

Monitoring výskytu deoxynivalenolu v pivech z obchodní sítě v letech 2009–2012

Monitoring of the Occurrence of Deoxynivalenol in Beers from Outlet Shops in 2009–2012

Sylvie BĚLÁKOVÁ¹, Karolína BENEŠOVÁ¹, Renata MIKULÍKOVÁ¹, Zdeněk SVOBODA¹, Josef ČÁSLAVSKÝ²

¹Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika / *Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic*,

²Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno / *Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

e-mail: belakova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Běláková, S. – Benešová, K. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Čáslavský, J.: Monitoring výskytu deoxynivalenolu v pivech z obchodní sítě v letech 2009–2012. Kvasny Prum., 59, 2013, č. 10–11, s. 292–295

V letech 2009–2012 byl sledován výskyt mykotoxinu deoxynivalenol ve vzorcích piva, které pocházely z obchodní sítě České republiky. Jednalo se o piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky i nealkoholická. Obsah deoxynivalenolu byl analyzován metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně – spektrometrickou detekcí. Deoxynivalenol byl nalezen u 74,8 % analyzovaných piv, jeho obsah se pohyboval v rozmezí 2,0–44,0 µg/l. Průměrný obsah deoxynivalenolu ve všech vzorcích v souvislosti s rokem výskytu byl 4,3–8,3 µg/l.

Běláková, S. – Benešová, K. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Čáslavský, J.: Monitoring of the occurrence of deoxynivalenol in beers from outlet shops in 2009–2012. Kvasny Prum., 59, 2013, No. 10–11, p. 292–295

In 2009–2012, the occurrence of mycotoxin deoxynivalenol in beer samples from Czech outlet shops was monitored. Samples included pale, dark, dispensed, lager and non-alcoholic beers. Deoxynivalenol content was analyzed by the liquid chromatography method with mass spectrometric detection. Deoxynivalenol was detected in 74.8 % of the analyzed beers, its content ranged from 2.0–44.0 µg/l. Mean deoxynivalenol content in all samples in relation to the year of the occurrence moved from 4.3–8.3 µg/l.

Běláková, S. – Benešová, K. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Čáslavský, J.: Überwachung des Deoxynivalenolvorkommens in den Jahren 2009 – 2012 im Bier aus dem Handelsnetz. Kvasny Prum., 59, 2013, Nr. 10–11, S. 292–295

Im Zeitraum 2009–2012 wurde im Bier aus dem Handelsnetz in der Tschechischen Republik das Vorkommen des Mykotoxins Deoxynivalenol verfolgt. Es handelte sich dabei um die helle, dunkle Schank-, Lager- und alkoholfreie Biere. Der Gehalt an Deoxynivalenol wurde durch die Methode der Flüssigkeitschromatographie mit Massen – spektrometrischer Detektion analysiert. Deoxynivalenol wurde bei 74,8% von den geprüften Bieren gefunden, der Gehalt liegt im Bereich 2,0 – 44,0 µg/l. Im Zusammenhang mit dem Jahrgang in allen Mustern war der durchschnittliche Gehalt an Deoxynivalenol 4,3 – 8,3 µg/l.

Klíčová slova: pivo, mykotoxiny, deoxynivalenol, LC/MS

Keywords: beer, mycotoxins, deoxynivalenol, LC/MS

1 ÚVOD

Pivo je slabě alkoholický nápoj, který se po staletí vyrábí z obilných sladů, vody a chmele za účasti pivovarských kvasinek. Ječmenný setý je základní surovinou pro výrobu sladu v tradičních pivovarských zemích. Tato starobylá rostlina prošla při domestikaci vývojem od převážně potravinářského obilí po krmivo a sladovnické obilí (Basařová et al., 2010; Hegrova et al., 2009). Složení mikroflóry zrna ječmene je ovlivňováno zejména geografickými a klimatickými vlivy, výživou, aplikací fungicidů, množstvím srážek od počátku metání do sklizně, odolností odrůd vůči poléhání, podmínkami během skladování ječmene a hotového sladu atd.

Na ječmeni se vyskytuje široké spektrum fytopatogenních hub, které napadají rostlinu během fází růstu, zrání, sklizně (*Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium*) a skladování (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*) (Bol et al., 1988; Niessen et al., 1992). Infekce ječmene těmito patogenními vláknitými mikromycetami vede k výnosovým ztrátám, snížení klíčivosti a sladovnické kvality zrna (Oliveira et al., 2012). Jako součást svého sekundárního metabolismu mohou patogenní plísně produkovat mykotoxiny. Mykotoxiny lze definovat jako přírodní produkty těchto plísní, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velmi malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxinnými plísněmi potenciálně značně nebezpečná (Bennett, J. W., 1987).

Mikroskopické vláknité houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny obilovin. Patří mezi půdní mikroorganismy vyskytující se v oblastech Evropy, Ameriky, Asie a Austrálie s mírnými klimatickými podmínkami (Placinta, 1999; Creppy, E. E., 2002; Malíř et al., 2003). Zrna ječmene jsou infikována fusariemi během kvetení i v době dozrávání. Zrna napadená v mléčné zralosti jsou silněji prorůstána myceliem, čímž se zvyšuje nebezpečí vyšší produkce mykotoxinů. Takto poškozená zrna většinou nedosahují požadované velikosti a zčásti bývají odstraněna již během třídění (Šafránková, 2011).

1 INTRODUCTION

Beer is weak alcoholic beverage, for centuries brewed from cereal malts, water and hop with the presence of brewery yeasts. Barley is a basic raw material for malt production in traditional brewing countries. During the domestication process, this ancient plant developed from prevalently food to feed cereal and malting cereal (Basařová et al., 2010; Hegrova et al., 2009). Composition of microflora of barley grain is affected namely by geographical and climatic effects, nutrition, fungicide application, amount of precipitation from the beginning of heading to harvest, resistance of varieties to lodging, conditions during storage of barley and produced malt etc.

Barley is attacked by a wide range of phytopathogenic fungi during growing, ripening, harvest (*Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium*), and storage (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*) (Bol et al., 1988; Niessen et al., 1992). Infection of barley by these pathogenic filamentous micromycetes leads to yield losses, reduced germination capacity and grain malting quality (Oliveira et al., 2012). As a part of their secondary metabolism pathogenic fungi can produce mycotoxins. Mycotoxins can be defined as natural products of these fungi which evoke a toxic response of the organism even at very low concentrations, therefore any contamination with toxinogenic fungi is potentially considerably dangerous (Bennett, J. W., 1987).

Microscopic filamentous fungi of *Fusarium* species are significant pathogens of cereals. They include soil microorganisms occurring in the areas with moderate climatic conditions in Europe, America and Asia (Placinta, 1999; Creppy, E. E., 2002; Malíř et al., 2003). Barley grains are infected by fusaria during flowering and ripening. Grains attacked during the milk stage of ripening are more heavily proliferated with mycelium, risk of a higher mycotoxin production thus being increased. Damaged grains then usually do not achieve a proper size and they are partly removed during sieving (Šafránková, 2011). Although micromycetes of *Fusarium* spp. are known as "field fungi", un-

ková, 2011). I když jsou mikromycety rodu *Fusarium* označovány jako „polní plísň“, za příznivých podmínek mohou růst také v průběhu skladování (Vaughan et al., 2005; Fakhrunnisa; Hasmhi, M. H.; Ghaffar, A., 2006).

K fusariovým mykotoxinům se řadí trichotheceny B (deoxynivalenol, nivalenol), trichotheceny A (T-2 toxin, HT-2 toxin), zearalenon a skupina fumonisinů (Mankevičiene et al., 2011; Capriotti et al., 2010; Wolf-Hall, 2007; Creppy E. E., 2002). Tyto mykotoxiny jsou celosvětově významné kontaminanty, které se vyskytují v obilovinách, např. pšenici, ječmenu, ovsu, kukuřici, rýži a jejich produktech jako je chléb, slad a pivo (Mankevičiene et al., 2011; Ibáñez-Vea et al., 2012). Deoxynivalenol (DON) je nejvíce sledovaný trichothecen. Jeho významným producentem je *Fusarium graminearum* (nepohlavní forma *Gibberella zeae*), který se uplatňuje především v teplejších oblastech (optimální teplota růstu je 25 °C). Dalším producentem je *F. culmorum*, který má nižší nároky na teplotu (optimum je 21 °C). Výskyt DON v cereáliích je meziročně velmi variabilní, závisí především na klimatických podmínkách v dané lokalitě, na typu předplodiny a na rezistenci dané odrůdy. V některých letech lze prokázat přítomnost tohoto mykotoxinu prakticky ve 100% vyšetřovaných vzorků (Velíšek, et al., 2009). DON je z hlediska praktického výskytu trichothecenů považován za hlavní kontaminant potravin. Jde však naštěstí o jeden z nejméně toxických trichothecenů, který je bez kumulativních vlastností a nemá charakter karcinogenu (Malíř et al., 2003; Velíšek et al., 2009).

Fusariové plísně představují významné bezpečnostní riziko pro pivovarský průmysl (Oliveira et al., 2012). Při skladování kontaminovaného ječmene vznikají výhodné podmínky pro rozvoj toxinogenních plísní (Papadopolou et al., 2000; Wolf-Hall, 2007). Během máčení, klíčení i hvozdění jsou plísně stále schopny růstu a tvoření mykotoxinů (Wolf-Hall, 2007). Výroba sladu – řízeného klíčení obilných zrn – je komplexní biologický proces, který zahrnuje širokou škálu biochemických a fyziologických reakcí (Laitila, 2007). Výměna máčecí vody sice odstraňuje část mykotoxinů, ale při klíčení může docházet opět k jejich nárůstu. Při hvozdění dochází k poklesu obsahu mykotoxinů, ale ne k jejich vymizení (Laitila, 2007; Oliveira, et al., 2012; Lancová, et al., 2008). Plísňe a jejich spóry se z infikovaného ječmene a sladu do piva dostat nemohou, nejpozději ve stádiu chmelovaru jsou usmrceny. Část mykotoxinů díky své tepelné stabilitě tento proces „přežije“ (Wolf-Hall, 2007; Scott, 1996) a může přejít až do finálního produktu – piva (Wolf-Hall, 2007; Bertuzzi, et al., 2011).

Cílem naší studie bylo sledovat výskyt DON ve vzorcích pív, které pocházely přímo od výrobců z České republiky.

2 MATERIÁL A METODY

V letech 2009–2012 byl sledován výskyt mykotoxinu DON v lahvoých pivech, která pocházela přímo od výrobců z ČR. Jednalo se o piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky a nealkoholická. Celkem bylo analyzováno 119 pív (viz tab. 1).

DON v pivu byl analyzován po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonku DONPREP. Odplyněný vzorek piva byl nanesen přímo na imunoafinitní kolonku, k promytí byla použita deionizovaná voda. Eluce byla prováděna opakovaně methanolem. Vzorek byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 1 ml vodného methanolu. Pro identifikaci a kvantifikaci DON byla použita metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně – spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS) (Anselme et al., 2006; Lancová et al., 2008; Kostelanska et al., 2011). Byla optimalizována a validována metoda s gradientovou elucí.

Tab. 1 Počty analyzovaných pív / Numbers of analyzed beers

Rok / Year	Nealko / Non-alko	Sv. výčepní / Pale drafted	Tm. výčepní / Dark drafted	Sv. ležák / Pale lager	Tm. ležák / Dark lager	Celkem / Total
2009	5	6	2	17	5	35
2010	5	3	2	14	5	29
2011	2	6	2	15	6	31
2012	4	2	2	12	4	24
Celkem / Total	16	17	8	58	20	119

Tab. 2 Úroveň kontaminace pív DON / Level of DON contamination of beer samples (µg/l)

Kategorie / Category	Celkem / Total	< 2.0	2–10	> 10
Nealko / Nonalcoholic	16	7	7	2
Sv. výčep / Pale drafted	17	7	9	1
Tm. výčep / Dark drafted	8	2	5	1
Sv. ležák / Pale lager	58	11	36	11
Tm. ležák / Dark lager	20	3	10	7

Tab. 3 Průměrný obsah DON (µg/l) v pivu / Mean DON content (µg/l) in beer

Rok / Year	Positivní / Celkem / Positive / Total	Rozmezí / Range	Prům. obsah DON / Mean DON content	
			Všechny vzorky / All samples	Kontaminované vz. / Contaminated samples
2009	29/35	2.0–24.1	6.0	7.0
2010	17/29	2.3–24.5	8.3	13.7
2011	24/31	2.2–44.0	7.4	9.3
2012	19/24	2.1–19.5	4.3	5.0
Celkem / Total	89/119	2.0–44.0	6.6	8.5

der favorable conditions they can also grow during storage (Vaughan et al., 2005; Fakhrunnisa; Hasmhi, M. H.; Ghaffar, A., 2006).

Fusarium mycotoxins include type-B trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol), trichothecenes A (T-2 toxin, HT-2 toxin), zearalenon and a group of fumonisins (Mankevičiene et al., 2011; Capriotti, et al., 2010; Wolf-Hall, 2007; Creppy, E. E., 2002). These mycotoxins are significant contaminants occurring worldwide in cereals e.g. wheat, oats, maize and rice and products made from them such as bread, malt and beer (Mankevičiene et al., 2011; Ibáñez-Vea et al., 2012). Deoxynivalenol (DON) is the most studied trichothecene. Its important producer is *Fusarium graminearum* (asexual form of *Gibberella zeae*) occurring prevalently in warmer areas (optimal temperature for growth is 25 °C). *F. culmorum*, another producer, is less demanding for temperature (optimum is 21 °C). DON occurrence in cereals is variable depending largely on weather conditions in the given locality and year, a previous crop and resistance of the given variety. In some years, the presence of this mycotoxin can be proven nearly in 100% of the examined samples (Velíšek et al., 2009). In terms of the trichothecene occurrence, DON belongs to main food contaminants. Fortunately, it is one of the least toxic trichothecenes without cumulative characters and it is not a carcinogen (Malíř et al., 2003; Velíšek et al., 2009).

Fusarium fungi are a significant safety risk for the brewing industry (Oliveira et al., 2012). Malting of contaminated barley creates favorable conditions for the development of toxinogenic fungi (Papadopolou et al., 2000; Wolf-Hall, 2007) which are still during steeping, germination and kilning capable to grow and produce mycotoxins (Wolf-Hall, 2007). Production of malt – controlled germination of cereal grains – is a complex biological process which includes a wide range of biochemical and physiological reactions (Laitila, 2007). Exchange of steeping water removes part of mycotoxins, but they can start to grow again during germination. During kilning, mycotoxins are reduced but not eliminated (Laitila, 2007; Oliveira et al., 2012; Lancová et al., 2008). Fungi and their spores cannot pass from infected barley and malt into beer; they are killed in the phase of wort boiling as the latest. Part of mycotoxins due to their thermal stability “survive” this process (Wolf-Hall, 2007; Scott, 1996) and can get even to the final product – beer (Wolf-Hall, 2007; Bertuzzi et al., 2011).

Tab. 4 Výsledky publikovaných studií obsahu DON ($\mu\text{g/l}$) v pivech / DON content ($\mu\text{g/l}$) in beers in published studies

Reference / References	Positivní / Celkem Positive / Total	Průměrný obsah DON / Mean DON content	Původ piv / Beer origin	LOQ* ($\mu\text{g/l}$)
(Anselme et al., 2006)	59/80	5.0	Belgium	2.0
(Kostelanska et al., 2009)	111/176	6.6	Europe and North America	2.5
(Bertuzzi et al., 2011)	70/106	2.1	European countries	0.5
(Varga et al., 2013)	289/374	8.4	38 countries of the world	3.0–11.0
VÚPS, a.s. / RIBM	89/119	6.6	Czech Republic	2.0

* Mez stanovitelnosti / Limit of quantification

Tab. 5 Nejvyšší naměřené hodnoty DON ($\mu\text{g/l}$) v jednotlivých letech sledování / The highest DON values ($\mu\text{g/l}$) in the individual years of monitoring

Rok / Year	Nealko / Nonalcoholic	Sv. výčepní / Pale drafted	Tm. výčepní / Dark drafted	Sv. ležák / Pale lager	Tm. ležák / Dark lager
2009	24.1	8.4	9.5	23.6	11.1
2010	9.2	2.5	1.2	24.5	23.9
2011	10.1	10.9	14.6	12.7	44.0
2012	3.0	2.1	3.8	9.9	19.5

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Mykotoxin DON v koncentraci vyšší než $2,0 \mu\text{g/l}$ byl nalezen u 74,8 % analyzovaných piv (89 piv z celkových 119), z toho u 56,3 % se kontaminace pohybovala mezi $2\text{--}10 \mu\text{g/l}$ (67 ze 119), u 18,5 % vzorků byl obsah DON vyšší než $10 \mu\text{g/l}$ (22 ze 119) viz *tab. 2*.

Průměrný obsah DON ve všech vzorcích se pohyboval v rozmezí $4,3\text{--}8,3 \mu\text{g/l}$ viz *tab. 3*.

V letech 2006–2013 byly publikovány 4 významné studie, které se týkaly výskytu DON v pivech (Anselme et al., 2006; Varga, et al., 2013; Bertuzzi et al., 2011; Kostelanska et al., 2009). Piva pocházela z let 2003–2013 a byla analyzována metodou plynové a kapalinové chromatografie. Z výše uvedené tabulky (*tab. 4*) vyplývá, že naše výsledky jsou plně v souladu s dříve publikovanými daty.

Průměrná hodnota obsahu DON ve všech nealkoholických pivech byla $4,5 \mu\text{g/l}$, ve světlých výčepních pivech $3,0 \mu\text{g/l}$, v tmavých výčepních pivech $5,4 \mu\text{g/l}$, ve světlých ležácích $7,3 \mu\text{g/l}$, v tmavých ležácích $9,9 \mu\text{g/l}$.

Medián obsahu DON činil $2,4 \mu\text{g/l}$ v nealkoholických pivech, $2,2 \mu\text{g/l}$ ve světlých výčepních pivech, $3,9 \mu\text{g/l}$ v tmavých výčepních pivech, $5,7 \mu\text{g/l}$ ve světlých ležácích a $6,1 \mu\text{g/l}$ v tmavých ležácích.

Nejvyšší hodnoty DON, které byly v letech 2009–2012 nalezeny, jsou shrnuty v *tab. 5*.

Varga a spol. (2013) a Kostelanská a spol. (2009) uvádí pozitivní korelaci mezi koncentrací alkoholu v pivu a obsahem mykotoxinů. Naše výsledky toto částečně potvrzují, neboť obsah DON vyšší než $10 \mu\text{g/l}$ byl nalezen u 23,1 % ležáčkových piv, 7,7 % výčepních piv a 12,5 % nealkoholických piv.

Maximální povolený limit DON v potravinách je pro všechny členské státy EU stanoven Nařízením komise (ES) č. 1881/2006. Pro ječmen činí $1250 \mu\text{g/kg}$. Maximální povolený limit pro obsah DON v pivu nebyl evropskou legislativou ošetřen. Vědecký výbor pro potraviny v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil tolerovatelný denní příjem (TDI) pro DON ve výši $1 \mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti a den (EFSA, 2007). O TDI pro DON bylo rozhodnuto na základě efektu u pokusných zvířat charakterizovaných snížením hmotnostních přírůstků a hmotnosti jater. Imunotoxický efekt byl pozorován až u dávek 2,5krát vyšších. (SZÚ, 2013).

DON může být stejně jako ostatní xenobiotika částečně metabolizován za vzniku konjugovaných forem. Většinou se jedná o konjugáty se sacharidy, které vznikají v průběhu detoxikačního procesu rostlin. K nejznámějším konjugátům patří deoxynivalenol-3-glukosid (D3G). V současné době není možné říct, jestli D3G, jakožto detoxikační rostlinný produkt, vykazuje akutní toxicitu nebo zda se v těle může rozštěpit zpět na DON (Berthiller et al., 2007; Berthiller et al., 2013). Nicméně Berthiller et al. (2013) uvádí, že D3G je odolný vůči kyselině chlorovodíkové, což naznačuje, že nebude hydrolyzován v žaludku savců a nerozštěpí se zpět na mykotoxin DON. Světový výzkum v této oblasti dosud intenzivně probíhá.

The aim of this study was to monitor the occurrence of DON in beer samples collected directly from the outlet shops in the Czech Republic.

2 MATERIAL AND METHODS

In 2009–2012, the occurrence of mycotoxin DON in bottled beers obtained directly from Czech outlet shops was monitored. Samples included pale, dark, dispensed, lager and non-alcoholic beers. Totally 119 beers were analyzed (see *Tab. 1*).

DON in beer was analyzed after previous purification by the immunoaffinity DON-PREP column. Degassed beer samples were applied directly on the immunoaffinity column, deionized water was used for washing. Elution with methanol was performed repeatedly. Samples were dried on a vacuum evaporator. Before injection, the samples were dissolved in aqueous methanol (1 ml). The high performance liquid chromatography method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS) was used for the DON identification and quantification (Anselme et al., 2006; Lancová et al., 2008; Kostelanska, et al., 2011). The method with gradient elution was optimized and validated.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Mycotoxin DON at concentration higher than $2.0 \mu\text{g/l}$ was detected in 74.8% of the analyzed beer samples (89 beers of total 119), in 56.3% of which contamination varied between $2\text{--}10 \mu\text{g/l}$ (67 of 119), in 18.5% of samples, DON was higher than $10 \mu\text{g/l}$ (22 of 119), see *Tab. 2*.

Mean DON content in all samples varied from $4.3\text{--}8.3 \mu\text{g/l}$ (see *Tab. 3*).

In 2006–2013, four important studies dealing with the DON occurrence in beers were published (Anselme et al., 2006; Varga, et al., 2013; Bertuzzi et al., 2011; Kostelanska et al., 2009). Beers came from 2003–2013 and were analyzed using gas and liquid chromatography methods. The table above (*Tab. 4*) indicates that our results are in full compliance with the data published previously.

The mean DON value in all non-alcoholic beers was $4.5 \mu\text{g/l}$, in pale drafted beers $3.0 \mu\text{g/l}$, dark drafted beers $5.4 \mu\text{g/l}$, pale lagers $7.3 \mu\text{g/l}$, dark lagers $9.9 \mu\text{g/l}$.

Median of DON content was $2.4 \mu\text{g/l}$ in non-alcoholic beers, $2.2 \mu\text{g/l}$ in pale drafted beers, $3.9 \mu\text{g/l}$ in dark drafted beers, $5.7 \mu\text{g/l}$ in pale lagers and $6.1 \mu\text{g/l}$ in dark lagers.

The highest DON values detected in 2009–2012 are summarized in *Tab. 5*.

Varga et al. (2013) and Kostelanská et al. (2009) reported a positive correlation between concentration of alcohol in beer and mycotoxin content. Our results partly confirm these findings as DON higher than $10 \mu\text{g/l}$ was found in 23.1% of lager beers, 7.7% of drafted beers and 12.5% of non-alcoholic beers.

Maximum allowable limit for DON in food was set for all the EU member states by the European Commission regulation (EU) no. 1881/2006. For barley it is $1250 \mu\text{g/kg}$. The maximum allowable limit for DON content was not set by the European legislation. The scientific committee of the European Food Safety Authority (EFSA) set the tolerable daily intake (TDI) for DON in the amount of $1 \mu\text{g/kg}$ per the body weight and per day (EFSA, 2007). The TDI for DON was set on the basis of the impact in testing animals characterized by the reduction in weight gains and liver weight. Immunotoxic effect was observed only in 2.5x higher doses (SZÚ, 2013).

DON similarly as other xenobiotics can be partially metabolized and conjugated forms are created, namely conjugates with saccharides formed during the detoxication process of plants. Deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) belongs to the well known conjugates. Today it is not possible to state whether D3G, as a detoxication product in plants, exhibits acute toxicity or whether it can split in the body back to DON (Berthiller, et al., 2007; Berthiller et al., 2013). Nevertheless, Berthiller et al. (2013) reported that D3G was resistant to hydrochloric acid, this indicates that it is not hydrolyzed in mammalian stomachs and does not split back to DON mycotoxin. This issue has been intensively researched worldwide.

4 ZÁVĚR

Pivo je starobylý nápoj, který je velmi populární na celém světě. Obiloviny, jedny z potenciálně nejvýznamnějších zdrojů plísní a mykotoxinů jsou základní surovinou pro jeho výrobu. Je proto velmi důležité se zabývat kvalitou vstupních surovin pro výrobu piva. Ve VÚPS pravidelně sledujeme obsah vybraných fusariových mykotoxinů, tedy i DON ve sklizni sladovnického ječmene a v námi analyzovaných vzorcích opakovaně zjišťujeme, že až na výjimky zdaleka nedosahují nastavených maximálních limitů. V rámci Českého svazu pivovarů a sladoven existuje metodické doporučení pro regulaci mykotoxinů v pivu. Na základě našich dosavadních zkušeností můžeme říct, že obsah mykotoxinů v pivovarských surovinách a pivu nepředstavuje významné zdravotní ohrožení. Je však nezbytné výskyt mykotoxinů v pivu průběžně sledovat a chránit tak zdraví spotřebitele.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT ČR FCH-S-13-2087 Zatížení ekosystémů prioritními polutanty a možnosti jejich eliminace.

LITERATURA / REFERENCES

- Anselme, M., Tangni, E. K., Pussemier, L., J. C., Motte, Van Hove, F., Schneider, Y. J., Van Peteghem, C., Larondelle, Y., 2006: Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants*, 23(9): 910–8.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. 1. vydání, Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN 978-80-7080-734-7.
- Bennett, J. W., 1987: Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia*, 100(1): 3–5.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krška, R., Schuhmacher, R., 2007: Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1–2): 33–37.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saega, S., Haesaert, G., Karlovský, P., Oswald, I. P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2013: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57: 165–186.
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Donadini, G., Pietri, A., 2011: Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food control*, 22: 2059–2064.
- Bol, J., Angelo, S. A. G. F., Vermeire, H. A., 1988: Cell-wall degrading enzymes in malt of microbial origin. *Proc. Eur. Brew. Conv. – Microbiology Group*: 142.
- Capriotti, A. L., Foglia, P., Gubbiotti, R., Rocca, C., Samperi, R., Laganà, A., 2010: Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No. 1831/2003 in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217: 6044–6051.
- Creppy, E. E., 2002: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19–28.
- EFSA, 2011: <http://www.efsa.europa.eu/>. EFSA. [Online] [Cited: 11 června 2013.] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1831:20100701:CS:PDF>
- EUR-Lex. EUR-Lex. [Online] [Cited: 8 září 2011.] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ>.
- Fakhrunnisa, Hasmhi, M. H., Ghaffar, A., 2006: Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (1): 185–192.
- Hegrova, B., Farkova, M., Macuchova, S., Havel, J., Preisler, J., 2009: Investigation of relationships between barley stress peptides and beer gushing using SDS-PAGE and MS screening. *Journal of Separation Science*, 32 (23–24): 4247–53.
- Ibáñez-Vea, M., Lizarraga, E., González-Penas, E., López de Cerain, A., 2012: Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. *Food Control*, 25: 81–88.
- Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P. M., Berthiller, F., Krška, R., 2009: Occurrence of Deoxynivalenol and its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3187–3194.

4 CONCLUSIONS

Beer, centuries-old beverage, has been very popular all over the world. Cereals, one of potentially most significant sources of molds and mycotoxins, are basic brewing raw materials. Therefore it is very important to monitor quality of the raw materials for beer production. The RIBM regularly tests contents of the selected fusarium mycotoxins, i.e. including DON in malting barley crop and the samples analyzed by far do not usually contain the set maximum limits. Czech Beer and Malt Association issued methodical recommendation for the regulation of mycotoxins in beer. Based on our current experience, we can state that mycotoxin content in brewing raw materials and beer does not represent any significant health risk. On the other hand, it is necessary to monitor continuously the occurrence of mycotoxins in beer and protect thus consumers' health.

Acknowledgements

The work was supported by project No. FCH-S-13-2087 Load of ecosystems by priority pollutants and possibilities of their elimination from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Translated by Vladimíra Nováková

- Kostelanska, M., Zachariasova, M., Lacina, O., Fenclova, M., Kollos, A., Hajslova, J., 2011: The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry*, 126: 1870–1876.
- Laitila, A., 2007: Microbes in the tailoring of barley malt properties. Academic dissertation in Microbiology. Helsinki: s. n., 2007.
- Lancová, K., Hájšlová, J., Poustka, J., Krppl, A., Zachariasova, M., Dostálek, P., Sachambula, L., 2008: Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (6): 732–744.
- Malíř, F. and Ostrý, V., 2003: Vlákenné mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. 1. vydání. s. l.: Mikada.
- Mankevičiene, A., Butkute, B., Gaurilickiene, I., Dabkevičius, Z., Suproniene, S., 2011: Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*, 22: 970–976.
- Niessen, L., Böhm-Schräm, M., Vogel, H., Donhauser, S., 1992: Mykologische Untersuchungen und Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres. *Brauwelt*, 132 (16/17): 702.
- Oliveira, P. M., Mauch, A., Jacob, F., Waters, D. M., Arendt, E. K., 2012: Fundamental study on the influence of Fusarium infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 32–43.
- Papadopolou, A., Wheaton, L., Muller, R., 2000: The control of selected microorganisms during malting process. *Brewing research International*, 106 (3): 179–188.
- Placinta, C., 1999: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21–37.
- Scott, P. M., 1996: Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the AOAC International*, 79: 875–882.
- SZÚ, 2013: <http://www.szu.cz/>. [Online] 2013. [Cited: 11. června 2013.] <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/mykotoxiny-v-pivu-dtest-postrasil-spotrebitele>.
- Šafránková, I., 2011: Mikroflóra zrn sladovnických odrůd ječmene. Úroda, 3.
- Varga, E., Malachova, A., Schwartz, H., Krška, R. F., Berthiller, F., 2013: Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives and Contaminants*, 30 (1): 137–146.
- Vaughan, A., Sullivan, T. O. and Sinderen, D. V., 2005: Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111 (4): 355–371.
- Velíšek, J., Hájšlová, J., 2009: Chemie potravin II. OSSIS, Havlíčkův Brod. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- Wolf-Hall, C. E., 2007: Mold and mycotoxin problem encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 89–94.