

## THE FATE OF MYCOTOXINS DURING MALTING AND BREWING

Malachová A.<sup>1,2</sup>, Cerkal R.<sup>2</sup>, Ehrenbergerová J.<sup>2</sup>, Hajšlová J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Chemistry and Analysis, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: alexandra.malachova@vscht.cz

---

### ABSTRACT

Barley, as well as others cereals, can be contaminated by mycotoxins which are produced by filamentous fungi as secondary metabolites under the field conditions. The highest health risk for costumers is that these toxins can survive during food processing and thus they pass into final products, such as beer. The aim of the presented study was to evaluate the transfer of Fusarium mycotoxins, namely deoxynivalenol (DON), deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) and enniatins (ENNs), into malt, beer, and their intermediate products. Concerning the fate of DON a D3G during malting, their levels are decreased during the steeping stage, however, rapid increase of their levels was observed within the germination process. Final malt contained approx. 80% of DON and 260% of D3G levels compared to the initial barley. Further increase of DON and D3G levels was proven during mashing of malt, their levels increased up to 600 and 800%, respectively, when comparing with starting malt.. This phenomenon can be attributed to releasing of mycotoxins from their masked forms. Worth to notice, that spent grains contained undetectable concentration of both DON and D3G. As regards enniatins, during the malting technology their levels significantly decreased. Further decline was observed during the brewing technology. Due to their low solubility in water, they do not pass almost into beer and thus stay in spent grains.

**Key words:** deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, enniatins, beer

**Acknowledgments:** This research was carried out within the scope of three projects (MSM 6046137305, NPV II 2B08049, and VC 1M0570) financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

## ÚVOD

Výroba piva, stejně jako produkce surovin pro jeho výrobu, má v České republice mnohasetletou tradici (1). Nesporně je pivo i celosvětově velmi oblíbeným nápojem, kdy jeho spotřeba v mnoha zemích dosáhla např. v roce 2004 až 100 l na osobu za rok (2). Základní surovinou pro výrobu sladu je ječmen, který bývá velmi často kolonizován, stejně jako mnoho jiných obilnin, mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium* již v průběhu vegetace. Jedním z negativním dopadů přítomnosti fusariových mikromycet je, že mohou produkovat široké spektrum toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů. V současnosti je známo více než 150 fusariových mykotoxinů, z nichž nejvýznamnější a také nejprostudovanější skupinou jsou trichotheceny. Mezi trichotheceny se řadí také doposud nejvíce sledovaný mykotoxin deoxynivalenol (DON), který z důvodu velmi častého výskytu bývá považován za marker mykotoxinové kontaminace a je také jediným trichothecenem, pro který bylo Evropskou komisí ustanoveno nejvyšší přípustné množství v různých surovinách a potravinách (3). Mykotoxiny nejsou toxické pouze pro konzumenty, ale také pro napadené rostliny, proto je mohou podobně jako jiná xenobiotika metabolizovat navázáním malé polární molekuly (glukosy, sulfátu či glutathionu), za vzniku pro rostlinu „méně toxických“ látek – vznikají tzv. maskované mykotoxiny. První zmínky o těchto látkách se objevily již v polovině 80. let 20. století (4), ale teprve od roku 2007, kdy byl uveden na trh analytický standard maskovaného deoxynivalenol-3-glukosidu (D3G), mohly být zahájeny intenzivní výzkumy v této oblasti. Největší riziko pro konzumenty potravin kontaminovaných D3G spočívá v jeho pravděpodobném štěpení v gastrointestinálním traktu savců na původní „nemaskovaný“ DON, a tím k navýšení expozice tomuto toxinu.

V souvislosti se změnami klimatu dochází k rozšiřování dříve méně běžných druhů mikromycet jako jsou např. *F. subglutinans* či *F. proliferatum*, které jsou zodpovědné především za produkci enniatinů. Tyto toxiny byly dříve běžné spíše v chladnějších oblastech, ale v současné době již byl reportován jejich výskyt také v cereáliích pěstovaných ve Španělsku a Itálii (5,6). Na rozdíl od trichothecenů se jedná o látky, o kterých je doposud nedostatek informací, proto vydal v letošním roce Evropský úřad dozorující nad bezpečností potravin (European Food Safety Authority – EFSA) vyzvu tyto mykotoxiny sledovat a poskytovat data o jejich výskytu (7).

Cílem překládané studie bylo sledovat osud výše zmíněných mykotoxinů v průběhu sladařské a pivovarské technologie při použití přirozeně kontaminované vstupní suroviny.

## MATERIÁL A METODIKA

### Popis experimentu

Jako modelová odrůda pro sladování a vaření piva byla použita sladovnická odrůda ječmene jarního Radevast. Zrno bylo vypěstováno na experimentální výzkumné stanici Mendelovy univerzity v Brně (MENDELU) v Žabčicích. Sladování bylo provedeno v mikrosladovně a pivo bylo uvařeno v minipivovaru Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. (VÚPS). Přesné podmínky obou technologických procesů byly publikovány již dříve (2). V průběhu obou technologických procesů byly odebrány meziprodukty: i) při sladování – vstupní ječmen, ječmen po 1., 2. a 3. dni máčení, zelený slad, slad a sladový květ; ii) při vaření piva – předek, sladina, mladina, mladé pivo, pivo a mláto, které byly potom vyšetřeny na obsah vybraných fusariových mykotoxinů na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha).

### Standardy a chemikálie

Standardy deoxynivalenolu (DON) a deoxynivalenol-3-glukosidu (D3G) byly dodány firmou Biopure (Tulln, Rakousko) a standardy enniatinu A (EN A), enniatinu B (EN B), enniatinu A1 (EN A1) a enniatinu B1 (EN B1) byly dodány firmou Alexis Biochemicals (New York, USA). Organická rozpouštědla určená pro hmotnostně-spektrometrickou detekci (acetonitril, methanol) a mravenčan amonný byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Německo). Deionizovaná voda používaná pro přípravu extrakční směsi a mobilní fáze byla připravena pomocí přístroje Milli-Q zakoupeného od firmy Millipore (Molsheim, Francie).

### Analytická metoda

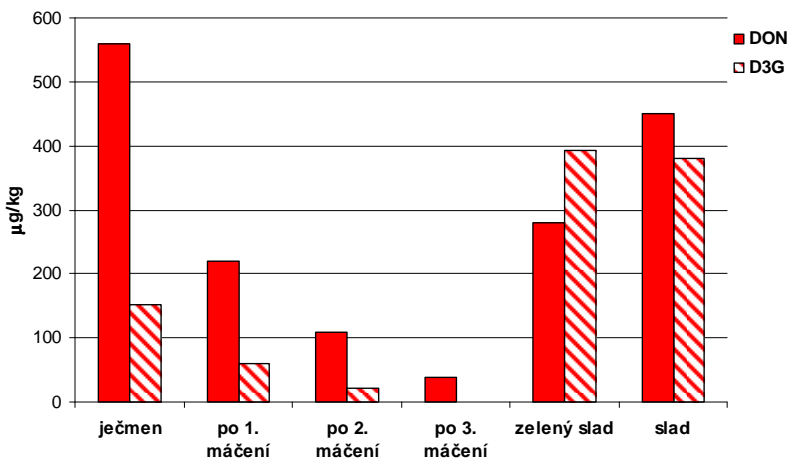
Analytická metoda pro stanovení mykotoxinů ječmeni, sladu, pivu a meziproduktech obou technologických procesů se skládá ze tří kroků: (i) extrakce vzorku azeotropní směsí – acetonitril:voda (84:16, v/v), (ii) odpaření a zahuštění alikvotního podílu extraktu na rotační vakuové odparce a (iii) rozpuštění získaného odparku ve směsi methanol:voda (50:50, v/v), (2). K vlastní separaci analytů a reziduálních složek matrice je využívána ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií typu orbitální iontová past.

Výtěžnosti všech analytů pro jednotlivé matrice se pohybovaly v rozmezí 84-98 % s RSD do 10%, detekční limity (LOD) nepřekročily 5 µg/kg.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

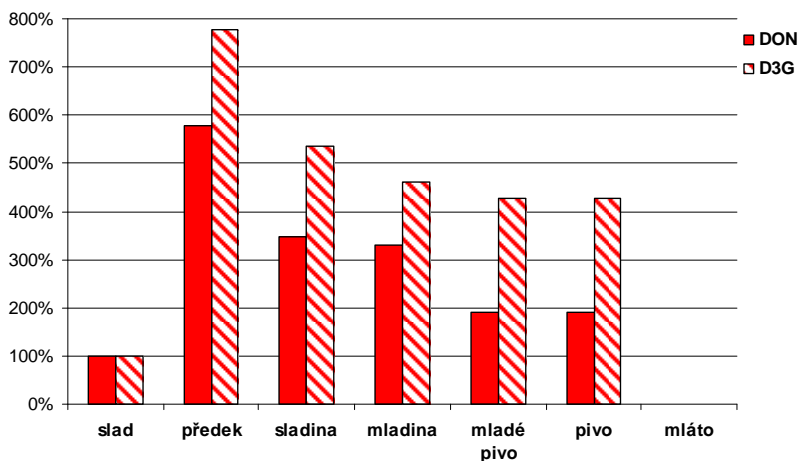
### Osud trichotheecenových mykotoxinů v průběhu pivovarovství a sladařství

Jak již bylo uvedeno v kapitole Materiál a metodika, všechny vzorky odebrané v průběhu pivovarské a sladařské technologie byly vyšetřeny na obsah DON a jeho maskované formy D3G. Dynamika hladin obou mykotoxinů je znázorněna na Obr. 1. Vstupní ječmen obsahoval 560 µg/kg DON a 151 µg/kg D3G. Po pěti hodinách máčení (po 1. máčení) došlo v důsledku vyluhování do máčecí vody k poklesu DON i D3G na 40 % původních hodnot. V dalších dvou dnech tento trend pokračoval. Po dalších čtyřech dnech klíčení byl odebrán meziprodukt zelený slad, který již obsahoval opět vyšší hladiny obou toxinů než v průběhu máčení. Hladina maskovaného D3G narostla na 393 µg/kg, což je téměř o 260 % více než bylo v původním ječmeni. Tento jev může souviset s rychlým nástupem enzymatické aktivity během klíčení. Ze zeleného sladu byl potom hvozďením, dotahováním a odklícením získán jako finální produkt celé technologické řady světlý slad plzeňského typu. V porovnání se zeleným sladem došlo i k mírnému snížení (o cca 10 %) hladiny D3G a naopak ke zvýšení hladiny DON o 30 %. Vysoké hladiny D3G (725 µg/kg) i DON (580 µg/kg) byly detekovány ve sladovém květu, který se využívá ke krmivářským účelům.



Obr. 1: Dynamika DON a D3G v průběhu sladování

Získaný slad byl poté využit v navazujícím experimentu jako vstupní surovina. Standardní pivovarskou technologií bylo vyrobeno pivo. Dynamika DON a D3G v průběhu vaření piva je shrnuta na *Obr. 2*, ze kterého je patrné, že v průběhu rmutování, kdy dochází k rozkladu dextrinů na monosacharidy, došlo k největšímu nárůstu DON (o 470 %) a D3G (o 670 %) oproti původním hladinám detekovaným ve sladu. Vysoké hladiny obou toxinů v meziprojektu předek oproti dalším intermediátům sladiny, mladiny, mladému pivu a pivu jsou dány vysokou koncentrací extraktu, který je dále zředován. Činností kvasinek již dále nedochází k výrazným změnám a hladiny DON i D3G v mladém pivu i a pivu jsou téměř identické. V odpadním produktu mlátě, využívaném stejně jako sladový květ ke krmivářským účelům, byly hladiny obou sledovaných analytů pod detekčním limitem 5 µg/kg.

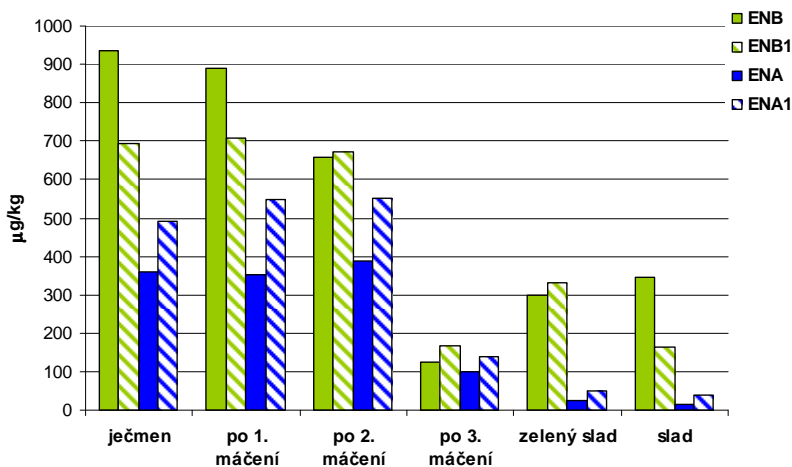


*Obr. 2: Dynamika DON a D3G v průběhu pivovarství*

### **Osud enniatinů v průběhu pivovarství a sladařství**

Dynamika enniatinů v průběhu sladařství a pivovarství nebyla doposud v literatuře popsána. Jedná se tedy o první pilotní experiment, který se bude v následujícím roce v rámci probíhajícího projektu opakovat. Ve srovnání s dynamikou DON a jeho maskovaného analogu D3G se enniatiny chovají v průběhu sladování naprosto odlišně (viz *Obr. 3*). V průběhu prvních tří dnů máčení dochází

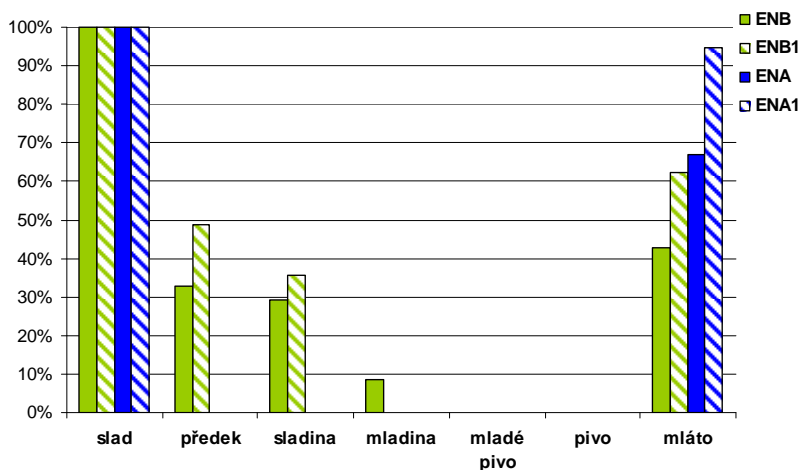
k pomalému snižování koncentrací všech enniatinů (EN B, EN B1, EN A, EN A1), což může být vysvětleno jejich nižší polaritou ve srovnání s trichoheceny. Markantní pokles byl zaznamenán až po ukončení máčení a nastartování procesu klíčení. V zeleném sladu došlo k poklesu o 20 % EN A a EN A1 oproti ječmenu po třetím dni máčení. Naopak hladiny EN B a EN B1 se zvýšily o 30 % a o 20 %. Hvozďením, dotahováním a odlícením již k velkým změnám hladin nedochází s výjimkou EN B1, který poklesl o dalších 20 %. Výsledný slad obsahoval v porovnání se vstupním ječmenem mnohem nižší hladiny, proto lze usuzovat, že na rozdíl od trichohecenů pravděpodobně nejsou enniatiny vázány do maskovaných forem nebo se za daných podmínek z maskovaných forem neuvolňují. Vysoké hladiny enniatinů byly opět detekovány ve sladovém květu (**Tab. I**)



Obr. 3: Dynamika enniatinů v průběhu sladování

Tab. I: Hladiny enniatinů detekované ve sladovém květu

varianta	mykotoxiny (µg/kg)			
	EN A	EN A1	EN B	EN B1
sladový květ	416	451	397	497



Obr. 4: Dynamika enniatinů v průběhu pivovarství

Při zhodnocení přestupu enniatinů do piva (viz Obr. 4) je nutné konstatovat, že do konečného piva nepřecházejí, což je patrné z vysokých hladin detekovaných v mlátu. EN A a EN A1 nebyly detekovány v žádném meziprojektu sladování a EN B a EN B1 byly stanoveny na nejvyšší hladině v předku.

## ZÁVĚR

Kontaminace cereálií mykotoxiny je závažným celosvětovým problémem. Největším rizikem pro konzumenty jsou maskované formy těchto toxinů, které se uvolňují v průběhu enzymatických procesů probíhajících při sladování a vaření piva. To znamená, že i při použití ječmene s velmi nízkými koncentracemi trichothecenů mohou být hladiny těchto látek ve výsledném pivu mnohonásobně vyšší. Opačný jev byl pozorován při sledování enniatinů v průběhu těchto technologií. Vstupní surovina byla kontaminována mnohonásobně více než slad a z něj vyrobené pivo.

## LITERATURA

1. Zpráva o českém pivovarství a sladařství, dostupné na <http://www.cspas.cz/index.asp?lang=2>), staženo dne 1.10.2010
2. Lancová K., Hajšlová J., Poustka J., Krplová A., Zachariášová M., Dostálek P., Sachambula L.: Transfer of *Fusarium* mycotoxins and „masked“ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barely through malt to beer. *Food Additives and Contaminants.*, 25 (6), 732–744 (2008).
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; *Official Journal of the European Union*, 2006, 5–24 (2006).
4. Berthiller F., Dall’Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R.: Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 3421–3425 (2005).
5. Jestoi M.: Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins and moniliformin – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (1), 21–49 (2008).
6. Meca G., Zinedine A., Blesa J., Font G., Manes J.: Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on Spanish markets. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1412–1416 (2010).
7. Verstraete F, 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*. 21–22<sup>th</sup> April, Prague (2009).