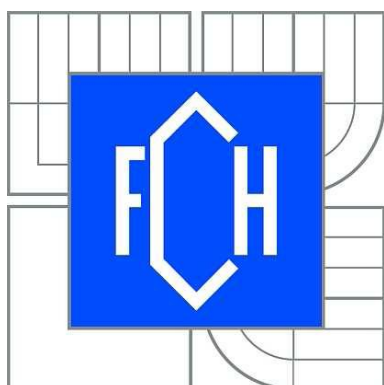


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## MYKOTOXINY V PIVOVARSKÝCH SUROVINÁCH A V PIVU

MYCOTOXINS IN BREWING MATERIALS AND BEER

AUTOREFERÁT DOKTORSKÉ DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUBSTANTIAL RESULTS OF DOCTORAL THESIS

BRNO 2013

ING. SYLVIE BĚLÁKOVÁ

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Chemie a technologie životního prostředí na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

Autor práce

AUTHOR

Ing. Sylvie Běláková

Vedoucí práce

SUPERVISOR

Doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

## **ABSTRAKT**

Vypracovaná disertační práce se zabývá problematikou mykotoxinů v pivovarských surovinách a pivu. Pozornost byla věnována především vybraným fusariovým mykotoxinům (deoxynivalenol, zearalenol, T-2 toxin a HT-2 toxin), ochratoxinu A a aflatoxinům B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>.

Náplní disertační práce bylo optimalizovat a validovat analytické metody pro stanovení výše uvedených mykotoxinů v pivovarských surovinách a v pivu. Pro separaci analytů byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně – spektrometrickou detekcí (HPLC-MS/MS) a metoda ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (UPLC/FLR).

Tyto analytické metody byly následně aplikovány při zmapování výskytu fusariových mykotoxinů ve sklizních sladovnického ječmene v České republice a v sladařském a pivovarském průmyslu při sledování úrovně kontaminace mykotoxiny.

Dále byly realizovány experimenty týkající se přepěňování piva, neboť primární gushing – přepěňování piva – souvisí stejně jako mykotoxiny s přítomností mikroskopických vláknitých hub v surovinách pro výrobu piva.

Práce, ve kterých jsou tyto metody podrobně uvedeny, jsou součástí disertace (**Příloha I – V**). Ze všech publikovaných výsledků je zřejmé, že výskyt mykotoxinů v obilovinách včetně ječmene je přirozený a nelze mu zcela zabránit ani při dodržení podmínek správné zemědělské praxe. Je známo, že určitý podíl mykotoxinů přítomných v kontaminovaném sladovnickém ječmeni může přejít díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem do finálního produktu – piva. Nalezené koncentrace mykotoxinů však nepředstavují významné zdravotní ohrožení spotřebitelů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ječmen, slad, pivo, mykotoxiny, LC-MS/MS, UPLC/FLR

## **ABSTRACT**

The presented thesis deals with the issue of mycotoxins in brewing materials and beer. Attention was devoted mainly to the selected fusarium mycotoxins (deoxynivalenol, zearalenol, T-2 toxin, and HT-2 toxin) ochratoxin A and aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>.

The aim of the thesis was to optimize and validate analytical methods for the determination of the above mentioned mycotoxins in the brewing materials and beer. Analytes were separated using high-performance liquid chromatography with mass – spectrometric detection (HPLC-MS/MS) and ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detection (UPLC/FLR).

These analytical methods were then applied for mapping the occurrence of fusarium mycotoxins in malting barley crops in the Czech Republic and monitoring the level of contamination with mycotoxins in malting and brewing industries.

In addition, experiments studying over-foaming of beer were conducted as primary gushing – over-foaming of beer – is connected, similarly as mycotoxins, with the presence of microscopic filamentous fungi in the raw materials for beer production.

Studies describing in detail these methods are part of this thesis (**Annex I – V**). From all published results, it is evident that the occurrence of mycotoxins in cereals including barley is natural and cannot be completely prevented, not even if all conditions of correct agricultural practice are observed. It is known that some mycotoxins present in contaminated malting barley pass to the final product – beer due to their chemical and physical properties. However, the mycotoxin concentrations found do not mean any significant health risk for consumers.

## **KEYWORDS**

Barley, malt, beer, mycotoxins, LC-MS/MS, HPLC/FLR

# OBSAH

1 ÚVOD.....	6
2 MYKOTOXINY V PIVOVARSKÝCH SUROVINÁCH.....	7
2.1 Charakteristika mykotoxinů.....	7
2.2 Plísňe rodu <i>Fusarium</i> .....	7
2.3 Fusariové mykotoxiny.....	8
2.3.1 <i>Trichotheceny</i> .....	8
2.3.2 <i>Zearalenon</i> .....	9
2.4 Aflatoxiny .....	10
2.5 Ochratoxin A.....	10
2.6 Konjugované formy mykotoxinů .....	11
2.7 Technologie výroby sladu a piva .....	12
2.7.1 <i>Přenos mykotoxinů ze surovin do piva</i> .....	12
3 ANALÝZA MYKOTOXINŮ .....	13
3.1 Vzorkování.....	13
3.2 Extrakce vzorku .....	13
3.3 Přechištění vzorku.....	13
3.4 QuEChERS .....	14
3.5 Analytické metody .....	14
3.5.1 <i>Imunochemická metoda ELISA</i> .....	14
3.5.2 <i>Kapalinová chromatografie</i> .....	14
4 VYBRANÉ VÝSLEDKY DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	15
4.1 Ochratoxin A.....	15
4.2 Aflatoxiny .....	17
4.3 Fusariové mykotoxiny.....	19
4.4 Deoxynivalenol v pivu .....	21
4.5 Přepěňování piva a mykotoxiny.....	22
5 ZÁVĚR.....	24
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	26
7 ŽIVOTOPIS.....	30
8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	31
8.1 Impaktované publikace .....	31
8.2 Recenzované publikace.....	32
8.3 Příspěvky ve sborníku.....	33
8.4 Přednášky .....	37

# 1 ÚVOD

Pivo je slabě alkoholický nápoj, který se po staletí vyrábí z obilných sladů, vody a chmele za účasti pivovarských kvasinek. Ječmen setý je základní surovinou pro výrobu sladu v tradičních pivovarských zemích (Basařová et al., 2010). Složení mikroflóry zrna ječmene je ovlivňováno zejména geografickými a klimatickými vlivy, výživou, aplikací fungicidů, množstvím srážek od počátku metání do sklizně, odolností odrůd vůči poléhání, podmínkami během skladování ječmene a hotového sladu atd.

Na ječmeni se vyskytuje široké spektrum fytopatogenních hub, které napadají rostlinu během fází růstu, zrání, sklizně (*Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium*) a skladování (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*) (Bol et al., 1988; Niessen et al., 1992). Infekce ječmene těmito patogenními vláknitými mikromycetami vede k výnosovým ztrátám, snížení klíčivosti a sladovnické kvality zrna a v důsledku může způsobit i přepěňování piva - tzv. gushing (Oliveira et al., 2012; Sarlin et al., 2005).

Jako součást svého sekundárního metabolismu mohou patogenní plísně produkovat mykotoxiny. Mykotoxiny lze definovat jako přírodní produkty těchto plísní, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velmi malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxinogenními plísněmi potenciálně značně nebezpečná (Bennett J. W., 1987). Plísně rodu *Fusarium* jsou producenty fusariových mykotoxinů (trichotheceny, fumonisiny, zearalenon), plísně r. *Aspergillus* produkují zejména aflatoxiny a ochratoxin A je nejčastěji produkována plísněmi r. *Penicillium* a *Aspergillus* (Creppy E. E., 2002; Capriotti et al., 2010).

Vláknité houby představují významné bezpečnostní riziko pro pivovarský průmysl (Oliveira et al., 2012). Při skladování kontaminovaného ječmene vznikají výhodné podmínky pro rozvoj plísní a mykotoxinů (Papadopoulou et al., 2000; Wolf-Hall, 2007). V průběhu celého pivovarského procesu mohou mykotoxiny přejít z kontaminovaného ječmene do sladu a následně i do piva (Wolf-Hall, 2007; Bertuzzi et al., 2011). Mykotoxiny jsou velmi chemicky i tepelně stabilní sloučeniny, které není možné z kontaminovaných komodit zcela odstranit (Zöllner et al., 2006; Oliveira et al., 2012).

Vysoká toxicita mykotoxinů a jejich variabilní výskyt je předurčují k regulaci legislativou, tedy k nastavení maximálních limitů v jednotlivých potravinách a surovinách pro výrobu potravin (Capriotti et al., 2010). Maximální povolené limity vybraných mykotoxinů v potravinách jsou pro všechny členské státy EU stanoveny Nařízením komise (ES) č.1881/2006.

Pro stanovení mykotoxinů bylo popsáno velké množství analytických metod. Jako rychlá testovací (screeningová) metoda se nejčastěji používá imunochemická metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Moderní analytické metody pro stanovení mykotoxinů jsou založeny většinou na kapalinové chromatografii s UV, fluorescenční nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS) (Zöllner et al., 2006; Capriotti et al., 2010).

## 2 MYKOTOXINY V PIVOVARSKÝCH SUROVINÁCH

### 2.1 CHARAKTERISTIKA MYKOTOXINŮ

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, které patří mezi významné toxiny přírodního původu. Jejich název je kombinací řeckého výrazu pro houbu „mykes“ a latinského slova „toxicum“, které znamená jed (Žabka et al., 2002; Malíř et al., 2003).

Otravy způsobené mykotoxiny, mykotoxikózy, jsou popisovány již od starověku, i když jejich původ nebyl v té době znám. Mykotoxiny se, s ohledem na jejich všudypřítomnost, mohou vyskytovat na všech úrovních potravního řetězce člověka i hospodářských zvířat. Ke kontaminaci může docházet už v době pěstování obilovin na poli, stejně tak i během jejich skladování (Krska et al., 2001; Velíšek et al., 2009).

Z hlediska zdraví člověka má v celosvětovém měřítku největší význam pět mykotoxinů nebo jejich skupin, a to aflatoxiny, ochratoxin A (OTA), fumonisiny, trichotheceny a zearalenon (Polišenská et al., 2010).

Mykotoxiny představují skupinu sloučenin, jejichž molekulová hmotnost běžně nepřesahuje 1000 Da. Z chemického hlediska se mykotoxiny řadí mezi vysoce stabilní, nízkomolekulární organické sloučeniny nebílkovinné povahy (Ježková et al., 2009).

### 2.2 PLÍSNĚ RODU FUSARIUM

Mikroskopické vláknité houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny obilovin. Na území České republiky se jako nejčastější patogen vyskytuje *Fusarium graminearum*, dále převládají druhy *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. equiseti*. K produkci toxických metabolitů dochází především při napadení druhu *F. graminearum* a *F. culmorum* (Havránková et al., 2012). Optimální podmínky pro růst těchto vláknitých hub je teplota 11 – 23 °C a vlhkost 95 – 100 % (Placinta, 1999; Creppy, 2002; Malíř et al., 2003).

I když jsou mikromycety rodu *Fusarium* označovány jako „polní plísně“, za příznivých podmínek mohou růst také v průběhu skladování (Vaughan et al., 2005; Fakhrunnisa, 2006).

**Fusarium head blight (FHB)** je celosvětově rozšířené houbové onemocnění, které se vyskytuje nejčastěji u pšenice a ječmene. Spektrum symptomů fuzarióz je velmi pestré podle obilního druhu a podle napadené části obilní rostliny. Druhy *F. graminearum* a *F. culmorum* jsou nejvýznamnějšími původci tohoto onemocnění, jehož následkem je znehodnocení obilného zrna a možná tvorba fusariových mykotoxinů (Wolf-Hall, 2007).

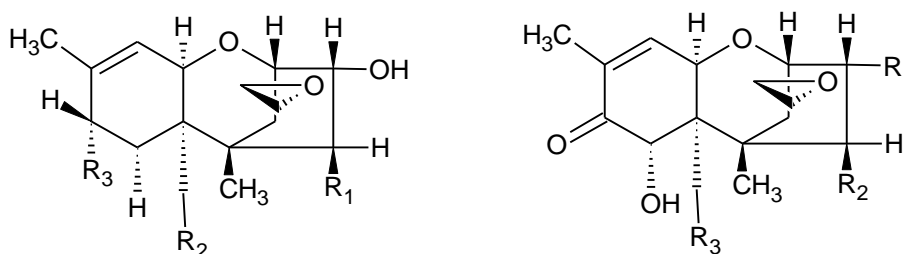
Kromě snížení kvality sladovnického ječmene může být výsledkem metabolické činnosti vláknitých mikromycet přepěňování piva, tzv. gushing, což je bouřlivé a nekontrolované přepěnění baleného piva. Napadení ječmene různými plísněmi především rodu *Fusarium* během fází růstu, zrání a sklizně je pokládáno za přímou

příčinu gushing (Hakanpaa et al., 2004; Sarlin et al., 2005; Shokribousjein et al., 2011). Obecně se má za to, že primární gushing je vyvolán přítomností tzv. hydrofobinů. Hydrofobiny jsou primární metabolity mikroskopických vláknitých hub. Jedná se o malé bílkoviny s molekulovou hmotností většinou mezi 7 a 15 kDa (Shokribousjein et al., 2011). Mezi přítomností mykotoxinů a přítomností hydrofobinů nebyl nalezen žádný vztah, gushing piva však může pro spotřebitele být upozorněním na přítomnost některých mykotoxinů (Sarlin et al., 2005; Shokribousjein et al., 2011).

## 2.3 FUSARIOVÉ MYKOTOXINY

### 2.3.1 Trichotheceny

Podle charakteristických funkčních skupin se trichotheceny rozlišují do čtyř podskupin, a to A, B, C a D (Velíšek et al., 2009; Zöllner et al., 2006).



Obr. 1: Strukturální vzorce trichothecenů typu A a B

Tab. 1: Funkční skupiny vybraných trichothecenů A a B (Hajšlová, 2010)

	Mykotoxin	R1	R2	R3
Typ A	HT-2	OAc	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	T-2	OH	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Typ B	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH
	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH

Trichothecenové mykotoxiny se nacházejí především v obilovinách (ječmen, pšenice, oves, kukuřice). Trichotheceny typu A a B jsou v obilovinách široce rozšířeny. Toxičtější trichotheceny typu C a D se vyskytují v potravinách a krmivech velmi zřídka (Zöllner et al., 2006).

#### *T-2 toxin a HT-2 toxin*

Z hlediska toxicity je T-2 nejzávažnější z trichothecenových mykotoxinů. Je významný svojí akutní toxicitou. Způsobuje onemocnění známé jako alimentární toxická alexie (ATA), dále kožní problémy doprovázené krvácivými ložisky



v oblasti hlavy a pohlavních orgánů pokusných zvířat (Hajšlová, 2008).

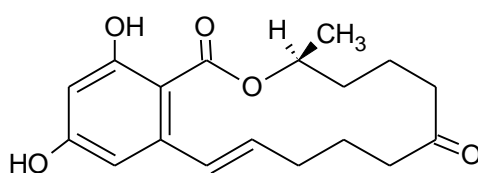
HT-2 je neacetylovaná forma T-2 toxinu (Pestka, 2007; Velíšek et al., 2009). V obilovinách se běžně vyskytují T-2 a HT-2 současně, jelikož jeden přechází v druhý. Oba toxiny patří mezi významné kontaminanty cereálií, především ovsa, žita, pšenice a ječmene. K hlavním producentům T-2 a HT-2 patří druhy plísní jako *Fusarium poae*, *F. sporotrichoides*, *F. equiseti* a *F. acuminatum* (Hajšlová, 2008).

### **Deoxynivalenol**

Jedním z dosud nejvíce sledovaných trichothecenů B je deoxynivalenol (DON). Významným producentem deoxynivalenolu je *Fusarium graminearum* (nepohlavní forma *Gibberella zeae*), který se uplatňuje především v teplejších oblastech (optimální teplota růstu je 25 °C). Dalším producentem je *F. culmorum*, který má nižší nároky na teplotu (optimum je 21 °C). Výskyt DON v cereáliích je meziročně velmi variabilní, závisí především na klimatických podmínkách v dané lokalitě, na typu předplodiny a na rezistenci dané odrůdy. V některých letech lze prokázat přítomnost tohoto mykotoxinu prakticky ve 100 % vyšetřovaných vzorků (Velíšek et al., 2009). Jde však naštěstí o jeden z nejméně toxických trichothecenů (Malíř et al., 2003; Velíšek et al., 2009). DON je často doprovázen acetylovanými izomery 3- a 15-acetyldeoxynivalenolem (ADONs), a také nivalenolem (NIV) (Pestka, 2007).

### **2.3.2 Zearalenon**

Zearalenon (ZON) je nesteroidní estrogení mykotoxin. Jeho významnými producenty jsou vláknité houby rodu *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. semitectum*). Z chemického hlediska se jedná o lakton kyseliny  $\beta$ -resorcylové. ZON je méně toxický než ostatní mykotoxiny, v případě jeho dostatečného množství se projevuje estrogenními účinky (Malíř et al., 2003; Zöllner et al., 2006; Velíšek et al., 2009).

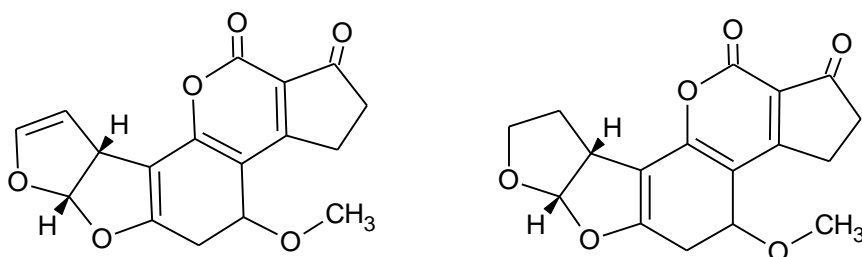


Obr. 2: Strukturální vzorec zearalenonu

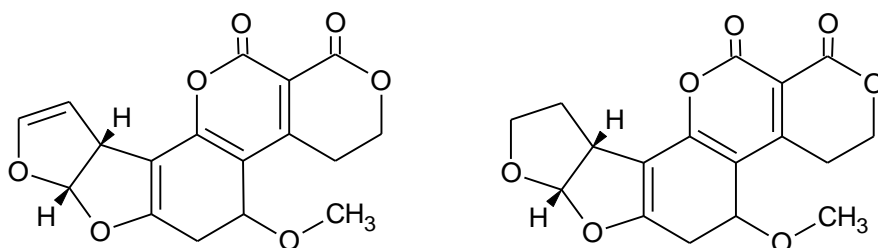
ZON je ve skladovaném obilí velmi stabilní, zůstává nezměněn i po tepelném zpracování mouky nebo fermentaci. Snadno dochází k jeho přenosu do cereálních výrobků, včetně chleba, sladu a piva. Vzhledem k tomu, že je ZON poměrně lipofilní, přechází také do rostlinných olejů, zejména klíčkových. Při zpracování obilovin na mouku se jeho obsah díky odstranění nejvíce kontaminovaných povrchových vrstev zrna v některých frakcích a produktech snižuje (Velíšek et al., 2009).

## 2.4 AFLATOXINY

Aflatoxiny jsou produkty toxigenních kmenů *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. argeniticus* a *A. nomius*. Za příznivých podmínek (vlhkost, teplota) jsou *A. flavus* a *A. parasiticus* schopny růst a tvořit aflatoxiny na téměř každém organickém substrátu, včetně všech zemědělských komodit (Malíř et al., 2003). Většinou se nalézají na různých nezpracovaných výrobcích, jako například obilniny, koření, všechny druhy ořechů, olejniny, fíky a sušené ovoce. Mezi více než dvaceti druhy aflatoxinů, které jsou známy, se pouze čtyři vyskytují v potravinách, a to aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>. Z chemického hlediska jde o deriváty difuranokumarinu. Nejčastěji se vyskytuje aflatoxin B<sub>1</sub>, který je nejvíce toxický a je nejsilnějším přírodním prokázaným karcinogenem (IARC, 1993; Velíšek et al., 2009). Kontaminace zemědělských produktů aflatoxiny jsou problémem zejména v tropických zemích, ale také v jižní a středozápadní části USA. Stres rostlin, nedostatečné usušení po sklizni a následné uskladnění při relativně vysoké teplotě a vlhkosti jsou hlavní důvody kontaminace. Obiloviny určené k lidské spotřebě (ječmen, žito, rýže a oves) nejsou hlavním zdrojem dietární expozice aflatoxiny, pokud jsou uskladněny ve vhodných podmínkách a nedojde k sekundární kontaminaci (Malíř et al., 2003).



Obr. 3: Strukturální vzorce aflatoxinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>



Obr. 4: Strukturální vzorce aflatoxinů G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>

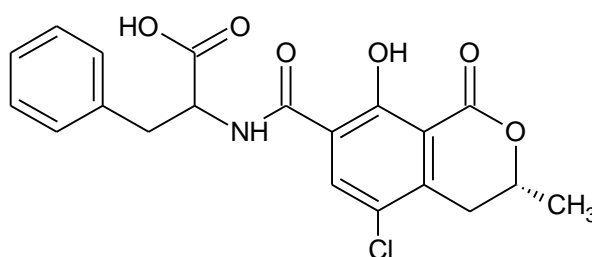
## 2.5 OCHRATOXIN A

Ochratoxiny jsou produkovány v tropických a subtropických oblastech vláknitými toxinogenními houbami rodu *Aspergillus*, zejména *A. ochraceus*. V chladnějších klimatických pásmech Evropy jsou významnými producenty ochratoxinů vláknité houby rodu *Penicillium*, především *P. verrucosum* (Velíšek et al., 2009).

Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším mykotoxinem ze skupiny ochratoxinů je

ochratoxin A (OTA). Mezi hlavní toxické účinky OTA patří nefrotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita a neurotoxicita. Tyto účinky byly experimentálně potvrzeny u zvířat a lze je proto předpokládat i u člověka (Mateo et al., 2007). OTA se chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Cílovými orgány působení OTA jsou zejména orgány rychlé přeměny – ledviny a játra. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) hodnotí OTA jako možný karcinogen pro člověka (IARC, 1993).

OTA se vyskytuje v řadě komodit jak rostlinného, tak i živočišného původu (Malíř et al., 2003; Zöllner et al., 2006). Za hlavní zdroje OTA v potravinách jsou pokládány obiloviny (ječmen, žito, oves, pšenice, rýže, kukuřice) a výrobky z nich (Kabak, 2009), dále vinné hrozny a produkty z nich – víno, vinná šťáva a vinný ocet, a rovněž káva, luštěniny, koření a zelený čaj. OTA je zřejmě jediným mykotoxinem, na jehož dietárním příjmu se významněji podílejí i potraviny živočišného původu (Velíšek et al., 2009).

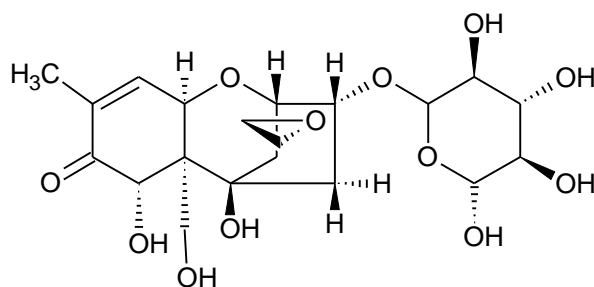


Obr. 5: Strukturální vzorec ochratoxinu A

## 2.6 KONJUGOVANÉ FORMY MYKOTOXINŮ

Mykotoxiny mohou být stejně jako ostatní xenobiotika částečně metabolizovány za vzniku konjugovaných forem mykotoxinů. Většinou se jedná o konjugáty se sacharidy, které vznikají v průběhu detoxikačního procesu rostlin (Endelhardt, 1999; Berthiller et al., 2007; Hajšlová, 2010).

Nejznámějším a dosud nejprobádanějším konjugátem trichothecenů je deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid (D3G). Relativně vysoké koncentrace D3G byly zjištěny ve sladu, pivu a dalších fermentovaných cereálních výrobcích, kdy molární poměr DON/D3G u některých vzorků může být  $\geq 1$  (Velíšek et al., 2009). V současné době není možné říct, jestli D3G, jakožto detoxikační rostlinný produkt, vykazuje akutní toxicitu nebo zda se v těle může rozštěpit zpět na DON (Berthiller et al., 2007; Berthiller et al., 2013). Nicméně Berthiller et al. (2013) uvádí, že D3G je odolný vůči kyselině chlorovodíkové, což naznačuje, že nebude hydrolyzován v žaludku savců a nerozštěpí se zpět na mykotoxin DON. Jiné studie prokázaly částečné štěpení D3G střevními bakteriemi na DON (Berthiller et al., 2013).



Obr. 6: Strukturální vzorec deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosidu

## 2.7 TECHNOLOGIE VÝROBY SLADU A PIVA

V České republice jsou základními surovinami pro výrobu sladu ječmen (*Hordeum vulgare*) a voda (Kosař et al., 2000).

### 2.7.1 Přenos mykotoxinů ze surovin do piva

Výroba sladu - řízené klíčení obilných zrn - je komplexní biologický proces, který zahrnuje širokou škálu biochemických a fyziologických reakcí (Laitila, 2007). Při sladování kontaminovaného ječmene vznikají výhodné podmínky pro rozvoj toxinogenních plísní (Papadopoulou et al., 2000; Wolf-Hall, 2007).

Při používání sladů kontaminovaných plísněmi nastávají změny ve složení meziproductů výroby piva. Plísně mohou produkovat proteázy, které povedou k vyššímu štěpení bílkovin ve sladině a mladině. To má negativní vliv na barvu, chuť, texturu a pěnivé vlastnosti vyrobeného piva (Wolf-Hall, 2007). Při zcezdování rmutu přechází část mykotoxinů do mláta, část zůstává ve sladině (Mateo et al., 2007; Bertuzzi et al., 2011).

Vzrůst DON a D3G (ale i dalších fusariotoxinů) během výroby sladu a piva může být až řádový a pravděpodobně souvisí s činností hydrolytických enzymů, které přispívají k uvolňování těchto mykotoxinů z jejich vazeb na polysacharidy, jako je např. škrob. Jejich koncentrace narůstá se vzrůstající dobou fermentace, resp. s obsahem alkoholu (Velíšek et al., 2009).

Plísně a jejich spóry se do piva dostat nemohou. Obecně se dá říci, že proces vaření piva funguje jako dekontaminační proces a nejpozději ve stádiu chmelovaru jsou plísně usmrceny. Část mykotoxinů díky své tepelné stabilitě tento proces přežije (Wolf-Hall, 2007; Scott, 1996). Existuje mnoho dalších faktorů, které mohou ovlivňovat koncentraci mykotoxinů v různých fázích sladování, jako je např. kmen plísně, koncentrace a životaschopnost plísně (zranění, dormance, smrt), umístění mycelia nebo spor a synergické nebo antagonistické vztahy mezi jednotlivými organismy. Výskyt plísní ve sladovnickém ječmeni má za následek změnu vlastností samotného ječmene tj. snížení klíčivosti ječmene, gushing, změnu barvy a pachů piva (Wolf-Hall, 2007).

Nejlepším řešením je proto pečlivá kontrola vstupních surovin a nepoužívání kontaminovaného zrna k přípravě sladu a vaření piva.

### 3 ANALÝZA MYKOTOXINŮ

Stanovení mykotoxinů lze obecně rozdělit na několik na sebe navazujících kroků:

- ✓ Vzorkování (odběr a úprava vzorků)
- ✓ Extrakce
- ✓ Přečištění
- ✓ Analytická metoda (identifikace mykotoxinů a jejich kvantifikace)

#### 3.1 VZORKOVÁNÍ

Vzorkování je obvykle vícestupňový proces, který začíná odběrem primárního vzorku a pokračuje jeho postupným zmenšováním až na laboratorní vzorek, který vstupuje do analytické laboratoře. Zde se z něho připraví analytický vzorek. Odběr vzorku, jeho další zmenšování a skladování musí probíhat způsobem, který neovlivní žádnou relevantní vlastnost vzorkovaného objektu. Největším úskalím při odběru vzorků je nehomogenita vzorkovaného materiálu (Malíř et al., 2003; Hajšlová, 2010). Turner uvádí, že 90 % chyb souvisejících s analýzou mykotoxinů je spojeno s jejich odběrem (Turner et al., 2009).

#### 3.2 EXTRAKCE VZORKU

Způsob extrakce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovovaného mykotoxinu, matrici, způsobu extrakce a rozpouštědle. K uvolnění analytu (mykotoxinu) z matrice se extrakční činidlo volí podle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Nejčastěji se k extrakci používá směs acetonitrilu s vodou nebo směs methanolu s vodou (Zöllner et al., 2006; Turner et al., 2009).

Přímé stanovení mykotoxinů ve vzorcích rostlinného původu bez jejich předchozí úpravy je vzhledem ke složitosti matrice velmi obtížné. Ječmen, slad i pivo jsou komplikovanou matricí, proto je velmi důležitá extrakce a čištění vzorku před samotnou analýzou.

#### 3.3 PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU

Přečištění vzorku slouží k odstranění interferujících látek. V současnosti se k přečištění extraktu nejčastěji používají:

*Imunoafinitní chromatografie (IAC)* - Metoda používaná pro svoji vysokou specifitu, menší spotřebu organických rozpouštědel a menší časovou náročnost.

Princip metody spočívá v tom, že přefiltrovaný a zředěný extrakt mykotoxinu ve směsi s vodným rozpouštědlem se nechá pomalu procházet imunoafinitní kolonkou. V této fázi dojde k reverzní specifické interakci mezi protilátkami v kolonce a mykotoxinem v extraktu. Po promytí kolonky speciálním promývacím pufrům je mykotoxin v procesu desorpce z kolonky eluován rozpouštědlem velké eluční síly (methanol, okyselený methanol atd.) (Malíř et al., 2003; Senyuva et al., 2010).

*Extrakce tuhou fází (SPE)* – je velmi výkonná technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Sorbent je z různých nepolárních, středně polárních a polárních materiálů na bázi modifikovaného silikagelu, polymeru nebo křemičitanu hořečnatého.

Princip této metody spočívá:

- ✓ v zachycení mykotoxinu na sorbentu a desorpci nečistot
- ✓ v zachycení matrice na sorbentu a desorpci přečištěného mykotoxinu

### **3.4 QUECHERS**

Extrakční metoda QuEChERS (akronym ze slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) je rychlou moderní metodou, kdy je v jednom kroku provedena jak extrakce vzorku, tak jeho přečištění od matricových efektů. Tato metoda byla původně používána pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách a v dalších složitých maticích. Nyní se její modifikované varianty používají pro multireziduální analýzu mykotoxinů ve spojení s LC-MS/MS.

### **3.5 ANALYTICKÉ METODY**

#### **3.5.1 Imunochemická metoda ELISA**

Ke stanovení mykotoxinů existuje velké množství analytických metod. Jako rychlá testovací (screeningová) metoda se nejčastěji používá imunochemická metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Metoda ELISA je založena na reakci antigenu s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky (Malíř et al., 2003).

Tato imunochemická metoda je velmi často používaná především pro svoji nenáročnost na obsluhu a nízkou cenu. V letech 2006 a 2007 byl metodou ELISA sledován výskyt DON, ZON a T-2 v obilovinách v Litvě (Mankevičiene et al., 2011), v roce 2011 výskyt DON, ZON, fumonisinů a T-2 v obilovinách ze sklizně v Chorvatsku (Pleadin, 2013), v roce 2009 byl metodou ELISA sledován výskyt DON a ZON v pivech (Kuzdralski, 2013).

#### **3.5.2 Kapalinová chromatografie**

Moderní analytické metody pro stanovení mykotoxinů jsou založeny většinou na kapalinové chromatografii s UV, fluorescenční nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS) po předchozím přečištění sledované matrice přes imunoafinitní nebo SPE kolonky (Zöllner et al., 2006; Krska et al., 2001; Capriotti et al., 2010; Benešová et al., 2012; Běláková et al., 2011; Senyuva et al., 2010).

V posledních letech se zájem při analýze mykotoxinů přesouvá z detekce jednoho analytu k multimetodám. Modifikované varianty extrakční metody QuEChERS se často používají pro multireziduální analýzu mykotoxinů ve spojení s LC-MS/MS (Tamura et al., 2011; Rubert et al., 2012; Arroyo-Manzanares et al., 2013).

## 4 VYBRANÉ VÝSLEDKY DIZERTAČNÍ PRÁCE

### 4.1 OCHRATOXIN A

#### *Analýza ochratoxinu A metodou UPLC/FLR*

Ječmen, slad i pivo jsou komplikované matrice, pro které je velmi důležitá příprava a čištění vzorku před samotnou analýzou. Byla optimalizována metoda extrakce ochratoxinu A z různých matic pomocí imunoafinitní kolonky Ochraprep a vyvinuta a validována analytická metoda UPLC s fluorescenční detekcí.

Pro analytické stanovení OTA byl použit kapalinový chromatograf Acquity UPLC ve spojení s fluorescenčním detektorem, ovládací software Empower (Waters, USA). Separace byla provedena na chromatografické koloně Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 µm) pomocí gradientové eluce. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril (ACN) a deionizovaná voda okyselená na pH 2,0 pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Separace byla provedena při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,3 ml.min<sup>-1</sup> a nástřiku 10 µl. Excitační a emisní vlnová délka byly 335 a 440 nm. Délka analýzy byla 5 minut. Metoda byla validována.

Tab. 2: Vybrané validační parametry

Matrice	LOD	LOQ	Výtěžnost %	RSD %
Ječmen, slad	0,05 µg.kg <sup>-1</sup>	0,2 µg.kg <sup>-1</sup>	82	8,0
Chmel	0,16 µg.kg <sup>-1</sup>	0,5 µg.kg <sup>-1</sup>	-	-
Pivo	0,3 ng.l <sup>-1</sup>	1,0 ng.l <sup>-1</sup>	95	5,3

Pro analytické stanovení jsme měli možnost použít i metodu HPLC s hmotnostně – spektrometrickou detekcí, ale použitím UPLC/FLR bylo možno získat výsledky v podstatně kratším čase ve srovnání s klasickou HPLC. Z důvodu vysoké selektivity fluorescenčního detektoru jsme dosáhli i nižších detekčních limitů.

Metoda je velmi jednoduchá a rychlá a je vhodná pro rutinní kontrolu pivovarských surovin, meziproductů i finálního výrobku v celém technologickém procesu výroby piva.

#### *Monitoring OTA*

Pomocí nově zavedené metody byly postupně analyzovány vzorky sladovnického ječmene, sladu a chmele pocházející z různých oblastí ČR a dále pak piv domácí i zahraniční provenience zakoupených v tuzemské obchodní síti. Vzorky byly rozčleněny do 3 kategorií: (i) pivovarské suroviny (ječmen, slad, chmel); (ii) změna obsahu OTA při výrobě sladu a piva; (iii) OTA v pivu.

**(i) Pivovarské suroviny:** Vzorky sladovnického ječmene, sladu a chmele byly analyzovány postupně v průběhu let 2008 – 2009.

Tab. 3: Výskyt OTA v pivovarských surovinách

Analyzovaný vzorek	Celkem vzorků/ pozitivních	% pozitivních	Nalezené hodnoty [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]
Ječmen	39/1	2,6	0,3
Slad	58/1	1,7	0,7
Chmel	5/1	20,0	0,6

Žádná z nalezených hodnot nedosahovala maximálních limitů nařízení (ES) č.1881/2006, kdy pro OTA v nezpracovaných obilovinách platí  $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  a slad  $3,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**(ii) Změna obsahu OTA při výrobě sladu a piva:** K sledování přechodu mykotoxinu OTA z ječmene do piva byly vybrány 2 odrůdy sladovnického ječmene (Bojos a Sebastian) v ošetřené a neošetřené variantě. Odrůdy pocházely ze zkušební stanice Hrubčice. Slady byly vyrobeny v mikrosladovně Sladařského ústavu v Brně dle metodiky MEBAC. Piva byla připravena ve VÚPS v Praze klasickým dekokčním způsobem (JACOB, 2011). Byla sledována dynamika přechodu ječmen – slad – sladina – mladina – pivo. V žádném ze vzorků ječmene, sladu a mladiny nebyl detekován OTA. Ve vzorcích sladiny odrůdy Sebastian byl nalezen OTA v koncentraci  $12,6 \text{ ng.l}^{-1}$ . V pivu z této odrůdy nebyl OTA nalezen. V pivu odrůdy Bojos byl nalezen OTA v koncentraci 7,6 a  $13,0 \text{ ng.l}^{-1}$ .

**(iii) Pivo:** Vzorky piv pocházely z obchodní sítě ČR. Jednalo se o piva světlá, tmavá, nealkoholická a speciální. Celkem bylo analyzováno 115 piv. 39 % všech piv bylo kontaminováno mykotoxinem OTA.

Tab. 4: Výskyt OTA v pivech

Pivo	Celkem vzorků/ pozitivních	% pozitivních	Min. [ $\text{ng.l}^{-1}$ ]	Max. [ $\text{ng.l}^{-1}$ ]
Světlé	72/30	41,7	1,0	243,8
Tmavé	18/8	44,4	2,2	47,8
Speciální	10/4	40,0	1,8	45,0
Nealkoholické	15/5	33,3	1,4	50,8

Maximální hodnota pro výskyt OTA v pivu nebyla evropskou legislativou stanovena. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil v roce 2006 tolerovatelný týdenní příjem (TWI) pro OTA  $120 \text{ ng.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti.

TWI je dávka, kterou může spotřebitel přijmout během každého týdne svého života bez výrazného zvýšení poškození zdraví. Nejvyšší koncentrace OTA v pivu,



kteřá byla během této studie na našem pracovišti naměřena, činila 243,8 ng.l<sup>-1</sup>. Při vypití 0,5 l tohoto piva by byl konzument exponován dávkou 121,9 ng OTA. Průměrný muž, vážící 83 kg by takto přijal 1,2 % z TWI.

## 4.2 AFLATOXINY

### *Analýza aflatoxinů metodou HPLC-MS/MS*

Byla optimalizována metoda extrakce aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> z ječmene, sladu, chmele a piva pomocí imunoafinitní kolony Aflaprep a metoda extrakce pivovarských kvasinek a mláta pomocí SPE kolony MycoSep 226 Aflazon. Byla optimalizována analytická metoda HPLC-MS/MS.

Pro analytické stanovení aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> v pivovarských surovinách a pivu byl použit kapalinový chromatograf Surveyor ve spojení s hmotnostním detektorem LCQ Advantage za použití ionizace elektrosprejem (ESI) v kladném módu, ovládací software Xcalibur (Thermo-Fisher, USA). Separace byla provedena na chromatografické koloně Synergi Hydro RP 80A (150 mm x 3,0 mm, velikost částic 4,0 μm) pomocí izokratické eluce. Jako mobilní fáze byl použit methanol (MeOH) a 10mM octan amonný 50/50 (v/v). Separace byla provedena při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,3 ml.min<sup>-1</sup> a nástřiku 25 μl. Délka analýzy byla 13 minut.

Tab. 5: Meze detekce (LOD) a meze stanovení (LOQ) sledovaných matic

Matrice	LOD				LOQ			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Ječmen [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,04	0,08	0,08	0,12	0,13	0,26	0,25	0,39
Chmel - granule [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,08	0,16	0,15	0,23	0,25	0,52	0,51	0,78
Slad [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,04	0,08	0,08	0,12	0,13	0,26	0,25	0,39
Chmel – pasta [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,19	0,39	0,38	0,58	0,64	1,29	1,27	1,94
Kvasnice [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,04	0,08	0,08	0,15	0,13	0,26	0,25	0,39
Mláto [μg.kg <sup>-1</sup> ]	0,04	0,08	0,08	0,15	0,13	0,26	0,25	0,39
Pivo [μg.l <sup>-1</sup> ]	1,5	3,1	3,1	4,7	5,1	10,3	10,2	15,2

Metoda byla validována. Jednotlivé vzorky ječmene, sladu a piva byly uměle obohaceny aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> ve 3 různých koncentračních hladinách, vzorky granulovaného chmele, pivovarských kvasinek a mláta ve 2 hladinách

Tab. 6: Validační parametry ječmene a sladu

Matrice	Analyt	Výtěžnost (%) ± RSD		
		Koncentrační hladina 1,0 µg.kg <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 0,5 µg.kg <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Koncentrační hladina 2,0 µg.kg <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 1,0 µg.kg <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Koncentrační hladina 4,0 µg.kg <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 2,0 µg.kg <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>
Ječmen, slad	B <sub>1</sub>	97,7 ± 18,6	83,1 ± 8,8	75,5 ± 16,7
	B <sub>2</sub>	98,1 ± 16,2	103,2 ± 19,9	88,3 ± 12,7
	G <sub>1</sub>	91,8 ± 11,6	81,4 ± 11,9	88,9 ± 11,0
	G <sub>2</sub>	117,0 ± 25,0	87,8 ± 29,3	90,8 ± 15,8

Tab. 7: Validační parametry piva

Matrice	Analyt	Výtěžnost (%) ± RSD		
		Koncentrační hladina 0,04 µg.l <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 0,02 µg.l <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Koncentrační hladina 0,08 µg.l <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 0,04 µg.l <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Koncentrační hladina 0,16 µg.l <sup>-1</sup> B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 0,08 µg.l <sup>-1</sup> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>
Pivo	B <sub>1</sub>	98,0 ± 18,0	88,4 ± 16,3	87,0 ± 8,4
	B <sub>2</sub>	96,8 ± 14,9	84,3 ± 15,8	105,6 ± 14,8
	G <sub>1</sub>	96,8 ± 18,7	90,1 ± 10,3	80,6 ± 10,8
	G <sub>2</sub>	106,0 ± 17,8	103,6 ± 16,7	90,4 ± 18,8

### **Monitoring aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>**

Byl sledován výskyt aflatoxinů ve vzorcích sladovnického ječmene (61 vzorků), sladu (77 vzorků), chmele (54 vzorků), pivovarských kvasinek (12 vzorků), mláta (12 vzorků) a piva (117 vzorků). Všechny vzorky pocházely z různých oblastí EU. Celkem bylo analyzováno 333 vzorků.

Aflatoxin B<sub>1</sub>, který je prokázaným karcinogenem, byl nalezen ve 2 vzorcích sladovnického ječmene (3,3 %) v koncentraci 0,3 a 0,4 µg.kg<sup>-1</sup>; 1 vzorku sladu (1,3 %) v koncentraci 0,2 µg.kg<sup>-1</sup>; 1 vzorku pivovarských kvasinek (8,3 %) v koncentraci 0,2 µg.kg<sup>-1</sup>; 1 vzorku mláta (8,3 %) v koncentraci 0,4 µg.kg<sup>-1</sup> a 5 vzorcích piva (4,3 %) v koncentraci 5,0 – 10,6 µg.l<sup>-1</sup>. Aflatoxin B<sub>1</sub> nebyl nalezen v žádném vzorku chmele.

Ostatní aflatoxiny B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> (počítáno jako suma) byly nalezeny v 1 vzorku ječmene (1,6 %), 1 vzorku chmele (1,9 %), a 2 vzorcích piva (1,7 %), v koncentracích 1,1 µg.kg<sup>-1</sup>, 1,2 µg.kg<sup>-1</sup>, 15,4 ng.l<sup>-1</sup> a 31,0 ng.l<sup>-1</sup>.

Žádná z výše naměřených hodnot nedosahovala maximálních limitů nařízení (ES) č.1881/2006, kdy pro Aflatoxin B<sub>1</sub> v nezpracovaných obilovinách i sladu platí 2,0 µg.kg<sup>-1</sup> a sumu aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> 4,0 µg.kg<sup>-1</sup>. Pro obsah aflatoxinů v pivu nebyl maximální limit stanoven.

### 4.3 FUSARIOVÉ MYKOTOXINY

#### *Analýza fusariových mykotoxinů metodou HPLC-MS/MS*

Byla optimalizována metoda extrakce vybraných fusariových mykotoxinů DON, HT-2, T-2 a ZON ve sladovnickém ječmeni pomocí SPE kolonky PuriTox MultiToxin. Byla optimalizována analytická metoda HPLC-MS/MS.

Pro analytické stanovení vybraných fusariových mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni byl použit kapalinový chromatograf Surveyor ve spojení s hmotnostním detektorem LCQ Advantage za použití ionizace za atmosférického tlaku (APCI a ESI), ovládací software Xcalibur (Thermo-Fisher, USA). Separace byla provedena na chromatografické koloně Synergi Hydro RP 80A (150 mm x 3,0 mm, velikost částic 4,0 µm) pomocí gradientové eluce. Jako mobilní fáze byl použit methanol (MeOH) a octan amonný. Separace byla provedena při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,5 ml.min<sup>-1</sup> a nástřiku 25 µl. Byla použita ionizace APCI v záporném módu pro analyty DON a ZON a ionizace ESI v kladném módu pro T-2 a HT-2.

Analýza byla provedena v klasickém MS skenu v úzkém rozmezí hmot. Pro kvantifikaci byly použity 2 MRM přechody.

Tab. 8: Vybrané MS/MS parametry pro DON, ZON, HT-2 a T-2

Analyt	Prekurzorový ion	MRM 1	MRM 2
DON	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	355 → 295	355 → 265
ZON	[M+H] <sup>-</sup>	317 → 273	317 → 299
HT-2	[M+Na] <sup>+</sup>	447 → 345	447 → 285
T-2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	489 → 387	489 → 245

Metoda byla validována. Vzorek ječmene byl ve 3 opakováních a 3 různých koncentračních hladinách uměle obohacen DON, ZON, T-2 a HT-2. Mez detekce (LOD) a mez stanovení (LOQ) byla vypočítána s využitím poměru signálu a šumu.

Tab. 9: Vybrané validační parametry

Analyt	Koncentrační hladina [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]	Výtěžnost (%) $\pm$ RSD	LOD [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]
DON	20,0	103,0 $\pm$ 14,0	1,5	5,0
	100,0	87,8 $\pm$ 8,7		
	500,0	91,1 $\pm$ 10,3		
ZON	20,0	100,3 $\pm$ 4,0	1,5	5,0
	100,0	91,5 $\pm$ 11,2		
	200,0	85,2 $\pm$ 19,6		
HT-2	20,0	77,8 $\pm$ 5,6	1,5	5,0
	100,0	83,7 $\pm$ 9,4		
	200,0	71,5 $\pm$ 12,8		
T-2	20,0	82,3 $\pm$ 12,6	0,3	1,0
	100,0	85,7 $\pm$ 7,8		
	200,0	83,5 $\pm$ 19,9		

### ***Monitoring mykotoxinů DON, ZON, T-2 a HT-2 v ječmeni***

Byl sledován výskyt fusariových mykotoxinů ve 4 po sobě jdoucích sklizních sladovnického ječmene. Vzorke pocházely ze 14 krajů ČR a byly dodány k analýze samotnými pěstiteli. Pro monitoring byly vybrány mykotoxiny, u kterých je maximální limit legislativně ošetřen (DON, ZON), nebo je nastavení tohoto limitu v brzké době očekáváno ( $\Sigma$ T-2, HT-2).

Tab. 10: Výskyt fusariových mykotoxinů v ječmeni v letech 2008 - 2011

Sklizeň	DON		ZON			$\Sigma$ T-2, HT-2			
	Celkem/ positivní	%	Max. [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]	Celkem/ positivní	%	Max. [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]	Celkem/ positivní	%	Max. [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]
2008	85/47	55,3	407,5	85/5	5,9	21,1	85/28	32,9	86,6
2009	75/73	97,3	2213,5	75/18	24,0	59,4	75/33	44,0	145,0
2010	85/31	36,5	106,1	85/7	8,2	21,5	85/23	27,1	97,8
2011	80/62	77,5	985,9	80/27	33,8	47,9	80/32	40,0	53,4

V průběhu 4 po sobě jdoucích sklizních bylo analyzováno celkem 325 vzorků, z toho DON byl přítomen v 65,5 % vzorků, ZON v 17,5 % a společný výskyt T-2 a HT-2 v 35,7 %. Nejvíce kontaminovaná sklizeň byla v roce 2009, kdy byl DON nalezen v 97 % analyzovaných vzorků a u jednoho vzorku byl překročen maximální limit na obsah DON ( $2213 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

#### **4.4 DEOXYNIVALENOL V PIVU**

##### ***Extrakce DON z piva***

DON v pivu byl analyzován po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonku Donprep. 2 ml odplyněného vzorku piva bylo nanášeno přímo na imunoafinitní kolonku, k promytí byla použita deionizovaná voda. Eluce byla prováděna opakovaně (3x) 1,5 ml methanolu průtokem 1 kapky za sekundu nebo pomaleji. Vzorek byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 1 ml směsi methanol/voda 20/80 (v/v). Současně s DON byl z kolonky Donprep vyextrahován i Deoxynivalenol-3-glukosid (D3G), což je tzv. „maskovaná forma“ mykotoxinu DON. IA kolona Donprep není výrobcem deklarována pro extrakci tohoto metabolitu, nicméně je pro toto použití velmi selektivní. Výsledky D3G nejsou součástí přílohy.

##### ***Analytické stanovení DON v pivu metodou LC-MS/MS***

Pro analytické stanovení DON v pivu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS). Separace byla provedena na chromatografické koloně Synergi Hydro RP 80A (3,0 mm x 150 mm s velikostí částic 4,0  $\mu\text{m}$ ) pomocí gradientové eluce. Jako mobilní fáze byl použit methanol (MeOH) a 5mM octan amonný 50/50 (v/v). Separace byla provedena při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,5 ml.min<sup>-1</sup> a nástřiku 25  $\mu\text{l}$ . Byla použita ionizace APCI v záporném módu. Délka analýzy byla 13 minut.

Metoda pro stanovení DON v pivu byla validována. 3 vzorky piva ležáckého typu byly uměle obohaceny standardem DON ve 3 různých hladinách 20, 40 a 80 ng.ml<sup>-1</sup>. Byla připravena kalibrační křivka v rozmezí 2 – 500 ng.ml<sup>-1</sup>. Limit detekce (LOD) 0,6  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byl určen jako trojnásobek poměru výšky šumu a píku, limit stanovení (LOQ) 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  jako desetinásobek poměru výšky šumu a píku. Průměr výtěžnosti pro všechny hladiny byl v rozmezí 85 – 105 %. RSD nepřesáhla 15 %.

##### ***Piva z obchodní sítě ČR***

Pro stanovení byla nakoupena piva z obchodní sítě ČR. Jednalo se o piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky i piva nealkoholická. Celkem bylo analyzováno 119 piv. Deoxynivalenol byl nalezen u 74,8 % piv v rozmezí koncentrací 2,0 – 44,0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Průměrná hodnota obsahu DON byla v nealkoholických pivech 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ve světlých výčepních pivech 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ve tmavých výčepních pivech 5,4  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ve světlých ležácích 7,5  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a ve tmavých ležácích 9,9  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Tab. 11: Úroveň kontaminace pív DON

Pivo	Celkem	Počty vzorků podle koncentrací		
		<2.0 $\mu\text{g.l}^{-1}$	2-10 $\mu\text{g.l}^{-1}$	>10 $\mu\text{g.l}^{-1}$
Nealkoholické	16	7	7	2
Světlé výčepní	17	7	9	1
Tmavé výčepní	8	2	5	1
Světlý ležák	58	11	36	11
Tmavý ležák	20	3	10	7

Maximální hodnota pro výskyt DON v pivu nebyla evropskou legislativou stanovena. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil v roce 2006 tolerovatelný denní příjem (TDI) pro DON  $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti.

TDI je dávka, kterou může spotřebitel přijímat každý den života bez výrazného zvýšení poškození svého zdraví. Nejvyšší koncentrace deoxynivalenolu, která byla v této studii na našem pracovišti naměřena, činila  $44,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Při vypití 0,5 l tohoto piva bude spotřebitel exponován dávkou  $22,0 \mu\text{g}$  DON. Průměrný muž, vážící 83 kg by přijal 26,5 % z TDI.

#### 4.5 PŘEPĚŇOVÁNÍ PIVA A MYKOTOXINY

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit existenci vzájemného vztahu mezi přepěňováním piva a mykotoxiny. Jako zástupce mykotoxinů, kteří se vyskytují v pivu jsme vybrali DON a OTA, které jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium* a *Penicillium*.

Pro studii bylo vybráno 15 pív z obchodní sítě s obsahem DON v rozmezí  $2,0 - 19,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ . DON byl stanoven metodou HPLC-MS/MS. OTA byl stanoven metodou UPLC/FLR. Koncentrace OTA v analyzovaných pivech se pohybovala v rozmezí  $4,8 - 194,6 \text{ ng.l}^{-1}$ .

K dalším sledovaným parametrům jsme zařadili obsah šťavelanů v pivu. Kyselina šťavelová je složkou ječmene i sladu. Její zvýšený výskyt v pivu však může způsobit, zvláště ve formě šťavelanu vápenatého, tzv. “oxalátový zákal”, případně přepěňování piva – tzv. sekundární gushing (Shokribousjein et al., 2011). Koncentrace šťavelanů v pivech byla stanovena metodou kapilární izotachoforézy (Havlová et al., 1997). Nalezený obsah šťavelanů se pohyboval v rozmezí  $1,8 - 39,0 \text{ mg.l}^{-1}$ . Úroveň gushingu v pivech byla stanovena modifikovanou metodou Carlsberg (Christian et al., 2011). Naměřené hodnoty byly v rozmezí  $0 - 264 \text{ ml.500ml}^{-1}$ . Podle úrovně gushingu byla piva rozdělena do 3 skupin (viz. tab. 11):

I. skupina: obsahuje piva, která vykazovala nulový gushing a všechna prošla pasterizací. Dle (Shokribousjein, et al., 2011) ke snížení gushingu může přispět

pasterizace piva při 60 °C, díky které se zvyšuje vnitřní tlak v pivu a struktury hydrofobinových vrstev kolem nano bublinek v pivu se destabilizují. Zvýšený tlak vede k rozpuštění těchto mikroskopických bublinek a tím ke snížení gushingu. Koncentrace DON je v rozmezí 3,1 – 11,2  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , koncentrace OTA v rozmezí 4,8 – 118,8  $\text{ng.l}^{-1}$ . Obsah šťavelanů byl v rozmezí 10,6 – 33,4  $\text{mg.l}^{-1}$ . Piva, u kterých se koncentrace šťavelanů pohybuje nad 15  $\text{mg.kg}^{-1}$ , mohou vykazovat sekundární gushing, neboť při této koncentraci se šťavelan vápenatý v pivu vysráží. Tyto krystaly tvoří nukleační místa (tvorbu krystalových zárodků), které indukují uvolňování  $\text{CO}_2$ , což může vést k sekundárnímu gushingu (Shokribousjein, et al., 2011).

II. skupina: obsahuje piva s nízkým gushingem v rozmezí 1 – 9 ml.500 ml<sup>-1</sup>. Nejvyšší koncentrace DON (19,2  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) byla naměřena u tmavého ležáku. Toto pivo vykazovalo současně nejvyšší hodnotu šťavelanů (39,0  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Naměřený gushing byl pouze 7 ml. Nejvyšší koncentrace OTA (194,6  $\text{ng.l}^{-1}$ ) byla zjištěna u světlého ležáku s obsahem DON 12,6  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a gushingem 1 ml.500 ml<sup>-1</sup>.

III. skupina: obsahuje piva s gushingem v rozmezí 14 – 264 ml/500 ml. Nejnižší hodnotu DON (2,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) mělo pivo, u kterého byl naměřen gushing 50 ml. Jednalo se o tmavý nefiltrovaný ležák, který neprošel pasterizací. U tohoto piva byla zjištěna i nejnižší koncentrace šťavelanů (1,8  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Nejvyššího gushingu dosáhlo pivo, u kterého byla zjištěna nízká koncentrace DON (5,3  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), koncentrace OTA 27,7  $\text{ng.l}^{-1}$  a koncentrace šťavelanů 18,2  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Tab. 12: Piva z obchodní sítě 2011

	Počet vzorků	Gushing ml.500 ml <sup>-1</sup>	DON $\mu\text{g.l}^{-1}$	OTA $\text{ng.l}^{-1}$	Šťavelany $\text{mg.l}^{-1}$
I	5	0	3,1 – 11,2	4,8 – 118,8	10,6 – 33,4
II	5	1 - 9	3,9 – 19,2	5,0 – 194,6	12,7 – 39,0
III	5	14 - 264	2,1 – 7,1	27,7 – 130,5	1,9 – 24,1

Zcela v souladu s publikovanými pracemi (Sarlin, et al., 2005; Shokribousjein, et al., 2011) jsme došli k závěru, že není možné předpovídat gushing piva z přítomnosti mykotoxinů a naopak. Gushing piva může být pouze signálem pro spotřebitele na možnou přítomnost některých mykotoxinů.

Z výše uvedených nesourodých výsledků lze konstatovat, že problém přepěňování piva nelze řešit izolovaně. Jelikož je povaha gushingu mnohofaktorová, je nutné tento jev zkoumat v souvislostech.

## 5 ZÁVĚR

Za jeden z nejvýznamnějších zdrojů plísní a mykotoxinů jsou považovány obiloviny. Infekce sladovnického ječmene plísněmi je proto stálou hrozbou pro sladařský a pivovarský průmysl. Vede k výnosovým ztrátám, snížení klíčivosti a sladovnické kvality zrna a může způsobovat přepěňování piva. Některé patogenní plísně, zejména rody *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*, mohou produkovat jako součást svého sekundárního metabolismu mykotoxiny. K jejich produkci na kontaminovaném ječmeni může za vhodné vlhkosti a teploty docházet v průběhu růstu a dozrávání ječmene na poli, během skladování i během samotného procesu výroby sladu a piva. Úplné odstranění mykotoxinů z již kontaminovaného ječmene je velmi problematické, spíše nemožné. Je proto nezbytné se zabývat kvalitou všech vstupních surovin pro výrobu sladu a piva.

Náplní této disertační práce bylo zmapovat hladinu výskytu vybraných fusariových mykotoxinů (DON, ZON, T-2 a HT-2), aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> a ochratoxinu A ve sladovnickém ječmeni a dalších pivovarských surovinách a pivu pomocí nově zavedených analytických metod LC-MS/MS a UPLC/FLR.

Byla optimalizována a validována metoda HPLC-MS/MS pro stanovení DON, ZON, T-2 a HT-2 ve sladovnickém ječmeni. Touto metodou byl v letech 2008 – 2011 monitorován výskyt výše uvedených fusariových mykotoxinů ve sklizních sladovnického ječmene ve 14 krajích České republiky. Celkem bylo k analýze dodáno 325 vzorků sladovnického ječmene. Nejvyšší výskyt fusariových mykotoxinů byl zaznamenán ve sklizni z r. 2009, kdy byl DON nalezen u 97 % analyzovaných vzorků. Největší vliv na výskyt fusariových mykotoxinů má počasí v daném roce, samozřejmě i dodržování správné zemědělské praxe a v neposlední řadě i vhodné podmínky uskladnění. I když se plísně rodu *Fusarium* řadí k tzv. „polním“ plísním, mohou růst a produkovat mykotoxiny i v průběhu nevhodného uskladnění.

Byla vyvinuta metoda UPLC/FLR pro stanovení OTA ve sladovnickém ječmeni, vybraných meziproduktech výroby sladu a piva a pivu. Během let 2008 – 2009 byly touto metodou postupně analyzovány pivovarské suroviny, meziprodukty výroby a pivo. Bylo analyzováno 102 vzorků pivovarských surovin. OTA byl nalezen pouze v jednom vzorku ječmene, sladu a chmele v koncentracích 0,3, 0,7 a 0,6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Dále bylo analyzováno 115 piv z obchodní sítě ČR, z toho 39 % piv bylo kontaminováno OTA v koncentraci 1,0 – 243,8  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . V současné době je evropskou legislativou nastaven maximální limit pro výskyt OTA ve víně (2  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pro pivo tento limit dosud neexistuje.

Byla zavedena metoda HPLC-MS/MS pro stanovení aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> v pivovarských surovinách a pivu. V průběhu let 2008 – 2011 byly postupně analyzovány vzorky sladovnického ječmene, sladu, chmele, mláta, pivovarských kvasinek a piva z oblasti Evropské Unie. Aflatoxiny byly analyzovány v 216 vzorcích pivovarských surovin a meziproduktech výroby piva, aflatoxiny byly nalezeny v 3,2 % z nich. Dále bylo analyzováno 117 piv. Aflatoxiny v koncentracích



5,0 – 10,6 ng.l<sup>-1</sup> pro aflatoxin B<sub>1</sub> a 15,4 – 31,9 ng.l<sup>-1</sup> pro sumu aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> byly nalezeny v 5,1 % analyzovaných piv.

Byla zavedena metoda HPLC-MS/MS pro stanovení DON v pivu. V letech 2009 – 2012 bylo analyzováno 119 piv z obchodní sítě ČR. Jednalo se o piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky a nealkoholická. DON byl nalezen v 74,8 % z nich. Jeho obsah se pohyboval v rozmezí 2,0 – 44,0 µg.l<sup>-1</sup>.

Dále se tato práce okrajově zabývala přepěňováním piva, tzv. primárním gushingem, což je jev, který souvisí s metabolickou činností plísni. Gushing je dáván především laickou veřejností do souvislosti s mykotoxiny tj. „pokud pivo vykazuje gushing, jsou v něm přítomny i mykotoxiny“. Vědecké práce tuto hypotézu nepotvrzují a ani v naší studii se toto nepotvrdilo.

Závěrem lze říci, že základním předpokladem pro kvalitu piva je zajištění kvality vstupních surovin pro jeho výrobu a jejich pravidelná kontrola. Ačkoli mykotoxiny v pivovarských surovinách a pivu nepředstavují významné zdravotní ohrožení, je nutné jejich výskyt průběžně sledovat a chránit tak zdraví spotřebitele. Tuto kontrolu není možné realizovat bez citlivých analytických metod.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ARROYO-MANZANARES, N., GARCÍA-CAMPANA, A.M. AND GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in silybum marianum by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2013, Vol. 1282, pp. 11-19.

BASAŘOVÁ, G.; ŠAVEL, J.; BASAŘ, P.; LEJSEK, T. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. 1.vydání. Praha : Vydavatelství VŠCHT Praha, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*. May 2011, Vol. 126, 1, pp. 321-325.

BENEŠOVÁ, K.; BĚLÁKOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Control*. 2012, Vol. 25, 2, pp. 626-630.

BENNETT, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopatologia. *Mycopatologia*. 1987, Vol. 100, 1, pp. 3-5.

BERTHILLER, F.; CREWS, C.; DALL'ASTA, C.; DE SAEGAR, S.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; OSWALD, I. P.; SEEFELDER, W.; SPEIJERS, G.; STROKA, J. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013, Vol. 57, pp. 165-186.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, Vol. 119, 1-2, pp. 33-37.

BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; MULAZZI, A.; DONADINI, G.; PIETRI, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*. 2011, Vol. 22, pp. 2059-2064.

BOL, J., ANGELO, S.A. G.F. AND VERMEIRE, H. A. Cell-Sall degrading enzymes in malt of microbial origin. *Proc.Eur.Brew.Conv - Microbiology Group*. 1988, 142.

CAPRIOTTI, A. L.; FOGLIA, P.; GUBBIOTTI, R.; ROCCIA, C.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. 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*. 2010, Vol. 1217, pp. 6044-6051.

CHRISTIAN, MANUEL; TITZE, JEAN; ILBERG, VLADIMÍR; FRITZ, JACOB. Novel Perspectives in Gushing Analysis: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011, Vol. 117, 3, pp. 295-313.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 2002, Vol. 127, pp. 19-28.

ENGELHARDT, G., RUHLAND, M., WALLNÖFER, P.R. Metabolism of mycotoxins in plant. *Advances in Food Sciences*. 1999, Vol. 21, 3-4, pp. 71-78.

FAKHRUNNISA; HASMHI, M.H.; GHAFFAR, A. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan Journal of Botany*. 2006, Vol. 38, 1, pp. 185-192.

HAIŠLOVÁ, J. Kontaminace vybraných surovin mykotoxiny. [Online] 2010. [Citace: 20. 9 2012.] <http://www.phytosanitary.org/projekty/2010/Projekt1.pdf>.

HAIŠLOVÁ, J. Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování. [Online] 2008. [Citace: 26. 8 2012.] <http://www.phytosanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>.

HAKANPAA, J.; PAANANEN, A.; ASKOLIN, S.; NAARI-SETALA, T.; PARKKINEN, T.; PENTTILA, M.; LINDER, M. B. Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, Vol. 279, 1, pp. 534-539.

HAVLOVÁ, P. AND ŠUSTA, J. Stanovení kyseliny šťavelové ve sladu a pivu. *Kvasný prům*. 1997, Vol. 43, 2, pp. 37-38.

HAVRÁNKOVÁ, H. and OVESNÁ, J. Geny biosyntézy trichothecenů u rodu *Fusarium*. *Chemické listy*. 2012, Vol. 106, pp. 818-825.

IARC. International Agency for Research on Cancer. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon, France : IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993. Vol. 56, pp. 245-395.

JACOB, F. 2011. *MEBAK: Collection of the Brewing Analysis Methods*. Freising-Weihenstephan : s.n., 2011.

JEŽKOVÁ, A.; ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J.; DOHNAL, V.; POLIŠENSKÁ, I. Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi a HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu. *Chemické listy*. 2009, Vol. 103, pp. 679-683.

KABAK, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, Vol. 47, 2, pp. 348-352.

KOSAŘ, K. and PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. [ed.] F. Frantík. Praha : Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000. ISBN 80-902658-6-3.

KRSKA, R., BAUMGARTNER, S. and JOSEPHS, R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Journal of Analytical Chemistry*. 2001, Vol. 371, 3, pp. 285-299.

KUZDRALINSKI, A., SOLARSKA, E. and MUSZYNSKA, M. 2013. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control*. 2013, Vol. 29, 1, pp. 22-24.

LAITILA, A. Microbes in the tailoring of barley malt properties. *Academic dissertation in Microbiology*. Helsinki : s.n., 2007.

LUTTESCHMID, G.; MURANYI, M.; STUBNER, M.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Heterologous expression of surface-active proteins from barley and filamentous fungi in *Pichia pastoris* and characterization of their contribution to beer gushing. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, Vol. 147, pp. 17-25.

MALÍŘ, F. and OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. vydání. Brno : Mikada, 2003. ISBN: 80-7013-395-3.

MANKEVIČIENE, A.; BUTKUTE, B.; GAURILČIKIENE, I.; DABKEVIČIUS, Z.; SUPRONIENE, S. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*. 2011, Vol. 22, pp. 970-976.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E.M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, Vol. 119, 1-2, pp. 79-83.

NIESSEN, L.; DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; GEIGER, E.; VOGEL, H. Mykologische Untersuchungen und Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden. Gushing/ des Bieres. *Brauwelt*. 1992, Vol. 16/17, 702.

OLIVEIRA, P. M.; MAUCH, A.; JACOB, F.; WATERS, D.M.; ARENDT, E. K. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, Vol. 156, pp. 32-43.

PAPADOPOULOU, A., WHEATON, L. AND MULLER, R. The control of selected microorganisms during malting process. *Brewing Research International*. 2000, Vol. 106, 3, pp. 179-188.

PESTKA, J. J. Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*. 2007, Vol. 137, pp. 283-298.

PLACINTA, C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 1999, Vol. 78, pp. 21-37.

PLEADIN, J., VAHČIĆ, N., PERŠI, N., ŠEVELJ, D., MARKOV, K., FRECE J. *Fusarium* mycotoxins occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*. 2013, Vol. 32, pp. 49-54

POLIŠENSKÁ, I.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; HADJEBA, K.; DOHNAL, V.; JIRSA, O.; DENESOVÁ, O.; JEŽKOVÁ, A. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in Czech cereals and comparison of two HPLC methods for ochratoxin A detection. *Food Additives & Contaminants*. 2010, Vol. 27, 11, pp. 1545-1557.

RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta*. 2012, Vol. 99, pp. 712-719.

SARLIN, T.; NAKARI-SETALA, T.; LINDER, M.; PENTTILA, M.; HAIKARA, A. Fungal Hydrophobins as Predictors of the Gushing Activity of Malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, Vol. 111, 2, pp. 105-111.

SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the AOAC International*. 1996, Vol. 79, pp. 875-882.

SENYUVA, H. Z. and GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B*. 2010, Vol. 878, 2, pp. 115-132.

SHOKRIBOUSJEIN, Z.; DECKERS, S. M.; GEBRUERS, K.; LORGOUILLOUX, Y.; BAGGARMAN, G.; VERACHTERT, H.; DELCOUR, J. A.; ETIENNE, P.; ROCK, J. M.; MICHIELS, CH.; DERDELINCKX, G. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia*. 2011, Vol. 35, pp. 85-101.

TAMURA, M., UYAMA, A. AND MOCHIZUKI, N. Development of a Multi-mycotoxin Analysis in Beer-based Drinks by a Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*. 2011, Vol. 27, pp. 629-635.

TURNER, R. W., SUBRAHMANYAM, S. AND PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2009, Vol. 632, pp. 168-180.

VAUGHAN, A., SULLIVAN, T. O. AND SINDEREN, D. V. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, Vol. 111, 4, pp. 355-371.

VELÍŠEK, J. and HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II*. Havlíčkův Brod : nakladatelství OSSIS, 2009. ISBN: 978-80-86659-16-9.

WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, Vol. 119, 1-2, pp. 89-94.

ZÖLLNER, P. and MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, Vol. 1136, pp. 123-169.

ŽABKA, M. and JEGOROV, A. Návrat houby, jež dala vzniknout jménu trichothece. *Chemické listy*. 2002, Vol. 96, pp. 607-610.

## 7 ŽIVOTOPIS

### **Jméno a příjmení, titul:**

Sylvie Běláková, Ing.

### **Datum narození:**

13/4/1974

### **Vzdělání:**

*2010 – dosud*

Doktorské studium, VUT Brno, Fakulta chemická,  
obor Chemie a technologie ochrany životního prostředí

*1998 – 2004*

VUT Brno, Fakulta chemická,  
obor Potravinářská chemie a biotechnologie

### **Zaměstnání:**

*2007 – dosud*

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a.s.,  
Sladařský ústav, Brno

*2005 – 2007*

Státní rostlinolékařská správa,  
sekce přípravků na ochranu rostlin, Brno

*2004 – 2005*

Státní zdravotní ústav, Brno

### **Členství v odborných organizacích:**

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii (CSMS)

## 8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### 8.1 IMPAKTOVANÉ PUBLIKACE

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, J. ČÁSLAVSKÝ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Výskyt vybraných fusariových mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni v ČR ve sklizních z let 2008-2011. *Food Control*. V recenzním řízení

BENEŠOVÁ, K., I. HARTMAN, **S. BĚLÁKOVÁ** a R. MIKULÍKOVÁ. Charakteristika ječného sladu pomocí HPLC. *Chemické listy*. Přijato k tisku

BENEŠOVÁ, K., **S. BĚLÁKOVÁ**, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Control*. 2012, 25(2), 626-630. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.11.033.

MIKULÍKOVÁ, R., **S. BĚLÁKOVÁ**, K. BENEŠOVÁ a Z. SVOBODA. Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2012, 133, 55-59. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.12.061.

BENEŠOVÁ, K., H. PLUHÁČKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, K. VACULOVÁ, R. Mikulíková, J. EHRENBERGEROVÁ a N. BŘEZINOVÁ-BELCREDI. Využití moderní separační metody UPLC k analýze vitamínu E v zrně ječmene. *Chemické listy*. 2012, 106, 672-676.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2011, 126(1), 321-325. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.062.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, K. BENEŠOVÁ, I. MÁROVÁ a Z. NESVADBA, 2011. Optimization of modern analytical SPME and SPDE methods for determination of trans-2-nonenal in barley, malt and beer. *Chromatographia*. 2011, 73(Suppl 1), 157-161.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., J. EHRENBERGEROVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ** a K. VACULOVÁ. Antioxidant Vitamins in Barley Green Biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 11755-11761.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., J. EHRENBERGEROVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ** a VACULOVÁ, K. Barley grain as a source of health-beneficial substances. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27, 242-244.(IF 0,685)

## 8.2 RECENZOVANÉ PUBLIKACE

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA a J. ČÁSLAVSKÝ. Monitoring výskytu mykotoxinu deoxynivalenol v pivech z obchodní sítě v letech 2009 – 2012. *Kvasny prum.* 2013. Přijato k tisku

BENEŠOVÁ, K., **S. BĚLÁKOVÁ**, R. MIKULÍKOVÁ, a Z. SVOBODA. Přehled analytických metod pro stanovení fytové kyseliny. *Kvasny Prum.* 2013, 59(5), 127-133. ISSN 0023-5830.

EHRENBERGEROVÁ, J., Z. PROKOPCOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, R. CERKAL, H. PLUHÁČKOVÁ, K. VACULOVÁ a P. SMUTNÁ. Variabilita obsahu volné a celkové ferulové kyseliny v obilkách ječmene jarního. *Kvasny Prum.* 2012, 58(7-8), 201-208. ISSN 0023-5830.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Faktory ovlivňující gushing. *Kvasny Prum.* 2012, 58(3), 62-65. ISSN 0023-5830.

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ, a **S. BĚLÁKOVÁ**. Využití moderních analytických metod SPDE a TDAS při stanovení sirných těkavých látek. *Kvasny Prum.* 2011, 57(7-8), 231-235. ISSN 0023-5830.

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ** a I. MÁROVÁ. Sledování methioninu v českých a zahraničních pivech. *Kvasny Prum.* 2011, 57(1), 8-12. ISSN 0023-5830.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí. *Kvasny Prum.* 2010, 56(6), 266-269. ISSN 0023-5830.

MIKYŠKA A., J. PROKEŠ, **S. BĚLÁKOVÁ**, J. ŠKACH a D. HAŠKOVÁ. Vliv původu ječmene a technologie sladování na obsah ferulové kyseliny v ječmeni a sladu. *Kvasny Prum.* 2010, 56(3), 145-151. ISSN 0023-5830.

BENEŠOVÁ, K., S. MACUCHOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Stanovení obsahu šťavelové kyseliny v ječmeni a sladu pomocí RP-HPLC. *Kvasny Prum.* 2010, 56(5), 247-250. ISSN 0023-5830.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, K. BENEŠOVÁ, I. MÁROVÁ a Z. NESVADBA. Stanovení obsahu trans-2-nonenalu v zrně ječmene, sladu a pivu. *Kvasny Prum.* 2010, 56(11-12), 428-432. ISSN 0023-5830.

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ a **S. BĚLÁKOVÁ**. Stanovení methioninu ve sladu. *Kvasny Prum.* 2009, 55(11-12), 310-314. ISSN 0023-5830.



SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, K. BENEŠOVÁ a Z. NESVADBA. Stanovení obsahu lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilkách ječmene a sladu. *Kvasny Prum.* 2009, 55(11-12), 315-320. ISSN 0023-5830.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA a S. MACUCHOVÁ, S. Monitoring of ferulic acid content during the malt production, *Chem. Listy.* 2008, 102, 595-596, ISSN 1803-2389.

MIKULÍKOVÁ, R., **S. BĚLÁKOVÁ**, Z. SVOBODA a S. MACUCHOVÁ. Monitoring of sensorially active sulphur substances in malt and beer. *Chem. Listy.* 2008, 102, 265-1311. ISSN 1803-2389.

MIKULÍKOVÁ, R., **S. BĚLÁKOVÁ**, Z. SVOBODA a S. MACUCHOVÁ, S. Content of strobilurin fungicides in barely, malt, and beer, *Chem. Listy.* 2008, 102, 265.

JANOUSHKOVÁ, E., M. KRBŮŠKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, J. SLAVÍK, J., I. ŘEHŮŘKOVÁ, and J. RUPRICH. The monitoring of dietary exposure of Czech population to organochlorinated pesticides in 1994-2003, *Chem.listy.* 2005, 99, s2, s290-s292. ISSN 0009-2770.

JANOUSHKOVÁ, E., M. KRBŮŠKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, I. ŘEHŮŘKOVÁ, I. BORKOVCOVÁ and J. RUPRICH, J. The monitoring of dietary exposure of Czech population to indicator polychlorinated biphenyls in 1994-2003, *Chem.Listy.* 2005, 99, s2, s288-s290. ISSN 0009-2770.

ŘEHŮŘKOVÁ, I., J. SLAVÍK, **S. BĚLÁKOVÁ**, J. ČÁSLAVSKÝ, E. JANOUSHKOVÁ, M. KRBŮŠKOVÁ and J. RUPRICH. The determination of acrylamide in foodstuffs of food basket of Czech population by GC-MS. *Chem.Listy.* 2005, 99, s2, s304-s306. ISSN 0009-2770.

### 8.3 PŘÍSPĚVKY VE SBORNÍKU

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Mykotoxiny v pivovarských surovinách a v pivu. In: *Mykotoxiny 2012*. Bratislava, 2012, s. 88-90. ISBN 978-80-7080-829-0 (CZ1.07/2.400/31.0026)

BENEŠOVÁ, K., **S. BĚLÁKOVÁ**, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA. Vybrané fusariové mykotoxiny v ječmeni sladu. In: *Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii*. Hradec Králové, 2012. ISBN 978-80-905045-0-9 (CZ1.07/2.400/31.0026)

ČESLOVÁ, L., P. DINISOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, Z. ŠTENCLOVÁ, J. FISCHER, J. HPLC/MS analysis of polyphenolic compounds in herbs and evaluation of their

antioxidant capacity. In: *Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii*. Hradec Králové, 2012. ISBN 978-80-905045-0-9

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, **S. BĚLÁKOVÁ** a K. BENEŠOVÁ. Sledování akrylamidu v průběhu sladování a v pivu In: *XLII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Sborník příspěvků* [CD]. Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 2012. s. 135. ISSN 1802-1433.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ**, a K. BENEŠOVÁ. Stanovení obsahu lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene a ve sladu. In: *XLII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Sborník příspěvků* [CD]. Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 2012. s. 115. ISSN 1802-1433.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Is gushing in beer associated with mycotoxins? In: *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2012*. Olomouc, 2012, s. 76-77. ISBN 978-80-244-3115-4, ISSN 0232-0061.

BENEŠOVÁ, K., I. HARTMAN, R. MIKULÍKOVÁ a **S. BĚLÁKOVÁ**. Simultaneous determination of vitamin E, carotenoids and ergosterol in malt by RP-HPLC with photodiode-array and fluorescence detection. In: *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2012*. Olomouc, 2012, s. 78-79. ISBN 978-80-244-3115-4, ISSN 0232-0061.

MACHÁŇ, P., J. EHRENBERGEROVÁ, E. KLÍMOVÁ, E. ŠUBRTOVÁ, R. CERKAL, **S. BĚLÁKOVÁ** a K. VACULOVÁ. Variability of selected non-starch polysaccharides in grain of hull-less and hulled spring barley. In: *6th International Congress FLOUR-BREAD '11, 8th Croatian Congress of Cereal Technologists Proceedings*. Osijek, Croatia: PTFOS, ICC, 2012, s. 474-479. ISSN 1848-2562.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Simultaneous determination of ochratoxin A and aflatoxins in beer by liquid chromatography/mass spectrometry. In: *1. Konference České hmotnostní spektrometrie*. Hradec Králové, 2011, s. 44. ISBN 978-80-905045-0-9.

BENEŠOVÁ, K., **S. BĚLÁKOVÁ**, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Application of high performance liquid chromatography-mass spectrometry for identification of vitamin E isomers in hop. In: *1. Konference České hmotnostní spektrometrie*. Hradec Králové, 2011, s. 38. ISBN 978-80-905045-0-9.

**BĚLÁKOVÁ, S.**, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Selected fusarium mycotoxins in barley and malt. In: *5th International Symposium on Recent advances in food analysis: Book of Abstracts*. Praha, 2011, p. 283. ISBN 978-80-7080-795-8.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ a K. BENEŠOVÁ. Monitoring of acrylamide in the course of malting and in beer. In: *5th International Symposium on Recent advances in food analysis: Book of Abstracts*. Praha, 2011, p. 340. ISBN 978-80-7080-795-8.

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ a S. BĚLÁKOVÁ. Determination of sulphur amino acids in barley, malt and beer. In: *5th Meeting on Chemistry and Life*. Brno, Proceedings. Chemické Listy 105. (S), 2011, p. 1021. ISSN 0009-2770

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ a K. BENEŠOVÁ. Stanovení obsahu trans-2-nonenalu v zru ječmene, sladu a pivu. In: *XLI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Sborník příspěvků* [CD]. Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem. 2011, p. 86. ISSN 1802-1433.

MIKULÍKOVÁ R., Z. SVOBODA, S. BĚLÁKOVÁ a K. BENEŠOVÁ. Identifikace odrůd ječmene doporučených pro České pivo In: *XLI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Sborník příspěvků* [CD]. Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem. 2011, p. 165. ISSN 1802-1433.

BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Monitoring of changes in ferulic acid content in the brewing materials and beer. In: *International symposium advances in chromatography and electrophoresis: CHIRANAL 2010*. Olomouc, 2010, s. 76-77. ISBN 978-244-2470-5ISSN 0232-0061.

BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Stanovení ochratoxinu A v pivovarských surovinách a pivu. In: *Mykotoxiny 2010*. Praha, 2010, s. 41-43. ISBN 978-80-7080-764-4.

BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ A Z. SVOBODA. Development of Methods for the Determination of the Selected Antioxidants in Cereals. In: *10th international nutrition & diagnostics conference*. Praha, 2010, s. 94, ISBN 978-80-7395-257-0.

BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ A Z. SVOBODA. Determination of ferulic acid content in selected cereals by the UPLC – PDA method. In: *Vitamins, nutrition, diagnostics 2009: the abstract Book*. Brno, 2009, p. 134. ISBN 978-8-7318-809-2.

BENEŠOVÁ, K., S. BĚLÁKOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA, R. ŠULOVÁ. Comparison of the content of health beneficial substances in various cereals. In: *Vitamins, nutrition, diagnostics 2009: Book of Abstracts*. Brno, 2009, p. 150. ISBN 978-8-7318-809-2.

**BĚLÁKOVÁ, S., Z. SVOBODA, R. MIKULÍKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Monitoring of ochratoxin a content in beers from retail stores using the UPLC/FLR method. In: *4th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS: Book of abstracts*. Praha, 2009, p. 378, ISBN 978-80-7080-726-2.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, R., **S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Modern analytical method for the analysis of sulphur flavon in malt and beer. In: *4<sup>th</sup> International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS: Book of abstracts*. Praha, 2009, p. 529. ISBN 978-80-7080-726-2.

**BĚLÁKOVÁ, S., Z. SVOBODA, R. MIKULÍKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Determination of trichothecene levels in barley and malt by high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. In: *27th Informal Meeting on Mass Spectrometry*. Retz, Austria, 2009, p. 46. ISBN 978-3-200-01508-1.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Use of the GC-MS method for monitoring strobilurine residues in barley, malt and beer. In: *27th Informal Meeting on Mass Spectrometry*. Retz, Austria, 2009, p. 73. ISBN 978-3-200-01508-1.

BENEŠOVÁ, K., **S. BĚLÁKOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA.** Application of high-performance liquid chromatography - mass spectrometry for identification of tocopherols and tocotrienols in barley and malt. In: *27th Informal Meeting on Mass Spectrometry*. Retz, Austria, 2009, p. 39. ISBN 978-3-200-01508-1.

SVOBODA, Z., R. MIKULÍKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Use of the new SLB-IL 100 Capillary Column for the Determination of Fatty Acids in Barley and Malt. In: *8<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences: Book of Abstracts*. Siófok, Hungary, 2009, p. 208. ISBN 978-963-06-7878-0.

MIKULÍKOVÁ, R., **S. BĚLÁKOVÁ, Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ.** Use of the UPLC-FLR method for monitoring of ochratoxin A in Wine. In: *Mykotoxíny 2009*. Bratislava, 2009, p.83-87, ISBN 978-80-7080-730-9.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., J. EHRENBERGEROVÁ, R. CERKAL, I. PAULÍČKOVÁ, **S. BĚLÁKOVÁ, K. VACULOVÁ.** Barley green biomass – source of antioxidants. In: *Book II of Proceedings of the Euro food chem XXV. Denmark: Determination of Life Sciences*. 2009, University of Copenhagen, p. 224-227. ISBN 978-87-993033-5-9.

**BĚLÁKOVÁ, S., S. MACUCHOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA.** Monitoring of levels of selected vitamins in barley caryopsis and products of its processing. In: *Vitamins Nutrition and Diagnostics 2008: The Abstract Book*. Zlín, 2008, p.135. ISBN 978-80-7318-708-8.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., J. EHRENBERGEROVÁ, Z. PROKOPCOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ. Ferulic acid in barley grain. In: *Vitamins Nutrition and Diagnostics 2008: The abstract Book*. Zlín, 2008, p. 146-147. ISBN 978-80-7318-708-8.

MACUCHOVÁ, S., S. BĚLÁKOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA. Z. The effects of fungal infection and fungicide treatment on the level of selected substances detrimental to health in a barley-malt-beer chain. In: *Vitamins Nutrition and Diagnostics 2008: The abstract Book*. Zlín, 2008, p. 146-147. ISBN 978-80-7318-708-8.

BĚLÁKOVÁ, S., MIKULÍKOVÁ, R., SVOBODA. Z., S. MACUCHOVÁ. Monitoring of changes of ferulic acid content in brewing materials using the UPLC method with PDA detektor. In: *14th International Symposium on Separation Science: Book of abstracts*. Primošten, Croatia, 2008, s. 112. ISBN 978-953-6894-36-9.

BĚLÁKOVÁ, S., R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA. S. MACUCHOVÁ. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in Brewing Materials Using the UPLC Method with FLR Detector. In: *14th International Symposium on Separation Science: Book of abstracts*. Primošten, Croatia, 2008, s. 113. ISBN 978-953-6894-36-9.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., S. BĚLÁKOVÁ, J. EHRENBERGEROVÁ, K. VACULOVÁ, K. Plant genetic resources of barley for antioxidants. In: *Modern variety breeding for present and future needs*. 1. vyd. Valencia, Spain: Editorial Universidad Politécnica de Valencia. 2008, s. 547. ISBN 978-84-8363-302-1.

MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, Z., S. BĚLÁKOVÁ, S. MACUCHOVÁ. Comparison of Modern Analytical Methods for the Analysis of Sulphur Flavors in Malt and Beer. In: *14th International Symposium on Separation Science: Book of abstracts*. Primošten, Croatia, 2008, s. 94. ISBN 978-953-6894-36-9.

MACUCHOVÁ, S., S. BĚLÁKOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA. Determination of Oxalic Acid Content in Brewing Materials with RP-HPLC. In: *14th International Symposium on Separation Science: Book of abstracts*. Primošten, Croatia, 2008, s. 171. ISBN 978-953-6894-36-9.

#### 8.4 PŘEDNÁŠKY

S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA. Mycotoxins in brewing materials and beer. Conference Mykotoxiny 2012, 18. - 19. 10. 2012, Bratislava

**S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA.** Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer. Konference mykotoxiny 2010, 14. 10. 2010, Praha

**S. BĚLÁKOVÁ, K. BENEŠOVÁ.** Zdravotně významné látky v pivovarských surovinách 2010, Waters, I. setkání uživatelů kapalinových chromatografů firmy Waters, Špindlerův Mlýn, 27. – 28. 4. 2010

**BĚLÁKOVÁ, S.** Vztah maskovaných mykotoxinů a gushingu piva II/B6, Praha 9. 11. 2009

**BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., MIKULÍKOVÁ, R., SVOBODA, Z.** Sledování změn obsahu kyseliny ferulové v pivovarských surovinách, 23. Pivovarsko-sladařské dny, Budějovický Budvar, 16. 10. 2009.