

KSILANOLITINIŲ FERMENTŲ ĮTAKA BIOETANOLIO GAMYBOS IŠ FUZARIOZĖS PAŽEISTŲ GRŪDŲ EFEKTYVUMUI

Elena Bartkienė¹, Bronius Bakutis¹, Violeta Baliukonienė¹, Gražina Juodeikienė², Loreta Bašinskienė², Daiva Vidmantienė²

¹*Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedra, Lietuvos veterinarijos akademija*

tel.: (8~37) 36 23 83; 36 32 59; faks. 36 24 17

el. paštas: elena.bartkiene@lva.lt; zoohig@lva.lt, violeta.baliukoniene@lva.lt; grazina.juodeikiene@ktu.lt

²*Maisto produktų technologijos katedra, Kauno technologijos universitetas*

tel. (8~37) 45 65 57; faks. 45 66 47

el. paštas: loreta.basinskiene@ktu.lt; daiva.vidmantiene@ktu.lt

Santrauka. Darbas skirtas fuzariozės pažeistų kviečių įtakos fermentacijos proceso efektyvumui įvertinti ir aktualioms mikotoksinų detoksikacijos problemoms spręsti. Eksperimento metu analizuota naujų biotechnologinių priemonių – ksilanolitinių fermentinių preparatų, naudojamų kartu su tradiciniais amilolitiniais fermentais – įtaka alkoholinės fermentacijos iš fuzariozės pažeistų kviečių proceso efektyvumui ir deoksinivalenolio (DON) koncentracijos pokyčiui bei jo likučiai pašarams naudojamuose žlaugtuose. DON koncentracijai įvertinti fuzariozės pažeistuose grūduose pritaikytas KTU Maisto produktų technologijos katedroje plėtojamas akustinis metodas. Bioetanolio gamybai atrinkti grūdų mėginiai su didžiausia DON koncentracija (3950 µg/kg).

Nustatyta, kad fuzariozės pažeisti kviečiai daro neigiamą įtaką alkoholinės fermentacijos ir bioetanolio gamybos procesams: susidaro mažesnis alkoholio kiekis raugale (13,5 proc.), o į pašarams naudojamus žlaugtus iš mikotoksinais užkrėstos grūdinės žaliavos pereina 73 proc. DON kiekio. Parinkus optimalius fermentų kiekius, sudarytas kompleksinis amilolitininių fermentų ir beta ksilanazės preparatas. Naujos fermentų kompozicijos taikymas leido padidinti alkoholio koncentraciją raugale 35,3 proc., o kartu ir fuzariozės pažeistų kviečių fermentavimo efektyvumą. Naudojant optimalių amilolitininių fermentų ir beta ksilanazės derinį grūdinei žaliavai sucukrinti, bioetanolio gamybos metu pasiektas didžiausias, tačiau tik dalinis DON detoksikacijos efektas: DON kiekis žlaugtuose, palyginti su žaliava, sumažėjo 51,5 proc. Taigi, norint užkirsti kelią mikotoksinais patekti į pašarų gamybos grandinę, svarbu laiku aptikti ir pašalinti mikotoksinus grūdinėje žaliavoje. Įrodyta, kad aptinkant DON fuzariozės pažeistuose kviečiuose gali būti pritaikytas akustinis metodas.

Raktažodžiai: deoksinivalenolis (DON), fuzariozės pažeisti kviečiai, ksilanolitiniai fermentai, bioetanolis, žlaugtai, akustinis metodas.

EFFECT OF XYLANOLYTIC ENZYMES ON THE EFFICIENCY OF BIOETANOL PRODUCTION FROM *FUSARIUM* CONTAMINATED GRAINS

Elena Bartkienė¹, Bronius Bakutis¹, Violeta Baliukonienė¹, Gražina Juodeikienė², Loreta Bašinskienė², Daiva Vidmantienė²

¹*Department of Food Safety and Animal Hygiene, Lithuanian Veterinary Academy*

Phone: (8~37) 36 23 83; 36 32 59; faks. 36 24 17

E-mail: elena.bartkiene@lva.lt; zoohig@lva.lt, violeta.baliukoniene@lva.lt; grazina.juodeikiene@ktu.lt

²*Department of Food Technology, Kaunas University of Technology*

Phone: 45 65 57; fax. 45 66 47

E-mail: loreta.basinskiene@ktu.lt; daiva.vidmantiene@ktu.lt

Summary. The study is dedicated to investigate the influence of *Fusarium* contaminated wheat on the efficiency of a fermentation process and to show the actual problem of mycotoxin detoxification through fermentation. During the experiment the influence of new biotechnological means: xylanolytic enzymes in combination with traditional amylolytic enzymes on the efficiency of an alcoholic fermentation of *Fusarium* contaminated wheat and deoxynivalenol (DON) detoxification in the DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles), usually used for feed, was analysed. The acoustic method developed in the Department of Food Technology, Kaunas University of Technology was used for the determination of DON in *Fusarium* contaminated grains. Wheat with high concentration of DON (3950 µg/kg) was used for bioethanol production.

The results showed that *Fusarium* contaminated wheat has a negative influence on alcoholic fermentation and on the bioethanol production processes: the quantity of alcohol was on 13.5 % lower than in the case of wholesome grain fermentation and 73 % of DON came into DDGS. The application of a new combination of amylolytic and xylanolytic enzymes for cereal saccharification allowed to increase the concentration of alcohol in the broth by 35.3 % and in the same way increased the efficiency of the fermentation process of *Fusarium* contaminated wheat. By using this enzyme combination, the highest degree (51.5 %) of partial detoxification of DON was achieved during the fermentation process. Therefore, cereal material must be properly investigated before bioethanol production to avoid that higher amounts of mycotoxins come in the residue and onwards in feed. The experiment proved that the acoustic method can be used

for the rapid quantitative determination of DON in grain.

Keywords: deoxynivalenol (DON), wheat, xylanolytic enzymes, bioethanol, Dried Distillers Grains with Solubles (DDGS), acoustic method.

Įvadas. Grūdų produktai sudaro 60 proc. žmogaus mitybos raciono ir yra viena iš pagrindinių žaliavų tiek žmogaus mitybos produktų, tiek ir pašarų gamyboje, todėl labai svarbu, kad jie atitiktų ES galiojančius reglamentus. Ypatingas dėmesys skiriamas teršalams – mikotoksinams, susidarantiems grūdų auginimo ir laikymo metu. Kokybei užtikrinti turi būti kontroliuojama visa grūdų gamybos ir perdirbimo grandinė, pradedant pirmine grūdų gamyba ir baigiant produktų realizavimu vartotojui (CAST, 2003).

Mikotoksinius gaminantys mikroskopiniai grybai ardo grūdus, keičia jų struktūrą, o pasigaminę toksinai užkrečia maistą bei gyvulių pašarus (Gilbert and Vargas, 2003). Vien tik augalų mikroskopiniai grybai sukelia apie 10 tūkst. įvairių ligų (Jones, 2000). Tokių ligų pavyzdžiu galėtų būti kviečių, rugių ir miežių „raukšlėjimasis“ („šašų“ liga), kurį sukelia *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai, dar vadinami dirvos pelėsiomis (Placinta et al., 1999). Kviečiai priskiriami prie jautriausių šiam susirgimui javų ir gali būti pavojingas *Fusarium* genties mikroskopinių grybų gaminamų mikotoksinų, taip pat ir deoksinivalenolio (DON) arba vomitoksino, šaltinis (Van Egmond, Jonker, 2003).

DON pavojingas ir žmonėms, ir gyvuliams. Jis gali pažeisti žinduolių organus, silpninti imuninę sistemą ir mažinti gyvulių produktyvumą (Jand et al., 2005; Peraica et al., 1999; Rock et al., 2000; Sel, 2003; Singhal and Kaur, 2005). Net ir santykinai mažas DON kiekis grūduose daro neigiamą poveikį gyvuliams (Bakutis, 2004). Kiaulėms jis pasireiškia, kai pašaruose DON kiekis yra mažesnis nei 350 µg/kg, todėl Europos pašarų gamintojų federacija (FEFAC) pasiūlė, kad kiaulių pašarams gaminti skirtuose grūduose DON neturi viršyti 750 µg/kg. Dabartinis grūdų užkrėstumo mikotoksinais lygis paskatino ES priimti naują reglamentą (Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006), nustatantį didžiausias leistinas DON ir kitų teršalų maisto produktuose koncentracijas. Pagal šį reglamentą DON neperdirbtuose grūduose, išskyrus kietuosius kviečius, avižas ir kukurūzus, neturi viršyti 1250 µg/kg, o tiesiogiai žmonėms vartoti skirtuose grūduose – 750 µg/kg.

Su grūdų užkrėstumu DON kovoti sunku, nes *Fusarium* genties mikroskopinių grybų vystymasis ir mikotoksinų susidarymo intensyvumas priklauso tik nuo klimato sąlygų grūdų vegetacijos laikotarpiu (Champeil et al., 2004). Ypač palankios sąlygos *Fusarium* genties mikroskopinių grybų plitimui susidaro tuose regionuose, kur kritulių iškrenta daugiau nei išgaruoja. Lietuva taip pat priskiriama tokiems regionams.

DON ir jo acetilo dariniai 3-AcDON ir 15-AcDON bei nivalenolis (NIV) yra labiausiai (po aflatoksino) paplitę augaliniuose produktuose mikotoksinai (Pettersen and Åberg, 2003), todėl akivaizdu, jog jų analizei turėtų būti skirta pakankamai daug dėmesio.

Pasaulinėje praktikoje mikotoksinams nustatyti iki šiol dažniausiai taikomi daug darbo jėgos ir laiko reikalaujan-

tys pamatiniai cheminiai ir fizikiniai mikotoksinų analizės metodai – plonasluoksnė chromatografija (PLC), skysčių chromatografija (SC) arba dujų chromatografija (DC) su įvairiais detektoriais, įskaitant ir masių spektrometriją (MS), o iš naujesnių metodų – DC su liepsnos jonizacijos detektoriumi (LJD), skirtas kviečiuose esančio DON, ekstrahuoto CH₃CN/H₂O ir išgryninto pagal Mycosep metodiką, nustatymui (Scott et al., 1993; Kos et al., 2004; Smith and Moss, 1985; Bhatnagar et al., 2003; Calvo et al., 2002; Trucksess and Pohland, 2002; Whitaker, 2003; Growi et al., 2003; Mishra and Das, 2003), taip pat ELISA, PCR ir kt. (Börjesson and Olsson, 2004; CAST, 2003).

Esant daugiapakopei mikotoksinų analizei, pakartotinių tyrimų rezultatai gali tarpusavyje smarkiai skirtis. Be to, šie skirtumai didėja didėjant mikotoksinų koncentracijai tiriamajame ėminyje.

Įvertinus tai, kad mikotoksinų tyrimų metodai sudėtingi ir brangūs, grūdų produktų gamybos procesuose išskirtinis dėmesys turi būti kreipiamas technologinėms priemonėms, mažinančioms mikotoksinius. Literatūroje yra duomenų apie įvairių fizikinių, cheminių ir biologinių priemonių, kurios gali suardyti, modifikuoti ar absorbuoti mikotoksinius, taikymą mikotoksinų detoksikacijai. Viena iš priemonių, efektyviai mažinančių mikotoksinų kiekį galutiniame produkte, yra grūdų valymas (Lee et al., 1992; Trigo–Stockli, 2002). Įrodyta, kad terminio apdorojimo (virimo) metu DON kiekį galutiniame produkte galima sumažinti 25 proc. (Dexter et al., 1997; Visconti et al., 2004). Pastaruoju metu mikotoksinams eliminuoti iš maisto produktų ir pašarų vis plačiau taikoma biologinė detoksikacija. Išskirta ir identifiukuota daugiau kaip 20 bakterijų ir mielių rūšių, pasižyminčių detoksikuojančiomis savybėmis (Schatzmayr et al., 2004). Nustatyta, kad grūdinės žaliavos alkoholinės fermentacijos metu DON koncentraciją žlaugtuose gali sumažinti iki 53 proc. (Garda et al., 2004; Scott, 1992), o duonoje, keptoje iš fermentuotos kvietinės tešlos, – 41–56 proc. (Samar et al., 2001). LVA tyrėjų grupės (Bakutis et al., 2005) duomenimis, naudojant mielių priedą pašaruose, priklausomai nuo mielių rūšies, DON kiekį juose galima sumažinti 48–85 proc.

Palyginti su ES ir kitomis šalimis Lietuvoje grūdų auginama nedaug, todėl jų nedaug eksportuojama, tačiau šalyje, skirtingai nei ES, didėja kombinuotųjų pašarų gamyba (Agro Rinka, 2006). Gyvulininkystės reikmėms kasmet sunaudojama beveik 1 mln. t grūdų, be baltyminių bei kitų šėrimui reikalingų priedų. Pažymėtina, kad Lietuvoje sparčiai plečiama ir biodegalų gamyba. Kaip bioetanolio gamybos atliekos lieka žlaugtai, kurie gali būti sėkmingai naudojami kombinuotųjų pašarų gamyboje. Svarbu, kad šios, bioetanolio gamybos metu gautos, atliekos būtų saugios pašarų gamybai. Taigi, tiriant fuzariozės pažeistų grūdų panaudojimo bioetanolio gamyboje galimybes, tikslinga ištirti skirtingų biotechnologinių priemonių – grūdinės žaliavos fermentinės hidrolizės ir alkoholi-

nės fermentacijos *Sacharomyces cerevisiae* mielėmis įtaką DON kiekiui gamybos atliekose (žlaugtuose).

Darbo tikslas – nustatyti ksilanolitinių fermentų, naudojamų kartu su tradiciniais amilolitininiais fermentais, įtaką bioetanolio gamybos iš fuzariozės pažeistų kviečių efektyvumui, deksinivalenolio (DON) koncentracijos pokyčiams fermentacijos metu ir jo likučiu pašarams naudojamuose žlaugtuose.

Medžiagos ir metodai. *Grūdinė žaliava ir jos paruošimas.* Tyrimo objektas – fuzariozės pažeistų minkštųjų kviečių kolekcija (2004–2005 m.), gauta iš Vokietijos „Neuss“ (6 mėginiai) ir „Mannheim“ malūnų (9 mėginiai). Bioetanolio gamybai naudoti kviečiai su didžiausia DON koncentracija (3950 µg/kg), gauti iš Nyderlandų augalų tyrimo instituto (PRI) Lelystad stoties. Palyginamiesiems tyrimams naudoti sveiki, mikotoksiniais neužkrėsti minkštųjų kviečių grūdai, gauti iš AB „Kauno grūdai“. Grūdinė žaliava, pašalinus priemaišas, sumalta laboratoriniu malūnu „WZ-1“ (ZBPP, Lenkija). Tiriant grūdus akustiniu spektrometru, analizuota 16 mėginių, matavimai kartoti 6 kartus.

Bioetanolio gamyba laboratorinėmis sąlygomis. Grūdinės žaliavos fermentavimui naudota žemų temperatūrų etanolio gamybos technologinė schema (1 pav.). Fermentacija atlikta vieną kartą, lygiagrečiai tiriant 3 mėginius.

Susmulkinta žaliava (100 g) sumaišyta su 35°C temperatūros vandeniu santykiu 1:5 ir kaitinta 90°C temperatūros vandens vonioje 30 min. Grūdinės žaliavos fermentinė hidrolizė atlikta dviem etapais – masės suskystinimas ir sucukrinimas. Suskystinimui ir sucukrinimui naudotų fermentinių preparatų charakteristikos ir kiekis pateikti

Lentelė. Fermentinių preparatų charakteristikos

Fermentų preparatai	Mikro-organizmas	Aktyvumas, 1 g preparato	Optimali temp., °C	Optimalus pH	Fermentų kiekis, 100 g žaliavos
Alfa amilazė	<i>Bacillus subtilis</i>	2350 AV*	60–70	6,0–6,5	150 AV
Gliukoamilazė	<i>Aspergillus awamori</i>	2500 GV**	55–65	5,0–6,0	300 GV
Beta ksilanazė/ Beta gliukanazė/ celiulazė	<i>Trichoderma reesei</i>	2540 KV***	50–60	5,0–6,0	100–250 KV

* AV – alfa amilazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, katalizuojantis 1 g tirpaus krakmolo hidrolizę iki įvairios molekulinės masės dekstrinų, atliekant hidrolizę nustatytais sąlygomis (30°C, 10 min., pH 6,0).

** GV – gliukoamilazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris veikdamas tirpaus krakmolo hidrolizę nustatytais sąlygomis (30°C, pH 4,7) per 1 min. išlaisvina 1 µmol gliukozės.

*** KV – beta ksilanazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris veikdamas ksilano hidrolizę nustatytais sąlygomis (50°C, pH 6,0) per 1 min. išlaisvina 1 µmol ksilozės.

Apie fermentacijos proceso efektyvumą buvo sprendžiama pagal rūgštingumą, sausųjų medžiagų kiekį sucukrintoje masėje ir raugale bei alkoholio kiekį raugale. Kad sausajame likutyje (žlaugtuose) būtų nustatytas DON kiekis, fermentuota masė po filtravimo ir džiovinimo analizuota ELISA metodu.

Fuzariozės pažeistų grūdų analizė akustiniu metodu. DON kiekiui fuzariozės pažeistų grūdų masėje nustatyti pritaikytas akustinis metodas, naudojant akustinį spekt-

Lentelėje. Masės suskystinimui naudota bakterinė alfa amilazė ir fermentuota 65°C temperatūroje 90 min. (terpės pH 6,0–6,5). Tada masė cukrinta 55°C temperatūroje (trukmė 120 min., pH 5,0–6,0), su gliukoamilaze ir beta ksilanaze (Lentelėje nurodytas kiekis). Sucukrinta masė atvėsinta iki 30°C temperatūros ir rauginta 30–33°C temperatūroje 72 h su *Sacharomyces cerevisiae* mielėmis (5,0±0,1 g).

Malta grūdinė žaliava/vanduo (1:5)
Masės kaitinimas 90°C, 30 min.
Masės skystinimas alfa amilaze 65°C, 90 min., pH 6,0–6,5
Masės sucukrinimas gliukoamilaze ir beta ksilanaze 55°C, 120 min., pH 5,0–6,0
Fermentavimas <i>S. cerevisiae</i> mielėmis 30–32°C, 72 h
Raugalo distiliavimas

1 pav. Alkoholio gamybos iš augalinės žaliavos technologijos schema

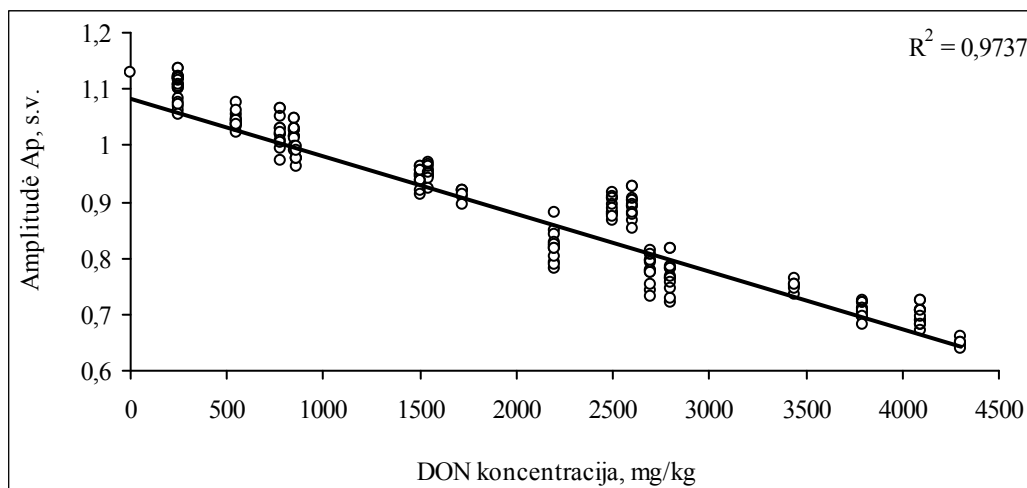
Žaliavos suskystinimui ir sucukrinimui naudotų fermentinių preparatų charakteristikos ir kiekis nurodyti Lentelėje.

rometrą, veikiantį žemų (4,95–35,71) dažnių kHz diapazone (Juodeikiene ir kt., 2004). Kiekvienas mėginys (iš viso 16) tirtas 6 kartus. Nustatyta, kad tarp akustinio signalų parametru ir DON koncentracijos fuzariozės pažeistuose kviečiuose (nustatytos ELISA metodu) yra stiprus atvirškintis tiesinis ryšys ($R^2 = 0,95–0,98$). Apskaičiuotas rezultatų kartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD (r) < 6 proc., kai DON koncentracija > 500 µg/kg, ir RSD (r) < 17 proc., kai DON koncentracija 100–500

$\mu\text{g}/\text{kg}$, bei HORRAT (r) rodiklio vertės 0,31–0,83 parodė, kad akustinis metodas yra gana tikslus ir tinkamas grūdiniuose žaliavoje aptikti DON (Juodeikiene et al., 2008).

Analizuota 200 g tiriamojo grūdų ėminio, iš kurio pašalintos priemaišos. Ėminio dalis supilta į matavimo indą, kurio dugnas padengtas pralaidžia garsui medžiaga (kapronu), grūdų sluoksnio storis – 30 mm, ir išmatuota perėjusio per grūdų sluoksnį akustinio signalo amplitudės ver-

tė (A_p). Matavimai atlikti esant optimaliam akustinio signalo dažniui – 24,28 kHz, kuriame A_p standartinio nuokrypio ir variacijos koeficiento vertės buvo mažiausios, atitinkamai 0,0187 ir 0,0059. DON koncentracija tiriamuose kviečių mėginiuose nustatyta pagal sudarytą kalibracinę kreivę tarp DON koncentracijos, nustatytos kviečių modelinėse sistemose ELISA ir akustiniu metodu (2 pav.)

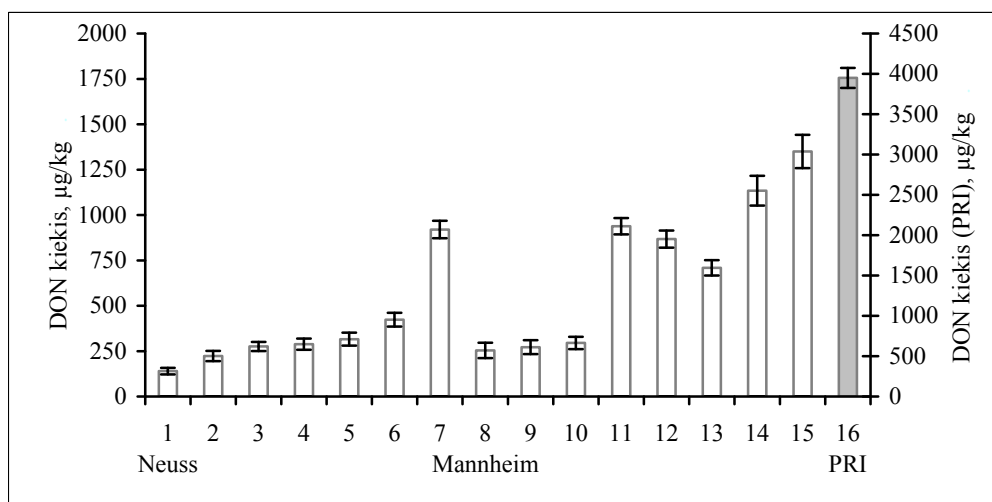


2 pav. Akustinio signalo amplitudės A_p , išmatuotos akustiniu spektrometru, priklausomybė nuo DON koncentracijos kviečių modelinėse sistemose

DON nustatymas imunofermentiniu (ELISA) metodu. DON koncentracija žlaugtuose nustatyta ELISA metodu. Metodas pagrįstas specifinių antikūnų, žymėtų fermentais, absorbcija tam tikrų polimerų (imunisorbentų) paviršiuose. DON kiekiui nustatyti naudotas rinkinys „Veratox[®] DON 5/5 Quantitative Test Kit“ (Neorgen Corporation, JAV). DON aptikimo ir nustatymo ribos – atitinkamai 100 ir 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Šiuo metodu kartu su DON nustatomas ir 3-AcDON.

Fermentinės hidrolizės ir rūgimo procesų efektyvumo įvertinimas. Alkoholinės fermentacijos efektyvumas įver-

tintas nustačius rūgštingumą ir tirpių sausųjų medžiagų kiekį sukurintoje masėje ir raugale bei raugalo stiprumą. Šiems rodikliams nustatyti taikyti standartiniai tarptautinėje praktikoje įprasti metodai: tirpių sausųjų medžiagų kiekiui – refraktometrinis (AACC-68-62, 1999), alkoholio kiekiui – tiesioginės distiliacijos ir aerometrijos (AOAC 982.10, 1995). Rūgštingumas nustatytas titrimetrinės analizės metodu. Vienas rūgštingumo laipsnis (1°) atitinka 1 ml 1 M NaOH, reikalingą 20 ml filtrato esančioms laisvosioms rūgštims neutralizuoti.



3 pav. DON koncentracijos minkštųjų kviečių iš Vokietijos („Neuss“ ir „Mannheim“ malūnų) ir Nyderlandų (augalų tyrimo instituto PRI) mėginiuose, nustatytos akustiniu spektrometru

Matematinė statistinė duomenų analizė. Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta su „Analyse-it.“ programos paketu. Duomenims įvertinti apskaičiuoti jų aritmetiniai vidurkiai, standartinis nuokrypis, dispersija, matavimo paklaida, variacijos koeficientas. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti naudota dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška. Matuojamų parametrų vidurkiui tarp duomenų grupių įvertinti taikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (ANOVA). Faktoriaus reikšmingumo lygmuo nustatytas pagal Fišerio kriterijų, kai patikimumas 95 proc.

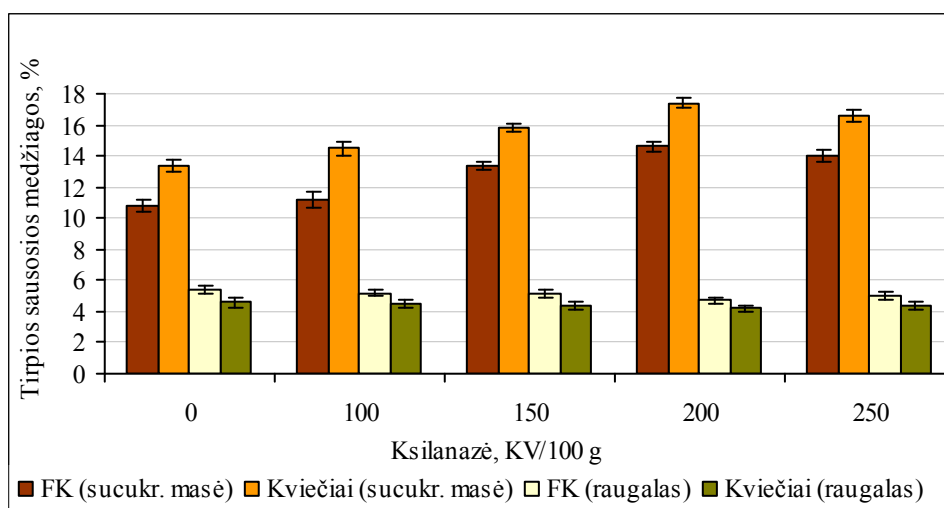
Tyrimų rezultatai. Fuzariozės pažeistų kviečių tyrimas akustiniu metodu. DON kiekiai, nustatyti kviečių kolekcijos, kurią sudarė iš Vokietijos ir Nyderlandų gauti fuzariozės pažeisti grūdai, mėginiuose, pateikti 3 pav.

Tyrimų duomenimis, 16 kviečių mėginiuose DON koncentracija svyravo nuo 140 iki 3950 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tarp jų mėginiuose iš „Neuss“ malūno – nuo 140 iki 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iš „Mannheim“ malūno – nuo 254 iki 1350 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tik viename mėginyje, gautame iš „Mannheim“ malūno, DON koncentracija viršijo 2006 m. gruodžio 19 d. Komisijos reglamente (EB) Nr. 1881/2006 nurodytą didžiausią leistiną neperdirbtuose grūduose (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Didžiausia DON koncentracija (3950 $\mu\text{g}/\text{kg}$), net 3,16 karto viršijanti reglamentuojamą kiekį, nustatyta kviečiuose, gautuose iš Nyderlandų augalų tyrimo instituto (PRI) Lelystad stoties. Šie kviečiai panaudoti bioetanolio gamybai.

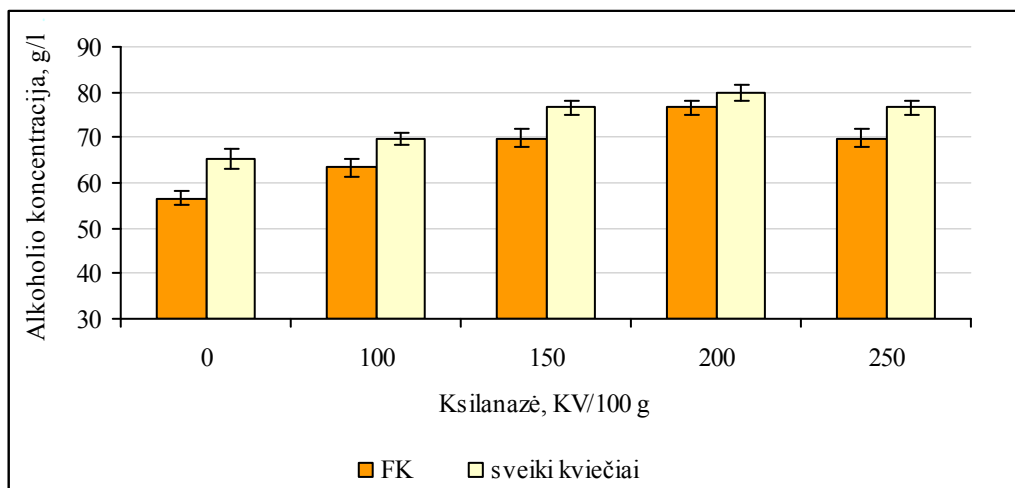
Ksilanazės priedo įtaka fuzariozės pažeistų kviečių fermentavimui. Sausųjų medžiagų sucukrintoje masėje analizė parodė, kad fuzariozės pažeistų kviečių fermentinė hidrolizė vyko blogiau nei sveikų kviečių. Fermentavimui naudojant tik amilolitinius fermentus, sucukrintoje masėje iš fuzariozės pažeistų kviečių palyginti su nepažeistais nustatyta 19,4 proc. mažiau tirpių sausųjų medžiagų (4 pav.). Tokių grūdų masės alkoholinė fermentacija taip pat vyko silpniau. Alkoholio koncentracija rauga-

le iš fuzariozės pažeistų kviečių buvo 13,5 proc. mažesnė nei kontroliniame mėginyje (5 pav.), o tirpių sausųjų medžiagų kiekis – 17,4 proc. didesnis. Tas taip pat rodo mažesnę suraugintų angliavandenių kiekį. Terpės rūgštingumo analizės metu pastebėta, kad fermentuojant fuzariozės pažeistus kviečius, lyginant su kontroliniu mėginiu, susidarė daugiau organinių rūgščių. Perdirbant tokius grūdus, sucukrintos masės ir raugalo rūgštingumas buvo 2 ir 1,4 karto didesnis, nei fermentuojant sveikus kviečius (6 pav.).

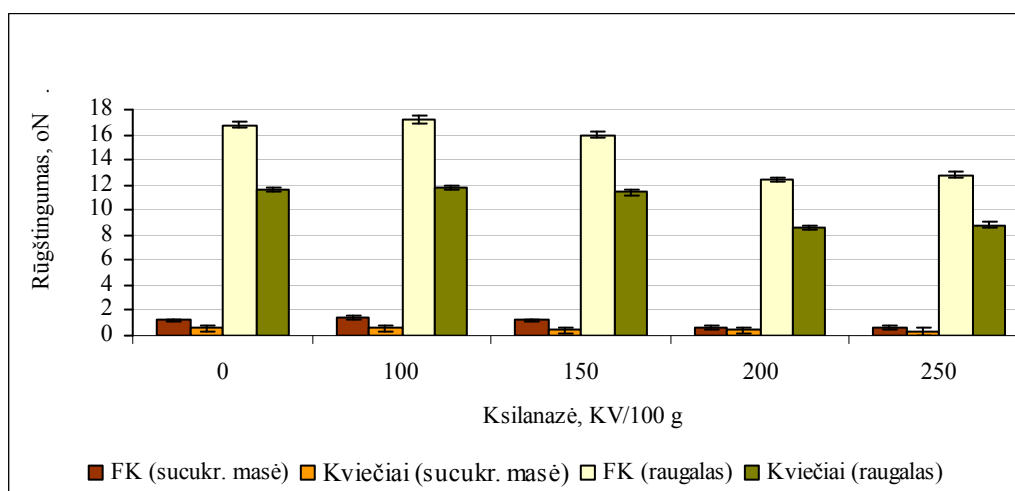
Fermentuojant fuzariozės pažeistus kviečius, be tradiciškai naudojamų amilolitinių fermentų (alfa amilazės ir gliukoamilazės), išbandyta skaidulinių medžiagų polisacharidus skaldanti grybinė beta ksilanazė. Tyrimo rezultatai parodė, kad fuzariozės pažeistų grūdų fermentinei hidrolizei naudojant įvairių beta ksilanazės priedo kiekį (100–250 KV), lyginant su amilolitinių fermentais, tirpių sausųjų medžiagų kiekis sucukrintoje masėje padidėjo 3,7–35,2 proc., o hidrolizuojant sveikus kviečius – 8,2–29,9 proc. (4 pav.). Beta ksilanazės priedas turėjo teigiamą įtaką ir sucukrintos masės alkoholinės fermentacijos procesui. Grūdų masei apcukrinti naudojant amilolitinių ir ksilanolitinių fermentų kompleksą, alkoholio kiekis raugale iš fuzariozės pažeistų grūdų padidėjo 12–35,3 proc., o iš sveikų grūdų – 6,9–22,2 proc. (5 pav.). Tačiau visais atvejais raugale iš fuzariozės pažeistų kviečių, lyginant su neužkrėstais kviečiais, alkoholio kiekis buvo 4,3–10,3 proc. mažesnis, o tirpių sausųjų medžiagų – 12–16 proc. didesnis. Beta ksilanazės priedas taip pat sumažino sucukrintos terpės rūgštingumą iki optimalaus *Sacharomyces cerevisiae* mielėms veikti (0,4–0,7°). Tas taip pat rodo teigiamą šio fermento įtaką rūgimo procesui. Pastebėta, kad didžiausias teigiamas beta ksilanazės poveikis fermentacijos procesui yra naudojant optimalų jos kiekį. Kviečių fermentacijos atveju šis kiekis sudarė 200 KV/100 g grūdinės žaliavos.



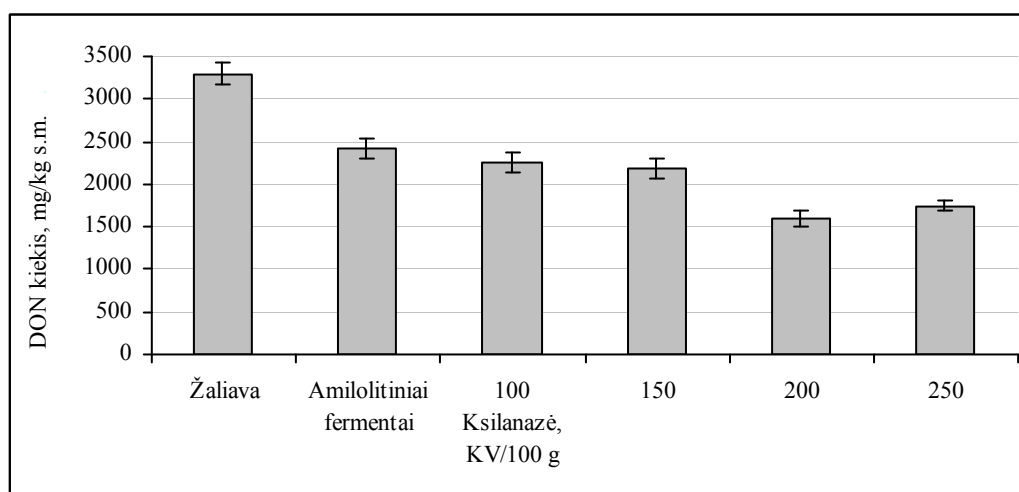
4 pav. Ksilanazės įtaka tirpių sausųjų medžiagų kiekiui sucukrintoje masėje ir raugale iš sveikų ir fuzariozės pažeistų kviečių (FK – fuzariozės pažeisti kviečiai; 0 – mėginyje tik su amilolitinių fermentais)



5 pav. Ksilanazės įtaka alkoholio koncentracijai raugale iš sveikų ir fuzariozės pažeistų kviečių (FK – fuzariozės pažeisti kviečiai; 0 – mėginys tik su amilolitiniais fermentais)



6 pav. Ksilanazės įtaka rūgštingumo pokyčiams sucukrintoje masėje ir raugale iš sveikų ir fuzariozės pažeistų kviečių (FK – fuzariozės pažeisti kviečiai; 0 – mėginys tik su amilolitiniais fermentais)



7 pav. DON koncentracija grūdinėje žaliavoje ir žlaugtuose po alkoholinės fermentacijos naudojant amilolitininius fermentus ir jų derinius su įvairiu beta ksilanazės kiekiu

Alkoholinės fermentacijos įtaka DON detoksikacijai.

Bandymo metu įvertinta amilolitinių ir ksilanolitinių fermentų įtaka DON kiekiui bioetanolio gamybos atliekose – žlaugtuose (7 pav.).

Tyrimai parodė, kad fuzariozės pažeistų kviečių fermentavimui naudojant tradicinius amilolitinius fermentus, bioetanolio gamybos atliekose DON nustatyta 26,7 proc. mažiau nei pradinėje žaliavoje. Beta ksilanazės priedu cukrinant grūdinę žaliavą, DON koncentraciją žlaugtuose galima sumažinti dar labiau – 31,5–51,5 proc. Didžiausias detoksikuojamasis efektas pasiektas pridėjus beta ksilanazės 200 KV/100 g žaliavos.

Aptarimas ir išvados. Apibendrinant tyrimų rezultatus galima teigti, kad fuzariozės pažeisti kviečiai daro neigiamą įtaką alkoholinės fermentacijos ir bioetanolio gamybos procesams. Daugelis tyrėjų (Samar et al., 2001) taip pat teigia, kad *Fusarium* patogenais užkrėstuose grūduose susidaranti medžiaga ne tik kelia pavojų žmonių sveikatai, bet ir veikia kaip technologinių procesų inhibitoriai. P. B. Schwarz ir kitų tyrėjų (1996) nuomone, mikotoksinai, ypač DON ir ergosterolis, stabdo mielių biomasės augimą ir fermentų sintezę bei skatina nepageidaujamus technologinio proceso nukrypimus.

Eksperimentas parodė, kad ksilanolitiniai fermentai kartu su amilolitinais teigiamai veikia fuzariozės pažeistų kviečių fermentinės hidrolizės, kartu ir fermentacijos procesą, taip pat daro teigiamą poveikį DON kiekio mažėjimui žlaugtuose.

Mūsų tyrimų rezultatai sutampa su D. Vidmantienės ir grupės tyrėjų (2006) atliktais bioetanolio gamybos iš grūdų ir jų atliekų tyrimais, kuriais nustatyta, kad grūdinės žaliavos hidrolizei panaudojus kompleksinį fermentinį preparatą, sudarytą iš alfa amilazės, gliukoamilazės ir beta ksilanazės, padidėjo etanolio išeiga jame, sumažėjo priemaišų (aukštesniųjų alkoholių, metanolio). Teigiamą beta ksilanazės poveikį tyrėjai aiškina grūdų arabinoksilanų skilimu iki pentozų veikiant šiems fermentams. Nors pentozės paprastai nėra fermentuojamos *S. cerevisiae* mielių, dalyvaudamos mielių biomasės sintezėje jos gali padidinti mielių gebėjimą gaminti alkoholį. Alkoholio koncentracijos padidėjimui įtaką gali daryti ir sinergetinis beta ksilanazėje esančių kitų ksilanolitinių fermentų (celiulazės, gliukanazės) veikimas. Šie fermentai depolimerizuoja skaidulinių medžiagų polisacharidus iki monosacharidų ir didina heksozių koncentraciją fermentuojamoje terpėje.

Literatūros duomenimis, DON kiekis gali mažėti dėl mielių gebėjimo absorbuoti ir modifikuoti šį mikotoksiną, susidarant įvairiems tirpiems junginiams (Garda et al., 2004), todėl po filtracijos žlaugtuose DON lieka mažiau. Įvairūs fermentai, naudojami grūdinei žaliavai sucukrinti, lemia skirtingų metabolitų susidarymą. Galima teigti, kad daugiau tokių junginių susidarė, kai, be tradicinių sucukrinimui amilolitinių fermentų, papildomai buvo naudojamas beta ksilanazės priedas. Pastebėta, kad didinant jo kiekį iki optimalaus (200 KV/100 g žaliavos), fermentacijos metu DON detoksikacijos efektas didėja.

Tikėtina, kad masės kaitinimas (šutinimas) prieš fermentinę hidrolizę taip pat gali būti viena iš DON kiekio sumažėjimo priežasčių. Kai kurie tyrėjai (Samar et al.,

2001) nustatė, kad 50°C temperatūroje fermentuojant kvietinę tešlą, DON produkte sumažėjo 49–56 proc. Jų nuomone, DON mažėjimas gali būti susijęs ne tik su temperatūra, bet ir su procesais, vykstančiais mielių fermentacijos metu.

G. Devegowda su mokslininkais (1998) nustatė, kad modifikuotas mielių ląstelių mananogigosacharidas turi savybę efektyviai prisijungti aflatoksinus, o kiek silpniau – ochratoksinus ir *Fusarium* toksinus. Manoma, kad gliukomananai, išskirti iš išorinės *S. cerevisiae* mielių ląstelių sienelės dalies, gali absorbuoti mikotoksinus (Yiannikouris, Jouany, 2002). Kiti tyrėjai taip pat patvirtino fermentacijos metu vykstančios toksinų biotransformacijos įtaką jų kiekio mažėjimui. J. Garda ir grupei tyrėjų (2004), 120 val. atliekant slyklo alkoholinę fermentaciją 14°C temperatūroje, pavyko DON kiekį misoje sumažinti 53 proc.

Alkoholinė fermentacija nėra pakankamai efektyvus procesas visiškai DON detoksikacijai. Pagal P. M. Scott (1992) atliktus tyrimus, fermentuojant *S. cerevisiae* mielėmis slyklą, užkrėtą DON ir zearalenonu, DON išliko stabilus po 7–9 dienų fermentacijos. G. A. Bennet ir J. L. Richard (1996) atlikti tyrimai parodė, kad DON nebuvo visiškai suskaidytas alkoholinės fermentacijos metu. Gana didelė DON koncentracija buvo nustatyta tiek fermentuotos masės filtrate, tiek jos sausajame likutyje.

Dėl šių priežasčių DON kiekiui kviečiuose nustatyti tikslinga įdiegti į grūdų priėmimo linijas greitą nekontaktinį akustinį metodą, kuris leistų ženkliai padidinti šio mikotoksino analizės efektyvumą ir užtikrinti grūdų saugą, užkirstų kelią fuzariozės pažeistiems grūdams patekti į gamybą.

Išvados

1. Fuzariozės pažeisti kviečiai daro neigiamą įtaką alkoholinės fermentacijos ir bioetanolio gamybos procesams: susidaro 13,5 proc. mažesnis alkoholio kiekis, o į pašarams naudojamus žlaugtus iš mikotoksinais užkrėstos žaliavos pereina 73 proc. DON.

2. Sudarytas kompleksinis amilolitinių fermentų ir beta ksilanazės preparatai grūdinei žaliavai sucukrinti (150 AV alfa amilazės, 300 GV gliukoamilazės, 200 KV beta ksilanazės 100 g žaliavos) padidino alkoholio koncentraciją raugale 35,3 proc., kartu – ir fuzariozės pažeistų kviečių fermentavimo efektyvumą.

3. Naudojant sudarytą amilolitinių fermentų ir beta ksilanazės derinį, bioetanolio gamybos metu pasiektas didžiausias, tačiau tik dalinis DON kiekio sumažinimo efektas: DON žlaugtuose palyginti su žaliava sumažėjo 51,5 proc. Taigi, norint užkirsti kelią mikotoksiniams patekti į pašarų gamybos grandinę, svarbu laiku juos aptikti grūdinėje žaliavoje ir pašalinti.

Literatūra

1. Agro RINKA. Oficialus informacinis statistinis leidinys. Vilnius: VĮ Žemės ūkio informacijos ir verslo centras. 2006 m. birželio 19 d. Nr. 11 (50). P. 24.
2. Bakutis B. Mikotoksinai gyvulių pašaruose. Kaunas: Terra Publica, 2004. P. 81.
3. Bakutis B., Baliukonienė V., Paškevičius A. Use of biological method for detoxification of mycotoxins

- (Biologinio metodo taikymas mikotoksinų detoksikacijai). *Botanica Lithuanica*. Vilnius: Botanikos institutas, 2005. Suppl. 7. P. 123–129.
4. Bennett G. A. and Richard J. L. (1996). Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Toxicology*, 1996. N. 50 (5). P. 235–238.
 5. Bhatnagar D., Ehrlich K. C., Cleveland T. E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin/Heidelberg, 2003. Nr. 61(2). P. 83–93.
 6. Börjesson T. and Olsson. Risk assessment for mycotoxins in cereals using Near Infrared Technology. XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Book of Abstracts. Bethesda, Maryland, 17–21 May, 2004.
 7. Calvo A. M., Wilson R. A., Bok J. W., Keller N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 2002. N. 66 (3). P. 447–450.
 8. CAST (Council for Agricultural Science and technology). *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Task Force Report No. 139. January 2003. Ames, Iowa, USA. P. 199.
 9. Champeil A., Fourbet J. F., Dore T., Rossignol L. Influence of cropping system on *Fusarium* heat blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop protection*. Elsevier, 2004. N. 23. P. 531–537.
 10. Devegowda G., Radu M.V., Nazar A., Swamy H.V. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. *Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium*, 1998. P. 241–255.
 11. Dexter J. E., Marchylo B. A., Clear R. M., Clarke J. M. Effect of *Fusarium* head blight on semolina milling and pasta-making of durum wheat. *Cereal Chemistry*. AACC International, 1997. N. 74 (5). P. 519–525.
 12. Garda J., Macedo R. M., Faria R., Bernd L., Dors G. C., Badiale-Furlong R. E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichotecenes. *Food Control*. Elsevier, 2004. N. 16 (5). P. 423–428.
 13. Gilbert J., Vargas E. A. Advances in sampling and analysis for aflatoxins in food and animal feed. *Journal of Toxicology – Toxin Reviews*. Taylor & Francis Group, 2003. N. 22 (2–3). P. 381–422.
 14. Grow A. E., Wood L. L., Claycomb J. L., Thompson P. A. New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier, 2003. N. 53 (2). P. 221–233.
 15. Yiannikouris A., Jouany J. (2002). Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 2002. N. 51. P. 81–99.
 16. Jand S. K., Kaur P., Sharma N. S. Mycoses and mycotoxicosis in poultry: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*. Indian Council of Agricultural Research, 2005. N. 75 (4). P. 465–476.
 17. Jones J. M. *Foods safety*. Second edition. AACC International, St. Paul, Minnesota, USA, 2000. P.453.
 18. Juodeikiene G., Basinskiene L., Vidmantiene D., Bartkiene E., Kunigelis V. and de Koe W. J. Rapid acoustic screening of deoxynivalenol (DON) in grain. *World Mycotoxin Journal*. Wageningen Academic Publishers, August 2008, N. 1 (3). P. 267–274.
 19. Juodeikiene G., Kunigelis V., Vidmantiene D. and de Koe W. J. Acoustic screening method for the determination of deoxynivalenol (DON) in wheat. *Veterinarija ir Zootechnika*, Kaunas, 2004. T.25. Nr. 47. P. 1392–2130.
 20. Kos G., Krska R., Lohninger H. and Griffiths P. R. A comparative study of mid-infrared diffuse reflection (DR) and attenuated total reflection (ATR) spectroscopy for the detection of fungal infection on RWA2-corn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer Berlin/Heidelberg, 2004. N. 378 (1). P.159–166.
 21. Lee U. S., Lee M. Y., Park W. K., Ueno Y. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in barley by polishing process. *Mycotoxin Research*. Springer Berlin/Heidelberg, 1992. N. 8 (10). P. 31–35.
 22. Mishra H. N., Das C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis Group, 2003. N. 43 (3). P. 245–264.
 23. Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999. N. 77 (9). P. 754–766.
 24. Pettersson H. and Åberg L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*. Elsevier, 2003. N. 14. P 229–232.
 25. Placinta C. M., D'Mello J. P. F. and Macdonald A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier, 1999. N. 78. P. 21–37.
 26. Rock C. L., Lampe J. W., Patterson R. E. Nutrition, genetics, and risk of cancer. *Annual Review of Public Health*. Annual Reviews, 2000. Vol. 21. P. 47–64.
 27. Samar M. M., Neira M. S., Resnik S. L., Pacin A. Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. *Food Additives and Contaminants*. Taylor & Francis Group, 2001. N. 18 (11). P. 1004–1010.

28. Schatzmayr D., Nitsch S., Binder E. M., Taeubel M., Loibner A., Schatzmayr G. Detoxification of mycotoxins. *World Nutritional Forum Proceedings 2004*. BIOMIN GmbH. P. 128–129.
29. Schwarz P. B., Beattie S., Casper H. H. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 1996. P. 102 (2). P. 93–96.
30. Scott P. M. Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. *Mycotoxin Research*. Springer, 1992. N. 8. P. 58–66.
31. Scott P. M., Kanhere S. R., Daley E. F., Faber J. M. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*. Taylor & Francis Group, 1993. N. 10 (4). P. 381–389.
32. Sell S. Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 2003. N. 63 (22). P. 7553–7562.
33. Singhal K. K., Kaur H. Aflatoxins in livestock and poultry: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*. Indian Council of Agricultural Research, 2005. N. 75 (1). P. 113–120.
34. Smith J. E. and Moss M. O. (eds.) *Mycotoxins: Formation, analysis and significance*. Chichester: John Wiley and Sons Limited, 1985. P. 148
35. Trigo - Stockli D. M. Effect of processing on deoxynivalenol and other trichotecenes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, 2002. N. 504. P. 181–188.
36. Trucksess M. W., Pohland A. E. Methods and method evaluation for mycotoxins. *Molecular Biotechnology*. Humana Press Inc., 2002. N. 22 (3). P. 287–292.
37. Van Egmond H. P., Jonker M. A. 2003. *Mycotoxins and Regulations*. The Second World Mycotoxin Forum. Final Program, Abstracts of lectures & posters. Noordwijk aan Zee, The Netherlands. 17–18 February, 2003.
38. Vidmantienė D., Juodeikienė G. and Basinskiene L. Technical ethanol production from waste of cereals and its products using a complex enzyme preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley InterScience, 2006. N. 86. P. 1732–1736.
39. Visconti A., Haidukowski E. M., Pascale M., Silvestri M. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters*. Elsevier, 2004. N. 153. P. 181–189.
40. Whitaker T. B. Detecting mycotoxins in agricultural commodities. *Molecular Biotechnology*. Humana Press Inc., 2003. N. 23 (1). P. 61–71.
41. 2006 m. gruodžio 19 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006, nustatantis didžiausias leistinas tam tikrų teršalų maisto produktuose koncentracijas (Tekstas svarbus EEE). Oficialusis leidinys L, 2006–12–20, Nr. 364.
- Gauta 2008 02 12
Priimta publikuoti 2010 01 27