

Pieno rūgšties bakterijų ir mielių įtaka *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais pažeistų miežių fermentacijai ir detoksikacijai

D. Černauskas, G. Juodeikienė, D. Vidmantienė, L. Bašinskienė

Kauno technologijos universitetas,
Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas, Lietuva
El. paštas grazina.juodeikiene@ktu.lt

E. Bartkienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija,
Tilžės g. 18, LT-547181 Kaunas, Lietuva

crossref <http://dx.doi.org/10.5755/j01.ct.60.2.1617>

Gauta 2012 m. vasario 20 d.; priimta spaudai 2012 m. balandžio 25 d.

Darbas skirtas grūdinės žaliavos išteklių didinimui, pritaikius *Fusarium* spp. pažeistų miežių apdorojimui biotechnologini sprendimą, pagrįstą pieno rūgšties bakterijų (PRB) antimikrobinu poveikiu deriniuose su atrinktomis alkoholinei fermentacijai mielių rūšimis. Bakteriocinus gaminančios PRB buvo išskirtos iš lietuviškų spontaninių ruginių raugų ir, atlikus 16S rRNR sekų PGR amplifikaciją, nustatytas bei patvirtintas jų priklausomumas *Lactobacillus* ir *Pediococcus* gentims bei galimas jų priklausomumas *Lactobacillus sakei* (KTU05-6), *Pediococcus acidilactici* (KTU05-7), *P. pentosaceus* (KTU05-8) rūšims. Nustatyta, kad grūdų užkrėstumas *Fusarium* spp. mažino alkoholinės fermentacijos metu susidariusį etanolio kiekį ($R^2 = 0,868$) ir, priešingai, didino aukštesnės eilės alkoholių koncentraciją ($R^2 = 0,867$). Tyrimai parodė, kad fermentacijos proceso efektyvumą galima padidinti parenkant mielių rūšį: *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* mielės sąlygojo didžiausią etanolio ir mažiausią aukštesnės eilės alkoholių susidarymą. Kitos mielių rūšies – *K. marxianus* įtaka fermentacijos procesui buvo analogiška kaip *Saccharomyces cerevisiae*. Miežių grūdų apdorojimas atrinktomis PRB neturėjo reikšmingos įtakos etilo alkoholio išėigai, o su kai kuriomis PRB (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) nustatytas didesnis šalutinių medžiagų kiekis. Tačiau visais atvejais pastebėtas reikšmingas šio biotechnologinio sprendimo poveikis žlaugtų detoksikacijai. Didžiausias detoksikuojamasis efektas, mažinantis DON koncentraciją žlaugtuose 44 %, palyginti su jo kiekiu žaliavoje, pasiektas pažeistą grūdinę žaliavą apdorojus *P. acidilactici* ar *L. sakei* ir fermentavus *S. cerevisiae*. Tokiu būdu, parenkant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčias PRB miežių grūdams apdoroti derinyje su mielėmis, galima ženkliai padidinti *Fusarium* spp. pažeistos grūdinės žaliavos perdirbimo efektyvumą: biomasę panaudoti bioetanolio gamybai, o susidariusius žlaugtus – pašarams.

Įvadas

Grūdų produktai yra viena pagrindinių žaliavų tiek žmogaus mitybos produktų, tiek pašarų gamyboje, todėl grūdų kokybei užtikrinti turi būti kontroliuojama visa grūdų gamybos ir perdirbimo grandinė – nuo pirminės grūdų gamybos iki grūdų produktų realizavimo vartotojui [1]. Ypač daug dėmesio skiriama teršalams – mikotoksinams, susidarantiems grūdų auginimo ir laikymo metu.

Mikotoksinus gaminantys mikroskopiniai grybai suardo grūdus, keisdami jų struktūrą, o pasigaminę toksinai užkrečia maistą ir gyvulių pašarus [2]. Vien augaluose mikroskopiniai grybai sukelia apie 10 tūkst. įvairių ligų [3]. *Fusarium* genties mikroskopinių grybų gaminamas deksinivalenolis (DON) ir jo acetilo dariniai 3-AcDON ir 15-AcDON bei nivalenolis (NIV) yra labiausiai (po aflatoksinu) augaliniuose produktuose paplitę mikotoksinai [4], todėl jie turėtų būti kontroliuojami ir detoksikuojami.

DON pavojingas tiek žmonėms, tiek gyvuliams. Jis gali pažeisti žinduolių organus, silpninti imuninę sistemą ir mažinti gyvulių produktyvumą [5–8]. Dabartinis grūdų

užkrėstumo mikotoksinais lygis paskatino ES priimti naują reglamentą Nr. 1881/2006, nustatantį didžiausias leistinas DON ir kitų teršalų maisto produktuose koncentracijas [9]. Pagal šį reglamentą DON kiekis neperdirbtuose grūduose, išskyrus kietuosius kviečius, avižas ir kukurūzus, turi būti ne didesnis kaip $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$, o tiesiogiai žmonėms vartoti skirtuose grūduose – $750 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Su grūdų užkrėstumu DON kovoti sunku, nes *Fusarium* genties mikroskopinių grybų vystymasis ir mikotoksinų susidarymo intensyvumas priklauso nuo klimato sąlygų grūdų vegetacijos laikotarpiu [10]. Ypač palankios sąlygos *Fusarium* genties mikroskopinių grybų plitimui susidaro tuose regionuose, kuriuose kritulių iškrita daugiau nei jų išgaruoja. Lietuva taip pat priskiriama tokiems regionams.

Literatūroje yra duomenų apie įvairių fizikinių, cheminių ir biologinių priemonių, kurios gali suardyti, modifikuoti ar absorbuoti mikotoksinus, taikymą mikotoksinų detoksikacijai. Pastaruoju metu mikotoksinais eliminuoti iš maisto produktų ir pašarų vis plačiau taikoma biologinė detoksikacija. Šios detoksikacijos esmė yra mikro-

organizmų panaudojimas mikotoksinams biologiškai izoliuoti („surišti“), slopinti ar transformuoti į netoksiškus ar mažiau toksiškus junginius.

Išskirta ir identifikuota daugiau kaip 20 bakterijų ir mielių rūšių, pasižyminčių detoksikuojančiomis savybėmis [11].

Nustatytas įvairių pieno rūgšties bakterijų rūšių poveikis *Fusarium* spp. gaminamų toksinų, tokių kaip zearalenono (ZEN) ir jo darinio α -zearalenono [12], taip pat aflatoksino B1 [13], ochratoksino A [14] ir fumonizino B1 ir B2 kiekio sumažėjimui [15]. Mokslininkų nuomone, detoksikacijos procesai galimi dėl mikotoksinų sujungimo ir jų biosintezės slopinimo, susijusių su galimomis sąveikomis tarp pieno rūgšties bakterijų ir mikotoksinų.

Informacija apie mielių sąveiką su mikotoksinais jau žinoma daugiau nei tris dešimtmečius [16, 17]. Atlikta daug tyrimų apie mikotoksinų pokyčius alaus ir vyno gamybos metu [18, 19]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad dauguma mielių sujungia nemažus aflatoksino B1 kiekius [20] bei ochratoksinus [21]. Nustatyta, kad mikotoksinų absorbcija priklauso nuo terpės pH ir vyksta efektyviausiai esant pH 3,0. Be to, termiškai apdorotos mielių ląstelės pasižymi didesniu mikotoksinų absorbcijos pajėgumu (90 % masės), palyginus su gyvybingomis ląstelėmis (35 % masės) [20].

Devegowda ir kt. nustatė, kad modifikuotas mielių ląstelių mananoligosacharidas turi savybę efektyviai prisijungti aflatoksinus, o kiek silpniau – ochratoksinus ir *Fusarium* spp. toksinus [22]. Manoma, kad gliukomananai, išskirti iš išorinės *S. cerevisiae* mielių ląstelių sienelių dalies, gali absorbuoti mikotoksinus [23]. Kitų tyrėjų pateikiami duomenys taip pat patvirtina, kad fermentacijos metu vyksta toksinų biotransformacija ir mažėja jų kiekis, tačiau tai nėra pakankamai efektyvus procesas visiškai DON detoksikacijai. Garda ir kt., atliekant 120 h slyklo fermentaciją 14 °C temperatūroje, pavyko DON kiekį misoje sumažinti 53 % [24]. Pagal Scott atliktus tyrimus, fermentuojant *S. cerevisiae* mielėmis slyklą, užkrėstą DON ir zearalenonu, DON išliko stabilus po 7–9 dienų fermentacijos [25]. Bennet ir Richard atlikti tyrimai parodė, kad DON nebuvo visiškai suskaidytas alkoholinės fermentacijos metu [26]. Gana didelė DON koncentracija buvo nustatyta tiek fermentuotos masės filtrate, tiek jos sausajame likutyje.

Grūdų auginimas Respublikoje, palyginus su ES ir kitomis šalimis, neturi pranašumų, todėl jų eksportas nėra didelis, tačiau Lietuvoje didėja kombinuotųjų pašarų gamyba. Pažymėtina, kad Lietuvoje sparčiai plečiasi ir biodegalų (bioetanolio, biodyzelino) gamyba. Kaip bioetanolio gamybos atliekos lieka žlaugtai, kurie gali būti sėkmingai naudojami kombinuotųjų pašarų gamyboje. Svarbu, kad šios bioetanolio gamybos atliekos būtų saugios pašarams gaminti. Todėl tiriant fuzariozės pažeistų grūdų panaudojimo bioetanolio gamyboje galimybes, aktuali naujų biotechnologinių priemonių paieška DON kiekiui gamybos atliekose (žlaugtuose) sumažinti. Šio darbo tikslas buvo nustatyti pieno rūgšties bakterijų ir mielių rūšių įtaką bioetanolio gamybos iš fuzariozės pažeistų miežių efektyvumui ir deoksinivalenolio (DON) koncentracijai.

racijos pokyčiams fermentacijos metu bei jo likučiui pašarams naudojamuose žlaugtuose.

Tyrimų metodika

MIEŽIŲ GRŪDAI IR MIKROORGANIZMAI. Eksperimentui naudoti 2010 m. miežių grūdai, surinkti iš įvairių Lietuvos ūkininkų ir ūkio bendrovių. Priemaišoms pašalinti miežių mėginiai buvo sijojami per dviejų sietų komplektą (viršuje – su 3,5 mm, apačioje – su 1 mm pločio akutėmis). Analitiniams tyrimams grūdai sumalti laboratoriniu malūnu *WZ-1* (ZBPP, Lenkija) ir juose ELISA metodu nustatytas DON kiekis. Bioetanolio gamybai atrinkti 6 miežių grūdų mėginiai, kuriuose DON koncentracija kito nuo 0 iki 425 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (0; 55; 60; 140; 170; 425 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Grūdų masei apdoroti naudotos bakteriocinus gaminančios pieno rūgšties bakterijos (PRB) KTU05-6, KTU05-7, KTU05-8 (KTU Maisto produktų technologijos katedros kolekcija), kurios buvo išskirtos iš lietuviškų spontaninių ruginių raugų ir, atlikus 16S rRNR sekų PGR amplifikaciją, nustatytas bei patvirtintas jų priklausomumas *Lactobacillus* ir *Pediococcus* gentims bei galimas jų priklausomumas *Lactobacillus sakei* (KTU05-6), *Pediococcus acidilactici* (KTU05-7), *P. pentosaceus* (KTU05-8) rūšims [27, 28].

PRB augintos De Man Rogosa ir Sharpe (MRS) sultinyje, kurio vienam litrui paruošti reikia: 20 g gliukozės, po 10 g peptono ir mėsos ekstrakto, po 5 g mielių ekstrakto ir natrio acetato, po 2 g natrio gliukonato ir dikalio hidrofosfato, 0,2 g magnio sulfato, 0,05 g mangano sulfato ir 1 ml tvino. Po 18 h kultivavimo 2 % (tūrio) PRB ląstelių inokuluota į šviežiai paruoštą MRS terpę ir auginta 18 h esant optimalioms augimo temperatūroms: KTU05-6 – 30 °C, KTU05-7 – 35 °C, KTU05-8 – 25 °C. Pažeistų miežių masėms apdoroti (trukmė – 2 h) naudota PRB suspensija (0,1 ml g^{-1}).

Miežių alkoholinei fermentacijai naudotos tradicinės *Saccharomyces cerevisiae* mielės (Lesaffre Polska S.A., Lenkija), taip pat dvi *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius* ir *Kluyveromyces marxianus* mielių rūšys, gautos iš Botanikos instituto Biodestruktorių laboratorijos.

BIOETANOLIO GAMYBA LABORATORINĖMIS SĄLYGOMIS. Grūdinės žaliavos (apdorotos arba neapdorotos PRB) fermentavimui naudota žemų temperatūrų etanolio gamybos technologinė schema. Susmulkinta žaliava (100 g) sumaišyta su 35 °C temperatūros vandeniu santykiu 1 : 10 ir kaitinta 90 °C temperatūros vandens vonioje 30 min. Grūdinės žaliavos fermentinė hidrolizė vykdyta dviem etapais: masės suskystinimas ir sucukrinimas. Masės suskystinimui naudota bakterinė α -amilazė iš *Bacillus licheniformis* (Termamyl 120L, aktyvumas 120 KNU g^{-1}) ir hidrolizė vykdyta 65 °C temperatūroje 1,5 h (terpės pH 6,0–6,5). Po to masė buvo cukrinama 55 °C temperatūroje (trukmė 2 h, pH 5,0–6,0), naudojant gliukoamilazės iš *Aspergillus niger* (AMG 300L, aktyvumas 300 AGU mL^{-1}) ir β -ksilanazės iš *Thermomyces lanuginosus* (Pentopan Mono BG, aktyvumas 2500 FXU g^{-1}) fermentinius preparatus (Novozymes A/S, Danija). Fermentų kiekiai

parinkti pagal anksčiau atliktus tyrimus [29]. Sucukrinta masė atvėsinta iki 30 °C temperatūros ir rauginta 30–33 °C temperatūroje 72 h, naudojant įvairių rūšių mieles (5,0 ±0,1 g). Apie fermentacijos proceso efektyvumą buvo sprendžiama pagal etilo alkoholio ir šalutinių produktų kiekį raugale. Fermentuota masė po filtravimo ir džiovinimo analizuota ELISA metodu DON kiekio įvertinimui sausajame likutyje (žlaugtuose).

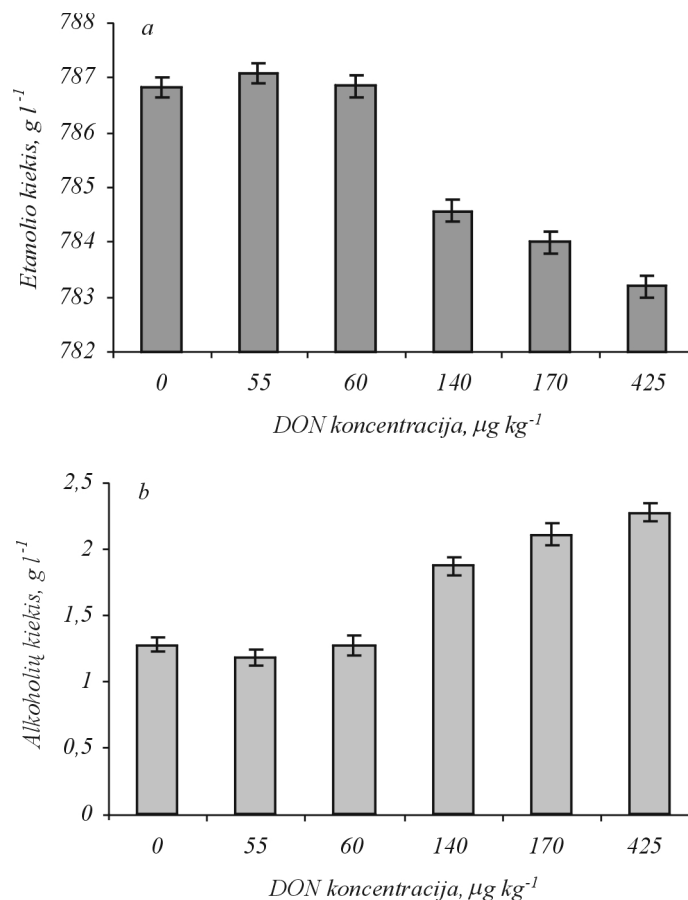
ETILO ALKOHOLIO IR ŠALUTINIŲ PRODUKTŲ ANALIZĖ. Etanolio koncentracija distiliate nustatyta gravimetrijos metodu. Kokybinė ir kiekybinė metanolio, aukštesniųjų alkoholių (propanolio, izobutanolio ir izoamilo alkoholio) ir kitų lakiųjų junginių (acetaldehido, metilacetato, etilacetato) analizė atlikta dujų chromatografijos metodu naudojant *Hewlett Packard-5890 GC* sistemą su liepsnos jonizacijos detektoriumi (Agilent Technologies, Inc., USA) ir kolonėlę *Zebron ZB-WAX* (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm; 100 % polietilenglikolis; Phenomenex, JAV). Analizės sąlygos: inžektoriaus temperatūra – 200 °C, detektoriaus temperatūra – 250 °C, nešančios dujos – helis, jų tėkmės greitis – 1,2 ml min⁻¹, temperatūra chromatografe keliami palaipsniui: 5 min palaikoma 40 °C temperatūra, po to 4 °C min⁻¹ greičiu keliami nuo 40 °C iki 100 °C ir 2 min palaikoma 100 °C temperatūra. Tiriamųjų junginių koncentracija (mg l⁻¹) apskaičiuota, palyginus smailių plotus su žinomos koncentracijos etaloninių medžiagų smailių plotais.

DON NUSTATYMAS IMUNOFERMENTINIŲ (ELISA) METODU. DON koncentracijai miežių grūduose ir žlaugtuose nustatyti taikytas ELISA metodas. Metodas pagrįstas specifinių antikūnių, žymėtų fermentais, absorbcija tam tikrų polimerų (imunosorbentų) paviršiuose. DON kiekybiniam nustatymui naudotas komercinis rinkinys RIDASCREEN® DON (R-Biopharm AG, Vokietija) pagal pateiktą gamintojo metodiką. Šiuo metodu kartu su DON nustatomas ir 3-AcDON, jų aptikimo riba – 18,5 μg kg⁻¹.

MATEMATINĖ STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ. Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta, naudojant programos *Microsoft Excel* analizės paketą. Duomenų patikimumui vertinti buvo apskaičiuoti jų aritmetiniai vidurkiai, standartinis nuokrypis, dispersija, matavimo paklaida, variacijos koeficientas. Grūdinės žaliavos fermentacija atlikta 2 kartus, tiriant lygiagrečiai 3 mėginius.

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

DON KONCENTRACIJA MIEŽIŲ GRŪDUOSE. *Fusarium* spp. pažeistų miežių grūdų įtaka alkoholinės fermentacijos proceso metu susidariusioms etanolio ir šalutinių produktų koncentracijoms parodyta 1 paveiksle.



1 pav. DON įtaka etanolio (a) ir aukštesnės eilės alkoholių (b), susidariusių fermentuojant *Fusarium* spp. užkrėstus miežius, kiekiui

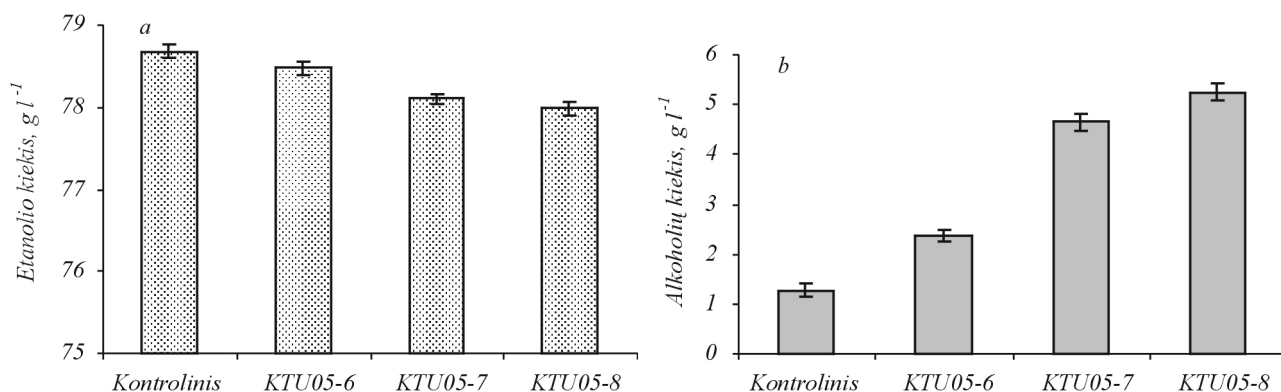
Iš tyrimo rezultatų matyti, kad didėjant DON kiekiui *Fusarium* spp. pažeistuose grūduose, mažėja fermentacijos metu susidariusio etanolio kiekis. Nustatytas etanolio kiekio ir DON koncentracijos miežių grūduose stiprus tiesinis atvirkštinis priklausomumas ($R^2 = 0,868$).

Analizuojant fermentacijos metu susidariusius šalutinius produktus, visuose mėginiuose aptikti aukštesnės eilės alkoholiai: izobutanolis ir izoamilo alkoholis, o kai kuriuose mėginiuose – propanolis. Nustatytas DON koncentracijos tirtroje grūdinėje žaliavoje ir susidariusių fermentacijos metu izobutanolio ir izoamilo alkoholio kiekių stiprus tiesinis priklausomumas ($R^2 = 0,867$). Tokiu būdu, aukštesnės eilės alkoholių kiekio didėjimas buvo proporcingas etanolio kiekio mažėjimui. Kitai šalutinių produktų frakcijai – aldehydams priklausančių junginių (acetaldehido, metilacetato ir etilacetato) nenustatyta.

PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ ĮTAKA FERMENTACIJAI. Tyrimo metu nustatyta *Fusarium* spp. pažeistų miežių grūdų apdorojimo įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis (PRB) įtaka fermentacijos metu (naudojant fermentacijai tą pačią mielių rūšį – *S. cerevisiae*) susidariusiems etanolio ir aukštesnės eilės alkoholių kiekiams (2 pav.).

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad grūdus apdorojus PRB, palyginus su kontrole (naudojant tik mieles), susidarė nepaisant PRB padermės, panašūs etanolio kiekiai.

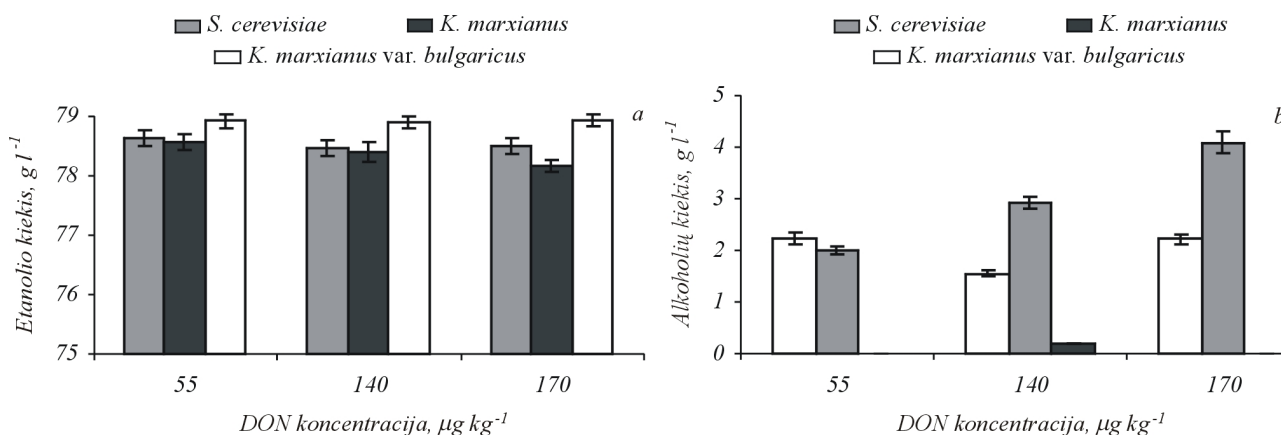
Tačiau grūdų apdorojimas PRB turėjo įtakos šalutinių produktų kiekio padidėjimui fermentacijos metu. Didesni aukštesnės eilės alkoholių kiekiai susidarė, apdorojus užkrėstus miežius KTU05-8 ($5,25 \text{ g l}^{-1}$) ir KTU05-7 ($4,65 \text{ g l}^{-1}$), o mažesnės šių junginių koncentracijos – apdorojus KTU05-6 bakterijomis ($2,38 \text{ g l}^{-1}$).



2 pav. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų (DON koncentracija – $140 \mu\text{g kg}^{-1}$) apdorojimo skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis (PRB) įtaka etanolio (a) ir aukštesnės eilės alkoholių (b), susidariusių fermentuojant *S. cerevisiae* mielėmis, kiekiui

MIELIŲ RŪŠIES ĮTAKA FERMENTACIJAI. Eksperimento metu tirta skirtingų mielių rūšių įtaka fermentacijos metu susidariusiam etanolio ir šalutinių produktų kiekiui (naudojant miežių grūdų apdorojimui tą pačią PRB – KTU05-6). Iš pateiktų rezultatų (3 pav., a) matyti, kad daugiausiai etanolio susidarė, fermentuojant užkrėstus miežius *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielėmis (vi-

duotiniškai $78,9 \text{ g l}^{-1}$), o panaudojus *S. cerevisiae* ir *K. marxianus* mielių rūšis – mažiau (vidutiniškai $78,5 \text{ g l}^{-1}$). Didėjant DON koncentracijai miežiuose nuo 55 iki $170 \mu\text{g kg}^{-1}$, fermentacijos *S. cerevisiae* ir *K. marxianus* metu susidarė šiek tiek mažesni etanolio kiekiai, tuo tarpu, naudojant *K. marxianus* var. *bulgaricus* mieles, nepastebėta etanolio kiekio mažėjimo.

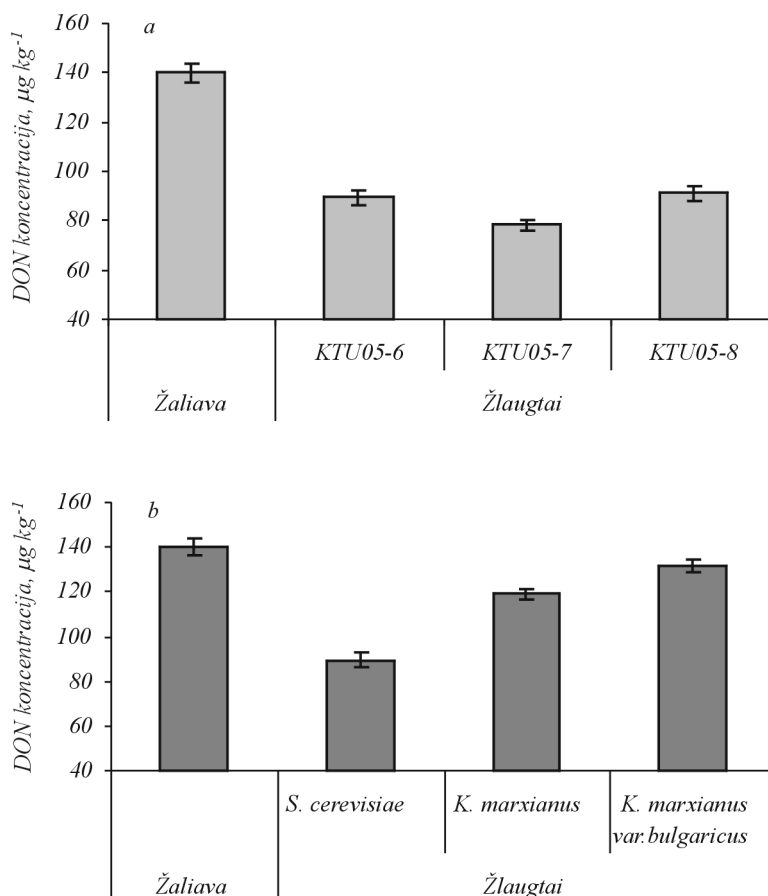


3 pav. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių fermentacijos skirtingų rūšių mielėmis įtaka etanolio (a) ir aukštesnės eilės alkoholių (b) kiekiui

Mielių rūšis taip pat turėjo įtakos šalutinių produktų susidarymui (3 pav., b). Didžiausi aukštesnės eilės alkoholių kiekiai nustatyti, fermentuojant užkrėstus miežius *K. marxianus* mielėmis, mažesni šių junginių kiekiai susidarė naudojant *S. cerevisiae* mieles. Tuo tarpu mėginiuose, fermentuotuose su *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielėmis, praktiškai nesudarė aukštesnės eilės alkoholių. Nustatyta ta pati DON įtakos fermentacijai tendencija, kad didėjant miežiuose DON koncentracijai *S. cerevisiae*

ir *K. marxianus* mielių fermentacijos atvejais nustatyti didesni aukštesnės eilės alkoholių kiekiai.

FUSARIUM SPP. PAŽEISTŲ MIEŽIŲ DETOKSIKACIJA. Tiriant PRB ir mielių derinių panaudojimo *Fusarium* spp. pažeistų miežių grūdų fermentacijos metu susidariusių žlaugtų detoksikacijai galimybes, buvo įvertinti juose DON koncentracijos pokyčiai (4 pav.).



4 pav. DON koncentracija grūdinėje žaliavoje ir žlaugtuose, naudojant miežių perdirbimui į bioetanolį įvairių PRB rūšių derinius su *S. cerevisiae* (a) ir įvairių mielių derinius su *L. sakei* (b)

Tyrimas parodė, kad fuzariozės pažeistų miežių grūdų apdorojimas įvairiomis PRB rūšimis ir fermentacija su *S. cerevisiae* mielėmis leido sumažinti, palyginus su pradine žaliava, DON koncentraciją žlaugtuose nuo 36 iki 44 % (4 pav., a). Didžiausias detoksikuojantis efektas buvo apdorojus *Fusarium* spp. pažeistą grūdinę žaliavą KTU05-7 bakterijomis. Naudojant įvairias mielių rūšis miežių fermentacijai, geriausias efektas žlaugtų detoksikacijai pasiektas su *S. cerevisiae* mielėmis (36 %), kitų tirtų rūšių įtaka DON likučiui žlaugtuose buvo mažesnė (4 pav., b).

Ekspertimentu įrodyta neigiama *Fusarium* spp. taršos įtaka grūdinės žaliavos fermentacijos efektyvumui sutampa su kitų tyrėjų darbais ir šio poveikio priežastingumas literatūros šaltiniuose aiškinamas įvairiai. Vienu atveju *S. cerevisiae* fermentacijos greičio ir etilo alkoholio susidarymo sumažėjimas siejamas su padidintu *Fusa-*

rium mikotoksinų koncentracijų inhibiciniu poveikiu mielių augimui [30]. Pagal Whitehead ir Flannigan [31], trichotecenai inhibuoja mielių mitochondrijų funkcijas ir tai sulėtina mikroorganizmuose deguonies išsiskyrimą bei jų augimo greitį. Kitais atvejais teigiama, kad *Fusarium* spp. pažeistuose grūduose sumažėja mielių veiklai reikalingų mitybinių komponentų (sacharidų ir kt.) kiekiai, ir tai turi neigiamos įtakos etanolio išėigoms [32].

Padidintas šalutinių junginių kiekio susidarymas *Fusarium* spp. pažeistų miežių fermentacijos metu patvirtina, kad mielės turėjo skurdžią fermentacijos terpę. Reinehro ir Furlongo [33] tyrimų rezultatai parodė, kad metanolio ir aukštesnės eilės alkoholių susidarymas salyklo fermentacijos metu priklauso nuo žaliavos pažeistumo mikroskopiniais grybais laipsnio. Autoriai pasiūlė žaliavos užkrėstumą trichotecenais kontroliuoti pagal aukštesnės eilės alkoholių fermentacijos metu susidarymą.

Naudojant *Fusarium* spp. pažeistų kviečių fermentinei hidrolizei *T. reesei* preparatą, nustatytas ženklus metanolio ir metilo acetato, taip pat izoamilo ir izobutilo alkoholių kiekių sumažėjimas, įrodantis ksilanolitinių fermentų panaudojimo misos cukrinimui tikslingumą [29].

Šio darbo metu buvo tiriamos mikroorganizmo rūšies parinkimo galimybės *Fusarium* spp. pažeistos grūdinės žaliavos perdirbimo proceso efektyvumui didinti, skiriant daugiausiai dėmesio miežių grūdų apdorojimui antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiomis PRB.

Apie mielių sąveiką su mikotoksinais jau žinoma seniai [16–19]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad kai kurios mielės sujungia nemažus mikotoksinų kiekius. Atlikti tyrimai patvirtino, kad mielių rūšis yra reikšminga tiek fermentacijos proceso efektyvumo didinimui, tiek žlaugtų detoksikacijai (šiuo atveju panaudota *S. cerevisiae*).

Pastaruju metu mikotoksinų eliminavimui iš maitinamųjų produktų ir pašarų vis labiau taikoma PRB biologinė detoksikacija. Atlikti tyrimai parodė, kad miežių grūdų apdorojimas atrinktomis PRB nepadidino etilo alkoholio išeigos ir neturėjo reikšmingos įtakos šalutinių medžiagų kiekių sumažinimui. Tačiau pastebėtas reikšmingas šio biotechnologinio sprendimo poveikis žlaugtų detoksikacijai, sąlygojantis DON kiekio šioje reikšmingoje pašarams gaminti žaliavoje sumažėjimą. Realizuojant PRB detoksikaciją praktikoje, aktualu žinoti PRB detoksikacijos mechanizmą ir jo valdymo galimybes. Žinoma, kad sąveikaujant PRB ir mikotoksiniams, galimi du specifiniai mikotoksinų detoksikacijos procesai: mikotoksinų įkorporavimas į PRB [12] ir/ar mikotoksinų biosintezės slopinimas [14].

Prenkant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčią PRB padermę (*P. acidilactici*) miežių grūdų apdorojimui derinyje su mielėmis, galima labai padidinti *Fusarium* spp. užkrėstos grūdinės žaliavos perdirbimo efektyvumą: biomasę panaudoti bioetanolio gamybai, o susidariusius žlaugtus – pašarams.

Išvados

1. Grūdų pažeistumas *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais mažino susidariusio etanolio kiekį ($R^2 = 0,868$) ir, priešingai, didino aukštesnės eilės alkoholių koncentraciją ($R^2 = 0,867$).
2. Fermentacijos proceso efektyvumą galima padidinti parenkant mielių rūšį: fermentuojant *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielėmis susidarė daugiausiai etanolio ir mažiausiai aukštesnės eilės alkoholių. Grūdų apdorojimas PRB neturėjo reikšmingos įtakos etanolio išeigai, tačiau didino aukštesnės eilės alkoholių susidarymą; mažiausiai fermentacijos procesą keitė *L. sakei* KTU05-6.
3. Prenkant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčią PRB padermę miežių grūdų apdorojimui, galima padidinti *Fusarium* spp. pažeistos grūdinės žaliavos perdirbimo efektyvumą: biomasę panaudoti bioetanolio gamybai, o susidariusius žlaugtus – pašarams. Didžiausias detoksikuojamasis efektas, mažinantis

DON koncentraciją žlaugtuose 44 %, pasiektas užkrėstą grūdinę žaliavą apdorojant *P. acidilactici* KTU05-7 ar *L. sakei* KTU05-6 ir fermentuojant *S. cerevisiae*.

Padėka

Tyrimą finansavo Lietuvos mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra (Pramoninės biologijos plėtros Lietuvoje 2011–2013 metų programos mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros projektas „Naujas antimikrobinis pieno rūgšties bakterijų bioproduktas ekologiškai auginamų grūdų sveikatingumui didinti (BIOEKOTECH)“). Autoriai taip pat dėkoja už pagalbą Botanikos instituto Biodestruktorių laboratorijai ir fermentus pateikusiai įmonei Novozymes A/S.

Literatūra

1. **CAST (Council for Agricultural Science and Technology)**. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Ames, Iowa, USA, 2003.
2. **Gilbert J., Vargas E. A.** // Journal of Toxicology – Toxin Reviews. 2003. N 22(2–3). P. 381–422.
3. **Jones J. M.** Foods Safety. St. Paul, Minnesota, USA, 2000.
4. **Pettersson H., Aberg L.** // Food Control. 2003. N 14. P. 229–232.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00011-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00011-2)
5. **Jand S. K., Kaur P., Sharma N. S.** // Indian Journal of Animal Sciences. 2005. N 75(4). P. 465–476.
6. **Rock C. L., Lampe J. W., Patterson R. E.** // Annual Reviews. 2000. Vol. 21. P. 47–64.
7. **Sell S.** // Cancer Research. 2003. N 63(22). P. 7553–7562.
8. **Singhal K. K., Kaur H.** // Indian Journal of Animal Sciences. 2005. N 75(1). P. 113–120.
9. 2006 m. gruodžio 19 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006, nustatantis didžiausias leistinas tam tikrų teršalų maisto produktuose koncentracijas. Oficialusis leidinys L, 2006-12-20, Nr. 364.
10. **Champeil A., Fourbet J. F., Dore T., Rossignol L.** // Crop Protection. 2004. N 23. P. 531–537.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.011>
11. **Shetty P. H., Jespersen L.** // Trends in Food Science & Technology. 2006. Vol. 17, N 2. P. 48–55.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.004>
12. **El-Nezami H., Polychronaki N., Lee Y. K., Haskard C., Juvonen R., Salminen S., Mykkänen H.** // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004. N 52(14). P. 4577–4581.
13. **Haskard C. A., El-Nezami H. S., Kankaanpää P. E., Salminen S., Ahokas J. T.** // Applied and Environmental Microbiology. 2001. Vol. 67. P. 3086–3091.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001>
14. **Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S.** // Food and Chemical Toxicology. 2008. Vol. 46, N 4. P. 1398–1407.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.008>
15. **Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D. P.** // Journal of Applied Microbiology. 2006. Vol. 101, N 4. P. 849–856.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x>

16. **Ciegler A., Lillehoj E. B., Peterson R. E., Hall H. H.** // Applied and Environmental Microbiology. 1966. Vol. 14, N 6. P. 934–939.
17. **Madhyastha M. S., Marquart R. R., Masi A., Borsa J., Frohlich A. A.** // Journal of Food Protection. 1994. Vol. 57. P. 48–53.
18. **Scott P. M., Kanhere S. R., Lawrence G. A., Daley E. F., Farber J. M.** // Food Additives and Contaminants. 1995. Vol. 12, N 1. P. 31–40.
<http://dx.doi.org/10.1080/02652039509374276>
19. **Torres P., Guzman-Ortiz M., Ramirez-Wong B.** // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. Vol. 49, N 6. P. 2825–2829.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0007030>
20. **Shetty P. H., Hald B., Jespersen L.** // International Journal of Food Microbiology. 2007. Vol. 113. P. 41–46.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013>
21. **Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A.** // Journal of Applied Microbiology. 2004. Vol. 97. P. 1038–1044.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x>
22. **Devegowda G., Arvind B. I. R., Morton M. G.** // Proceedings of Australian Poultry Science Symposium. Sydney, 1996. P.103–106.
23. **Yiannikouris A., Jouany J.** // Animal Research. 2002. Vol. 51. P. 81–99.
<http://dx.doi.org/10.1051/animres:2002012>
24. **Garda J., Macedo R. M., Faria R., Bernd L., Dors G. C., Badiale-Furlong R. E.** // Food Control. 2005. Vol. 16. P. 423–428.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.05.001>
25. **Scott P. M.** // Mycotoxin Research. 1992. Vol. 8. P. 58–66. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03192217>
26. **Bennett G. A., Richard J. L.** // Food Technology. 1996. Vol. 50. P. 235–238.
27. **Narbutaitė V., Fernandez A., Horn N., Juodeikienė G., Narbad A.** // Letters in Applied Microbiology. 2008. Vol. 47, N 6. P. 555–560.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02466.x>
28. **Digaitienė A., Hansen A. S., Juodeikiene G., Eidukonyte D., Josephsen J.** // Journal of Applied Microbiology. 2012 (priimtas spaudai).
29. **Vidmantienė D., Juodeikiene G., Basinskiene L.** // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006. Vol. 86. P. 1732–1736.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2514>
30. **Palazzini J. M., Ramirez M. L., Torres A. M., Chulze S. N.** // Crop Protection. 2007. Vol. 26. P. 1702–1710.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.004>
31. **Whitehead M. P., Flannigan B.** // Journal of the Institute of Brewing. 1989. Vol. 95. P. 411–413.
32. **Wang J., Pawelzik E., Weinert J., Wolf G. A.** // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53. P. 5818–5823.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf050525g>
33. **Reinehr C. O., Furlong E. B.** // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2003. Vol. 46. P. 587–593.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132003000400013>

D. Černauskas, G. Juodeikienė, D. Vidmantienė,
L. Bašinskienė, E. Bartkienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė

EFFECT OF MICROORGANISMS ON THE FERMENTATION OF BARLEY CONTAMINATED BY *FUSARIUM* SPP., AND ITS DETOXIFICATION

Summary

The work is aimed at increasing the efficiency of the processing of *Fusarium* contaminated barley by pretreating grains with antimicrobial lactic acid bacteria in combination with special selected yeast strains for alcoholic fermentation. Bacteriocins producing lactic acid bacteria (LAB) have been isolated from Lithuanian spontaneous rye sourdoughs. These LABs were attributed to *Lactobacillus* and *Pediococcus acidilactici* KTU05-07 and *P. pentosaceus* KTU05-08 species. PCR detection of LAB structural genes has been carried out. The contamination of barley with *Fusarium* spp. decreases the amount of ethanol during fermentation processes ($R^2 = 0.868$) and, on the contrary, increases the concentrations of higher alcohols ($R^2 = 0.867$). The efficiency of the fermentation process could be increased by selecting yeast strains: a higher ethanol yield and a lower amount of higher alcohols were found by using *K. marxianus* var. *bulgaricus*. The other yeast strain *K. Marxianus*, showed the same effect on fermentation processes as did *S. cerevisiae*. The treatment of contaminated barley with selected LABs has not a significant influence on bioethanol yield; however, by using some LAB strains such as *P. acidilactici* and *P. pentosaceus*, a higher amount of higher alcohols has been developed. Furthermore, in all cases this biotechnological solution has a positive effect on detoxification of dried grains with solubles (DDGS) by decreasing the content of DON in raw material important for feed production. The best detoxification effect has been achieved by using *P. acidilactici* or *L. sakei* for contaminated barley treatment and *S. cerevisiae* for fermentation processes. So, by selecting LABs with antimicrobial effects in combination with yeast, the efficiency of the processing of *Fusarium* contaminated barley can be significantly increased: the biomass could be used for bioethanol production, and DDGS – for feed.