

Fusariové mykotoxiny v ječmeni jarním a jejich výskyt v rámci technologického řetězce ječmen-slad-pivo

Fusarium Mycotoxins in Spring Barley and Their Occurrence Within the Technological Chain Barley-Malt-Beer

MARTA KOSTELANSKÁ¹, MILENA ZACHARIÁŠOVÁ¹, ZBYNĚK DŽUMAN¹, JANA HAJŠLOVÁ¹, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ², RADIM CERKAL², KATEŘINA VACULOVÁ³, ALEXANDR MIKYŠKA⁴, VRATISLAV PSOTA⁴

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice

¹Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6

e-mail: jana.hajslova@vscht.cz

²Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno

e-mail: jaroslava.ehrenbergerova@mendelu.cz

³Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž a Agrotest fyto, s. r. o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž

³Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. and Agrotest fyto, Ltd., Havlickova 2787, 767 01 Kromeriz

e-mail: vaculova.katerina@vukrom.cz

⁴Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lipová 15, 120 44 Praha 2

⁴Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lipova 15, 120 44 Praha 2

e-mail: mikyska@beerresearch.cz

Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Džuman, Z. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Cerkal, R. – Vaculová, K. – Mikyška, A. – Psota, V.: Fusariové mykotoxiny v ječmeni jarním a jejich výskyt v rámci technologického řetězce ječmen-slad-pivo. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 209–214.

Fusariové mykotoxiny patří k nejčastějším kontaminantům sladovnického ječmene, sladu i finálního piva. V rámci projektu Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele byl v letech 2009 a 2010 sledován obsah fusariotoxinů ve 12 odrůdách ječmene jarního, který byl pěstován ve dvou moravských lokalitách ve dvou pěstebních systémech. Kromě suroviny byla sledována dynamika mykotoxinů deoxynivalenolu a jeho maskované formy deoxynivalenol-3-glukosidu v rámci sladařské a pivovarské technologie při použití chemicky ošetřeného a neošetřeného ječmene jako vstupní suroviny technologií.

Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Džuman, Z. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Cerkal, R. – Vaculová, K. – Mikyška, A. – Psota, V.: Fusarium mycotoxins in spring barley and their occurrence within the technological chain barley-malt-beer. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 209–214.

Fusarium mycotoxins represent the predominant contaminants of malting barley, malt and final beer. As a part of the national project Research Centre for Barley and Hop Substances, levels of *Fusarium* mycotoxins were investigated in 12 varieties of spring barley, harvested in 2009 and 2010 in two different Moravian localities and grown under two different breeding systems. Beside of raw materials, also dynamics of deoxynivalenol and its „masked“ form deoxynivalenol-3-glucoside as associated with chemical treatment of barley were studied within the malting and brewing technologies.

Kostelanská, M. – Zachariášová, M. – Džuman, Z. – Hajšlová, J. – Ehrenbergerová, J. – Cerkal, R. – Vaculová, K. – Mikyška, A. – Psota, V.: Fusarium-Mykotoxine in der Sommergerste und ihre Auftreten im Rahmen der technologischen Kette Gerste – Malz – Bier. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 209–214.

Zu den häufigsten Kontaminanten der Braugerste, des Malzes und des Bieres gehören *Fusarium* Mykotoxine. Im Zeitraum 2009–2010 wurde im Rahmen eines Projektes im Forschungszentrum für Studium Gersten- und Hopfengehaltstoffe einen Gehalt an Fusarium-Toxine in den 12 Sommergerstensorten, die in den zwei mährischen Lokalitäten in den zwei Anbausystemen angebaut wurden, verfolgt. Im Rahmen der Mälzerei- und Brautechnologie wurde bei Anwendung der chemisch behandelten und unbehandelten Gerste als einen Eingangrohstoff neben den Rohmaterialien auch die Dynamik von Mykotoxinen Deoxynivalenol und seiner maskierten Form Deoxynivalenol-3-Glukosid verfolgt.

Klíčová slova: ječmen jarní, mykotoxiny, deoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin

Keywords: spring barley, mycotoxins, deoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin

1 ÚVOD

Problematika výskytu toxigenních patogenů a jejich sekundárních metabolitů, mykotoxinů, v obilovinách a následně v potravinách je jednou z priorit výzkumu podporovaného Evropskou unií. Cílem projektu je vypracovat postupy jak kontaminaci předcházet nebo jak zachytit surovinu mykotoxiny kontaminovanou a minimalizovat její další pronikání do potravinového řetězce. Výzkum a stanovení nejvíce rozšířené skupiny fusariových mykotoxinů tvoří důležitou část projektu Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele (dále jen Výzkumné centrum). Na základě dosavadních výsledků získaných analýzou ječmene jarního ze sklizní 2005 až 2010 bylo prokázáno, že k hlavním mykotoxinovým kontaminantům patří fusariotoxin deoxynivalenol (DON). Zajímavostí získaných výsledků byl častý výskyt dvou trichothečenů, tentokrát typu A, jmenovitě HT-2 a T-2 to-

1 INTRODUCTION

The occurrence of toxigenic pathogens and their secondary metabolites mycotoxins in cereals represent one of the main priorities extensively supported by European Union. The aim of respective projects is firstly the development and suggestion of effective methods that would be able to prevent cereal crops from mycotoxins contamination, and secondly to detect the affected raw materials and minimize their further spread within the food chain. Research and determination of *Fusarium* mycotoxins present the crucial part of national project Research Centre for Barley and Hop Substances (Research Centre). Based on our existing results obtained by analysis of barley samples harvested in years 2005–2010, it has been proved, that deoxynivalenol (DON) is the main fusariotoxin contaminant of spring barley. Interestingly, high incidence with relatively high contamination

xinů. Oba analyty byly detekovány především v letech 2007 až 2010. Výstupy experimentů a analýz sladovnického ječmene z let 2005–2008 byly publikovány v časopise Kvasný průmysl (56, 2010, číslo 3) vydaném u příležitosti pětiletého výročí zahájení aktivit Výzkumného centra [1]. Předkládaná publikace shrnuje data o výskytu mykotoxinů v následujících letech projektu 2009 a 2010, se zaměřením na zmíněné HT-2 a T-2 toxiny a osud DON a jeho maskované formy DON-3-glukosidu (D3G) v průběhu výroby sladu a piva.

2 FUSARIOVÉ TRICHOHECENY „TYPU A“ V JEČMENI, SLADU A PIVU

Mykotoxin DON patří obecně k nejznámějším a nejčastěji detekovaným kontaminantům obou diskutovaných technologií. Jeho incidence, koncentrace hladiny i dynamika v průběhu sladování a vaření piva byly předmětem již několika rozsáhlých studií [2–8]. Vedle DON je třeba vzpomenout i výskyt maskovaného D3G [5,6,9,10], který se ukázal být běžným kontaminantem sladařských i pivovarských meziproduktů, ale zatím bohužel není stanovován rutinně. Přítomnost tohoto toxinu byla již dříve publikována v ječmeni, pšenici i kukuřici, kdy jeho koncentrační hladiny v testovaných vzorcích představovaly v průměru 20 % koncentrace volného DON [11]. V posledních deseti letech je stále větší pozornost věnována dalším dvěma fusariotoxinům ze skupiny trichothecenů typu A, jmenovitě HT-2 a T-2 toxinům, jejichž stále častější výskyt, ale i zvyšující se kontaminace byla potvrzena několika desítkami monitorizačních studií [12–22].

Oba toxiny jsou sice považovány za hlavní kontaminanty ovesa a ovesných výrobků, ale od roku 2002 byly sledovány stále se zvyšující koncentrace obou toxinů jak v ječmeni, tak také v pšenici. K hlavním producentům HT-2 i T-2 toxinů patří druhy mikroskopických vláknitých hub (plísň) *Fusarium poae*, *F. langsethiae* a *F. sporotrichoides*, jejich akutní i chronická toxicita je ve srovnání s DON vyšší. Navzdory vysoké toxicitě obou látek a stále se zvyšující incidenci i kontaminaci toxinů HT-2 i T-2 v cereáliích a potravinách, nebyly doposud Evropskou komisí stanoveny jejich maximální hygienické limity. Prozatím je stanovena pouze hodnota jejich Tolerable Daily Intake (TDI) na hladině 0,06 µg/kg tělesné hmotnosti pro sumu HT-2 i T-2 [23]. Pro přesné stanovení těchto limitů zatím nebyl nashromážděn dostatek analytických dat.

Průměrné hladiny kontaminace HT-2 a T-2 toxinů se v ječmeni běžně pohybují v rozmezí 50–200 µg/kg (suma toxinů), ale byly zaznamenány i koncentrace nad 1000 µg/kg [15, 18, 24]. Obecně bývá ve vzorcích cereálií častěji detekován HT-2 toxin, což je de-acetylovaný metabolit T-2 toxinu. Vliv běžně používaných agronomických praktik na kontaminaci cereálií toxiny T-2 a HT-2 nebyl dosud dostatečně studován a popsán, ale ze zveřejněných dat je evidentní, že neplatí stejná pravidla jako v případě DON. Samotné potravinářské technologie mají na hladiny obou toxinů významný vliv a jejich výskyt a změny v rámci sladařsko-pivovarské technologie byly již sledovány v několika málo publikacích [1,5,25,26]. Výsledky studií popisující hladiny HT-2 i T-2 při výrobě piva nejsou zcela kompatibilní. Některé práce uvádějí přenos toxinů ze sladu do piva srovnatelný s DON, jiné naopak uvádějí výskyt obou toxinů pouze v mlátu a žádné nebo velmi nízké hladiny ve finálních pivech. Kvašení ani filtrace nemají na HT-2 a T-2 toxiny žádný vliv. Nutno poznamenat, že při analýzách piva nebyvají tyto toxiny často detekovány [22, 27].

3 TESTOVANÉ VZORKY JEČMENE JARNÍHO

Stejně jako v minulých letech řešení projektu bylo v lokalitách Kroměříž a Žabčice pěstováno několik sladovnických odrůd pluchatého (Aksamit, Blaník, Bojos, Jersey, Kangoo, Prestige, Radegast, Sebastian) a nepluchatého (KM 1057, AF Lucius, KM 2084 a KM 2283) ječmene jarního. V roce 2010 byly navíc pěstovány i odrůdy Malz a Tolar. V obou zmiňovaných lokalitách byl ječmen pěstován po standardní předplodině za použití optimální pěstební technologie, a to dvěma systémy: chemicky ošetřeného pěstování a chemicky neošetřeného pěstební kontroly. Aplikované pesticidní přípravky jsou souhrnně uvedeny v tab. 1.

Analýzy všech uvedených vzorků byly provedeny na Ústavu chemie a analýzy potravin na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze pomocí moderní instrumentace využívající kapalinovou chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) jako separační a detekční systém. Podrobný popis analytické metody je uveden v publikacích [5]. Pro zajištění sladařských a pivovarských experimentů v roce 2010 byl vybrán vzorek ječmene odrůdy Radegast

levels of trichothecenes “type A” namely HT-2 and T-2 toxins, were detected in tested barley samples. Both analytes were positive in samples predominantly in years 2007 – 2010. Results of experiments and analyses obtained in the project obtained in years 2005–2008 were published in “Kvasný průmysl” journal (56, 2010, issue 3) devoted to fifth anniversary of Research Centre project running [1]. Recent paper is focused on summary of data from harvest 2009 and 2010, with emphasis on above mentioned HT-2 and T-2 toxins. The fate of DON and its conjugated or “masked” form DON-3-glucoside (D3G) within the malting and brewing technology is discussed as well.

2 FUSARIUM TRICHOHECENES OF “TYPE A” IN BARLEY, MALT AND BEER

Mycotoxin DON is considered to be the most known and also the most frequently detected contaminant in both discussed technologies. Its incidence, concentration levels and dynamics within the malting and brewing have been subjects to many devoted studies [2–8]. Next to DON also the presence of masked D3G should be noted [5,6,9,10]. This compound is also the common contaminant of malting and brewing technological intermediates. Unfortunately, this compound it is still not routinely controlled neither in cereals nor in cereal-based foods. The existence of D3G has been already proved and published in barley, wheat, as well as in corn at average concentration levels approximately 20 % of free DON amount [11]. In recent ten years, increasing attention has been paid to the other *Fusarium* toxins from group of trichothecenes A, HT-2 and T-2 toxins. Increasing incidence and levels have been proved in numerous of monitoring studies [12–22].

Both toxins are considered to be the main mycotoxins contaminants of oat and oat derived products. Since 2002, increasing contamination levels in barley and wheat have been observed as well. *Fusarium poae*, *F. langsethiae* and *F. sporotrichoides* belong to the main microscopic fungi species that are responsible for their production. In comparison to DON, both acute and chronic toxicity of particular toxins are significantly higher. Despite of high toxicity of both compounds, respective maximum legislation limits have not been established yet. With regard to lack of analytical data for determination of desired hygienic levels, only Tolerable Daily Intake (TDI) was estimated at values as low as the 0.06 µg/kg b.w. for sum of HT-2 + T-2 toxins [23].

Mean concentration levels of HT-2 and T-2 toxins in barley are in the range 50–200 µg/kg (sum of toxins) in this crop, however, in some cases, also levels exceeding 1000 µg/kg were reported [15,18,24]. With regard to natural formation of HT-2 toxin from T-2 toxin through de-acetylation, HT-2 toxin represents generally more abundant contaminant. The impact of agronomical practices on levels of HT-2 toxin and T-2 toxins were not properly identified and described until today. From already published data is clear that the general rules valid for DON cannot be applied in case of HT-2 and T-2 toxins. Various food processing technologies have major effect on levels of both toxins and their fate within malting and brewing has been already described in few studies [1,5,25,26].

The malting has a major effect on levels of HT-2 and T-2 toxins. Their levels can be decreased or increased depending on parameters of particular malting stages. The published result regarding the levels of HT-2 and T-2 toxins in beer collected from retail markets are rather contradictory. While some reports show the transfer of toxins from the raw material to final beer in ratios comparable to DON, other papers describe only occurrence in spent grains and no or very low concentrations in final beer products. It should be noted, that discussed toxins are not commonly detected in market beers [22, 27].

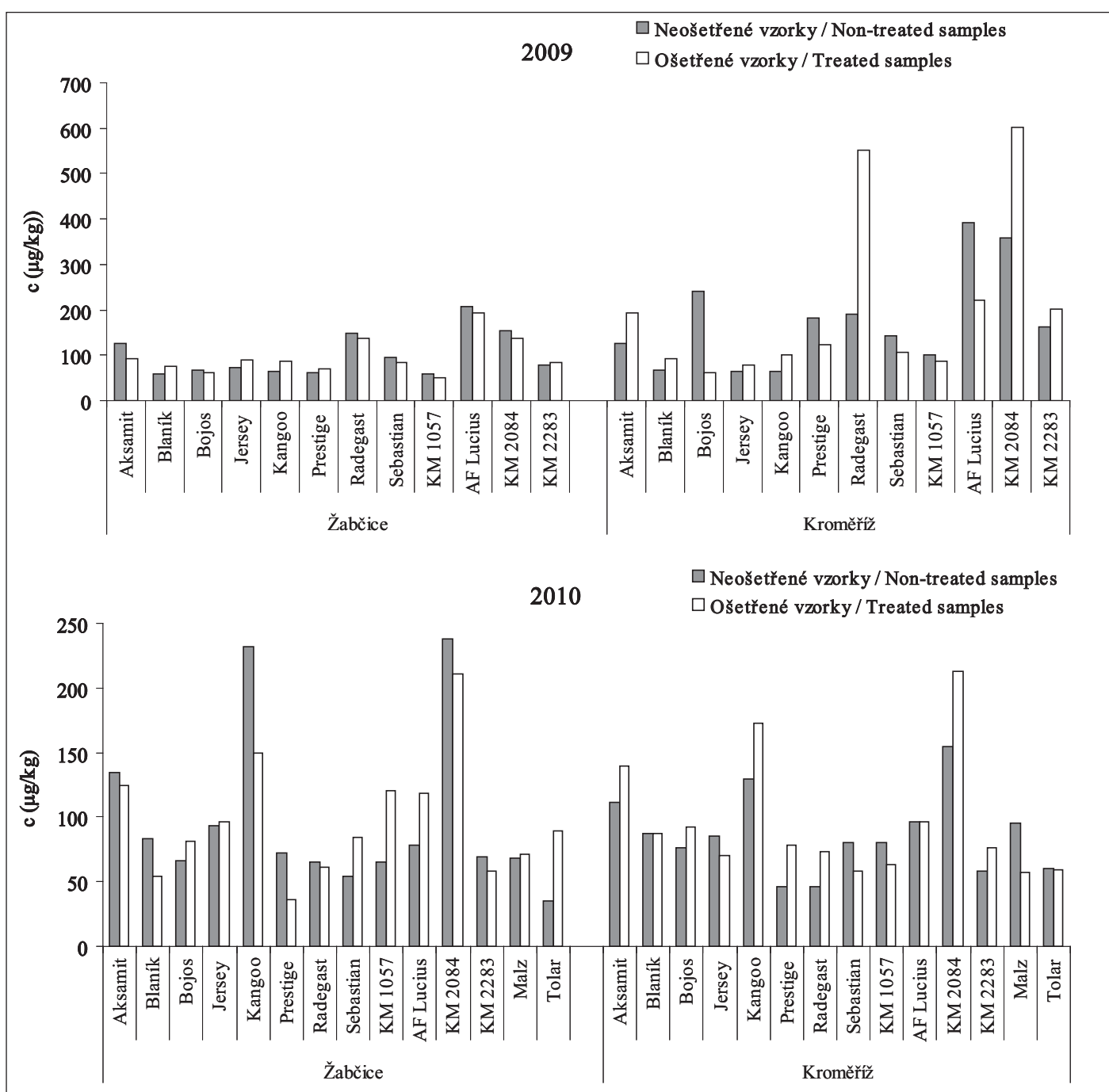
3 SAMPLES OF SPRING BARLEY TESTED WITHIN STUDY

Identically to other project's years, several cultivars of spring malting barley were grown in two Moravian localities (Kroměříž and Žabčice). In total, eight covered cultivars (Aksamit, Blaník, Bojos, Jersey, Kangoo, Prestige, Radegast, Sebastian) and four hullless (KM 1057, AF Lucius, KM 2084 a KM 2283) were grown in 2009. In 2010, two more covered cultivars Malz and Tolar were grown. The barley was grown after the standard pre-crop in both localities and the optimal growing technologies were applied for two growing systems with and without chemical treatments. The overview of applied fungicides is summarized in Tab. 1.

Mycotoxins analysis of all described samples were carried out in laboratories of Department of Food Chemistry and Analysis on Insti-

Tab.1 Přehled použitých fungicidů a herbicidů v letech 2009 a 2010 / Overview of fungicides and herbicides applied in year 2009 a 2010

Lokalita Locality	Přípravek Active substances	2009 Neošetřená Non-treated	2010 Ošetřená Chemically treated	Neošetřená Non-treated	Ošetřená Chemically treated
Kroměříž	Moření / Stains		Raxil TNT		Raxil TNT
	Herbicity / Herbicides	Granstar 75 Starane 250 EC Lontrel 300		WG Axial	
Žabčice	Fungicity / Fungicides		Fandango 200 EC Fandango 200 EC		Archer Top 400 EC Fandango 200 EC
	Moření / Stains		Raxil TNT		Raxil TNT
Žabčice	Herbicity / Herbicides	Logran 20 WG Banvel 480 S		Mustang Forte	
	Fungicity / Fungicides		Archer Top 400 EC Fandango 200 EC		Archer Top 400 EC



Obr. 1 Obsahy HT-2 toxinu ve vzorcích sladovnického ječmene, sklizeň 2009 a 2010 / Fig. 1 Levels of HT-2 toxin in samples of malting barley, harvest 2009 and 2010

(sklizeň 2009), který byl vypěstovaný v Kroměříži ve dvou variantách: (i) chemicky ošetřeno a (ii) chemicky neošetřeno. V průběhu obou technologií byly odebrány vzorky meziproductů a výsledných produktů a byly dále vyšetřeny na obsah mykotoxinů. Celkem bylo analyzováno 26 vzorků: i) sladařství – vstupní ječmen, ječmen po 1., 2. a 3. dni máčení, zelený slad, slad a sladový květ; ii) pivovarství – předeček, sladina, mladina, mladé pivo, pivo a mláto. Analyzovány byly také odpadní máčecí vody použité v průběhu sladování.

4 OBSAH MYKOTOXINŮ VE VZORCÍCH JEČMENE JARNÍHO

V letech 2009 a 2010 bylo v rámci projektu Výzkumného centra testováno celkově 104 vzorků sladovnického ječmene jarního. Mykotoxin, který byl detekován v obou letech sklizně ve všech analyzovaných vzorcích, je překvapivě HT-2 toxin. V roce 2009 byly naměřeny jeho koncentrační hladiny v rozmezí 51–602 µg/kg (průměr 143 µg/kg). Nutno poznamenat, že ve dvou vzorcích ječmene (Radegast a KM 2084) byla překročena koncentrační hladina 500 µg/kg, která bude podle předpokladů přestavovat budoucí hygienický limit v nezpracovaných cereáliích. V roce 2010 se jednalo o hladiny 35–238 µg/kg (průměr 94 µg/kg). Druhý představitel, T-2 toxin, byl v roce 2009 stanoven přibližně v polovině vzorků a jeho hladiny nepřekročily 300 µg/kg. V minulém roce 2010 byla incidence T-2 toxinu ve vzorcích vyšší, celkově bylo zjištěno 80 % pozitivních vzorků, s maximální koncentrací 150 µg/kg.

Vedle HT-2 toxinu byl v obou ročních detekován prakticky ve všech vzorcích také DON, a to v rozmezí hladin 31–690 µg/kg v roce 2009, nezvykle nízká kontaminace DON byla zjištěna ve sladovnickém ječmeni v roce 2010, maximální hladiny nepřesáhly 80 µg/kg. Tento fakt je přisuzován velmi suchému létu, které nedovolilo masivnější rozvoj fusariových plísní. Maskovaná forma D3G je ve vzorcích analyzovaných v rámci Výzkumného centra rutinně stanovován od roku 2009, kdy byl detekován v 90 % vzorků sladovnického ječmene na průměrných hladinách 75 µg/kg. V roce 2010, kdy obecně nálezy mykotoxinů byly velmi nízké, se D3G objevil pouze u čtvrtiny vzorků s maximální koncentrací 20 µg/kg. Z ostatních fusariových mykotoxinů byl detekován pouze NIV, a to jen na velmi nízkých hladinách.

Pěstební lokality, Kroměříž a Žabčice, neměly nijak zásadní vliv na spektrum mykotoxinů, počty pozitivních vzorků i průměrné nálezy byly v obou lokalitách srovnatelné. Mezi nejméně kontaminované odrůdy v obou letech patřily odrůdy KM 1057 a Jersey. Naopak odrůda Blaník byla nejvíce náchylná ke kontaminaci DON. Fungicidní ošetření nemělo obecně významný vliv na hladiny mykotoxinů. Na obr. 1 jsou graficky znázorněny hladiny HT-2 toxinu ve všech pěstovaných odrůdách v obou typech fungicidního ošetření. Hladiny toxinu jsou velmi srovnatelné u obou variant pěstování a zůstává tedy otázkou dalšího výzkumu, zda fungicidní přípravky používané proti fusariosám klasů jsou účinné i na druhy plísní produkující HT-2 a T-2 toxiny.

5 DYNAMIKA VÝSKYTU DON A MASKOVANÉHO D3G V RÁMCI SLADAŘSKÉ A PIVOVARNICKÉ TECHNOLOGIE

Hladiny DON, D3G, HT-2 a T-2 toxinů v ječmeni, který byl použit pro sladařské a pivovarské pokusy, stejně jako jejich koncentrace v meziproductech sladování, jsou uvedeny na obr. 2. Je zřejmé, že v průběhu máčení dochází ke snížení hladin všech sledovaných toxinů u obou variant ošetření ječmene. Tento fakt je nejpravděpodobněji způsoben vyluhováním mykotoxinů do máčecích vod. Porovnáním variant bez a s chemickým ošetřením je zřejmé, že trend snižování hladin v průběhu máčení se výrazně neliší. Toxiny nebyly v testovaných máčecích vodách detekovány z důvodu velkého zředění vzorků vod. V následném kroku klíčení sladu, kdy je získán meziproduct zelený slad, došlo k novému navýšení hladin DON a jeho maskované formy D3G. V zeleném sladu byly detekovány hladiny DON o 40 % („bez chemického ošetření“) a o 50 % („chemicky ošetřeno“) vyšší než v předchozím meziproductu (ječmen po 3. dni máčení). Mnohonásobné navýšení hladin D3G, až 260 % v případě kontrolního vzorku bez ošetření a 380 % u chemicky ošetřeného ječmene, bylo zjištěno u vzorků zeleného sladu. Tyto nárůsty jsou dnes přičítány hlavně aktivitě amylolytických enzymů, které se uplatňují v průběhu klíčení ječmene a způsobují štěpení vazeb škrobu, kde je D3G pravděpodobně vázán. Dalším vysvětlením je také „de novo“ produkce mykotoxinů z plísní na povrchu zrníček. Finální slad obsahoval přibližně 50 % DON a asi dvojnásobné množství D3G ve srovnání s ne-

tute of Chemical Technology in Prague by means of modern instrumentation using liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), which was used for separation and detection of target compounds. Detailed description of analytical method is given in our publications [5] The sample of Radegast cultivar (harvest 2009) from Kroměříž, in both treated and non-treated version, was picked out for further malting and brewing experiments. Intermediates and final products of both technologies were collected and tested for mycotoxins contamination. All together, 26 samples were analyzed: (i) malting – raw barley material, barley after the 1st, 2nd and 3rd steeping, green malt, malt and rootlets; (ii) brewing – first wort, sweet wort, wort, young beer, beer and spent grains. Additionally, steeping water used in the malting process was analyzed.

4 CONTENT OF MYCOTOXINS IN SAMPLES OF SPRING BARLEY

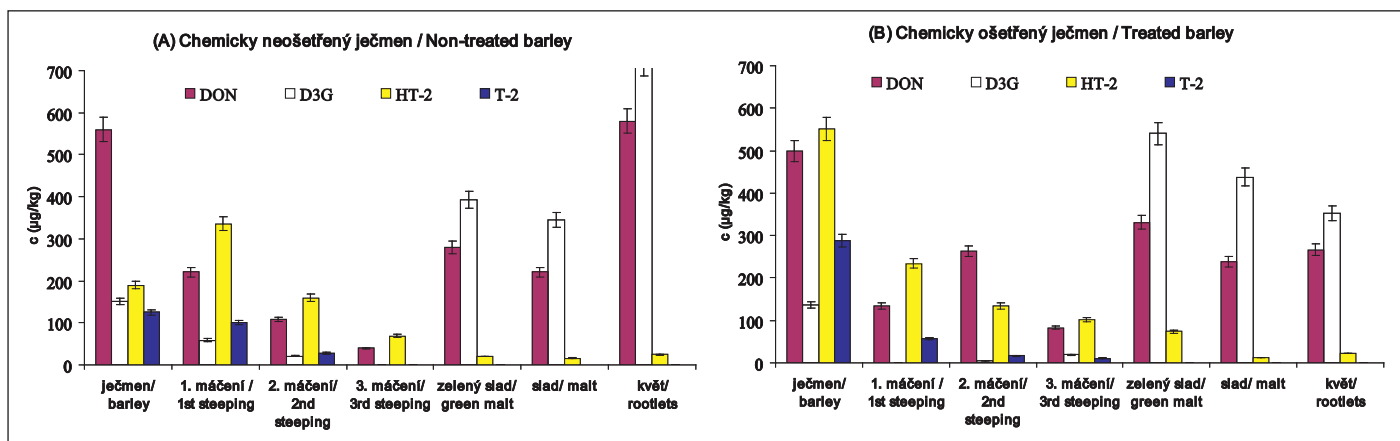
In total, 104 of malting spring barley samples were tested for mycotoxins contamination as a part of Research Centre project in last two years 2009 and 2010. HT-2 toxin was surprisingly detected in entire batch of tested samples in both years. In 2009 its concentrations were in range from 51 to 602 µg/kg (mean 143 µg/kg). It should be noted, that in two samples (barley cultivars Radegast and KM 2084 grown in Kroměříž) concentration exceeded level 500 µg/kg, which is expected to become the future hygienic limits for unprocessed cereals. In 2010, levels of HT-2 toxin ranged from 35 to 238 µg/kg (mean 94 µg/kg). T-2 toxin was detected almost in half of the samples in 2009 and its levels did not exceed level 300 µg/kg. In harvest 2010, the incidence of T-2 toxin was rather higher, 80 % of samples were positive with maximum concentration as high as 150 µg/kg.

As expected, beside of HT-2 toxin, also DON was notable contaminant of almost all samples in 2009; its levels were detected at concentrations in the range 31–690 µg/kg. On the other hand, unusually low concentrations of targeted mycotoxins in barely samples were observed in 2010 (maximum level was 80 µg/kg). This fact was most probably caused by very hot summer, which did not allow the extensive growth of *Fusarium* moulds. Masked D3G is routinely analysed in Research Centre samples since 2009, when 90 % of positive samples contained D3G at an average level 75 µg/kg. In 2010, only one-fourth of cultivars contained D3G (levels below 20 µg/kg were observed).

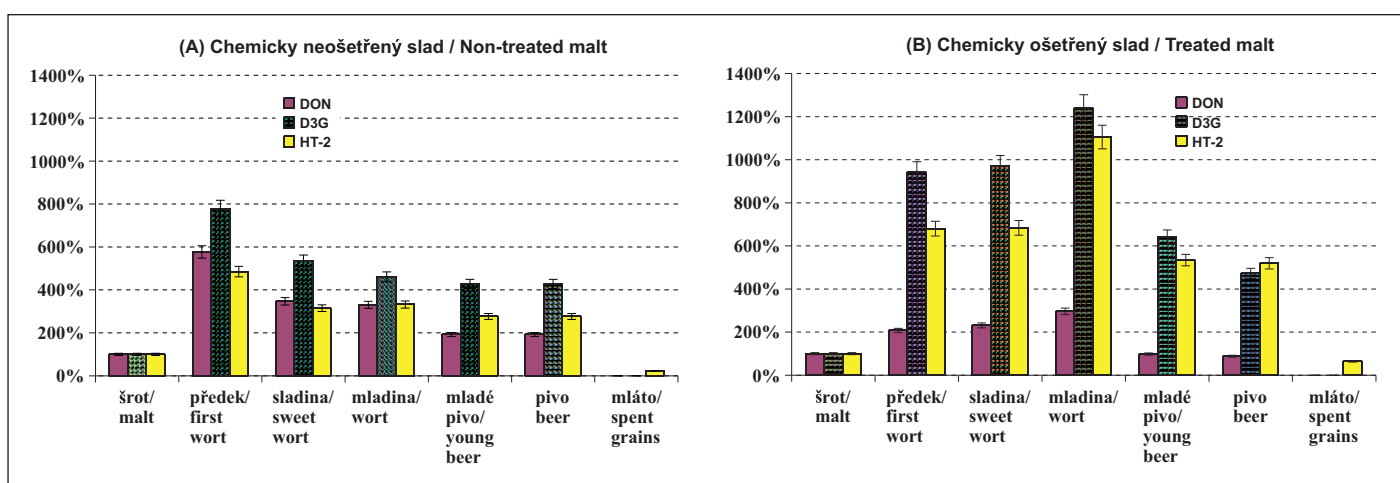
No statistically significant influence of the growing locality (Kroměříž and Žabčice) was observed, both percentage of positive samples and concentration levels were comparable. KM 1057 and Jersey were the least contaminated cultivars in both years of harvest. On the other hand, Blaník was the cultivar most susceptible to *Fusarium* contamination. Also fungicide treatment did not show any notable influence on final barley contamination. Fig. 1 shows the levels of HT-2 toxin in tested samples. Concentrations of this toxin are comparable in both ways of fungicide treatment. Based on these observations, the impact of fungicides on growth of tricothecenes A producing *Fusarium* spp. is rather questionable.

5 DYNAMICS OF DON AND D3G OCCURRENCE WITHIN MALTING AND BREWING TECHNOLOGY

Levels of DON, D3G, HT-2 and T-2 toxins in barley used for experimental malting and brewing and also their levels in malting intermediates are shown in Fig. 2. The concentrations of all mycotoxins were decreased in the initial steeping, which is caused by leaching of compounds out of barley to steeping water. Obviously, both variants of chemical treatment do not differ a lot in terms of mycotoxins amount. However, despite of high sensitivity of analytical method used, mycotoxins were not detected in steeping water samples, because of its high dilution rate. In the germination step, within which the green malt is produced, an extensive increase of DON and D3G occurred. The levels of DON were higher up to 40 and 50 % for non-treated and treated barley, respectively, as compared to barley after 3rd steeping. Extreme increase of D3G was observed in both, green malt derived from non-treated barley (up to 260 %) and treated barley (up to 380 %). This growth of masked D3G levels can be explained partly by intensive activity of amylolytic enzymes that can cause the releasing of masked forms form starch and also partly by „de novo“ mycotoxins production by fungi. Final malt products contained approximately 50 % of DON and two times higher levels of D3G compared to unprocessed barley. The high levels of mycotoxins were also detected in rootlets, the side-product of



Obr. 2 Obsahy DON a D3G v meziproduktech sladovací technologie: (A) chemicky neošetřený ječmen, (B) chemicky ošetřený ječmen / Fig. 2 Levels of DON and D3G in intermediates of malting technology: (A) non-treated barley, (B) treated barley



Obr. 3 Dynamika hladin DON, D3G a HT-2 toxinu v meziproduktech pivovarského procesu (A) neošetřený slad, (B) ošetřený slad / Fig. 3 Dynamics of DON, D3G and HT-2 toxin levels in intermediates of brewing technology: (A) non-treated malt, (B) treated malt

zpracovaným ječmenem. Vysoké hladiny DON a D3G byly detekovány také ve sladovém květu, který je, pro své vhodné nutriční složení, často využíván jako krmivo či surovina pro speciální výživu.

Oba získané slady byly dále využity jako vstupní surovina navazujícího pivovarského experimentu. Dynamika DON, D3G a HT-2 toxinu v průběhu vaření piva je znázorněna na obr. 3 pro jednotlivé varianty sladů. Z výsledků je patrné, že v průběhu rmutování, kdy dochází k rozkladu dextrinů na monosacharidy, došlo k největšímu nárůstu DON a D3G oproti původním hladinám detekovaným ve vstupních sladech. V našem případě dochází rovněž k navýšení hladin HT-2 toxinu v jednotlivých meziproduktech vaření piva. Činnosti kvasinek už také nedochází k výrazným změnám a koncentrace DON, D3G i HT-2 v mladém pivu ani v hotovém pivu. Porovnáním obou variant sladů je možné konstatovat, že v průběhu technologie dochází k vyššímu nárůstu mykotoxinů při použití „chemicky ošetřené“ varianty jako vstupní suroviny. Toto je možno vysvětlit použitím fungicidů, které způsobují inkorporaci toxinů do hlubších vrstev endospermu. V mlátě, využívaném stejně jako sladový květ ke krmivářským účelům, byly hladiny obou sledovaných analytů pod detekčním limitem 5 µg/kg.

Co se týká trichothecenů A, lze celkově shrnout, že v průběhu sladování dochází nejdříve k vyluhování T-2 i HT-2 toxinů do máčecích vod a jejich hladiny v máčeném ječmeni klesají o 80 až 100 %. V našem případě došlo při klíčení sladu k dalšímu poklesu hladin obou toxinů. Byla ovšem publikována i data, kdy se HT-2 toxin choval obdobně jako DON a v průběhu klíčení a finální dotahování sladů vedlo k nárůstu těchto toxinů a koncentrační hladiny dosáhly přibližně 60–75 % kontaminace surového ječmene [25]. Ve sladu a dále i ve všech meziproduktech vaření piva už nebyl detekován T-2 toxin. Dynamika HT-2 toxinu v průběhu pivovarství byla srovnatelná s chováním DON a D3G (i v případě srovnání chemicky ošetřené a neošetřené varianty sladu). Téměř celý obsah HT-2 toxinu byl v průběhu rmutování převeden ze sladového šrotu do sladin, malé nálezy byly ovšem detekovány i v mlátě. Další procesy už významně neovlivnily koncentrace HT-2 toxinu a ve finálním pivu byl detekován na hladině 11 µg/l.

technology, which is often used as a part of the feed or in special human diet because of its advantageous nutritional value.

Both malts obtained from non-treated and treated barley, were further used as an input material for brewing technology. Dynamics of DON, D3G and HT-2 transfer from experimental non-treated and treated malts to beers are illustrated in Fig. 3. As expected on the basis of previous results, DON and D3G were transferred from malts to wort and further to the beer. The major increase in mycotoxins levels occurred immediately after the mashing, when present enzymes managed to release the mycotoxins from the malt matrix during cleavage of starch and dextrins to form mono-carbohydrates. Following steps of beer production, such as fermentation or filtration, do not influence the levels of toxin significantly, although slight drop in mycotoxins levels can be observed. Comparing two batches of beer derived from non-treated and treated malts, it should be noted, that rather higher transfer of DON and D3G was observed in chemically treated beer intermediates. We assume that this is caused by releasing of mycotoxins incorporated deeply to barley endosperm (what is result of fungicide application). The content of mycotoxins in spent grains, occasionally also used to feed, were lower than limit of detection of the analytical method (5 µg/kg).

Regarding trichothecenes A, it can be concluded that within malting technology are HT-2 and T-2 toxins firstly leaching out to steeping water and their content decreases down to 80 – 100 % compared to levels in input barley. In our case, germination of malt resulted in another drop in both toxins concentrations. Data describing the similar fate of HT-2 toxin to DON and its levels also increased in green malts and reached the 60 – 75 % of barley content were also published [25]. Neither in malt nor in brewing intermediates T-2 toxin was detected. Dynamics of HT-2 toxin within brewing process was similar to DON and D3G (also in case of non-treated and treated samples comparison). Almost the whole batch of HT-2 toxin was transferred from malt to wort and only traces of analyte were detected in spent grains. Another step of brewing did not affect levels of HT-2 toxin significantly and it was detected in final beer on concentration level 11 µg/l.

6 ZÁVĚR

Fusariové mykotoxiny jsou v rámci národního projektu Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele systematicky sledovány od roku 2005. Jedná se o monitoring fusariotoxinů ve 12 odrůdách sladovnického ječmene jarního v závislosti na pěstební lokalitě a fungicidním ošetření. Ve vzorcích z posledních dvou sklizní 2009 a 2010 se stal hlavním kontaminantem ječmene HT-2 toxin a jeho hladiny se pohybují průměrně kolem 100 µg/kg. Druhým nejčastěji detekovaným toxinem byl DON a také jeho maskovaná forma D3G. Aplikace fungicidů ani pěstební lokalita neměly zásadní vliv na hladiny testovaných fusariotoxinů.

Kromě hladin toxinů v ječmeni byl sledován i jejich osud v rámci klasické sladařsko-pivovarské technologie. V průběhu sladování klesly hladiny DON přibližně na polovinu jeho hodnoty ve vstupní surovině, naopak koncentrace D3G se zvýšily přibližně dvakrát. V průběhu vaření piva dochází k největším nárůstům toxinů v průběhu mraťování, další kroky pivovarské technologie už nemají na hladiny fusariových mykotoxinů významný vliv.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla provedena za podpory projektu MŠMT 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

LITERATURA / REFERENCES

1. Malachova, A., Hajšlová, J., Ehrenbergerová, J., Kostelanská, M., Zachariášová, M., Urbanová, J., Cerkal, R., Šafránková, I., Marková, J., Vaculová, K., Hrstková, P.: *Fusarium* mycotoxins in spring barley and their transfer into the malt. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 131–137.
2. Scott, P. M.: Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *The Journal of AOAC Int.* **79**, 1996, 875–882.
3. Schwarz, P. B., Casper, H. H., Beattie, S.: Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **53**, 1995, 121–127.
4. Wolf-Hall, C. E., Schwarz, P. B.: Mycotoxins and fermentation: Beer production. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **504**, 2002, 217–226.
5. Lancova, K., Hajšlova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P., Saschambula, L.: Transfer of *Fusarium* mycotoxins and “masked” deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants* **25**, 2008, 732–744.
6. Kostelanska, M., Hajšlova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J.: Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **57**, 2009, 3187–3194.
7. Scott, P. M.: Mycotoxins in alcoholic beverages and fruit juices: Occurrence and analysis. *Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens* **1001**, 2008, 170–191.
8. Wolf-Hall, C. E.: Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 2007, 89–94.
9. Zachariasova, M., Hajšlova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P., Hochel, I.: Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **625**, 2008, 77–86.
10. Kostelanská, M., Zachariášová, M., Lacina, O., Fenclová, M., Kollos, A. L., Hajšlová, J.: The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC–TOFMS method. *Food Chemistry* **126**, 2011, 1870–1876.
11. Berthiller, F., Dall'asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G., Schuhmacher, R.: Occurrence of deoxynivalenol and its 3-D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants* **26**, 2009, 507–511.
12. Langseth, W., Rundberget, T.: The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* **147**, 1999, 157–165.
13. Gottschalk, Ch., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K.: Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**, 2007, 1547–1553.
14. Pettersson, H.: T-2 and HT-2 toxins in Oats and Oat Products,

6 CONCLUSIONS

Fusarium mycotoxins were systematically tested in samples of national project Research Centre for Barley and Hop Substances since 2005. Monitoring of mycotoxins was carried out with 12 cultivars of malting spring barley and their dependence on growing locality and fungicide treatment of particular samples. In samples of last two harvests 2009 and 2010, the HT-2 toxin was identified as the main barley contaminant occurring at mean contamination level of 100 µg/kg. The second abundant fusariotoxin was obviously DON and also its masked form D3G. Based on performed experiments, the application of fungicides and the locality of growing seem to have no significant influence on mycotoxins levels in malting barley samples.

In addition to barley, also intermediates and final products of malting and brewing technologies were tested. Within the malting process, the drop of DON levels down to 50 % was observed, on the other hand, concentration of D3G increased more than twice in comparison to unprocessed barley. The mashing process had the most significant effect on *Fusarium* mycotoxins levels; further beer processing steps do not influence mycotoxins at all.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a project of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (RC 1M0570).

Dept. Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Private presentation – oral information 2007.

15. Hajšlová, J., Lancová, K., Sehnalová, M., Krplová, A., Zachariášová, M., Moravcová, H., Nedělník, J., Marková, J., Ehrenbergerová, J.: Occurrence of trichothecene mycotoxins in cereals harvested in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science* **25**, 2007, 339–350.
16. Majerus, P., Hain, J., Scheer, M.: T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization. *Mycotoxin Research* **24**, 2008, 24–30.
17. Schollenberger, M., Suchy, S., Jara, H. T., Drochner, W., Müller, H. M.: A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia* **147**, 1999, 49–57.
18. Edwards, S. G.: *Fusarium* mycotoxins content of UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants* **26**, 2009, 1185–1190.
19. Edwards, S. G.: *Fusarium* mycotoxins content of UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants* **26**, 2009, 1063–1069.
20. Edwards, S. G.: *Fusarium* mycotoxins content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* **26**, 2009, 496–506.
21. Milanez, T. V., Valente-Soares, L. M., Baptista, G. G.: Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. *Food Control* **17**, 2006, 293–298.
22. Gano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Legarda, T. M., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S.: *Food Control* **22**, 2011, 490–495.
23. Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.
24. Stratton, G. W., Robinson, A. R., Smith, H. C., Kittilsen, L., Barbour, M.: Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **24**, 1993, 399–409.
25. Boivin, P.: Transmission of T-2 and HT-2 to beer from raw materials. Private presentation – oral information, unpublished results of French Institute of Brewing and Malting, 2009.
26. Suga, K., Mochizuki, N., Harayama, K., Yamasita, H.: Analysis of trichothecenes in malt and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society of Brewing* **63**, 2005, 1–4.
27. Schothorst, R. C., Jekel, A. A.: Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry* **82**, 2003, 475–479.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 22. 5. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 17. 6. 2011