

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Czech Journal of
FOOD SCIENCES

Potravinářské vědy

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

3

VOLUME 16
June 1998
CS ISSN 0862-8653

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gesce České akademie zemědělských věd

Abstracts from the journal is comprised in Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, PASCAL – CD-ROM (INIST), WLAS, TOXILINE PLUS and Czech Agricultural Bibliography.

Editorial board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Miloslav Adam, CSc., Ing. Luisa Benešová, prof. Ing. Dušan Čurda, CSc., prof. Ing. Jiří Davídek, DrSc., Ing. Jan Drbohav, CSc., Ing. Jiřina Houšová, CSc., prof. Ing. Ivo Ingr, DrSc., prof. Ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc., Ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc., prof. Ing. Jan Velišek, DrSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Prof. Dr. Werner Baltes (Germany), Dr. Reto Battaglia (Switzerland), Ing. Milan Kováč, CSc. (Slovak Republic), Prof. Dr. Halina Kozłowska (Poland), Prof. Dr. Radomir Lászity (Hungary), O. Univ. Prof. Dr. Werner Pflannhauser (Austria), Prof. Ing. Alexander Příbela, DrSc. (Slovak Republic)

Editor-in-chief – Vedoucí redaktorka

RNDr. Marcela Braunová

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, preliminary reports, short communications and reviews. Paper are published in English, Czech, or in Slovak.

Periodicity: The journal is published six times a year. Volume 16 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: + 420 2 25 10 98, fax: + 420 2 242 538 39, e-mail: editor@login.cz. Both the dates of the reception of the manuscript and of the acceptance by the editorial board for publishing will be indicated in the printed contribution.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address. Subscription price for 1998 is 84 USD (Europe) and 88 USD (overseas).

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, předběžná a krátká sdělení a odborná review. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo ve slovenštině.

Periodicitá: Časopis vychází šestkrát ročně. Ročník 16 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou kopiích je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Marcela Braunová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/25 10 98, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. V uveřejněném příspěvku se uvádí jak datum doručení rukopisu do redakce, tak i jeho přijetí redakční radou k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány na celý rok na adrese: Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 336 Kč.

Determination of Residual Acetaldehyde in Polyethylene Terephthalate Bottles by Solid Phase Microextraction

Helena ČÍŽKOVÁ, Michal VOLDŘICH, Jaroslav DOBIÁŠ

Institute of Chemical Technology – Department of Food Preservation and Meat Technology,
Prague, Czech Republic

Abstract

ČÍŽKOVÁ H., VOLDŘICH M., DOBIÁŠ J. (1998): Determination of residual acetaldehyde in polyethylene terephthalate bottles by solid phase microextraction. Czech J. Food Sci., 16: 81–84.

Acetaldehyde, a common degradation product of polyethylene terephthalate (PET), is formed during the melt polycondensation reaction and melt processing of PET. Residual acetaldehyde can affect beverage taste and hence consumer acceptance. The use of solid-phase microextraction (SPME) for residual acetaldehyde determination in PET bottles was studied. A rapid and sensitive method was modified and optimised. Acetaldehyde is extracted within 8 minutes using a carbowax/divinylbenzene coated fused silica fibre inserted into the PET inner air-space. Fibre is then inserted into the injector of a GC for 2 minutes for thermal desorption and analysis. Detection limit of the procedure was 0.5 ml/l, relative standard deviation was lower than 7%. The content of 50 analysed PET bottles varied from 0.5 to 4.0 ml/l for clear and from 0.5 to 5.2 for green bottles.

PET bottle; acetaldehyde; solid phase microextraction (SPME)

Acetaldehyde (AA) is a common degradation product of polyethylene terephthalate (PET), which is one of the most frequently used material for food packaging. AA is formed during the melt polycondensation reaction and melt processing of PET (Dong et al., 1980). Concentration of free acetaldehyde dissolved in polymer varies from 0.5 to 10 mg/kg. When bottles are filled, acetaldehyde can slowly liberate to the bottle content, so that its final amount in packed food or beverages rises to several tens or hundreds µg/l (Voldřich et al., 1995). Acetaldehyde release is related not only to heat history of polymer and properties of packed stuff but it is also a function of geometrical features, weight, storage time and storage temperature of PET container. Additional acetaldehyde contributed to beverages by its package can impart a sufficient flavour to change the taste of beverages, which are widely filled to plastic bottles. That could be unpleasant especially in the case of neutrally tasting mineral waters, where migration phenomena can potentially change the quality of drinks (Monarca et al., 1994).

For the reduction of the level of residual acetaldehyde in beverages, control of processing conditions of PET bottles is necessary. It could be done by running determination in PET preforms and bottles, or by control of acetaldehyde migration out of freshly blown PET container into inner air-space. Residual acetaldehyde concentration in the air-space of bottles presented by producers is maxi-

mally 4 and 15 µg/l for clear and coloured PET bottles, respectively, and is usually in the range from 0.5 to 25 µg/l (Anon y m, 1980).

The direct head-space/GC method has been applied for determination of acetaldehyde concentration in the air space of bottles for many years (Anon y m, 1984; Wyatt, 1983). The aim of this work was to evaluate the use of a relatively new isolation method – the Solid Phase Microextraction (SPME) – for the determination of acetaldehyde content in PET bottles. The SPME is an extraction technique for organic compounds, by which analytes are adsorbed directly from the sample onto a fused-silica fibre which is coated with appropriate stationary phase. While the fibre is inserted into the sample, the analytes partition from the sample matrix into the stationary phase until equilibrium is reached. The fiber is then inserted into the heated injection port of gas chromatograph (GC) and the analytes are rapidly thermally desorbed into the capillary GC column for analysis (Minn drup, 1994; Harmon, 1997).

MATERIALS AND METHODS

Stocks of 0.6 and 1.5 l clear and green PET bottles used by producers of soft drinks were analysed by SPME/GC method. Freshly blown PET bottles were purged with a steady stream of nitrogen for 30 min, then were stored at 20 °C for 24 h. SPME method was used for direct sampling

from PET bottles, 65 mm carbowax/divinylbenzene or 100 mm polydimethylsiloxane coating of fibre (Supelco Inc., Bellefonte, USA) was inserted for 1, 5, 10, 20 and 30 min to the inner space of bottle. The fiber was then inserted into the GC injection port for thermal desorption.

Acetaldehyde content was determined on Carlo Erba model HRGC 5300 capillary gas chromatograph equipped with flame ionisation detector (250 °C) and 30 m DB-wax capillary column (0.32 mm id. $\times$ 0.25 mm film thickness). The splitless injector was maintained at 180, 200, 230 and 250 °C and desorption times 10, 20, 30, 90, 120 and 300 s were used. The column temperature was rising from 70 to 180 °C at 5 °C/min, carrier gas (He) flow was 1.6 ml/min.

RESULTS AND DISCUSSION

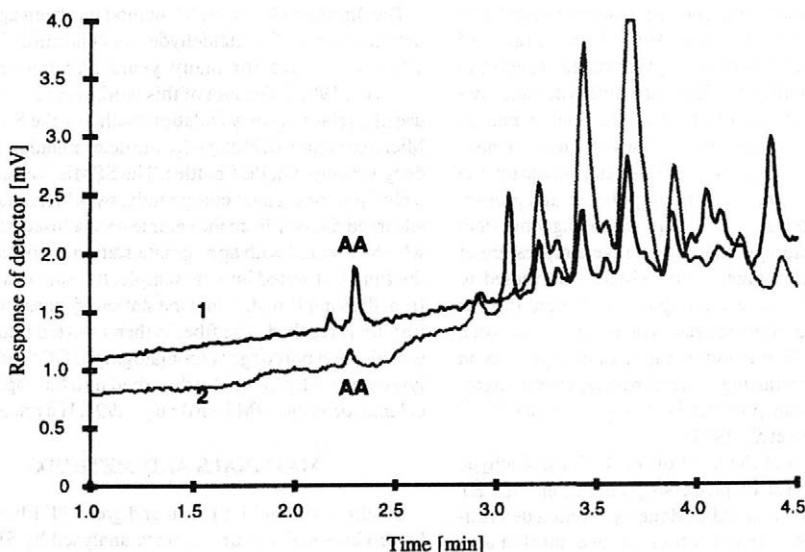
The SPME is a relatively new, simple, time saving technique. Considerable simplification of handling the acetaldehyde sample before GC analysis is the main advantage of SPME. Regarding the price, this method is not suitable for routine serial determination of acetaldehyde, but can be used for occasional analyses of lower amounts of samples. At the present time several kinds of fiber coatings are available, at our laboratory the nonpolar polydimethylsiloxane and polar carbowax/divinylbenzene coatings of fibre were tested. Out of these two coatings of different polarity, the polar carbowax/divinylbenzene coating of fibre was proper for absorption of very polar and volatile acetaldehyde. The polydimethylsiloxane is also applicable, but the efficiency, which is caused by differences in coating's affinity to the target analyte, will be lower in the case of less polar coating (Fig. 1).

To determine the optimal adsorption and desorption conditions for polar carbowax/divinylbenzene coatings of fibre, the PET bottles, freshly blown or spiked with acetaldehyde at the levels 5, 10, 20 mg/l, were analyzed.

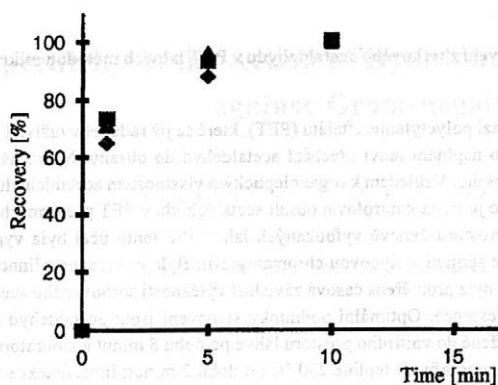
The dependence of absorbed amount of acetaldehyde on the time of adsorption for the freshly blown samples is given in Fig. 2. The equilibrium between solid-phase coating and gaseous phase – PET inner air-space – was reached for all tested concentrations within 10 minutes. Time profile of mass absorbed by the fiber coating showed that in the range of tested concentrations of acetaldehyde, theoretical recovery from 83 to 97% was reached in 8 minutes. Therefore an optimal time of adsorption was chosen 8 minutes, which can guarantee sufficient reproducibility of the method and this time can speed up sampling.

Temperature of desorption – temperature of GC injector – did not have any significant influence on the response of detector in the range of tested temperatures (from 200 to 250 °C), which was recommended by the producer of fiber. Dependence of mass of desorbed acetaldehyde into the GC column on the holding time in injector is presented in Fig. 3. Total desorption was reached within 120 seconds for all tested concentrations.

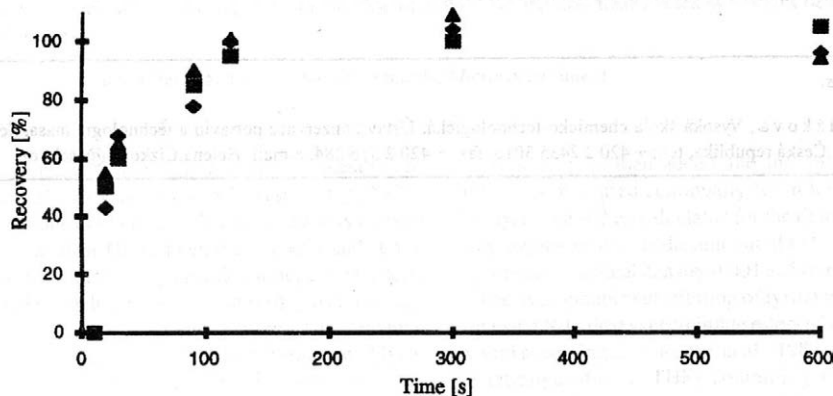
Optimal conditions for determination of acetaldehyde in freshly blown PET bottles by SPME are – sampling: polar carbowax/divinylbenzene coatings of fibre, time of adsorption 8 min, laboratory temperature, desorption: temperature 230 °C, time 2 minutes, recommended GC conditions are described in Materials and Methods chapter. Quantification was based on calibration curve method. The detector response was linearly proportional to the quantities of acetaldehyde in the range from 2 to 100 μ g/l. The



1. Overlaid chromatograms showing the response differences of residual acetaldehyde (AA) in PET bottle toward polar carbowax/divinylbenzene (1) and nonpolar polydimethylsiloxane (2) SPME phases



2. Time profile of recovery of mass of acetaldehyde absorbed by the carbowax/divinylbenzene fibre for different concentrations: ordinary PET bottle (♦), spiked samples in level 5 (■) and 10 (▲) µg/l of acetaldehyde



3. Time profile of recovery of mass of acetaldehyde thermodesorbed from the carbowa/divinylbenzene fibre for different concentrations: ordinary PET bottle (♦), spiked samples in level 5 (■) and 10 (▲) µg/l of acetaldehyde

detection limit was about 0.5 µg/l. Repeatability of the procedure was tested by analyses of 5 identical samples of fresh blown bottles, the relative standard deviation was 6.9%.

The acetaldehyde content in 50 samples of freshly blown PET bottles (clear and green) was analysed using the SPME method, the obtained concentrations were from 0.5 to 4.0 µg/l and 0.5–5.2 µg/l for clear and green bottles, respectively. The results were in good agreement with those obtained by direct headspace method of acetaldehyde determination (Anonym, 1980).

References

- ANONYM (1980a): Standard method for determining the 24 hour airspace acetaldehyde content of freshly blown PET bottles. Appendix A, Part III, Johnson Controls Plastics N.V.
- DONG M., DIEDVARDO A. H., ZITOMER F. (1980): Determination of residual acetaldehyde in polyethylene terephthalate

bottles, preforms, and resins by automated headspace gas chromatography. *J. Chrom. Sci.*, 18: 242–246.

HARMON A. D. (1997): Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Flavors. In: R. MARSILI (Ed.): *Techniques for Analysing Food Aroma*. New York, Marcel Dekker Inc.: 81–112.

MINNDRUP R. F. (1994): Solid phase microextraction simplifies preparation of forensic, pharmaceutical, and food and beverage samples. *Supelco Int.*, 14: 2.

MONARCA S., DE FUSCO R., BISCARDI D. (1994): Studies of migration of potentially genotoxic compounds into water stored in PET bottles. *Food Chem. Toxic.*, 32: 783–788.

VOLDŘICH M., DOBIÁŠ J., ČURDA D. (1995): Head-Space stanovení acetaldehydu v PET preformách a láhvích používaných v České republice. *Potrav. Vědy*, 13: 49–56.

WYATT M. D. (1983): Semi-automation of headspace GC as applied to determination of acetaldehyde in polyethylene terephthalate beverage bottles. *J. Chrom. Sci.*, 21: 508–511.

Received February 17, 1998

Souhrn

ČÍŽKOVÁ H., VOLDŘICH M., DOBIÁŠ J. (1998): Stanovení zbytkového acetaldehydu v PET lahvích metodou mikroextrakce na tuhé fázi (SPME). Czech J. Food Sci., 16: 81–84.

Acetaldehyd je běžnou složkou obalových materiálů na bázi polyetylentereftalátu (PET), které se již řadu let využívají pro balení sycených nealkoholických nápojů a minerálních vod. Po naplnění lahví přechází acetaldehyd do obsahu. Nalezená množství kolísají podle podmínek od jednotek do stovek μl na litr obsahu. Vzhledem k organoleptickým vlastnostem acetaldehydu tak může být negativně ovlivněna senzorická hodnota nápoje. Proto je třeba kontrolovat obsah acetaldehydu v PET preformách a lahvích a zároveň sledovat migraci acetaldehydu do vnitřního prostoru čerstvě vyfoukaných lahví. Pro tento účel byla vypracována a ověřena izolační metoda mikroextrakce na tuhé fázi ve spojení s plynovou chromatografií. Byla porovnána účinnost izolace acetaldehydu pomocí dvou sorbentů odlišné polarity, dále byla proměřena časová závislost výtěžnosti sorbovaného acetaldehydu a závislost výtěžnosti metody na teplotě a době termodesorpce. Optimální podmínky stanovení jsou: acetaldehyd se izoluje adsorpcí na polární vlákno (carbowax/divinylbenzen) vložené do vnitřního prostoru láhve po dobu 8 minut a laboratorní teplotě; desorpce probíhá v nástříkové komůrce plynového chromatografu při teplotě 230 °C po dobu 2 minut; limit detekce metody je 0,5 μl acetaldehydu na litr vnitřního prostoru; relativní směrodatná odchylka stanovení je menší než 7 %. Metoda byla použita k analýze 50 vzorků lahví o objemu 0,5 a 1,5 l. Obsah acetaldehydu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 0,5 až 4 $\mu\text{l/l}$ u bílých a 0,5–5,2 $\mu\text{l/l}$ u zelených lahví.

PET láhve; acetaldehyd; mikroextrakce na pevné fázi (SPME)

Contact address:

Ing. Helena Čížková, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervace potravin a technologie masa, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel.: + 420 2 2435 3013, fax: + 420 2 316 284, e-mail: Helena.Cizkova@vscht.cz

Specificity of the Action of Hydrophobically Substituted Lysozyme against Gram-negative Bacteria*

Marija GOTTVALDOVÁ, Alexandra PROŠKOVÁ, Jiří KUČERA

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

GOTTVALDOVÁ M., PROŠKOVÁ A., KUČERA J. (1998): Specificity of the action of hydrophobically substituted lysozyme against Gram-negative bacteria. Czech J. Food Sci., 16: 85–87.

Hen egg lysozyme was hydrophobised using N-lauryl- or N-palmitoyl-oxysuccinimide. Its antimicrobial activities were detected against different Gram-negative bacteria. The lytic activity is controlled not only with the hydrophobicity. The lysis of Gram-negative bacteria was slow compared with the Gram-positive ones but they finally reach as much as 68% of the lysis of Gram-positive ones.

lysozyme derivatives; antibacterial action; *Pseudomonas putida*; *Micrococcus luteus*

Lysozyme (muramidase, E.C. 3.1.2.9) is frequently used as a food preservative (A k a s h i, 1970; Eisai Comp., 1972). The most serious drawback of this application is its very low activity against Gram-negative bacteria and fungi. Nevertheless, the activity against Gram-negative bacteria can be raised by hydrophobisation of lysozyme molecule, for instance by the way of substitution of the enzyme surface by large chain fatty acid. The substitution of lysozyme with palmitic acid (I b r a h i m et al., 1991) or perillaldehyde (I b r a h i m et al., 1994) were used for hydrophobisation.

In the present study we have compared the activity of lysozyme substituted by lauric or palmitic acid against a set of Gram-negative bacteria. Only some of these bacteria were sensitive to such hydrophobically substituted enzyme.

MATERIAL AND METHODS

Lysozyme (food grade) was purchased from PROMED factory, Prague, CZ. N-hydroxysuccinimide esters of lauric acid and palmitic acid were obtained from SIGMA, Fine Chemicals.

Lysozyme activity was determined according to the method of P r o c k o p and D a v i d s o n (1964) based on a nephelometric determination of the lysis of *Micrococcus luteus* under standard conditions. *Micrococcus luteus* is suspended in 67mMol phosphate buffer pH 6.3 to the optical density at 546 nm in the range of 0.3 to 0.5. 37.5 µl of the lysozyme solution (5 mg dissolved in the

same buffer) is then added and the optical density at 546 nm is measured continually for at least 15 minutes. The lysis rate is then calculated for the time zero. One unit of lysozyme activity is the amount of the enzyme causing a decrease of optical density 0.001 at 546 nm.

The hydrophobic substitution of lysozyme was carried-out using N-hydroxysuccinimide esters of appropriate fatty acid according to H a q u e et al. (1982). Ten milliliters of tetrahydrofuran (THF) containing the appropriate amount of N-hydroxysuccinimide ester of appropriate acid (0.7 or 1.4 mM final concentration in the reaction mixture) were gradually added to 40 ml of 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing a single concentration of lysozyme (0.7mM). While the mixture agitated at 25 °C, the pH was brought to 9.0 with NaOH (1M). The reaction mixture was incubated for one hour with gentle agitation. The pH is then adjusted to 7.0 with HCl (1M), and the mixture was subsequently dialyzed for 2 days at 4 °C against buffer containing 1M NaCl. Thereafter the precipitated product is separated by centrifugation and dried with ice-cold diethylether. The protein is then dialyzed exhaustively for three days against distilled water and lyophilized. Degree of substitution was 1 : 1 in each case. Degree of substitution is verified according to the same authors.

Protein concentration was determined with the Lowry method in the modification of H a r t r e e (1972).

The bacteria, *Pseudomonas putida* strain 7, *Ps. putida* strain 8, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, and *Escherichia coli*, were grown at 37 °C in meat-peptone medium for 16 hours. The cultivation broth

* This work was supported by the Grant Agency of Czech Republic, grant No. 525/96/0523.

was then diluted with 67mM phosphate buffer solution pH 6.3 to the final optical density at 546 nm of 0.6. Solution of lysozyme (0.1 ml) or modified lysozyme (0.1 mg protein per ml of the same buffer) was then added. The rate of the decrease of optical density at 546 nm was then measured after 30 s induction period. The initial rate was then calculated for each bacterium.

Scanning spectrophotometer Philips, model PU 8730, was used for all photometric determinations.

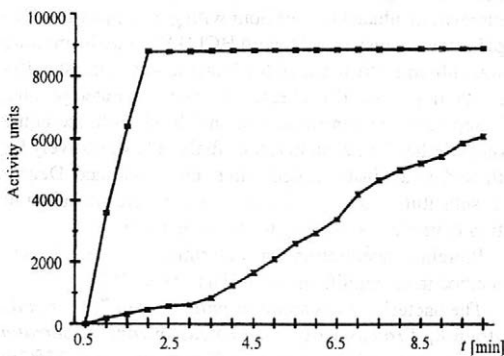
RESULTS AND DISCUSSION

Lysozyme, lauryl-lysozyme, and palmitoyl-lysozyme were compared for their action on different Gram-negative bacteria (Table I).

I. Comparison of the lysis of selected Gram-negative microorganisms using lysozyme, lauryl-lysozyme, and palmitoyl-lysozyme

Microorganism	Enzyme activity [units per ml]		
	lysozyme	lauryl-lysozyme	palmitoyl-lysozyme
<i>Pseudomonas putida</i> strain 7	1280	763	1486
<i>Ps. putida</i> strain 8	0	22	177
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	18
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	24	12
<i>Escherichia coli</i>	0	16	34

The course of lysis of *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas putida* was plotted and the results are shown in Fig. 1. The results show a different sensitivity to lysozyme, lauryl-lysozyme, and palmitoyl-lysozyme in the series of Gram-negative strains used. The sensitivities of strains referred to in Table I are relatively low compared with



■ *M. luteus* ▲ *Ps. putida*

1. The lysis of *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas putida* strain 7 using palmitoyl-lysozyme

those of Gram-positive bacteria. Moreover, remarkable differences were found between both fatty acids. No direct relationship between the length of fatty acid aliphatic chain and activity was found. Some Gram-negative bacteria were surprisingly more sensitive to lauryl-lysozyme, others to palmitoyl-lysozyme. The activity of such hydrophobically substituted lysozyme against Gram-negative bacteria is controlled by more complex relationships than the hydrophobicity itself. In the case of *Ps. putida* strain 7, which is sensitive even to unsubstituted lysozyme, the lauryl-lysozyme gives lower inhibition compared with both the unsubstituted lysozyme as well as palmitoyl-lysozyme. The differences are probably caused by the differences in the steric orientation of individual hydrophobic moieties in the cell wall structure of the bacteria. The longer aliphatic chain fits better the structure than the shorter one. Moreover, the shorter aliphatic chain could interfere with the binding site of the lysozyme itself giving lower activity compared with unsubstituted lysozyme.

The time dependence of the lysis of Gram-negative bacteria with palmitoyl-lysozyme differs from that of Gram-positive bacteria, as shown in Fig. 1. The lysis of Gram-positive bacterium (*M. luteus*) was complete within 2 minutes, but the lysis of Gram-negative one was still not complete after 10 minutes of reaction.

As a conclusion, the result show that the use of hydrophobically substituted lysozyme is possible in food preservation, as the lower lysis rate is not crucial in these cases. Lysozyme is usually added to the food product and it can act there all the shelf-life of such food.

References

- AKASHI A. (1970): Preservative effect of egg white lysozyme on salami sausage. *Jpn. J. Zootechnol. Sci.*, 41: 143.
- EISAI COMPANY (1972): Fish Product Preservation. Japanese Patent 57/10/72.
- HAQUE Z., MATOBA T., KITO M. (1982): Incorporation of fatty acid into food proteins: Palmitoyl soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 481-486.
- HARTREE E. F. (1972): Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- IBRAHIM H. R., HATTA H., FUJIKI M., KIM M., YAMAMOTO T. (1994): Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1813-1817.
- IBRAHIM H. R., KATO A., KOBAYASHI K. (1991): Antimicrobial effects of lysozyme against Gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 2077-2082.
- PROCKOP D. J., DAVIDSON W. D. (1964): A study of urinary and serum lysozyme in patients with renal disease. *New Engl. J. Med.*, 270: 269-274.

Received February 17, 1998

Souhrn

GOTTVALDOVÁ M., PROŠKOVÁ A., KUČERA J. (1998): **Specificita působení hydrofobně substituovaného lysozymu proti gramnegativním bakteriím.** Czech J. Food Sci., 16: 85–87.

Vaječný lysozym jsme hydrofobizovali vazbou kyseliny laurové nebo kyseliny palmitové prostřednictvím reaktivních esterů těchto kyselin. Poměr reagujících složek (lysozym a příslušná kyselina) byl regulován tak, aby stupeň substituce byl 1 (na 1 mol lysozymu 1 mol acylu). Takto hydrofobizovaný lysozym jsme testovali na bakteriolytickou účinnost proti vybraným gramnegativním bakteriím a srovnávali jsme ji s bakteriolytickou účinností proti základnímu testovacímu mikroorganismu *Micrococcus luteus*. Ukázalo se, že citlivost různých gramnegativních bakterií k hydrofobizovanému lysozymu se značně liší a to nejen podle druhu bakterie, ale také podle délky alifatického (hydrofobního) řetězce kyseliny. Jen v některých případech vedlo prodloužení řetězce ke zvýšení účinnosti. Výsledky ukazují, že hydrofobizace je co do typu hydrofobního substituentu pro gramnegativní bakterie relativně specifická. Lyze gramnegativních bakterií byla v porovnání s grampozitivními pomalejší, ale v konečném stadiu dosahovala 68 % lyze grampozitivních bakterií.

deriváty lysozymu; antibakteriální akce; *Pseudomonas putida*; *Micrococcus luteus*

Contact address:

Ing. Marija Gottvaldová, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 702 315, fax: + 420 2 701 983, e-mail: j.kucera@vupp.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: + 420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address.

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	177,-	195,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	177,-	195,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	177,-	195,-
Lesnictví – Forestry	12	177,-	195,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	145,-	152,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	6	84,-	88,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	56,-	58,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	56,-	58,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	56,-	58,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	56,-	58,-

Výskyt a detekce nitrátreduktasy v potravinářských vzorcích

Gabriela JENÍKOVÁ, Martina MACKOVÁ, Jarmila PAZLAROVÁ, Kateřina DEMNEROVÁ

*Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology,
Prague, Czech Republic*

Abstract

JENÍKOVÁ G., MACKOVÁ M., PAZLAROVÁ J., DEMNEROVÁ K. (1998): **Occurrence and detection of nitrate reductase in food samples.** Czech J. Food Sci., 16: 89–94.

The production of nitrate reductase (NR) by microorganisms contaminating food products was monitored. The enumeration of viable microorganisms was performed in eleven food samples, the number of coliform bacteria was estimated and the ratio of bacterial strains exhibiting nitrate reductase activity was determined. Identification of selected coliform strains was performed microscopically and by biochemical tests. In all food samples the presence of N-nitrosamines was evaluated. A bacterial strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was chosen for the purification of nitrate reductase due to high production of this enzyme. The strain was originally isolated from hopped wort. Nitrate reductase isolated from this bacterium was characterized as assimilatory nitrate reductase (EC 1.6.6.1) and it was found that this enzyme is located in cytosol. Activity of nitrate reductase and the growth of bacteria was monitored. After 8 hours cultivation the production of enzyme reached its maximum. After desintegration and extraction with phosphate buffer (pH = 7.5) it was precipitated by polyethyleneglycol and purified by ionex chromatography on DEAE-celulose. The purification procedure gave 51.3% recovery of NR activity with 15.8 fold purification.

nitrate reductase; N-nitrosamines; bacteria; food samples

Souhrn

JENÍKOVÁ G., MACKOVÁ M., PAZLAROVÁ J., DEMNEROVÁ K. (1998): **Výskyt a detekce nitrátreduktasy v potravinářských vzorcích.** Czech J. Food Sci., 16: 89–94.

Byla sledována produkce nitrátreduktasy (NR) u bakterií izolovaných z potravinářských výrobků. U jedenácti vzorků potravin byl stanoven celkový počet bakterií, počet koliformních bakterií a určen podíl bakteriálních kmenů s nitrátreduktasovou aktivitou. Byla provedena identifikace vybraných koliformních kmenů na základě barvení podle Grama a biochemických testů. U potravinových vzorků byl rovněž sledován obsah N-nitrosaminů. Nitrátreduktasa byla izolována z kmene *Pseudomonas pseudoalcaligenes* pocházejícího z pivní mladiny. Enzym byl charakterizován jako asimilační nitrátreduktasa vyskytující se v cytoplasmě (EC 1.6.6.1). Sledováním tvorby nitrátreduktasy v závislosti na době růstu produkčního kmene byla určena optimální doba kultivace 8 hodin. Surový enzym byl po dezintegraci buněk extrahován fosfátovým pufrům (pH = 7,5), purifikován srážením polyetylenoglykolem a ionexovou chromatografií na DEAE-celulose. Purifikačním postupem bylo dosaženo stupně přečištění 15,8 a výtěžnosti 51,3 %.

nitrátreduktasa; N-nitrosaminy; bakterie; potraviny

Studium mikrobiální a rostlinné nitrátreduktasové aktivity vedlo k objevu tří rozdílných typů enzymu nitrátreduktasy, které se liší svou lokalizací v buňce a začleněním do metabolických drah. Asimilační nitrátreduktasa se nachází v cytoplasmě buněk rostlin, hub a bakterií a katalyzuje první krok asimilace nitrátu do biomolekul (S m a r e l l i, C a m b e l l, 1980). Disimilační nitrátreduktasa se vyskytuje pouze u některých bakterií, kde se účastní anaerobní respirace – procesu, při kterém nitrát slouží jako terminální akceptor elektronů membránového dýchacího řetězce místo kyslíku (C a r l s o n et al., 1982). Podle buněčné lokalizace se disimilační nitrátreduktasy dělí na membránové a periplazmatické (B o n n e f o y, D e M o s s, 1994). Disimilační redukce nitrátu denitrifikujícími bakteriemi je hlavní příčinou ztráty dusíkatých látek z půdy a také z odpadních i podzemních vod.

V potravinářském průmyslu představují mikroorganismy s nitrátreduktasovou aktivitou nebezpečné kontaminanty, neboť produkty redukce nitrátu (nitrit a oxidy dusíku) podléhají v potravinách nitrosacími reakcím (se sekundárními a terciárními aminy, amidy a kvartérními amonií sloučeninami) za tvorby karcinogenních N-nitro-

sosloučenin (G a n g o l l i et al., 1995). Proto je obsah nitratu a nitritu sledován a limitován zdravotními normami.

V předložené práci se zabýváme stanovením bakterií s nitrátreduktasovou aktivitou ve vzorcích potravin a jejich izolací s cílem nalézt vhodné podmínky pro jejich inaktivaci a samotnou izolaci enzymu nitrátreduktasy z vybraného produkčního kmene.

MATERIÁL A METODY

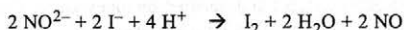
Použité mikroorganismy

Ze vzorků potravin byla získána řada bakteriálních kmenů. Koliformní bakterie byly identifikovány pomocí komerčně dostupných identifikačních souprav Enterotestu a Nefermtestu. Pro izolaci nitrátreduktasy byl používán bakteriální kmen *Pseudomonas pseudoalcaligenes* získaný z mladiny při procesu výroby piva v Plzeňském pivovaru.

Stanovení aktivity nitrátreduktasy

Jodoškrobová metoda

Metoda slouží k rychlé identifikaci nitrátredukujících bakterií rostoucích na agarové půdě obsahující KNO_3 a je založena na reakci:



Filtrační papír nasycený roztokem škrobu a KI se položí na bakteriální kolonii a zvlhčí se několika kapkami 2M kyseliny octové. Vznik modrofialového zbarvení je důkazem přítomnosti dusitanových iontů (B o k v a j o v á et al., 1993), které vznikají z dusičnanových iontů působením nitrátreduktasy.

Spektrofotometrická metoda (Mac Gregor, 1978)

Do zkumavky se pipetuje 200 μl vzorku (buňky nebo buněčný extrakt), 50 μl metylviolegenu (0,5%), 25 μl roztoku NaHCO_3 (0,8%) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,8%) a 25 μl KNO_3 (1M). Po uplynutí 10 minut od přidání dusičnanu do reakční směsi je reakce zastavena promícháním na vortexu (do ztráty modrého zbarvení). Následuje přidání 500 μl roztoku kyseliny sulfanilové (1 % ve 20% HCl) a 500 μl N-naftyletylendiaminu (0,129%), po 10 min se odstředí sražené bílkoviny (5500 $\times$ g, 10 min) a měří se absorbance při 540 nm proti slepému pokusu, který obsahuje místo roztoku KNO_3 stejné množství fosfátového pufru (0,01M; pH 7,5). Kalibrační křivka se proměňuje s roztoky nitritu o různých koncentracích.

Aktivita enzymu se počítá podle tohoto vztahu:

$$\text{aktivita [mU/ml]} = \Delta A \cdot V_t \cdot df / t \cdot V_s \cdot 1,0 \cdot k$$

kde: V_t – celkový objem [ml]

V_s – objem roztoku enzymu [ml]

df – zředovací faktor

ΔA – A vzorek – A slepý pokus

t – doba reakce [min]

$1,0$ – dráha světla [cm]

k – koeficient kalibračního přepočtu

1 U je definována jako aktivita enzymu katalyzující přeměnu 1 mol substrátu za 1 min.

Testy potravinových vzorků

10 g vzorku potravin v 90 ml sterilního MAX roztoku (MAXimum recovery diluent, Oxoid) bylo homogenizováno na homogenizátoru Stomacher po dobu 1 minuty. Po dalším ředění roztokem MAX byly vzorky použity pro rozřet 100 μl alikvot na Petriho misky s kultivačními médii pro zjištění celkového počtu bakterií – PCA (plate count agar, Oxoid), počtu koliformních bakterií – VRBA (violet red bile agar, Oxoid) a média pro kultivaci bakteriálních kmenů s nitrátreduktasou – LB + KNO_3 (Luria-Berthani broth, Oxoid + 1,0 g KNO_3 / l). Po kultivaci při 37 °C po dobu 24 až 48 h byl určen počet kolonií a výsledky porovnány s platnou potravinářskou normou (výnos 75 MZSV ČR – Hlavního hygienika ČR o mikrobiologických požadavcích na poživatiny a jejich obaly, svazek 65/1990). Kolonie koliformních bakterií a bakterií rostoucích na půdě LB + KNO_3 byly přeočkovány na další misku s LB + KNO_3 a byly testovány na přítomnost NR jodoškrobovou metodou. Dále byla provedena identifikace vybraných koliformních kmenů pomocí Enterotestu (Lachema Brno).

Další testované mikroorganismy byly izolovány v průběhu procesu výroby piva z pivní mladiny v pivovaru Staropramen. Tyto bakterie byly identifikovány pomocí Gramova barvení, Enterotestu a Nefermtestu (Lachema Brno) a rovněž byly testovány na přítomnost NR aktivity jodoškrobovými papírky.

Stanovení nitrosaminů

Pro stanovení celkového množství nitrososloučenin byla použita jednoduchá spektrofotometrická metoda (Telling, Dunnet, 1981; Coker et al., 1991) s několika modifikacemi.

20 g vzorku potravin bylo po přidání 20 ml roztoku NaCl (20%) a 0,5 g sulfamátu sodného zhomogenizováno a směs byla inkubována při teplotě 4 °C (20 min). Po vytřepání 50 ml n-hexanu, filtrací a oddělení hexanové vrstvy byla vodná vrstva extrahována 2 $\times$ 50 ml ethylesteru kyseliny octové.

Spojené ethylacetátové frakce byly koncentrovány na vakuové odparce (vodní lázeň o teplotě 50 °C) na výsledný objem asi 1 ml. Poté byla směs rozdělena po 0,5 ml do dvou zkumavek: A = stanovený vzorek, B = slepý pokus (pokud byl objem po odpařování menší než 1 ml, byl doplněn ledovou kyselinou octovou).

A: + 0,200 ml denitrosančního činidla (3% HBr v ledové kyselině octové) – inkubace 5 min ve vodní lázni při teplotě 50 °C

B: + 0,200 ml destilované vody

A, B: + 0,200 ml roztoku kyseliny sulfanilové (0,2% ve 20% HCl) – inkubace 5 min + 0,100 ml roztoku N-naftyletylendiaminu (0,1%) – inkubace 25 min

Po 25 minutách bylo vizuálně vyhodnoceno růžové zbarvení vznikajícího azobarviva. Hodnocení bylo pro-

vedeno semikvantitativně, protože působením denitro-
sačního činidla vznikala u většiny vzorků zákal, což zne-
možnilo měření absorbance při 540 nm.

Isolace a purifikace nitrátreduktasy

Kultivace bakterií

Isolovaný bakteriální kmen *Pseudomonas pseudocaligenes* byl uchováván na šikmém masopeptonovém aga-
ru (Imuna, Šarišské Michalany) při teplotě 4 °C. Zároveň
byla kultura v tekutém médiu zamrazena v 25% glycerolu
při teplotě –80 °C.

Inokulum bylo připraveno kultivací za třepání ve 100 ml
LB média (Luria-Berthani broth, Oxoid) 16 h při 28 °C. Poté
bylo 8 ml inokula převedeno do Erlenmayerových baněk
se 100 ml LB média. Kultivace probíhala 8 h za teploty
28 °C a třepání (120 RPM).

Extrakce surového preparátu

Po oddělení kultivačního média (3400 × g, 30 min) byly
buňky resuspendovány ve 300 ml fosfátového pufru
(0,01M; pH 7,5) a znovu odstředěny. Odstředěné buňky

suspendované v 10 ml fosfátového pufru (0,01M, pH = 7,5)
s Tritonem X-100 byly dezintegrovány ultrazvukem 20 × 30 s
za současného chlazení v ledové tříšti. Suspenze byla
po dezintegraci odstředěna (45700 × g, 25 min., 4 °C), pe-
leta resuspendována v 5 ml roztoku fosfátového pufru
(0,01M, pH = 7,5) a ve frakcích stanovena NR aktivita.

Srážení bílkovin polyetylglykolem

Srážení bílkovin polyetylglykolem bylo použito jako
purifikační krok pro hrubé přečištění surového enzymo-
vého preparátu od některých balastních bílkovin. K suro-
vému extraktu NR byl za míchání a chlazení v ledové tříšti
pomalu přikapáván stejný objem 40% (w/v) roztoku PEG
(6 000–8 000) obsahující 0,2M KCl. Po 72 h stání při
4 °C byly vysrážené bílkoviny odstředěny (25 min,
45 700 × g, 4 °C), precipitát bílkovin rozpuštěn v 0,01M
fosfátovém pufru (pH = 7,5). V supernatantu i precipitátu
byla stanovena aktivita NR a koncentrace bílkovin (B r a d-
f o r d, 1976). Vzorky byly odsoleny za použití kolonek
Centricon. Precipitát byl použit pro další purifikaci ionexo-
vou chromatografií.

I. Počty bakterií stanovené v potravinových vzorcích – Bacterial counts determined in food samples

Potravina ¹	Norma CPM	Nález CPM	Norma kolif.	Nález kolif.	NR% z kolif.	LB+KNO ₃ počet	NR% z LB+KNO ₃
Šunka ²	10 ⁴	2,2.10 ⁴	0	1,35.10 ⁴	50	1,2.10 ⁴	71
Salám ³	10 ⁴	0	0	0	0	0	0
Párek ⁴	10 ⁴	10 ⁶	0	0	0	10 ⁶	0
Balkánský sýr ⁵	–	3.10 ⁴	5*10 ²	2.10 ²	100	1,5.10 ⁴	17
Eidam ⁶	–	10 ⁶	0	2,5.10 ²	100	2,6.10 ⁵	0
Uzená makrela ⁷	5.10 ³	10 ³	10 ²	0	0	10 ²	0
Hlávkový salát ⁸	10 ⁵	10 ⁶	10 ²	2,3.10 ³	100	10 ⁶	0
Kyselé zelí ⁹	–	10 ⁶	0	0	0	10 ⁶	0
Červené víno ¹⁰	10 ³	0	0	0	0	0	0
Pivo ¹¹	50	0	0	0	0	0	0
Zeleninový salát ¹²	5.10 ⁴	9.10 ⁴	10 ²	8.10 ²	100	7.10 ⁴	14

Norma CPM, Norma kolif. – CPM regulation, colif. regulation = celkový počet mezofilních (koliformních) bakterií podle výnosu 75
MZSV ČR – Hlavního hygienika ČR o mikrobiologických požadavcích na potraviny a jejich obaly, svazek 65/1990 – total counts
of mesophilic (coliform) bacteria pursuant to Decree 75 issued by the Ministry of Public Health of CR – Chief Hygienist Officer
of CR, on microbiological requirements for foods and their packages, Item 65/1990

– u balkánského sýra a kyselého zelí není normou limitován celkový počet mezofilních bakterií – total counts of mesophilic bacteria
are not established for Balkan cheese and sauerkraut by the Regulation

Nález CPM, Nález kolif. – CPM finding, colif. finding = celkový počet bakterií (počet koliformních bakterií) nalezený ve vzorku
potravin – total counts of bacteria (counts of coliform bacteria) detected in a food sample

NR% z kolif. – NR% of colif. = procentuální počet nitrátredukcujících bakterií z nalezeného počtu koliformních bakterií – percentage
counts of nitrate-reducing bacteria out of the total counts of coliform bacteria

LB+KNO₃ počet – LB + KNO₃ counts = počet bakterií získaný kultivací na půdě s obsahem nitrátu – counts of bacteria produced by
cultivation in nitrate-containing medium

NR% z LB+KNO₃ – NR% out of LB + KNO₃ = procentuální počet nitrátredukcujících bakterií z nalezeného počtu bakterií získaných
kultivací na půdě s obsahem nitrátu – percentage counts of nitrate-reducing bacteria out of the counts of bacteria produced by
cultivation in nitrate-containing medium

¹food; ²ham; ³salami; ⁴sausage; ⁵Balkan cheese; ⁶Eidamer; ⁷smoked mackerel; ⁸lettuce; ⁹sauerkraut; ¹⁰red wine; ¹¹beer; ¹²vegetable salad

Ionexová chromatografie na DEAE-celulose

Vzorek po srážení PEG a následném odsolení byl aplikován na kolonu s DEAE-celulosou (délka 6 cm, průměr 2,5 cm). Eluce byla prováděna gradientem iontové síly 0–1M NaCl ve fosfátovém pufru (0,01M, pH = 7,5). Byly jímány frakce o konstantním objemu 10 ml, rychlost průtoku kolonou byla stanovena na 54 ml/h.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Testy bakteriálních kmenů z potravinových vzorků

U vzorků potravin byl zjištěn celkový počet bakterií (ČSN ISO 4833), počet koliformních bakterií (ČSN ISO 4832) a počet nitrátredukujících bakterií. Výsledky jsou zpracovány v tab. I.

Z tabulky vyplývá, že u tří vzorků testovaných potravin, šunky, hlávkového salátu a zeleninového salátu, byly překročeny normou povolené limity výskytu bakterií, a to jak celkového počtu, tak koliformních kmenů. V ostatních potravinách k překročení normy nedošlo, avšak absolutní nepřítomnost bakterií u piva byla pravděpodobně způsobena pasterizací konečného výrobku a nevypovídá o podmínkách při výrobě.

U potravinových vzorků byla provedena identifikace některých bakteriálních kmenů pomocí Enterotestu (tab. II).

II. Identifikace bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků potravin – Identification of bacterial strains isolated from food samples

Potravina ¹	Bakterie izolované z potravin ⁷
Šunka ²	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
Balkánský sýr ³	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter gergoviae</i>
Eidam ⁴	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i>
Hlávkový salát ⁵	<i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia rubidaea</i>
Zeleninový salát ⁶	<i>Cedecea davisae</i> <i>Pseudomonas</i> sp.

¹food; ²ham; ³Balkan cheese; ⁴Eidamer; ⁵lettuce; ⁶vegetable salad; ⁷bacteria isolated from foods

Z pivovaru Staropramen bylo získáno sedm bakteriálních kmenů izolovaných při výrobním procesu z pивní mladiny. Bylo provedeno Gramovo barvení – všechny testované kmeny byly identifikovány jako Gram-negativní tyčinky. Výsledky charakterizace pomocí Enterotestu a Nefertestu jsou uvedeny v tab. III.

Výsledky ukazují, že při fermentačním procesu výroby piva dochází ke kontaminaci bakteriálními kmeny, které mají často nitrátreduktasovou aktivitu. Jejich činnost vznikají už v pивní mladině z přítomných nitrátů nitrity a při

III. Identifikace bakteriálních kmenů z pивní mladiny – Identification of bacterial strains from hopped wort

Číslo kmene ¹	Identifikace ²	NR aktivita ⁴
1	nefermentující, blíže neurčeno ³	+
2	nefermentující, blíže neurčeno	+
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	–
4	<i>Cedecea davisae</i>	+
5	<i>Serratia</i> sp.	+
6	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	+
7	<i>Serratia liquefaciens</i>	–

¹strain no.; ²identification; ³not fermenting, not specified; ⁴NR activity

dalším zpracováním existuje zvýšené riziko vzniku karcinogenních N-nitrososloženin. Tato bakteriální kontaminace piva se ve finálním výrobku procházejícím pasterizací a dalšími antimikrobiálními stabilizačními procesy neprojevuje, avšak produkty metabolismu nitrátredukující mikroflóry jsou potenciálně nebezpečné.

Stanovení obsahu N-nitrosaminů

Byl stanovován obsah N-nitrosaminů ve vzorcích potravin. Vyhodnocení bylo provedeno pouze semikvantitativně vizuálním porovnáním zabarvení analyzovaných vzorků proti odpovídajícím slepým vzorkům, protože spektrofotometrické stanovení bylo zatíženo velkou chybou vznikající v důsledku vzniklého zakalení denitrosovaného vzorku a nikoliv už slepého pokusu (tab. IV).

IV. Obsah N-nitrosaminů ve vzorcích potravin – N-nitrosamines contents in food samples

Potravina ¹	Obsah N-nitrosaminů ¹³
Šunka ²	+++
Salám ³	–
Párek ⁴	+
Balkánský sýr ⁵	+
Eidam ⁶	–
Uzená makrela ⁷	++
Hlávkový salát ⁸	neurčeno, dochází k extrakci chlorofylu ¹⁴
Kyselé zelí ⁹	–
Červené víno ¹⁰	+
Pivo ¹¹	+++
Zeleninový salát ¹²	++

– negativní reakce – negative reactions

+, ++, +++ pozitivní reakce s rostoucí intenzitou zbarvení (+++ odpovídá řádové hodnotě 0,1 mg N-nitrososloženin v 1 kg potravině) – positive reactions with increasing color intensity (+++ corresponds to the value of 0.1 mg N-nitrosocompounds per 1 kg food)

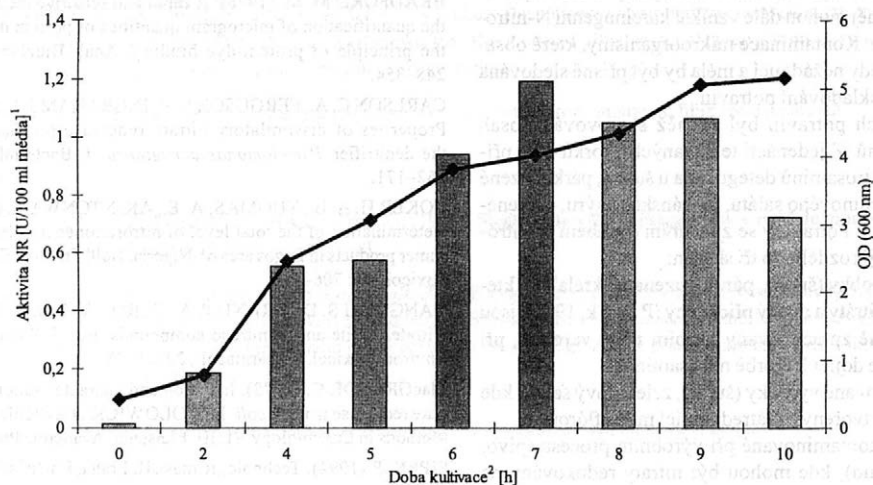
¹food; ²ham; ³salami; ⁴sausage; ⁵Balkan cheese; ⁶Eidamer; ⁷smoked mackerel; ⁸lettuce; ⁹sauerkraut; ¹⁰red wine; ¹¹beer; ¹²vegetable salad; ¹³N-nitrosamines content; ¹⁴not determined, chlorophyll extraction takes place

U vzorku hlávkového salátu nebylo možné určit intenzitu růžového zabarvení, protože při extrakci přechází chlorofylové barvivo do analyzované směsi a intenzivním zeleným zabarvením ruší vyhodnocení stanovení.

Izolace a purifikace NR

Stanovení růstové křivky a optimální doby produkce nitrátreduktasy

Buňky mikroorganismu *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, který byl vybrán jako vysoce produkční kmen izolovaný při procesu výroby piva z mladiny, byly kultivovány v LB médiu v baňkách za současného třepání při teplotě 28 °C. V průběhu kultivace byly po hodinových intervalech odebírány vzorky pro stanovení růstu biomasy a aktivity NR. Byla stanovena růstová křivka a doba nejvyšší produkce enzymu (obr. 1). Z těchto výsledků vyplývá, že nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena mezi 7. a 8. hodinou kultivace (pozdní exponenciální fáze).



¹NR activity (U/100 ml medium); ²cultivation time

1. Růstová křivka kmene *Pseudomonas pseudoalcaligenes* a jeho produkce NR – Growth curve of the strain *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and its NR production

V. Celková bilance purifikace – Total purification balance

	Objem ² [ml]	Aktivita specifická ³ [mU/mg]	Stupeň přečištění ⁴	Výtěžnost ⁵ [%]
Surový extrakt ¹	6,0	1,1	1,0	100,0
Supernatant PEG	11,0	2,6	2,3	–
Ionexová chrom.	5,3	2,6	2,3	58,0
Spojené frakce	30,0	17,9	15,8	51,3

supernatant PEG = supernatant po srážení polyetylen glykolem – supernatant after polyethyleneglycol precipitation

ionexová chrom. = vzorek po srážení polyetylen glykolem aplikovaný na ionexovou chromatografii – sample after polyethyleneglycol precipitation applied to ionex chromatography

spojené frakce – conjugated fractions = frakce po ionexové chromatografii s nejvyšší NR aktivitou – fractions after ionex chromatography with the highest NR activity

¹crude extract; ²volume; ³specific activity; ⁴re-purification rate; ⁵yield

Ionexová chromatografie na DEAE-celulose pro vzorek srážený polyetylen glykolem

Surový extrakt byl srážen polyetylen glykolem, jehož výsledná koncentrace byla 20 % (w/v). Sraženina byla po odstředění (45700 × g, 25 min, 4 °C) resuspendována v 5 ml fosfátového pufru (0,01M, pH = 7,5) a vzorek byl odsolen na kolonkách Centricon. Výsledný preparát byl aplikován na kolonu s DEAE-celulosou. NR byla eluována gradientem iontové síly v šesti frakcích při koncentraci elučního gradientu 0,25 M NaCl. Po stanovení aktivity a koncentrace bílkovin byly spojeny tři neaktivnější podíly, u kterých byla stanovena aktivita a množství bílkovin. Bilance jednotlivých purifikačních kroků je shrnuta v tab. V.

Popsaným purifikačním postupem bylo dosaženo stupně přečištění 15,8 a výtěžnost procesu byla 51,3 %. Přestože tímto postupem nebyl získán homogenní preparát, došlo k výraznému snížení obsahu balastních bílkovin za současného zachování 51 % původní aktivity NR.

Závěr

Zkoušky mikrobiální nezávadnosti potravin

U vzorků potravin byl zjištěn celkový počet potravin: u šunky, hlávkového salátu a zeleninového salátu byl překročen normou povolený limit výskytu bakterií, a to jak celkového počtu, tak koliformních kmenů.

U všech vzorků mimo šunku platí, že veškeré koliformní bakterie, které se v potravinách vyskytovaly, měly NR aktivitu. Přestože u vzorku piva nebyla zjištěna žádná bakteriální kontaminace, byly izolovány bakteriální kmeny s NR aktivitou z pивní mladiny. Při fermentačním procesu výroby piva tedy dochází ke kontaminaci bakteriálními kmeny, které mají často nitrátreduktasovou aktivitu, která se ve finálním výrobku ošetřeném pasterizací a dalšími antimikrobiálními stabilizačními procesy neprojevuje, avšak produkty metabolismu nitrátredukující mikroflóry jsou potenciálně nebezpečné.

Působením NR je v kontaminovaných potravinách tvořen nitrit a z něj mohou dále vznikat karcinogenní N-nitrososloučeniny. Kontaminace mikroorganismy, které obsahují NR, je tedy nežádoucí a měla by být přísně sledována při výrobě i skladování potravin.

Ve vzorcích potravin byl rovněž stanovován obsah N-nitrosaminů. Z jedenácti testovaných vzorků byla přítomnost N-nitrosaminů detegována u šunky, párku, uzené makrely, zeleninového salátu, balkánského sýru, červeného vína a piva. Potravin se zjištěným obsahem N-nitrosaminů se dají rozdělit do tří skupin:

1. Masné výrobky (šunka, párek a uzená makrela), do kterých jsou nitráty a nitrity přidávány (P i p e k, 1994), jsou dále tepelně zpracovávány uzením nebo vařením, při nichž může dojít i k tvorbě nitrosaminů.
2. Kontaminované výrobky (šunka, zeleninový salát), kde jsou nitrity tvořeny nitrátredukující mikroflórou.
3. Výrobky kontaminované při výrobním procesu (pivo, červené víno), kde mohou být nitráty redukovány na nitrity v průběhu výroby nitrátredukující mikroflórou, která se již ve finálním výrobku nevyskytuje.

Poslední dvě skupiny podporují teorii, že výskyt nitrátredukující mikroorganismů vede ke zvýšenému riziku tvorby nitrosaminů.

Částečná purifikace enzymu nitrátreduktasy

Z růstové křivky byla stanovena optimální délka kultivace v závislosti na produkci nitrátreduktasy mezi 7. a 8. hodinou, tj. v pozdní exponenciální fázi růstu. Pro dezinte-

graci buněk byla použita sonikace buněk s přidavkem Tritonu X-100. Vzhledem k tomu, že po dezintegraci byla frakce supernatantu NR neaktivnější, byl enzym charakterizován jako asimilační nitrátreduktasa vyskytující se v cytoplazmě (EC 1.6.6.1). Surový enzymový preparát byl hrubě přečištěn srážením polyetylen glykolem. Vzorek byl odsolen za použití kolonek Centricon. Přečištěný vzorek byl dále purifikován ionexovou chromatografií na DEAE-celulose. Tímto purifikačním postupem bylo dosaženo stupně přečištění 15,8 a výtěžnosti 51,3%.

Literatura

- BOKVAJOVÁ A., DEMNEROVÁ K., ŠUCHOVÁ M., KRÁLOVÁ B., KRÁL M. (1993): Inhibition of nitrate reductase activity of microbial contamination in hopped wort. *Potrav. Vědy*, 11: 225–253.
- BONNEFOY V., DeMOSS J. A. (1994): Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 47–56.
- BRADFORD M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–354.
- CARLSON C. A., FERGUSON L. P., INGRAHAM J. L. (1982): Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 151: 162–171.
- COKER H. A. B., THOMAS, A. E., AKINTONWA A. (1991): Determination of the total level of nitrosamines in select consumer products in Lagos area of Nigeria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 706–710.
- GANGOLLI S. D., BRAND P. A., FERON V. J. et al. (1995): Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur. J. Pharmacol., Environ. Toxicol. – Pharmacol.*, 292: 1–38.
- MacGREGOR C. (1978): Isolation and characterization of nitrate reductase from *E. coli*. In: COLOWICK., PACKER (Eds.): *Methods in Enzymology* VL III. *Fleischer*. Academic Press Inc.
- PIPEK, P. (1994): *Technologie masa II*. Praha, Ediční středisko ČVUT.
- SMARELLI Jr. J., CAMBELL W. H. (1980): Activation of *Thalassiosira pseudonana* NADH:nitrate reductase. *Phytochemistry*, 19: 1601–16105.
- TELLING G. M., DUNNET P. C. (1981): The determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) at trace levels in shampoos and skin creams by a simple, rapid colorimetric method. *Inter. J. Cosmetic Sci.*, 3: 241–248.

Došlo 27. 1. 1998

Kontaktní adresa:

Ing. Gabriela Jeníková, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel.: +420 2 2435 3021, fax: +420 2 311 99 90, e-mail: gabriela.jenikova@vscht.cz

Sledovanie vybraných prvkov v modelovom procese výroby škrobu z amarantu

Mária KOREŇOVSKÁ, Patrícia ZAUŠKOVÁ, Gabriela HALÁSOVÁ¹

Food Research Institute, Bratislava; ¹Slovak Technical University
– Faculty of Chemical Technology, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

KOREŇOVSKÁ M., ZAUŠKOVÁ P., HALÁSOVÁ G. (1998): Observation of selected elements in a model process of starch production from amaranth. Czech J. Food Sci., 16: 95–98.

The distribution of selected elements (Cd, As, Hg, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe) into starch, protein and fibre from amaranth in model process of amaranth starch production (alkaline mode) was studied. Dependence of selected elements cumulation on the wetting time in alkaline solution was determined. It was shown that the mode of alkaline starch preparation is suitable for starch production from amaranth in view of contamination elements content.

selected elements; cumulation of elements; starch from amaranth; protein from amaranth; fibre from amaranth

Súhrn

KOREŇOVSKÁ M., ZAUŠKOVÁ P., HALÁSOVÁ G. (1998): Sledovanie vybraných prvkov v modelovom procese výroby škrobu z amarantu. Czech J. Food Sci., 16: 95–98.

V modelovom procese výroby amarantového škrobu – alkalickým spôsobom sme sledovali distribúciu vybraných prvkov (Cd, As, Hg, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe) do škrobu, bielkoviny a vlákniny. Zistili sme závislosť kumulácie jednotlivých prvkov od doby máčania v alkalickom roztoku. Z hľadiska obsahu kontaminujúcich prvkov je alkalický spôsob prípravy amarantového škrobu vhodný pre technologický proces výroby škrobu.

vybrané prvky; kumulácia prvkov; amarantový škrob; amarantová bielkovina; amarantová vláknina

Amarant (laskavec) je starobylá úžitková rastlina rodu *Amaranthus* (L), ktorú pestovali už starí Inkovia, Aztékovia a Mayovia. Zrno amarantu považovali za posvätné pre jeho vysokú výživovú hodnotu. Dnes je amarant už známa plodina ako potravinová – krmovina a ako liečivá rastlina. Amarant je možné využiť aj v škrobárskom priemysle, pretože práve tu sa hľadajú stále nové suroviny na uspokojenie požiadaviek nových technológií pre nové výrobky v potravinárskom, textilnom, papierenskom, poľnohospodárskom a farmaceutickom priemysle. V súčasnom období sa laboratórne modelujú výrobné procesy škrobu s cieľom nájsť optimálny postup výroby s maximálnou výťažnosťou škrobu. Škrob je polymér glukózy a hromadí sa ako produkt asimilácie v určitých častiach rastlín, napr. v semenách, koreňoch a hl'uzách. Škrobové zná uložené ako bunkové inklúzie majú pre každý druh rastliny charakteristickú stavbu a majú sprievodné látky. Sprievodné látky, ktoré sú sčasti chemicky pevne spojené, podmieňujú špeciálne vlastnosti rôznych druhov škrobu.

Zo sacharidov je v zrno amarantu najviac zastúpený škrob. Jeho obsah sa pohybuje od 48 % (*Amaranthus cruentus*) až po 72 % (*Amaranthus hypochondriacus*). Zrnká amarantového škrobu patria k najmenším čo do veľkosti, ktorá sa pohybuje v priemere okolo 1 µm. Z komerčne dostupných škrobov má najmenšie zrnká ryžový škrob. Amarantový škrob ako škrob zo pseudocereálií (pohánka, mrľík) je na rozdiel od cereálnych škrobov uložený nie v endosperme, ale v perisperme. Je pevne viazaný s bielkovinami škrobu. Vyskytuje sa ako voskový alebo ako škrob s malým obsahom amylózy, v priemere 4–15 %. Toto všetko má za následok jeho špecifické fyzikálno-chemické vlastnosti a ovplyvňuje to aj izoláciu.

Všeobecne je dôležité izolovať zrníčka škrobu priamo z rastlinného pletiva, vyhnúť sa použitiu metód, ktoré môžu spôsobiť degradáciu. Extrakcia a purifikácia škrobov z cereálií je oveľa ťažšia ako z iných botanických vzorov, pravdepodobne preto, že cereálne zná obsahujú menej vody.

V priemyselnom meradle sú škrobové zrná uvoľnené z matrice v procese máčania zrna s prípravným napučaním vo vode.

MATERIÁL A METÓDY

Na sledovanie vybraných prvkov (As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Cu, Fe, Zn) v modelovom procese výroby škrobu z amarantu sme použili atómovú absorpčnú spektrometriu na grafitovej kyvete (interné metódy akreditovaného skúšobného laboratória VÚP). Meranie sa robilo na atómovom absorpčnom spektrometri Perkin Elmer 4100 spojeným s HGA 700 a autosamplerom AS-70. Vzorky boli mineralizované mokrou cestou v mikrovlnnom rozkladnom systéme Milestone MLS 1200 MEGA po pridaní mineralizačnej zmesi (3,5 ml HNO₃ konc. a 0,5 ml H₂O₂), návažka vzorky bola 0,5–1,0 g v závislosti od matrice a obsahu prvku. Všetky použité chemikálie boli čistoty p.a. a Suprapur fy Merck, voda bola dvakrát destilovaná. Ortuť sa stanovila na jednouchcelom ortuťovom analyzáte AMA 254 fy Altec bez predchádzajúcej úpravy vzorky. Správnosť metódy stanovenia As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Cu, Fe a Zn bola kontrolovaná na certifikovaných referenčných materiáloch: BCR 189 (wholemeal flour), ČSRM 12–2–05 (ražná chlebová múka), GBW 08502 (rice flour), ČSRM 12–2–03 (lucerna P – ALFALFA). Výsledné hodnoty sú priemernou hodnotou z troch paralelných stanovení.

Jednotlivé frakcie modelového procesu výroby amarantového škrobu boli pripravené na Katedre potravín a sacharidov CHTF – STU v Bratislave. Izolovali škrob z odrody vypěstovanej v Rusku pod názvom Elbrus, z odrody *Amaranthus hypochondriacus* vypěstovanej na Slovensku na malej farme v Slatinách nad Bebravou a z krížencov *Amaranthus hypochondriacus* × *Amaranthus hybridus*. Vzorky krížencov boli pokusne vypěstované v Nemecku (označené hybrid 33 K 432 a 19 K 343).

V priemyselnom meradle sú škrobové zrná uvoľnené z matrice v procese máčania zrna s prípravným napučaním

vo vode. Na Katedre potravín a sacharidov CHTF – STU aplikovali alkalický spôsob máčania v kombinácii s mletím zasucha (krížence 33 K 432 a 19 K 343) alebo mokrym mletím (vzorky Elbrus a *Amaranthus hypochondriacus*).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tab. I–II sú namerané obsahy ortuti, olova, kadmia, arzenu, chrómu, niklu, medi, zinku a železa v jednotlivých frakciách (vedľajších produktoch) modelového procesu prípravy amarantového škrobu. V tab. III–IV je teoretické percentuálne vyhodnotenie obsahov sledovaných prvkov v škrebe a vedľajších produktoch výroby. Pri výpočtoch sme vychádzali z obsahov škrobu, bielkoviny a vlákny v zrnách rôznych druhov amarantu, ktoré boli publikované (Vetter, 1994; Lorenz et al., 1984; Goriostein et al., 1991; Wroniak et al., 1995; Laovora-vit et al., 1986), nakoľko sme nemali k dispozícii konkrétnu látkovú bilanciú. V druhu *Amaranthus hypochondriacus* bolo 72 % škrobu, v ostatných druhoch sme počítali so 60 % výťažnosťou. Vlákny sme uvažovali 4 % vo všetkých druhoch (publikované hodnoty sa pohybovali od 2,9 do 4,6 %). Bielkoviny sme počítali 16,5 % pre krížence a 14,5 % pre druh *Amaranthus hypochondriacus*. V týchto tabuľkách sú preto len informačné hodnoty, ktoré nám približujú možnú distribúciu sledovaných prvkov do jednotlivých frakcií v modelovom procese prípravy amarantového škrobu alkalickým spôsobom.

Pri modelovom spôsobe prípravy amarantového škrobu (druhy *A. elbrus* a *A. hypochondriacus*), v ktorom sa zrno mlelo zamokra (máčané 4 h v 0,25 % NaOH), sa ortuť, olovo, meď a zinok najviac vyskytovali v škrebe (70 až 160 %), do bielkoviny prechádzali v menšom množstve (11 až 86 %) a vo vláknine sa nachádzali len minimálne (2 až 10 %). Obsah kadmia, arzenu, chrómu a železa v škrebe bol nižší ako vo vstupnej surovine (zrne), ale aj v ostatných frakciách sme zistili nízky obsah týchto kovov. Predpokladáme, že pri alkalickom máčaní a premývaní sa tieto kovy

I. Modelový výrobný proces škrobu z amarantu druh *Amaranthus hypochondriacus* a *Amaranthus elbrus* – Model process of starch production from amaranth species *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus elbrus*

Prvok ¹ [mg/kg]	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>				<i>Amaranthus elbrus</i>			
	zrno ¹¹	bielkovinná frakcia ¹²	škrob ¹³	vlákna ¹⁴	zrno	bielkovinná frakcia	škrob	vlákna
Ortuť ²	0,012	0,038	0,036	0,015	0,012	0,023	0,040	0,022
Olovo ³	0,220	0,390	0,290	0,120	0,260	0,955	0,455	0,250
Kadmium ⁴	0,028	0,026	0,013	0,011	0,024	0,025	0,011	0,016
Arzen ⁵	0,060	0,072	0,040	0,018	0,046	0,037	0,020	0,028
Chrómu ⁶	0,599	0,181	0,412	1,22	0,677	0,217	0,211	2,01
Nikel ⁷	1,27	1,55	0,985	0,884	1,34	2,14	1,44	0,247
Meď ⁸	5,57	6,12	6,59	2,80	3,00	2,38	3,59	7,87
Zinok ⁹	65,3	254,0	107,0	52,3	20,2	141,0	57,0	57,1
Železo ¹⁰	36,0	34,2	17,4	13,7	68,0	16,6	12,7	16,1

¹element; ²mercury; ³lead; ⁴cadmium; ⁵arsenic; ⁶chromium; ⁷nickel; ⁸copper; ⁹zinc; ¹⁰iron; ¹¹grain; ¹²protein fraction; ¹³starch; ¹⁴fibre

II. Modelový výrobný proces škrobu z amarantu – hybrid 19 K 343 a 33 K 432 – Model process of starch production from amaranth – hybrid 19 K 343 and 33 K 432

Prvok ¹ [mg/kg]	19 K 343				33 K 432			
	zrno ¹¹	bielkovinná frakcia ¹²	škrob ¹³	vláknina ¹⁴	zrno	bielkovinná frakcia	škrob	vláknina
Ortuť ²	0,006	0,034	0,004	0,017	0,014	0,086	0,003	0,011
Olovo ³	1,00	3,10	2,77	0,620	0,220	0,690	0,590	0,245
Kadmium ⁴	0,025	0,115	0,015	0,020	0,044	0,118	0,017	0,076
Arzén ⁵	0,753	0,094	0,063	0,135	0,279	0,039	0,023	0,298
Chróom ⁶	3,13	0,521	0,366	0,474	0,435	0,303	0,210	0,568
Nikel ⁷	7,05	8,96	5,71	1,95	2,61	4,83	1,61	1,21
Meď ⁸	10,6	33,8	0,776	7,69	9,60	32,4	0,754	7,48
Zinok ⁹	45,3	220,0	195,0	181,0	44,2	300,0	159,0	189,0
Železo ¹⁰	134,0	70,0	19,6	24,3	113,0	69,5	15,3	21,3

For 1–14 see Table I

III. Distribúcia prvkov do frakcií – druh *Amaranthus hypochondriacus* a *Amaranthus elbrus* – Distribution of elements into fractions – species *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus elbrus*

Prvok ¹ [%]	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>				<i>Amaranthus elbrus</i>			
	bielkovina ¹¹	škrob ¹²	vláknina ¹³	suma ¹⁴ [%]	bielkovina	škrob	vláknina	suma [%]
Ortuť ²	40,5	167,0	4,4	211,9	23,7	176	7,3	207,0
Olovo ³	22,7	70,0	1,7	94,4	45,5	92,0	3,4	100,4
Kadmium ⁴	11,8	29,3	1,2	42,3	12,9	24,4	2,4	39,7
Arzén ⁵	15,4	42,4	0,9	58,7	10,0	23,0	2,2	35,2
Chróom ⁶	3,9	43,8	6,3	54,0	4,0	16,5	10,5	31,0
Nikel ⁷	15,7	49,4	2,1	67,2	19,8	57,1	0,7	77,6
Meď ⁸	15,4	85,0	2,0	102,4	11,2	71,8	10,5	93,5
Zinok ⁹	49,9	104	2,5	156,4	86,0	149,0	10,0	245,0
Železo ¹⁰	12,2	30,8	1,2	44,2	3,0	9,9	0,8	13,7

For 1–10 see Table I; ¹¹protein fraction; ¹²starch; ¹³fibre; ¹⁴sum

IV. Distribúcia prvkov do frakcií – hybrid 19 K 343 a 33 K 432 – Distribution of elements into fractions – hybrid 19 K 343 and 33 K 432

Prvok ¹ [%]	19 K 343				33 K 432			
	bielkovina ¹¹	škrob ¹²	vláknina ¹³	suma ¹⁴ [%]	bielkovina	škrob	vláknina	suma [%]
Ortuť ²	87,0	35,0	10,0	132,0	88,6	11,4	2,8	102,8
Olovo ³	45,3	147,0	2,2	194,5	45,7	160,9	3,9	210,5
Kadmium ⁴	64,4	36,0	3,2	103,6	44,3	23,2	6,9	74,4
Arzén ⁵	1,8	4,4	0,7	6,9	2,0	4,4	3,8	10,2
Chróom ⁶	2,4	6,2	0,5	9,1	10,2	25,6	4,6	40,4
Nikel ⁷	18,6	43,0	1,0	62,6	27,1	32,8	1,6	61,5
Meď ⁸	46,6	3,9	2,6	53,1	49,3	4,2	2,8	56,3
Zinok ⁹	71,0	228,0	14,1	313,1	99,0	191,0	15,0	305
Železo ¹⁰	7,6	7,5	0,7	15,8	9,0	7,2	0,7	16,9

For 1–14 see Table III

vyplavili, ale nemali sme k analýze máčaciu a premývaciu vodu, v ktorej by sme mohli dané prvky stanoviť a potvrdiť naše predpoklady. Z hľadiska platných hygienických limitov, keď škrob posudzujeme podľa kategórií „ostatné potraviny“, všetky sledované prvky mali obsah podlimitný, len zinok pri druhu *Amarantus hypochondriacus* bol v škrobe nadlimitný.

Pri mletí zrna zasucha (krížence amarantu), pri ktorom sa zrno najprv pomlelo a potom máčalo 30 minút v 0,25% roztoku NaOH (na rozdiel od prvého spôsobu prípravy), sa prejavil zvýšený obsah ortuti, kadmia a medi v bielkovinovej frakcii, ale olovo, zinok a nikel opäť prechádzali do škrobu. Arzén, chróm a železo sa vymyli premývacou vodou a ich obsah vo všetkých frakciách bol nižší, tak ako pri prvom spôsobe prípravy škrobu. Množstvo zinku a ortuti vo frakciách pri oboch spôsoboch mletia zrna bolo nad 100 %, čo mohlo byť spôsobené vonkajšou kontamináciou roztokom NaOH a premývacou vodou. Pri mletí zrna zasucha sme namerali aj obsah olova nad 100 %. Z hľadiska platných hygienických limitov pri tomto spôsobe prípravy škrobu bol tiež zistený nadlimitný obsah zinku a pri odrode hybridu 19 K 343 aj niklu a olova, nakoľko vstupná surovina mala vyšší obsah týchto kovov.

Záver

Na záver môžeme konštatovať, že pre technologický proces výroby amarantového škrobu z hľadiska obsahu kontaminujúcich prvkov v škrobe je vhodný alkalický spôsob máčania zrna v kombinácii s mletím za sucha alebo mokrým mletím.

Literatúra

- VETTER J. (1984): Mineralstoffe und Aminosäuren in den Körnern der neu kultivierten „Pseudo-Getreide“-Art *Amaranthus hypochondriacus*. Z Lebens.-Unters. Forsch., 198: 284–286.
- LORENZ K., GROSS, M. (1984): Saccharide of amaranth. Nutrit. Repts Int., 29, 3: 721–726.
- GORIOSTEIN S., ARNO de NUE I., ARRUDA, P. (1991): Alchoho-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals. J. Agric. Food Chem., 39: 848 – 850.
- WRONIAK M., KRUSZEWSKA B., GWIAZDA, S. (1995): Nasiona amaranthus jako surowiec do otrzymywania preparatów białkowych. Przegląd Zbozowo – młynarski, 39 (8): 19 – 21.
- LAOVARAVIT N., KRATZER F. H., BECKER R. (1986): The nutritional value of amaranth for feeding chickens. Poultry Sci., 65: 1365–1370.

Došlo 28. 1. 1998

Kontaktná adresa:

RNDr. Mária Koreňovská, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava, Slovenská republika, tel.: + 421 7 543 71 40, fax: + 421 7 526 14 17, e-mail: maria.korenovska@vup.sk

Odrol smažených bramborových lupínků v průběhu skladování*

Karel PATOČKA, Jiří BLAHOVEC

Czech Agricultural University, Prague, Czech Republic

Abstract

PATOČKA K., BLAHOVEC J. (1988): **Breaking of fried potato chips during storage.** Czech J. Food Sci., 16: 99–102.

Methodology and results of measurements are presented for the breaking of fried potato chips in relation to storage time and temperature. Storage of fried potato chips called "Bohemia Chips" in original packages at a room temperature for three months does not have any significant effects on their breaking. Neither were there any changes in their breaking during storage at a cooler temperature, i.e. 9 °C, in the course of 5.5-month storage.

fried potato chips; mechanical properties; breaking; storage

Souhrn

PATOČKA K., BLAHOVEC J. (1998): **Odrol smažených bramborových lupínků v průběhu skladování.** Czech J. Food Sci., 16: 99–102.

Předložená práce uvádí metodiku a výsledky měření odrolu smažených bramborových lupínků v závislosti na době a teplotě skladování. Skladování smažených bramborových lupínků Bohemia Chips v originálním obalu při pokojové teplotě nemá po dobu tří měsíců významný vliv na změnu jejich odrolu. Při jejich skladování při teplotě chladničky (9 °C) se odrol významně nemění v průběhu celého 5,5měsíčního skladování.

smažené bramborové lupínky; mechanické vlastnosti; odrol; skladování

Kvalitní smažené bramborové lupínky musí být křehké a křupavé. Tato vlastnost bývá včleňována jako standardní parametr texturního profilu smažených lupínků (Vickers, 1987; Waele, Eijk, 1996). Žádoucí křehkost lupínků se projevuje negativně jejich odrolem při distribuci. Práce je věnována sledování sklonu k odrolu u smažených bramborových lupínků v průběhu jejich skladování.

MATERIAL A METODY

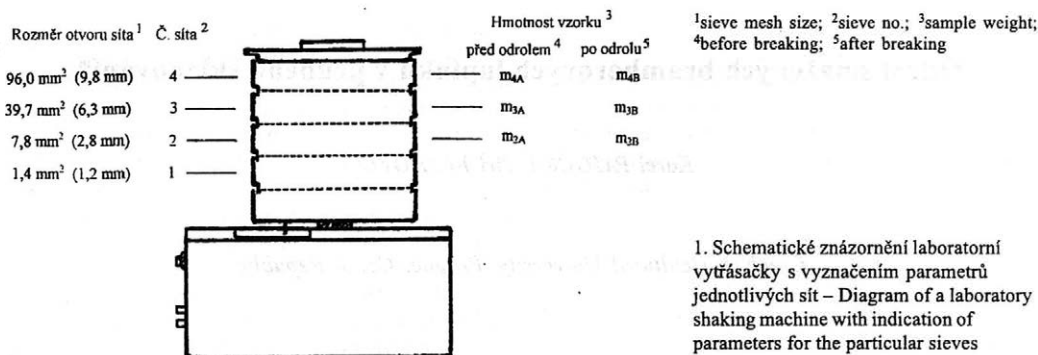
K testování odrolu smažených bramborových lupínků byl použit standardní výrobek Bohemia Chips (slané lupínky) dodaný výrobcem ve dni výroby 24. března 1997. Dodané vzorky v originálním balení byly rozděleny na dvě poloviny. První byla skladována při běžné laboratorní teplotě, která v letním období nabývala hodnot až 28 °C. Druhá polovina byla umístěna do chladničky a v ní skladována při teplotě 9 °C. Interval mezi odběry vzorků k testům byl tři týdny (poslední dvě měření v intervalu jednoho měsíce). Každý test byl opakován na čtyřech vzorcích po 100 g (přibližně obsah jednoho sáčku lupínků).

Jádrem experimentu byl síťový test, použitý nejprve k ohodnocení hmotnosti různých frakcí v odebraném vzorku (obr. 1 – m_{fr}) a později k obdobné operaci (frakce m_{fr}) u vzorku po definovaném odrolu v kulovém mlýně.

K síťové analýze byla použita sériově vyráběná vytrásačka firmy Stavební stroje, n. p. Zličín, závod Brno-Přízřenice, typ AP-2 s kruhovými sítí o průměru 180 mm uspořádanými nad sebou (obr. 1). Navážka vzorku na síť č. 4 byla $100 \pm 0,5$ g. Standardně byl používán tento režim: frekvence vytřásání 2,3 kmity/s, amplituda 68 mm, doba vytřásání 120 s. Hmotnost frakcí na sítěch byla stanovována opakovaným vážením sít před vytřásáním a po něm.

Definovaný odrol lupínků ve vzorku byl prováděn v laboratorním kulovém mlýně (výrobce Laboratorní přístroje, Praha) s porcelánovým válcovým tělesem o vnitřním průměru 22 mm a vnitřní délce 200 mm. V mlýně spolu se vzorkem rotuje 39 porcelánových koulí o průměru přibližně 35 mm a průměrné hmotnosti 54 g. Po předběžných zkouškách byly zvoleny tyto parametry testu: otáčky 30 min^{-1} a doba odrolu 10 minut.

* Práce vznikla s podporou GA ČR grantu č. 525/96/1398.



Přímým výsledkem testu bylo stanovení hmotnosti jednotlivých frakcí vzorku před odrolovým testem a po něm. K porovnání výsledků sloužily parametry označené jako relativní nárůst propadu (RNP) na jednotlivých sítích, vyjádřených pro síta 4 a 3 následujícími vztahy:

$$RNP_4 = (m_{4A} - m_{4B}) / m \quad (1)$$

$$RNP_3 = [(m_{4A} - m_{4B}) + (m_{3A} - m_{3B})] / (m_{4A} - m_{4B}) \quad (2)$$

kde: m – hmotnost vzorku

m_{4A} , m_{4B} , m_{3A} , m_{3B} – příslušné hmotnosti frakcí (obr. 1)

Na síti č. 2 již k žádnému propadu nedocházelo – relativní nárůst propadu na tomto síti byl nulový.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Střední hodnoty hmotností jednotlivých frakcí v provedených experimentech jsou uvedeny v tab. I. Tab. II shrnuje vypočtené hodnoty relativních propadů, které jsou znázorněny na obr. 2. Průkaznost rozdílů mezi naměřenými hodnotami byla prověřována párovým t -testem (tab. III).

Vzájemně testované soubory jsou charakterizovány průměrnými hodnotami a směrodatnými odchylkami. Soubory mají stejný počet naměřených hodnot, a to 4. Pro testování hypotézy významnosti rozdílů

$$d' = \left| \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \right|$$

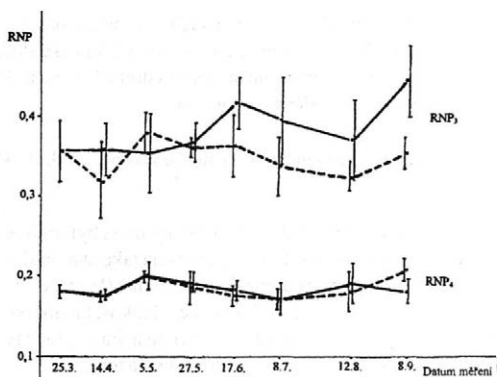
použijeme testovací veličinu t danou výrazem:

$$t = \frac{d}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}$$

Vypočtenou hodnotu t srovnáme s kritickou hodnotou $t_{\alpha(f)}$, kde počet stupňů volnosti je dán výrazem $f = 2(n-1)$ a je roven 6. Pokud $t \geq t_{\alpha(f)}$, můžeme tvrdit, že rozdíl namě-

řených hodnot relativních nárůstů propadů je významný na příslušné hladině významnosti.

Relativní nárůst propadů na síti č. 4 je relativně stálý a pohybuje se v rozmezí 0,173–0,208. Různě skladované produkty se průkazně liší pouze u posledního měření (8. 9.) a prokázaný rozdíl je v tomto případě způsoben nárůstem RNP u vzorku skladovaném při teplotě 9 °C. Na síti č. 3 je situace přesně opačná (obr. 2 a tab. III), RNP₃ je při posledním měření průkazně vyšší u vzorku skladovaném při pokojové teplotě a tento rozdíl je způsoben větším nárůstem RNP₃ pro vzorky skladované při vyšší teplotě.



¹date of measurement

2. Průběh průměrných nárůstů propadů (RNP) a jejich směrodatných odchylek v průběhu skladování při laboratorní teplotě (plná čára) a při teplotě 9 °C (přerušovaná čára – Average relative increases in fragment amount under sieve (RNP) and their standard deviations during storage at a laboratory temperature (solid line) and at a temperature 9 °C (broken line))

Relativní nárůst propadu na síti č. 3 je v případě vzorků skladovaných při teplotě 9 °C relativně stálou veličinou v celém průběhu skladování (jedná se o hodnotu 0,350 se směrodatnou odchylkou 0,036). Od těchto hodnot se liší hodnoty RNP₃ pro vzorky skladované při pokojové teplotě pro delší skladování (17. 6.–8. 9. – obr. 2). Tento rozdíl

I. Průměrné hmotnostní zůstatky vzorků smažených bramborových lupínků Bohemia Chips na sítěch různých velikostí v průběhu skladování v laboratorních a chladírenských podmínkách – Average weights of samples of fried potato chips called "Bohemia Chips" remaining on sieves of various mesh size during storage in laboratory and cooler conditions

Datum ¹	Teplotní podmínky ²	A – původní vzorek ³ [m/g]				B – drcený vzorek ⁴ [m/g]			
		č. síta ⁵				č. síta ⁵			
		1	2	3	4	1	2	3	4
25. 3. 1997	laboratorní	0,00	2,00	4,38	93,62	0,00	8,50	16,00	75,50
	chladírenské	–	–	–	–	–	–	–	–
14. 4. 1997	laboratorní	0,00	1,50	4,13	94,37	0,00	7,75	15,38	76,87
	chladírenské	0,00	0,75	1,88	97,37	0,00	6,25	13,63	80,12
5. 5. 1997	laboratorní	0,00	2,50	5,75	91,75	0,00	9,50	18,75	71,75
	chladírenské	0,00	1,50	3,75	95,25	0,00	9,00	15,50	75,50
27. 5. 1997	laboratorní	0,00	2,75	4,75	92,50	0,00	9,75	16,75	73,50
	chladírenské	0,00	1,87	3,00	95,13	0,00	8,50	14,75	76,75
16. 6. 1997	laboratorní	0,00	2,90	5,50	92,00	0,00	10,50	16,00	73,50
	chladírenské	0,00	1,75	2,75	96,00	0,00	8,13	13,50	78,37
7. 7. 1997	laboratorní	0,00	3,50	6,50	90,00	0,00	10,25	17,00	72,75
	chladírenské	0,00	1,50	2,00	96,50	0,00	7,38	13,38	79,24
12. 8. 1997	laboratorní	0,00	2,00	3,50	94,50	0,00	9,00	15,50	75,50
	chladírenské	0,00	1,00	2,90	96,10	0,00	6,75	15,00	78,25
8. 9. 1997	laboratorní	0,00	2,25	6,25	91,50	0,00	10,25	16,25	73,50
	chladírenské	0,00	1,38	1,88	96,74	0,00	8,88	15,12	76,00

¹date; ²temperature conditions; ³original sample; ⁴crushed sample; ⁵sieve no.

II. Relativní nárůsty propadů na síť č. 4 (RNP₄) a č. 3 (RNP₃) v laboratorních a chladírenských podmínkách v průběhu skladování – Relative increases in fragment amount under sieves no. 4 (RNP₄) and no. 3 (RNP₃) in laboratory and cooler conditions during storage

Datum ¹	Laboratorní podmínky ²				Chladírenské podmínky ³			
	RNP ₄		RNP ₃		RNP ₄		RNP ₃	
	průměr ⁴	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x
25. 3. 1997	0,181	0,010	0,360	0,041	–	–	–	–
14. 4. 1997	0,175	0,007	0,358	0,036	0,173	0,013	0,317	0,051
5. 5. 1997	0,200	0,018	0,353	0,054	0,198	0,005	0,380	0,025
27. 5. 1997	0,190	0,014	0,368	0,025	0,184	0,022	0,361	0,012
17. 6. 1997	0,183	0,012	0,418	0,036	0,176	0,013	0,363	0,042
8. 7. 1997	0,173	0,021	0,396	0,056	0,173	0,013	0,339	0,037
12. 8. 1997	0,190	0,025	0,372	0,050	0,179	0,024	0,32	0,019
8. 9. 1997	0,180	0,014	0,446	0,048	0,208	0,015	0,355	0,019

¹date; ²laboratory conditions; ³cooler conditions; ⁴average

byl prokázán v měřeních provedených 17. 6. a 8. 9. (tab. III). To ukazuje, že odolnost lupínků skladovaných v tmavém uzavřeném prostoru s teplotou skladování 9 °C se v průběhu příliš nemění (střední hodnota 0,350, směrodatná odchylka 0,036). Od této hodnoty se liší odolnost lupín-

ků skladovaných při pokojové teplotě (tab. III pro 17. 6. a 8. 9.). Toto srovnání ukazuje, že odolnost lupínků skladovaných při pokojové teplotě se začíná významně měnit od hodnot odolnosti lupínků skladovaných při teplotě 9 °C asi po třech měsících skladování.

III. Parametry Studentova rozdělení pro relativní nárůsty propadů – Parameters of Student's distribution for relative increases in fragment amount under sieve

	25. 3.	14. 4.	5. 5.	27. 5.	17. 6.	8. 7.	12. 8.	8. 9.
RNP ₃ , DI, T ₁ – T ₂	–	1,314	0,906	0,507	1,986	1,696	1,798	3,527 ⁺
RNP ₃ , T ₁ , D ₁ – DI	–	0,073	0,206	0,333	2,175	1,037	0,372	2,722 ⁺
RNP ₃ , T ₂ , D ₁ – DI	–	1,315	0,833	0,047	0,273	0,761	1,593	0,221
RNP ₄ , DI, T ₁ – T ₂	–	0,347	0,263	0,462	0,726	0,000	0,636	2,680 ⁺
RNP ₄ , T ₁ , D ₁ – DI	–	0,984	1,827	1,047	0,190	0,733	0,692	0,116
RNP ₄ , T ₂ , D ₁ – DI	–	1,057	2,952 ⁺	0,248	0,610	1,037	0,154	2,941 ⁺

T₁ = laboratorní teplota skladování – laboratory storage temperature; T₂ = teplota skladování v ledničce – fridge storage temperature; D₁ = první měření 25. 3. 1997 – first measurement 25th March '97; DI = měření prováděné v příslušném datu – measurement at respective dates

kritické hodnoty – critical values: $t_{0,05} = 2,447$, $t_{0,01} = 3,707$; ⁺ $P = 0,05$

Závěr

Skladování lupínků Bohemia Chips v originálním obalu při pokojové teplotě po dobu tří měsíců nemá významný vliv na změnu jejich odolnosti. Při teplotě skladování 9 °C se odolnost významně nemění v průběhu celého skladování (5, 5 měsíce).

Poděkování

Autoři by rádi poděkovali dr. Adamcovi z Chio Bohemia, a. s. v Choustníku za poskytnutí experimentálního materiálu a Ing. J. Vackovi z VÚB v Havlíčkově Brodě za pomoc při přípravě experimentu.

Literatura

VICKERS Z. M. (1987): Crispness and Crunchiness – Textural Attributes with Auditory Components. In: MOSKOWITZ H. R. (Ed.): Food Texture Instrumental and Sensory Measurements. New York, Marcel Dekker Inc.: 145–165.

WAELE E. T. de, EIJK P. C. M. van (1996): The Crispness of fried potato tissue as influenced by the physical state of its biopolymers. In: Abstr. Conf. Pap. 13 th Triennial Conf. Europ. Assoc. Potato Res., 14–19 July Veldhoven, The Netherlands.

Došlo 26. 11. 1997

Kontaktní adresa:

Mgr. Karel Patocka, Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: + 420 2 2438 3317, fax: + 420 2 20 92 22 54, e-mail: blahovec@tf.czu.cz

Mutagenní účinky vybraných mykotoxinů*

Ivo BÁRTA, Petr ŠMERÁK, Markéta SEDMÍKOVÁ, Bohumil TUREK¹, Eliška KOVÁČOVÁ¹,
Jiřina BARTOVÁ

3rd Medical Faculty, Charles University, Prague; ¹National Institute of Public Health, Prague,
Czech Republic

Abstract

BÁRTA I., ŠMERÁK P., SEDMÍKOVÁ M., TUREK B., KOVÁČOVÁ E., BARTOVÁ J.: Genotoxic effects of selected mycotoxins. Czech J. Food Sci., 16: 103–109.

The paper deals with the follow-up of mutagenic hazards posed by selected mycotoxins (ochratoxin A, patulin, penicillic acid). These substances originate in foodstuffs secondarily as products of contaminating microfungi. Mutagenic activity was assessed by the Ames test on two strains of *Salmonella typhimurium* (TA98 a TA100), and at low doses (approximating 0.1 LD₅₀) by the micronucleus test in the eucaryotic model (mouse). In the Ames test there has been detected no mutagenic activity either with or without metabolic activation in ochratoxin A, patulin or penicillic acid. In the micronucleus test ochratoxin was mutagenic at the highest doses only, penicillic acid was markedly mutagenic, and patulin was not mutagenic at all.

mutagenic activity; mycotoxins; Ames test; micronucleus test

Souhrn

BÁRTA I., ŠMERÁK P., SEDMÍKOVÁ M., TUREK B., KOVÁČOVÁ E., BARTOVÁ J.: Mutagenní účinky vybraných mykotoxinů. Czech J. Food Sci., 16: 103–109.

Rizika mutagenní aktivity vybraných mykotoxinů (ochratoxin A, patulin, kyselina penicillová), které vznikají v potravinách jako sekundární metabolity mikroskopických hub kontaminujících potraviny, byla testována Amesovým testem na dvou kmenech *Salmonella typhimurium* (TA98 a TA100) a v nízkých dávkách (blízkých 0,1 hodnoty LD₅₀) mikronukleus testem na eukaryotním modelu (myš). V Amesově testu nebyla prokázána mutagenní aktivita ani s metabolickou aktivací, ani bez ní u ochratoxinu A, patulinu a kyseliny penicillové. V mikronukleus testu byl ochratoxin A mutagenní pouze v nejvyšší koncentraci, výrazně mutagenní byla kyselina penicillová, nemutagenní byl patulin.

mutagenní aktivita; mykotoxiny; Ames test; mikronukleus test

Mykotoxiny, sekundární metabolity některých plísní, vykazují u člověka i u zvířat širokou škálu biologických účinků, včetně genotoxických. Tyto účinky představují pro člověka a hospodářská zvířata významná zdravotní rizika, jejichž dosah není dodnes zcela komplexně zhodnocen (Wood, 1992). V současnosti je popsáno více než 300 mykotoxinů.

I v našich geografických podmínkách jsou nálezy mykotoxinů či jejich metabolitů relativně časté. V předešlých pracích jsme se zabývali genotoxickým rizikem aflatoxinu B₁ a některých mykotoxinů trichothecenového typu (Bárta et al., 1990, 1991, 1995; Petr et al., 1993). K výběru ochratoxinu, patulinu a kyseliny penicillové nás vedlo především hledisko jejich častého výskytu, neboť jejich pro-

ducenti – toxinogenní plísně – patří vedle plísní produkujících AFB₁ a trichotheceny k plísním nejčastěji kontaminujícím potraviny a krmiva. Uvedené mykotoxiny se vyskytují především v nízkých koncentracích, a to jak v potravinách a krmivech, tak i ve tkáních a tělních tekutinách člověka i hospodářských zvířat (Ruprich, 1995; Turek, 1996). Současné údaje o výskytu námi sledovaných mykotoxinů jsou u nás poměrně vzácné, což neodpovídá jejich významu. Zjišťované nálezy patulinu a ochratoxinu A v našich podmínkách však upozorňují na možné aktuální riziko (A dens a m et al., 1989; Malíř, Jergoová, 1996; Ruprich, Ostrý, 1993a, b). Chronické ovlivnění organismu nízkými dávkami mykotoxinů představuje především genotoxická rizika (mutagenita, kar-

*Práce byla provedena za podpory GA ČR, projekt č. 311/94/1739.

cinogenita, embryotoxicita), účinky imunosupresivní a další nespecifická poškození. Patulin a některé další mykotoxiny jsou v rámci Codex Alimentarius řazeny mezi prioritní látky, u nichž se vyžadují informace k posouzení jejich toxicity a genotoxicity. U ochratoxinu A a patulinu byla snížena hodnota ADI, resp. PTWI (WHO, 1995). Výsledky této práce budou využitelné i v tomto směru.

Ochratoxin A je produkován několika druhy plísní rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*) a některými druhy rodu *Penicillium*, zejména *P. viridicatum* (Merve et al., 1977; Lai et al., 1970; Ciegler, 1972; Hesseltine et al., 1972; Ciegler et al., 1972 a další). Jeho častý výskyt v potravinách a potravinových řetězcích představuje závažné riziko pro hospodářská zvířata (Blunden et al., 1991). Jeho rezidua v masných výrobcích jako důsledek kontaminace krmiv a z toho vyplývající častá expozice lidského organismu byly důvodem pro řadu studií zabývajících se účinky ochratoxinu až na molekulární úrovni (Fink-Gremmels et al., 1995).

Údaje o mutagenních účincích ochratoxinu A jsou rozporné (Sun, Stahr, 1993; Bose, Sinha, 1994). Kumari a Sinha (1994) uvádějí, že 1 µg ochratoxinu A na 1 kg tělesné hmotnosti myši na den způsobuje abnormality metafázických chromozomů při mitotickém i meiotickém dělení, které lze ovlivnit retinolem, resp. vitamínem A. Opakované orální a subkutánní dávky ochratoxinu A nebyly pro myši a potkany karcinogenní (Purchase, Watt, 1971; Dickens, Waynforth, 1969). Dlouhodobé orální podávání způsobovalo u myši nádorové změny v ledvinách, játrech a plicích (Kanisawa, Suzuki, 1978; Kanisawa, 1984; Bendele et al., 1985). Ochratoxin A, kyselina penicilová a AFB₁ indukují rovněž zlomy DNA (Ueno et al., 1995). Většina autorů uvádí negativní výsledky v Amesově testu i při metabolické aktivaci (Würgler et al., 1991; Zeiger et al., 1988 a další). Karcinogenita ochratoxinu A byla experimentálně prokázána u řady zvířat (NTP, 1989).

Patulin je produkován množstvím druhů mikroskopických hub rodu *Penicillium* (*P. claviforme*, *P. patulum*, *P. expansum*, *P. leucopus*, *P. urticae* aj.), několika druhy rodu *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*) a druhem *Byssosclamyces nivea* (Chain et al., 1942; Birkinshaw et al., 1943; Anslo et al., 1943; Bergel et al., 1943; Abraham, Florey, 1949; Hooper et al., 1994 a další). Substrátem pro většinu plísní produkujících patulin (zejména *P. expansum*) jsou různé druhy ovoce, zejména jablka, takže patulin velmi často kontaminuje jablečné mošty, kde se vyskytuje v množství až 240 µg/ml (Harwig et al., 1973; Brian et al., 1956; Walker, 1956). Byl zjištěn ve šťávě z grapefruitu a jeho nálezy jsou uváděny i v plesnivém pečivu. Hodnota LD₅₀ u myši je 15–35 mg/kg, u laboratorních potkanů 15–50 mg/kg (Katzman et al., 1994; Hofmann et al., 1971 a další).

Kyselina penicilová je produkována velkým množstvím druhů mikroskopických hub rodu *Penicillium* a řadou dal-

ších druhů rodu *Aspergillus* (zejména skupiny *A. ochraceus*, kde se vyskytuje společně s ochratoxinem A). Kontaminuje především zrna různých obilovin, mouku (byla nalezena i ve sladu), luštěniny a tabák (Snow et al., 1972) a dostává se tak do potravinového řetězce domácích zvířat i člověka (Kurtzman, Ciegler, 1970). Hodnotu LD₅₀ u myši při subkutánní aplikaci určil Murnaghan (1946) na 110 mg/kg, při perorální aplikaci 600 mg/kg. Lindenfelser et al. (1973) stanovili hodnotu LD₅₀ u myši při intraperitoneální aplikaci pouze 70 mg/kg.

MATERIÁL A METODY

K posuzování mutagenní aktivity sledovaných látek byl zvolen Amesův test a mikronukleus test. Amesův test je celosvětově uznávanou metodou používanou pro screening genotoxických účinků chemických látek i jejich směsí (Ames, 1971; Ames et al., 1975; Maron, Ames, 1983). Je standardně zavedena a používána i u nás (Černá et al., 1989). Výhodou tohoto testu je jeho celosvětově rozšířenost, standardizace metody a možnost mezilaboratorního srovnávání výsledků. Jako testovací kmeny byly v této práci použity auxotrofní kmeny his⁻ bakterie *Salmonella typhimurium* TA98 a TA100. Pro aktivaci byla použita S9 frakce jaterního homogenátu z jater potkanů indukovaná směsí polychlorovaných bifenylů Aroclorem 1254.

Jako referenční mutageny (látky se známými a ověřenými mutagenními vlastnostmi – pozitivní kontrola) byly použity: 2-aminofluoren v koncentraci 10 µg/misku, v případě TA98 i TA100 jako nepřímý mutagen. Jako přímý mutagen byl použit 4-nitro-orto-fenyldiamin (NOFD) pro TA98 v koncentraci 30 µg/misku a azid sodný v koncentraci 10 µg/misku pro TA100. Testované mykotoxiny a referenční mutageny (aminofluoren, 2-nitrofenylen diamin, azid sodný) a další chemické látky (glukoso-6-fosfát a nikotinamid-dinukleotid – NADP) byly dodány firmou SIGMA-ALDRICH s. r. o.

Aminofluoren a NOFD byly ředěny koncentrovaným dimethylsuloxidem (DMSO), azid sodný byl rozpouštěn v destilované vodě. Testované mykotoxiny a referenční mutageny byly rozpouštěny v DMSO. U mykotoxinů rozpustných ve vodě (patulin, kyselina penicilová) byla jako rozpouštědlo použita sterilní destilovaná voda. Koncentrace byly ředěny tak, aby odpovídající množství testované látky bylo rozpouštěno v 0,1 ml rozpouštědla.

Koncentrace testovaných látek v Amesově testu

Ochratoxin A byl pro Amesův test na kmenech TA98 a TA100 použit v koncentracích 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0; 10,0; 0,5 a 0,1 µg na misku, kyselina penicilová byla testována v koncentracích 100,0; 10,0; 1,0; 0,1 a 0,01 µg na misku a u patulinu byly použity dávky 50,0; 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5 a 0,1 µg na misku.

Po uplynutí kultivační doby byly odečítány počty revertant na Counter Biotran III, Edison N. J. USA a na

Counteru výrobce Laboratory Imaging, Praha. Každá jednotlivá koncentrace sledovaných látek či jejich směsí byla testována v každém pokuse na třech miskách a každý pokus byl minimálně dvakrát opakován.

V každém pokusu byl sledován počet spontánních revertantů u každého kmene za přítomnosti 0,1 ml příslušného rozpouštědla na 1 misku (negativní kontrola – NK). Poměr (koeficient K) mezi průměrným počtem spontánních revertantů a průměrným počtem indukovaných revertantů u testovaných koncentrací byl použit jako základní kritérium pro hodnocení mutagenní aktivity testované látky. Statistické hodnocení mutagenity bylo provedeno stanovením intervalů spolehlivosti na základě Poissonovského rozdělení na 5% hladině významnosti. Statisticky významné rozdíly revertantů zjištěné u jednotlivých koncentrací testovaných látek proti kontrole (NK) a rozdíly mezi oběma kmeny byly hodnoceny *t*-testem.

Mikronukleus test

Mikronukleus test reprezentuje testovací metodu mutagenity *in vivo* na úrovni eukaryotního modelu používanou většinou u běžných laboratorních zvířat, která je v podstatě zjednodušenou a rychlejší variantou cytogenetické analýzy chromozomálních aberací v buňkách kostní dřeně laboratorních hlodavců (myš, potkan, křeček). Vyjadřuje schopnost testované látky indukovat chromozomální abnormality zlomového typu – efekt klastogenity (Schmid, 1975; Gregor et al., 1987; DECD, 1983).

Na základě požadavku získat údaje o mutagenní aktivitě nízkých dávek testovaných mykotoxinů a ušetřit experimentální zvířata jsme při mikronukleus testu vycházeli z 0,1 hodnoty LD₅₀ (výchozí testovaná koncentrace). Pokusným zvířatům byly aplikovány mykotoxiny a jejich kombinace intraperitoneálně v jednorázových dávkách. Koncentrace byly voleny tak, aby odpovídající množství testovaného mykotoxinu přepočtené na 10 g tělesné hmotnosti myši bylo rozpuštěno v 0,1 ml. Stejně množství rozpouštědla bylo aplikováno i kontrolní skupině.

Byly použity bílé laboratorní myši SPF kmene ICR od fy Top-Velaz o tělesné hmotnosti 20–25 g, kterým byly aplikovány testované látky v těchto koncentracích: ochratoxin A byl testován v dávkách 5,0; 2,5 a 1 mg, patulin v dávkách 3,0; 1,5 a 0,5 mg (dávkové odpovídají 0,2; 0,1 a 0,05 hodnoty LD₅₀) a kyselina penicilová v dávkách 14,0; 7,0 a 3,5 mg na 1 kg tělesné hmotnosti myši (dávkové odpovídají 0,2; 0,1 a 0,05 hodnoty LD₅₀). Doba expozice byla 24 h.

Po zpracování kostní dřeně bylo mikroskopicky hodnoceno při zvětšení 1 000krát pod imerzním objektivem u každého zvířete 1 000 polychromatofilních erytrocytů (PCHE) a stanovována frekvence mikrojadér. U každé experimentální skupiny zvířat byl vyjadřován průměrný počet mikrojadér vztažených na 1 000 PCHE.

Jako pozitivní kontrola byly použity myši ovlivněné i. p. cyklofosfamidem (referenční mutagen) v dávce 20 a 40 mg na kg. U myši ovlivněných i. p. příslušným rozpouštědlem (negativní kontrola) nebyla zjištěna signifikantně vyšší

četnost mikrojadér ve srovnání s intaktními zvířaty. Porovnáním frekvencí mikrojadér po podání testované látky a kontrolních látek byl získán základní údaj o mutagenní aktivitě testovaného vzorku. Ke statistickému hodnocení výsledků mikronukleus testu bylo použito *t*-testu na 5% hladině významnosti.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Amesův test

V Amesově testu byly průměrné hodnoty spontánních revertantů (NK – negativní kontrola) u kmene *S. typhimurium* TA98 32,3 + 7,2 bez metabolické aktivace a s metabolickou aktivací 38,6 + 8,5. U kmene *S. typhimurium* TA100 byly průměrné hodnoty spontánních revertantů 133,7 + 26,3 bez metabolické aktivace a 158,6 + 27,0 s metabolickou aktivací (tab. I – NK).

Ochratoxin A nevykázal ve všech testovaných koncentracích statisticky významné zvýšení počtu revertantů ani s metabolickou aktivací, ani bez ní. Průměrné počty revertantů a hodnoty koeficientu K jsou uvedeny v tab. I.

Patulin nevykázal u obou kmenů mutagenní aktivitu v Amesově testu s metabolickou aktivací, ani bez ní. Nejvyšší testované koncentrace měly výrazný toxický efekt. Stanovené průměrné počty revertantů a hodnoty koeficientu K jsou uvedeny v tab. I.

Kyselina penicilová nevykazovala v Amesově testu žádnou mutagenní aktivitu ani s metabolickou aktivací, ani bez ní. Rovněž statisticky nevýznamné byly rozdíly ve frekvenci revertantů mezi kmeny TA98 a TA100 (tab. I).

Mikronukleus test

V mikronukleus testu byly průměrné zjištěné počty mikrojadér v polychromatofilních erytrocytech kostní dřeně u kontrolních skupin zvířat 2,9 + 1,6 (tab. II – 7% DMSO). Rozdíly mezi samci a samicemi byly statisticky zhodnoceny a ani v jednom případě nebyly zjištěny při hladině významnosti ($\alpha = 0,01$) statisticky významné rozdíly mezi oběma pohlavími. Uvedené výsledky jsou průměrnými summárními výsledky za obě pohlaví. Zjištěné rozdíly mezi testovanými látkami a kontrolními skupinami byly hodnoceny *t*-testem při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Ochratoxin A byl aplikován i. p. v dávkách 1,0 a 2,5 mg na kg. U skupiny ovlivněné dávkou 5,0 mg/kg byly zjištěny počty mikrojadér statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Průměrné hodnoty mikrojadér v polychromatofilních erytrocytech kostní dřeně a mutagenní aktivita jednotlivých dávek jsou shrnuty v tab. II.

Patulin nevyvolal statisticky významné zvýšení tvorby mikrojadér u žádné skupiny zvířat ani u jedné z testovaných dávek (3,0; 1,5 a 0,5 mg/kg) – tab. II.

Kyselina penicilová indukovala u laboratorních myši statisticky významně vyšší frekvenci mikrojadér. Její mutagenita byla prokázána v mikronukleus testu ve všech testovaných koncentracích, tj. v rozmezí dávek 3,5 až 14,0 mg/kg (tab. II).

I. Počty revertant u kmenů TA98 a TA100 *Salmonella typhimurium* po ovlivnění ochratoxinem A, patulinem a kyselinou penicilovou – Revertant numbers in strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium* after the action of ochratoxin A, patulin and penicillic acid

<i>S. typhimurium</i> TA98					<i>S. typhimurium</i> TA100				
Dávka [mg/misku] ¹	–S9 počet revertant ²	K	+S9 počet revertant	K	–S9 počet revertant	K	+S9 počet revertant	K	
Ochratoxin A⁴									
25,0	46,7 ± 10,1	1,4	47,7 ± 9,8	1,1	153,8 ± 19,5	1,0	159,3 ± 14,4	0,9	
20,0	46,8 ± 7,6	1,4	54,2 ± 9,2	1,2	151,8 ± 30,7	1,0	165,7 ± 38,9	1,0	
15,0	43,7 ± 9,6	1,3	43,7 ± 11,3	1,0	152,3 ± 32,4	1,0	154,8 ± 14,0	0,9	
10,0	41,0 ± 4,7	1,2	50,5 ± 11,5	1,1	155,5 ± 23,6	1,0	155,8 ± 30,3	0,9	
5,0	37,0 ± 3,6	1,1	43,7 ± 12,0	1,0	154,0 ± 20,8	1,0	162,7 ± 20,6	0,9	
1,0	34,7 ± 4,2	1,0	43,8 ± 11,3	1,0	156,3 ± 28,9	1,0	162,6 ± 22,2	0,9	
Patulin⁵									
50,0	toxický efekt ³	–	toxický efekt	–	124,3 ± 39,0	0,7	107,8 ± 29,0	0,5	
25,0	19,7 ± 3,8	0,8	32,0 ± 5,0	0,8	88,8 ± 12,5	0,5	99,0 ± 12,9	0,5	
20,0	19,7 ± 2,3	0,8	33,2 ± 5,8	0,9	95,7 ± 7,6	0,5	106,3 ± 13,1	0,5	
15,0	27,5 ± 5,1	1,1	37,7 ± 2,7	1,0	113,5 ± 7,7	0,6	128,2 ± 7,5	0,6	
10,0	23,2 ± 4,5	0,9	31,3 ± 6,0	0,8	136,6 ± 24,5	0,8	146,3 ± 15,9	0,7	
5,0	26,8 ± 5,6	1,1	33,4 ± 9,6	0,9	149,6 ± 20,4	0,8	161,7 ± 19,0	0,8	
1,0	26,5 ± 8,0	1,1	34,2 ± 12,0	0,9	163,2 ± 29,5	0,9	194,7 ± 12,6	0,9	
0,5	26,3 ± 1,9	1,1	43,5 ± 12,3	1,2	193,6 ± 18,4	1,1	184,7 ± 12,0	0,9	
0,1	22,3 ± 4,2	0,9	32,2 ± 4,8	0,9	187,8 ± 19,7	1,0	181,3 ± 21,3	0,9	
Kyselina penicilová⁶									
100,0	35,9 ± 18,6	1,0	48,4 ± 16,1	0,9	127,2 ± 20,4	1,0	142,0 ± 20,7	1,1	
10,0	31,5 ± 11,8	0,8	58,3 ± 29,1	1,1	117,8 ± 25,2	0,9	123,0 ± 20,3	1,0	
1,0	42,5 ± 16,2	1,1	53,1 ± 18,8	1,0	142,0 ± 42,8	1,1	140,2 ± 26,0	1,1	
0,1	40,4 ± 19,6	1,1	52,1 ± 19,3	1,0	136,6 ± 28,2	1,1	127,9 ± 18,9	1,0	
0,01	37,9 ± 11,2	1,0	61,8 ± 17,3	1,1	138,9 ± 27,5	1,1	133,0 ± 15,8	1,0	
NK – konc. DMSO⁷									
	32,3 ± 7,2	1,0	38,6 ± 8,5	1,0	133,7 ± 26,3	1,0	158,6 ± 27,0	1,0	

–S9 = bez metabolické aktivace S9 frakcí jaterního homogenátu – without S9 metabolic activation of liver homogenate fractions
+S9 = s metabolickou aktivací – with metabolic activation

K = poměr četnosti indukovaných revertantů a spontánních revertantů – ratio of the frequency of induced revertants and spontaneous revertants

¹dose [mg per dish]; ²revertant number; ³toxic effect; ⁴ochratoxin A; ⁵patulin; ⁶penicillic acid; ⁷negative control – conc. DMSO

Ochratoxin A vykazuje v Amesově testu negativní výsledky, v mikronukleus testu byla zjištěna klastogenita v nejvyšší testované dávce. Celkově lze shrnout, že u prokaryotických mikroorganismů je ochratoxin A nemutagen (s použitím i jiných testovacích systémů) (Würgler et al., 1991), v eukaryotních buňkách jsou popsány v různých buněčných liniích jednočetné zlomy DNA, což koresponduje s potenciální klastogenitou. Pokus o indukci výměn sesterských chromatid (SCE) v kostní dřeni křečička čínské nebyl pozitivní. Ochratoxin A vytváří DNA adukty (Pfohl-Leszkowicz et al., 1991). Na základě

našich výsledků a dostupných literárních údajů doporučujeme zatím ochratoxin A posuzovat jako mutagen aktivní u eukaryotních organismů.

Patulin neindukoval v našich experimentech žádné statisticky významné genetické změny. V Amesově testu se projevovaly ve vyšších koncentracích jeho cytotoxické účinky ve shodě s údaji v literatuře (Schaeffer et al., 1975; Würgler et al., 1991). Údaje o mutagenitě patulinu na úrovni eukaryotních organismů jsou velmi sporadické. Problematika mutagenity patulinu bude vyžadovat další studie mutagenity *in vivo*.

II. Počty mikrojadér v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeně po ovlivnění ochratoxinem A, patulinem a kyselinou penicilovou – Numbers of micronuclei in polychromatophilic erythrocytes of bone marrow after the action of ochratoxin A, patulin and penicillic acid

Látka ¹	Dávka ⁵ [mg.kg ⁻¹]	Počty mikrojadér ⁶	Mutagenita ⁷ (p = 0,05)
Ochratoxin A ²	5,0	5,0 + 2,2	+
	2,5	3,2 + 2,2	–
	1,0	2,6 + 1,1	–
Patulin ³	3,0	2,4 + 1,8	–
	1,5	3,2 + 1,5	–
	0,5	2,3 + 1,2	–
Kyselina penicilová ⁴	14,0	4,5 + 2,3	+
	7,0	4,5 + 2,0	+
	3,5	3,9 + 2,0	+
DMSO	7%	2,9 + 1,6	–

¹substance; ²ochratoxin A; ³patulin; ⁴penicillic acid; ⁵dose; ⁶numbers of micronuclei; ⁷mutagenicity

Kyselina penicilová v Amesově testu nevykázala mutagenní aktivitu ani s metabolickou aktivací, ani bez ní u kmene TA98 a TA100. K obdobným výsledkům dospěli např. K u c z u k et al. (1978). Všechny testované koncentrace v mikronukleus testu byly mutagenní. Jsou popsány mutagenní účinky kyseliny penicilové u eukaryotních organismů, např. indukce jednořetězcových zlomů DNA u buněčných kultur (U m e d a et al., 1972; U e n o et al., 1995). Mutagenitu tohoto mykotoxinu by bylo vhodné ověřit ještě komplexní cytogenetickou analýzou buněk kostní dřeně u některého laboratorního hlodavce, případně dalším doplňkovým testem.

Literatura

- ABRAHAM E. P., FLOREY H. W.: Substances Produced by Fungi Imperfecti and Ascomycetes. In: FLOREY H. W., CHAIN E., HEATLEY N. G., JENNINGS M. A., SANDERS A. G., ABRAHAM E. P., FLOREY M. E. (Eds.): Antibiotics. London, Oxford Univ. Press: 273–355.
- ADENSAM L., LEBEDOVÁ M., PAVLOSEK J., TUREK B. (1989): Stanovení patulinu v dětských a kojeneckých jablčkových výživách metodou PLC. *Prům. Potr.*, 40: 127–128.
- AMES B. N. (1971): The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: HOLLAENDER A. (Ed.): Chemical Mutagens, Principle and Methods for Their Detection. Vol. 1 New York, Plenum: 267–282.
- AMES B. N., KAMMEN H. O., YAMASAKI E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31: 347–364.
- ANSLOW W. K., RAISTRICK H., SMITH G. (1943): Anti-fungal substances from moulds. Part I. Patulin a metabolic pro-

- duct of *Penicillium patulum* and *Penicillium expansum*. *J. Soc. Chem. Ind.*, 62: 236–238.
- BÁRTA I., ADÁMKOVÁ M., PETR T., BÁRTOVÁ J. (1990): Dose and time dependence of chromosomal aberration yields of bone marrow cells in male Chinese hamsters after a single i.p. injection of aflatoxin B₁. *Mutation Res.*, 244: 189–195.
- BÁRTA I., PETR T., TUREK B., KEJLOVÁ K. (1991): Long-term biological effects of AFB₁. In: Abstr. Symp. 21st Annual Meet. EEMS on Environmental Mutagens – Carcinogens. Prague.
- BÁRTA I., MAZURA I., ŠMERÁK P., BÁRTOVÁ J., NOVOTNÁ B., SEDMÍKOVÁ M. (1995): Interaktivní genotoxické účinky trichotecenových mykotoxinů. [Závěrečná zpráva projektu FRVŠ č. 0656/7/1995.] Praha, 3. Lék. Fak. UK.: 1–4.
- BENDELE A. M., CARLTON W. W., KROGH P., LILLEHOJ E. B. (1985): Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57 B1/6JX C3H) F₁ mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, 75: 733–742.
- BERGEL F., MORRISON A. L., MOSS A. R., KLEIN R., RINDERNECHT A., WARD J. L. (1943): An antibacterial substance from *Aspergillus clavatus* and *Penicillium claviforme* and its probable identity with patulin. *Nature (London)*, 152: 750.
- BIRKINSHAW J. H., MICHAEL S. E., BRACKEN A., RAISTRICK H. (1943): Patulin in the common cold. II. Biochemistry and chemistry. *Lancet*, 245: 625–630.
- BLUNDEN G., ROCH O. G., ROGERS D. J., COKER R. D., BRADBURN N., JOHN A. E. (1991): Mycotoxins in food. *Med. Lab. Sci.*, 48: 271–282.
- BOSE S., SINHA S. P. (1994): Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Food. Chem. Toxicol.*, 32: 533–537.
- BRIAN P. W., ELSON G. W., LOWE D. (1956): Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*. *Nature (London)*, 178: 263–264.
- CIEGLER A. (1972): Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.*, 18: 631–636.
- CIEGLER A., FENNELL D. I., MINTZLAFF H. J., LEISTNER L. (1972): Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften*, 59: 365–366.
- ČERNÁ M., DOBIÁŠ L., HÁJEK V. (1989): Amesova metoda. V: Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí – standardní metodika. *Acta Hyg. Epidemiol. Microbiol.* (Příloha), 20: 33–56.
- DECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS 474 – Genetic Toxicology. Micronucleus Test. 1983. Council Directive 84/449/EEC. Part B. Methods for the determination of toxicity. B 12 Other effect – Mutagenicity (micronucleus test).
- DICKENS F., WAYNFORTH H. B. (1969): Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. Washington D.C., U.S. Dept. Health, Education and Welfare: 418.
- FINK-GREMMELS J., JAHN A., BLOM M. J. (1995): Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Nat. Toxins*, 3: 214–220.
- GREGOR J. M. S., HEDDLE J. A., HITE M., MARGOLIN B. H., RAMEL C., SALAMONE M. F., TICE R. R., WILD D. (1987): Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res.*, 189: 103–112.

- HARWIG J., CHEN Y. K., KENNEDY B. P. C., SCOTT P. M. (1973): Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 6: 22–25.
- HESELTEINE C. W., VANDEGRAFT E. E., FENNEL D. I., SMITH M. L., SHOTWELL O. L. (1972): Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64: 539–550.
- HOFMANN K., MINTZLAFF H. J., ALPERDEN I., LEISTNER L. (1971): Untersuchung über die Inaktivierung des Mycotoxins Patulin durch Sulfhydrylgruppen. *Fleischwirtschaft*, 51: 1534–1536.
- HOOPER I. R., ANDERSON H. W., SKELL P., CARTER H. E. (1944): The identity of clavacin with patulin. *Science*, 99: 16.
- CHAIN E., FLOREY H. W., JEMMINGS M. A. (1977): An antibacterial Substance Produced by *Penicillium claviforme*. B. In: WYLLIE D., MOREHOUSE L. G.: *Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*. V. *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Vol. 1. New York: 283 s.
- KANISAWA M. (1984): Synergistic Effect of Citrinin on Hepatocarcinogenesis of Ochratoxin A in Mice. In: KURATA H., UENO Y. (Eds.): *Toxicogenic Fungi, Their Toxic and Health Hazard*. Tokyo, Japanese Association of Mycotoxicology: 245–254.
- KANISAWA M., SUZUKI S. (1978): Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*, 69: 599–600.
- KATZMAN P. A., HAYS E. E., CAIN C. K., WYK J. J. van, REITHEL F. J., THAYER S. A., DOISY E. A., GABY W. L., CARROL C. E., MUIR R. D., JONES L. R., WADE N. J. (1994): Clavacin, an antibiotics substance from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.*, 154: 475–486.
- KUCZUK M. H., BENSON P. M., HEATH H., HAYES A. W. (1978): Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, 53: 11–20.
- KUMARI D., SINHA S. P. (1994): Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.*, 32: 471–475.
- KURTZMAN C. P. A., CIEGLER A. (1970): Mycotoxin from a blue-eye mold of corn. *Appl. Microbiol.*, 20: 204–207.
- LAI M., SEMENIUK G., HESELTEINE C. W. (1970): Condition for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 19: 542–544.
- LINDENFELSER L. A., LILLEHOJ E. B., MILBURN M. S. (1973): Ochratoxin and penicillic acid in tumorigenic and acute toxicity tests with white mice. *Dev. Ind. Microbiol.*, 14: 331–336.
- MALÍŘ F., JERGOVÁ Z. (1996): Úvodní studie lidské ochratoxikózy ve čtyřech okresech ČR. In: *Zdraví a životní prostředí*. Sbor. Konf. Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva. Praha, SZÚ: 325–337.
- MARON D. M., AMES B. N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113: 173–215.
- MERVE K. J. van den, STEYN P. S., FOURIE L., SCOTT B., THERON J. J. (1977): Ochratoxin A, a Toxic Metabolite Produced by *Aspergillus ochraceus*. In: WYLLIE T. D., MOREHOUSE L. G.: *Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*. Vol. 1: *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. New York: 283 s.
- MURNAGHAN M. F. (1946): The pharmacology of penicillic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 88: 119–132.
- NTP – National Toxicology Programme, Technical Report Series No. 358 (1989): Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health: 142 s.
- PETR T., BÁRTA I., HRABAL P., KEJLOVÁ K. (1993): Mutagenic and carcinogenic effect of aflatoxin B₁ in vivo. *Abstr. Symp. Olle Moller-Jensen Memorial Symposium on Nutrition and Cancer*. Lyon, IARC.
- PFOHL-LESKOVICZ A., CHAKOR K., CREPPY E. E., DIRHEIMER G. (1991): DNA Adduct Formation in Mice Treated with Ochratoxin A. In: CASTEGNARO M., PLEŠTINA R., DIRHEIMER G., CHERNOZEMSKY I. N., BARTSCH H. (Eds.): *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Lyon, IARC: 245–253.
- PURCHASE J. F. H., A WATT J. J. van der (1971): The long-term toxicity of ochratoxin A to rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, 9: 681–682.
- RUPRICH J. (1995): Zdravotní a hygienický význam mykotoxinů produkovaných houbami rodu *Fusarium* v potravinových řetězcích. [Závěrečná zpráva projektu GA MZ ČR, č. 1642-2.] Praha, SZÚ: 106 s.
- RUPRICH J., OSTRÝ V. (1993a): Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Centr. Europ. J. Publ. Health*, 1: 46–48.
- RUPRICH J., OSTRÝ V. (1993b): Health risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A to humans: Czech Republic – Brno – 1991/1992. *Centr. Europ. J. Publ. Health*, 1: 86–93.
- SCHAEFFER W. I., SMITH N. E., PAYNE P. A. (1975): Physiological and biochemical effects of the mycotoxin patulin on Chang liver cell cultures. *In Vitro*, 11: 69–77.
- SCHMID W. (1975): The micronucleus test. *Mutation Res.*, 31: 9–15.
- SNOW J. P., LUCAS G. B., HARVAND, PERO R. W., OWENS R. G. (1972): Analysis of tobacco and smoke condensate for penicillic acid. *Appl. Microbiol.*, 24: 34–36.
- SUN T. S., STAHR H. M. (1993): Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice. *J. AOAC Int.*, 76: 893–898.
- TUREK B. (1996): Sledování organických látek v biologickém materiálu. In: *Zdraví a životní prostředí*. 1. Konf. systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Praha, SZÚ: 313–318.
- UENO Y., UMEMORI K., NIIMI E., TANUMA S., NAGATA S., SUGAMATA M., IHARA T., SEKIJIMA M., KAWAI K. (1995): Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Nat. Toxins*, 3: 129–137.
- UMEDA M., YAMAMOTO T., SAITO M. (1972): DNA-strand breakage of HeLa cells induced by several mycotoxins. *Jap. J. Exp. Med.*, 42: 527–535.
- WALKER J. R. L. (1956): Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*. *Phytochemistry*, 8: 561–566.
- WHO Technical Report Series, 859 (1995): Evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva.

WÜRLER F. E., FRIEDRICH V., SCHLATTER J. (1991): Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Res.*, 261: 209–216.

ZIEGER E., ANDERSON B., HAWORTH S., LAWLOR T., MORTELMANS K. (1998): *Salmonella* mutagenicity tests. IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutag.*, 11: 1–158.

Došlo 9. 7. 1997

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Ivo Bárta, CSc., Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ruská 87, 100 00 Praha 10, Česká republika, tel.: + 420 2 67 10 24 91, fax: + 420 2 67 31 18 12, e-mail:IVO.BARTA@LF3.CUNI.CZ

REVIEW

Těžké kovy v jedlých houbách

Pavel KALÁČ, Lubomír SVOBODA

Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Abstract

KALÁČ P., SVOBODA L. (1998): **Heavy metals in edible mushrooms.** Czech J. Food Sci., 16: 110–116.

Wild growing mushrooms have been a very popular delicacy in the Czech Republic with yearly consumption of about 7 kg per family. However, the consumption exceeds 10 kg in some individuals. Some species, namely from genera *Agaricus*, *Macrolepiota*, *Lepista* and *Calocybe* accumulate high levels of cadmium and mercury even in the unpolluted and mildly polluted areas. The contents of both metals and also that of lead increase considerably in the heavily polluted sites, such as in the vicinity of metal smelters. The usual contents of the three metals are tabulated for 25 mushroom species. Present knowledge of chemical forms of the metals in mushrooms is limited as are the rates of their bioavailability in man. Thus, consumption of the accumulating species should be restricted. The cultivated species, especially the common mushroom (*Agaricus bisporus*), contain only low levels of the metals.

edible mushrooms; heavy metals; cadmium; mercury; lead

V sedmdesátých letech se zjistilo, že řada druhů volně rostoucích vyšších hub, zejména ze skupiny basidiomycet, kumuluje ve svých plodnicích některé těžké kovy, především kadmium, rtuť, olovo a měď, a to v množstvích výrazně vyšších než jakékoli jiné požívatiny.

U slovanských národů je obliba sběru a konzumace hub velmi vysoká. Pro léta 1994 a 1995 se uvádí, že v České republice sbíralo houby 72 % rodin s ročním průměrem 7 kg na domácnost [57]. Existuje však nemálo jedinců, kteří ročně konzumují více než 10 kg volně rostoucích hub.

Výskyt a hygienická hlediska kadmia, rtuti, olova a thalia v jedlých houbách kriticky zhodnotila Seegerová [47]. Od té doby nebyl publikován žádný literární přehled, což zřejmě souvisí s nízkou spotřebou volně rostoucích hub v západní Evropě.

Cílem tohoto přehledu je podat ucelenou informaci o výskytu a potenciálních rizicích tzv. těžkých kovů v jedlých houbách. Uváděny jsou především výsledky z posledních patnácti let. Samostatnou problematiku představuje radioaktivita hub.

Faktory ovlivňující obsah těžkých kovů v plodnicích

Poznatky z fyziologie vyšších hub jsou dosud značně omezené, takže i posouzení role těžkých kovů v jejich metabolismu se pohybuje spíše v oblasti hypotéz než průkazných zjištění. Existuje však shoda v tom, že výskyt kovů v plodnicích je v první řadě záležitostí druhu, do jisté míry i rodu.

Dalším významným faktorem je složení substrátu, z něhož houba získává živiny. V tomto směru jsou značné rozdíly v příjmu jednotlivých kovů [21, 58]. V plodnicích se kumulují kadmium, rtuť a měď, obsah zinku a manganu je přibližně stejný jako v substrátu, zatímco obsah olova a železa je nižší než v substrátu. Tyto vztahy charakterizuje biokoncentrační faktor, což je poměr obsahu kovů v sušině plodnice k obsahu v sušině substrátu. Pro kadmium se uvádějí hodnoty 50–300, pro rtuť 30–500, zatímco pro olovo jsou to jen desetiny, příp. setiny [21, 47, 58].

Méně významný je vliv stáří, resp. velikosti plodnice. Některé práce udávají, že mladší plodnice mají vyšší obsah kovů, což se přisuzuje jejich transportu z mycelia hned na počátku tvorby plodnic (fruktifikace), takže pozdějším nárůstem hmoty koncentrace postupně klesá. Převažuje názor, že rozhodující podíl kovů přijímá plodnice myceliem. Podíl pocházející ze spadu je pokládán za málo významný, což souvisí i s krátkou dobou životnosti plodnice (kolem 10–14 dnů).

Podle našeho názoru je obsah kovů v plodnicích volně rostoucích hub významně ovlivněn rovněž stářím mycelia a délkou prodlevy mezi fruktifikacemi. Pro tuto hypotézu hovoří nejvyšší obsahy kovů v první sklizňové vlně pěstovaných druhů hub a skutečnost, že hladiny těžkých kovů v pěstovaných houbách jsou podstatně nižší než ve volně rostoucích. To lze přisoudit stáří mycelia, které se v přírodě vyskytuje na stanovišti řadu let, zatímco u pěstovaných hub maximálně několik měsíců.

Všechny tyto faktory vedou k velkému rozptylu zjišťovaných obsahů u jednotlivých druhů, představujících někdy až řádové rozpětí. To je výrazný rozdíl proti situaci u rostlin.

Většina kovů není v plodnici rozložena rovnoměrně. Nejvyšší obsahy jsou ve výtrusorodé vrstvě, nikoli však ve výtrusech, méně ve zbytku klobouku a nejméně ve třeni.

O mechanismech transportu kovů z mycelia do plodnice je zatím minimum údajů. U rtuti zřejmě závisí na obsahu sulfhydrylových skupin vázaných zejména na bílkovinný nosič, u kadmia je mechanismus transportu jiný [32].

Houby jako bioindikátory kontaminace prostředí těžkými kovy

V západní Evropě byl výzkum výskytu těžkých kovů v plodnicích motivován spíše přírodovědnými než hygienickými hledisky. Basidiomycety (stopkovýtřusé houby) se podílejí na mykorrhizě s lesními stromy. Proto se úbytek hub v důsledku znečištění substrátu těžkými kovy může podílet na zhoršení stavu lesů [45].

Vysoký obsah toxických kovů v řadě druhů vybízeli k ověření, zda nemohou houby sloužit jako bioindikátory míry kontaminace prostředí. Četné práce byly shrnuty v literárním přehledu [63] se závěrem, že plodnice sice odrážejí svým obsahem těžkých kovů jejich výskyt v substrátu, ale tento vztah není tak těsný, aby mohl být spolehlivým indikátorem míry znečištění. U několika druhů, zejména helmovky ředkvičkové (*Mycena pura*) [9], čirůvky fialové (*Lepista nuda*) a pýchavky obecné (*Lycoperdon perlatum*) je informační hodnota vyšší.

Vysoké koncentrace těžkých kovů se zjišťují v plodnicích v silně kontaminovaných lokalitách, jako jsou blízké okolí frekventovaných silnic [33, 54], skládek čistírenských kalů [64] či oblastí zatížených imisemi [6, 37] včetně území velkých měst. Velmi vysoké obsahy jsou v plodnicích sbíraných v okolí hutí barevných kovů [10, 28, 30, 39].

Zajímavé výsledky pocházejí ze Švédska, kde Movitz [43] nezjistil průkazné rozdíly mezi obsahy kadmia v herbářových vzorcích plodnic z let 1890–1926 a v plodnicích získaných ze stejných lokalit na konci 70. let.

Hygienicky závažné kovy

Z asi 150 původních prací o výskytu těžkých kovů u jedlých houbách vyplývá, že z hygienického hlediska je třeba brát v úvahu kadmium, rtuť a v menší míře i olovo. Slabými místy při posuzování hygienické závažnosti jsou nedostatečné poznatky o chemických formách kovů v plodnicích a míře vstřebávání z trávicího traktu.

Přehled sbíraných a konzumovaných druhů hub, pro něž jsou k dispozici údaje o obsahu škodlivých kovů, je uveden v tab. I. Obsahy kovů se v literatuře vesměs vyjadřují v mg na kg sušiny a pro houby se usaněné počítá se sušinou 10 %.

Kadmium

Obvyklé hodnoty kadmia jsou uvedeny v tab. II. Výrazně kumulující skupinu představuje rod žampion, přede-

vším druhu žlutnoucí po mechanickém poškození pletiv (flavescentes) [1]. Obsahy kadmia v žampionech mohou být mimořádně vysoké a dosahovat hodnot 100 až 300 mg na 1 kg sušiny [47, 53]. Výrazně zvýšené obsahy byly zjištěny i v okolí hutí vyrábějících olovo [28], rtuť či měď [30].

I. Přehled druhů jedlých hub, u nichž jsou četnější údaje o obsahu těžkých kovů

Č.	Čeď / Druh	
Hřibovité – Boletaceae		
1.	Hřib dubový	<i>Boletus aestivalis</i>
2.	Hřib smrkový	<i>Boletus edulis</i>
3.	Hřib hnědý	<i>Xerocomus badius</i>
4.	Hřib žlutomasý	<i>Xerocomus chrysenteron</i>
5.	Hřib plstnatý	<i>Xerocomus subtomentosus</i>
6.	Hřib strakoš	<i>Suillus variegatus</i>
7.	Kozák březový	<i>Leccinum scabrum</i>
8.	Klouzek obecný	<i>Suillus luteus</i>
9.	Klouzek sličný (modřínový)	<i>Suillus grevillei</i>
Liškovité – Cantharellaceae		
10.	Liška obecná	<i>Cantharellus cibarius</i>
Žampionovité – Agaricaceae		
11.	Žampion polní	<i>Agaricus campestris</i>
12.	Žampion ovčí	<i>Agaricus arvensis</i>
13.	Žampion lesní	<i>Agaricus silvaticus</i>
14.	Žampion hajný (lesomilný)	<i>Agaricus silvicola</i>
15.	Bedla červénající	<i>Macrolepiota rhacodes</i>
16.	Bedla vysoká	<i>Macrolepiota procera</i>
Muchomůrkovité – Amanitaceae		
17.	Muchomůrka růžovka	<i>Amanita rubescens</i>
Čirůvkovité – Tricholomataceae		
18.	Čirůvka fialová	<i>Lepista nuda</i>
19.	Čirůvka májovka	<i>Calocybe gambosa</i>
20.	Václavka obecná	<i>Armillariella mellea</i>
Holubinkovité – Russulaceae		
21.	Holubinka trávovzelená	<i>Russula aeruginea</i>
22.	Holubinka namodralá	<i>Russula cyanoxantha</i>
23.	Ryzec pravý	<i>Lactarius deliciosus</i>
24.	Ryzec syrovinka	<i>Lactarius volemus</i>
Pýchavkovité – Lycoperdaceae		
25.	Pýchavka obecná	<i>Lycoperdon perlatum</i>

Nejvyšší přípustná koncentrace kadmia pro zeleninu v ČR je 0,05 mg/kg čerstvé hmoty, resp. 0,07 mg/kg pro konzervované houby, po přepočtu tedy 0,5, resp. 0,7 mg na 1 kg sušiny. Je zřejmé, že tomuto limitu vyhovuje jen velmi malý podíl volně rostoucích hub. Podle FAO/WHO [3] je přijatelná týdenní dávka 0,007 mg/kg tělesné hmotnosti, čili 0,42 mg pro osobu o hmotnosti 60 kg. Tuto dávku by naplnila porce 300 g čerstvých hub o obsahu kadmia 14 mg/kg sušiny. Proto hygienické služby některých západoevropských a skandinávských zemí nedoporučují konzumovat volně rostoucí žampiony častěji než dvakrát ročně.

II. Obvyklé obsahy kadmia (mg/kg sušiny) v plodnicích hub

Poř. č.	Druh	<0,5	0,5–1	1–2	2–5	5–10	10–20	20–50	>50	Literatura
1.	Hřib dubový			X	X					6, 14, 26
2.	Hřib smrkový			X						14, 25, 26, 60
3.	Hřib hnědý		X	X						14, 26, 54
4.	Hřib žlutomasý			X						14, 26, 54, 60
5.	Hřib plstnatý		X	X						14, 26
6.	Hřib strakoš		X							26
7.	Kozák březový				X					6, 14
8.	Klouzek obecný		X							14, 25
9.	Klouzek sličný			X						26, 54
10.	Liška obecná	X	X							14, 25, 26
11.	Žampion polní				X	X	X	X		1, 26, 29, 54, 66
12.	Žampion ovčí					X	X			29, 54, 60, 62
13.	Žampion lesní					X	X	X		1, 29, 60, 62
14.	Žampion hajní						X	X	X	29, 54
15.	Bedla červenající		X	X						1, 26, 60
16.	Bedla vysoká			X						6, 25, 26, 54, 60
17.	Muchomůrka růžovka			X						6, 26, 54, 60
18.	Čirůvka fialová		X	X						1, 26, 54, 60
19.	Čirůvka májovka				X					26
20.	Václavka obecná				X					6, 13, 26, 60, 62
21.	Holubinka trávovělná		X							14, 26
22.	Holubinka namodralá			X	X					26, 54, 60
24.	Ryzec syrovinka		X							26
25.	Pýchavka obecná		X							6, 25, 54

O formách vazby kadmia v houbách je známo jen velmi málo. Ze žampionu velkovýtrusého (*Agaricus macrosporus*) byl izolován kadmium-mykofosfatin [40]. Jedná se o fosfoglykoprotein o relativní mol. hm. 12 000 neobsahující síru, ale s hojným zastoupením kyselých aminokyselin, glukosy a galaktosy. Kromě toho byly izolovány čtyři nízkomolekulární glykoproteiny obsahující síru a vázající kadmium a měď. Metallothioneiny nebyly zjištěny ani v plodnicích pěstovaného žampionu dvouvýtrusého (*A. bisporus*) [11], ani v hyfách žampionu ovčího [23].

Zatímco počáteční údaje o vstřebávání kadmia z hub uváděly jen minimální podíl [52], resp. kolem 10 % [8], novější výsledky jsou méně příznivé. Mitry et al. [42] udávají u krys nižší absorpci kadmia z hub než z anorganických kadmiových solí, další výsledky u myši i lidí však uvádějí stejné a vyšší vstřebávání než z chloridu kademnatého [38, 50]. Kadmium se zadržuje zejména v ledvinách, slezině a v játrech, rychle a výrazně vzrůstá po podání hub jeho obsah v krevním séru. Předpokládá se, že organicky vázané kadmium při průchodu kyselým prostředím žaludku může disociovat z komplexů s bílkovinami a polypeptidy a v tenkém střevu vytvářet odlišné komplexy.

Rtut'

Přehled nejčastějších obsahů rtuti je uveden v tab. III. Mezi výrazně kumulující druhy patří čirůvka májovka, čirůvka fialová a žampion ovčí, značný obsah se zjišťuje

i v ověřovaných druzích rodů žampion a bedla. Extrémně vysoké hodnoty rtuti 100–200 mg/kg sušiny byly zjištěny u bedly vysoké a části vzorků čirůvky fialové v oblasti střední Špiše. Toto území je silně kontaminováno rtutí, ale i dalšími škodlivými prvky z osmisetletého zpracování polymetalických rud. Obsahy rtuti jsou proto až řádově vyšší než údaje v tab. III [30].

Hygienické předpisy ministerstva zdravotnictví ČR připouštějí obsah rtuti v houbách do 0,05 mg/kg čerstvé hmoty, tedy 0,5 mg/kg sušiny. Podle FAO/WHO [2] je přijatelná týdenní dávka 0,005 mg/kg tělesné hmotnosti, neboli 0,3 mg pro osobu o hmotnosti 60 kg. Z toho nesmí být více než 0,2 mg rtuti ve formě metylrtutnatých sloučenin. Dávku 0,3 mg by naplnila porce 300 g čerstvých hub s obsahem rtuti 10 mg na kg sušiny, což je u nejvíce kumulujících druhů časté.

V pěstovaném žampionu dvouvýtrusém je rtut' vázána především ve frakci vysokomolekulárních bílkovin, zatímco ve frakci o relativní mol. hm. 17 000–45 000 je jen malý podíl. U pěstované hlívy ústřední (*Pleurotus ostreatus*) je poměr opačný [35]. Bohužel zatím chybí informace, zda dochází během tepelných úprav hub k vytěžení části rtuti.

Omezené údaje jsou rovněž o podílu metylrtuti. Existuje shoda výsledků, že činí jednotky procent, ojediněle až do 16 % z celkového obsahu rtuti v rodech žampion [32, 55] a penízovka (*Collybia*) [41] a v řadě druhů zahrnutých v tab. III [5]. Pro hřib hnědý a kozák březový byl zjištěn

III. Obvyklé obsahy rtuti (mg/kg sušiny) v plodnicích hub

Poř. č.	Druh	<0,5	0,5–1	1–2	2–5	5–10	10–20	Literatura
1.	Hřib dubový			X	X			15, 26, 31
2.	Hřib smrkový				X			15, 26, 31
3.	Hřib hnědý	X	X					5, 16, 18, 26, 31, 54
4.	Hřib žlutomasý	X	X					15, 18, 26, 31
5.	Hřib plstnatý	X	X					16, 26, 31
6.	Hřib strakoš	X						26, 31
7.	Kozák březový	X						6, 15, 18, 31
9.	Klouzek sličný	X						26, 54
10.	Liška obecná	X						26
11.	Žampion polní			X	X	X		1, 26, 29, 31, 54, 65
12.	Žampion ovčí				X	X	X	29, 31, 54, 62
13.	Žampion lesní				X			1, 29, 62
14.	Žampion hajní				X			29, 54
15.	Bedla červenající				X	X		1, 26, 31
16.	Bedla vysoká			X	X	X		6, 15, 16, 26, 31, 65
17.	Muchomůrka růžovka		X	X				6, 15, 26, 31, 54
18.	Čirůvka fialová				X	X	X	1, 26, 31, 54, 65
19.	Čirůvka májovka					X	X	26, 31
20.	Václavka obecná	X						6, 16, 26, 62
21.	Holubinka trávozelená	X						15, 26
22.	Holubinka namodralá		X					26, 54
23.	Ryzec pravý	X	X					16, 18, 65
24.	Ryzec syrovinka			X				26
25.	Pýchavka obecná			X	X			6, 16, 18, 54

podíl 0,7–1,3 % [20]. Prokázalo se, že vyšší houby jsou schopny akumulovat metylrtuť ze substrátu s biokonzentračním faktorem asi 20 a/nebo metyllovat rtuťnaté soli [20].

Olovo

Přehled obvyklých obsahů olova v houbách je shrnut v tab. IV. Výrazně kumulujícími druhy jsou pýchavka obecná, bedla červenající a čirůvka fialová. Mimořádně vysoké obsahy 100–300 mg/kg suš. se zjišťují v řadě druhů v bezprostředním okolí hutí na olovo [10, 28, 36, 39], kde jsou vesměs i zvýšené hladiny dalších škodlivých kovů. Zvýšené hodnoty jsou i v blízkosti frekventovaných silnic [33, 54].

Český hygienický limit pro olovo je 0,5 mg/kg čerstvé hmoty, tedy 5 mg/kg sušiny. Podle FAO/WHO [4] je týdenní přijatelná dávka 0,025 mg/kg tělesné hmotnosti, neboli 1,5 mg pro osobu o hmotnosti 60 kg. Tuto dávku by naplnila porce 300 g čerstvých hub o obsahu olova 50 mg na kg sušiny. Z toho je zřejmé, že obsah olova v houbách z nekontaminovaných oblastí nepředstavuje při obvyklé konzumaci hygienické riziko.

Další kovy

Obvyklé obsahy dalších kovů jsou shrnuty v tab. V. Ve většině případů jsou kumulujícími druhy ty, které se vyznačovaly vysokými obsahy některého ze tří zdravotně nejzávažnějších kovů. Hladiny kovů jsou srovnatelné s obsahy v rostlinách, mědi však houby obsahují více.

V kumulujících druzích jsou časté koncentrace mědi 100–300 mg/kg sušiny, což se však neposuzuje jako zdravotně problematické. V trsnatci lupenitém (*Grifola frondosa*) byl identifikován kyselý peptid, který zvyšuje podíl rozpustné mědi při fyziologických hodnotách pH, takže zvyšuje absorpci tohoto kovu z tenkého střeva [51].

Obsahy žádného z kovů uvedených v tab. V nejsou považovány za škodlivé, ale také se neuvažuje o houbách jako o potenciálním zdroji některého z biogenních kovů v lidské výživě.

Výskyt kovů v pěstovaných houbách

Obsahy zdravotně sledovaných kovů v pěstovaných houbách jsou výrazně nižší než u stejných či příbuzných volně rostoucích druhů [22, 56]. To se přisuzuje jednak nízkému obsahu těchto kovů v substrátu, jednak krátké životnosti mycelia. Obsahy jsou nejvyšší v první sklizňové vlně.

Žampion dvouvýtrusý je velmi citlivý na rostoucí obsah rtuti a v menší míře i kadmia v substrátu, zatímco výnos hlívy ústřední není těmito kovy příliš ovlivněn [44, 46]. Žampion přijímá ze substrátu, příp. krycí zeminy kovy v sestupném pořadí rtuť-zinek-kadmium-olovo, pro hlívu je pořadí kadmium-rtuť-zinek, olovo téměř nepřijímá [34]. Biokonzentrační faktor pro kadmium u hlívy však klesá při rostoucích koncentracích kovu v substrátu, z čehož se usuzuje, že tento druh má regulační mechanismus pro příjem kadmia [19].

IV. Obvyklé obsahy olova (mg/kg sušiny) v plodnicích hub

Poř. č.	Druh	0, 5–1	1–2	2–5	5–10	10–20	Literatura
1.	Hřib dubový		X	X			6, 14, 26
2.	Hřib smrkový		X	X			6, 25, 26
3.	Hřib hnědý		X	X			14, 26, 54
4.	Hřib žlutomasý		X				14, 26, 54
5.	Hřib plstnatý	X					14, 26
6.	Hřib strakoš	X					26
7.	Kozák březový		X	X			6, 14
8.	Klozek obecný		X				14, 25
9.	Klouzek sličný		X				26, 54
10.	Liška obecná		X				14, 25, 26
11.	Žampion polní			X	X		1, 26, 29, 54, 66
12.	Žampion ovčí			X	X		29, 64, 52
13.	Žampion lesní			X	X		1, 29, 62
14.	Žampion hajní			X			29, 54
15.	Bedla červenající				X	X	1, 26
16.	Bedla vysoká			X	X		6, 25, 26, 54
17.	Muchomůrka růžovka		X	X			6, 26, 54
18.	Čirůvka fialová				X		1, 26, 54
19.	Čirůvka májovka		X				26
20.	Václavka obecná		X				6, 13, 26, 62
21.	Holubinka trávozelená			X	X		14, 26
22.	Holubinka namodralá		X				26, 54
24.	Ryzec syrovinka	X					26
25.	Pýchavka obecná				X	X	6, 25, 54

V. Obvyklé obsahy kovů v plodnicích hub a kumulující rody a druhy

Kov	Obsah [mg/kg suš.]	Kumulující rody a druhy	Literatura
Beryllium	<0,05–0, 5		49
Chrom	0,1–1, 2	žampiony, bedla vysoká	25, 27, 29
Kobalt	<0,1–3	žampion ovčí	25, 27, 29
Mangan	5–60	žampiony	12, 14, 25, 27, 29, 61
Měď	10–70	žampiony, bedla vysoká, bedla červenající	1, 12, 14, 25, 27, 29
Nikl	0,4–2	lakovka ametystová	59, 61, 62
Thalium	< 0,25		1, 25, 27, 29, 48
Zinek	30–180	žampiony, pýchavka obecná	1, 12, 14, 25, 27, 29, 59, 61, 62
Železo	30–150	hřib strakoš, klouzek obecný	12, 14, 27, 29

Obsah kadmia v pěstované hlívě ústřední je asi desetinásobný než v žampionu dvouvýtrusém [22].

Změny obsahu kovů při konzervaci a kuchyňských úpravách hub

Údaje o úbytích kovů při konzervaci a zejména při kuchyňském zpracování hub prakticky chybějí. Při blanšírování plodnic žampionu dvouvýtrusého při 95–100 °C po dobu 15 minut představovaly úbytky manganu 45 %, železa 35 %, zinku 23 %, ale mědi jen 4 %. Úbytky škodlivých kovů však zjišťovány nebyly [7]. Srovnatelné úbytky jsou uváděny i při pětiminutovém varu [24].

Závěr

Některé druhy volně rostoucích jedlých hub, zejména z rodů žampion, bedla a čirůvka, kumulují i v oblastech s nízkým a mírným znečištěním prostředí těžkými kovy vysoké obsahy kadmia a rtuti. Situace se výrazně zhoršuje v silně kontaminovaných lokalitách, kde mohou být navíc i vysoké obsahy olova.

Dosud chybějí poznatky o případném poklesu obsahu těchto kovů během konzervace a kuchyňských úprav hub. Málo se ví o chemických formách kadmia a rtuti v houbových, o jejich přeměnách a míře absorpce v trávicím traktu

člověka. Dosavadní poznatky však svědčí o určitých rizicích, která představují druhy hub s vysokými obsahy kadmia. Spotřeba těchto druhů by proto měla být omezena u té části populace, která houby konzumuje v mimořádných množstvích. Pěstované druhy hub, zejména žampion dvouvýtrusý, obsahují škodlivých kovů jen velmi málo.

Literatura

- ANDERSEN A., LYKKE S.-E., LANGE M., BECH K. (1982): Sporelementer i spiselige svampe. Publ. 68, Stat. Levnedsmiddelinst., Denmark: 29 s.
- ANONYMUS (1978): Mercury. WHO Tech. Rep. Ser. No. 631, Geneva.
- ANONYMUS (1989): Cadmium. WHO Tech. Rep. Ser. No. 776, Geneva: 28–31.
- ANONYMUS (1993): Lead. WHO Tech. Rep. Ser. No. 837, Geneva: 32–35.
- BARGAGLI R. (1986): Accumulo di mercurio nei funghi eduli ed eventuali implicazioni per i consumatori. Mic. Ital.: 23–29.
- CIBULKA J., ŠIŠÁK L., PULKRAB K., MIHOLOVÁ D., SZÁKOVÁ J., FUČÍKOVÁ A., SLÁMOVÁ A., STĚHU-LOVÁ I., BARLÁKOVÁ S. (1996): Cadmium, lead, mercury and caesium levels in wild mushrooms and forest berries from different localities of the Czech Republic. Scientia Agric. Bohemica, 27: 113–129.
- COSKUNER Y., ÖZDEMİR Y. (1997): Effects of canning processes on the elements content of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). Food Chem., 60: 559–562.
- DIEHL J. F., SCHLEMMER U. (1984): Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Cadmium in der Pilzen durch fütterungsversuche mit Ratten; Relevanz für den Menschen. Z. Ernährungswiss., 23: 126–135.
- DIETL G. (1987): Wildpilze als Akkumulationsindikatoren für Schwermetalle in Boden. VDI-Berichte Nr. 609: 765–787.
- DOLISCHKA J., WAGNER I. (1981): Investigation about lead and cadmium in wild growing edible mushrooms from differently polluted areas. In: Recent Develop. Food Anal., Proc. 1st Eur. Conf. Food Chem., Vienna: 486–491.
- ESSER J., BRUNNERT H. (1986): Isolation and partial purification of cadmium-binding components from fruiting bodies of *Agaricus bisporus*. Environ. Pollut., Ser. A., 41: 263–275.
- FALANDYSZ J., BONA H. (1992): Zawartość metali w pieczarkach *Agaricus* sp. dziko rosnących na terenie Gdansk i w jego okolicy. Bromat. Chem. Toksykol., 25: 251–256.
- FALANDYSZ J., SICINSKA B., BONA H., KOHNKER D. (1992): Metale w opience miodowej *Armiliariella mellea*. Bromat. Chem. Toksykol., 25: 171–176.
- FALANDYSZ J., DANISIEWICZ D., BONA H. (1994): Metale w grzybach na terenie Borów Tucholskich i lasów kaszubskich. Bromat. Chem. Toksykol., 27: 129–134.
- FALANDYSZ J., KRYSZEWSKI K. (1996): Rtec w grzybach i substracie spod grzybów z okolic Polanowic w gminie Gubin, województwo zielonogórskie. Roczn. PZH, 47: 377–388.
- FALANDYSZ J., MARCINOWICZ A., CHWIR A. (1996): Rtec w jadalnych grzybach z terenu lasów koscierskich i Mierzei Wislanej. Roczn. PZH, 47: 205–210.
- FALANDYSZ J., CHWIR A. (1997): The concentrations and bioconcentration factors of mercury in mushrooms from the Mierzeja Wislana sand-bar, Northern Poland. Sci. Total Environ., 203: 221–228.
- FALANDYSZ J., MARCINOWICZ A., DANISIEWICZ D., GALECKA, K. (1997): Rtec w grzybach i substracie spod grzybów w rejonie Lubiany, gmina Koscierzyna. Bromat. Chem. Toksykol., 30: 63–68.
- FAVERO N., BRESSA G., COSTA P. (1990): Response of *Pleurotus ostreatus* to cadmium exposure. Ecotoxicol. Environ. Safety, 20: 1–6.
- FISCHER R. G., RAPSONMANIKIS S., ANDREAE M. O., BALDI F. (1995): Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi. Environ. Sci. Technol., 29: 993–999.
- GAST C. H., JANSEN E., BIERLING J., HAANSTRA L. (1988): Heavy metals in mushrooms and their relationship with soil characteristics. Chemosphere, 17: 789–799.
- HALDIMANN M., BAJO C., HALLER T., VENNERT T., ZIMMERLI B. (1995): Vorkommen von Arsen, Blei, Cadmium, Quecksilber und Selen in Zuchtspilzen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 86: 463–484.
- JACKL G. A., REIDEL G., KOLLMER W. E. (1987): Identification of the cadmium binding compounds in *Agaricus arvensis* hyphae using ^{109}Cd . Appl. Radiat. Isot., 38: 431–435.
- JENÍK J., TAUBEROVÁ J. (1989): Kloboukaté houby jako možný bioindikátor kvality životního prostředí. Sb. Věd. Prací, VŠCHT Pardubice, 59: 133–142.
- JORHEM L., SUNDBSTRÖM B. (1995): Levels of some trace elements in edible fungi. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 201: 311–316.
- KALAČ P., WITTINGEROVÁ M., STAŠKOVÁ I., ŠIMÁK M., BASTL J. (1989): Obsah rtuti, olova a kadmia v houbách. Čs. Hyg., 34: 568–576.
- KALAČ P., WITTINGEROVÁ M., STAŠKOVÁ I. (1989): Obsah sedmi biogenních prvků v jedlých houbách. Potravn. Vědy, 7: 131–136.
- KALAČ P., BURDA J., STAŠKOVÁ I. (1991): Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of a lead smelter. Sci. Total Environ., 105: 109–119.
- KALAČ P., STAŠKOVÁ I. (1994): Těžké kovy v plodnicích volně rostoucích hub rodu pečárka (*Agaricus* spp.). Potravn. Vědy, 12: 185–195.
- KALAČ P., NIŽNANSKÁ M., BEVILAQUA D., STAŠKOVÁ I. (1996): Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and a copper smelter. Sci. Total Environ., 177: 251–258.
- KALAČ P., ŠLAPETOVÁ M. (1997): Mercury contents in fruiting bodies of wild growing edible mushrooms. Potravn. Vědy, 15: 405–410.
- KOJO M. R., LODENIUS M. (1989): Cadmium and mercury in macrofungi – mechanisms of transport and accumulation. Angew. Bot., 63: 279–292.
- KUTHAN J. (1979): Die Auswertung des Bleigehaltes im Bronze-Röhring – *Boletus aereus* Bull. ex Fr. – entlang einer der Verkehrsadern in Bulgarien. Čes. Mykol., 33: 58–59.
- LASOTA W., FLORCZAK J., KARMANSKA A. (1990): Vplyv warunków uprawy na akumulację niektórych substancji toksycznych w grzybach. I. Obserwacje procesu wchłaniania Hg, Cd, Pb i Zn przez pieczarkę dwuza-

- rodniakowa (*Agaricus bisporus* Lange) i bocznika ostrzygowatego (*Pleurotus ostreatus* Jacq.: Fr. Kumm.). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 23: 95–99.
35. LASOTA W. – FLORCZAK J. (1991): Wpływ warunków uprawy na akumulację niektórych substancji toksycznych w grzybach. II. Wchłanianie i wiązanie ^{203}Hg przez pieczarkę dwuzapadniakową (*Agaricus bisporus* Lange) i bocznika ostrzygowatego (*Pleurotus ostreatus* Jacq.: Fr. Kumm.). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 24: 67–71.
 36. LEPSOVÁ A. – KRÁL R. (1988): Lead and cadmium in fruiting bodies of macrofungi in the vicinity of a lead smelter. *Sci. Total Environ.*, 76: 129–138.
 37. LEPSOVÁ A. – MEJSTŘÍK V. (1988): Accumulation of trace element in the fruiting bodies of macrofungi in the Krušné Hory Mountains, Czechoslovakia. *Sci. Total Environ.*, 76: 117–128.
 38. LIND Y., WICKLUND GLYNN A., ENGMAN J., JORHEM L. (1995): Bioavailability of cadmium from crab hepatopancreas and mushroom in relation to inorganic cadmium: a 9-week feeding study in mice. *Food Chem. Toxicol.*, 33: 667–673.
 39. LIUKKONEN-LILJA H., KUUSI T., LAAKSOVIRTA K., LODENIUS M., PIEPPONEN S. (1986): The effect of lead processing works on the lead, cadmium and mercury contents of fungi. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 176: 120–123.
 40. MEISCH H.-U., SCHMITT J. A. (1986): Characterization studies on cadmium-mycophosphatins from the mushroom *Agaricus macrosporus*. *Environ. Health Persp.*, 65: 29–32.
 41. MINAGAWA K., SASAKI T., TAKIZAWA Y., TAMURA R., OSHINA T. (1980): Accumulation route and chemical form of mercury in mushroom species. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 25: 382–388.
 42. MITRA A. K., PURKAYASTHA R. P., CHATTERJEE N. B., BHATTACHARYA B. (1995): Uptake and tissue distribution of cadmium in albino rat after oral exposure to cadmium-contaminated edible mushroom and its effect on blood. *Curr. Sci.*, 68: 1050–1053.
 43. MOVITZ J. (1980): Höga halter kadmium i vildväxande, svenska champinjoner. *VarFöda*, 2: 270–278.
 44. RÁCZ L., PAPP L., FODOR P. (1995): Migration analysis of elements from compost and casing material to the fruit bodies in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Acta Alim.*, 24: 161–166.
 45. RÜHLING A., SÖDERSTRÖM B. (1990): Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. *Water, Soil Pollut.*, 49: 375–387.
 46. SANGLI SUWAN S., YOSHIDA N., MORINAGA T., MUROOKA Y. (1993): Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 112–114.
 47. SEEGER R. (1982): Toxische Schwermetalle in Pilzen. *Dtsch. Apoth. Z.*, 122: 1835–1844.
 48. SEEGER R., GROSS M. (1981): Thallium in höheren Pilzen. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 173: 9–15.
 49. SEEGER R., SCHLEICHER G., SCHWEINSHAUT P. (1984): Untersuchungen zum Berylliumvorkommen in Pilzen. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 80: 178–186.
 50. SEEGER R., SCHIEFELBEIN F., SEUFFERT R., ZANT W. (1986): Absorption of cadmium ingested with mushrooms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 332 Suppl.: 110.
 51. SHIMAOKA I. – KODAMA J. – NISHINO K. – ITO-KAWA Y. (1993): Purification of a copper binding peptide from the mushroom *Grifola frondosa* and its effect on copper absorption. *J. Nutr. Biochem.*, 4: 33–38.
 52. SCHELLMANN B., HILZ M.-J., OPITZ O. (1980): Cadmium- und Kupferausscheidung nach Aufnahme von Champignon-Mahlzeiten. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 171: 189–192.
 53. SCHMITT J. A., MEISCH H.-U. (1985): Cadmium in mushrooms – distribution, growth effects and binding. *Trace Elem. Med.*, 2: 163–166.
 54. SOVA Z., CIBULKA J., SZÁKOVÁ J., MIHOLOVÁ D., MADER P., REISNEROVÁ H. (1991): Obsah kadmia, rtuti a olova v houbách v lokalitách Bakov nad Jizerou a Černý Vůl. In: Sbor. VŠZ AF Č. Budějovice, R. Zoot., 8: 13–29.
 55. STIJVE T., BESSON R. (1976): Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere*, 5: 151–158.
 56. STRMISOVÁ G., DUBRAVICKÝ J., BÁNHEGYIOVÁ E. (1990): Minerálne zloženie hlivy ustricovitej. *Potrav. Vědy*, 8: 149–155.
 57. ŠIŠÁK L. (1996): Význam lesa pro sběr hub a dalších mimodřevních produktů v České republice. *Mykol. Sbor.*, 73: 98–101.
 58. TYLER G. (1982): Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79: 239–245.
 59. VETTER J. (1989): Vergleichende Untersuchung des Mineralstoffgehaltes der Gattungen *Agaricus* (Champignon) und *Pleurotus* (Austerseitling). *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 189: 346–350.
 60. VETTER J. (1994): Data on arsenic and cadmium contents of some common mushrooms. *Toxicon*, 32: 11–15.
 61. VETTER J. (1993): Die Kupfer-, Mangan- und Zink-Gehalte einiger essbarer Grosspilzarten. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 198: 469–472.
 62. WILCKE C. (1989): Artspezifische Schwermetallaufnahme von Wildpilzen und Zuchtchampignons. In: 6th Int. Trace Elements Symp., Leipzig. Vol. 5: 1545–1552.
 63. WONDRAUSCHEK I., RÖDER U. (1993): Monitoring of heavy metals in soils by higher fungi. In: MARKERT B. (Ed.): Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Weinheim, VCH: 345–363.
 64. ZABOWSKI D., ZASOSKI R. J., LITKE W., AMMIRATI J. (1990): Metal content of fungal sporocarps from urban, rural, and sludge-treated sites. *J. Environ. Qual.*, 19: 372–377.
 65. ZURERA G., RINCÓN F., ARCOS F., POZO-LORA, R. (1986): Mercury content in mushroom species in the Cordova Area. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 662–667.
 66. ZURERA-COSANO G., RINCÓN-LEON F., POZO-LORA R. (1987): Lead and cadmium content of some edible mushrooms. *J. Food Qual.*, 10: 311–317.

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Pavel Kalač, CSc., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Katedra chemie, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: + 420 038 455 45, fax: + 420 038 498 69, e-mail: kalač@zf.jcu.cz

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The responsibility for the contents of a manuscript rests with the authors. They are strongly advised to get a critical review before submitting a manuscript. The Editorial Board will decide on publication, after considering the manuscripts scientific importance, contribution and quality, and the opinions and reviews by experts.

The manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. A PC diskette with the complete text and including references, tables and figure legends of graphical documentation should be provided with manuscript, indicating the used editor program.

Manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, an instruction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Legends to figures.

The Title page must contain a informative title, complete name(s) of the author(s), the name(s) and address(es) of the institution(s) where the work was done, and the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author.

The **Abstract** shall not exceed 120 words. It should state in short and concise form what was done and how, and should contain basic numerical and statistical data from the results. Keywords follow the abstract; they are ranked from general to specific terms, and are written in lower case letters and separated by semicolons.

The introduction (without a subtitle) should consist of a short review of literature relevant and important for the study. The reason(s) for the work may be included.

In **Materials and Methods**, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication. Abbreviations can be used if necessary; first use of an abbreviation should be just after its complete name or description. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used.

Results should be presented clear and concise.

The **Discussion** should interpret the results, without unnecessary repetition. Sometimes it is possible or advantageous to combine Results and Discussion in one section.

If Acknowledgments are needed, they are next.

References in the text to citations consist of author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first is named, followed by the phrase 'et al.'. The list of References should include only publications quoted in the text. These should be in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, year (in brackets), full title of the article, abbreviation of the periodical, volume number, first and last page numbers.

Tables and Figures shall be enclosed separately. Tables are numbered in Roman, Figures in Arabic numerals. Each of them must be referred to in the text. Figures should be restricted to material essential for documentation and understanding of the text. Duplicated documentation of data in both tables and figures is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Both line drawing and photographs are referred to as figures. They cannot be redrawn by publisher. Photographs should have high contrast. Each figure should be accompanied by a concise, descriptive legend.

Reprint: Thirty (30) reprint of each paper are supplied free of charge.

POKyny PRO AUTORY

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě práce.

Rukopis (text, tabulky, literatura, abstrakt a závěr) musí být psány s dvojitými mezerami mezi řádky na papíru formátu A4. K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. grafickou dokumentaci pořízenou na PC s uvedením použitého programu.

Vědecké práce musí mít toto členění: titulní strana, abstrakt a klíčová slova, krátký přehled literatury (bez nadpisu úvod), materiál a metody, výsledky, diskuse, literatura, tabulky a obrázky včetně popisů.

Titulní strana musí obsahovat název práce, plné jméno autorů, název a adresu instituce, kde byla práce dělána, akademické, vědecké a pedagogické tituly, číslo telefonu a faxu a e-mail adresu kontaktního autora.

Souhrn musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit 120 slov. Klíčová slova (KEY words, index terms) se připojují po vynechání řádku pod souhrn. Řadí se směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním; začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Materiál a metody: Model pokusu musí být popsán podrobně a výstižně. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl práci opakovat. Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní. Zkratky jsou používány jen pokud je to nutné; první použití zkratky musí být uvedeno úplným popisem nebo vysvětlením. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat. Používané měrové jednotky musí odpovídat soustavě měrových jednotek SI.

Výsledky: Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních hodnot tabulek a dát přednost grafům, anebo tabulky shrnout v statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část práce by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Je přípustné spojení s předchozí kapitolou (Výsledky a diskuse).

Literatura: Odkazy na literaturu v textu se provádějí uvedením jména autora a roku vydání publikace. Při větším počtu autorů se v textu uvádí první z nich a za jméno se doplní zkratka „et al.“. V části Literatura se uvádějí jen práce citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvního autora: příjmení (verzálkami), zkratka jména, rok vydání (v závorce), plný název práce, úřední zkratka časopisu, ročník, první-poslední stránka; u knih je uvedeno místo vydání a vydavatel.

Tabulky a obrázky: Tabulky, obrázky a fotografie se dodávají zvlášť a všechny musí být citovány v práci. Akceptovány budou jen obrázky, které jsou nezbytné pro dokumentaci výsledků a umožňují pochopení textu. Není přípustné dokumentovat výsledky jak v tabulkách, tak na grafech. Všechny ilustrativní materiály musí mít kvalitu vhodnou pro tisk. Fotografie i grafy jsou v textu uváděny jako obrázky a musí být průběžně číslovány. Každý obrázek musí mít stručný a výstižný popis.

Separáty: Autor obdrží zdarma 30 separátních výtisků práce.

CONTENTS

Čížková H., Voldřich M., Dobiáš J.: Determination of residual acetaldehyde in polyethylene terephthalate bottles by solid phase microextraction	81
Gottvaldová M., Prošková A., Kučera J.: Specificity of the action of hydrophobically substituted lysozyme against Gram-negative bacteria	85
Jeníková G., Macková M., Pazlarová J., Demnerová K.: Occurrence and detection of nitrate reductase in food samples (in Czech)	89
Koreňovská M., Zaušková P., Halášová G.: Observation of selected elements in a model process of starch production from amaranth (in Slovak)	95
Patočka K., Blahovec J.: Breaking of fried potato chips during storage (in Czech)	99
Bárta I., Šmerák P., Sedmíková M., Turek B., Kováčová E., Bártová J.: Genotoxic effects of selected mycotoxins (in Czech)	103
REVIEW	
Kalač P., Svoboda L.: Heavy metals in edible mushrooms (in Czech)	110

OBSAH

Čížková H., Voldřich M., Dobiáš J.: Stanovení zbytkového acetaldehydu v PET lahvích metodou mikroextrakce na tuhé fázi (SPME)	81
Gottvaldová M., Prošková A., Kučera J.: Specificita působení hydrofobně substituovaného lysozymu proti gramnegativním bakteriím	85
Jeníková G., Macková M., Pazlarová J., Demnerová K.: Výskyt a detekce nitrátreduktasy v potravinářských vzorcích	89
Koreňovská M., Zaušková P., Halášová G.: Sledovanie vybraných prvkov v modelovom procese výroby škrobu z amarantu	95
Patočka K., Blahovec J.: Odrol smažených bramborových lupínků v průběhu skladování	99
Bárta I., Šmerák P., Sedmíková M., Turek B., Kováčová E., Bártová J.: Mutagenní účinky vybraných mykotoxinů	103
REVIEW	
Kalač P., Svoboda L.: Těžké kovy v jedlých houbách	110