

Výskyt „emerging“ mykotoxinů v pivovarských surovinách

*The Occurrence of “Emerging” Mycotoxins in Brewing Raw Materials*Karolína BENEŠOVÁ¹, Martina ČUMOVÁ², Sylvie BĚLÁKOVÁ¹, Renata MIKULÍKOVÁ¹, Zdeněk SVOBODA¹¹ VÚPS, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno / RIBM, Plc. Malting Institute Brno, 7 Mostecká, 614 00 Brno, Czech Republic² ÚKZÚZ, Národní referenční laboratoř, Hroznová 2, 656 00 Brno / CISTA, Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, National Reference Laboratory, 2 Hroznová, 656 06 Brno, Czech Republic
e-mail: benesova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Benešová, K. – Čumová, M. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: Výskyt „emerging“ mykotoxinů v pivovarských surovinách. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 4, s. 114–119

„Emerging“ mykotoxiny jsou nově se objevující mykotoxiny, jejichž existence dříve nebyla známa. Fusaproliferin, beauvericin, enniatiny a moniliformin jsou metabolity nejběžnějšího rodu plísně - *Fusarium spp.* Dosud o nich existují pouze omezené údaje, bylo však zjištěno, že zejména enniatiny se nacházejí v obilovinách v poměrně vysokých koncentracích. V současné době probíhá výzkum a sledování těchto mykotoxinů v různých surovinách a výrobcích z nich. Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o výskytu „emerging“ mykotoxinů v pivovarských surovinách a jejich přechodu do piva.

Benešová, K. – Čumová, M. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: The occurrence of “emerging” mycotoxins in brewing raw materials. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 4, pp. 114–119

“Emerging” mycotoxins are newly appearing mycotoxins, the existence of which was previously unknown. Fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin are metabolites of the most frequent fungi of *Fusarium spp.* Only limited data on these toxins exist, however, namely enniatins were detected in cereals at relatively high concentrations. Currently, research and monitoring of these mycotoxins in various raw materials and derived products have been conducted. This study summarizes the latest knowledge about the occurrence of “emerging” mycotoxins in brewing materials and their transmission to beer.

Benešová, K. – Čumová, M. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: Das Vorkommen von „emerging“ Mykotoxinen in den Braurohstoffen. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 4, S. 114–119

Die „emerging“ Mykotoxine sind eine neue entstehende Mykotoxine, ihre Existenz wurde bis jetzt nicht bekannt. Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatiny und Moniliformin sind die Metabolite des häufigsten Schimmelpilzes - *Fusarium spp.* Bis jetzt existieren über diese Mykotoxine nur beschränkte Angaben, jedoch wurde es festgestellt, dass insbesondere Enniatine in der in Getreide in den relativ hohen Konzentrationen sich befinden. Zurzeit läuft eine Forschung und Verfolgung von Mykotoxinen in den verschiedenen Rohstoffen und daraus hergestellten Erzeugnissen. Im Artikel wird eine Übersicht von neuesten Erkenntnissen über die „emerging“ Mykotoxine in den Braurohstoffen und deren Übergang ins Bier zusammengefasst.

Klíčová slova: „emerging“ mykotoxiny, obiloviny, ječmen, slad, pivo**Keywords:** “emerging” mycotoxins, cereals, barley, malt, beer**1 ÚVOD**

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity houbových patogenů, které běžně kontaminují široké spektrum obilovin, potravin a krmiv. Jsou to nebezpečné kontaminanty přírodního původu. V organismu mohou vyvolat různé toxické syndromy souhrnně zvané mykotoxikózy (Richard, 2007). Cílovými orgány působení mykotoxinů jsou především vnitřní orgány, tj. játra, ledviny, plíce, buňky endokrinních žláz a imunitního systému. Mykotoxiny mohou vyvolat akutní toxické reakce a řada z nich má mutagenní, teratogenní, karcinogenní a estrogenní účinky. V případě společného výskytu více mykotoxinů tyto mohou mít synergický a kumulativní účinek (Speijers, Speijers, 2004). Jsou termostabilní a z kontaminovaných potravin se nedají zcela odstranit.

K nejvýznamnějším „tradičním“ mykotoxinům nalézaným v obilovinách patří produkty hub rodu *Fusarium* (trichotheceny, zearalenon, fumonisiny), *Aspergillus* a *Penicillium* (aflatoxiny, ochratoxin A). Tyto mykotoxiny jsou studovány několik desetiletí, a proto je dostupná řada studií o jejich působení i výskytu (Creppy, 2002).

„Emerging“ mykotoxiny jsou nově se objevující mykotoxiny, jejichž existence dříve nebyla známa. Jsou to metabolity jednoho z nejběžnějších rodů plísní, *Fusarium spp.* Jde např. o fusaproliferin, beauvericin, enniatiny a moniliformin. Významnými producenty těchto toxinů jsou *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* a *F. sambucinum*. Dosud o nich existují pouze omezené údaje. Důvodem není jen jejich pozdější objevení, ale zvláště to, že teprve nedávno bylo zjištěno, že jde o mykotoxiny. Pro posouzení jejich účinků však zatím chybí dostatek relevantních informací, proto byla v roce 2009 vydána Evropským úřadem dozorcím nad bez-

1 INTRODUCTION

Mycotoxins are secondary metabolites of fungal pathogens which commonly contaminate a wide range of cereals, foodstuffs and feedstuffs. They are dangerous contaminants of the natural origin. In the organism, they can cause various toxic syndromes, summarily called mycotoxicoses (Richard, 2007). The target organs affected by mycotoxins are mainly the internal organs, i.e. livers, kidneys, lungs, cells of endocrine glands and the immune system. Mycotoxins can trigger acute toxic reactions and many of them have mutagenic, teratogenic, carcinogenic, and estrogenic effects. In cases where more mycotoxins occur, their effect can be synergistic and cumulative (Speijers and Speijers, 2004). They are thermostable and cannot be completely eliminated from contaminated foods.

Products of species of *Fusarium* (trichothecens, zearalenone, fumonisins), *Aspergillus* and *Penicillium* (aflatoxins, ochratoxin A) belong to the most important “traditional” mycotoxins occurring in cereals. These mycotoxins have been investigated for tens of years and many studies on their operation and occurrence are available (Creppy, 2002).

The “emerging” mycotoxins are newly appearing mycotoxins, the existence of which was previously unknown. They are the metabolites of one of the most common species of fungi, *Fusarium spp.*, such as fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin. The significant producers of these toxins are *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, and *F. sambucinum*. Only limited data on them exist. The reason is not only their later discovery but mainly the fact that their toxicity was revealed only recently. Still, there is lack of relevant information for the evaluation of their effects. Therefore, in 2009, the

pečností potravin (European Food Safety Authority – EFSA) výzva ke sledování těchto mykotoxinů a poskytování dat o jejich výskytu za účelem případného zavedení maximálních přípustných množství v potravinách (Verstraete, 2009).

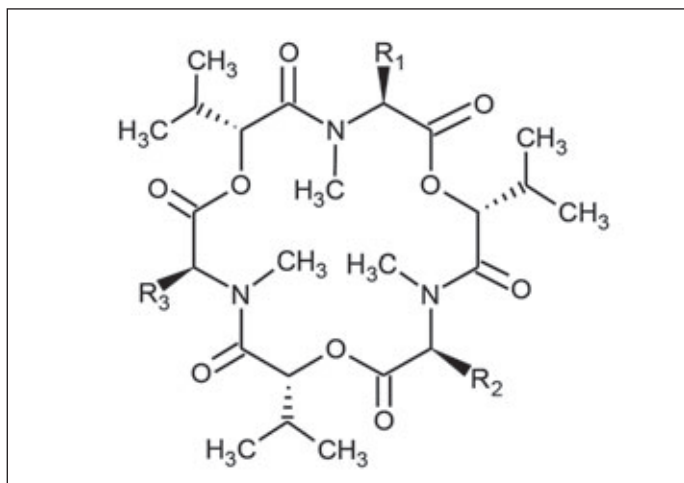
V současné době se ke stanovení mykotoxinů nejčastěji využívají analytické metody na principu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Tyto metody umožňují současné stanovení více mykotoxinů, případně i dalších přítomných látek v jediné analýze a poskytují tak komplexní přehled o vlastnostech a kontaminaci zkoumaného vzorku.

2 VLASTNOSTI „EMERGING“ MYKOTOXINŮ

Beauvericin byl poprvé izolován z agarových kultur *Beauveria bassiana* a enniatiny z *F. oxysporum*. Producenti fusaproliferinu, *F. proliferatum* a *F. subglutinans* jsou nejčastějšími patogeny kukuřice. Pilotní toxikologické výzkumy fusaproliferinu ukázaly teratogenní a patologické účinky na buněčné kultury in vitro (Munkvold et al., 1998). Je také toxický pro krevety *Artemia salina* a lidské B lymfocyty (Logrieco et al., 1996) a teratogenní pro kuřecí embrya (Ritieni et al., 1997). Enniatiny a beauvericin působí jako ionofory, které narušují fyziologickou iontovou rovnováhu a pH tím, že vytvoří dimerické struktury, které přepravují monovalentní ionty přes buněčnou membránu. Enniatiny jsou popisovány jako rostlinné toxiny s antibiotickou a insekticidní aktivitou (Grove, Pople, 1980), beauvericin vykazuje cytotoxicitu (Fornelli et al., 2004) a může způsobit apoptózu (programovanou buněčnou smrt) a fragmentaci DNA (Ojcius et al., 1991). Jejich případná akutní ani chronická toxicita doposud nebyla potvrzena a toxické působení těchto látek je stále předmětem výzkumu. Moniliformin (MON) byl poprvé izolován a strukturně charakterizován v roce 1973 (Cole et al., 1973) jako sekundární metabolit mikroskopické houby *Fusarium moniliforme*, odtud také pochází jeho název. Byla prokázána vysoká akutní toxicita pro laboratorní zvířata, např. potkany a drůbež (Burmeister et al., 1979), je také cytotoxický pro savčí buňky a je řazen mezi potenciální kardiotoxiny. Mechanismus toxického účinku spočívá v inhibici enzymů odpovědných za oxidativní dekarboxylaci pyruvátu na acetyl CoA a α -ketoglutarátu na sukcinyl CoA.

Enniatiny A, A₁, B, B₁ (dále jen Enn A, Enn A₁, Enn B, Enn B₁) a beauvericin mají podobnou chemickou strukturu. Jedná se o cyklické hexadepsipeptidy skládající se ze střídajících se jednotek D- α -hydroxy-isovaleryl-(2-hydroxy-3-methylbutanové kyseliny) a aminokyselin (Oueslati et al., 2011), kde jednotlivými substituenty R₁, R₂ a R₃ jsou v případě enniatinů buď sekundární butyl nebo isopropyl, u beauvericinu potom fenylmethyl (Santini et al., 2012) (obr. 1). Moniliformin má strukturu hydroxycyklobutenedionu, tedy malé iontové molekuly ve formě sodné nebo draselné soli karboxylové kyseliny (Springer et al., 1974). Fusaproliferin je bicyklický seskviterpen (Santini et al., 1996). Podrobný přehled o fyzikálně chemických a biologických vlastnostech těchto mykotoxinů a jejich významu v potravinovém řetězci shrnuje práce Jestoi v roce 2008 (Jestoi, 2008).

Obr. 1 Struktura enniatinů a beauvericinu / Fig. 1 Structure of enniatins and beauvericin



European Food Safety Authority (EFSA) launched a call for monitoring these mycotoxins and providing data on their occurrence with the aim to prospectively introduce the maximum acceptable limits in foods (Verstraete, 2009).

Currently, mycotoxins are most commonly detected with analytical methods based on high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. These methods can be applied for a simultaneous determination of several mycotoxins and/or detection of other substances present in one analysis, providing thus a complex insight into properties and contamination of a tested sample.

2 “EMERGING” MYCOTOXIN CHARACTERISTICS

Beauvericin was first isolated from agar cultures of *Beauveria bassiana* and enniatins from *F. oxysporum*. Fusaproliferin producers, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*, are the most common pathogens of corn. Pilot toxicological research into fusaproliferin has shown teratogenic and pathological effects on cell cultures in vitro (Munkvold et al., 1998). It is also toxic for prawns *Artemia salina* and human B lymphocytes (Logrieco et al., 1996) and teratogenic for chick embryos (Ritieni et al., 1997). Enniatins and beauvericin act as ionophores that disturb physiological ionic balance and pH by forming dimeric structures that transfer monovalent ions through the cell membrane. Enniatins are described as plant toxins with antibiotic and insecticidal activity (Grove and Pople, 1980), beauvericin exhibits cytotoxicity (Fornelli et al., 2004) and can cause apoptosis (programmed cell death) and DNA fragmentation (Ojcius et al., 1991). Their possible acute or chronic toxicity has not been confirmed yet and toxicity of these substances has still been investigated. Moniliformin (MON) was firstly isolated and its structure characterized in 1973 (Cole et al., 1973) as a secondary metabolite of a microscopic fungi *Fusarium moniliforme*, from which it derived its name. Its high acute toxicity has been proven for laboratory animals, e.g. rats and poultry (Burmeister et al., 1979), it is also cytotoxic for mammalian cells and belongs to potential cardiotoxins. The mechanism of its toxic effect is based on the inhibition of enzymes responsible for oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl CoA and α -ketoglutarate to succinyl CoA.

Enniatins A, A₁, B, B₁ (further only Enn A, Enn A₁, Enn B, Enn B₁) and beauvericin have similar chemical structures. These cyclic hexadepsipeptides consist of alternating D- α -hydroxy-isovaleryl-(2-hydroxy-3-methylbutan acid) and amino acid-units (Oueslati et al., 2011), in enniatins, the individual R₁, R₂ and R₃ substituents are either secondary buthyl or isopropyl, in beauvericin, phenylmethyl (Santini et al., 2012) (Fig. 1). Moniliformin hydroxycyclobutanedione structure is formed by small ionic molecules in a form of sodium or potassium acid (Springer et al., 1974). Fusaproliferin is a bicyclic sesquiterpene (Santini et al., 1996). A detailed summary of physical, chemical and biological characters of these mycotoxins and their importance in the food chain has been presented in a study by Jestoi (Jestoi, 2008).

3 THE OCCURRENCE OF “EMERGING” MYCOTOXINS IN CEREALS

Research studying the occurrence of “emerging” mycotoxins has been limited only to various parts of Europe and Africa. The available data suggest the association between the local climate and detected mycotoxin concentration.

Beauvericin was found to occur at lower concentrations in cereals in colder climate, higher concentrations were recorded in south Europe and north Africa. Zinedine et al. (2011) reported maximum beauvericin concentration of 59 mg.kg⁻¹ in corn. The highest enniatin

Mykotoxin / Mycotoxin	R ₁	R ₂	R ₃
Beauvericin	phenylmethyl	phenylmethyl	phenylmethyl
Enniatin A	sec-butyl	sec-butyl	sec-butyl
Enniatin A ₁	sec-butyl	sec-butyl	iso-propyl
Enniatin B	iso-propyl	iso-propyl	iso-propyl
Enniatin B ₁	iso-propyl	iso-propyl	sec-butyl

3 VÝSKYT „EMERGING“ MYKOTOXINŮ V OBILOVINÁCH

Výzkumy sledující výskyt „emerging“ mykotoxinů jsou zatím omezeny na různé části Evropy a Afriky. Dostupné údaje naznačují souvislost mezi místním klimatem a nalezenou koncentrací mykotoxinů.

Bylo zjištěno, že beauvericin se vyskytuje v nižších koncentracích na obilovinách v chladnějším klimatu, vyšší koncentrace se nacházejí v jižní Evropě a severní Africe. Zinedine et al. (2011) uvádí maximální koncentraci beauvericinu 59 mg.kg^{-1} v kukuřici. Nejvyšší koncentrace enniatinů byla popsána ve Španělsku - 814 mg.kg^{-1} enniatinu A₁ v rýži (Meca et al., 2010) a v severní Africe, zatímco v severní Evropě byla koncentrace spíše nižší – max. $18,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ enniatinu B ve finské pšenici (Jestoi et al., 2004). Fusaproliferin se v chladnějším klimatu vyskytuje vzácněji, ve středomoří je jeho výskyt občasný – ojedinělá koncentrace $19,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ v rýži z Maroka (Sifou et al., 2001). Nejvyšší obsah moniliforminu byl nalezen v norské pšenici – $0,95 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Uhlig et al., 2004).

4 OSUD „EMERGING“ MYKOTOXINŮ BĚHEM PROCESU VÝROBY SLADU

Mykotoxiny mohou přecházet z kontaminovaných vstupních surovin do sladu a finálního produktu – piva. Osud některých mykotoxinů v průběhu sladovacího procesu a během výroby piva byl již v minulosti sledován (Scott, 1996), avšak existují zatím pouze dvě studie, které sledovaly přechod enniatinů a beauvericinu z ječmene do sladu a do piva, kdy byly analyzovány i meziprodukty, a to pouze v laboratorním měřítku (Václavíková et al., 2013; Hu et al., 2014).

Václavíková et al. sladovali v roce 2007 ječmen jarní, odrůdu Radegast, ve dvou variantách (neošetřené a ošetřené na poli fungicidem proti houbovým chorobám) a odebrali vzorky v průběhu sladovacího procesu. Jednalo se o přirozeně kontaminovaný ječmen. Autoři pozorovali pomalý pokles hladin mykotoxinů v průběhu máčení, větší pokles nastal až po ukončení máčení a začátku klíčení. V zeleném sladu poklesl Enn A a Enn A₁ o 20 % oproti ječmenu po třetím dni máčení, naopak obsah Enn B a Enn B₁ se zvýšil o 30, resp. 20 %. Po hvozdění, dotahování a odklícení poklesl obsah Enn B₁ o dalších 20 %, obsah Enn B se mírně zvýšil. U ostatních enniatinů nedošlo k větším změnám hladin. Celkově obsahoval zelený slad přibližně 13 – 30 % enniatinů proti výchozímu ječmenu, v hotovém, odhvozděném sladu obsah enniatinů ještě mírně poklesl na 10 – 20 % množství v původní surovině. Chemické ošetření nemělo příliš výrazný vliv.

Hu et al. (2014) sladovali odrůdu ječmene jarního Quench ve třech opakováních, z nichž jedna byla infikována v době kvetení na poli spory *Fusarium culmorum*, druhá spory *Fusarium avenaceum* a třetí byla ponechána přirozené infekci. Autoři měřili koncentrace enniatinů a beauvericinu ve výchozím ječmenu, v máčecí vodě po 1. a 2. dni máčení, v zeleném sladu a výsledném odhvozděném sladu. Výsledky byly částečně v rozporu se závěry Václavíkové et al. (2013). U přirozeně kontaminované (neinfikované) varianty se obsah enniatinů a beauvericinu v zeleném sladu zvýšil oproti ječmenu průměrně o cca 50 %. Výsledný odhvozděný slad obsahoval proti výchozímu ječmenu 76 % Enn A, 83 % Enn A₁, 100 % Enn B, 103 % Enn B₁ a 84 % beauvericinu. Hladiny se tedy oproti výchozímu ječmenu téměř nezměnily. V obou případech byl také analyzován sladový květ, který je pro vysoký obsah enzymů, vitaminů a dalších zdravích prospěšných látek využíván ke krmivářským účelům. Hladiny enniatinů ve sladovém květu se pohybovaly kolem $400 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Václavíková et al., 2013), resp. v rozmezí $37,1 - 648,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a beauvericin $72,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Hu et al., 2014). V obou citovaných studiích byl sladován vždy pouze jeden, resp. dva vzorky jedné odrůdy s přírodní kontaminací, u každé byl jiný výchozí obsah mykotoxinů a byly vzájemně v jiném poměru.

Bolechová et al. (2015) studovali obsah enniatinů a beauvericinu v ječmenu a z něj vyrobeného sladu. Bylo analyzováno celkem 12 vzorků ječmene jarního a 12 vzorků z něj vyrobeného sladu. Šlo o čtyři sladovnické odrůdy – Malz, Bojos, Sebastian a Xanadu ze 3 lokalit v České republice (Čáslav, Uherský Ostroh a Jaroměřice nad Rokytnou). Pouze v několika případech tato studie potvrdila předchozí dílčí výsledky, že sladováním se hladina enniatinů a beauvericinu nezmění nebo mírně klesne. Je prokázáno, že složení mykoflóry ječmene i dalších plodin se mění v závislosti na lokalitě, počasí, odrůdě, a zejména ročníku pěstování (Polišenská et al., 2009). Všechny tyto parametry tak mají velký vliv na spektrum přítomných mykotoxinů, jejich množství a jejich vzájemný poměr.

concentration was described in Spain - 814 mg.kg^{-1} of enniatin A₁ in rice (Meca et al., 2010) and North Africa, while concentration in north Europe was rather lower – max. 18.3 mg.kg^{-1} of enniatin B in Finnish wheat (Jestoi et al., 2004). Fusaproliferin occurs more rarely in colder weather, its occurrence in the Mediterranean area is occasional – e.g. concentration of 19.6 mg.kg^{-1} in rice from Morocco (Sifou et al., 2001). The highest moniliformin content was detected in Norwegian wheat – 0.95 mg.kg^{-1} (Uhlig et al., 2004).

4 FATE OF “EMERGING” MYCOTOXINS DURING THE MALT PRODUCTION PROCESS

Mycotoxins can pass from the contaminated initial raw materials to malt and the final product – beer. Fate of some mycotoxins during the malting process and during beer production was followed in the past (Scott, 1996), nevertheless, there are only two studies describing the transmission of enniatins and beauvericin from barley to malt and beer, intermediaries were analyzed in a laboratory scale (Václavíková et al., 2013; Hu et al., 2014).

In 2007, Václavíková et al. malted the spring barley variety Radegast, in two variants (untreated and treated in the field with a fungicide against fungal diseases). They collected samples during the malting process. Barley was naturally contaminated. The authors observed a slow decline in mycotoxin levels during steeping, a higher drop was recorded only after steeping and at the beginning of germination. In green malt, Enn A and Enn A₁ decreased by 20% versus barley after the third day of steeping. On the contrary, Enn B and Enn B₁ increased by 30 and 20%, respectively. After kilning and degerming, Enn B₁ content dropped by another 20%, Enn B mildly increased. Other enniatin levels did not change significantly. Totally, green malt contained approximately 13 – 30% of enniatins compared to the initial barley, enniatin content in the finished, kiln dried malt mildly decreased to 10 – 20% of the amount in the original raw material. The effect of the chemical treatment was not confirmed.

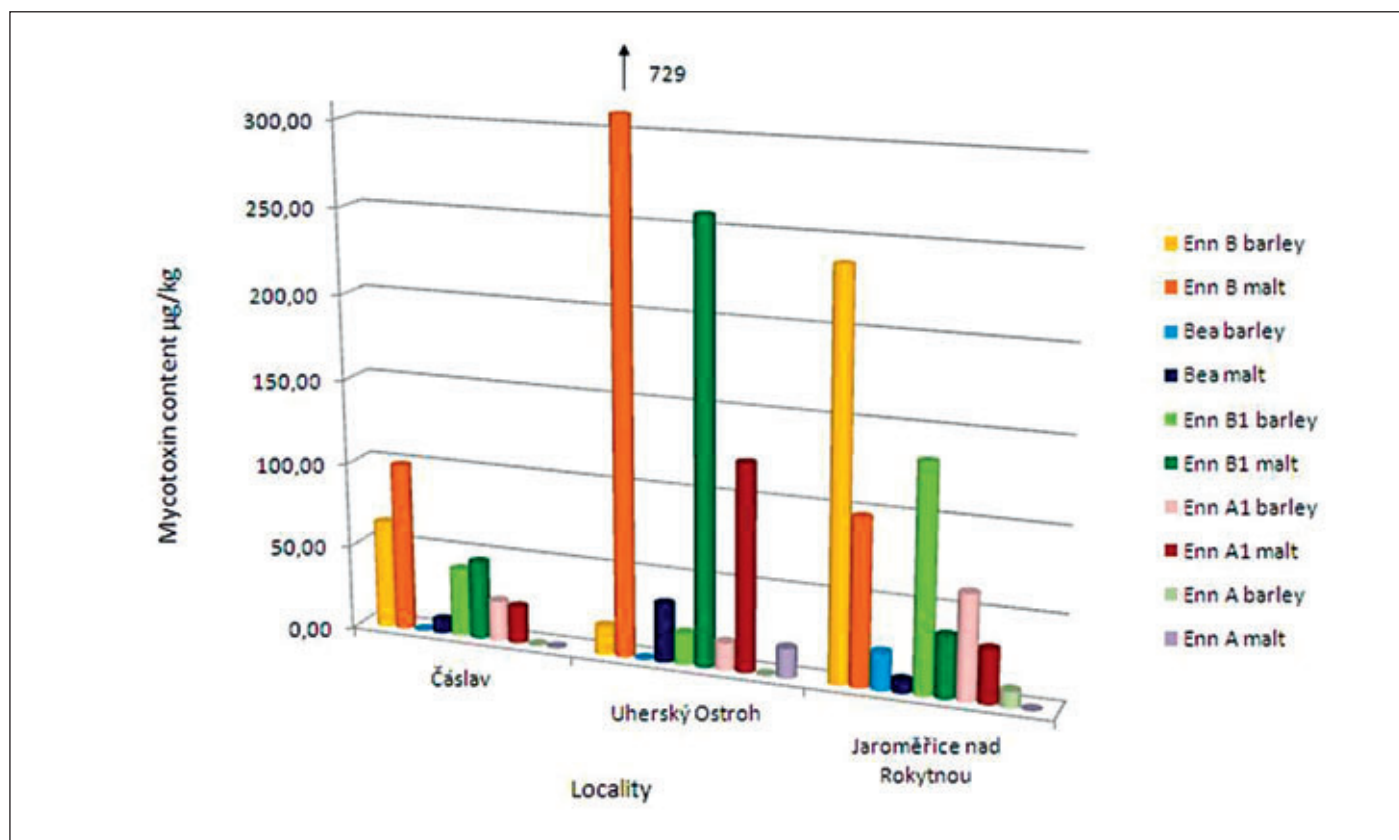
Hu et al. (2014) malted the spring barley variety Quench in three replications, one of them was infected during flowering in the field by spores of *Fusarium culmorum*, the other one by spores of *Fusarium avenaceum* and the third one was left to the natural infection. The authors measured enniatin and beauvericin concentrations in the initial barley, steeping water after the first and second day of steeping, green malt and resulting degermed malt. The results were partly in contradiction to the results of Václavíková et al. (2013). The enniatin and beauvericin contents in naturally contaminated (non-infected) variant in green malt increased versus barley by ca 50%. Compared to the initial barley, the final degermed malt contained 76% of Enn A, 83% of Enn A₁, 100% of Enn B, 103% of Enn B₁, and 84% of beauvericin. It means that the levels compared to the initial barley did not change. Further, in both cases malt culms were also analyzed, malt culms for their high content of enzymes, vitamins and other for health beneficial substances are used for feeding. The enniatin levels in malt culms varied around $400 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Václavíková et al., 2013), Hu et al. (2014) found enniatin levels in the range of $37.1 - 648.9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and beauvericin $72.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$. In both cited studies always one or two samples of one variety with the natural contamination, were malted, each had a different initial content of mycotoxins and they were mutually in a different ratio.

Bolechová et al. (2015) studied enniatin and beauvericin contents in barley and malt made from it. Totally 12 samples of spring barley were analyzed and 12 samples of produced malt. Four malting varieties were used – Malz, Bojos, Sebastian, and Xanadu from 3 localities in the Czech Republic (Čáslav, Uherský Ostroh, and Jaroměřice nad Rokytnou). The previous partial results suggesting that the enniatin and beauvericin levels did not change or mildly declined, were confirmed only in some cases in this study. It has been proven that the mycoflora composition of barley and other crops changes depending on the locality, weather, variety and namely the year of growing (Polišenská et al., 2009). Therefore, all these parameters have a great effect on the spectrum of the present mycotoxins, their quantity and mutual ratio.

Bolechová et al. (2015) found significant differences among the individual localities. The relatively highest concentration of the mycotoxins studied was found in malts from the locality of Uherský Ostroh. These results are summarized in Fig. 2.

Enniatin A was below the limit of quantification, with the exception of barley Bojos from the locality of Jaroměřice nad Rokytnou ($9.4 \mu\text{g.kg}^{-1}$) and two malts from Uherský Ostroh (9.6 and $25.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Obr. 2 Nalezené obsahy „emerging“ mykotoxinů v jednotlivých lokalitách (průměr hodnot ze 4 odrůd) / Fig. 2 Contents of „emerging“ mycotoxins in the individual localities (the average value from 4 varieties)



Bolechová et al. (2015) našli výrazné rozdíly mezi jednotlivými lokalitami. Relativně nejvyšší koncentrace sledovaných mykotoxinů byla nalezena ve sladech z lokality Uherský Ostroh. Tyto výsledky přehledně shrnuje obr. 2.

Enniatin A byl pod mezí kvantifikace s výjimkou ječmene Bojos z lokality Jaroměřice nad Rokytnou ($9,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) a dvou sladů z Uherického Ostrohu ($9,6$ a $25,3 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Nejméně kontaminovány byly ječmeny i slady z lokality Čáslav. Enn A₁ se vyskytoval v nízkých koncentracích do $34,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B do $111,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B₁ do $68,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ a jejich hladiny v ječmeni i ve sladu byly srovnatelné. Beauvericin se objevil ve dvou sladech v nízké koncentraci ($7,8 \mu\text{g kg}^{-1}$), v ječmenech byl vždy pod mezí kvantifikace. Koncentrace mykotoxinů ve vzorcích z lokality Jaroměřice nad Rokytnou byly rovněž nízké. Nejvyšší byly koncentrace v odrůdě Bojos, Enn B $420,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B₁ $307,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ a Enn A₁ $154,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, kde u Enn B₁ a A₁ šlo o nejvyšší koncentraci ze všech zkoumaných vzorků. Obsah Enn B, B₁ a A₁ klesl oproti ječmeni ve všech sladech s výjimkou odrůdy Xanadu. Ve všech vzorcích ječmene byl nalezen beauvericin v nízkých koncentracích (do $30,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) a ve sladu jeho koncentrace ještě klesla. Ječmeny z lokality Uherský Ostroh byly kontaminovány mykotoxiny nejméně. Ve dvou ječmenech se vyskytoval beauvericin pod mezí kvantifikace a enniatiny do koncentrace $33,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Enn B₁ v ječmeni Bojos). Po zeskladování těchto vzorků však došlo u všech 4 vzorků k velikému nárůstu koncentrace některých mykotoxinů v řádu stovek až tisíců procent. Enniatin A se vyskytl ve dvou sladech, nejvyšší koncentrace byla $25,3 \mu\text{g kg}^{-1}$, ostatní sledované mykotoxiny ve všech sladech, kdy nejvyšší koncentrace beauvericinu byla $41,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn A₁ $281 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B $1110 \mu\text{g kg}^{-1}$ a Enn B₁ $504 \mu\text{g kg}^{-1}$.

I když jsou mikromycety rodu *Fusarium* označovány jako „polní plísně“, za příznivých podmínek mohou růst také v průběhu skladování (Vaughan et al., 2005; Fakhrunnisa Hasmhi a Ghaffar, 2006). Mikrospóry plísní mohou být přítomny všude, rizikový může být například kontakt sklizené plodiny s půdou při sklizni. Záleží také na pěstované předplodině, přičemž nejvíce rizikovou v tomto směru je kukuřice. Při skladování dochází k poklesu hladin mykotoxinů vlivem vyluhování do máčecí vody, v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě, během klíčení však jejich produkce může vzrůst, protože teplé a vlhké prostředí sladovny je vhodné pro růst plísní. Zvýšením

The least contaminated were barleys and malts from the locality of Čáslav. Enn A₁ occurred at low concentrations to $34.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B to $111.9 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B₁ to $68.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ and their contents in barley and malt were comparable. Beauvericin appeared in two malts at low concentration ($7.8 \mu\text{g kg}^{-1}$), in barleys, it was always below the limit of quantification. Mycotoxin concentrations in the samples from the locality of Jaroměřice nad Rokytnou were also low. The highest concentrations were recorded in the variety Bojos, Enn B $420.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B₁ $307.6 \mu\text{g kg}^{-1}$, and Enn A₁ $154.4 \mu\text{g kg}^{-1}$, in Enn B₁ and A₁ it was the highest concentration of all the studied samples. Enn B, B₁ and A₁ contents dropped versus barley in all malts, with the exception of the variety Xanadu. Beauvericin at low concentrations (to $30.1 \mu\text{g kg}^{-1}$) was detected in all barley samples, its concentration in malt was even lower. Barleys from the locality Uherský Ostroh were less contaminated with mycotoxins. Beauvericin below the limit of quantification and enniatins to $33.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Enn B₁ in barley Bojos) were detected in two barleys. However, after malting, high increase in concentration of some mycotoxins in orders of hundreds to thousands of percents was recorded in all four samples. Enniatin A occurred in two malts, with the highest concentration of $25.3 \mu\text{g kg}^{-1}$. As for the other mycotoxins studied in all malts, the highest beauvericin concentration was $41.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn A₁ $281 \mu\text{g kg}^{-1}$, Enn B $1110 \mu\text{g kg}^{-1}$, and Enn B₁ $504 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Although the micromycetes of *Fusarium* species are referred to as “field fungi”, under favorable conditions they can also grow during storage (Vaughan et al., 2005; Fakhrunnisa, Hasmhi, M. H. and Ghaffar, A., 2006). Microspores of fungi can be present everywhere, for example a contact of the harvested crop with soil during harvest can be risky. It also depends on the previous crop, maize being the most risky. During malting, mycotoxin levels decline due to leaching into steeping water, depending on their solubility in water, their production can then increase during germination as the warm and wet environment of a malting plant is favourable for the fungal growth. The increase in the temperature during kilning may cause a higher mycotoxin production as a result of fungal stress response (Wolf-Hall, 2007).

It must be stated that the described experiments were conducted only under the laboratory conditions and that the situation in malt plants can be different (Benešová and Běláková – non-published results).

teploty během hvozdnění však může dojít k vystresování plísně a tím k další produkci mykotoxinů. (Wolf-Hall, 2007).

Je také třeba uvést, že popsané pokusy probíhaly pouze v laboratorním měřítku a v reálném prostředí sladoven může být situace poněkud odlišná (Benešová a Běláková – nepublikované výsledky).

Ezekiel et al. (2014) publikovali práci, která sleduje obsah 17 mykotoxinů, včetně enniatinů A a B, beauvericinu, moniliforminu a fusaproliferinu ve dvou tradičních a oblíbených fermentovaných obilných nápojích často konzumovaných v Nigérii – *Kunu-zaki* a *Pito*. *Kunu-zaki* je nealkoholický nápoj vyrobený z kukuřice, *Pito* je tradiční alkoholický nápoj vyrobený z čiroku. Byly odebrány vzorky vstupních surovin, vyrobeného sladu a hotových nápojů. I zde po zesladování došlo k prudkému nárůstu koncentrace sledovaných mykotoxinů, v hotových nápojích ovšem jejich koncentrace opět velmi klesla. Závěry proto zatím nelze zobecňovat a je třeba ve výzkumu nadále pokračovat.

5 OSUD „EMERGING“ MYKOTOXINŮ BĚHEM PROCESU VÝROBY PIVA

Dynamika přechodu enniatinů do piva byla poprvé popsána v r. 2013 (Václavíková et al., 2013). Enniatiny B a B₁ byly detekovány na nejvyšší hladině v předku, dále se nacházely ve sladině a enniatin B i v mladině. Enniatiny A a A₁ nebyly v žádném meziprojektu výroby piva detekovány. Přibližně 64–91 % enniatinů bylo odstraněno v mlátu. Žádný z enniatinů nebyl detekován ve finálním produktu – v pivu.

Hu et al. (2013) uvádí, že 64–98 % enniatinů a 53–85 % beauvericinu původně přítomných v hotovém sladu je odstraněno v mlátu. Sladina obsahuje kolem 6 % enniatinů a nedetekovatelné množství beauvericinu. Po chmelovaru a fermentaci nebyly již enniatiny ani beauvericin nalezeny ani v hotovém pivu.

Ezekiel et al. (2014) uvádí pokles koncentrace sledovaných mykotoxinů v hotových fermentovaných nápojích *Kunu-zaki* a *Pito* o 59,3–9,9 % oproti výchozím nesladovaným surovinám.

6 ZÁVĚR

„Emerging“ mykotoxiny jsou nově se objevující mykotoxiny, metabolity plísně rodu *Fusarium* spp. Teprve v nedávné době byly identifikovány jako mykotoxiny. Jedná se zejména o fusaproliferin, beauvericin, enniatiny a moniliformin. Probíhá výzkum jejich toxických účinků. O jejich výskytu dosud existují pouze dílčí údaje, bylo však zjištěno, že zejména enniatiny se nacházejí v obilovinách v relativně vysokých koncentracích. Z obilovin přecházejí do cereálních výrobků a jsou tak jimi exponováni lidé i zvířata. V současné době probíhá výzkum a sledování těchto mykotoxinů v různých potravinách a krmivech a je sledována jejich transformace do vyrobených potravin. Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o výskytu „emerging“ mykotoxinů v ječmene, sladu a sladovém květu a jejich přechodu do finálního výrobku, piva. Bylo zjištěno, že tyto mykotoxiny do piva nepřecházejí. Slad a sladový květ jsou pro vysoký obsah zdravotně prospěšných látek využívány k potravinářským a krmivářským účelům, proto je velmi žádoucí sledování jejich obsahu i v těchto komoditách.

PODĚKOVÁNÍ

Tato publikace vznikla ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. v rámci projektu „Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin“ (RO1914) podpořeného z prostředků Institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace, kterou poskytlo MZe ČR.

LITERATURA / REFERENCES

- Bolechová, M., Benešová, K., Běláková, S., Čáslavský, J., Pospíchalová, M., Mikulíková, R., 2015: Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. Food Control 47, 108 – 113. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.06.045
- Burmeister, H. R., Ciegler, A., Vesonder, R. F., 1979: Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322: Purification and toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 37: 11 – 13.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Cutler, H. G., Doupnik, B. L., Peckham, J. C., 1973: Toxin from *Fusarium moniliforme*: effect on plants and animals. Science 179: 1324 – 1326.
- Creppy, E. E., 2002: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 127 (1–3): 19 – 28.

Ezekiel et al. (2014) in their study investigated content of 17 mycotoxins, including enniatins A and B, beauvericin, moniliformin, and fusaproliferin in two favourite traditional fermented cereal drinks often consumed in Nigeria – *Kunu-zaki* and *Pito*. *Kunu-zaki* is non- alcoholic beverage made from maize, *Pito* is a traditional alcoholic beverage made from sorghum. Samples from the initial raw materials, produced malt and finished beverages were taken. After malting, a rapid increase in the concentration of studied mycotoxins was recorded, however, in finished beverages their concentration again decreased. Therefore, conclusions cannot be generalized and further research is needed.

5 FATE OF “EMERGING” MYCOTOXINS DURING THE BREWING PROCESS

Dynamics of the transmission of enniatins to beer was firstly described in 2013 (Václavíková et al., 2013). The highest levels of enniatins B and B₁ were detected in first wort, further in sweet wort, enniatin B was also found in hopped wort. Enniatins A and A₁ were not detected in any intermediate product of the brewing process. Approximately 64 – 91 % of enniatins were removed with spent grains. None of enniatins was detected in a final product – beer.

Hu et al. (2013) reported that 64 – 98 % of enniatin and 53 – 85 % of beauvericin originally presented in finished malt were removed with spent grains. Sweet wort contains about 6 % of enniatins and undetectable amount of beauvericin. After hop boiling and fermentation, enniatins or beauvericin were found in finished beer.

Ezekiel et al. (2014) reported the decline in concentration of the studied mycotoxins in finished fermented beverages *Kunu-zaki* and *Pito* by 59.3 – 99.9 % compared to the initial non-malted raw materials.

6 CONCLUSION

“Emerging” mycotoxins are newly appearing mycotoxins, metabolites of *Fusarium* spp. Only recently they have been identified as mycotoxins, namely fusaproliferin, beauvericin, enniatins and moniliformin. Research of their toxic effects has been carried out. Only partial data on their occurrence exist, nevertheless, it was found that namely enniatins are found in cereals at relatively high concentrations. They pass from cereals to cereal products exposing people and animals to their effects. Currently, research and monitoring of these mycotoxins in various foodstuffs and feedstuffs have been conducted, their transformation to derived foods has been monitored. This study summarizes the latest knowledge about “emerging” mycotoxins in barley, malt and malt culms and their transmission to the final product, beer. It was found out that these mycotoxins do not pass to beer. Malt and malt culms for their high contents of substances that are beneficial for human health are used for food and feed purposes, therefore their monitoring also in these commodities is highly recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

Study published in this article was achieved within institutional support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for a long-term conceptual development of the Research Institute of Brewing and Malting (RO1914).

- Ezekiel, Ch. N., Abia, W. A., Ogara, I. M., Sulyok, M., Warth, B., Krska, R., 2015: Fate of mycotoxins in two popular traditional cereal-based beverages (*kunu-zaki* and *pito*) from rural Nigeria. LWT- Food Sci. Technol. 60 (1): 137 – 141. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.08.018
- Fakhrunnisa, Hasmi, M. H., Ghaffar, A., 2006: Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. Pak. J. Bot. 38: 185 – 192.
- Fornelli, F., Minervini, F., Logrieco, A., 2004: Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). J. Invertebr. Pathol. 85: 74 – 79.
- Grove, J. F., Pople, M.: 1980. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia 70: 103 – 105.

Hu, L., Gastl, M., Linkmeyer, A., Hess, M., Rychlik, M., 2014: Fate of enniatins and beauvericin during the malting and brewing process determined by stable isotope dilution assays. *LWT- Food Sci. Technol.* 56: 469 – 477. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.11.004

Jestoi, M., 2008: Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin – A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48: 21 – 49.

Jestoi, M., Rokka, M., Yli-Mantila T., Parikka, P., Rizzo, A., Peltonen, K., 2004: Presence and concentration of the *Fusarium* - related mycotoxins beauvericin, enniatins nad moniliformin in Finnish grain samples. *Food Addit Contam.* 21: 794 – 802.

Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, F., Fogliano, V., Ritieni, A., Caiaffa, M. F., Randazzo, G., Bottalico, A., Macchia, L., 1996: Fusaproliferin production of *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia Salina*, SG-9 insects cells, and IRAC/LCL 171 human B lymphocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3378 – 3384.

Meca, G., Zinedine, A., Blesa, J., Font, G., Manes, J., 2010: Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on Spanish Markets. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1412 – 1416. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.03.010

Munkvold, G., Stahr, H. M., Logrieco, A., Moretti, A. a Ritieni, A., 1998: Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium*-contaminated livestock feed on Iowa, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3923 – 3926.

Ojcius, D. M., Zychlinsky, A., Zheng, L. M., Young, J. E., 1991: Ionophore induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp Cell Res.* 197 (1): 43 – 49.

Oueslati, S., Meca, G., Mliki, A., Ghorbel, A., Mañes, J., 2011: Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control.* 22: 1373-1377. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.02.015

Polišenská, I., Jirsa, O., Salava, J., 2009: *Fusarium* mycotoxins and fusarium pathogens in cereals harvested in 2009. *Obilnářské listy* 17: 3 – 6.

Richard, J. L., 2007: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119 (1–2): 3 – 10.

Ritieni, A., Monti, S. M., Randazzo, G., Logrieco, A., Moretti, A., Pelluso, G., Ferracane, R., Fogliano, V., 1997: Teratogenic effects of fusaproliferin on chicken embryos. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3039 – 3043. DOI: 10.1021/jf960890v

Santini, A., Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Mannina, L., Logrieco, A., Benedetti, E., 1996: Structure and absolute stereochemistry of fusaproliferin, a toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *J. Nat. Prod.* 59 (2): 109 – 112. DOI: 10.1021/np960023k

Santini, A., Meca, G., Uhlig, S., Ritieni, A., 2012: Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food – review. *World Mycotoxin J.* 5: 71 – 81. DOI: 10.3920/WMJ2011.1331

Scott, P. M., 1996: Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the AOAC International* 79: 875 – 882.

Sifou, A., Meca, G., Serrano, A. B., Mahine, N., El Abidi, A., Manes, J., El Azzouzi, M., Zinedine, A.: 2011, First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A₁, B, B₁), beauvericin and fusaproliferin in rice on Moroccan retail markets. *Food Control*, 22: 1826 – 1830. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.04.019

Speijers, G. J. A., Speijers, M. H. M., 2004: Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 153 (1): 91 – 98. DOI:10.1016/j.toxlet.2004.04.046

Springer, J. P., Clardy, J., Richard J. C., Kirksey, J. W., Hill, R. K., Carlson, R. M., Isidor, J. L., 1974: Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutane microbial toxin. *J. Am. Chem. Soc.* 96 (7): 2267 – 2268.

Uhlig, S., Torp, M., Jarp, J., Parich, A., Gutleb, A. C., Krska, R., 2004: Moniliformin in Norwegian grain. *Food Addit Contam.* 21 (6): 598 – 606.

Václavíková, M., Malachová, A., Vepřková, Z., Dzuman, Z., Zachariasová, M., Hajslova, J., 2013: „Emerging“ mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry* 136: 750 – 757. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.08.031

Vaughan, A., Sullivan, T. O., Sinderen, D. V., 2005: Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *J. Inst. Brew.* 111: 355 – 371. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x

Verstraete, F., 2009: EU food safety legislation with focus on contaminants: Challenges for food research, in *Food Research in Support to Science – Base Regulations: Challenges for Producers and Customers*. 21–22th April, 2009, Prague.

Wolf-Hall, C. E., 2007: Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 89 – 94. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.030

Zinedine, A., Meca, G., Manes, J., Font, G.: 2011. Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A₁, B, B₁), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco. *Food Control* 22: 1 – 5. DOI :10.1016/j.foodcont.2010.05.002

Do redakce došlo / Manuscript received: 16. 12. 2014
Přijato k publikování / Accepted for publication: 11. 2. 2015

26. Pivovarsko-sladařské dny



sladovny
soufflet ČR



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



Jedna z nejvýznamnějších pivovarsko-sladařských akcí u nás, Pivovarsko-sladařské dny, se již tradičně v lichém roce, konají 22.–23. října v Olomouci. Spolupřadatelem jsou vedle VÚPS, a.s., a VŠCHT Praha, rovněž Sladovny Soufflet, a.s.

Odborný program proběhne 22. října, následující den se uskuteční exkurze do sladovny.

Uzávěrka přihlášek přednášek: 1. června

Přihlášky lze podat v redakci časopisu *Kvasný průmysl*, kvas@beerresearch.cz. K akci bude vydáno dvojčíslo 10–11, které bude obsahovat odborné recenzované publikace ke každé přednášce. Uzávěrka odevzdání rukopisů článků: 13. července, odevzdání finálních verzí článků 21. srpna.

Zájemci o komerční prezentaci mohou kontaktovat pana Rudolfa Jastrabana, Agentura Elis, r.jastraban@gmail.com, tel. 737 227 720.

Přihlášky účastníků, program a aktuální informace jsou k dispozici na www.pivovarskedny.cz