

## MYCOBIOTA OF SELECTED SLOVAK ORIGIN WINES (PRODUCTION YEAR 2009) DURING THE VINIFICATION WITH FOCUS ON THE *ASPERGILLUS* AND *PENICILLIUM* GENERA AND THEIR POTENTIAL MYCOTOXIN PRODUCTION

Zuzana Barboráková, Dana Tančinová, Jadža Lejková, Zuzana Mašková, Mária Dovičičová, Roman Labuda, Miroslava Kačániová, Michal Mokry

### ABSTRACT

The aim of this study was to obtain the information about the mycobiota of Slovak origin wines during the production process in the year 2009, with focus on the *Aspergillus* and *Penicillium* genera. The plate dilution method on DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar) and Malt Extract agar was used for determination of the mycobiota samples. Altogether thirty-three samples from the production process of 5 species white Slovak origin wines were mycologically analysed. The spectrum of isolated penicilia consisted of 21 species: *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. oxalicum*, *P. paneum/carneum*, *P. pinophilum*, *P. polonicum*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum*, *P. roqueforti*, *P. rubrum* and *P. rugulosum*. Five species of *Aspergillus* genus and 2 species of *Eurotium* genus were isolated from samples: *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. section Nigri*, *A. versicolor*; *Eurotium amstelodami* and *E. herbariorum* group. The representative isolates of *Aspergillus* and *Penicillium* genera (103) were *in vitro* tested by TLC (Thin Layer Chromatography) for their ability to produce selected mycotoxins. A total of 82.5 % was confirmed to produce at least one mycotoxin.

**Keywords:** wine, fermentation process, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., mycotoxins

### ÚVOD

Víno je alkoholický nápoj, ktorý sa vyrába prekvasením muštu alebo rmutu vínnej révy rodu *Vitis*. Prítomnosť vláknitých mikroskopických húb vo vinohradoch je tradične spájaná s kazením bobúľ hrozna rastúcou hubou. Hlavnou mikromycétou zodpovednou za hnilobu hroznových bobúľ je *Botrytis cinerea*, patogén, ktorý poškodzuje bobule a má vplyv na ich organoleptické vlastnosti (Serra et al., 2006). Existujú však aj ďalšie huby, ktoré spôsobujú poškodenie bobúľ a produkujú mykotoxíny, t. j. toxické sekundárne metabolity vláknitých mikroskopických húb.

Za produkciu mykotoxínov v hroznových bobuliach sú zodpovedné hlavne dva rody: *Aspergillus* a *Penicillium*. Druh *P. expansum* izolovaný z bobúľ môže produkovať patulín. Citrinín je tiež produkovaný druhom *P. expansum*, ale nebol nájdený v jablčných a hroznových šťavách (Abrunhosa et al., 2001). Aflatoxinogénne druhy, *A. flavus* a *A. parasiticus* môžu byť tiež občas izolované z hroznových bobúľ (Saez et al., 2004). Hlavným mykotoxínom, ktorý sa sleduje v súvislosti s produkciou vína je ochratoxín A (Hocking et al., 2007). Popisovaná je jeho produkcia druhmi *A. ochraceus* a tzv. „čiernymi“ aspergilmami, t. j. *A. carbonarius* a *A. niger* v teplom podnebí (napr. v južnej Európe) a druhmi *P. verrucosum* a *P. nordicum* v miernom podnebí (Pitt et al., 2000). Ochratoxín A má nefrotoxické, hepatotoxické, teratogénne a karcinogénne účinky a bol klasifikovaný ako možný ľudský karcinogén (Mateo et al., 2007). Percento vín, v ktorých je ochratoxín A detegovaný je v niektorých krajinách veľmi vysoké

(okolo 50 %), hlavne vo vínach z oblastí Stredozemného mora. Pred a pozberové ošetrovanie viniča a ochrana pred vláknitými mikroskopickými hubami, zber bobúľ s minimálnym poškodením, rýchle spracovanie a dobrá sanitácia pri výrobe vína zohrávajú významnú úlohu pri minimalizácii kontaminácie vín vláknitými mikroskopickými hubami a mykotoxínmi (Mateo et al., 2007; Hocking et al., 2007).

Cieľom práce bolo priniesť poznatky o kontaminácii vybraných vín slovenského pôvodu vláknitými mikroskopickými hubami počas výrobného procesu a vybrané izoláty najčastejšie vyskytujúcich sa húb z rodov *Aspergillus* a *Penicillium* otestovať na schopnosť produkovať mykotoxíny *in vitro* podmienkach TLC (tenkovrstvová chromatografia) metódou.

### MATERIÁL A METODIKA

Mykologicky bolo vyšetrených 5 druhov bielych vín v rôznych stupňoch fermentácie (tabuľka 1). Vzorok (celkovo 33) boli odoberané počas spracovania hrozna

Tabuľka 1: Prehľad analyzovaných vzoriek

Výrobný stupeň	Druh vína				
	Müller Thurgau	Biohrozno	Tramin červený	Chardonnay	Cabernet Sauvignon
Neodkalená šťava	+	+	+	+	+
Odkalená šťava	+	+	+	+	+
Začiatok kvasenia	+	+	+	+	+
Stred kvasenia	+	+	+	+	+
Dokvasovanie	+	+	+	+	+
Zasírený mušt	+	-	-	+	+
Stočené víno	+	+	+	+	+

+ vykonaná mykologická analýza vzorky, - nevykonaná mykologická analýza vzorky

a výroby vína v roku 2009 vo vinárskych závodoch a u individuálneho spracovateľa.

**Stanovenie kontaminácie mikromycétami**

Na stanovenie kontaminácie vzoriek sa použila platňová zriedľovacia metóda. Ako živné médiá boli použité DRBC (agar s dichloranom, bengálskou červenou a chloramfenikolom; Merck, Nemecko) a sladínový agar (Biomark, India). Na očkovanie na platne živných médií sa použili riedenia  $10^{-1}$  až  $10^{-3}$  v dvoch opakovaniach. Kultivácia prebiehala 5 - 7 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C v tme.

**Identifikácia izolátov rodov *Aspergillus* a *Penicillium***

Izoláty rodu *Penicillium* boli preočkované na identifikačné médiá MEA (agar so sladínovým extraktom), CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom), YES (agar s kvasničným extraktom a sacharózou) a CREA (agar s kreatínom a sacharózou; Samson et al., 2002). Kultivácia prebiehala 7 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C v tme. Druhá identifikácia bola vykonaná na základe kultivačných a mikromorfologických znakov podľa kľúčov: Samson et Frisvad, 2004; Pitt, 1979; Raper et Thom, 1949.

Izoláty rodu *Aspergillus* boli preočkované na CYA, CY20S (Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy; Klich, 2002) a MEA. Kultivácia prebiehala 7 dní, pre druhy teleomorfného rodu *Eurotium* 14 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C a  $37 \pm 1$  °C v tme. Druhá identifikácia aspergilov bola vykonaná na základe morfológických charakteristík podľa: Pitt, 1985; Pitt et Hocking, 1999; Klich, 2002; Samson et al., 2002; Frisvad et al., 2004; Varga et al., 2007.

**Stanovenie potenciálnej toxigenity izolátov**

Reprezentatívne izoláty boli *in vitro* testované na produkciu vybraných mykotoxínov metódou TLC podľa Samson et al. (2002), modifikovanou Tančinovou et Labudom (2006).

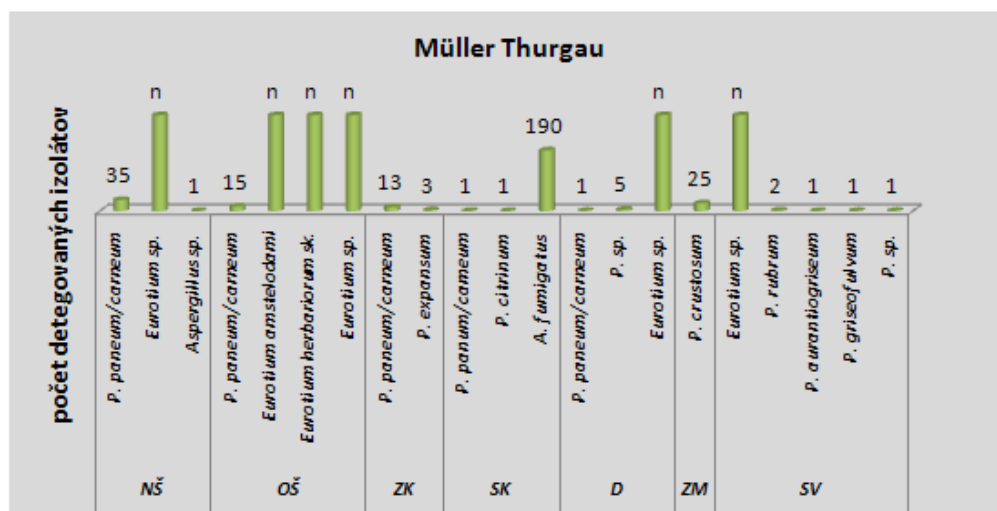
Kultivácia pre skríning intracelulárnych toxínov: kyseliny cyklopiazonovej, sterigmatocystínu, penitrému A a roquefortínu C prebiehala na CYA, pre skríning extracelulárnych toxínov: aflatoxínu B<sub>1</sub> a G<sub>1</sub>, citrinínu, ochratoxínu A, grizeofulvínu, fumagilínu a patulínu na YES 14 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C v tme. Z kolónií boli

spolu s kultivačným médiom vyrezané 3 výseky, každý s plochou približne 5 x 5 mm. Výseky boli extrahované 5 min v 500 µl roztoku chloroform:metanol (2:1, v/v) na Vortexe (Genie®2, MoBio laboratories). Tekuté fázy metabolických extraktov jednotlivých izolátov a štandardy skrínovaných mykotoxínov (Sigma, Nemecko) boli nanášané v množstvách 20 - 30 µl na chromatografickú platňu (Merck, Nemecko) a následne vyvíjané v chromatografickej sústave toluén:etylacetát:kyselina mravčia (5:4:1, v/v/v).

Vizualizácia ochratoxínu A (modrozelená fluoreskujúca), aflatoxínu B<sub>1</sub> (modrá fluoreskujúca), aflatoxínu G<sub>1</sub> (zelená fluoreskujúca), grizeofulvínu (modrá škvrna) a citrinínu (žltozelená škvrna s chvostom) prebiehala priamo pod UV svetlom (365 nm), vizualizácia kyseliny cyklopiazonovej pod denným rozptýleným svetlom po nanosení Ehrlichovho činidla (fialová škvrna s chvostom). Patulín bol viditeľný na dennom svetle po postriekaní platne 0,5 % roztokom MBTH (3-metyl-2 benzotiazolióňhydrazón hydrochlorid) v metanole a následnom zahriatí na 130 °C, 8 min ako žltoranžová škvrna. Penitrém A bol viditeľný po nanosení 20 % AlCl<sub>3</sub> v 60 % etanole a zahriatí na 130 °C na 8 minút ako tmavozelená až čierna škvrna a roquefortín C po nanosení Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O ako oranžová škvrna (Samson et al., 2002). Vizualizácia fumagilínu bola vykonaná podľa Barboráková et al. (2010). Na vizualizáciu bol použitý 1,0 % roztok NBP (4-nitrobenzyl pyridín; Merck, Nemecko) v chloroforme a roztok TEPA (tetraetylénpentamín; Merck, Nemecko) v chloroforme a následné zahrievanie chromatografickej platne 8 minút pri teplote 150 °C. Prítomnosť toxínu sa prejavila ako modrá škvrna.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Celkovo 7 rôznych druhov rodu *Penicillium* (*P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. paneum/carneum* a *P. rubrum*), 1 druh rodu *Aspergillus* (*A. fumigatus*) a 2 druhy teleomorfného rodu *Eurotium* (*E. amstelodami* a *E. herbariorum* skupina) boli vyzolované v procese výroby vína Müller Thurgau. Prehľad druhov a ich



**Obrázok 1:** Mykologická kontaminácia v procese výroby vína Müller Thurgau  
 NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, D – dokvasenie, ZM – zasirený mušt, SV – stočené víno, n – nespočítateľné množstvo kolónií (>150), P. – *Penicillium*, A. – *Aspergillus*, sk. - skupina

početnosť v jednotlivých fázach fermentačného procesu je znázornený na obrázku 1. Z pohľadu celého výrobného procesu bol pre rod *Penicillium* dominantný druh *P. paneum/carneum* (65 izolátov) a *P. crustosum* (25 izolátov).

Na schopnosť produkovať vybrané druhy mykotoxínov bolo testovaných 6 izolátov *P. paneum/carneum* (tabuľka 2), 5 izolátov produkovalo roquefortín C a žiaden izolát neprodukoval patulín. Jeden testovaný izolát *P. griseofulvum* produkoval roquefortín C, patulín, grizeofulvín a kyselinu cyklopiazonovú. Obidva testované izoláty *P. expansum* produkovali roquefortín C a patulín,

ale neprodukovali citrinín. Zo skupiny aspergilov početnosťou výrazne dominoval teleomorfný rod *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. herbariorum* skupina) a pre človeka potenciálne patogénny druh *A. fumigatus*. Izolát *A. fumigatus* produkoval antibiotikum fumagilín. Najväčšia kontaminácia vláknitými mikroskopickými hubami bola v prvých fázach výrobného procesu vína, t. j. v neodkalenej a odkalenej šťave. V stočenom víne početnosťou dominoval rod *Eurotium*, ktorý nie je známy produkciou skrínovaných mykotoxínov, zastúpenie penicilii bolo veľmi nízke (8 izolátov).

**Tabuľka 2:** Toxinogenita vybraných izolátov rodov *Penicillium* a *Aspergillus* izolovaných v procese výroby vína Müller Thurgau

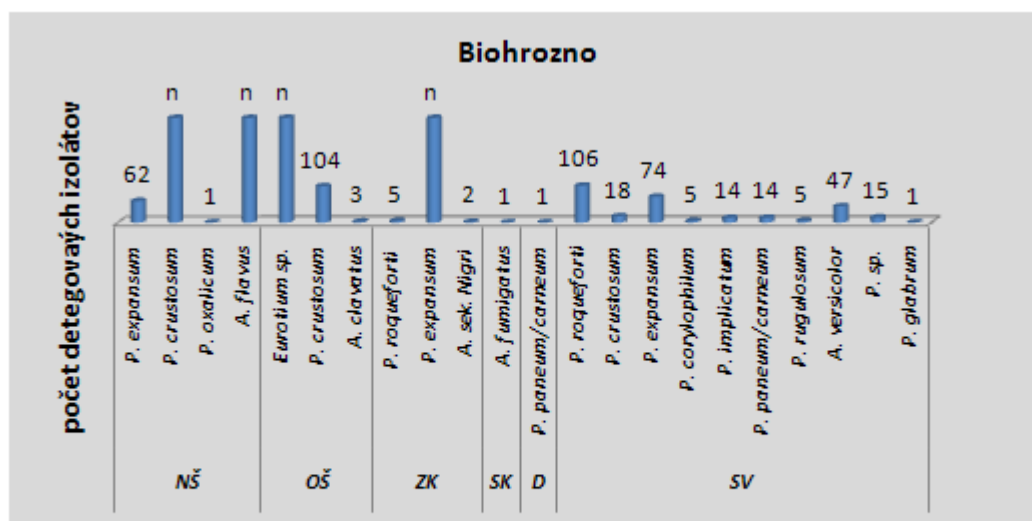
Izolát	Fáza	RC	PAT	CPA	G	C	FUM
<i>P. griseofulvum</i>	SV	1*/1**	1/1	1/1	1/1	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	NŠ	4/4	0/4	-	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	ZK	0/1	0/1	-	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	SK	1/1	0/1	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	ZK	2/2	2/2	-	-	0/2	-
<i>A. fumigatus</i>	SK	-	-	-	-	-	1/1

\*počet produkčných izolátov, \*\*celkový počet testovaných izolátov, - nestanovovaný metabolit

RC – roquefortín C, PAT – patulín, CPA – kyselina cyklopiazonová, G – grizeofulvín, C – citrinín, FUM – fumagilín, NŠ – neodkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, SV – stočené víno, *P.* – *Penicillium*, *A.* – *Aspergillus*

V procese výroby vína z **biohrozna** dominoval druhovým zastúpením rod *Penicillium*. Celkovo bolo vyizolovaných 9 druhov tohto rodu, a to:

*P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. oxalicum*, *P. paneum/carneum*, *P. roqueforti* a *P. rugulosum* (obrázok 2).



**Obrázok 2:** Mykologická kontaminácia v procese výroby vína z biohrozna

NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, D – dokvasenie, SV – stočené víno, n – nespočítateľné množstvo kolónií (>150), *P.* – *Penicillium*, *A.* – *Aspergillus*, sek. - sekcia

Z pohľadu celého výrobného procesu mali najvyššie zastúpenie *P. crustosum* (9 z 10 izolátov produkovalo roquefortín C a 8 izolátov produkovalo patulín), *P. expansum* (všetky 4 testované izoláty produkovali roquefortín C a patulín, žiaden neprodukoval citrinín) (tabuľka 3). Po dva izoláty *P. roqueforti* a *P. paneum/carneum* produkovali roquefortín C. Okrem penicilii boli vyizolované aspergily: *Aspergillus flavus*, *A. clavatus*, *A. versicolor*, *A. sekcia Nigri* a teleomorfný rod *Eurotium*. Zo skupiny aspergilov mal

najväčší výskyt druh *A. flavus* a rod *Eurotium*. U testovaného izolátu *A. flavus* nebola potvrdená produkcia aflatoxínu B<sub>1</sub> a ani kyseliny cyklopiazonovej. Tri izoláty druhu *A. versicolor*, ktoré boli získané zo stočeného vína produkovali sterigmatocystín. Izoláty *A. sekcia Nigri* neprodukovali ochratoxín A. Najvyšší počet mikromycét bol v prvých dvoch fázach výrobného procesu vína (neodkalená a odkalená šťava), no najväčšia druhová rozmanitosť bola v stočenom víne. V stočenom víne dominovali svojim zastúpením *P. roqueforti* a *P. expansum*.

Tabuľka 3: Toxinogenita vybraných izolátov rodu *Penicillium* a *Aspergillus* izolovaných v procese výroby vína z biohrozna

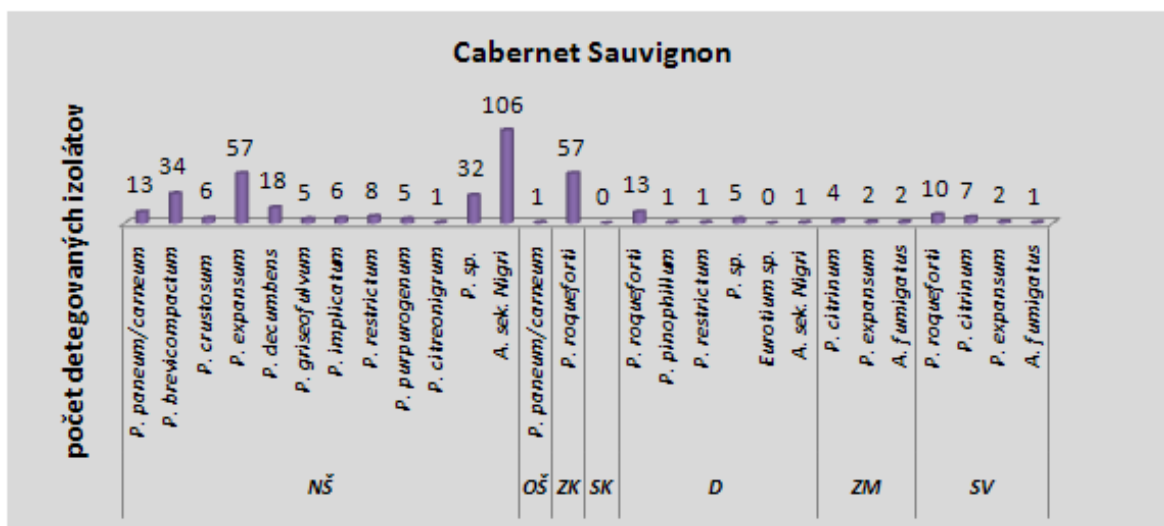
Izolát	Fáza	RC	PAT	STER	CPA	C	AB <sub>1</sub>	AG <sub>1</sub>	OTA
<i>P. crustosum</i>	SV	4*/4**	3/4	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	OŠ	3/4	3/4	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	NŠ	2/2	2/2	-	-	-	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	SV	2/2	0/2	-	-	-	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	SV	2/2	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	SV	3/3	3/3	-	-	0/3	-	-	-
<i>P. expansum</i>	NŠ	1/1	1/1	-	-	0/1	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	SV	-	-	3/3	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	NŠ	-	-	-	0/1	-	0/1	0/1	-
<i>A. sekcia Nigri</i>	ZK	-	-	-	-	-	-	-	0/2

\*počet produkčných izolátov, \*\*celkový počet testovaných izolátov, - nestanovený metabolit

RC – roquefortín C, PAT – patulín, CPA – kys. cyklopiazonová, STER – sterigmatocystín, C – citrinín, AB<sub>1</sub> – aflatoxín B<sub>1</sub>, AG<sub>1</sub> – aflatoxín G<sub>1</sub>, OTA – ochratoxín A, NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, SV – stočené víno, ZK – začiatok kvasenia, P. – *Penicillium*, A. – *Aspergillus*

Vysoké druhové zastúpenie izolovaných húb z rodu *Penicillium* bolo vo výrobnom procese vína **Cabernet Sauvignon**, a to 13 druhov: *P. brevicompactum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*,

*P. implicatum*, *P. paneum/carneum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum* a *P. roqueforti*. Z druhov dominovali svojou početnosťou *P. crustosum* (57 izolátov) a *P. roqueforti* (80 izolátov; obrázok 3).



Obrázok 3: Mykologická kontaminácia v procese výroby vína Cabernet Sauvignon

NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, D – dokvasenie, ZM – zasireny mušt, SV – stočené víno, P. – *Penicillium*, A. – *Aspergillus*, sek. - sekcia

Celkovo 13 izolátov bolo otestovaných na produkciu vybraných mykotoxínov (tabuľka 4). Roquefortín C produkoval izolát *P. griseofulvum* a *P. expansum*, dva izoláty *P. paneum/carneum* a 3 izoláty *P. roqueforti*. Patulín produkoval izolát *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. paneum/carneum* a *P. expansum*. Dva izoláty *P. expansum* produkovali citrinín, kým *P. expansum* tento toxín neprodukovalo. Rovnako *P. griseofulvum* neprodukovalo kyselinu cyklopiazonovú. Zo skupiny aspergilov boli vyizolované *A. sekcia Nigri* a *A. fumigatus*, ale početnosťou dominovala *A. sekcia Nigri*.

Testované izoláty neprodukovali ochratoxín A, ale dva izoláty *A. fumigatus* produkovali antibiotikum fumagilín. Na základe počtu vyizolovaných druhov a ich početnosti možno skonštatovať, že najviac kontaminovaná bola neodkalená šťava.

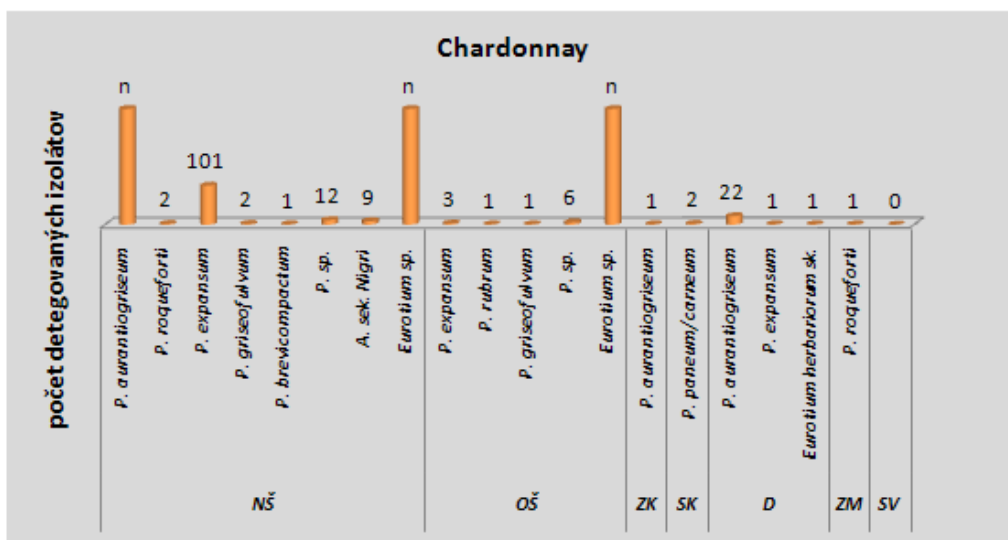
V procese výroby vína **Chardonnay** bolo celkovo vyizolovaných 7 druhov rodu *Penicillium*, t. j. druhy: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. griseofulvum*, *P. expansum*, *P. paneum/carneum*, *P. roqueforti* a *P. rubrum*. Dominantnými druhmi boli *P. aurantiogriseum* a *P. expansum* (105 izolátov; obrázok 4).



Tabuľka 4: Toxinogenita vybraných izolátov rodu *Penicillium* a *Aspergillus* izolovaných v procese výroby vína Cabernet Sauvignon

Izolát	Fáza	RC	PAT	G	CPA	C	OTA	FUM
<i>P. crustosum</i>	NŠ	0*/1**	1/1	-	-	-	-	-
<i>P. griseofulvum</i>	NŠ	1/1	1/1	1/1	0/1	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	NŠ	2/2	1/2	-	-	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	SV	1/1	-	-	-	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	ZK	1/1	-	-	-	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	D	1/1	-	-	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	ZM	0/1	0/1	-	-	1/1	-	-
<i>P. expansum</i>	SV	0/1	1/1	-	-	1/1	-	-
<i>P. expansum</i>	NŠ	1/1	0/1	-	-	0/1	-	-
<i>A. sekcia Nigri</i>	NŠ	-	-	-	-	-	0/7	-
<i>A. fumigatus</i>	ZM	-	-	-	-	-	-	1/1
<i>A. fumigatus</i>	SV	-	-	-	-	-	-	1/1

\*počet produkčných izolátov, \*\*celkový počet testovaných izolátov, - nestanovovaný metabolit  
 RC – roquefortín C, PAT – patulín, CPA – kys. cyklopiazonová, G - grizeofulvín, C – citrinín, FUM – fumagilín,  
 OTA – ochratoxín A, NŠ – neodkalená šťava, SV – stočené víno, ZK – začiatok kvasenia, D – dokvasovanie,  
 ZM – zasirený mušt, , P. – *Penicillium*, A. – *Aspergillus*



Obrázok 4: Mykologická kontaminácia v procese výroby vína Chardonnay

NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, D – dokvasenie,  
 ZM – zasirený mušt, SV – stočené víno, n – nespočítateľné množstvo kolónii (>150), P. – *Penicillium*,  
 A. – *Aspergillus*, sk. – skupina, sek. - sekcia

Schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny bola testovaná u 4 izolátov (tabuľka 5). Jeden izolát *P. paneum/carneum* produkovoval roquefortín C, ale neprodukoval patulín. Roquefortín C produkovoval tiež jeden izolát druhu *P. roqueforti* a 4 izoláty *P. expansum*, ktoré zároveň produkovali patulín, ale neprodukovali citrinín. Ďalším dominantnými rodmi vo výrobnom

procese bol rod *Eurotium* a *A. sekcia Nigri* (9 izolátov). Päť vybraných izolátov bolo testovaných na produkciu ochratoxínu A, ale produkcia nebola použitou metódou potvrdená. Mikromycétami najviac kontaminovaná bola odkalená a neodkalená šťava, v stočenom víne bol ich počet nedetegovateľný.

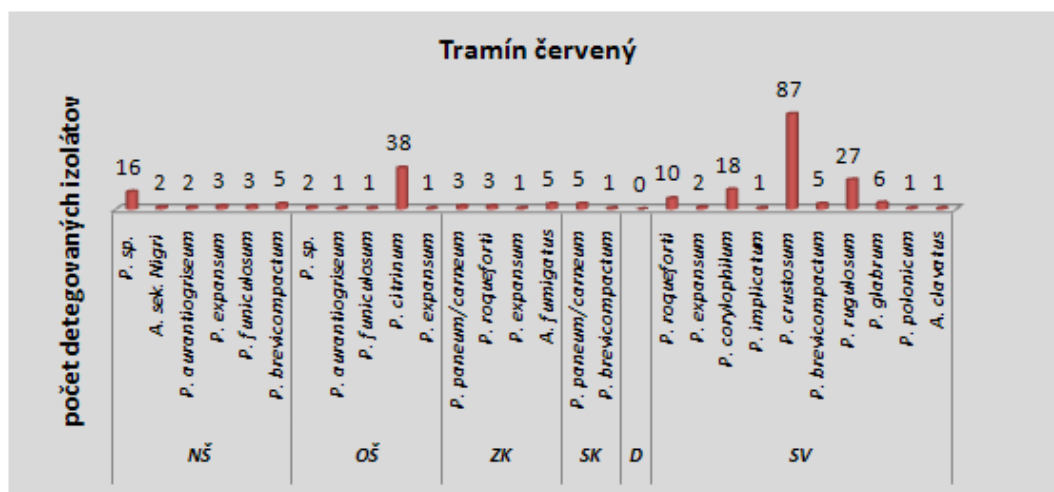
Tabuľka 5: Toxinogenita vybraných izolátov rodu *Penicillium* a *Aspergillus* izolovaných v procese výroby vína Chardonnay

Izolát	Fáza	RC	PAT	C	OTA
<i>P. paneum/carneum</i>	SK	1*/1**	0/1	-	-
<i>P. roqueforti</i>	ZM	1/1	-	-	-
<i>P. expansum</i>	NŠ	4/4	4/4	0/4	-
<i>A. sekcia Nigri</i>	NŠ	-	-	-	0/5

\*počet produkčných izolátov, \*\*celkový počet testovaných izolátov, - nestanovovaný metabolit  
 RC – roquefortín C, PAT – patulín, C – citrinín, OTA – ochratoxín A, NŠ – neodkalená šťava, SK – stred kvasenia,  
 ZM – zasirený mušt, P. – *Penicillium*, A. – *Aspergillus*

Celkovo 13 druhov penicílií (*P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*,

*P. implicatum*, *P. paneum/carneum*, *P. polonicum*, *P. roqueforti* a *P. rugulosum*) bolo vyizolovaných počas výrobného procesu vína **Tramín červený** (obrázok 5).



**Obrázok 5:** Mykologická kontaminácia v procese výroby vína Tramín červený

NŠ – neodkalená šťava, OŠ – odkalená šťava, ZK – začiatok kvasenia, SK – stred kvasenia, D – dokvasenie, SV – stočené víno, *P.* – *Penicillium*, *A.* – *Aspergillus*, sek. - sekcia

Najväčšie zastúpenie malo *P. crustosum* (87 izolátov) a *P. citrinum* (38 izolátov). Na schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny bolo testovaných 38 izolátov penicílií a aspergilov. Všetky testované izoláty *P. crustosum* produkovali roquefortín C a patulín (tabuľka 6). Dva izoláty *P. paneum/carneum* z 3 testovaných produkovali roquefortín C a jeden izolát patulín. Všetky izoláty *P. roqueforti* a *P. expansum* produkovali roquefortín C. Izoláty *P. expansum* produkovali tiež patulín, ale citrinín neprodukovali.

Citrinín produkovalo 23 izolátov z 25 testovaných izolátov druhu *P. citrinum*. Celkovo boli vyizolované 3 druhy aspergilov, *A. sekcia Nigri* sekcia (2 izoláty), *A. clavatus* (1 izolát) a *A. fumigatus* (5 izolátov). *A. clavatus* produkoval patulín a *A. fumigatus* antibiotikum fumagilín. Izoláty *A. sekcia Nigri* neprodukovali ochratoxín A. V stočenom víne sa nachádzal najväčší počet vyizolovaných druhov, teda táto fáza bola najviac kontaminovaná vláknitými mikroskopickými hubami.

**Tabuľka 6:** Toxinogenita vybraných izolátov rodu *Penicillium* a *Aspergillus* izolovaných v procese výroby vína Tramín červený

Izolát	Fáza	RC	PAT	C	FUM	OTA
<i>P. crustosum</i>	SV	2*/2**	2/2	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	ZK	0/1	1/1	-	-	-
<i>P. paneum/carneum</i>	SK	2/2	0/2	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	SV	2/2	-	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	ZK	1/1	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	SV	1/1	1/1	0/1	-	-
<i>P. expansum</i>	NŠ	2/2	2/2	0/2	-	-
<i>P. citrinum</i>	OŠ	-	-	23/25	-	-
<i>A. clavatus</i>	SV	-	1/1	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	ZK	-	-	-	1/1	-
<i>A. sekcia Nigri</i>	NŠ	-	-	-	-	0/2

\*počet produkčných izolátov, \*\*celkový počet testovaných izolátov, - nestanovovaný metabolit

RC – roquefortín C, PAT – patulín, C – citrinín, FUM – fumagilín, OTA – ochratoxín A, NŠ – neodkalená šťava, SV – stočené víno, ZK – začiatok kvasenia, OŠ – odkalená šťava, SK – stred kvasenia, *P.* – *Penicillium*, *A.* – *Aspergillus*

Magnoli et al. (2003) uvádzajú, že *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* spp., *Eurotium* spp., *Penicillium* spp. a *Rhizopus* spp. sú dominantnými hubami v zberaných bobuliach vínnej révy v Argentíne. Rovnaké spektrum húb uvádzajú Belli et al. (2006) u španielskych odrôd. V našich vzorkách boli dominantné rody *Aspergillus* a *Penicillium*, ktoré sú podľa Aydogdu et Guccer (2009) zodpovedné za prítomnosť mykotoxínov v samotných bobuliach

a v produktoch z nich vyrobených, teda aj vo víne. Rod *Penicillium* je typický pre mierne a chladnejšie oblasti, kým rod *Aspergillus* pre subtropické a tropické oblasti (Serra et al., 2006). V našich vzorkách dominoval rod *Penicillium*, čo sa zhoduje s týmto konštatovaním. Najväčšiu pozornosť v súvislosti s hroznom a s komoditami, ktoré sa z neho vyrábajú treba venovať mykotoxínom, hlavne ochratoxínu A, aflatoxínom, patulínu a citrinínu (Aydogdu et Guccer, 2009). Žiaden z testovaných izolátov (14) *A. sekcia Nigri*,

ktoré boli vyizolované z našich vzoriek, neprodukoval ochratoxín A. Rovnaké výsledky získali **Ostrý et al. (2007)**. *P. verrucosum* ako ďalší potenciálny producent ochratoxínu A nebol z našich vzoriek vyizolovaný, čo sa zhoduje s **Ostrý et al., 2007** a **Bau et al., 2005**. **Varga et Kozakiewicz (2006)** uvádzajú, že ochratoxín A sa nachádza vo väčšom množstve v červených vínach v porovnaní s bielymi. V tejto štúdii testované *A. flavus* izoláty neprodukovali aflatoxíny. Patulín produkovalo 87,5 % izolátov *P. expansum* a 14, 3 % izolátov *P. crustosum*. Tento toxín je celkovo veľmi toxický pre prokaryotické a eukaryotické bunky, ale toxicita pre človeka nebola presvedčivo demonštrovaná (**Dijksterhuis et Samson, 2007**). Roquefortín C produkovalo 83,3 % testovaných izolátov *P. paneum/carneum* a 100 % *P. griseofulvum* izolátov. Citrinín produkovalo 92 % testovaných izolátov *P. citrinum*, 50 % *P. griseofulvum* izolátov a 15,4 % *P. expansum* izolátov.

## ZÁVER

Predložená štúdia potvrdila relatívne široké spektrum druhov rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, ktoré sú súčasťou mykocenózy vo všetkých štádiách fermentačného procesu výroby vybraných 5 druhov bielych vín slovenského pôvodu. Počas štúdie bolo celkovo vyizolovaných 21 druhov penicilíí, 5 druhov aspergilov a 2 druhy teleomorfného rodu *Eurotium*. Hlavné rody *Aspergillus* a *Penicillium* sú častými producentmi mykotoxínov, čím sa zvyšuje riziko prítomnosti mykotoxínov aj v hotových vínach. Najväčšie zistené riziko v sledovaných vzorkách vína predstavuje prítomnosť producentov mykotoxínov patulínu a citrinínu. Celkovo bolo testovaná toxinogenita 103 izolátov rodov *Aspergillus* a *Penicillium*, 82,5 % izolátov produkovalo najmenej jeden mykotoxín.

## LITERATÚRA

AYDOGDU, H., GUCCER, Y., 2009. Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products. In *Trakia Journal of Sciences*, vol. 7, 2009, no. 2, p. 211-214.

ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. M., KOZAKIEWICZ, Z. et al., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. In *Letters in Applied Microbiology*, vol. 32, 2001, p. 240-242.

BARBORÁKOVÁ, Z., LABUDA, R., HÄUBL, G., 2010. Produkcia antibiotika fumagilínu kmeňom *Penicillium scabrosum* na syntetických médiách. In *Zborník z V. Vedeckej konferencie doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Nitra : VES SPU, 2010, p. 43-47. ISBN 978-80-552-0471-0.

BAU, M., BRAGULAT, M. R., ABARCA, M. L. et al., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. In *Journal of Food Microbiology*, vol. 98, 2005, no. 2, p. 125-130.

BELLÍ, N., BÁU, M., MARÍN, S. et al., 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. In *Journal of Food Microbiology*, vol. 111, 2006, p. 40-45.

DIJKSTERHUIS, J., SAMSON, R. A., 2007. *Food Mycology a Multifaceted Approach to Fungi and Food*.

Boca Raton : CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. 403 p. ISBN 0-8493-9818-5.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P. et al., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology*, vol. 50, 2004, p. 23-43.

HOCKING, A. D., LEONG, S. L., KAZI, B. A. et al., 2007. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 119, 2007, p. 84-88.

KLICH, M. A., 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p. ISBN 90-70351-46-3.

MAGNOLI, C., VIOLANTE, M., COMBINA, M. et al., 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. In *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, 2003, p. 715-722.

MATEO, R., MEDINA, Á, MATEO, E. M. et al., 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 119, 2007, p. 79-83.

OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J., PROCHÁZKOVÁ, I. et al., 2007. Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. In *Czech Mycology*. vol. 59, 2007, no. 2, p. 241-254.

PITT, J. I., 1979. *Penicillium crustosum* and *Penicillium simplicissimum*, the correct names for two common species producing tremorgenic mycotoxins. In DeVRIES, J. W., TRUCKSESS, M. W., JACKSON, L. S. (ed.), 2002. *Mycotoxins and Food Safety*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 295 p. ISBN 0-3064-6780-1.

PITT, J. I., 1985. Nomenclatorial and taxonomic problems in the genus *Eurotium*. In SAMSON, R. A., PITT, J. I., 1985. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. New York and London : Plenum Press, 1985. p. 383-396.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2 vyd. Maryland : An Aspen Publication, 1999. 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.

PITT, J. I., BASILICO, J. C., ABARCA, M. L., LOPEZ, C., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. In *Medical Mycology*, vol. 38, 2000, p. 41 – 46.

RAPER, K. B., THOM, CH., 1949. *A Manual of the Penicillia*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1949. 875 p.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F. et al., 2002. Method for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. (ed.), 2002. *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, p. 283-297.

SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C., 2004. *Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004. 260 p. ISBN 90-70351-53-6.

SAEZ, J. M., MEDINA, A., GIMENO-ADELANTADO, J. V. et al., 2004. Comparison of different sample treatments for analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid

chromatography. In *Journal of chromatography*, A. vol. 1029, 2004, p. 125-133.

SERRA, R., LOURENÇO, A., ALÍPIO, P., VENÁCIO, A., 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. In *Mycological Research*, vol. 110, 2006, p. 971-978.

TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In Kolektív autorov (ed.), 2006. *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Nitra : SPU, 2006, p. 167-194.

VARGA, J., KOZAKIEWICZ, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 17, 2006, p. 72-81.

VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. In *Studies in Mycology*, vol. 59, 2007, p. 75-88.

### Pod'akovanie:

Práca vznikla s podporou projektu KEGA-014SPU-4/2010. Autori ďakujú Bc. Monike Tonkovej za technickú asistenciu pri analýzach vzoriek.

### Kontaktná adresa:

Ing. Zuzana Barboráková. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: zuzana.barborakova@gmail.com

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food

Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: dana.tancinova@uniag.sk

Ing. Jadža Lejková. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: j.lejkova@gmail.com

Ing. Zuzana Mašková, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: zuzana.maskova@uniag.sk

Ing. Mária Dovičičová, PhD. Graduate from Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: mddmfbp@gmail.com

doc. Ing. Roman Labuda, PhD. Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 1, Tulln, Austria, E-mail: roman.labuda@romerlabs.com

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: miroslava.kacaniova@uniag.sk

Ing. Michal Mokry. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: michal.mokry@sk.nestle.com