

DOI: 10.18832/kp201728

Výskyt mykotoxinů v pivech z obchodní sítě

The Occurrence of Mycotoxins in Beers from Retail Shops

Sylvie BĚLÁKOVÁ¹, Simona Wawroszová², Karolína BENEŠOVÁ¹¹Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika
*Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic*²Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 61200 Brno, Česká republika*Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

e-mail: belakova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper***Běláková, S., Waroszová, S., Benešová, K., 2017: Výskyt mykotoxinů v pivech z obchodní sítě.** Kvasny Prum. 63(6): 293–297

V roce 2016 byl sledován obsah mykotoxinu deoxynivalenolu, jeho metabolitu deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosidu a ochratoxinu A v pivech z české, polské a slovenské maloobchodní sítě. Celkem bylo analyzováno 30 vzorků piv. Pro stanovení deoxynivalenolu a jeho metabolitu byla použita vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC/MS) a pro stanovení ochratoxinu A ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (UPLC/FLR). Deoxynivalenol byl detekován ve 25 vzorcích v koncentračním rozmezí 1,54 – 12,57 μg·l⁻¹ a deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid se vyskytoval v 27 vzorcích v rozmezí kontaminace 1,18 – 12,47 μg·l⁻¹. Ochratoxin A byl nalezen ve 23 vzorcích v rozmezí kontaminace 1,2 – 82,5 ng·l⁻¹.

Běláková, S., Waroszová, S., Benešová, K., 2017: The Occurrence of Mycotoxins in Beers from Retail Shops. Kvasny Prum. 63(6): 293–297

In 2016, contents of mycotoxin deoxynivalenol, its metabolite deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranoside and ochratoxin A, in beers from Czech, Polish and Slovak retail shops were studied. Totally, 30 beer samples were analyzed. Deoxynivalenol and its metabolite were determined using high performance liquid chromatography with mass detection (HPLC/MS) HPLC, and ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection (UPLC/FLR) was employed for the determination of ochratoxin A. Deoxynivalenol was detected in 25 samples in the concentration range of 1.54 - 12.57 μg·l⁻¹ and deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranoside was present in 27 samples in the contamination range of 1.18 - 12.47 μg·l⁻¹. Ochratoxin A was detected in the contamination range of 1.2 – 82.5 ng·l⁻¹.

Běláková, S., Waroszová, S., Benešová, K., 2017: Das Auftreten von Mykotoxinen in den Bieren aus dem Handelsmarkt. Kvasny Prum. 63(6): 293–297

Im Jahre 2016 wurde ein Gehalt an Mykotoxin Deoxynivalenol, seinen Metabolit Deoxynivalenol-3-β-D-Glukopyranosid und Ochratoxin A in den Bieren aus dem tschechischen, slowakischen und polnischen Biermarkt verfolgt. Insgesamt wurden 30 Biermuster analysiert. Für die Bestimmung des Deoxynivalenols und seinen Metabolit wurde Hochleistungs-Flüssigchromatographie in Kombination mit Massendetektion (HPLC/MS) und zur Ochratoxin A Bestimmung die Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (UPLC/FLR) angewandt. In den 25 Mustern wurde Deoxynivalenol im Konzentrationsbereich 1,54 – 12,57 μg·l⁻¹ festgestellt, Deoxynivalenol-3-β-D-Glukopyranosid im Konzentrationsbereich 1,18 – 12,47 μg·l⁻¹ in den 27 Mustern und Ochratoxin A in den 23 Mustern im Konzentrationsbereich 1,2 – 82,5 ng·l⁻¹ festgestellt.

Klíčová slova: pivo, mykotoxiny, deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid, ochratoxin A**Keywords:** beer, mycotoxins, deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranoside, ochratoxin A

1 ÚVOD

Pivo je slabě alkoholický nápoj, který se po staletí vyrábí z obilných sladů, vody a chmele za účasti pivovarských kvasinek (Basařová et al., 2010). Česká republika patří mezi země s největší konzumací piva na osobu a rok. V roce 2015 se umístila na prvním místě se 143 litry na osobu a rok. Následuje Německo a Rakousko se 106 a 105 litry na osobu a rok (Beer Statistics, 2016). Při takto velké konzumaci je kontrola nežádoucích látek jak ve vstupních surovinách, tak v pivu velice důležitá. Mezi tyto nežádoucí látky patří bezesporu i mykotoxiny.

Mykotoxiny lze definovat jako přírodní toxické metabolity vláknitých mikromycetů, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velmi malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxinogenními plísněmi potenciálně značně nebezpečná (Bennett, 1987).

Mykotoxiny jsou chemicky i tepelně velmi stabilní sloučeniny a proto mohou přecházet z infikovaného ječmene do sladu během řízeného procesu sladování, při kterém vznikají vhodné podmínky pro jejich produkci. Obecně jsou mykotoxiny stabilní do 170 °C v neutrálním až kyselém prostředí a mohou tedy odolávat i procesu vaření piva. Z tohoto důvodu je analýze mykotoxinů v surovinách pro výrobu piva a v pivu věnována velká pozornost (Wolf-Hall, 2007).

Deoxynivalenol (DON) je nejvíce sledovaný fusariový mykotoxin, který se řadí mezi trichothece B. Jeho významným producentem je *Fusarium graminearum* (nepohlavní forma *Gibberella zeae*), který

1 INTRODUCTION

Beer is a slightly alcoholic beverage, which has been produced for centuries from cereal malts, water and hops using brewer's yeast (Basařová et al., 2010). The Czech Republic belongs to the countries with the largest consumption of beer per person per year. In 2015, it ranked first with 143 liters per person per year. Germany and Austria with 106 and 105 liters per person per year followed (Beer Statistics, 2016). With such high consumption, monitoring of undesirable substances in both input raw materials and beer is very important. These undesirable substances definitely include mycotoxins.

Mycotoxins can be defined as natural toxic metabolites of filamentous micromycetes that evoke a toxic response of the organism even at very low concentrations; for this reason, any contamination with toxigenic fungi is potentially very dangerous (Bennett, 1987).

Mycotoxins are chemically and thermally very stable compounds and thus they can pass from infected barley to malt during the controlled process of malting which generates suitable conditions for their production. Generally, mycotoxins are stable to 170 °C in neutral to acidic environment and thus they can survive the brewing process. For this reason, high attention must be paid to the analysis of mycotoxins in beer raw materials and beer (Wolf-Hall, 2007).

Deoxynivalenol (DON) is the most studied fusarium mycotoxin, it belongs to the trichothece B. Its major producer is *Fusarium graminearum* (asexual form of *Gibberella zeae*), which plays a role mainly in warmer areas (optimal growth temperature is 25 °C). An-

se uplatňuje především v teplejších oblastech (optimální teplota růstu je 25 °C). Dalším producentem je *F. culmorum*, který má nižší nároky na teplotu (optimum je 21 °C). Výskyt DON v cereáliích je meziročně velmi variabilní, závisí především na klimatických podmínkách v dané lokalitě, na typu předplodiny a na rezistenci dané odrůdy. (Malíř et al., 2003; Velíšek et al., 2009).

Kromě volných forem mykotoxinů, které jsou běžně sledovány, existují konjugované formy mykotoxinů, které bývají také označovány jako maskované mykotoxiny. Jedná se zejména o konjugáty s mono- a oligosacharidy, které vznikají v průběhu detoxikačního procesu v kontaminovaných rostlinách. Deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid (D3G) je nejznámějším a zatím nejprobadanějším konjugátem trichothecenů (Velíšek et al., 2009; Berthiller et al., 2007). V současné době není možné říct, jestli D3G, jakožto detoxikační rostlinný produkt, vykazuje akutní toxicitu nebo zda se v těle může rozštěpit zpět na DON (Berthiller et al., 2007; Berthiller et al., 2013).

Ochratoxin A (OTA) patří mezi významné nefrotoxicke mykotoxiny s karcinogenními účinky a je spojován s nádory ledvin (Malíř et al., 2014). Tento toxický metabolit je v oblastech mírného podnebního pásu a v chladnějších oblastech produkovan hlavně vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Penicillium* (Malíř a Ostrý, 2003). V obilovinách je OTA produkovan zejména mikroskopickou vláknitou houbou *P. verrucosum*, která se jen zřídka vyskytuje na poli. Kontaminace obilovin OTA je proto považována především za posklizňový problém (Amézqueta et al., 2009; Anli et al., 2010). *P. verrucosum* se často nachází v silech, kde ulpívá na mechanických nečistotách a zrnech z předchozího roku. Kritické faktory, které ovlivňují produkci OTA v napadených obilovinách během pěstování, sklizně a především skladování, jsou teplota, vlhkost a čas, po který je obilovina vystavena nepříznivým podmínkám (Amézqueta et al., 2009). Přítomnost OTA v pivu závisí na kontaminaci vstupních surovin, tj. sladovnického ječmene a sladu. Byla provedena řada studií, kde byl sledován přechod OTA a dalších mykotoxinů do piva v průběhu vaření (Scott, 1996; Baxter et al., 2001; Inoue et al., 2013).

Vysoká toxicita mykotoxinů a jejich variabilní výskyt předurčují mykotoxiny k regulaci legislativou (Capriotti et al., 2010). Maximální povolené limity mykotoxinů DON a OTA v potravinách jsou v České republice a Evropské unii stanoveny Nařízením komise (ES) č. 1881/2006 ve znění Nařízení komise (ES) č. 1126/2007 pro fusariové mykotoxiny a Nařízením komise (EU) č. 105/2010 pro ochratoxin A. Maximální limity pro DON a OTA v obilovinách činí 1250 µg.kg⁻¹ a 5 µg.kg⁻¹. Pro pivo nebyl maximální limit stanoven.

Cílem naší studie bylo sledovat výskyt DON, D3G a OTA ve vzorcích piv, které pocházely z maloobchodní sítě České, Polské a Slovenské republiky.

2 MATERIÁL A METODY

Byl sledován výskyt mykotoxinu DON, jeho metabolitu D3G a mykotoxinu OTA v českých (10 vzorků), polských (12 vzorků) a slovenských (8 vzorků) lahvoých pivech. Jednalo se o ležáky s obsahem alkoholu v rozmezí 4,6 – 6,0 %, které byly zakoupeny v maloobchodní síti v České republice, Polsku a na Slovensku v roce 2016.

DON a D3G v pivu byly analyzovány po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonku DONPREP. Odplyněný vzorek piva byl nanesen přímo na imunoafinitní kolonku, k promytí byla použita deionizovaná voda. Eluce byla prováděna opakovaně methanolem. Vzorek byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 0,5 ml směsi methanol/voda 50/50 (v/v). Pro

other producer is *F. culmorum*, which has lower temperature requirements (optimum is 21 °C). The occurrence of DON in cereals is very variable year-on-year, depending mainly on the climatic conditions of the site, the type of pre-crop and the resistance of the variety. (Malíř et al., 2003; Velíšek et al., 2009).

Besides free mycotoxin forms which are commonly observed, conjugated mycotoxin forms exist, they are also referred to as masked mycotoxins. These are namely conjugates with mono- and oligosaccharides that originate during the detoxication process in contaminated plants. Deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranosid (D3G) is the most well known and so far most studied conjugate of trichothecenes (Velíšek et al., 2009; Berthiller et al., 2007). Currently it remains unclear whether D3G as a detoxification plant product exhibits acute toxicity or whether it can cleave back to DON in the body (Berthiller et al., 2007; Berthiller et al., 2013).

Ochratoxin A (OTA) belongs to significant nephrotoxic mycotoxins with carcinogen effects and it is associated with kidney tumours (Malíř et al., 2014). This toxic metabolite is produced mainly by filamentous microscopic fungi of *Penicillium* species in the moderate climatic and in colder areas (Malíř and Ostrý, 2003). In cereals, OTA is produced mainly by a microscopic filamentous fungi *P. verrucosum* which only rarely occurs in fields. Contamination of cereals with OTA is therefore considered a post-harvest problem (Amézqueta et al., 2009; Anli et al., 2010). *P. verrucosum* is often detected in silos where it adheres to mechanical impurities and grains from a previous year. Critical factors affecting OTA production in contaminated cereals during growing, harvesting and storage include the temperature, humidity and the time at which cereals are exposed to adverse conditions (Amézqueta et al., 2009). The presence of OTA in beer depends on contamination of the input raw materials, i.e. malting barley and malt. A number of studies have investigated passing of OTA and other mycotoxins to beer during brewing (Scott, 1996; Baxter et al., 2001; Inoue et al., 2013).

Mycotoxins due to their high toxicity and variable occurrence are regulated by the legislation (Capriotti et al., 2010). In the Czech Republic and European Union, the maximal allowed limits of DON and OTA mycotoxins in food are set by the Commission Regulation (EC) No 1881/2006 as amended by the Commission Regulation (EC) 1126/2007 for fusarium mycotoxins and Commission Regulation (EU) no. 105/2010 for ochratoxin A. The maximal limits for DON and OTA in cereals are 1250 µg.kg⁻¹ and 5µg.kg⁻¹, respectively. No maximal limit was set for beer.

The aim of our study was to monitor the occurrence of DON, D3G and OTA in samples of beers from the retail shops in the Czech, Polish and Slovak Republics.

2 MATERIAL AND METHODS

The occurrence of mycotoxin DON, its metabolite D3G and mycotoxin OTA was studied in Czech (10 samples), Polish (12 samples) and Slovak (8 samples) bottled beers. These were lager beers with alcohol content in the range of 4.6 – 6.0 % which were purchased in retail shops in the Czech Republic, Poland and Slovakia in 2016.

DON and D3G in beer were analyzed after prior purification through the DONPREP immunoaffinity column. The degassed beer sample was applied directly to the immunoaffinity column, deionized water was used for washing the sample. Elution was carried out repeatedly with methanol. The sample was evaporated to dryness on a vacuum evaporator. Before injecting, the sample was dissolved in 0.5 ml of 50/50 v/v methanol/water mixture. For the identification and

Tab. 1 Obsah DON a D3G (µg.l⁻¹) v pivech / Table 1 Content of DON and D3G (µg.l⁻¹) in beers

Kategorie Category	Počet piv Number of beers	Mykotoxin Mycotoxin	Pozitivní vzorky Positive samples	Rozmezí Range	Průměrný obsah Average content
Česká piva Czech beers	10	DON	10	3.07 – 10.70	4.40
		D3G	10	1.18 – 12.47	2.99
Polská piva Polish beers	12	DON	8	1.54 – 8.19	2.92
		D3G	11	1.85 – 10.68	4.27
Slovenská piva Slovak beers	8	DON	7	2.29 – 12.57	4.54
		D3G	6	2.45 – 10.16	4.22

identifikaci a kvantifikaci DON a D3G byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně – spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS) (Běláková et al., 2013).

OTA v pivu byl analyzován po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonku OCHRAPREP. Vzorek piva byl odplyněn na ultrazvuku a jeho pH bylo upraveno na 7,2 pomocí 2M roztoku hydroxidu sodného. Takto upravený vzorek byl aplikován přímo na imunoafinitní kolonku. K promytí kolonky byl použit fosfátový pufr PBS. Eluce byla prováděna 1,5 ml směsí methanol/kyselina octová 98/2 (v/v). Eluát byl odpařen ve vakuové odparce. Před nástřikem byl odparek rozpuštěn v 0,5 ml směsí methanol/voda 50/50 (v/v). Pro analytické stanovení OTA v pivu byla použita metoda ultra vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí (UPLC – FLR) (Běláková et al., 2011; Běláková et al., 2015).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 DON a D3G v pivu

DON a jeho metabolit D3G patří mezi nejčastěji se vyskytující mykotoxiny ve sladu a v pivu v Evropských zemích (Kostelanská et al., 2011). DON se může vyskytovat v pivu, jsou-li suroviny použité pro jeho výrobu kontaminované (Papadopoulou et al., 2004). Jeho hlavním rostlinným metabolitem je D3G, který vykazuje sníženou toxicitu vůči rostlinám, a to jako takzvaný maskovaný mykotoxin (Varga et al., 2013).

Mykotoxin DON a jeho konjugát D3G se vyskytovaly v koncentraci vyšší než limit kvantifikace (LOQ = 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) v 83 a 90% vzorků sledovaných piv. DON byl nalezen ve všech českých pivech, 67% polských piv a 88% slovenských piv. Koncentrace DON se pohybovala v rozmezí 1,54 – 12,57 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší obsah byl nalezen ve slovenském pivu. D3G obsahovala všechna česká piva, 92% polských piv a 75% slovenských piv. Koncentrace D3G byla v rozmezí 1,18 – 12,47 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší obsah byl nalezen v českém pivu. Přehled kontaminace piv DON a D3G je uveden v tab. 1.

Tyto zjištěné koncentrace se výrazně neliší od předchozích studií. Ruprich a Ostrý v roce 1995 detekovali DON v 59 ze 77 vzorků piv v rozmezí 7 – 70 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ruprich a Ostrý, 1995). Schothorst a Jekel v roce 2003 našli DON pouze ve 3 z 51 vzorků holandských piv, a to v koncentraci 26 – 41 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Schothores a Jekel, 2003). Papadopoulou-Bouraoui et al. v roce 2004 provedli výzkum 313 vzorků piv z evropských zemí. DON se vyskytoval v 272 vzorcích s koncentrací v rozmezí 4,0 – 56,7 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Papadopoulou et al. 2004). Běláková et al. v roce 2013 sledovala výskyt DON v 119 pivech z obchodní sítě České republiky. DON byl nalezen v 89 vzorcích s koncentrací v rozmezí 2,00 – 44,00 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Běláková et al., 2013). Varga a spol. v roce 2013 analyzovali DON a D3G ve 374 pivech z 38 zemí světa. DON byl nalezen ve 289 a D3G ve 348 pivech (77 a 93%). Jejich průměrná koncentrace činila 8,4 a 6,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Varga et al., 2013).

Molární poměry D3G/DON se pohybovaly u českých piv v rozmezí 0,25 – 0,75, u polských piv 0,37 – 1,48 a u slovenských piv 0,44 – 1,25. Ve srovnání s DON, obsah D3G může být nižší, stejný nebo vyšší a není tedy možné předpovědět koncentraci D3G z měření samotného DON (Varga et al., 2013). Varga et al. uvádí molární poměr D3G/DON v rozmezí 0,11 – 1,25 ve studii z roku 2013 při testování 374 piv (Varga et al., 2013). Kostelanska et al. (2009) uvádí molární poměry D3G/DON 0,58 – 1,24 ve 176 světlých a tmavých pivech (Kostelanska et al., 2009). Zvýšení poměru D3G/DON v pivu může být způsobeno různými postupy při výrobě piva. Během fáze klíčení při sladování hladiny DON a jeho metabolitů vzrůstají ve srovnání s koncentrací v původních zrnech ječmene. Zvyšování množství D3G je způsobeno zejména díky vysoké enzymatické aktivitě a pokračuje také při rmutování (Varga et al., 2013).

Legislativní limit pro výskyt DON v pivu nebyl dosud stanoven. V roce 1999 byl stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) tolerovatelný denní příjem (TDI) pro DON na 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Nejvyšší nalezená koncentrace DON v analyzovaných pivech byla ve slovenském pivu 12,57 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Aby průměrný muž vážící 83 kg překročil TDI, musel by vypít 13 takto kontaminovaných půllitrových piv za den. Nejedná se tedy o koncentraci, která by představovala hrozbu pro zdravotní stav konzumentů.

3.2 OTA v pivu

Přítomnost OTA v pivu závisí na kontaminaci vstupních surovin, tj. sladovnického ječmene a sladu. OTA je při vysokých teplotách relativně stabilní. Při rmutování část OTA přechází do mláta, část zůstává ve sladině. Při fermentaci se OTA může adsorbovat na kvasinky a zbytek přechází do piva (Scott, 1996; Baxter et al., 2001; Mateo et

al., 2013). Quantification of DON and D3G, the method of high performance liquid chromatography was used coupled with mass spectrometric detection (LC-MS/MS) (Běláková et al., 2013).

OTA in beer was analyzed after prior purification through the OCHRAPREP immunoaffinity column. The beer sample was ultrasonic degassed and its pH was adjusted to 7.2 with 2M sodium hydroxide solution. The sample then was applied directly to the immunoaffinity column. Phosphate buffer PBS was used to wash the column. Elution was carried out with 1.5 ml of methanol/acetic acid 98/2 (v/v). The eluate was evaporated in a vacuum evaporator. Before injecting, the residue was dissolved in 0.5 ml of a 50/50 (v/v) methanol/water mixture. The method of ultra-high liquid chromatography coupled with fluorescent detection (UPLC – FLR) was used for the determination of OTA in beer (Běláková et al., 2011; Běláková et al., 2015).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 DON and D3G in beer

DON and its metabolite D3G belong to the frequently occurring mycotoxins in malt and beer in European countries (Kostelanska et al., 2011). DON may occur in beer if raw materials for its production are contaminated (Papadopoulou et al., 2004). Its main plant metabolite is D3G which exhibits lowered toxicity to plants as a so-called masked mycotoxin (Varga et al., 2013).

Mycotoxin DON and its conjugate D3G occurred at the concentration higher than the limit of quantification (LOQ = 1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) in 83 and 90% of the studied beer samples. DON was detected in all Czech beers, 67% of Polish beers and 88% of Slovak beers. Concentration of DON moved from 1.54 – 12.57 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The highest content was found in the Slovak beer. D3G was detected in all Czech beers, 92% of Polish beers and 75% of Slovak beers. D3G concentration moved from 1.18 – 12.47 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The highest content was found in the Czech beer. Survey of contamination of beers with DON and D3G is given in Table 1.

The concentrations found do not vary significantly from previous studies. In 1995, Ruprich and Ostrý detected DON in 59 of 77 beer samples in the range of 7 – 70 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ruprich and Ostrý, 1995). In 2003, Schothorst and Jekel found DON only in 3 of 51 samples of Dutch beers, in the range of 26 – 41 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Schothores and Jekel, 2003). In 2004, Papadopoulou-Bouraoui et al. conducted research of 313 samples of beers from European countries. DON occurred in 272 samples with concentration in the range of 4.0 – 56.7 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Papadopoulou et al., 2004). In 2013, Běláková et al. studied the DON occurrence in 119 beers from retail shops in the Czech Republic. DON was detected in 89 samples with concentration in the range of 2.00 – 44.00 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Běláková et al., 2013). In 2013, Varga et al. analyzed DON and D3G in 374 beers from 38 countries. DON was found in 289 and D3G in 348 beers (77 and 93%). Their average concentrations were 8.4 and 6.9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Varga et al., 2013).

Molar rates D3G/DON in Czech beers varied from 0.25 – 0.75, in Polish beers 0.37 – 1.48 and in Slovak beers 0.44 – 1.25. Compared to DON, D3G content may be lower, the same or higher and therefore D3G concentration cannot be estimated only from DON measuring (Varga et al., 2013). Varga et al. reported D3G/DON rates in the range of 0.11 – 1.25 in their study from 2013 when 374 beers were tested (Varga et al., 2013). Kostelanska et al. (2009) reported molar rates of D3G/DON 0.58 – 1.24 in 176 pale and dark beers (Kostelanska et al., 2009). An increase in the D3G/DON rate in beer may be due to different beer production processes. During the germination phase, the level of DON and its metabolites increases compared to the concentration in the original barley grains. Increasing the amount of D3G is mainly due to high enzyme activity and it continues in mashing (Varga et al., 2013).

A legislative limit for the occurrence of DON in beer has not been determined. In 1999, a tolerable daily intake (TDI) for DON per 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight was established by the European Food Safety Authority (EFSA). The highest DON concentration found in the analyzed beers was 12.57 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in a Slovak beer. To exceed the TDI, an average man weighing 83 kg would have to drink 13 contaminated pints of beer per day. Thus this concentration does not pose a threat to consumers' health.

3.2 OTA in beer

The presence of OTA in beer depends on the contamination of the input materials, i.e. malting barley and malt. OTA is relatively stable at high temperatures. During mashing, some OTA passes to spent grains, some remains in wort. During fermentation, OTA can adsorb

Tab. 2 Obsah OTA (ng.l⁻¹) v pivu / Table 2 OTA content (ng.l⁻¹) in beer

Kategorie Category	Počet piv Number of beers	Pozitivní vzorky Positive samples	Rozmezí Range	Průměrný obsah Average content
Česká piva Czech beers	10	9	1.8 – 82.5	20.8
Polská piva Polish beers	12	7	1.2 – 49.3	6.7
Slovenská piva Slovak beers	8	7	1.9 – 78.5	31.3

al., 2007; Běláková et al., 2011). OTA je také hydrolyzován kyselinami a některými proteasami na ochratoxin a fenylalanin (Inoue et al., 2013).

OTA byl nalezen v koncentraci vyšší než limit kvantifikace (LOQ = 1,0 ng.l⁻¹) v 77% vzorků sledovaných piv. Česká piva byla kontaminována OTA z 90%, polská piva z 58% a piva slovenská z 88%. Koncentrace OTA se pohybovala v rozmezí 1,2 – 82,5 ng.l⁻¹. Nejvyšší koncentrace byla nalezena v českém pivu. Přehled kontaminace piv OTA je uveden v tab. 2.

V Kanadě Scott a Kanhere našli OTA ve 26 ze 41 testovaných vzorků piv s hodnotou OTA do 200 ng.l⁻¹ (Scott a Kanhere, 1995). V roce 2005 bylo analyzováno 88 piv z obchodní sítě Španělska. OTA se vyskytoval v 83% analyzovaných vzorků v rozmezí 7,0–204 ng.l⁻¹ (Medina et al., 2005). V roce 2009 byl sledován výskyt OTA v pivech z české maloobchodní sítě. OTA byl nalezen v 39% vzorků v rozmezí 1,0 – 243,8 ng.l⁻¹ (Běláková et al., 2011). V roce 2015 byl na stejném pracovišti publikován výskyt OTA v pivech v letech 2011 – 2014. Celkem bylo analyzováno 132 vzorků. OTA byl nalezen v 81% analyzovaných vzorků. Jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 1,0 – 194,6 ng.l⁻¹ (Běláková et al., 2015). Všechny získané hodnoty OTA v analyzovaných pivech jsou v souladu s dříve publikovanými daty.

Legislativní limity pro výskyt OTA v pivu nebyly dosud stanoveny, nicméně jsou v některých evropských zemích stanoveny směrné hodnoty, jako např. v Nizozemsku (0,5 µg.l⁻¹), ve Finsku (0,3 µg.l⁻¹) a v Itálii (0,2 µg.l⁻¹) (Yordanova a Vrabcheva, 2006). V roce 2006 byl stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) tolerovatelný týdenní příjem (TWI) pro OTA 120 ng.kg⁻¹ tělesné hmotnosti. Při vypití 0,5 l piva, ve kterém byla zjištěna nejvyšší koncentrace OTA 82,5 ng.l⁻¹, by byl spotřebitel vystaven dávce 41,2 ng OTA. Aby průměrný muž vážící 83 kg překročil TWI, musel by vypít 241 takto kontaminovaných půllitrových piv za týden. Dá se tedy konstatovat, že obsah OTA v těchto analyzovaných pivech nepředstavuje žádné významné zdravotní riziko.

4 ZÁVĚR

Sledování potenciálně toxických látek vstupujících do potravního řetězce člověka je nedílnou součástí moderní lidské společnosti. V zájmu ochrany veřejného zdraví je nezbytné udržet množství kontaminujících látek na toxikologicky přijatelných úrovních. Mezi kontaminující látky patří i mykotoxiny, které se velmi často vyskytují v obilovinách a tedy i ve sladovnickém ječmeni. Mykotoxiny jsou poměrně stabilní sloučeniny a mohou přecházet z kontaminovaného ječmene až do piva. V této práci jsme analyzovali 30 piv, která byla nakoupena v maloobchodní síti české, polské a slovenské republiky. Byly zde sledovány mykotoxiny DON, jeho metabolit D3G a OTA. Bylo kontaminováno celkem 83 % vzorků piv DON, 90% D3G a 77% OTA. Nejvyšší koncentrace DON (12,57 µg.l⁻¹) byla nalezena ve slovenském pivu, D3G (12,47 µg.l⁻¹) v českém pivu a OTA (82,5 ng.l⁻¹) v českém pivu. Maximální hodnoty pro výskyt DON a OTA v pivu nebyly evropskou legislativou stanoveny. Od roku 1999 existuje TDI pro DON (1 µg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti) a od roku 2006 TWI pro OTA (120 ng.kg⁻¹ tělesné hmotnosti). Na základě těchto stanovených limitů lze říct, že obsah sledovaných mykotoxinů nepředstavuje v žádném analyzovaném pivu pro konzumenta významné zdravotní riziko.

PODEKOVÁNÍ

Tato publikace vznikla ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a. s., v rámci projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

to yeast and the rest passes to beer (Scott, 1996; Baxter et al., 2001; Mateo et al., 2007; Běláková et al., 2011). OTA is also hydrolyzed by acids and some proteases to ochratoxin a and phenylalanin (Inoue et al., 2013).

OTA was found at concentration higher than the limit of quantification (LOQ = 1.0 ng.l⁻¹) in 77% of samples of the studied beers. Czech beers were contaminated with OTA of 90%, Polish beers of 58% and Slovak beers of 88%. OTA concentration moved in the range of 1.2 – 82.5 ng.l⁻¹. The highest concentration was found in the Czech beer. Table 2 shows the survey of OTA contamination in beers.

In Canada, Scott and Kanhere found OTA in 26 of 41 tested beer samples with the OTA value to 200 ng.l⁻¹ (Scott and Kanhere, 1995). In 2005, 88 beers from the retail shop in Spain were analyzed. OTA occurred in 83% of the analyzed samples in the range of 7.0 – 204 ng.l⁻¹ (Medina et al., 2005). In 2009, the occurrence of OTA in beers from the Czech retail shops was studied. OTA was found in 39% of samples in the range of 1.0 – 243.8 ng.l⁻¹ (Běláková et al., 2011). In 2015, the same workplace published the occurrence of OTA in beers in 2011 – 2014. Totally, 132 samples were analyzed. OTA was found in 81% of the analyzed samples. Its concentration moved in the range of 1.0 – 194.6 ng.l⁻¹ (Běláková et al., 2015). All the obtained values of OTA in the analyzed beers are in compliance with previously published data.

The legislative limits for the occurrence of OTA in beer have not been set yet, nevertheless guiding values were specified in some European countries, such as Holland (0.5 µg.l⁻¹), Finland (0.3 µg.l⁻¹), and Italy (0.2 µg.l⁻¹) (Yordanova and Vrabcheva, 2006). A tolerable weekly intake (TWI) for OTA of 120 ng.kg⁻¹ body weight was established by the European Food Safety Authority (EFSA) in 2006. When drinking 0.5 liters of beer in which the highest OTA concentration of 82.5 ng.kg⁻¹ was detected, the consumer would be exposed to 41.2 ng of OTA. In order for an average man weighing 83 kg to exceed the TWI, he would have to drink 241 of such contaminated pints of beer per week. Therefore, it can be stated that the content of OTA in these beers does not pose any significant health risk.

4 CONCLUSIONS

Monitoring of potentially toxic substances entering the human food chain is an integral part of modern human society. In order to protect public health, the amount of contaminants must be kept at toxicologically acceptable levels. Contaminant substances include mycotoxins, which commonly occur in cereals and therefore in malting barley. Mycotoxins are relatively stable compounds and can pass from contaminated barley to beer. In this study, we analyzed 30 beers which were purchased in retail shops of the Czech, Polish and Slovak Republics. Mycotoxin DON, its metabolite D3G and OTA were analyzed. Totally 83 % of beer samples were contaminated with DON, 90% D3G and 77% OTA. The highest DON concentration (12.57 µg.l⁻¹) was found in the Slovak beer, D3G (12.47 µg.l⁻¹) in Czech beer and OTA (82.5 ng.l⁻¹) in Czech beer. The maximal levels for the DON and OTA occurrence in beer have not been set by European legislation. Since 1999, TDI for DON (1 µg.kg⁻¹ body weight) and since 2006 TWI for OTA (120 ng.kg⁻¹ body weight) have existed. Based on these fixed limits we can claim that contents of the studied mycotoxins do not represent for consumers any significant health risk in any analyzed beer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted in the Research Institute of Brewing and Malting, Plc. within the project of TAČR TE02000177 “Centre for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products”.

Translated by Vladimíra Nováková

LITERATURA / REFERENCES

- Amézqueta, S., González-Penas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., 2009: Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 20: 326–333.
- Anli, E., Alkis, M., 2010: Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *J.Inst.Brew.*, 116(1): 23–32.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT v Praze. ISBN 978-80-7080-734-7.
- Baxter, E. D., Slaiding, I. R. and Kelly, B., 2001: Behavior of ochratoxin A in brewing. *American Society of Brewing Chemists.*, 59: 98–100.
- Beer Statistics – 2016 Edition. In: *The Brewers of Europe* [online]. Belgium, 2016. [cit. 29. 3. 2017]. ISBN 978-2-9601382-7-6. Dostupné na [www: http://www.brewersofeurope.org/site/media-centre/index.php?doc_id=840&class_id=31&detail=true](http://www.brewersofeurope.org/site/media-centre/index.php?doc_id=840&class_id=31&detail=true).
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2011: Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 126 (1): 321–325.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., Čáslavský, J., 2013: Monitoring výskytu deoxynivalenolu v pivech z obchodní sítě v letech 2009–2012. *Kvasny prum.*, 59 (10-11): 292–295.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R. a Svoboda, Z., 2015: Výskyt ochratoxinu A v pivech. *Kvasny prum.*, 61(2): 34–37.
- Bennett, J. W., 1987: Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopatologia. *Mycopatologia*, 100(1): 3–5.
- Berthiller, Fr., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007: Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2): 33–37.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saega, S., Haesaert, G., Karlovský, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2013: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57: 165–186.
- Capriotti, A. L., Foglia, P., Gubbiotti, R., Rocchia, C., Samperi, R., Laganà, A., 2010: Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No.1881/2006 In cereals. *Journal of Chromatography A.*, 1217: 6044–6051.
- Gumus, T., Arici, M., Demirci, M., 2004: A Survey of Barley, Malt and Beer Contamination with Ochratoxin A in Turkey. *Journal of the institute of brewing.*, 110(2): 146–149.
- Hajšlová, J., 2009: Mykotoxiny. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí [online]. [cit. 9. 6. 2016]. Dostupné na [www: http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf](http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf)
- Inoue, T., Nagatomi, Y., Uyama, A., Mochizuki, N., 2013: Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Biosci. Biotechnol. Bichem.*, 77 (7): 1410–1415.
- Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P. M., Berthiller, F., Krska, R., 2009: Occurrence of Deoxynivalenol and its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3187–3194.
- Kostelanska, M., Zachariasova, M., Lacina, O., Fenclova, M., Kollos, A., Hajslova, J., 2011: The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry*, 126: 1870–1876.
- Malíř, F., Ostrý, V., 2003: Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka, 1.vydání, Mikada, Brno. ISBN: 80-7013-395-3.
- Malíř, F., Ostrý, V., Prohl-Leszkwicz, A., Novotná, E., 2014: Mycotoxin ochratoxin A and developmental and reproductive toxicity – an overview. *Developmental and Reproductive Toxicology*: 1–10.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E. M., Mateo, F., Jiménez, M., 2007: An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1–2): 79–83.
- Medina, A., Jiménez, M., Gimeno-Adelantado, J. V., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., 2005: Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A.*, 1083 (1–2): 7–13.
- Papadopoulou-Bouras, A., Vrabcheva, T., Valzacchi, S., Stroka, J., Anklam, E., 2004: Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives and Contaminants*, 21(6): 607–617.
- Ruprich, J., Ostry, V., 1995: Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial Elisa tests and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*, 3(4): 224–229.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., 1995: Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit. Contam.*, 12(4): 591–598.
- Scott, P. M., 1996: Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the AOAC International*, 79: 875–882.
- Schothorst, R. C., Jekel, A. A., 2003: Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*, 82(3): 475–479. ISSN 03088146.
- Varga, E., Malachova, A., Schwartz, H., Krska, R., Berthiller, F., 2013: Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives and Contaminants.*, 30(1): 137–146.
- Velíšek, J., Hajšlová, J., 2009: *Chemie potravin II.* Havlíčkův Brod: nakladatelství OSSIS. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- Wolf-Hall, C. E., 2007: Mold and mycotoxin problem encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 89–94.
- Yordanova, P., Vrabcheva, T., 2006: Ochratoxin A in bulgarian beer and wine. *Advances in Bulgarian Science*, 4: 12-19. ISSN 1312-6164.

*Do redakce došlo / Manuscript received: 06/07/2017
Přijato k publikování / Accepted for publication: 17/10/2017*