakční činidlo se volí dle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Vzhledem k charakteru a stálosti mykotoxinů probíhá extrakce za laboratorní teploty a za neutrální nebo kyselá reakce. K extrakci mykotoxinů se nejčastěji používá metanol, voda, acetonitril, octan etylnatý, aceton, chloroform, případně vodné roztoky organických rozpouštědel. Metoda extrakce kapalina-kapalina se dnes již opouští, používá se separace na pevné fázi. Jednou z možností je gelová filtrace k odstranění lipidických sloučenin a pigmentů. V současné době se nejčastěji používá čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitních kolonkách (např. RIDA- R-Biopharm, VICAM- Vicam LP, USA, EASI-EXTRACT- Rhone Poulenc). Jsou založeny na principu imunologické reakce antigen + protilátka. Na imunoafinitní kolonce dojde k reverznímu spojení mezi protilátkami navázanými na gel v kolonce a jim odpovídajícím antigenem

(mykotoxinem) z matrice. Promytím se odstraní zbytky extraktu a desorpcí se uvolní antigen z vazby s protilátkou [Mrkvicová, 2007].

Pro stanovení mykotoxinů bylo vyvinuto mnoho analytických metod, patří mezi ně chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) stejně jako některé imunochemické přístupy: ICA metody (immunoaffinity column assays), SIIA metody (sequential injection immunoassay), RIA metody (radioimmunoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), konkurenční povrchová plazmová rezonance (SPR) nebo využití biosenzorů [Pemberton a kol., 2006].

Z hlediska finanční náročnosti a přístrojového vybavení je nejdostupnější tenkovrstvá chromatografie (TLC), která je vhodná pro rychlé a kvalitativní stanovení mykotoxinů [Mrkvicová, 2007].

4.1 Analytické metody

Naprostá většina chemických analytických metod používaných pro přesné, selektivní a citlivé stanovení mykotoxinů v různých vzorcích pochází ze skupiny separačních metod: chromatografie, elektroforéza [Cigic´a Prosen, 2009].

4.1.1 HPLC

Často se používá pro rutinní analýzy a průkazné metody pro nové nebo prověřující techniky. Nejpoužívanějším detektorem se stal hmotnostní spektrometr, nejlépe tandemový hmotnostní spektrometr. Stále je velmi populární i fluorescenční detektor díky své citlivosti, selektivitě a poměrně nízké ceně. Pro HPLC jsou používány také ostatní detektory, zejména UV-detektor [Cigic´a Prosen, 2009]. HPLC potřebuje robustní zařízení, které je v současné době omezena technickými vlastnostmi dostupných materiálů [Pohanka a kol., 2007].

4.1.2 Plynová chromatografie

Moderní plynové chromatografie kombinují separaci na kapilární koloně s mnoha obecnými a specifickými detektory. Zjevnou nevýhodou ve srovnání s kapalinovou chromatografií je skutečnost, že mohou být analyzovány pouze tepelně stabilní a těkavé analyty, i když tento problém může být částečně vyřešen derivatizací. Detektory pro všechny typy derivátů či nativních látek zahrnují plamenoionizační detektor a nejčastěji hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací nebo chemickou ionizací [Cigic´a Prosen, 2009].

4.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Z hlediska finanční náročnosti a přístrojového vybavení je nejdostupnější tenkovrstevná chromatografie (TLC), která je vhodná pro rychlé kvalitativní stanovení mykotoxinů. Na jejím základě byla vyvinuta metoda instrumentalizované HPTLC. Nověji se začaly používat metody HPLC s UV a fluorescenční detekcí [Mrkvicová, 2007]. Jejich mnohé výhody zahrnují použitelnost surového extraktu analýzy, široký výběr stacionárních a mobilních fází, stejně jako řadu detekčních činidel [Cigic'a Prosen, 2009].

TLC metoda s předchozím imunoafinitním přečištěním a denzitometrické kvantifikace byla vyvinuta pro aflatoxiny v potravinových vzorcích. Výhody této metody jsou rychlé zpracování vzorků a limity kvantifikace nižší než stanovené regulačními orgány [Cigic'a Prosen, 2009].

4.2 Screening metody

Screeningové metody mají široké uplatnění v oblasti analýzy mykotoxinů. Obvykle poskytují rychlou a citlivou detekci, jsou velmi ekonomické a snadno ovladatelné. [Cigic'a Prosen, 2009].

4.2.1 Metody založené na imunologických testech

Bylo prokázáno, že imunologické testy mohou být užitečné nástroje pro analýzu mnoha toxických látek, které jsou nyní předmětem přísných předpisů EU, pokud jde o jejich přípustné limity v potravinách a krmivech [Piermarini a kol., 2007].

Techniky imunologických testů, které jsou založeny na vysoce specifické schopnosti molekulárního rozpoznávání antigenů pomocí protilátek, se staly hlavními analytickými metodami v klinické a biochemické analýze a dalších oblastech, jako jsou kontroly týkající se životního prostředí, kontroly jakosti potravin atd. [Liu a kol., 2006].

Vazbu antigenu na příslušné protilátce doprovází pouze malé fyzikálně-chemické změny. Takže u většiny současných imunologických testů se vazba rozlišuje přes značené antigeny nebo protilátky [Díaz-González a kol., 2005].

Jako nejruznější značky, které byly použity pro vývoj imunologických testů, jsou nejčastěji používány enzymy v důsledku jejich přirozeného rozlišení [Díaz-González a kol.,

2005]. Mykotoxiny jsou malé neimunogenní molekuly a musí být vázány na vhodné proteinové nosiče vyvolávající dostatečnou imunitní reakci a produkci protilátek u zvířete [Cigic´a Prosen, 2009].

Elektrochemické EIA (enzym imunologické testy) lze rozdělit na heterogenní a homogenní testy. Homogenní EIA spoléhají na změnu aktivity enzymového označovače, který se vyskytuje, když se antigen váže na protilátku až k tvorbě imunokomplexu a nevyžadují žádný separační krok. Naopak, heterogenní testy vyžadují fyzikální separaci enzymového označovače vázaného na imunokomplex z volného enzymového označovače imunologického činidla. Přestože tento separační krok komplikuje postup, získávají nejlepší limity detekce. Tyto systémy jsou nejčastějšími alternativami v EIA. [Díaz-González a kol., 2005].

Enzymová imunoanalýza (ELISA), kde jedno z imunologických činidel je imobilizované v pevné fázi, je nejčastěji používaná alternativa ve vývoji heterogenních EIA [Díaz-González a kol., 2005].

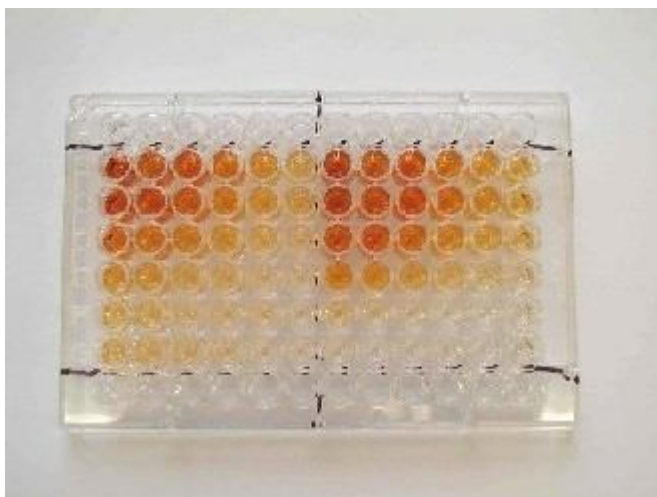
4.2.1.1 ELISA

ELISA soupravy jsou jedním z nejvýznamnějších široce používaných metod [Pohanka a kol. 2007]. ELISA je analytická technika, která využívá citlivosti a specifity vzájemné interakce protilátka-antigen [Daly a kol., 2000]. Na stěny jamky mikrotitrační destičky je navázána protilátka specifická k antigenu-mykotoxinu. Po postupné aplikaci vzorku/standardu, protilátky mykotoxinu a enzymového konjugátu mykotoxinu dojde ke kompetitivní imunoenzymatické reakci. Vázaný antigen (konjugát) a volný antigen (mykotoxin ze vzorku/standardu) soutěží o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky [Stehlíková, 2007].

ELISA je dostupná metoda umožňující současné zpracování velkého počtu vzorků, typicky 96 na jednu desku obr. č. 2. [Pohanka a kol., 2008]. Inkubační doby jsou 0,5- 2 hodiny a vyvinuté barvy se obvykle měří spektrofotometricky. Jsou možné i ostatní typy detekcí např. amperometrická nebo diferenční pulzní voltametrie [Cigic´a Prosen, 2009]. Častěji jsou kombinovány se spektrofotometrickou detekcí, vzhledem ke komerčně dostupné mikrotitrační destičce a čtecímu zařízení, kde lze měřit mnoho vzorků souběžně. Lze využít, i elektrochemickou detekci, která je poměrně levnější a citlivější než spektrofotometrické analýzy s přizpůsobeným čtecím zařízením na mikrotitrační desky [Díaz- González a kol., 2005].

ELISA metody mohou mít výhody v porovnání s jinými postupy, protože jsou jednoduché, citlivé a levné [Ammida a kol., 2004]. Test ELISA soupravy je komerčně dostupný pro většinu hlavních mykotoxinů [Krska a kol., 2008].

Zheng a kol. uvedli limit detekce (LOD) pro ELISA ve své studii přibližně 2 ppb. Specifičnost ELISA je převážně dána vlastnostmi použitých protilátek, více než nástrojovými parametry [Pohanka a kol., 2008].



Obrázek č. 2. Klasická 96-jamková destička pro metodu ELISA [http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html]

4.2.2 Biosenzory

Biosenzor je analytický přístroj, obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupin) chemických látek ve vzorku [Skládal, 2002].

Biorekogniční část biosenzoru je možné zařadit do dvou základních skupin. Biokatalytické (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus), které přeměňují analyt v průběhu reakce (obvykle vystupuje analyt jako substrát enzymové reakce) a bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor) kde je analyt specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu [Skládal, 2002].

Fyzikálně-chemické převodníky poskytující signál vhodný k dalšímu zpracování, lze rozdělit do následujících skupin: elektrochemické (potenciometrie, amperometrie,

konduktometrie, volumetrie), optické (fotometrie, fluorimetrie, luminometrie, nelineární optika), piezoelektrické, akustické a kalorimetrické [Skládal, 2002].

4.2.2.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory jsou založeny na zkoumání elektrochemických látek, a nebo průběhu procesu biologické a chemické interakce aktivní látky a substrátu. V tomto procesu měří elektrochemický detektor elektrochemický signál vyvolaný interakcí. Máme tři typy elektrochemických biosenzorů (konduktometrické, potenciometrické a amperometrické detektory) [Mehrvar a Abdi, 2004].

Při navrhování vhodných elektrochemických biosenzorů se obvykle bere v úvahu fixační technika, geometrie, velikost, materiál a vhodné podmínky elektrodového substrátu.

Elektrochemické biosenzory jsou nejčastěji používané biosenzory z používaných biosenzorů vzhledem k jejich rychlejším odezvám, větší jednoduchosti a nižším nákladům ve srovnání s optickými, kalorimetrickými a piezoelektrickými biosensory [Mehrvar a Abdi, 2004].

Z velké skupiny elektrochemický biosenzorů jsou potenciometrické a amperometrické nejslibnější [Pohanka a kol., 2007].

- Potenciometrické biosenzory

Základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. Převodníkem je iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou. Rozsah měřitelných koncentrací je dán vlastnostmi ISE. Odezva je logaritmická [Skládal, 2002].

Měří se potenciál pracovní elektrody proti referenční elektrodě - ta musí být kvalitní (časově stálá), přitom v systému neteče proud - je třeba měřicí přístroj s velkým vstupním odporem (dnes operační zesilovač) [Skládal, 2002].

Polovodičové potenciometrické senzory

Velkou výhodou těchto senzorů jsou miniaturní rozměry, masová produkce a tudíž nízká cena ve srovnání s klasickými potenciometrickými elektrodami. Základním konstrukčním materiálem je křemík. Jeho vodivost je velmi nízká, avšak přidávkem vhodných stopových příměsí lze jeho vodivost zvýšit [Skládal, 2002].

ISFET "ion sensitive field effect transistor".

Základem ISFETů je tranzistor řízený polem (FET) fungující na principu změny vodivosti prostřednictvím elektrického pole [Skládal 2002]. ISFET mohou být použity pro sledování změn napětí s minimální spotřebou proudu. U ISFET je místní potenciál generován plochou iontů z roztoku. Tento potenciál upravuje průtok proudu přes křemíkový polovodič [Pohanka a kol., 2007].

LAPS biosenzory

Zkratka LAPS znamená light addressable potentiometric sensor. Tento polovodičový převodník je konstrukčně jednodušší než ISFETy, navíc je možné připojení kontaktů ze strany, která není v kontaktu s roztokem. Křemíkový čip je potažený vrstvami oxidu křemičitého a nitridu křemíku, na povrchu je rozdělen na několik oblastí (komůrek) pomocí další vrstvy SiO₂. Celý čip má pouze jeden kontakt. V neosvětleném stavu je neaktivní. Pokud se z druhé strany osvětlí (IR LED, při 940 nm pronikne světlo do Si až 50 nm hluboko), dojde k lokální aktivaci a získá se signál odpovídající změnám pH v „adresované“ zóně [Skládal, 2002].

- Amperometrické biosenzory

Amperometrické biosenzory sledují aktuální změny proudu ($I \neq 0$) [Pohanka a kol., 2007]. Proud se obvykle měří při konstantním napětí (potenciál E, nebo U) pracovní elektrody. Velikost proudu prošlého za daný čas v systému pak udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách. Amperometrická měření je možné provádět v dvou - nebo tříelektrodovém uspořádání [Skládal, 2002].

Podle časového průběhu potenciálu na pracovní elektrodě se rozlišuje celá řada měřících technik. Nejjednodušší je samozřejmě prostá amperometrie. Chronoamperometrie umožňuje získat informace o přechodných elektrodových jevech po skokové změně pracovního potenciálu. Pulzní amperometrie zase zvyšuje podíl signálu vůči šumu. Lineární a zejména cyklická voltametrie mají důležitou úlohu při vývoji amperometrických biosenzorů. Pulzní voltametrické techniky již vyžadují poměrně drahé přístrojové vybavení, i když potřebné pulsy lze relativně snadno generovat pomocí počítače s D/A převodníkem [Skládal, 2002].

Amperometrické systémy zachycují lineární závislost koncentrace. Amperometrické systémy ve srovnání s konduktometrickými a potenciometrickými jsou vysoce citlivé, rychlé a levné [Mehrvar a Abdi, 2004].

U amperometrického testu mohou být upotřebeny vhodné enzymy. Aflatoxin B1 může být metabolizován aflatoxin-detoxifyenzymem. Tento enzym byl použit pro detekci v multiobouzděné uhlíkové nanotrubicí tří-elektrodového systému. Vyvinutý přístroj umožňuje detekci sterigmatocystinu, který je prekurzorem aflatoxinu B1. Kalibrační rozsah pro sterigmatocystinový test byl poměrně krátký (0.13-4.29 μM), nicméně dosažená LOD o 0,13 μM byla znamenitá [Pohanka a kol., 2007].

- Konduktometrické biosenzory

Konduktometrické biosenzory měří chemické a biologické změny ve vodivosti mezi dvěma kovovými elektrodami v objemu roztoku [Mehrvar a Abdi, 2004].

Konduktometrické biosenzory prokázaly nižší citlivost ve srovnání s amperometrickými a potenciometrickými biosensory, takže jejich použití jsou omezena [Pohanka a kol., 2007].

4.2.2.2 Optické biosenzory

Základem je interakce světelného záření s chemickými látkami. Pro konstrukci katalytických biosenzorů se využívají optické techniky jako absorbance (poměrně málo), fluorescence a luminiscence [Skládal, 2002].

Jako detektory pro měření intenzity světla jsou nejcitlivější fotonásobiče, nevýhodou je potřeba vysokého napětí. O něco méně citlivým detektorem jsou fotodiody typu „avalanche“, ty však mají větší šum. Nejméně citlivé jsou obyčejné fotodiody (1000x méně než fotonásobiče), vykazují větší šum (malý vnitřní odpor), avšak jsou velmi levné, mechanicky stabilní a vhodné zejména pro přenosná zařízení. Zdrojem světla jsou lasery, světloemitující diody (LED), výbojky (pro UV oblast) či lampy [Skládal, 2002].

Optické biosenzory jsou založeny na fluorescenčně značených protilátkách nebo na některých fluorescenčně aktivních mykotoxinech. Aflatoxiny mají absorpční maxima okolo 360 nm (pro komplexní analýzu jiných typů mykotoxinů se musí použít fluorescenčně-značené protilátky nebo pomocí nelineární optické metody). Hlavní nevýhodou optických metod je citlivost na optické znečištění. V některých případech se vzorky a celé zařízení musí leštit [Pohanka a kol., 2007].

Fluorometrický imunosenzorický test byl použit pro souběžnou analýzu 12 různých vzorků včetně mykotoxinu fumonisinu. Byl použit vlnovod povlečený avidinem [Pohanka a kol., 2007].

- Povrchová plazmová rezonance (SPR)

Jednou z metod, které umožňují rychlou detekci toxinů je SPR (surface plasmon resonance) [Hodnik a Anderluh, 2009].

SPR - rezonance elektromagnetické vlny šířené povrchovou vrstvou kovu (surface plasmon resonance, vzniká interakcí exponenciální vlny s volnými elektrony v kovu). BIAcore vyvinutý firmou Pharmacia je nejstarší afinitní biosenzore založený na principu SPR [Skládal, 2002].

Biosenzory založené na SPR využívají tenký kovový film mezi dvěma transparentními médii různého indexu lomu, např. skleněný hranol a roztok vzorku. Zlato je přednostně používáno v mnoha SPR refraktometrech. Paprsek roviny polarizovaného světla vstupuje do prostředí o vyšším indexu lomu (skleněný krystal) může podstoupit celkovému vnitřnímu odrazu nad kritický úhel dopadu. Za těchto podmínek je elektromagnetická složka světla nestálá vlna, která bude pronikat do zlatého filmu. V určitém úhlu dopadu, způsobí interakce této vlny s volně oscilujícími elektrony na ploše zlatého filmu excitaci povrchových plazmonů, což vede následně k poklesu intenzity odraženého světla. Tento jev se nazývá povrchová plazmová rezonance a dochází k němu pouze v určitém úhlu dopadajícího světla. SPR systém tedy detekuje změny v indexu lomu na povrchu vrstvy roztoku v kontaktu se sensorovým čipem [Hodnik a Anderluh, 2009].

U SPR je pozorován ostrý pokles v intenzitě odraženého světla v určitém úhlu, který je závislý na indexu lomu media na neosvětlené straně povrchu. Tento úhel posunu je pozorován tehdy, kdy se biomolekuly vážou na povrch a mění se index lomu povrchové vrstvy [Hodnik a Anderluh, 2009].

Daly a kol. uvedli ve své práci vývoj povrchové plazmové analýzy založené na imunologické analýze pro detekci aflatoxinů. Konjugát aflatoxinu je kovalentně imobilizován na povrchu čipového snímače a protilátkám s volným toxinem je povoleno průběžně protékat po povrchu. Konjugovaný a volný toxin v roztoku soutěží o vazbu na protilátky v roztoku. Jak se protilátky vážou na konjugát, mění se index lomu v pufru v kontaktu se sensorovým čidlem. Změny v indexu lomu se měří podle SPR [Daly a kol., 2000].

Většina ze SPR biosenzorů využívají jako jednotky RU (jednotky odezvy). Tomu to signálu odpovídá přímo úměrná množství vázaných molekul. Pro proteiny se odhaduje, že přibližně 1000 RU odpovídá pokrytí 1 ng/mm² [Hodnik a Anderluh, 2009].

U aflatoxinů jsou v důsledku jejich nízké molekulové hmotnosti, hmotnostní změny způsobené vázáním na povrch senzoru příliš malé a to má za následek podstatné změny v indexu lomu. V důsledku toho je na rozvoj kvantitativní metody pro detekci aflatoxinů a dalších nízkomolekulárních sloučenin nutné použít nepřímé metody snímání. To může být kompetitivní - ve které standardních vzorky a vysokomolekulární hapten-konjugát soutěží o vazebná místa na povrchu imobilizovaných protilátek nebo inhibiční - ve kterých se vzorek inkubuje s protilátkou a směs prochází přes plochu imobilizovaným konjugátem, kde vzniká vazba zbývajících volných protilátek [Daly a kol., 2000].

4.2.2.3 Převodníky pro bioafinitní senzory

Afinitní biosensory využívají jako rekogniční složku biomolekuly schopné specificky vytvářet komplex s analytem, který je strukturně komplementární k vazebnému místu imobilizované biomolekuly. Typickým příkladem je vznik imunokomplexu mezi antigenem a protilátkou nebo hybridizace nukleových kyselin. Vznik biokomplexu na povrchu biosenzoru lze v zásadě sledovat dvěma odlišnými přístupy, přímo a nepřímo [Skládal, 2002].

Nepřímá metoda využívá toho, že jeden z reakčních partnerů se vhodně označí (enzymem, fluoroforem) a převodník pak vlastně sleduje vazbu značky na svém povrchu; použitelné jsou přístupy biokatalytických senzorů [Skládal, 2002].

Přímá metoda je mnohem atraktivnější, protože umožňuje sledovat vznik biokomplexu obvykle průběžně [Skládal, 2002].

4.2.3 Příklady použití elektrochemických biosenzorů

- Detekce aflatoxinu B1 v ječmeni a aflatoxinu M1 v mléce

Ammida a kol. se ve své práci zaměřují na rozvoj imunosenzoru pro detekci AFB1 v ječmeni. Detekce vybraného analytu se provádí prostřednictvím soutěže mezi BSA-AFB1 imobilizovaným na povrchu a volným antigenem (standardní roztok nebo vzorek aflatoxinu) o vazebná místa protilátky MAb. Po soutěžním kroku se množství protilátky MAb, které reagovalo s imobilizovaným BSA-AFB1, hodnotilo pomocí značených sekundárních protilátek. Sekundární protilátky byly značeny alkalickou fosfatase (AbII-AP), jako měrná elektroda byla použita uhlíková tištěná elektroda. Pro detekci byla použita diferenční pulzní voltametrie [Ammida a kol., 2004].

Záměrem Micheli a kol. bylo vytvořit imunosenzor pro detekci AFM1 v mléce. Monoklonální protilátky (MAb) proti AFM1 byly imobilizovány na povrchu tištěné elektrody. Po soutěžním kroku, kdy byl přidán enzymatický substrát pro HRP- 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin dihydrochlorid (TMB), bylo hodnoceno množství AFM1- HRP konjugátu, který reagoval s imobilizovanou protilátkou MAb. Elektroaktivní produkt byl zjištěn pomocí chronoamperometrie při použitím potenciálu -100 mV, při kterém je produkt TMB podroben redukci [Micheli a kol., 2005].

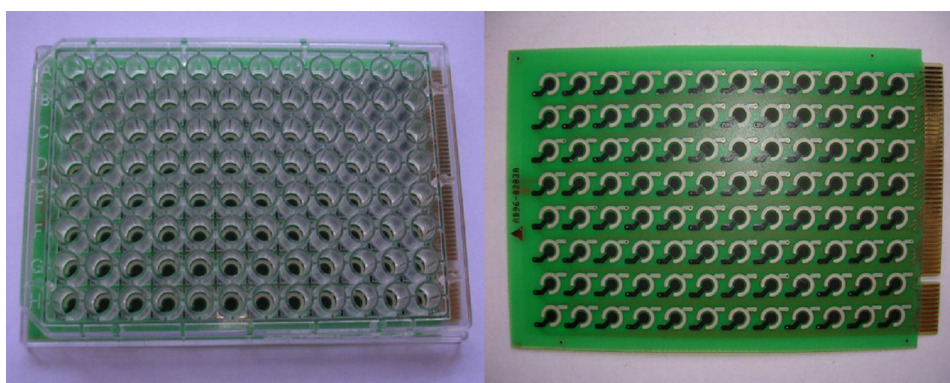
- Detekce aflatoxinu B1 pomocí elektrochemické imunologické sensorové sady

Piermarini a kol. poukazují na využití mikrotitrační destičky s 96 políčky, kdy v každém políčku byla zakotvena měrná elektroda- uhlíkově tištěná obr. č. 3. Podmínky pro stanovení byly nejdříve optimalizovány metodou ELISA a tento postup byl poté využit pro elektrochemickou detekci AFB1. Princip stanovení je stejný jako u Ammida a kol. [Ammida a kol., 2004].

Detekce byla provedena s využitím přerušované pulzní amperometrie [Piermarini a kol., 2007].

Tato studie ukazuje, že mikrotitrační destička je potenciálně velmi užitečné zařízení, vzhledem k tomu, že 96 elektrochemických senzorů je umístěno dole na 96-jamkové desce a vícekanalových výběr může být proveden prakticky současně. To nabízí jedinečnou možnost kombinovat vysokou citlivost elektrochemických metod s využitím SPE (screen-printed elektrody) s vysoce výkonnými postupy ELISA [Piermarini a kol., 2007].

Obrázek č. 3. Kompletní 96 jamková mikrotitrační deska (a) a s 96 tištěnými senzory (uhlík a Ag / AgCl) (b) ukazující spojený kombinovaný model [Piermarini a kol., 2007].



(a)

(b)

- Detekce aflatoxinu B1 pomocí ELIME sady

Piermarini a kol. uvedli ve své práci ELIME sady založené na použití SPE ve spojení s immunomagnetickými částicemi (IMBs) pro detekci AFB1 ve vzorcích obilí [Piermarini a kol., 2009]

V této práci byla snaha o vytvoření elektrochemického immunosenzoru kvůli požadovaným vlastnostem citlivosti a specifičnosti. Využívá se úsilí zprovoznit osm magnetizovaných SPE elektrod, aby bylo dosaženo rychlého a praktického elektrochemického měření [Piermarini a kol., 2009].

Na povrchu SPE byly navázány magnetické částice, na kterých probíhalo stanovení. Tyto magneticky tištěné elektrochemické sady jsou založeny na nepřímém konkurenčním ELISA formátu, kdy dochází k soutěži AFB1-BSA konjugátu imobilizovaného na povrchu magnetických částic a volného aflatoxinu o vazebná místa na monoklonální protilátce anti-aflatoxinu B1. Vzhledem k tomu, že se koncentrace AFB1 zvyšuje (ve standardu nebo vzorku) množství MAb vázané na AFB1-BSA klesá. Vázaný imunologický komplex (AFB1-BSA-MAb) byl poté detekován pomocí označené alkalické fosfatasy Anti-myší IgG (AB2-AP) [Piermarini a kol., 2009].

Bylo možné současně provádět osm lokalizovaných měření na povrchu osmi SPE pracovních elektrod na kterých byly navázány magnetické částice. Enzymová aktivita se měří elektrochemicky pomocí α -naftyfosfátu jako substrátu. Elektroaktivní enzymatický produktu (a-naftol) byl zjištěn pomocí diferenciální pulzní voltametrie (DPV) [Piermarini a kol., 2009].

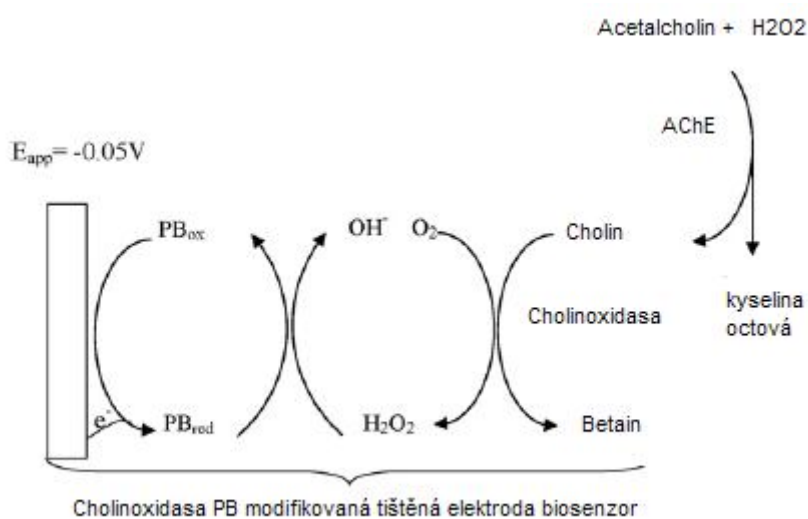
- Stanovení AFB1 v olivovém oleji pomocí bio-elektrochemického testu

Byla vyvinuta nová elektrochemická metoda založená na detekci AFB1v olivovém oleji inhibicí enzymu acetylcholinesterasy (AChE) [Rejeb a kol., 2009]. Amperometrické biosenzory založené na inhibici cholinesterasy jsou považovány za jednu z nejlepších alternativ v rámci této strategie. Jednoduchost, nízké náklady na zařízení a možnost učinit jejich miniaturizaci je užitečné pro analytické přístroje [Pohanka a kol., 2008]

Stanovení AFB1 je založeno na inhibici s AChE. Zbytková aktivita AChE je určena pomocí cholinoxidasy (ChOx) amperometrického biosenzoru reakcí spolu s enzymem AChE v roztoku produkují jako finální produkt enzymatické reakce peroxid vodíku. AChE je také

inhibována jinými aflatoxiny. Oba AFB1 a AFB2 vyvolávají značnou inhibici s AChE, zatímco AFM1, AFG1 a AFG2 ukazují omezenou schopnost inhibovat tento enzym. Je důležité zdůraznit, že navrhovaný způsob není selektivní metodou pro AFB1, ale představuje metodu pro stanovení celkového obsahu aflatoxinů [Rejeb a kol., 2009].

Amperometrické zjištění činnosti AChE je založena na realizaci druhého enzymu, ChOx, poskytující po sobě jdoucích přeměnu nativní substrátu (acetylcholin) na elektrochemicky aktivní produkt H_2O_2 obr. č 4. [Rejeb a kol., 2009].



Obrázek č. 4. Schematické znázornění systému pro určení AFB1. Konečný produkt je H_2O_2 , který se měří na PB-modifikované elektrodě za použití potenciálu $-0.05V$ proti tištěné vnitřní stříbrné pseudoreferentní elektrodě [Rejeb a kol., 2009].

Výhodou této metody je, že je mnohem jednodušší a rychlejší než HPLC nebo používá méně nákladná činidla specifických protilátek než ELISA. Kromě toho elektrochemické měření aktivity AChE umožňuje měření nízkých koncentrací AFB1, protože se vyhýbá ředicímu kroku, který je nutný pro spektrofotometrické metody vzhledem k přítomnosti barevných extraktů [Rejeb a kol., 2009].

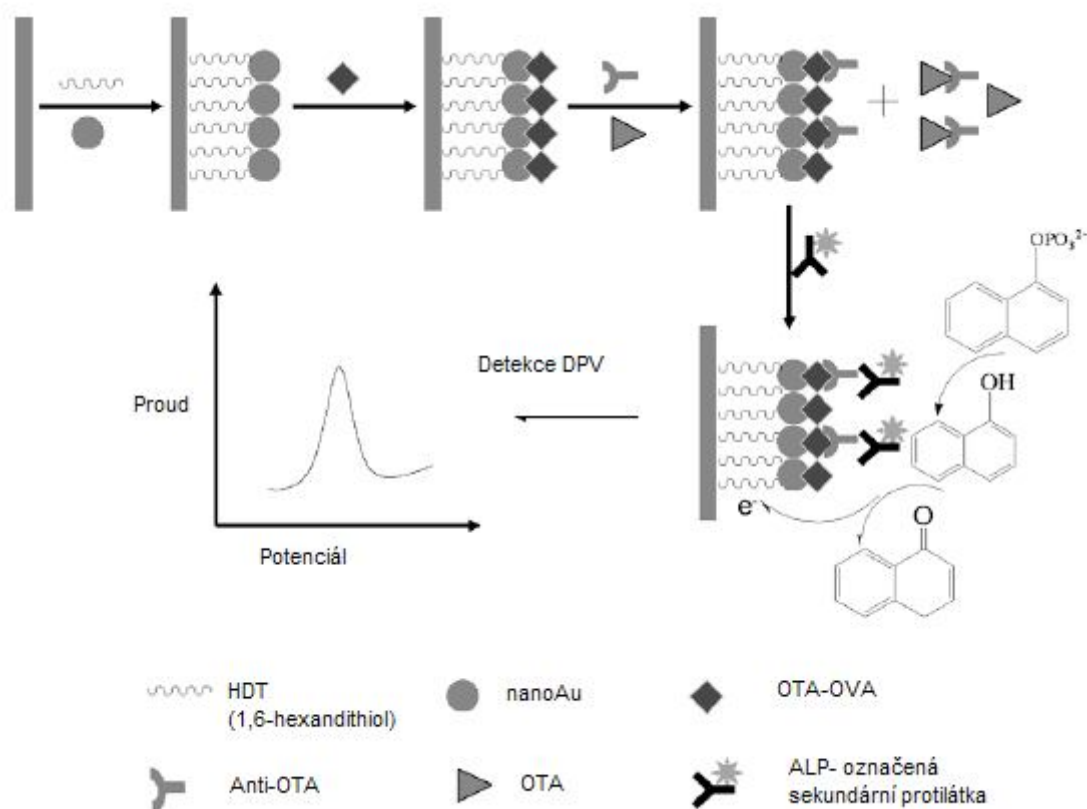
- Elektrochemické imunosenzory pro ochratoxin A

Liu a kol. ve své práci vyvinuli elektrochemický imunosenzor založený na principu nepřímého kompetitivního testu pro detekci OTA obr. č. 5. Nejdříve byl na vrstvu koloidního zlata pro jeho dobrou biokompatibilitu, vynikající vodivost s relativně velkým poměrem povrchu imobilizován konjugát OTA-ovalbumin. Pak OTA ve vzorcích soutěžil o omezená vazebná místa na protilátce Anti-OTA s imobilizovanými OTA deriváty na rozhraní detekce.

Množství alkalické fosfatasy – označené sekundární protilátky, která se selektivně váže na povrch elektrody pomocí primární protilátky, kvantitativně koreluje s koncentrací OTA ve vzorku. Elektrochemická reakce pak byla získána z enzymatického produktu 1-naftyl fosfátu, citlivého substrátu alkalické fosfatasy v elektrochemickém čtecím zařízení [Liu a kol., 2009].

Metoda je založena na kombinaci výhod koloidního zlata na shromáždění, imobilizaci a enzymového zesílení, tím je umožněn limit detekce (8,2 pg/ml) mnohem nižší než detekční limit pro stávající imunologické senzory. Výsledky naznačily, že imunologický sensor by mohl být použit v přírodě na OTA kontaminované vzorky kukuřice [Liu a kol., 2009].

Obrázek č. 5. Schematický náčrt elektrochemického imunosenzoru založeného na principu nepřímého kompetitivního testu pro stanovení OTA [Liu a kol. 2009].



5. ZÁVĚR

Ve své práci jsem se zabývala toxiny produkované jak bakteriemi, tak různými rody plísní. Uvedla jsem u každé skupiny jejich účinky a vliv na člověka či zvířata.

Představila jsem zde analytické metody stanovení a screeningové metody. U screeningových metod jsem uvedla metody založené na imunologických testech a biosenzory. V kapitole o biosenzorech jsem se zaměřila na používání elektrochemických biosenzorů a uvedla jsem několik případů použití pro detekci nejdůležitějších mykotoxinů.

6. LITERATURA:

Abrami L., Liu S., Cosson P., Leppla S. H., F. Gisou van der Goot (2003): Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process, *The Journal of Cell Biology*, **160**, 321-328

Alouf J. E., Popoff M. R. 2006: *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, Academic Press, 291

Ammida N. H. S., Micheli L., Palleschi G. (2004): Electrochemical immunosensor for determinativ of aflatoxin B1 in barley, *Analytica Chimica Acta*, **520**, 159–164

Balachandran P., Hollingshead S. K., Paton J. C., Briles D. E. (2001): The Autolytic Enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin, *Journal of Bacteriology*, **183**, 3108- 3116

Bennett J. W., Klich M. (2003): Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 497–516

Betina V. (1990): *Mykotoxíny-chémia-biológia-ekológia*, Vydavateľstvo ALFA Bratislava

Blaustein R. O., Koehlert T. M., Colliert J. R., Finkelstein A. (1989): Anthrax toxin: Channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers, *Biophysics*, **86**, 2209-2213

Bragulat M. R., Martínez E., Castellá G., Cabañes F. J., (2008): Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs, *International Journal of Food Microbiology*, **126**, 43-48

Chang Shenq-Chyi, Wei Yau- Huei, Wei Ding- Ling, Chen Yen- Yu, Jong Shung-Chang (1991): Factors Affecting the Production of Eremofortin C and PR Toxin in *Penicillium roqueforti*, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2581-2585

Chang Shernq-Chyi, Lu Kuang-Lieh, Yeh Sheau-Farn (1993): Secondary Metabolites Resulting from Degradation of PR Toxin by *Penicillium roqueforti*, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 981

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

- Cook T. M., Protheroe R. T., Handel J.M. (2001) : Tetanus: a review of the literature, *British Journal of Anaesthesia*, **87**, 477-487
- Daly S. J., Keating G. J., Dillon P. P., Manning B. M., O’Kennedy R., Lee H. A., Morgan M. R. A. (2000): Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for Aflatoxin B1, *Jurnal of agricultural and Food chemistry*, **48**, 5098-5104
- Díaz-González M., González –García M. B., Costa-García A. (2005): Recent Advances in Electrochemical Enzyme Immunoassays, *Electroanalysis*, **17**, 1901 – 1918
- Dorner J. W., Cole R. J., Lomax L. G., Gosser H. S., Diener U. L. (1983): Cyclopiazonic Acid Production by *Aspergillus flavus* and Its Effects on Broiler Chickens, *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 698-703
- Ferrarezi M. C., Cardoso T. C., Dutra I. S. (2008): Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea, *Anaerobe*, **14**, 328-331
- Fleischer B., Schrezenmeier H. (1988): T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells, *Journal of Experimental Medicine*, **167**, 1697-1707
- Gómez-Catalán Jesús, Ester Piqué, Gemma Falcó, Natividad Borrego, Miquel Rodamilans and Juan M. Llobet (2005): Determination of Aflatoxins in Medicinal Herbs by HPLC. An Efficient Method for Routine Analysis, *Phytochemical Anylysis*, Volume 16, Issue 3, Pages 196-204
- Güereña-Burgueño F., Hall E. R., Taylor D. N., Cassels F. J., Scott D. A., Wolf M. K., Roberts Z. J., Nesterova G. V., Alving C. R., Glenn G. M. (2002): Safety and Immunogenicity of a Prototype Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Administered Transcutaneously, *Infection and Immunity*, **70**, 1874–1880
- Gurjar A. A., Hegde N. V., Love B. C., Jayarao B. M. (2008): Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle, *Molecular and Cellular Probes*, **22**, 90–95
- Herrington D. A., Hall R. H., Losonsky G, Mekalanos J. J., Taylor R. K., Levine M. M. (1988): Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humus, *Journal of Experimental Medicine*, **168**, 1487-1492

Hodnik V., Anderluh G. (2009): Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance, *Sensors*, **9**, 1339-1354

Jacewicz M.; Clausen H.; Nudelman E.; Donohue-Rolfé A., Keusch G.T. (1986): Pathogenesis of *Shigella* diarrhea XI. Isolation of a *Shigella* Toxin-Binding Glycolipid from Rabbit Jejunum and HeLa Cells and Its Identification as Globotriaosylceramide, *J. Exp. Med.* © The Rockefeller University Press, **163**, 1391-1404

Ježková A., V. Dohnal, J. Skládanka (2007): Sledování obsahu zearalenonu a aflatoxinů v pícech, 8. vedecká konferencia doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov, 6. 4. 2007, FPV UKF Nitra

Julák J. (2006): Úvod do lékařské bakteriologie, 1. vydání, vydavatel Univerzita Karlova v Praze Nakladatelství Karolinum, Praha 1, Ovocný trh 3

Klimpel K. R., Arora N., Leppla S. H. (1994): Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity, *Molecular Microbiology*, **13**, 1093-1100

Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., Macdonald S., Crews C. (2008): Mycotoxin analysis: An update, *Food Additives and Contaminants*, **25**, 152–163

Leimeister – Wächter M., Haffner Ch., Domann E., Goebel W., Chakraborty T. (1990): Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*, *Microbiology*, **87**, 8336-8340

Lindberg A. A., Brown E. J., Strömberg N., Westling-Ryd M. (1987): Identification of the Carbohydrate Receptor for Shiga Toxin Produced by *Shigella dysenteriae* Type I, *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 1779-1785

Lisalová M., Machariková M. (2005): Riziko pôsobenia mikroskopických húb v archívoch a knižniciach na zdravie človeka, *Knižnica* roč. 6., č. 3., 20

Liu Y., Qin Z., Wu X., Jiang H. (2006): Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode, *Biochemical Engineering Journal*, **32**, 211–217

- Liu X-P., Deng Ya-J., Jin X-Y., Chen Li-G., Jiang Jian-H., Shen Guo-L., Yu Ru-Q. (2009): Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization, *Analytical Biochemistry*, **389**, 63–68
- Loe D. W., Stewart R. K., Massey T. E., Deeley R. G., Cole S. P. C (1997): ATP- Dependent Transport of Aflatoxin B1 and Its Glutathione Conjugates by the Product of the Multidrug Resistance Protein (*MRP*) Gene, *Molecular Pharmacology*, **51**, 1034-1041
- Magan Naresh, Olsen Monica (2004): *Mycotoxins in food: detection and kontrol*, Woodhead Publishing, 2004
- Malíř F., Ostrý V. (2004): Stanovisko vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Snížení obsahu aflatoxinů v suchých skořápkových plodech (zejména v pistáciích a burských oříšcích), Vědecký výbor pro potraviny, Brno
- Malíř F., Ostrý V. (2007): Informace Vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Ochratoxin A v potravinách, Vědecký výbor pro potraviny, Brno
- Martin W., Lorkowski G., Creppy E. E., Dirheimer G., Rösenthaller R. (1986): Action of Citrinin on Bacterial Chromosomal and Plasmid DNA In Vivo and In Vitro, *Applied and Environmental Microbiology*, **52**, 1273-1279
- McLaughlin J., Lambert D., Padfield P. J., Burt J. P. H., O'Neill C. A. (2009): The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells, *Toxicology in Vitro*, **23**, 83–89
- Mehrvar M., Abdi M. (2004): Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Analytical science*, **20**, 1113-1125
- Micheli L., Grecco R., Badea M., Moscone D., Palleschi G. (2005): An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 588–596
- Moravcová H., Nedělník J. (2005): Studium obsahu aflatoxinu M1 ve vzorcích mléka z distribuční sítě ČR v letech 2004-2005, Sb. věd. prací VUP Troubsko 15, 27–32
- Mrkvicová M. (2007): Stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu, zeralenonu, aflatoxinů a fumonisinů metodou HPLC nebo LC/MS/MS v krmivech, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Bulletin 2007, **XI**, číslo 1/2007, 13

Mullet W., Lai E. P. C., Yeung J. M., (1998): Immunoassay of Fumonisin by a Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Analytical Biochemistry*, **258**, 161-167

Nedělník J., Moravcová H., Honzlová A. (2006): Mykotoxiny v krmivech, *Krmivářství*, **3**, 18–23, ISSN 1212–9992

Orth D., Grif K., Zimmerhackl L. B., Würzner R. (2009): Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria, *Wien Klin Wochenschr*, **121**, 108–112

Ostrý V. (2005): Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Výskyt mykotoxinu ochratoxinu 1 ve víně, Vědecký výbor pro potraviny, Brno

Owino J. H. O., Arotiba O. A., Hendricks N., Songa E. A., Jahed N., Waryo T. T., Ngece R. F., Baker P. G. L., Iwuoha E. I. (2008): Electrochemical Immunosensor Based on Polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B1, *Sensors*, **8**, 8262-8274

Özsoy N., Selmanoğlu G., Koçkaya E. A., Gül N., Cebesoy S. (2008): Effect of patulin on the interdigitating dendritic cells (IDCs) of rat thymus, *Cell Biochemistry and Function*, **26**, 192–196

Parker Ch. O., Tothill I. E. (2009): Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2452–2457

Patočka Jiří (2004): *Vojenská toxikologie*, Grada Publishing a.s., 2004

Pelisser M. R., Klein C. S., Ascoli K. R., Zotti T. R., Arisi A. C. M., (2009): Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products, *Brazilian Journal of Microbiology* **40**, 145-148

Pemberton R. M., Pittson R. and Biddle N., Drago G. A., Hart J. P. (2006): Studies Towards the Development of a Screen-Printed Carbon Electrochemical Immunosensor Array for Mycotoxin: A Sensor for Aflatoxin B1, *Analytical Letters*, **39**, 1573

Pestka J. J., Smolinski A., (2005): Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humus, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **8**, 39–69, 2005

- Piermarini S., L. Micheli L., Ammida N. H. S., Palleschi G., Moscone D. (2007): Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 1434-1440
- Piermarini S., Volpe G., Micheli L., Moscone D., Palleschi G.(2009): An ELIME-array for detection of aflatoxin B1 in corn samples, *Food Control*, **20**, 371–375
- Pinkney M., Beachey E., Kehoe M. (1989): The Thiol-Activated Toxin Streptolysin 0 Does Not Require a Thiol Group for Cytolytic Activity, *Infection and Immunity*, **57**, 2553-2558
- Pohanka M., Jun D., Kuca K. (2007): Mycotoxin Assays Using Biosensor Technology: A Review, *Drug and Chemical Toxicology*, **30**, 253–261
- Pohanka M., Kuca K., Jun D.(2008): Aflatoxin Assay Using an Amperometric Sensor Strip and Acetylcholinesterase as Recognition Element, *Sensor Letters*, **6**, 1-4
- Rejeb I. B, Arduini F., Arvinte A., Amine A., Gargouri M., Micheli L., Bala C., Moscone D. Palleschi G. (2009): Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 1962-1968
- Richard E., Heutte N., Bouchart V., Garon D. (2009): Evaluation of fungal contamination and mykotoxin production in maize silage, *Animal Feed Science and Technology*, **148**, 309–320
- Ryšková Olga, *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie*, 1. Dotisk 1.vydání, vydavatel Univerzita Karlova v Praze Nakladatelství Karolinum, Praha 1, Ovocný trh 3, rok 2007 str. 113
- Sekiya K., Satoh R., Danbara H., Futaesaku Y. (1993): A Ring-Shaped Structure with a Crown Formed by Streptolysin 0 on the Erythrocyte Membrane, *Journal of Bacteriology*, **175**, 5953-5961
- Schad E. M., Zaitseva I., V. N.Zaitsev V.N., Dohlsten M., Kalland T., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H., Svensson L.A. (1995): Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A, *The Embo Journal*, **14**, 3292-3301
- Skládal P. (2002): *Biosensory*, Masarykova Univerzita Přírodovědecká fakulta, Brno 2002

- Stehlíková J. (2007): Zavedení stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Bulletin 2007, ročník **XI**, číslo 1/2007
- Stiles B. G., Hale M. L., Marvaud J. Ch., Popoff M. R. (2002): *Clostridium perfringens* iota toxin: characterization of the cell-associated iota b komplex, *Biochem. J.*, **367**, 801-808
- Størmer F. C., Kolsaker P., Holm H., Rogstad S., Elling F.(1985): Metabolism of Ochratoxin B and Its Possible Effects upon the Metabolism and Toxicity of Ochratoxin A in Rats, *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1108-1112
- Strombeck D. R., Harrold D. (1975): Comparison of the Rate of Absorption and Proteolysis of [¹⁴C]Cholera toxin and [¹⁴C]Bovine Serum Albumin in the Rat Jejunum, *Infection and Immunity*, **12**, 1450-1456
- Sussman M. (1997): *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence*, Cambridge University Press
- Šilhánková L. (1995): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*, 2. vydání, vydavatel Viktoria Publishing, a.s, 150
- Šrámová H., Karpíšková R., Beneš Č., Špelina V., Petráš P. (2005): *Alimentární onemocnění (infekce a otravy z potravin)*, Vědecký výbor pro potraviny Brno
- Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta* **632**, 168-180
- Wise A., Suzangar M., Messripour M., Mohammadi J. (1978): Urinary excretion of aflatoxin M1 administration of aflatoxin B, in sucrose- or starch-rich diets, *British Journal of Nutrition*, **40**, 397-401
- Wu M. T.; Ayres J. C., Koehler P. E. (1974): Production of Citrinin by *Penicillium viridicatum* on Country-Cured Ham, *Applied and environmental microbiology*, **27**, 427-428
- Yu Feng-Yih, Liao Yi-Chun, Chang Chia-Hao, Liu Biing-Hui (2006): Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway, *Toxicology Letters* **161**, 143–151

Yu, J., Chang P.-K., Ehrlich K. C., Cary J. W., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Payne G. A., Linz J. E.; Woloshuk C. P., Bennett, J. W. (2004): Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis, Applied and Environmental Microbiology, **70**, 1253-1262

Yu J. H., Leonard T. J. (1995): Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase, Journal of Bacteriology Aug. 1995, **177**, 4792-4800

<http://www.fermentek.co.il/deoxynivalenol.htm> - 20. 6. 2009

http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html - 20. 6. 2009

<http://www.fermentek.co.il/zearalenone.htm> - 20. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/penicillic_acid.htm - 20. 6. 2009

<http://www.fermentek.co.il/patulin.htm> - 20. 6. 2009

<http://www.fermentek.co.il/sterigmatocystin.htm> - 20. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/ochratoxin_A.htm -20. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_M2.htm 20. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_M1.htm -20. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_B1.htm - 21. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_B2.htm - 21. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_G1.htm - 21. 6. 2009

http://www.fermentek.co.il/aflatoxin_G2.htm - 21. 6. 2009