

(19)



(10) **LT 6142 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6142** (51) Int. Cl. (2015.01): **A01N 63/00**
A23L 3/00
- (21) Paraiškos numeris: **2013 046**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2013 05 15**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2014 11 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2015 04 27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Gražina JUODEIKIENĖ, LT
Lilija KALĖDIENĖ, LT
Saulius GRIGIŠKIS, LT
Loreta BAŠINSKIENĖ, LT
- (73) Patento savininkas:
UAB „BIOCENTRAS“, V.A. Graičiūno g. 10, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabolienės kontora METIDA, Verslo
centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas

- (57) Referatas:

Šis išradimas priskiriamas žemės ūkio biotechnologijų sričiai. Jame aprašytas sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas, kuomet jie apdorojami pienarūgščių bakterijų preparatais, siekiant apsaugoti nuo pelėsinų mikroorganizmų. Antimikrobinėmis savybėmis pasižymintiems bioproduktams sukurti buvo atrinktos labiausiai patogeninius mikroorganizmus veikiančios pieno rūgšties bakterijos *Lactobacillus sakei* (MI806), *Pediococcus acidilactici* (MI810) ir *Pediococcus acidilactici* (MI807), kurios buvo išskirtos iš rūginių duonos raugų ir saugomos UAB „Biocentras“ mikrobinių kultūrų muziejuje. Šiame išradime aprašomas pienarūgščių bakterijų preparatų panaudojimo būdas, apdorojant sėklius grūdus ir sėklas prieš sėją.

Šis išradimas priskiriamas žemės ūkio biotechnologijų sričiai. Jame aprašytas sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas, kuomet jie apdorojami pienarūgščių bakterijų preparatais, siekiant apsaugoti nuo pelėsinių mikroorganizmų. Šiame išradime aprašomas pienarūgščių bakterijų preparatų panaudojimo būdas, apdorojant sėklinius grūdus ir sėklas prieš sėją.

TECHNIKOS LYGIS

Maisto pramonėje naudojami grūdai dažnai būna užkrėsti patogeniniais mikroorganizmais. Didesnės patogeninių mikroorganizmų koncentracijos visiškai sugadina grūdus ir jų negalima panaudoti maisto produktams gaminti. Užkrėstus grūdus panaudojus kaip sėklinius jie blogai dygsta, ženkliai sumažėja grūdų derlingumas. Dažniausiai sėkliniai grūdai būna užkrėsti *Fusarium spp.*, *Cochliobolus sativus*, *Alternaria spp.* ar kietosios kūlės *Tilletia caries* sporomis. Pelėsiai maitindamiesi grūdais išskiria antrinius metabolitus - mikotoksinus, nuo kurių išsivysto fuzariozinis puvinys. Jis kenkia ne tik patiems augalams, bet ir patiems grūdams, kurie tampa netinkami nei maisto produktams gaminti nei pašarams ruošti.

Tokiems patogeniniams mikroorganizmams degraduoti arba sustabdyti jų augimą yra panaudojama nemažai cheminių ir biologinių preparatų. Tačiau šie preparatai turi įvairių trūkumų:

- 1) nepakankamas veikimo efektyvumas, kadangi preparatai pasižymi siauru antimikrobinio poveikio specifiškumu;
- 2) trumpalaikis poveikis, nes apdorojami tik grūdai ar sėklos;
- 3) trumpa antikikrobinų preparatų gyvavimo trukmė.

Patentinėje literatūroje yra aprašomos įvairios bakteriocinus sintetinančių bakterijų rūšys. Iš jų išskirti peptidai plačiai pritaikomi įvairiose srityse, tokiose kaip veterinarija, žemdirbystė, maisto pramonė, kosmetikos pramonė, medicina ir kt.

Patente US004980163 pateikiamos plataus pritaikymo spektro bakteriocinų kompozicijos. Šios kompozicijos gali būti ištirpintos arba suspenduotos tam tinkamame tirpiklyje ar matricoje ir pasižymi platesniu antimikrobinio veikimu nei naudojant kiekvieną iš kompozicijos komponentų atskirai. Ištirpintos arba suspenduotos bakteriocinų kompozicijos turi platesnes praktinio pritaikymo galimybes. Kompozicijų

sudėtys atrodė taip:

lizostafinas ir savo sudėtyje lantionino turintis bakteriocinas;

lizostafinas, savo sudėtyje lantionino turintis bakteriocinas ir chelatuojantis agentas;

lizostafinas, savo sudėtyje lantionino turintis baltymas, chelatuojantis agentas ir surfaktantas.

Patente US005348881A aprašoma *N. Lactococcus* mikroorganizmai, produkuojantys du ar daugiau skirtingų bakteriocinų. *Lactococcus lactis* naudojami maisto pramonėje *Lactobacillus casei* ir kitų maisto užkratų inhibicijai. Taip pat aprašomos bakteriocinų kompozicijos, bakterijų mišiniai ir jų panaudojimo maisto pramonėje metodai.

Patente US005683890A aprašomi *Streptococcus thermophilus* bakteriocinai, turintys amino rūgščių sekas SEQ ID NO: 1 ir SEQ ID NO: 2. Taip pat aprašomas metodas, kaip gauti supernatanto ekstraktą, turintį bent vieną iš šių dviejų bakteriocinų. Galiausiai aprašomas šių bakteriocinų, kaip prieš patogenus aktyvių agentų, panaudojimas maisto produktų, ypač sūrių ir rūgščių pieno gaminių, bei kosmetikos produktų gamyboje.

Patente US005691301A aprašomas bakteriocinų kompozicijos, apimančios savo sudėtyje lantionino turinčius bakteriocinus ir nebakteriocidinius agentus. Kai bakteriocinų kompozicijos imobilizuojamos ant tinkamų nešiklių, jie tampa pagerintais, greitai veikiančiais plataus veikimo spektro bakteriociniais, tinkamais įvairiapusiam naudojimui.

Patente US20120164119A1 aprašomas naujas antimikrobinis agentas. Jis turi panašų į nizino antimikrobinį poveikį. Bakteriocinas pavadintas lakticinu 3147, kurio molekulinis svoris 2,8 kad. Jis inhibuoja laktokokų, laktobacilų, enterokokų, bacilų, leukonostročių, pediokokų, klostridijų, stafilokokų ir streptokokų aktyvumą. Taip pat geba inhibuoti nizinę produkuojančius bakterinius kamienus.

Patente US006753024B2 aprašoma gumbasvogūnių išorinė luobelė bei į gabalėlius supjaustomi gumbasvogūniai. Gabalėliai sutrinami į tyrėlę, kuri išdžiovinama, praskiedžiama vandeniu ir verdama. Po to inokuliuojama atrinktomis bakteriocinus produkuojančiomis bakterijomis ir paliekama fermentuotis, kol

gaunamas maistinis konservantas.

Patente US00689370B2 aprašomi nauji bakteriocinai, produkuojami naujų bakterijų kamienai. Šie antimikrobiniai veikimu pasižymintys peptidai panaudojami sumažinti patogeninių bakterijų dauginimąsi gyvūnuose (ypač naminiuose paukščiuose).

Patentas US007449311B2 siejamas su iki šiol nežinomus bakteriocinus produkuojančiais mikroorganizmais. Tiksliau išradime charakterizuojamas naujas bakteriocinas su lantibiotiku. Jis pavadintas makedocinu, kadangi yra produkuojamas *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 mikroorganizmų. Makedocinas inhibuoja platų pieno rūgštį gaminančių bakterijų spektrą, o taip pat ir keletą maistą gadinančių patogeninių bakterijų (tarp jų ir *Clostridium tyrobutyricum*). Makedocinas yra temperatūros atžvilgiu stabilus, aktyvus ir veikia plačiame pH intervale. Patente taip pat aprašomas nepatogeninių mikroorganizmų panaudojimas makedocino biosintzei maiste vykstančių fermentacinių procesų metu, tokių kaip pieno produktų (sviesto, sūrio), fermentuotos mėsos ir daržovių paruošimas. Be to, aprašomas ir makedocino panaudojimas ir ne fermentaciniuose procesuose, tokiuose kaip žalios mėsos, vakuumuotų mėsos produktų, greito maisto ir konservų gamyboje.

Patente US20080248953A1 aprašomas metodas, skirtas pagerinti augalų vegetaciją ir/arba atsparumą ligoms. Tam naudojamas išgrynintas polipeptidas, kuris pasižymi geresnėmis antimikrobinėmis savybėmis, apsaugant augalus, augalų sėklas arba vegetacijos aplinką nuo patogeninių mikroorganizmų.

Patente US20110236359A1 aprašomas naujas pienarūgštę produkuojančio kamieno *Lactococcus lactis* porūšiai *lactis* MM19 (katalogo Nr. NML-080508-01) ir *Pediococcus acidilactici* MM33 (katalogo Nr. NML-080508-02), išskirti iš žmogaus žarnyno. Kamienų *L. lactis* porūšiai MM19 ir *P. acidilactici* MM33 bei produkuojami bakteriocinai yra naudingi mikrobinio augimo maisto produktuose inhibavimui ir mikrobinės infekcijos ar kolonizavimo žinduoliuose inhibavimui.

Patente US20120028799A1 aprašomas augalų ligų, sukeltų bakterinių ar grybelinių patogenų kontroliavimo metodas. Jis paremtas iš *Streptomyces scopuliridis* kamieno RB72 išskirto baltymo ar polipeptido, kuriame yra amino rūgštis iš pateiktos SEQ ID NO: 1 pritaikymu augalų ar augalų sėklų apsaugai. Taip pat aprašomos specifinės sąlygos, prie kurių yra pasiekiamas efektyvus augalų ligų, sukeltų

bakterinių ar grybelinių patogenų, gydymas. Be to, apibūdinama augalų ir augalų sėklų, apdorotų minėtais antimikrobiniais agentais, sodinimo kompozicija.

Patente RU 2409661 C2 aprašomas išradimas gali būti pritaikomas infekcinėmis ligomis sergančių gyvūnų (ypač paukščių) profilaktikai ir gydymui. Štamas *Enterococcus faecium* LVP1073, yra išskirtas iš sveiko viščiuko žarnyno. Šis producentas sintetina bakteriociną E1073, kuris yra aktyvus prieš bakterinius patogenus. Šis 34 amino rūgščių ilgio bakteriocinas yra priskiriamas katijoninių peptidų grupei (pI = 8,2), jo molekulinė masė lygi 3256 Da. Taip pat buvo identifiкуotas bakteriocino E1073 biosintezės induktorius *Lactobacillus plantarum* 1LVP. Taip pat buvo nustatytas signalinis peptidas reguliuojantis bakteriocino biosintezę. Patente aprašomas išradimas, veiksmingas prieš daugelį gramteigiamų ir gramneigiamų patogeninių mikroorganizmų. Taip pat apdorojus minėtu bakteriocinu viščiukus prieš skerdimą, gauta produkcija yra apsaugoma nuo žmogui kenksmingų patogeninių mikroorganizmų.

Patente LT 4209 B yra aprašomas augalų grūdų apdorojimo būdas, panaudojant pienarūgščio bakterinį preparatą, siekiant pagerinti grūdų kokybę. Išradime taip pat aprašytas šio preparato panaudojimo būdas, kuomet laukuose apipurškiami grūdūs nokinantys augalai. Be to, aprašomas alaus gamybai naudojamo salyklo apdorojimas biopreparatu.

Tačiau ir toliau išlieka poreikis sukurti greičiau veikiantį, efektyvesnį, naujos kartos bioproduktą, kuris veiktų plačiame antimikrobiniame intervale. Šiuo metu yra sukurti saugūs antimikrobiniai preparatai, pagaminti iš pienarūgščių bakterijų, turi siaurą specifinį antimikrobinį aktyvumą. Šiems trūkumams pašalinti ir padidinti grūdų ir sėklų daigumą bei derlingumą sukurtas naujas sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas.

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimo tikslas – sumažinti sėklinių grūdų ir sėklų mikrobiologinę taršą ir pagerinti natūraliomis biopriemonėmis jų daigumą, apvoliojant sėklius grūdus ir sėklas padaugintų augaliniame substrate, praturtintame mineralinėmis medžiagomis ir aminorūgštimis, bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų mišiniu. Kai kurie cheminiai antimikrobiniai preparatai (beicai) turi per ilgą gyvavimo trukmę. Dėl šios priežasties, iš beicuotų grūdų gaminant maisto produktus, jie gali pakliūti ir į žmogaus

organizmą.

Išradimo esmė yra sėkmingas pienarūgščių bakterijų biopreparatų panaudojimas žemės ūkyje naudojamų grūdų apsaugai nuo patogeninių mikrobus. Tokie biopreparatai yra tinkami naudoti augalų auginimo ir grūdų derliaus laikymo metu susidarančių fitopatogenų ir antrinio metabolizmo produktų prevencijai.

Šiame išradime yra siūlomas naujas grūdų ir sėklų apsaugos būdas, kuris pilnai ar bent iš dalies išsprendžia esamas problemas. Nuo žinomų grūdų apdorojimo antimikrobinėmis medžiagomis išradimas skiriasi tuo, kad užkrėsti patogeniniais mikroorganizmais grūdai ir sėklos apdorojamos kompleksiskai antimikrobinio preparatu, gautų iš skirtingų pienarūgščių bakterijų.

Taip pat skiriasi tuo, kad skirtingos pienarūgščių bakterijos yra parenkamos taip, kad iš jų gauti antimikrobiniai biopreparatai turi platų antimikrobinį poveikį skirtingiems patogeniniams mikroorganizmams, priklausomai nuo to, kuo užkrėsti grūdai.

Trečias skirtumas pasireiškia tuo, kad antimikrobinės medžiagos gali būti panaudotos apvalytos arba kartu su pienarūgštėmis bakterijomis.

Ketvirtas skirtumas pasireiškia tuo, kad biopreparatas gali būti naudojamas kompleksiskai apdorojant sėklinius grūdus arba sėklas prieš sėją arba po sėjos.

Mikroorganizmai esantys sėkliniuose grūduose ir sėklose gali būti naudingi arba kenksmingi. Į sėklinių grūdų ir sėklų mikrofloros sudėtį įeina tokie pelėsiniai mikroorganizmai kaip *Fusarium spp.*, *Cochliobolus sativus*, *Alternaria spp.*, pašaknio puviniai ir kietosios ir dulkančios kūlės. Ši mikroflora mažina grūdų derlių ir sudaro nepalankias sąlygas sėklinių grūdų ir sėklų laikymui.

Pelėsiniai grybai yra nepageidautinos priemaišos sėkliniuose grūduose, naudojamuose maisto ir pašarų pramonėje. Dėl to būtina kontroliuoti sėklinių grūdų užterštumą pelėsiais jų saugyklose, nes tokie veiksniai kaip temperatūra ir drėgnis gali inicijuoti pelėsių augimą. Tam, kad būtų sustabdytas pelėsinės mikrofloros augimas, yra panaudojamaos pienarūgščio rūgimo bakterijos.

TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

Antimikrobinėmis savybėmis pasižymintiems bioproduktams sukurti buvo atrinktos labiausiai patogeninius mikroorganizmus veikiančios pieno rūgšties

bakterijos *Lactobacillus sakei* (MI806), *Pediococcus acidilactici* (MI810) ir *Pediococcus acidilactici* (MI807), kurios buvo išskirtos iš rūginių duonos raugų ir saugomos UAB „Biocentras“ mikrobinių kultūrų muziejuje.

Lactobacillus sakei (MI806) : gramteigiamos, anaerobinės, sporų nesudarančios, lazdelės pavidalo bakterijos, priskiriamos *Firmicutes* tipui, eilei *Lactobacillales*, šeimai *Lactobacillaceae*, genčiai *Lactobacillus*. Kultūra auginama anaerobinėmis sąlygomis; ant agarizuotos MRSA terpės, 37°C temperatūroje užauga per 48 val. Gali augti 35-50 °C temperatūrų ribose. Auga 3,5-7,0 -8,5 pH ribose.

L. sakei pasižymi fermentaciniu metabolizmu, galutinis fermentacijos produktas - laktatas. Kiti galimi produktai: acetatinės druskos, etanolis, CO₂, sukcinatas.

Toliau pateikiami *Lactobacillus sakei* (MI806) taksonominės priklausomybės nustatymo duomenys (SEQ ID Nr. 1):

NAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGAC
GGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTG
CTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTT
TCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAAcCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
GANNNCCCTAGAGATAGGGCTTTCCCNCTCGGGGNNN.

Pediococcus acidilactici (MI810) priskiriamos *Firmicutes* tipui, eilei *Lactobacillales*, šeimai *Lactobacillaceae*, genčiai *Pediococcus*. Bakterijos auginamos ant MRSA arba M-17 terpių. Auginant 37 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis, užauga per 48 -72val.

P. acidilactici yra kokių pavidalo, gramteigiamos, nejudrios, sporų nesudarančios laktobakterijos. Suformuoja kokių tetradas. Bakterijos priskiriamos fakultatyviniams anaerobams. Vykdo fermentuojamo tipo metabolizmą. Fermentuoja cukrus. Galutinis metabolizmo produktas - pieno rūgštis. CO₂ neišskiria. *P. acidilactici* gerai auga rūgščioje aplinkoje, bet gali augti ir gana plačiose 4,5 -8,0 pH ribose. Jos taip pat atsparios rūgštims.

Toliau pateikiami *Pediococcus acidilactici* (MI8010) taksonominės priklausomybės nustatymo duomenys SEQ ID Nr. 2):

NAANTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAA
GCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGC
CTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACG
TGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATT
TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTC
GGCTCAACCGAAGAAGTGCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGAGGA
CAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAG
TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG
TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAA
GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGC
CTGGGGAGTN.

Pediococcus acidilactici (MI807) priskiriamos *Firmicutes* tipui, eilei *Lactobacillales*, šeimai *Lactobacillaceae*, genčiai *Pediococcus*. Bakterijos auginamos

P. acidilactici yra kokių pavidalo, gramteigiamos, nejudrios, sporų nesudarančios laktobakterijos. Suformuoja kokių tetradas. Bakterijos priskiriamos fakultatyviniams anaerobams. Vykdo fermentuojamo tipo metabolizmą. Fermentuoja cukrus. Galutinis metabolizmo produktas pieno rūgštis. CO₂ neišskiria. *P. acidilactici* gerai auga rūgščioje aplinkoje, bet gali augti gana plačiose 3,5-8,0 pH ribose. Atsparios rūgštims.

NCCTTTAGTGCTGGACGTGTAAAGTAATCACGTTAGCTTGTTGGTAAAG
TTCTTCTAAAGTATCTACATACATGCCTTCCTTTTCTAATGCAGGATTACGGAAAA
CATCGTACGCAATTACCTTTGCGCCAAATCCTTTAAAAATGTCAATTGCAGCAGC
GCCAATCCGTCCGGTACCAATTACCCCAACGGTCATTTGATTAAGTTCCAAACC
GATGTCTGGTTCCCAACGATAATCGCCATGAGCCATTTTGTATTCAAATTCAGGA
ATCTTACGGAGTAATGCTAACAGTTGGGTGACTGACAATTCAGCAATTGCTCTTG
GAGAATATGCTGGTACGTTTCGAAATTTTGATATCATTTTTCTTGAGTGCATCTGC
GGGTNCNNNTCAAGTCNN.

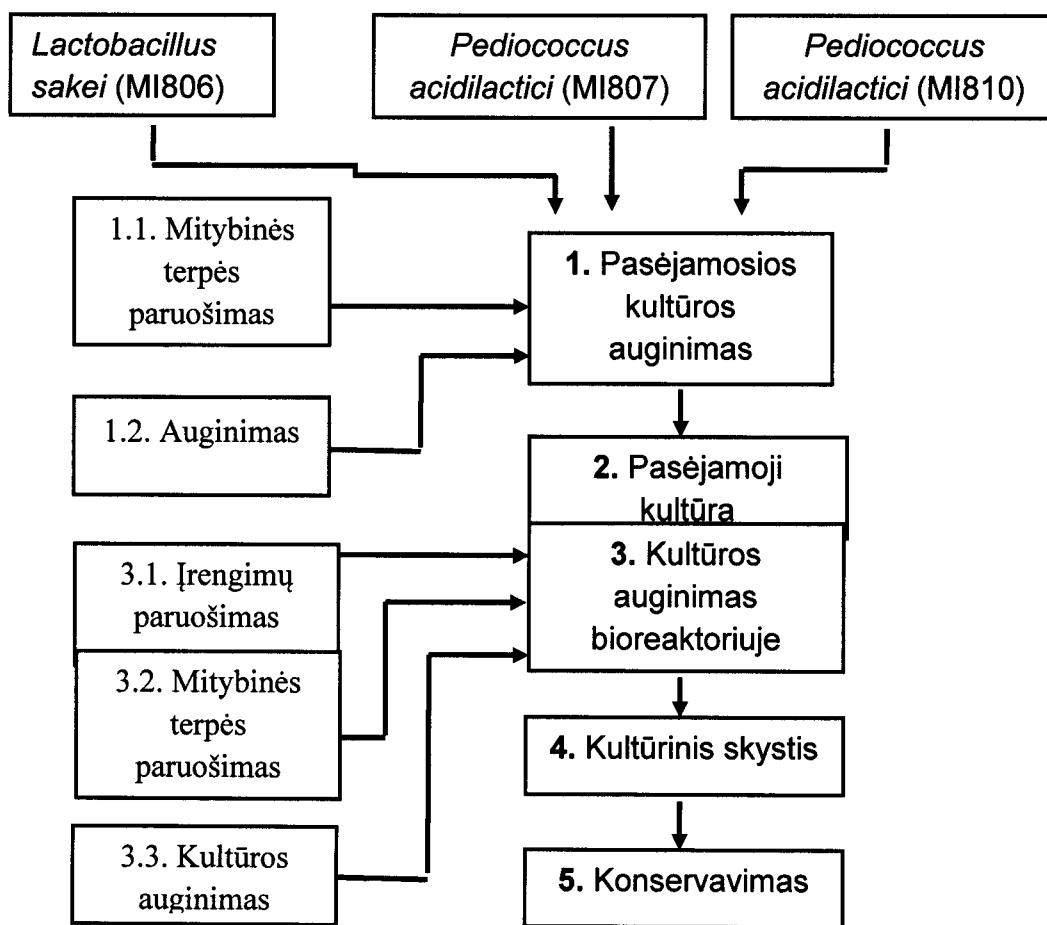
1 lentelė. PRB ir antigrybinių preparatų inhibicinis poveikis sporų susidarymui ir augimui

[illegible]

	<i>F. culmorum</i> L-2	++ +	+++	++ +	+++	++ +	+++	++ +	+++	++ +	+++
	<i>F. solani</i> 4-SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mielės	<i>P. brutorii</i> P.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. capsularis</i> S.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Z. bailii</i> Z.1(T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>K. marxianus</i> K.7.1(T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. cerevisiae</i> Sa.1.5(T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. parapsilosis</i> C.7.2	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-
	<i>Y. lipolytica</i> Y.C.6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>hansenii</i> Deb.4(T)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Antimikrobinis aktyvumas buvo nustatomas difuzijos į agarą metodu, naudojant indikatorinius mikroorganizmus. Tam į Petri lėkštelės plonu sluoksniu išpilstoma terpė, tokiu būdu suformuojant pagrindą kaip papildomų maistinių medžiagų šaltinį. Išdžiūvus apatiniam sluoksniui į 10 mL išlydytos ir iki 45 °C temperatūros atvėsintos terpės pridedama patogeninių mikroorganizmų suspensijos ~ 10⁴ KFU ląstelių gazono. Terpė užpilama ant paruoštų lėkštelių su paruoštu apatiniu agaro sluoksniu. Sustingus viršutiniam agaro sluoksniui, steriliu cilindru išpjaunamos 8 mm skersmens įdubos ir agaras pašalinamas. Į šulinėlius dozuoja po 50 µL biopreparato. Petri lėkštelės su pasėliais inkubuojamos termostate. Inkubacijos trukmė ir temperatūra parenkama atsižvelgiant į patogeninį mikroorganizmą. Kaip teigiama reakcija – testuojamų mikroorganizmų augimo slopinimas – vertinama skaidri zona apie įdubą, išmatuojant skaidrios zonos aplink šulinėlį skersmenį.

Toliau pateikiama antimikrobinų biopreparatų fermentacijos technologinė schema – I etapas (1 pav).



1 pav. Antimikrobinių biopreparatų fermentacijos technologinė schema (I etapas)

Kompleksiniam biopreparatui gaminti naudojamos bakteriocinus sintetinančios pieno rūgšties bakterijos: *Lactobacillus sakei* (MI806), *Pediococcus acidilactici* (MI810) ir *Pediococcus acidilactici* (MI807).

Lactobacillus sakei (MI806) bakterijos auginamos MRS sultinyje nemaišant 18 valandų, esant 35 °C temperatūroje. Po to 2 % gauto inokulianto išsėjama į sterilintą fermentacijos terpę, sudarytą iš bulvių sunkos, 5 % ryžių ekstrudato, 0,1 g/L mangano sulfato (MnSO_4), 0,2 g/L magnio sulfato (MgSO_4), 2 g/L cisteino hidroklorido ($[\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_3^+\text{-CO}_2\text{H}]\text{Cl}^-$). Bakterijų kultūra auginama 6 val., esant 35 °C temperatūrai.

Pediococcus acidilactici (MI807) bakterijos auginamos nemaišant MRS sultinyje 18 valandų, 35 °C temperatūroje. Po to 2 % gauto inokulianto išsėjama į sterilintą fermentacijos terpę, sudarytą iš bulvių sunkos, 5 % ryžių ekstrudato, 0,1 g/L

mangano sulfato (MnSO_4), 0,2 g/L magnio sulfato (MgSO_4), 2 g/L cisteino hidrochlorido ($[\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_3^+\text{-CO}_2\text{H}]\text{Cl}^-$). Bakterijų kultūra auginama 18 val., esant 35 °C temperatūrai.

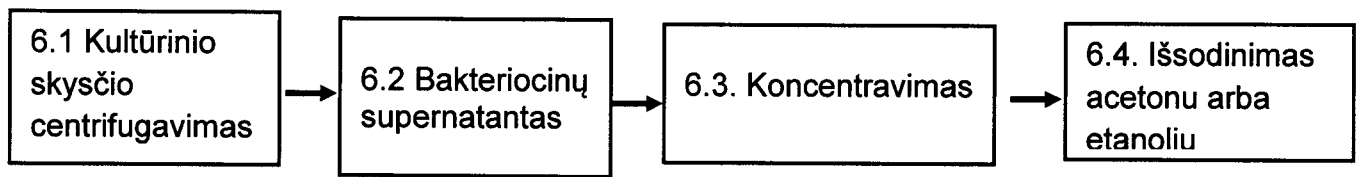
Pediococcus acidilactici (M1810) bakterijos auginamos nemaišant MRS sultinyje 18 valandų, esant 35 °C temperatūroje. Po to 2 % gauto inokulianto išsėjama į sterilintą fermentacijos terpę, sudarytą iš bulvių sunkos, 5 % ryžių ekstrudato, 0,1 g/L mangano sulfato (MnSO_4), 0,2 g/L magnio sulfato (MgSO_4), 2 g/L cisteino hidrochlorido ($[\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_3^+\text{-CO}_2\text{H}]\text{Cl}^-$). Bakterijų kultūra auginama 6 val., esant 35 °C temperatūrai.

Toliau pateikiamos pagrindinės kultūrinio skysčio charakteristikos (2 lentelė).

2 lentelė. Pagrindinės biopreparato charakteristikos

Rodiklio pavadinimas	Rezultatai		
	P. acidilactici KTU05-10	P. acidilactici KTU05-07	L. sakei KTU05-06
Išvaizda	Tirštos konsistencijos skystis	Tirštos konsistencijos skystis	Tirštos konsistencijos skystis
Spalva	Smėlio spalvos	Smėlio spalvos	Smėlio spalvos
Kvapąs	Specifinis bulvių sunkos kvapas	Specifinis bulvių sunkos kvapas	Specifinis bulvių sunkos kvapas
Sausų medžiagų, %	10-12	10-12	10-12
KSV/ml.	$> 10^{9-10}$	$> 10^{9-10}$	$> 10^{9-10}$
Indikatorinių kultūrų augimo slopinimo zonų diametras (be šulinėlių diametro), mm			
<i>Fusarium culmorum</i>	Ne mažiau 8	Ne mažiau 8	Ne mažiau 8
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Ne mažiau 20	Ne mažiau 22	Ne mažiau 24
<i>Bacillus subtilis</i>	Ne mažiau 20	Ne mažiau 20	Ne mažiau 23

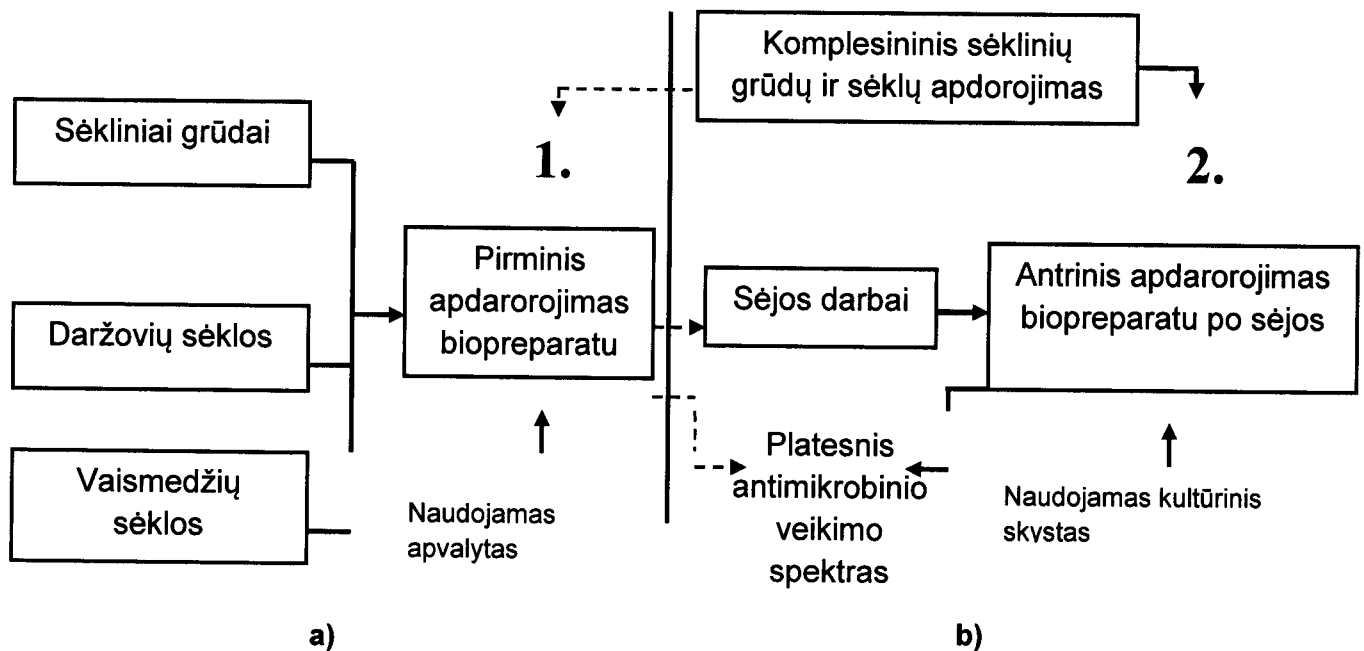
Toliau pateikiama antimikrobinio preparato valymo schema (II etapas) (2 pav).



2 pav. Antimikrobinio biopreparato valymo technologinė schema (I etapas):

Gautas kultūrinis skystis centrifuguojamas, nepertraukiamo veikimo centrifugoje, esant 17000 aps/min. Taip atskiriama biomasė. Toliau gautas supernatantas koncentruojamas, panaudojant ultrafiltracijos įrenginį, kurio membranos porų diametras 1000 – 3000 Da. Gautas koncentratas išsodinamas acetonu, etanoliu arba kitu organiniu tirpikliu.

Toliau pateikiamos pirminio ir antrinio apdorojimų biopreparatų principinės schemos (3 pav).



3 pav. Pirminio (a) ir antrinio (b) apdorojimo sukurtu biopreparatu principinės schemos

Eksperimentiniai tyrimai lauko sąlygomis su kuriu bioproduktu apdorotomis vasarinių kviečių sėklomis parodė didelę preparato įtaką kultūrų derlingumui.

Žemiau aprašomi keli išradimo būdo pritaikymo pavyzdžiai.

1 pavyzdys

Pienarūgščio rūgimo biopreparatų paruošimas.

Sėkliniams grūdams, sėkloms ir pasėliams apdoroti gaminami biopreparatai, sudaryti iš 3 skirtingų bakterijų kultūrų: *L. sakei* KTU05-06, *P. acidilactici* KTU05-07, *P. acidilactici* KTU05-10. Iš kokių kultūrų ir kokių jų kiekių gaminamas biopreparatas, priklauso nuo sėklinių grūdų ir/ar sėklų užterštumo nepageidaujamais mikroorganizmais laipsnio. Galimos biopreparatų sudėtys ir komponentų kiekiai yra pateikiami 3 ir 4 lentelėse.

3 lentelė. Apvalytų antimikrobinių biopreparatų kompozicijos

Biopreparato Nr.	Naudojama bakterijų kultūra		
	<i>L. sakei</i> KTU05-06	<i>P. acidilactici</i> KTU05-07	<i>P. acidilactici</i> KTU05-10
1a	0 - 100 %	0 - 100 %	
2a	0 - 100 %		0 - 100 %
3a		0 - 100 %	0 - 100 %
4a	0 - 100 %	0 - 100 %	0 - 100 %

4 lentelė. Sukoncentruotų antimikrobinių biopreparatų kompozicijos

Biopreparato Nr.	Naudojama bakterijų kultūra		
	<i>L. sakei</i> KTU05-06	<i>P. acidilactici</i> KTU05-07	<i>P. acidilactici</i> KTU05-10
1b	0 - 100 %	0 - 100 %	
2b	0 - 100 %		0 - 100 %
3b		0 - 100 %	0 - 100 %
4b	0 - 100 %	0 - 100 %	0 - 100 %

2 pavyzdys

Pienarūgščio rūgimo biopreparatų įtaka kviečių „Triso“ derlingumui

Prieš sėją kviečių grūdai buvo apdoroti biopreparatais, sudarytais iš 3 skirtingų bakterijų kultūrų: *L. sakei* KTU05-06, *P. acidilactici* KTU05-07, *P. acidilactici* KTU05-10. Mokslinių tyrimų metu buvo parinktos biopreparatų kompozicijos, turinčios

didžiausią įtaka vasarinių kviečių derlingumui (5 lentelė).

5 lentelė. Pienarūgščio rūgimo biopreparatų įtaka kviečių „Triso“ derlingumui

Tyrimo variantas	Grūdų derlius, t/ha	Grūdų derliaus priedas, t/ha	Derlius santykiniais skaičiais
Kontrolė	4,73	0	100
KTU05-6	5,15	0,42	108,8
KTU05-7	5,23	0,50	110,5
KTU05-10	5,08	0,35	107,4
KTU05-7 + KTU05-10	5,06	0,33	106,9
KTU05-6+ KTU05-7+ KTU05-10	5,06	0,33	107,0

3 pavyzdys

Pienarūgščio rūgimo biopreparatų veiksmingumas nuo kietųjų kūlių vasariniuose kviečiuose „Triso“

Prieš sėją kviečių grūdai buvo apdoroti biopreparatais, sudarytais iš 3 skirtingų bakterijų kultūrų: *L. sakei* KTU05-06, *P. acidilactici* KTU05-07, *P. acidilactici* KTU05-10. Mokslinių tyrimų metu buvo parinktos biopreparatų kompozicijos, veiksmingiausios nuo kietųjų kūlių vasariniuose kviečiuose (6 lentelė).

6 lentelė. Pienarūgščio rūgimo biopreparatų įtaka nuo kietųjų kūlių vasariniuose kviečiuose „Triso“

Tyrimo variantas	Užsikrėtusių varpų 1,5 m ²	Pažeidimų sumažėjimas, %
Kontrolė	306	0
KTU05-6	18	94,3
KTU05-7	4	98,8
KTU05-10	23	92,7
KTU05-7 + KTU05-10	4	98,8
KTU05-6+ KTU05-7+ KTU05-10	10	96,7

4 pavyzdys

Pienarūgščio rūgimo biopreparatų praktinis panaudojimas lauko sąlygomis

PRB pagal tą pačią schemą buvo panaudotas su trimis augalais (vasariniais kviečiais „Triso“ vasariniais miežiais „Class“ ir „Simba“).

a) naudojami apvalyti biopreparatai:

Kontrolė (vanduo 20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 1a (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 2a (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 3a (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 4a (20 ml/1 kg sėklos)

b) naudojami sukoncentruoti biopreparatai:

Kontrolė (vanduo 20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 1b (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 2b (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 3b (20 ml/1 kg sėklos)

Biopreparatas Nr. 4b (20 ml/1 kg sėklos)

PRB efektyvumas agronominiu požiūriu buvo tiriamas taikant lauko bandymų metodą. Kiekvienas lauko eksperimentas įrengtas 4 pakartojimais, laukeliai išdėstyti atsitiktine tvarka.

Sėkla buvo apdorojama sėklos beicavimui skirtu įrenginiu Hege 11, kuris užtikrina tolygų produkto pasiskirstymą ant sėklos. Prieš sėją sėklos buvo džiovinamos. Apvalytais biopreparatais apdorota sėkla buvo džiovinama lauke nuo saulės apsaugotoje vietoje, po to reikiamas kiekvieno varianto sėklos kiekis buvo pasveriamas kiekvienam laukeliui. Lauko sąlygomis laukeliai buvo sėjami tikslaus išsėjimo sėjamąja Hege 80.

Po sėjos pasėliai buvo apdorojami sukoncentruotais biopreparatų vandeniniais tirpalais. Tam buvo naudojami šie biopreparato paskleidimo ant pasėlių būdai:

purškimas, dulksnojimas ir miglojimas. Purškimo darbinis slėgis nuo 30 iki 50 bar, darbinio biopreparato tirpalo išpurškimo norma nuo 2000 iki 4000 L/ha. Dulksnojimo darbinis slėgis 50-60 bar, darbinio biopreparato dulksnojimo norma 200-300 l/ha, oro kiekis 8000-9000 m³/h. Miglojimo darbinis slėgis 2-3 bar. Prieš paskleidžiant biopreparatą, pasėlių laukas buvo suskirstytas į 0,1 ha (12m x 83,3m) darbinius plotus. Pasėlių laukas apdorotas biopreparatu pučiant ne didesniame nei 4 m/s vėjo greičiui ir esant aukštam atmosferos slėgiui.

Siekiant iliustruoti ir aprašyti šį išradimą, aukščiau yra pateikti tinkamiausių įgyvendinimo variantų aprašymai. Tai nėra išsamus arba ribojantis išradimas, kuriuo siekiama nustatyti tikslią formą arba įgyvendinimo variantą. Į aukščiau pateiktą aprašymą reikia žiūrėti daugiau kaip į iliustraciją, o ne kaip į apribojimą. Akivaizdu, kad tos srities specialistams gali būti akivaizdžios daugybė modifikacijų ir variacijų. Įgyvendinimo variantai yra parinkti ir aprašyti tam, kad tos srities specialistai geriausiai išaiškintų šio išradimo principus ir jų geriausią praktinį pritaikymą, skirtą skirtingiems įgyvendinimo variantams su skirtingomis modifikacijomis, tinkančiomis konkrečiam panaudojimui arba įgyvendinimo pritaikymui, nes konkrečiu atveju kiekybiniai šio panaudojimo būdo pritaikymo rodikliai gali skirtis. Numatyta, kad išradimo apimtis apibrėžiama prie jo pridėta apibrėžtimi ir jos ekvivalentais, kuriuose visi minėti terminai turi prasmę plačiausiose ribose, nebent nurodyta kitaip. Turi būti pripažinta, kad įgyvendinimo variantuose, aprašytuose tos srities specialistų, gali būti pateikti pakeitimai, nenukrypstantys nuo šio išradimo apimtys, kaip tai nurodyta toliau pateiktoje apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sėkliniai grūdai ir sėklos apdorojami išskirta pieno rūgšties bakterija, parinkta iš grupės, susidedančios iš *Lactobacillus sakei* MI806, *Pediococcus acidilactici* MI810 ir *Pediococcus acidilactici* MI807.

2. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėti grūdai ir sėklos yra apdorojami mažiausiai dviem iš minėtų pieno rūgšties bakterijų.

3. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėti grūdai ir sėklos yra apdorojami kompozicija, kurios sudėtyje yra *Lactobacillus sakei* MI806, *Pediococcus acidilactici* MI810 ir *Pediococcus acidilactici* MI807.

4. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėti grūdai ir sėklos yra apdorojami kompozicija, kurios sudėtyje yra mažiausiai dvi iš minėtų pieno rūgšties bakterijų.

5. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėti grūdai ir sėklos yra apdorojami biopreparatu, apimančiu kompoziciją pagal bet kurį iš 3-4 punktų.

6. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas biopreparatas yra apvalytas arba sukoncentruotas.

7. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas biopreparatas yra apvalytas.

8. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apvalytas preparatas yra naudojamas prieš sėją.

9. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas biopreparatas yra sukonzentruotas.

10. Sėklinių grūdų ir sėklų apdorojimo būdas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sukonzentruotas biopreparatas yra naudojamas po sėjos.

11. Biopreparato panaudojimas, skirtas sėkliniams grūdams ir sėkloms apdoroti.

12. Panaudojimas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad biopreparatu apdoroja sėklinius grūdus ir sėklas prieš sėją arba po sėjos.

13. Sėkliniai grūdai ir sėklos, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad yra apdorojami būdu pagal bet kurį iš 1-10 punktų.