

GRZEGORZ KŁOSOWSKI, ANNA BŁAJET-KOSICKA, DAWID MIKULSKI,
JAN GRAJEWSKI

OCENA MOŻLIWOŚCI REDUKCJI STĘŻENIA MIKOTOKSYN W PROCESIE PRODUKCJI ETANOLU Z ZIARNA KUKURYDZY TECHNOLOGIĄ BUS I KLASYCZNĄ

Streszczenie

Oceniono możliwość redukcji stężenia mikotoksyn obecnych w ziarnie kukurydzy w procesie produkcji etanolu technologią klasyczną (parnik Henze'go) oraz BUS (bezcisnieniowe uwalnianie skrobi). Analizowano wpływ operacji i procesów jednostkowych oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na zmiany stężenia mikotoksyn w zacierach i wywarach. W technologii BUS wykazano zależność redukcji stężenia mikotoksyn od sposobu obróbki termicznej zacieru. Zastosowanie podgrzewaczy typu „jet-cooker” sprzyjało większej redukcji stężenia mikotoksyn, która wyniosła w odniesieniu do deoksyniwalenolu (DON) maksymalnie ok. 20 %, a fumonizyn (FUM) do 21 %. W alternatywnym wariantcie, użycie płytowych wymienników ciepła (eliminacja kontaktu pary wodnej z zacierem) skutkowało mniejszą efektywnością eliminacji mikotoksyn. W technologii klasycznej wykazano znaczną redukcję stężeń DON, zearalenonu (ZEA) i FUM pod wpływem obróbki barotermicznej. Ostateczny bilans stężenia mikotoksyn w tej technologii wykazał niemal całkowitą eliminację FUM, redukcję DON w około 77 - 97 %, natomiast ZEA od 95 do 100 %. W trakcie fermentacji nie stwierdzono wpływu tego procesu z udziałem drożdży na redukcję stężeń DON, ZEA i FUM. Rezultaty uzyskane w procesie technologicznym BUS wskazują, że nie należy oczekiwać pełnej eliminacji mikotoksyn. W specyficznych warunkach wykazano nawet trzykrotny wzrost stężenia ZEA w wysuszonym wywarze w stosunku do surowca. Powinno to skłaniać do kontroli wywaru uzyskanego z przerobu surowców zanieczyszczonych mikotoksynami, zwłaszcza w przypadku jego wykorzystania w żywieniu zwierząt.

Słowa kluczowe: biodegradacja mikotoksyn, fermentacja alkoholowa, etanol

Wprowadzenie

Coraz częściej skrobiowe surowce gorzelnicze stanowią partie produktów nieprzydatnych do wykorzystania na cele paszowe, gdyż cechuje je znaczny stopień porażenia przez patogeny grzybowe i bakteryjne. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo

Dr inż. G. Kłosowski, mgr D. Mikulski, Zakład Biotechnologii, mgr A. Błajet-Kosicka, dr hab. J. Grajewski prof. UKW, Zakład Fizjologii i Toksykologii, Wydz. Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz

występowania w nich podwyższonego stężenia wtórnych metabolitów tych mikroorganizmów, zwłaszcza mikotoksyn. Problem ten jest obserwowany przy towarowej uprawie kukurydzy, której zbiór na ziarno trwa nawet w początkach pory zimowej [1, 7, 25]. Po biokonwersji skrobi zawartej w surowcu na alkohol, a następnie jego oddestylowaniu, pozostaje wywar podestylacyjny o trudnym do zdefiniowania stopniu skażenia mikotoksynami lub ich metabolitami.

Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami grzybów, należących przede wszystkim do rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Mogą powstawać w wielu surowcach rolnych w bardzo różnych warunkach. Mikotoksyny wykazują wielokierunkowe działanie toksyczne, dlatego ich obecność w surowcach gorzelnicznych stanowi potencjalne zagrożenie dla przebiegu procesu fermentacji i jakości spirytusu surowego [8, 18, 19], jak również dla zwierząt żywionych wywarem gorzelnicznym. Chociaż ostre efekty toksyczne są obserwowane tylko wyjątkowo, długotrwałe narażenie nawet na małe stężenia mikotoksyn może powodować różne niedyspozycje i dolegliwości zwierząt. Niebezpieczeństwo potęguje migracja mikotoksyn do produktów pochodzenia zwierzęcego (mleko, mięso, podroby, jaja). Metabolity grzybów pleśniowych ze względu na niewielkie rozmiary cząsteczek i różnorodne właściwości toksyczne mogą powodować w organizmach efekty: mutagenne i kancerogenne (AF – aflatoksyny, OTA – ochratoksyna A i fumonizyny – FUM), wpływać na system hormonalny (zearalenon – ZEA), uszkadzać system immunologiczny (AF, OTA i deoksyniwalenol – DON), powodować niedoczynność nerek (OTA, cytrynina) i wady rozwojowe (OTA) [27].

Zanieczyszczenie żywności może nastąpić bezpośrednio poprzez wzrost komórek grzybów pleśniowych wytwarzających toksyny na artykułach spożywczych lub też pośrednio poprzez przenikanie (droga *carry over*) mikotoksyn z paszy do organizmu zwierzęcia, a stąd do produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego [4, 5, 21]. Integralność i kontrola łańcucha żywnościowego obejmująca fizyczny i biologiczny wpływ środowiska na łańcuch żywnościowy/paszowy; został ujęty w 7. Programie Ramowym UE w sekcji – Żywność, Rolnictwo, Rybołówstwo i Biotechnologia. Zrealizowane badania wpisują się w ten program, uznający za priorytetowe kierunki badań nad wykorzystaniem odpadów rolno-przemysłowych i produktów ubocznych oraz poprawę jakości, w tym bezpieczeństwa żywności, napojów i pasz.

Zasadnicze znaczenie ma ustalenie, które mikotoksyny, jak często i w jakich ilościach obecne są w surowcach gorzelnicznych, co wiąże się z coraz powszechniejszym przetwarzaniem w gorzelnictwie surowców o niskich parametrach jakościowych lub wręcz odpadowych.

Znane są doniesienia naukowe o możliwości redukcji stężenia mikotoksyn w trakcie procesów mikrobiologicznych z udziałem między innymi drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [13, 22, 26]. Istotne wydaje się zbadanie tego zagadnienia w odniesieniu do procesów fermentacyjnych w skali przemysłowej.

Toksynotwórcze grzyby pleśniowe mogą wzrastać i produkować toksyny w zbożach w czasie wegetacji roślin. Są to głównie toksyny fuzaryjne i trichoteceny np. DON, ZEA i FUM [6, 9]. Podczas magazynowania ziarniaków zboża w niewłaściwych warunkach (np.: przy wilgotności powyżej 13 %) istnieje niebezpieczeństwo tworzenia się mikotoksyn wytwarzanych przez tzw. grzyby przechowalnicze, szczególnie z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*. Jedną z nich jest OTA spotykana w zbożach klimatu umiarkowanego, jak również aflatoksyna B₁ (AFB₁) wykryta w magazynowanym wilgotnym ziarnie kukurydzy [10, 20].

Znaczenie ziarna kukurydzy jako surowca dla przemysłu gorzelniczego wzrosło w Polsce znacząco w ostatnich latach. Począwszy od 1995 r. areał kukurydzy uprawianej z przeznaczeniem na ziarno zwiększył się ponad czterokrotnie. Ze względów technologicznych jest to surowiec charakteryzujący się wieloma pozytywnymi właściwościami, w tym wysoką zawartością skrobi i związaną z tym dużą wydajnością alkoholu o korzystnym składzie produktów ubocznych i właściwościach sensorycznych. Warunki klimatyczne Polski sprawiają, że w momencie zbioru ziarno kukurydzy charakteryzuje się wysoką wilgotnością, wahającą się w granicach 30 - 38 % [28]. Z tego powodu nie nadaje się do dłuższego przechowywania bez konieczności dosuszenia, co z kolei powoduje wzrost kosztów i ceny tego surowca. Niepożądane procesy mikrobiologiczne zachodzące w wilgotnym ziarnie powodują spadek wydajności alkoholu (ok. 1 dm³ EtOH/100 kg), a jednocześnie postępuje jego porażenie rozwijającymi się intensywnie pleśniami oraz zanieczyszczenie mikotoksynami silnie toksycznymi dla ludzi i zwierząt [17, 16].

W celu zwiększenia efektywności produkcji, oszczędności energii, zmniejszenia jednostkowych kosztów produkcji spirytusu surowego, zastępuje się w Polsce technologię klasyczną technologią BUS. Ziarno nie jest poddawane obróbce barotermicznej, jak ma to miejsce w technologii klasycznej, lecz rozdrabniane mechanicznie. Tym samym wyeliminowane zostaje działanie wysokiej temperatury (152 °C) na surowiec. W metodzie klasycznej niektóre mikotoksyny pod wpływem obróbki wysokotemperaturowej mogą ulegać transformacji do form pochodnych, np. DON do mniej toksycznego DOM-1 [23, 24].

Większość wykonanych i opublikowanych w Polsce badań nad zawartością mikotoksyn dotyczy oceny stopnia skażenia produktów spożywczych oraz przetworzonych przemysłowych pasz i karmy dla zwierząt. Problem skażenia mikotoksynami surowców wykorzystywanych w przemyśle fermentacyjnym oraz ich wpływ na samą fermentację i jakość produktu finalnego, jak również stopień ewentualnej biodegradacji w trakcie procesów fermentacyjnych, w tym produkcji etanolu był dotychczas przedmiotem nielicznych prac badawczych realizowanych w Polsce [8, 11, 12, 22].

Celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości redukcji stężeń mikotoksyn zawartych w surowcu wyjściowym podczas procesu technologicznego fer-

mentacji alkoholowej prowadzonej z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, z uwzględnieniem poszczególnych operacji i procesów jednostkowych. W trakcie realizacji projektu dokonano oceny występowania i stopnia zanieczyszczenia mikotoksynami ziarna kukurydzy oraz oceniono pozostałości mikotoksyn w wywarze podestylacyjnym uzyskiwanym z różnych procesów technologicznych (technologia klasyczna – Henze'go oraz BUS – becznieniowego uwalniania skrobi).

Materiały i metody badań

Próbki surowca gorzelniczego – ziarno kukurydzy, jak również uzyskane z tego surowca próbki zacierów i wywarów pochodziły z warunków pełnoprodukcyjnych gorzelnii rolniczych stosujących technologię klasyczną oraz becznieniowego uwalniania skrobi (BUS). Pobrane w sposób reprezentatywny próbki surowców zabezpieczano w workach foliowych przed zmianą właściwości podczas transportu. Próbki płynne zacierów i wywarów pobierano do pojemników szklanych o pojemności 1 dm³ na poszczególnych etapach procesu produkcyjnego, po wcześniejszym wymieszaniu zawartości kadzi i zbiorników wywarowych. Pobrany materiał po przewiezieniu do laboratorium przechowywano w chłodni w temp. 4 - 8 °C (kilka do kilkunastu godzin) do momentu wykonywania ekstrakcji mikotoksyn do analiz instrumentalnych. Próbki pobierano i analizowano w dwóch powtórzeniach. Charakterystykę podstawowych parametrów surowców wykorzystywanych do produkcji w poszczególnych gorzelniach zestawiono w tab. 1.

Oznaczenie stężenia mikotoksyn wykonywano w Laboratorium Badawczym Mikotoksyn Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Mikotoksyny izolowano z surowca, zacierów oraz wywarów z zastosowaniem kolumnienek powinowactwa immunologicznego AflaTest[®], FumoniTest[™] i ZearalaTest[®] (Vicam) w przypadku aflatoksyn (AF), FUM i ZEA oraz odpowiednio Donprep[®] i Ochraprep[®] (R-Biopharm Rhône) do izolowania DON i OTA – zgodnie z procedurami przewidzianymi przez producentów kolumnienek z modyfikacjami własnymi. Mikotoksyny oznaczano metodą HPLC. Detekcję AF i OTA prowadzono z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego (Merck-Hitachi system kolumna: LiChroCART 250-4, LiChrospher 100 RP-18; 250×4 mm, 5 µm). AF oznaczano z zastosowaniem derywatywacji pokolumnowej (system Cobra Cell) i fazy ruchomej o składzie ACN:MeOH:H₂O (1 : 1 : 3) z dodatkiem kwasu azotowego i bromku potasu jako czynnika derywatyzującego. W oznaczaniu OTA fazę ruchomą stanowił roztwór ACN i 2 % CH₃COOH (7 : 3). W obydwu przypadkach stosowano elucję izokratyczną z przepływem 1 ml/min. DON, ZEA i FUM były oznaczane przy zastosowaniu podwójnej spektrometrii mas (MS/MS, 3200 QTRAP – Applied Biosystems) [3].

Tabela 1

Zestawienie podstawowych parametrów technologicznych oraz poziom zanieczyszczenia surowca mikotoksynami.

List of major technological parameters and level of contaminating raw material by mycotoxins.

Podstawowe parametry technologiczne kukurydzy wykorzystywanej w gorzelniach Major technological parameters of maize used in distilleries	Technologia BUS PLS technology		Technologia Henze'go Henze's (classic) technology				
	Gorzelnia T Distillery T	Gorzelnia B Distillery B	Gorzelnia SY Distillery SY	Gorzelnia SŁ Distillery SŁ	Gorzelnia C Distillery C	Gorzelnia P Distillery P	
Sucha masa [SM%] Dry substance [DS%]	74,35	86,33	64,16	63,32	84,42	62,89	
Wydajność [dm ³ EtOH ze 100 kg surowca] Yield [dm ³ EtOH/100 kg of raw material]	29,0	36,75	28,0	24,5	32,5	23,5	
Poziom zanieczyszczenia mikotoksynami [ppb] Level of contamination by mycotoxins [ppb]	∑ AF	0,28	nw / nd	nw / nd	nw / nd	nw / nd	nw / nd
	OTA	nw / nd	nw / nd	nw / nd	nw / nd	<0,2	<0,2
	ZEA	18	8	8	28	156	572
	DON	452	452	351	972	3099	6059
	∑ FUM	1186	nw / nd	22	997	1518	2137

nw / nd – nie wykryto/not detected

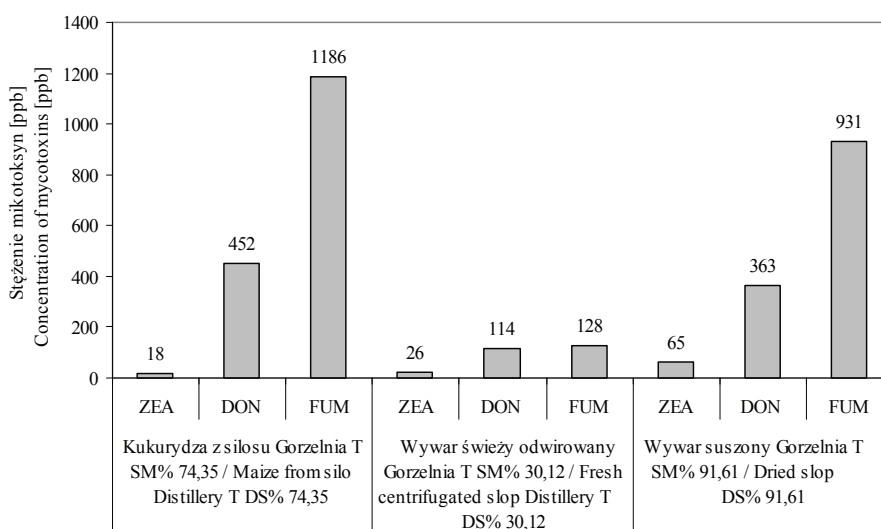
Wydajność alkoholu ze 100 kg analizowanego surowca oznaczano metodą fermentacyjną zgodnie z instrukcją analityczną CLPR [14], z modyfikacją polegającą na zastąpieniu hydrolizy kwasowo-termicznej (autoklawowanie) przez hydrolizę enzymatyczną skrobi, z użyciem handlowych amylolitycznych preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego firmy Novozymes (Dania) tj.: Termamyl S.C. oraz SAN Extra. W warunkach podanej metody wydajność alkoholu ze skrobi wynosi około 91 % w stosunku do teoretycznej (71,9 %), czyli ze 100 kg czystej skrobi otrzymuje się 65,4 dm³ alkoholu. Wilgotność analizowanych próbek surowców (materiał zmielony w młynie laboratoryjnym) oraz zacierów i wywarów oznaczano w dwóch powtórzeniach, z zastosowaniem wagosuszarki firmy RADWAG typ WPS-30.

Wyniki i dyskusja

Określenie stopnia redukcji stężenia mikotoksyn w próbach zacierów i wywarów pochodzących z procesu technologicznego w gorzelniach stosujących technologię BUS

Wyniki badań, dotyczące biodegradacji mikotoksyn w procesie technologicznym w gorzelniach stosujących technologię BUS, wykazują zróżnicowanie w zależności od zakładu i występujących różnic w sposobie obróbki termicznej surowca.

Wyniki oznaczania stężenia mikotoksyn w wywarach podestylacyjnych w gorzelnii oznaczonej symbolem „T” wskazują, że czynniki występujące w procesie technologicznym pozwoliły na uzyskanie umiarkowanego efektu redukcji stężenia mikotoksyn w odniesieniu do DON i FUM (rys. 1). Ze względu na brak zanieczyszczenia surowca przez OTA i śladowe skażenie aflatoksynami, nie zachodziła możliwość oszacowania ewentualnego stopnia redukcji stężeń tych mikotoksyn.



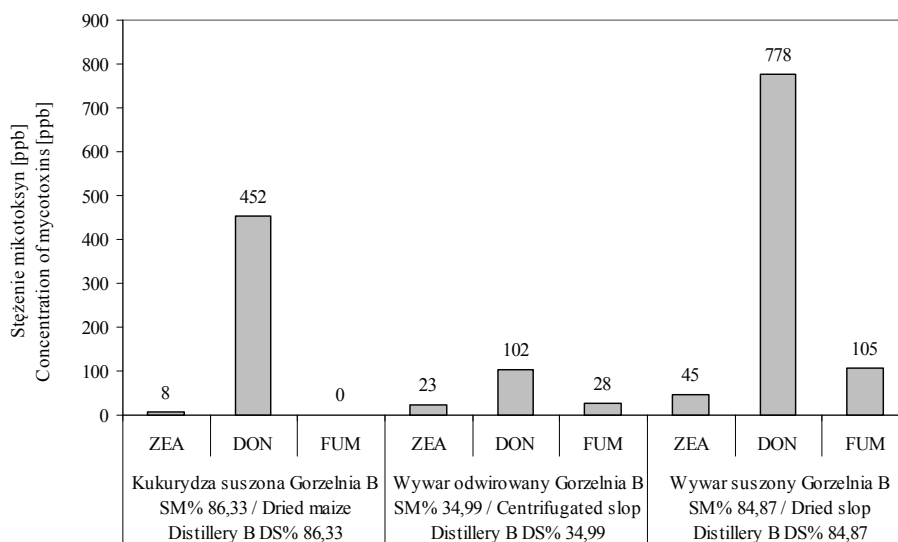
Rys. 1. Stężenie mikotoksyn w ziarnie kukurydzy z silosu i w wywarze podestylacyjnym, w gorzelnii „T”, stosującej technologię BUS oraz suszenie wywaru w suszarni bębnowej.

Fig. 1. Concentrations of mycotoxins in maize grain taken from silo and in slop after distillation, in distillery „T” where BUS technology was used and slops were dried in the drum drying device.

Redukcja stężenia DON w wywarze wysuszonym do wilgotności 8,39 % (w stosunku do stężenia w surowcu) po procesie suszenia w suszarce bębnowej kształtowała się na poziomie ok. 20 %. Stężenie fumonizyn w suchej masie wywaru wynosiło: FumB₁ – 620 ppb, FumB₂ – 319 ppb, FumB₃ – 79 ppb (łącznie – 931 ppb w świeżej masie wywaru; 1017 ppb w suchej masie). Redukcja stężenia fumonizyn w stosunku do ich stężenia w surowcu wyniosła ponad 21 %. Stężenie ZEA w wysuszonym wywa-

rze było znacząco większe niż w surowcu wyjściowym. W przeliczeniu na suchą masę surowca i wywaru wysuszonego wzrost ten był niemal trzykrotny. W stałej frakcji wywaru po odwirowaniu uzyskano 89 % spadek stężenia fumonizyn względem surowca wyjściowego. W odniesieniu do DON redukcja stężenia wynosiła bezpośrednio w próbach surowca i wywaru odwirowanego ok. 75 %. Proces suszenia (związany ze znaczną redukcją wilgotności) przyczynił się do względnego wzrostu stężenia mikotoksyn. Ponadto po uwzględnieniu faktu, że skrobia stanowiąca ponad 58 % suchej masy surowca ulega biokonwersji do etanolu i dwutlenku węgla, stężenie mikotoksyn w wysuszonym wywarze podestylacyjnym w technologii BUS może być większe w porównaniu z surowcem wyjściowym.

Odmienne wyniki uzyskano w wyniku analizy próbek z gorzelnii „B”, również stosującej technologię BUS. Odnotowano wzrost stężenia mikotoksyn w wywarze podestylacyjnym związany z zachodzącą w trakcie fermentacji biokonwersją skrobi do etanolu. Znaczne zmiany proporcji składników w surowcu i wysuszonym wywarze przyczyniły się w efekcie końcowym do relatywnego wzrostu stężenia DON, ZEA i fumonizyn w wywarze podestylacyjnym (rys. 2).



Rys. 2. Stężenie mikotoksyn w kukurydzy suszonej i w wywarze podestylacyjnym, w gorzelnii „B”, stosującej technologię BUS oraz suszenie wywaru z dodatkiem zagęszczonej frakcji ciekłej.

Fig. 2. Concentrations of mycotoxins in dried maize and in slop after distillation, in distillery „B” where BUS technology was used and slops were dried with addition of concentrated liquid fraction.

Można sądzić, że różnice w zakresie uzyskanej redukcji stężeń mikotoksyn pomiędzy zakładami zależą od sposobu pasteryzacji surowca. W gorzelnii „B” stosowane jest podgrzewanie zacieru metodą wymiennikową (wymyennik przeponowy). Metoda

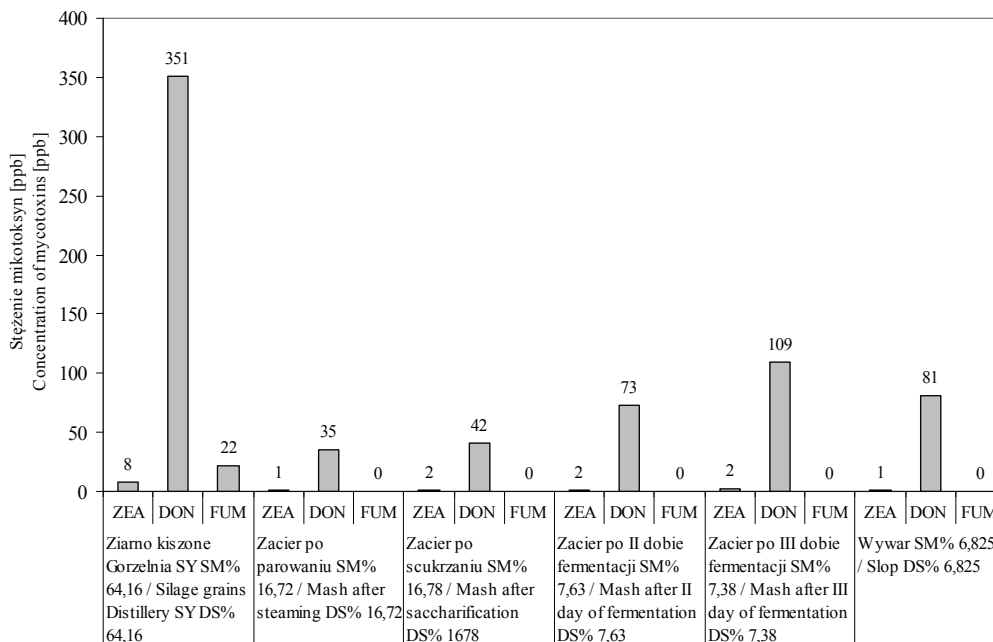
ta jest stosunkowo łagodna, co sprawia, że temperatura zacieru nie przekracza 90 °C. Nie występuje bezpośredni kontakt przegrzanej pary wodnej z surowcem. Z kolei w gorzelnii „T” stosowany jest przepływowy system podgrzewania zacieru z użyciem strumieniowych podgrzewaczy inżektorowych typu „jet-cooker”. W tego typu urządzeniu dochodzi do bezpośredniego kontaktu przegrzanej pary wodnej o wysokiej temperaturze z mieszaniną wody i surowca stanowiącej zacier. Jak wykazano we wstępie, obróbka termiczna (obejmująca oddziaływanie wysokiej temperatury na surowiec) może powodować redukcję stężenia mikotoksyn [20, 21]. Pewien wpływ na uzyskane wyniki z gorzelnii „B” ma również zagęszczanie supernatantu po wirowaniu w wyparkach próżniowych i dodawanie otrzymanego syropu do wywaru w trakcie suszenia. Ma to na celu redukcję ilości ścieków i poprawę bilansu wodno-ściekowego gorzelnii. Tym niemniej we frakcji ciekłej mogą znajdować się pewne ilości mikotoksyn, przyczyniając się również do wzrostu ich stężenia w wywarze suszonym.

Określenie stopnia redukcji stężenia mikotoksyn w próbach zacierów i wywarów pochodzących z procesu technologicznego z gorzelnii stosującej technologię klasyczną Henze’go

Wyniki badań stężenia mikotoksyn na różnych etapach procesu technologicznego (w produktach pośrednich) w gorzelniach stosujących technologię klasyczną Henze’go przedstawiono na rys. 3 - 6. Niezależnie od zakładu, należy podkreślić znaczącą redukcję stężeń mikotoksyn już na etapie obróbki zacieru w parniku, z zastosowaniem obróbki barotermicznej. Bezpośredni kontakt przegrzanej pary wodnej o temp. ok. 150 °C i ciśnieniu dochodzącym do 5 atmosfer skutkowało zauważalną redukcją stężeń DON, ZEA i fumonizyn.

Obróbka barotermiczna (parowanie) surowca w gorzelnii „SY” spowodowała redukcję stężenia DON o ok. 90 % (wyniki przeliczone na suchą masę w celu wyeliminowania efektu rozcieńczenia toksyn – co ma miejsce przy sporządzaniu zacieru – wskazują na ich redukcję o ok. 64 %) (rys. 3). Niemal identyczny efekt uzyskano w gorzelnii „C”, gdzie w zacierze po pierwszej dobie stwierdzono redukcję stężenia DON o ok. 94 % (rys. 4).

W gorzelnii „SY” po obróbce barotermicznej redukcja stężenia ZEA w zacierze i wywarze była niemal całkowita. W gorzelnii „C” (rys. 4) zmniejszenie stężenia ZEA po pierwszej dobie fermentacji wyniosło ok. 87 %. Jednak w przypadku tej toksyny należy podkreślić, że poza obróbką barotermiczną, w pewnym stopniu do redukcji stężenia mogła przyczynić się również aktywność metaboliczna mikroflory drożdżowej, prowadząca do powstawania jej metabolitów tj. α - i β -ZOL [29].



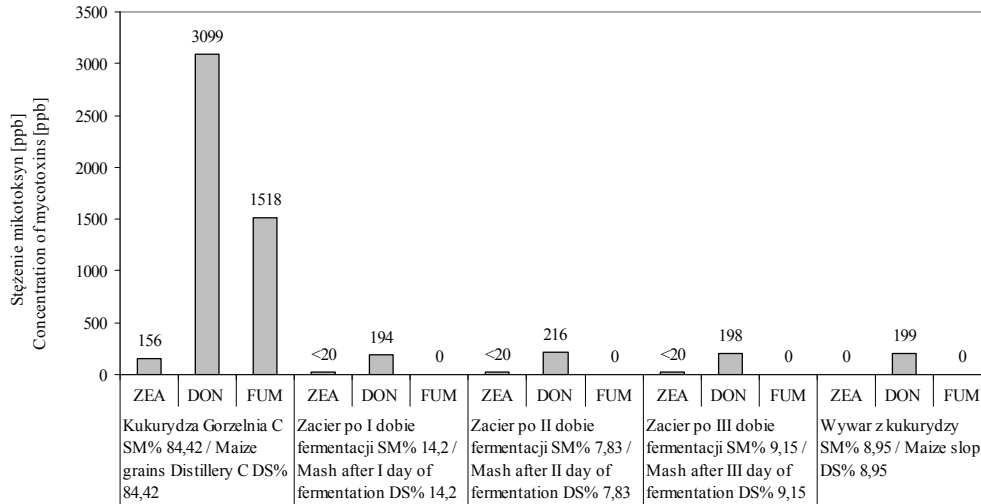
Rys. 3. Stężenie mikotoksyn w kiszonym ziarnie kukurydzy, w zacierach i w wywarze podestylacyjnym, w gorzelnii „SY”, stosującej technologię klasyczną (metoda Henze’go),

Fig. 3. Concentrations of mycotoxins in marinated maize grain, in mashes and in slop after distillation, in distillery „SY” where classic technology was used (Henze’s method).

Nie stwierdzono, aby obróbka rozparowanego surowca przy zastosowaniu enzymatycznych preparatów amylobitycznych pochodzenia mikrobiologicznego powodowała zmiany lub redukcję stężenia badanych mikotoksyn (rys. 3). Po procesie zacieraania (hydrolizie) ich stężenia pozostawały praktycznie na niezmiennym poziomie.

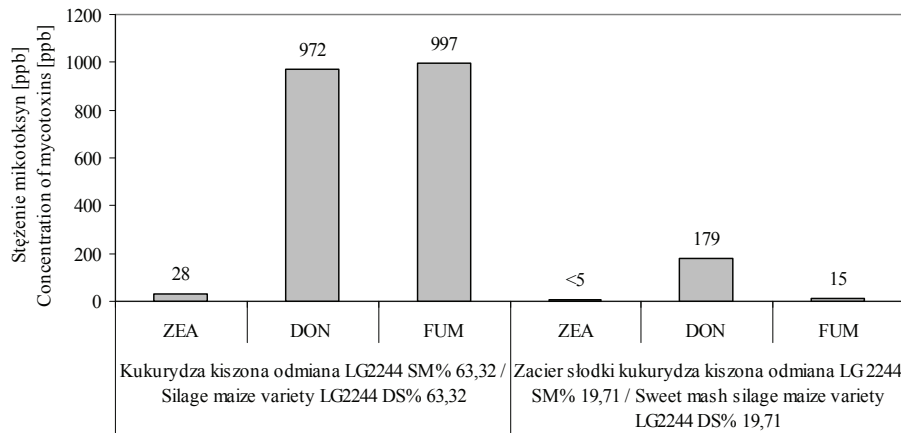
W zależności od stężenia w surowcu, całkowicie lub niemal całkowicie i trwale z procesu technologicznego wyeliminowane zostały fumonizyny dzięki procesowi parowania. Podobny efekt redukcji stężenia mikotoksyn stwierdzono również w innych zakładach stosujących technologię klasyczną z wykorzystaniem parnika Henze’go. W przypadku wyższego stężenia początkowego fumonizyn w surowcu, ich pozostałość po obróbce barotermicznej była bardzo niewielka na poziomie ok. 15 ppb. Redukcja wynosiła niemal 99 % po procesie parowaniu i hydrolizie enzymatycznej (rys. 5).

Sam proces fermentacji, z zastosowaniem drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae*, nie spowodował zauważalnej redukcji stężenia badanych mikotoksyn w produktach pośrednich przerobu kukurydzy (rys. 3 i 4).



Rys. 4. Stężenie mikotoksyn w suszonym ziarnie kukurydzy, w zacierach i w wywarze podestylacyjnym, w gorzelnii „C”, stosującej technologię klasyczną (metoda Henze’go).

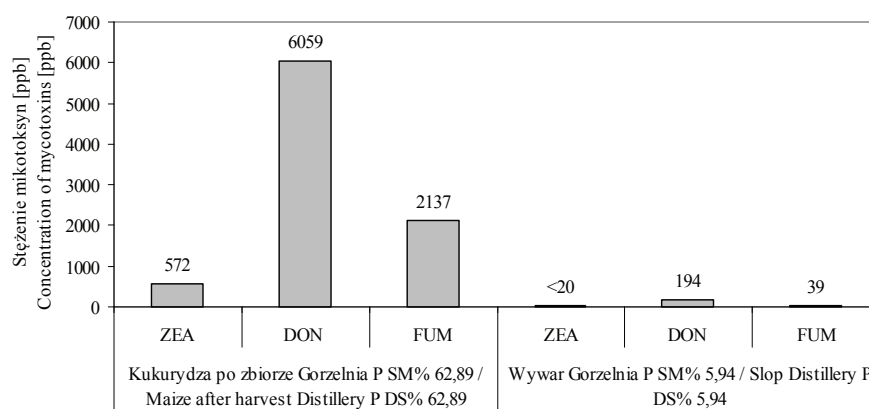
Fig. 5. Concentrations of mycotoxins in dried maize corn, in mashes and in slop after distillation, in distillery “C” where classic technology was used (Henze’s method).



Rys. 5. Stężenie mikotoksyn w kiszonym ziarnie kukurydzy i w zacierze, po obróbce barotermicznej surowca (parnik Henze’go) oraz hydrolizie enzymatycznej skrobi, z zastosowaniem preparatów amylolytycznych, w gorzelnii „SŁ”.

Fig. 4. Concentrations of mycotoxins in marinated maize grain and in mash after barothermal processing (Henze’s steamer) and after enzymatic hydrolysis of starch, using amylolytic preparations, in distillery „SŁ”.

Aktywność mikroflory drożdżowej w zakresie biodegradacji mikotoksyn była niezauważalna. Są to rezultaty podobne do uzyskanych w technologii BUS. Wpływ na brak redukcji stężenia mikotoksyn na skutek oddziaływania mikroflory drożdżowej w trakcie fermentacji może potęgować występowanie w zacierach z technologii Henze'go szkodliwych produktów reakcji karmelizacji i Maillarda, powstających w procesie obróbki barotermicznej surowca [15]. Obecność substancji szkodliwych w podłożu fermentacyjnym i konieczność neutralizacji ich toksycznego oddziaływania może zmniejszać efekt redukcji stężenia mikotoksyn przez drożdże w procesach biosorpcji i biodegradacji.

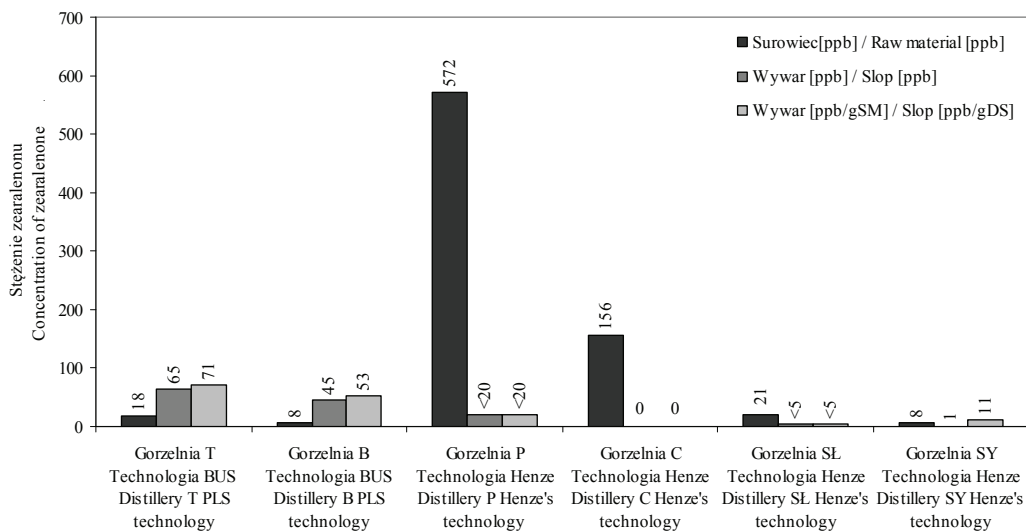


Rys. 6. Stężenie mikotoksyn w kukurydzy po zbiorze i w wywarze, po obróbce barotermicznej surowca (parnik Henze'go), hydrolizie enzymatycznej skrobi z zastosowaniem preparatów amylolytycznych oraz fermentacji, w gorzelnii „P”.

Fig. 6. Concentrations of mycotoxins in maize grain after harvesting and in mash, after barothermal processing of raw material (Henze's steamer), after enzymatic hydrolysis of starch with the use of amylolytic preparations and fermentation, in distillery „P”.

Na rys. 6. przedstawiono bilans DON, ZEA i fumonizyn w surowcu wyjściowym o stosunkowo wysokim poziomie zanieczyszczenia oraz ich pozostałość w wywarze podestylacyjnym (gorzelnia „P” stosująca technologię klasyczną). Po przeliczeniu stężenia mikotoksyn na suchą masę próbek surowca i wywaru stwierdzono redukcję stężenia mikotoksyn w wywarze wynoszącą odpowiednio, w przypadku ZEA ponad 67 %, DON – 65 % i ok. 80 % w odniesieniu do fumonizyn.

Wykonano dodatkowe bezpośrednie zestawienie stężeń mikotoksyn w surowcu wyjściowym i wywarach podestylacyjnych uwzględniające różnice zawartości suchej masy w badanych próbkach (rys. 7 - 9). Ze względu na śladowe skażenie surowca i wywarów OTA i aflatoksynami pominięto je na wykresach.

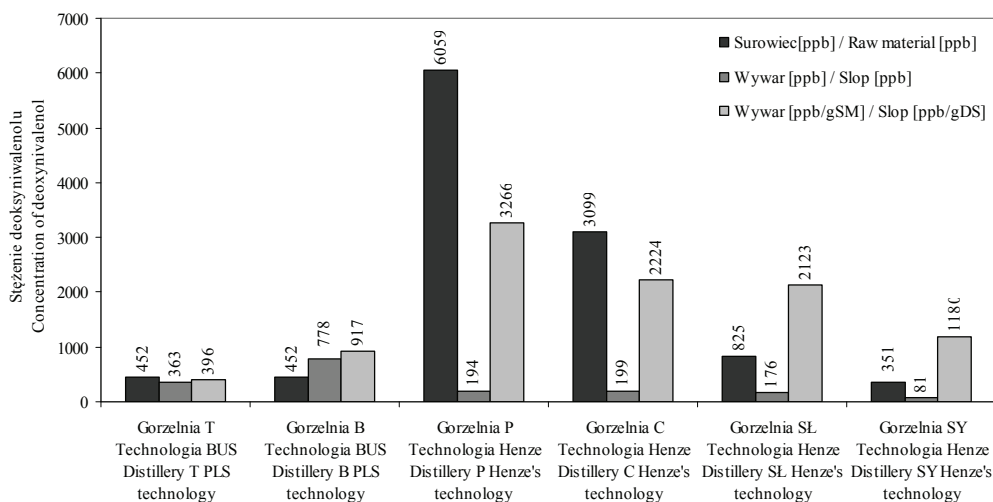


Rys. 7. Zestawienie bilansu stężenia ZEA w surowcu i w wywarze podestylacyjnym w gorzelniach stosujących technologię BUS i suszenie wywaru (sucha masa wywaru od 85 - 91 %) oraz gorzelniach stosujących technologię klasyczną bez suszenia wywaru (sucha masa wywaru 6 - 9 %).

Fig. 7. Balance of ZEA concentration in raw material and in slops after distillation, in distilleries applying BUS technology and slop drying (dry substance of slops ranging from 85 to 91 %) and in distilleries applying classic technology without drying slops (dry substance of slops: 6 - 9 %).

Z analizy wykresu (rys. 7) wynika, że w technologii BUS, w której nie jest stosowana obróbka barotermiczna, nie należy oczekiwać redukcji stężenia ZEA. Stwierdzono dodatni bilans tej toksyny w wysuszonym wywarze względem surowca wyjściowego. Ze względu na małe skażenie surowca wyjściowego również zanieczyszczenie wywaru ZEA było niewielkie. W przypadku znacznego stężenia tej toksyny w surowcu, wzrost skażenia wysuszonego wywaru może być istotny. W zależności od zakładu i poziomu zanieczyszczenia surowca redukcja stężenia ZEA w wywarze wynosiła od 95 - 100 %. Na brak możliwości uzyskania całkowitej eliminacji ZEA w procesie fermentacji zwracają uwagę również inni autorzy [2].

Na rys. 8. przedstawiono zestawienie obejmujące zmiany stężenia DON w surowcu i w wywarach. W technologii BUS, w zależności od zakładu i wspomnianych wcześniej różnic w sposobie pasteryzacji zacieru, uzyskano odmienne rezultaty. W gorzelnii „T” (strumieniowy pasteryzator typu „jet-cooker”) uzyskano ok. 35 % efekt redukcji stężenia DON w suchej masie wysuszonego wywaru (względem stężenia w surowcu).



Rys. 8. Zestawienie końcowego bilansu stężenia DON w surowcu i w wywarze podestylacyjnym w gorzelniach stosujących technologię BUS i suszenie wywaru (sucha masa wywaru od 85 – 91 %) oraz w gorzelniach stosujących technologię klasyczną bez suszenia wywaru (sucha masa wywaru 6 - 9 %).

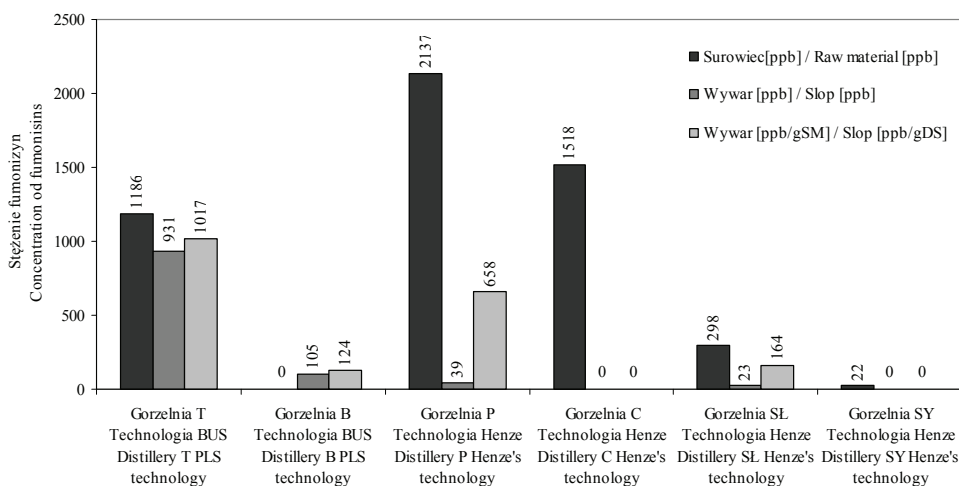
Fig. 8. Balance of the final DON concentration in raw material and slops after distillation, in distilleries applying BUS technology and slop drying (dry substance of slops: 85-91 %) and in distilleries applying classic technology without drying slops (dry substance of slops: 6 - 9 %).

W gorzelnii „B” (pasteryzacja wymiennikiem przeponowym), w której stosowano dodatkowo zawracanie zagęszczonej w wyparce ciekłej frakcji wywaru, stwierdzono wzrost stężenia DON w suchej masie wysuszonego wywaru względem surowca o ponad 70 %.

W technologii klasycznej redukcja stężeń DON w wywarze w stosunku do stężenia w surowcu wahała się w zależności od zakładu i stężenia początkowego. Wyższemu stężeniu DON w surowcu odpowiadała większa redukcja stężenia stwierdzona w wywarze podestylacyjnym wynosząca średnio 95 %. Przy niższych stężeniach DON w surowcu redukcja wynosiła już tylko ok. 78 %.

Na rys. 9. przedstawiono zestawienie obejmujące zmiany stężenia fumonizyn w suchej masie próbek surowca i wywarów. W technologii BUS, w zależności od zakładu i wspomnianych wcześniej różnic w sposobie pasteryzacji zacieru, uzyskano rezultaty podobne, jak w przypadku stężenia DON. W gorzelnii „T”, na skutek stosowania bardziej radykalnej metody obróbki termicznej, uzyskano efekt redukcji stężenia fumonizyn w wysuszonym wywarze, w przeliczeniu na suchą masę surowca wyjściowego i wywaru wyniósł ok. 37 %. W gorzelnii „B” ze względu na opisane wyżej różni-

ce technologiczne stwierdzono wzrost stężenia fumonizyn w wysuszonym wywarze względem surowca.



Rys. 9. Zestawienie końcowego bilansu stężenia fumonizyn w surowcu i w wywarze podestylacyjnym w gorzelniach stosujących technologie BUS i suszenie wywaru (sucha masa wywaru 85 - 91 %) oraz gorzelniach stosujących technologię klasyczną bez suszenia wywaru (sucha masa wywaru 6 - 9 %).

Fig. 9. Balance of the final fumonisins concentration in raw material and in slops after distillation, in distilleries applying BUS technology and slop drying (dry substance of slops: 85-91%) and in distilleries applying classic technology without drying slops (dry substance of slops: 6 - 9 %).

W technologii klasycznej redukcja stężeń fumonizyn w wywarze w stosunku do stężenia w surowcu była niemal całkowita. W dwóch przypadkach stwierdzono w wywarze nieznaczne stężenie fumonizyn na poziomie 23 - 39 ppb. We wszystkich próbach surowca i wywaru dominującą fumonizyną była forma B₁.

Wnioski

1. W technologii BUS uzyskano maksymalną redukcję stężenia DON na poziomie ok. 20 %, a fumonizyn do 21 % (odpowiednio ok. 35 % i 37 % w przeliczeniu na suchą masę surowca wyjściowego i wywaru). Wyjątek stanowi ZEA, którego stężenie w wysuszonym wywarze było niemal trzykrotnie większe niż w surowcu.
2. W technologii BUS, przy umiarkowanej redukcji mikotoksyn w procesie technologicznym, istnieje realne zagrożenie wzrostu stężenia mikotoksyn w suchej masie wywaru podestylacyjnego względem ich stężenia w surowcu.
3. W wariacie technologii BUS, w którym do pasteryzacji zacieru stosuje się przegrzaną parę wodną mającą bezpośredni kontakt z surowcem, uzyskano wyższy

- stopień redukcji DON i fumonizyn, w porównaniu rozwiązaniem wykorzystującym płaszczowe wymienniki ciepła.
4. W trakcie procesu technologicznego, zarówno w technologii BUS, jak i klasycznej, nie stwierdzono aktywności metabolicznej drożdży przejawiającej się redukcją stężenia badanych mikotoksyn w trakcie fermentacji.
 5. W technologii klasycznej obróbka barotermiczna surowca w parniku Henze'go powoduje znaczącą redukcję stężeń DON, ZEA i fumonizyn, wywierając decydujący wpływ na ostateczny ujemny bilans stężenia tych mikotoksyn w wywarze przejawiający się niemal całkowitą eliminacją fumonizyn, redukcją DON w granicach 77 - 97 % i ZEA od 95 - 100 %.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego własnego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N311 052 31/3420. Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006 - 2009 jako projekt badawczy.

Literatura

- [1] Arseniak E., Góral T.: Mikotoksyny fuzaryjne w ziarnie zbóż. Forum producentów roślin zbożowych, kukurydzy i rzepaku. Zbiór referatów, Polagra-Farm Poznań 2005.
- [2] Bennet G.A., Lagoda A.A., Shotwell O.L. and Hesseltine C.M.: Utilization of zearalenone - contaminated corn for ethanol production. J. Am. Oil Chem. Soc., 1981, **58**, 974-976.
- [3] Błajet-Kosicka A., Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J.: Application of Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry to mycotoxins analysis in several matrices (food- and feedstuffs, biological samples, fungi cultures). Acta Biochimica Polonica, 2008, **55**, Suppl. 2/2008, 50.
- [4] Cavret S., Lecoeur S.: Fusariotoxin transfer in animal. Food Chem. Toxicol., 2006, **44**, 444-453.
- [5] Czerwiecki L.: Mikotoksyny w żywności jako czynnik zagrożenia zdrowotnego. Żywność, Żywnienie a Zdrowie, 1997, **4**, 292-300.
- [6] D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C.: Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Anim. Feed Sci. Tech., 1999, **80**, ss. 183-205.
- [7] Dorszewski P.: Porażenie kukurydzy grzybami *Fusarium* a jej przydatność do skarmiania. Kukurydza, 1998, **2(12)**, 39-40.
- [8] Dziuba E., Foszczyńska B., Zarychta P.: The effect of mycotoxins on FAN metabolism and formation of volatile compounds in malt worts. Acta Sci. Pol., Biotechnologia, 2007, **6 (3)**, 15-26.
- [9] Eriksen G. S., Pettersson H.: Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol., 2004, **114 (1-4)**, 205-239.
- [10] Fandohan P., Zoumenou D., Hounhouigan D.J., Marasas W.F.O., Wingfield M.J., Hell K.: Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. Int. J. Food Microbiol., 2005, **98**, 249-259.
- [11] Foszczyńska B., Dziuba E.: Physiological status of brewing yeast during fermentation of worts contaminated with mycotoxins, P. 1: T-2 and ZEA. Acta Sci. Pol., Biotechnologia, 2007, **6 (1)**, 3-12.
- [12] Foszczyńska B., Dziuba E.: Physiological status of brewing yeast during fermentation of worts contaminated with mycotoxins, P. 2: DAS and OTA. Acta Sci. Pol., Biotechnologia, 2007, **6 (2)**, 25-34.

- [13] Haskard C., El-Nezami H., Kankaanpaa P., Salminen S., Ahokas J.: Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 2001, **VII**, (7) **67**, 3086-3091.
- [14] Instrukcja analityczna CLPR: Oznaczanie wydajności alkoholu z surowców zawierających skrobię. CLPR, Warszawa 1976.
- [15] Kłosowski G., Błajet-Kosicka A.: Mechanizmy powstawania oraz występowanie pirazyn w destylatach spirytusowych, jako element oceny prawidłowości obróbki termicznej surowca w procesie technologicznym. *Biotechnologia*, 2010, **1**, 140-153.
- [16] Kłosowski G., Grajewski J.: Wpływ skażenia ziarna kukurydzy deoksynivalenolem i zearalenonem na wskaźniki biotechnologiczne i wydajność fermentacji alkoholowej. W: Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego. Teoria i praktyka, Wyd. PM „LOGO”, Bydgoszcz 2008, ss. 61-68.
- [17] Kłosowski G., Grajewski J., Miklaszewska B.: Przydatność technologiczna oraz stopień skażenia grzybami pleśniowymi i mikotoksynami ziarna kukurydzy stosowanego w Polsce do przerobu na bioetanol. W: Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego. Technologie ekologiczne. Wyd. PM „LOGO”, Bydgoszcz 2007, ss. 61-68.
- [18] Kłosowski, G., Mikulski, D.: The effect of raw material contamination with mycotoxins on the composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. *Bioresource Technol.*, 2010, **101**, 9723-9727.
- [19] Kłosowski G., Mikulski D., Grajewski J., Błajet-Kosicka A.: The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technol.*, 2010, **101**, 3147-3152.
- [20] Lee B. H., Magan N.: Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **61**, 11-16.
- [21] Perkowski J.: Aspekty żywieniowe i konsekwencje zdrowotne występowania mikotoksyn. V Międzyn. Konf. Nauk. „Mikotoksyny i Dioksyny a Środowisko”, Bydgoszcz 2000, ss. 29-38.
- [22] Piotrowska M., Żakowska Z.: The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnol.*, 2000, **17**, 307-310.
- [23] Pronyk C., Cenkowski S., Abramson D.: Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. *Food Control*, 2006, **17**, 789-796.
- [24] Samar M., Resnik S.L., González H.H.L., Pacin A.M., Castillo M.D.: Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. *Food Control*, 2007, **18**, 1295-1299.
- [25] Sieliwanowicz B.: Żyto i kukurydza w technologii gorzelniczej BUS, zacieranie i fermentacja. W: Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego. Teoria i praktyka. Wyd. PM „LOGO”, Bydgoszcz 2003, ss. 5-9.
- [26] Shetty P.H., Hald B., Jespersen L.: Surface binding of Aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **113**, 41-46.
- [27] Sweeney M.J., Dobson A.D.W.: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **43**, 141-158.
- [28] Warzecha R.: Rejestr odmian kukurydzy. Kukurydza rośliną przyszłości. Wyd. Biznes Press, Warszawa 2005, ss. 28-37.
- [29] Zinedine A., Soriano J., M., Molto J., C., Mañes J.: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.*, 2007, **45**, 1-18.

ASSESSING THE POTENTIAL OF REDUCING MYCOTOXIN CONCENTRATION DURING THE PRODUCTION PROCESS OF ETHANOL FROM MAIZE GRAIN USING PLS AND CLASSIC TECHNOLOGY**S u m m a r y**

The potential of reducing mycotoxin concentrations in maize grain was assessed during the process of producing ethanol with the application of classic technology (Henze's steamer) and PLS technology (Pressureless Starch Liberation). The effect of individual operations, processes, and *Saccharomyces cerevisiae* yeast on changes in the concentrations of mycotoxins in mashes and slops was analyzed. As for the PLS technology, the dependence was found between the reduction of mycotoxin concentrations and the method of how the mash was thermally processed. Owing to "jet-cooker" heaters used, the reduction degree of mycotoxin concentration was higher and amounted to, at the maximum, ca. 20 % in the case of deoxynivalenol (DON), and up to 21 % in the case of fumonisins (FUM). Alternatively, when plate heat exchangers were utilized (elimination of contact between water steam and mash), the elimination of mycotoxins was less effective. In the classic technology, a considerable reduction of concentrations of DON, zearalenone (ZEA), and FUM was found when a barothermal processing was applied. The final balance of mycotoxin concentration in this technology showed that FUM were eliminated almost completely, DON at a level between 77 - 97 %, and ZEA was reduced by about 95 - 100 %. During the fermentation process, no impact of this process with the yeast used was found on the reduction of DON, ZEA, and FUM concentrations. The results obtained when the PLS technology was applied prove that no complete elimination of mycotoxins should be expected. Under specific conditions, the ZEA concentration in dried slops was found to be three times as high as in the raw material. Therefore, it is highly advised to control the slops produced during the processing of raw materials contaminated by mycotoxins, especially when they are used in feeding animals.

Key words: mycotoxins biodegradation, alcoholic fermentation, ethanol ☒