



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Pieno rūgšties bakterijų fermentacija deoksinivalenolio ir
deoksinivalenolio konjugatų užterštuose miežių produktuose
sumažinimui**

Baigiamasis magistro projektas

Karolina Reikertaitė

Projekto autorė

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Vadovė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Pieno rūgšties bakterijų fermentacija deoksinivalenolio ir
deoksinivalenolio konjugatų užterštuose miežių produktuose
sumažinimui**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Karolina Reikertaitė

Projekto autorė

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Vadovė

Doc. dr. Aušra Šipailienė

Recenzentė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Karolina Reikertaitė

Pieno rūgšties bakterijų fermentacija deoksinivalenolio ir deoksinivalenolio konjugatų užterštuose miežių produktuose sumažinimui

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Karolina Reikertaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Reikertaitė, Karolina. Pieno rūgšties bakterijų fermentacija deoksinivalenolio ir deoksinivalenolio konjugatų užterštuose miežių produktuose sumažinimui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Technologijų mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: *Fusarium* spp. mikotoksinai, deoksinivalenolis, deoksinivalenolio konjugatai, pieno rūgšties bakterijos, fermentacija, fermentiniai aktyvumai

Kaunas, 2022. 64 p.

Santrauka

Darbas skirtas grūdų biologinio apdorojimo naudojant pienarūgštę fermentaciją įtakos įvertinimui *Fusarium* spp. mikotoksino deoksinivalenolio (DON) ir DON konjugatų tokių kaip DON-3- β -D-gliukozido (D3G), 3-acetildeoksinivalenolio (3-ADON) ir 15-acetildeoksinivalenolio (15-ADON) koncentracijų užterštuose miežių grūduose pokyčiams. Skirtingo užterštumo miežių grūdų mėginiai, kuriuose DON koncentracijos 223 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 248 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 460 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 996 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ir 6563 $\mu\text{g}/\text{kg}$, fermentuoti 48 val. pagausintomis MRS terpėje pieno rūgšties bakterijų (PRB) padermėmis (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. uvarum* ir *L. brevis*) ir įvertintos miežių grūduose prieš fermentaciją ir po fermentacijos DON bei DON konjugatų koncentracijos UHPLC-Orbitrap-HRMS įranga. Nustatyta, kad miežių biologinis apdorojimas reikšmingai sumažino DON koncentraciją vidutiniškai nuo 1698 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iki 1180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D3G koncentraciją nuo 519,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iki 113,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3-ADON nuo 82,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iki 37,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ir 15-ADON nuo 339,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iki 185,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Šiam poveikiui įtakos turėjo naudota PRB padermė ir jų dauginimosi bei išskiriamų metabolitų savitumai skirtingo *Fusarium* spp. užterštumo terpėje. Didžiausias miežių, užterštų DON mikotoksinais, nukenksminimo efektas pasiektas naudojant fermentacijai *L. casei* padermę, bioapdorojimo metu DON kiekis miežių mėginiuose sumažėjo vidutiniškai 47 %, D3G – 82,4 %, 15-ADON – 46,1 %, o 3-ADON – 55 %. *L. casei* taip pat gerai dauginosi fermentacijos metu skirtingos taršos miežiuose ir gamino organines rūgštis. Nustatytas ryšys tarp mikotoksinų užterštuose miežių grūduose (prieš fermentaciją) ir fermentinių profilių, rodo, kad *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai, produkuojantys DON ir tirtus DON konjugatus, pasižymi plačiu fermentinių aktyvumų spektru. PRB fermentacijos metu buvo fiksuotas amilazių ir ksilanazių aktyvumo mažėjimas, tuo tarpu proteazių aktyvumo didėjimas nustatytas tiek mažo užterštumo miežių mėginiuose, tiek ir didelio užterštumo. Tokiu būdu, galima prielaida, kad proteolitiniu aktyvumu grūdinėje žaliavoje pasižymintys grybai gali suaktyvėti fermentacijos sąlygose ir dalyvauti kombinacijoje su PRB (*L. casei*) mikotoksinų detoksikacijos procese.

Kaip vienas iš perspektyvių būdų, kontroliuoti grūdinės žaliavos mikrobiologinę taršą, buvo pritaikytas alaus pramonėje susidarantių atliekų – salyklojų ekstrudavimas kombinacijoje su PRB fermentacija. Atlikti tyrimai parodė, kad ekstruzijos technologija gali padidinti salyklojų maistinę saugą ir sulaukti pritaikymo PRB fermentuotų produktų gamybai.

Gauti rezultatai leidžia manyti, kad taršos sumažėjimas gali būti susijęs ne tik su bakterijų konjugacija, bet ir su fermentiniu mikotoksinų skaidymu PRB fermentacijos metu. Šio tyrimo išvadoje fiksuotas efektyvus fermentacijos poveikis DON ir jo konjugatų sumažėjimui atveria naujų biopesticidų vystymo perspektyvumą ir realias grūdų gamybos tvarumo didinimo galimybes.

Reikertaitė, Karolina. *Lactobacillus* Fermentation for Deoxynivalenol and Deoxynivalenol Conjugates Reduction in Contaminated Barley-based Products. Master's Final Degree Project / supervisor prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Technological Sciences, Food Technologies.

Keywords: *Fusarium* spp. mycotoxins, deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates, lactic acid bacteria, fermentation, enzymatic activities

Kaunas, 2022. 64 p.

Summary

This study is dedicated to evaluate the influence of biological treatment of cereals using lactic acid fermentation on *Fusarium* spp. changes in the concentrations of mycotoxin deoxynivalenol (DON) and DON conjugates such as DON-3- β -D-glucoside (D3G), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) in contaminated barley grains. Samples of barley grains of different contamination with DON concentrations of 223 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 248 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 460 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 996 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 6563 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were fermented for 48 hours with strains of lactic acid bacteria (LAB) (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. uvarum* and *L. brevis*) in MRS medium and evaluated DON and DON conjugate concentrations in barley grains before and after fermentation using UHPLC-Orbitrap-HRMS equipment. Biological treatment of barley significantly reduced DON concentrations from an average 1698 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D3G concentrations from 519,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 113,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3-ADON from 82,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 37,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 15-ADON from 339,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 185,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This effect was influenced by the LAB strain used and the specificities of their reproduction and secreted metabolites in different medium of *Fusarium* spp. contamination. The highest decontamination effect of barley contaminated with DON mycotoxins was achieved using *L. casei* strain for fermentation, DON content in barley samples decreased, on average, by 47%, D3G – 82,4 %, 15-ADON – 46,1 %, and 3-ADON – 55 %. *L. casei* also reproduced well during fermentation with different contaminants in barley and produced organic acids. The relations between mycotoxin-contaminated barley grains (before fermentation) and enzyme profiles, indicates that *Fusarium* spp. microscopic fungi producing DON and the DON conjugates have a wide range of enzymatic activities. Decreases in amylase and xylanase activity were observed during LAB fermentation, whereas increases in protease activity were observed in both low-contamination barley and high-contamination barley samples. It can be assumed, that fungi with proteolytic activity in cereal raw material can be activated during fermentation and participate in the detoxification process in combination with LAB (*L. casei*) mycotoxins.

One of the promising ways to control the microbiological contamination of grain raw materials was the extrusion of waste from the brewing industry – brewer's spent grain in combination with LAB fermentation. Studies have shown that extrusion technology can increase the nutritional safety of brewer's spent grain and be adapted for the production of LAB fermented products.

The obtained results suggest that the reduction in contamination may be related not only to bacterial conjugation but also to the enzymatic degradation of mycotoxins during LAB fermentation. In conclusion of this study, the observed effect of fermentation on the reduction of DON and DON

conjugates opens the prospects for the development of new biopesticides and opportunities to increase the sustainability of grain production.

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	9
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	10
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	11
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. <i>Fusarium</i> spp. toksinų charakteristika.....	14
1.1.1. Trichotecenų charakteristika	14
1.1.2. Modifikuoti DON toksinai	14
1.2. <i>Fusarium</i> spp. taršos įtaka miežių grūdams lyginant su kviečiais	15
1.3. Biologiniai metodai mikotoksinų mažinimui	16
1.3.1. Pieno rūgšties bakterijos.....	16
1.3.2. Pieno rūgšties bakterijų detoksikacijos mechanizmas.....	17
1.4. Salyklojų valorizacija ir panaudojimas	19
1.4.1. Salyklojų charakteristika	20
1.4.2. Salyklojų apdorojimas ekstruzijos technologija.....	20
1.4.3. Salyklojų PRB fermentacija ir pritaikymas maisto pramonėje	21
2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI	23
2.1. Tyrimų kryptys	23
2.2. Miežių grūdų mėginiai	24
2.3. Pieno rūgšties bakterijos	24
2.4. Salyklojus ir jo paruošimas	25
2.5. Miežių grūdų PRB fermentacija	25
2.6. Mikotoksinų analizė	25
2.7. <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų miežių grūdų fermentacijos proceso vertinimas	26
2.8. Fermentinių aktyvumų analizė	27
2.8.1. Amilolitinio aktyvumo nustatymas	27
2.8.2. Ksinalolitinio aktyvumo nustatymas	28
2.8.3. Proteolitinio aktyvumo nustatymas	29
2.9. Salyklojų cheminės sudėties ir kokybės vertinimas	30
2.10. Salyklojų fermentacijos įvertinimas	31
2.11. Statistinis duomenų įvertinimas	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS	32
3.1. DON ir DON konjuguotų formų miežių grūduose charakteristika	32
3.2. <i>Fusarium</i> spp. taršos miežiuose įtaką PRB fermentacijos procesui.....	34
3.2.1. pH ir BTR pokyčiai mikotoksinais užterštuose fermentuotuose mėginiuose	35
3.2.2. Pieno rūgšties izomerų pokyčiai <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų miežių fermentacijos metu	37
3.3. PRB fermentacijos įtaka DON ir DON konjugatams.....	38
3.4. Fermentinių aktyvumų pokyčiai PRB fermentacijos metu ir jų ryšys su mikotoksinais	40
3.4.1. <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų miežių grūdų fermentiniai aktyvumai ir jų ryšys su mikotoksinais	41
3.4.2. Fermentinių aktyvumų pokyčiai PRB fermentacijos metu	45
3.5. Pienarūgštės fermentacijos taikymo galimybės salyklojų apdorojimui	49
3.5.1. Ekstruzijos proceso įtaka salyklojų cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms.....	49

3.5.2. Ekstruduojų salyklojų PRB fermentacijos savitumai	51
IŠVADOS	55
LITERATŪROS SĄRAŠAS	56

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Naudojamų reagentų kiekiai.....	29
2 lentelė. Naudoti reagentai.....	30
3 lentelė. Salyklojų kokybės vertinimui naudoti metodai.....	30
4 lentelė. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) miežių grūdų mėginiuose.....	33
5 lentelė. Salyklojų cheminės savybės.....	51

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Tyrimų kryptių schema.....	23
2 pav. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijos miežių grūdų mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5)	32
3 pav. Pieno rūgšties bakterijų dauginimasis skirtingos <i>Fusarium</i> spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.)	35
4 pav. pH pokyčiai skirtingos <i>Fusarium</i> spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.).....	36
5 pav. BTR pokyčiai skirtingos <i>Fusarium</i> spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.).....	37
6 pav. L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai skirtingos <i>Fusarium</i> spp. taršos mėginių fermentacijos metu (po 0 val.; 24 val. ir 48 val.)	38
7 pav. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijų pokyčiai PRB fermentacijos skirtingo užterštumo miežių grūdų mėginiuose naudojant skirtingas PRB padermes	39
8 pav. Amilolitiniai aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis	42
9 pav. Ksilanolitinių fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis.....	43
10 pav. Proteolitinių fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis.....	44
11 pav. Amilolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu	45
12 pav. Ksilanolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu	46
13 pav. Proteolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu	46
14 pav. Fermentinių aktyvumų (amilolitinio, ksilanolitinio ir proteolitinio) pokyčiai PRB fermentacijos metu vieno iš mažiausio (B2) ir didžiausio (B5) užterštumo mėginiuose.....	47
15 pav. PRB padermių fermentinių aktyvumų (amilolitinio, ksilanolitinio ir proteolitinio) pokyčiai PRB fermentacijos metu.....	48
16 pav. Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) pokyčiai salyklojų ekstruzijos metu naudojant skirtingus temperatūrinius režimus (60 °C; 90 °C ir 110 °C).....	50
17 pav. Tirpių ir netirpių skaidulinių medžiagų pokyčiai salyklojuose ekstruzijos metu naudojant skirtingus temperatūrinius režimus (60 °C; 90 °C ir 110 °C).....	51
18 pav. PRB dauginimosi pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdorojimo salyklojaus mėginiuose .	52
19 pav. pH pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdorojimo salyklojaus mėginiuose.....	53
20 pav. BTR pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdorojimo salyklojaus mėginiuose.....	54

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Santrumpos:

3-ADON – 3-acetildeoksinivalenolis

15-ADON – 15-acetildeoksinivalenolis

B. – *Bifidobacterium*

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius

BTR – bendras titruojamasis rūgštingumas

D3G – deoksinivalenolio-3-gliukozidas

DON – Deoksinivalenolis

GRAS – patvirtinti ir saugūs naudojimui maisto ar cheminiai komponentai (angl. Generally Recognized As Safe)

KSV – kolonijas sudarančių vienetų skaičius

L. – *Lactobacillus*

MRS – *de Man, Rogosa* ir *Sharpe* mitybinė terpė

PRB – pieno rūgšties bakterijos

R² – determinacijos koeficientas

ĮVADAS

Miežiai yra ketvirti daugiausiai auginami pasaulyje grūdiniai javai, kurie populiarūs vidutinio klimato zonoje, įskaitant Šiaurės Vakarų Europą ir Kanadą. Pasaulyje per metus pagaminama apie 140 milijonų tonų miežių, kurie daugiausiai naudojami pašarų (70 %) ir alaus gamybai (27 %) [1]. Pagal gamybos apimtį šie grūdiniai javai išlieka viena iš svarbiausių žaliavų, todėl aktualu užtikrinti jos mikrobiologinę saugą. Dėl nekontroliuojamų klimato sąlygų (temperatūros ar santykinio oro drėgnumo) miežių grūduose gali atsirasti mikroskopinių grybų, išskiriančių antrinius metabolitus – mikotoksinus.

Žinoma, kad miežiai dėl skirtingos anatominių dalių sudėties, lyginant su kviečiais, yra laikomi mažiau jautrūs mikotoksinams, tačiau grybinės *Fusarium* spp. infekcijos požymius miežių grūduose yra daug sunkiau identifikuoti nei kviečiuose [1]. Daug tyrimų atliekama vertinant mikotoksinus kviečių grūduose ar sprendžiant jų detoksikacijos galimybes, tačiau analogiški tyrimai, susiję su mikotoksinų taršos prevencija, turėtų būti vykdomi ir miežių perdirbimo metu [1].

Fusarium spp. produkuojami mikotoksinai pasižymi toksiškumu, kuris pavojingas tiek žmogui, tiek gyvuliui. Vienas iš jų – deoksinivalenolis (DON), kuris gali turėti tokių šalutinių poveikių gyvuliams, kaip vėmimas, sumažėjęs svorio prieaugis, viduriavimas, kraujavimas, odos pažeidimai [2]. Deoksinivalenolis yra žinomas dėl galimų įvairių neigiamų simptomų, kurie pasireiškia ne tik gyvūnams (žiurkėms ar kiaulėms), bet ir žmonėms silpninant imuninę sistemą. Alaus pramonėje miežių tarša sukelia gėrimų putojimą ir galimą net butelių sprogamą. Deoksinivalenolis – vienas iš labiausiai paplitusių mūsų klimatinėse sąlygose grūdų produktuose trichotecenų grupės atstovų. Šis mikotoksinas nesuardomas maisto produktų gamybos metu, nes yra chemiškai atsparus ir termiškai stabilus. Organizmuose metabolizmo metu galimi DON virsmai pereinant į konjuguotas (maskuotas) formas. Tokiomis cheminėmis modifikacijomis, susidarant mažesnio toksiškumo junginiams, siekiama sumažinti pradinį mikotoksinų toksiškumą. Šie DON konjugatai yra taip pat toksiški ir sukelia neigiamų padarinių, tačiau jie mažai tirti ir EFSA iki šiol negali jų reglamentuoti. Todėl svarbu ieškoti būdų, kurie leistų sumažinti ne tik DON, bet ir DON konjugatų kiekius, taip detoksikuojant grūdinę žaliavą. Tokia problema aktuali visame pasaulyje, įskaitant ir Lietuvą.

Yra įvairių būdų kaip būtų galima išvengti mikotoksinų taršos, tačiau vis didesnis dėmesys skiriamas aplinkai draugiškai biokontrolei, tokiai kaip fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB). PRB pasižymi antimikrobinėmis savybėmis įskaitant slopinančiu poveikiu grybams ir yra pripažintos kaip GRAS [3]. Jos taip pat gali būti naudojamos antrinių produktų perdirbimui gerinant funkcines savybes ir kokybės parametrus.

Alaus pramonėje plačiai naudojamas miežinis salykklas, iš kurio alaus gamybos metu susidaro apie 70 % antrinių produktų (salyklojų) su likusiomis miežių vertingomis medžiagomis [4]. Pramonėje tokių didelės drėgmės atliekų susidaro dideli kiekiai, todėl dėl sandėliavimo stygiaus galimos aplinkosaugos problemos. Todėl tokia vertinga žaliava dažniausiai yra nukreipiama gyvulių pašarui, taip pat naudojama biodujų gamybai arba patenka į aplinką [5], [6]. Taikant ekstruziją salyklojo apdorojimui, manoma, kad galima būtų stabilizuoti salyklojų kokybę, o tolesnis jų bioapdorojimas pieno rūgšties bakterijomis leistų valorizuoti šiuos antrinius produktus atveriant pritaikymo galimybes maisto pramonėje [7].

Darbo tikslas: ištirti PRB fermentacijos panaudojimo galimybes ir biocheminių procesų savitumus *Fusarium* spp. užkrėstų miežių mėginių ir salyklojų apdorojimui.

Šio darbo uždaviniai:

1. charakterizuoti įvairaus *Fusarium* spp. užkrėstumo miežių grūdų pokyčius PRB fermentacijos metu naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčias PRB padermes;
2. įvertinti įvairaus *Fusarium* spp. užkrėstumo miežių grūdų fermentinių aktyvumą (ksilanolitinio, amilolitinio ir proteolitinio) pokyčius PRB fermentacijos metu ir jų ryšį su taršos bei fermentacijos proceso kriterijais;
3. ištirti salyklojų panaudojimo galimybes antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių raugų gamyboje, nustatant:
 - ekstruzijos proceso įtaką salyklojų (mišinyje su kviečių sėlenomis) įtaką cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms;
 - PRB dauginimosi, pH ir BTR pokyčių savitumus skirtingai apdorotų salyklojų terpėje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Fusarium* spp. toksinų charakteristika

Toksinų atsiradimas grūdiniuose žaliavoje yra glaudžiai susijęs su mikroskopinių grybų augimu palankioms aplinkos sąlygoms, ypač esant karštam ir drėgnam klimatui. Be to, užterštumas mikotoksinais gali atsirasti įvairiuose maisto gamybos grandinės etapuose, pvz., lauke, nuimant derlių, transportuojant, sandėliuojant, perdirbant ir paskirstant [8]. Šiuo metu, keičiantis klimato sąlygoms, maisto ir pašarų užterštumas mikotoksinais visame pasaulyje yra didelė problema. Remiantis naujausiais duomenimis apie maistinius grūdus, mikotoksinų paplitimas gali siekti 60–80 %, priklausomai nuo mikotoksino, naudojamo analizės metodo ir aptikimo ribos [8].

Fusarium spp. yra viena iš dažniausiai pasitaikančių augalų patogeninių grybų genčių. Šie grybai sukelia infekcijas įvairiuose ekonomiškai svarbiuose augaluose ir mažina ne tik javų derlių ir kokybę, bet ir kelia didelių problemų galutiniams vartotojams. Tam tikros *Fusarium* rūšys [9] gali gaminti skirtingus toksiškus antrinius metabolitus – mikotoksinus, kurie gali kauptis užkrėstuose augaluose ir sandėliuojamoje žaliavoje.

1.1.1. Trichotecenų charakteristika

Vieni iš labiausiai žinomų mikotoksinų yra trichotecenai (DON, HT-2, T-2 toksinas), fumonizinais (B1, B2, B3), zearalenonas (ZEN) ir nivalenolis (NIV) [10], [9]. Įvairūs trichotecenai, tokie kaip deoksinivelenolis (DON), gali būti aptinkami grūduose, tokiuose kaip kukurūzai, ryžiai ir miežiai. Deoksinivalenolį dažniausiai išskiria *F. graminearum* ir *F. culmorum* grybai [9]. Tai plačiai vyraujantis ir vienas svarbiausių ekonominius nuostolius sąlygojančių trichotecenų, tačiau jo toksiškumas mažesnis nei nivalenolio ar T-2 toksino. DON toksiškumas pasireiškia gebėjimu prisijungti prie ribosomų subvieneto sukeldami ribotoksiniinio streso atsaką slopinti baltymų sintezę [9]. Kadangi leukocitai yra pagrindiniai taikiniai, priklausomai nuo toksino koncentracijos ir poveikio trukmės [10], DON gali turėti neigiamą poveikį imuninei sistemai.

Europos Sąjungoje yra nustatytos didžiausios DON koncentracijos: kūdikių ir mažų vaikų mitybai skirtame grūdiniame maiste – 200 µg/kg, miltuose – 750 µg/kg ir duonoje – 500 µg/kg. DON yra labai stabilus aukštoje temperatūroje, tirpsta vandenyje ir poliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip metanolis, acetonitrilas ir etilo acetatas. DON poveikis gyvūnams dažniausiai pasireiškia virškinimo trakto sutrikimais, tokiais kaip vėmimas, hemoraginis viduriavimas, maisto atsisakymas. Ilgalaikis DON poveikis gali pasireikšti anoreksija, hepatotoksiškumu, dermatologinėmis problemomis. Ūmus poveikis žmonėms yra panašus kaip ir gyvuliams [9].

1.1.2. Modifikuoti DON toksinai

Yra žinoma, kad DON mikotoksinai gali turėti modifikuotas (maskuotas) formas dar vadinamas DON konjugatais [10]. Atsižvelgiant į vis didėjančią jų svarbą, pasiūlyta suskirstyti modifikuotus mikotoksinus į kategorijas (su keturiais skirtingais lygiais): laisvas formas, su matrica susijusias ir modifikuotas formas. Su matrica susiję mikotoksinai gali būti randami kompleksų pavidale (ištirpę arba įstrigę) arba prisijungę kovalentiniais ryšiais, o modifikacija gali būti skatinama biologiškai arba chemiškai. Trečiasis biologinės modifikacijos lygis apima funkcionalizavimą ir konjugaciją, o pastaroji modifikacija vyksta augaluose, gyvūnuose ir grybuose (ketvirtasis lygis). Trečiasis chemiškai modifikuotų mikotoksinų lygis apima termiškai ir netermiškai modifikuotas formas [10].

Tokių formų atsiradimas kelia susirūpinimą dėl jų galimo atsiradimo žaliavose ar maisto produktuose, kadangi taip apsunkinamas analitinis kiekybinis jų įvertinimas, o susidariusios struktūros taip pat gali pasižymėti toksiniu poveikiu [10]. Tokie modifikuoti (maskuoti) toksinai gali suaktyvėti esant tam tikroms sąlygoms, pvz., virškinimo trakte. Maisto produktai, kuriuose buvo rastas DON-3-Glc, kelia susirūpinimą dėl DON atsparumo rūgštinei skrandžio terpei ir fermentų veikimo. Įrodyta *in vitro*, kad DON-3-Glc virsta į DON veikiant bakterijoms, priklausančioms *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* ir *Bifidobacterium* gentims (būdingoms normaliai žarnyno mikroflorai). Taigi, toksinis DON poveikis, susijęs su maisto produktų vartojimu, gali būti didesnis nei remiantis šio mikotoksino nustatyta koncentracija maisto produktuose. Jei maskuota DON forma žmogaus organizme toliau metabolizuojama, susidaro mikotoksinų dariniai susijungiant su cukrumi, aminorūgštimis, sulfato grupėmis ar kitais biologiniais komponentais [10]. Šie modifikuoti mikotoksinai yra asociacinės sąveikos produktai, susidarantys tarp „natūralaus“ mikotoksino ir matricos makro sudedamųjų dalių, ir juose nėra kovalentinių ryšių.

Yra keli mechanizmai, galintys paaiškinti maskuotų mikotoksinų atsiradimą [10]. Jie gali būti pirmtakai, metabolitai arba skilimo produktai, esantys „pirminėje“ (arba laisvoje) mikotoksino formoje. Mikotoksinas gali susidaryti abiotinių veiksnių poveikyje, o taip pat vykstant pirminio toksino cheminėms reakcijoms su matrica. Maskuoti mikotoksinai gali būti toliau klasifikuojami pagal maskuotos formos sąsajas su pirmine mikotoksino forma.

Kaip metabolitai, maskuoti mikotoksinai gali atsirasti grybų, augalų ar žinduolių metabolizmo procesų metu [10]. Dažniausi pateikiami pavyzdžiai yra 3-acetildeoksinivalenolis (3-ADON) ir 15-acetildeoksinivalenolis (15-ADON), kurie buvo aptikti *Fusarium* spp. užkrėstuose grūdiniuose javuose. Žinoma, kad augalai turi tam tikrus apsauginius mechanizmus, kurie leidžia jiems sumažinti mikotoksinų poveikį. Jie paverčiami į poliškesnius metabolitus, kurie patenka į vakuoles tolesniam saugojimui arba susijungia su ląstelės sienelės komponentais. Kitas mechanizmas aiškina apie galimus mikotoksinų cheminius pokyčius gaminant maistą. Nors yra žinoma apie mikotoksinų terminį atsparumą, tam tikri procesai, tokie kaip kaitinimas ir fermentacija, turi didelį potencialą modifikuojant mikotoksinius [10]. Mikroskopinių grybų augimą ir antrinių metabolitų susidarymą apsprendžia daugybė veiksnių, tokių kaip pasėlių jautrumas taršai, žemės ūkio praktika, klimato sąlygos, derliaus nuėmimas, laikymo ir proceso sąlygos. *Fusarium* spp. toksinai gali susidaryti miežių salyklo gamybos proceso metu ir patekti į pagamintą alų. Trichotecenų, tokių kaip D3G, buvo rasta salykle ir aluje, paruoštame iš miežių salyklo, kuris buvo natūraliai užkrėstas *Fusarium* spp. Šie pelėšiai blogina salyklo kokybę sukeldami alaus putojimą, taip pat dėl susprogusių alaus butelių alaus pramonė patiria didelius ekonominius nuostolius [10].

1.2. *Fusarium* spp. taršos įtaka miežių grūdams lyginant su kviečiais

Miežiai ir kviečiai yra smulkiagrūdžiai javai, kurie plačiai naudojami tiek gyvulių ir žmonių mityboje. Dėl *Fusarium* spp. sukeltos infekcijos pablogėja šių javų grūdų kokybė ir sauga. Vieni pagrindinių skirtumų tarp miežių ir kviečių, kurie susiję su *Fusarium* infekcija ir mikotoksinų kaupimu yra jų anatinės sudėties skirtumai, apsprendžiantys augalų jautrumą *Fusarium* spp. infekcijai ir ligos sunkumui. Miežiai yra atsparesni grybelinės infekcijos plitimui, o kviečiuose infekcija plinta daug greičiau. Todėl pirminės infekcijos prevencija yra labiau svarbi kviečiams nei miežiams [1].

Norint aptikti infekcijos požymius vizualiai, taip pat pažymimi skirtumai tarp miežių ir kviečių grūdų. Miežiuose *Fusarium* spp. infekciją labai sunku aptikti sprendžiant pagal išorinius grūdų požymius

arba juos galima supainioti su kitomis ligomis, dėl to gali būti klaidingai įvertinamas *Fusarium* spp. poveikis miežiams. Tuo tarpu kviečiuose *Fusarium* spp. infekcija gali būti akivaizdi ir matoma apžiūrint pavienius grūdus. Vertinant išorinę javų būklę, vizualinė patikra gali būti naudinga kviečių augintojams, tačiau miežiams to pritaikyti negalima. Be to, taikomi separavimo metodai derliaus nuėmimo metu miežiams gali būti ne tokie veiksmingi lyginant su kviečiais [1].

Dauguma technologinių priemonių, skirtų pradinės *Fusarium* spp. infekcijos sumažinimui prieš derliaus nuėmimą, yra vienodos tiek miežiams, tiek ir kviečiams. Tačiau dėl anatomicinės miežių ir kviečių grūdų sandaros skirtumo taikomos kai kurios specifinės priemonės (pvz., fungicidų naudojimas) *Fusarium* spp. infekcijos prevencijai. Naudojant fungicidus, miežiuose ir kviečiuose stebimas skirtingas jų veikimo efektyvumas. Kviečiuose stebimas papildomas daugkartinio fungicido panaudojimo efektyvumas *Fusarium* spp. infekcijos ir DON koncentracijos mažinimui, o miežių atveju papildomo daugkartinio naudojimo efektyvumo taršai nematyti. Todėl, duomenys apie veiksmingą fungicidų naudojimą kviečiams negali būti sutapatinti ir skirti miežiams [1].

Kadangi miežiai ir kviečiai dažniausiai naudojami skirtingų maisto produktų gamybai, todėl į laikotarpį, kurio metu javai yra jautriausi mikotoksinų infekcijai taip pat turi būti atsižvelgiama. Siekiant pagerinti produkto kokybę, būtina miežius perdirbti po derliaus nuėmimo sumažinant juose mikroskopinių grybų buvimą ir jų dauginimąsi, o kviečių užterštumą mikotoksinais iki minimumo būtina sumažinti prieš derliaus nuėmimą [1].

1.3. Biologiniai metodai mikotoksinų mažinimui

Mikotoksinų prevencija yra vienas iš sudėtingiausių maisto pramonės uždavinių, nes mikotoksinais užteršti maisto produktai negali būti vartojami. Kadangi mikotoksinais yra termiškai atsparūs, maisto šiluminis apdorojimas ir kiti naudojami šiluminiai procesai nėra veiksmingi mikotoksinų pašalinimui [11]. Todėl nuolat ieškoma natūralių ir aplinkai draugiškų technologinių sprendimų kaip būtų galima detoksikuoti mikotoksinius. Vienas iš jų – biologinė kontrolė naudojant mikroorganizmus, tokius kaip grybai ar bakterijos [9].

Tyrimais įrodyta, kad pieno rūgšties bakterijos (PRB) ir kitos bakterijų rūšys, tokios kaip *Micrococcus luteus* ir *Bacillus subtilis*, gali prisijungti prie fumonizinių B₁ ir B₂, greičiausiai per pagrindinį bakterijų ląstelės sienelės komponentą – peptidoglikaną [12]. *Saccharomyces cerevisiae* efektyviausiai jungiasi su aflatoksinais sumažinant jų kiekį žemės riešutuose, užkrėstuose *Aspergillus parasiticus* sporomis. Įrodytas fermentacijos efektyvumas mikotoksinius mažinimui ir šalinimui.

Ne vienas tyrimas parodė PRB panaudojimo galimybes mikotoksinų biologiniam skaidymui, tačiau taip pat svarbu išsiaiškinti kokį mechanizmą bakterijos naudoja detoksikacijai. Mikotoksinų nukenksminimas gali būti suprantamas kaip jų skaidymas arba pavertimas į mažiau toksiškas molekules, kai juos veikia atitinkami fermentai ir mikroorganizmai. Literatūroje paskelbta [13], kad mikroorganizmai gamina fermentus, kurie keičia ne tik mikotoksinų, bet ir baltymų struktūrą, taip sumažinant toksiškos medžiagos aktyvumą. Teigiama [14], kad mikotoksino skaidymas priklauso nuo PRB padermės ir pačio mikotoksino kiekio užterštoje terpėje.

1.3.1. Pieno rūgšties bakterijos

Pieno rūgšties bakterijos tarp natūralių biologinių antagonistų turi keletą galimų pritaikymų [15]. Šie mikroorganizmai plačiai naudojami fermentuotų maisto produktų gamyboje, taip pat yra žarnyno

mikrofloros dalis. Tyrimai rodo, kad PRB turi teigiamą poveikį žmogaus sveikatai. Šios bakterijos ilgą laiką naudojamos fermentuotų maisto produktų gamybai. Jos gamina kai kuriuos antagonistinius junginius, veikiančius prieš patogenines bakterijas ir ypač prieš nepageidaujamą maisto gedimą sukeliančią mikroflorą. PRB naudojimas pelėsių augimui kontroliuoti gali būti alternatyva fiziniams ir cheminiams metodams, nes įrodyta, kad šios bakterijos pasižymi stipriu antigrybiniu aktyvumu. Norint kontroliuoti pelėsių augimą, ir prailginti fermentuotų produktų realizacijos trukmę, būtina atrinkti PRB padermes, pasižyminčias didžiausiu antimikrobiniu efektyvumu [15]. Pieno rūgšties bakterijos yra pageidaujamos praktikoje, nes jos yra saugios (GRAS), be to, yra daug padermių, kurias lengva kultivuoti ir prižiūrėti. Maisto detoksikacija atliekama naudojant gyvybingas mikroorganizmų ląsteles ir (arba) naudojant atrinktų PRB padermių gaminamus fermentus. PRB gamina keletą biologiškai aktyvių metabolitų, kurie gali slopinti grybų augimą ir užkirsti mikotoksinų susidarymą. PRB fermentacijos metu susidaro platus biologiškai aktyvių junginių spektras įskaitant organines rūgštis, anglies dioksidą, vandenilio peroksidą, 3-fenilpieno rūgštį ir mažos molekulinės masės peptidus – bakteriocinus [16]. PRB išskiria daugybę proteolitinių fermentų, galinčių hidrolizuoti baltymus, įskaitant su ląstelės sienele susietą proteinazę, kuri hidrolizuoja baltymą į polipeptidus; peptidų transporterius, kurie perneša peptidus į ląstelę, ir gausias tarpląstelines peptidazes, kurios skaido perkeltus peptidus iki amino rūgščių [16].

1.3.2. Pieno rūgšties bakterijų detoksikacijos mechanizmas

Pagal J. Magnusson [17], antimikrobinį PRB skaidymo mechanizmą galima paaiškinti tuo, kad jos kaupia organines rūgštis ir gamina antagonistinius patogenams antigrybinius junginius. Viena iš labiausiai ištirtų PRB padermių – *L. plantarum* gali sintetinti peptidus arba antimikrobinius baltymus, žinomus kaip bakteriocinai. Literatūroje pasitaiko prieštaringų tyrimų rezultatų, pagal kuriuos šie komponentai yra neaktyvūs prieš gramneigiamas bakterijas ir eukariotinius mikroorganizmus, tokius kaip mielės ar pelėsiai. Tačiau yra straipsnių, kuriuose aprašomas antigrybinis PRB poveikis prieš kai kuriuos mikotoksinus produkuojančius pelėsius [18]. *L. plantarum* fermentacijos metu taip pat susidaro fenoliniai junginiai, kurie galimai mažina mikrobinę taršą. Tarp mėginių, turinčių didžiausią antigrybinį poveikį, *L. plantarum* gamino DL-3-fenilpieno rūgštį, salicilo rūgštį ir vaniliną, o tuos pačius junginius gamino ir kita tirta *L. plantarum* padermė. Yra žinoma, kad šie *L. plantarum* sintetinami junginiai gali sukelti sutrikimus ląstelėse ir iššaukti jų stresą, dėl to gali įvykti plazminės membranos lizė [19]. Kituose šaltiniuose teigiama, kad tokie fermentai kaip epoksidazės, gali ardyti trichotecenų toksinį žiedą. Tad ir DON detoksikacija taip pat gali būti susijusi su oksidacinių fermentų veikimu katalizuojant *epoksidinio žiedo* suardymą [20].

Mokslininkai [15] išskyrė ir identifikavo šešias PRB kolonijas, kurios pasižymėjo antigrybiniu aktyvumu prieš kai kuriuos pelėsinis grybus, įskaitant *Fusarium* spp. Bakterijų fermentacijos metu susidarė keli junginiai, turintys stiprų antigrybinį poveikį. Dauguma nustatytų antigrybiniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų buvo mažos molekulinės masės junginiai tokie kaip organinės rūgštys, reuterinas, vandenilio peroksidas, baltyminės kilmės medžiagos, hidroksilo riebalų rūgštys ir fenolio junginiai [15]. Maisto produktuose PRB fermentacijos metu susidarancios organinės rūgštys (pieno ir acto) yra galutiniai angliavandenių metabolizmo produktai. Šios rūgštys pripažintos saugiomis ir plačiai naudojamos maisto produktų konservavimui [21].

Iškelta hipotezė, kad organinės rūgštys veikia plazminę membraną, neutralizuoja jos elektrocheminį potencialą ir padidindamos jos pralaidumą, sukelia bakteriostazę ir galiausiai jautrių organizmų žūtį. Ta pati hipotezė taip pat galėtų paaiškinti kai kurių pelėsių jautrumą organinėms rūgštims [18]. Ši

savybė buvo įrodyta tiriant acto ir propiono rūgščių poveikį pašalinei mikroflorai [15]. Esant didelei disociacijos konstantai, acto rūgštis buvo apibūdinta kaip veiksmingesnis konservantas nei pieno rūgštis ir buvo pripažintas kaip vienas iš geriausių pelėsių augimo inhibitorių [18]. Be to, buvo iškelta hipotezė apie fenilpieno rūgšties sinerginį efektą su neidentifikuotomis antigrybiniu aktyvumu pasižyminčiomis medžiagomis, susidarantiomis *L. plantarum* fermentacijos metu [22].

Taip pat yra žinoma, kad kai kurios PRB sudaro fenolinius junginius ar hidroksi riebalų rūgštis, kurios taip pat pasižymi antigrybiniu aktyvumu prieš daugelį maiste pasitaikančių patogeninių grybų [15]. Vandenilio peroksidą dauguma PRB gamina esant aerobinėms sąlygoms [23]. PRB nesintetina katalazės, todėl negali suardyti vandenilio peroksido, kuris kaupiasi ir oksiduoja mikroorganizmų lipidų membraną ir ląstelių baltymus [24]. Siekdami rasti alternatyvą fungicidams po derliaus nuėmimo, *P. expansum* sukkelto mėlynojo pelėsio prevencijai ir kontrolei, buvo [25] įvertintas vandenilio peroksido antimikrobinis aktyvumas *in vitro* ir parinkta minimali slopinanti koncentracija (MIK), naudojant skirtingus metodus, pvz., agar difuzijos, lakumo matavimą ir agar bei sultinio praskiedimo metodą. *P. expansum* augimas (taikant agar difuzijos metodą) buvo visiškai slopinamas 5 % vandenilio peroksido tirpalu; MIK vertė < 0,025 %. Pasiūlyta, kad nedidelis vandenilio peroksido kiekis obuolių žievelėje galėtų būti alternatyva fungicidams, naudotiniams *P. expansum* slopinimui. Vandenilio peroksidas gali slopinti ir *F. graminearum* sporų daigumą [26]. Be to, sporų, kurios buvo inkubuotos su 0,5 mM vandenilio peroksidu, inokuliacija žymiai sumažino mikotoksinų susidarymą (trichotecenų atveju).

Reuterinas yra dar viena medžiaga, kurią sudaro PRB padermės, įskaitant *L. brevis* fermentacijos metu naudojant glicerolį ir esant anaerobinėms sąlygoms [27]. Įrodyta, kad tam tikruose organizmuose šis junginys gali slopinti ribonukleazės aktyvumą – pagrindinį fermentą, dalyvaujantį DNR biosintezėje [15]. Be to, reuterinas gali slopinti *Aspergillus* spp. ir *Fusarium* spp. augimą [28]. Manoma, kad glicerolio priedai prie kai kurių PRB kultūrų, produkuojančių reuteriną, padidina jų antigrybinį aktyvumą [27].

Tiriant aflatoksinų pokyčius fermentacijos metu, nustatyta, kad aflatoksinų mažėjimas buvo susijęs ne su pH mažėjimu, o su mažos molekulinės masės metabolito susidarymu, kurį gamina PRB eksponentinio augimo pradžioje. Manoma, kad šis slopinimo mechanizmas yra skirtingas nei vandenilio peroksido ar organinių rūgščių. Taip pat buvo tiriama sąveika tarp pieno rūgšties padermių ir *Fusarium* spp. toksinų, tokių kaip zearalenonas (ZEN) ir jo darinys α -zearalenolis. Didelė dalis (38 – 48 %) abiejų toksinų buvo rasta bakterijų nuosėdose ir nebuvo aptikta zearalenono ar α -zearalenolio skilimo produktų [29], todėl buvo padaryta išvada, kad bakterijų sąveika, o ne metabolizmas yra pagrindinis mechanizmas, kuriuo toksinai pašalinami iš fermentacijos terpės. Panašūs rezultatai gauti su kitais mikotoksinais, įskaitant ochratoksiną A ir fumoniziną B1 ir B2 [15].

Taip pat yra atliktų tyrimų, pagal kuriuos PRB ląstelių lizės metu išskiriamos molekulės, kurios potencialiai slopina pelėsių augimą ir dėl to sumažina jų mikotoksinų susidarymą [30]. Šie metabolitai taip pat gali susidaryti PRB dauginimosi metu [30], taikant dializę, nustatyta, kad *Lactobacillus* ląstelių neturinčiuose ekstraktuose yra metabolito, kuris slopina aflatoksinų susidarymą. Manoma, kad šis aflatoksinų biosintezės slopinimas nebuvo susijęs su vandenilio peroksido susidarymu ar pH sumažėjimu [31]. Šios išvados sutapo su kitų mokslininkų išvadomis [30], pagal kurias *Lactobacillus* ląstelių neturintys supernatantai slopina aflatoksinų biosintezę susidarant specifiniams bakterijų metabolitams.

Papildomai atliktų tyrimų tikslas – išsiaiškinti mechanizmą, kuriuo PRB detoksikuoja kai kuriuos mikotoksinus, tokius kaip aflatoksinai, zearalenonas ir fumonizinais. Įrodyta, kad apdorojant PRB terminiu arba rūgštiniu būdu, jų gebėjimas pašalinti aflatoksiną B1 padidėja [32]. Šis rezultatas patvirtina, kad kai kurių pagrindinių junginių (NaOH ir Na₂CO₃) ir izopropanolio priedai turi neigiamos įtakos mikotoksinų sąveikai. PRB padermių gyvybingumas nebuvo esminis veiksnys, o tai rodo, kad sujungimas tikriausiai įvyko ant ląstelės sienelės. Manoma, kad PRB angliavandeniai ir (arba) baltyminiai komponentai vaidina svarbų vaidmenį sąveikoje su aflatoksinu B1, nes paveikus karščiu ar rūgštimis, PRB padermės smarkiai sumažino aflatoksiną B1 prisijungimą [33]. Daryta prielaida, kad šioje sąveikoje riebalų rūgštys nedalyvavo, nes PRB padermės veikimas lipazėmis nesukėlė reikšmingos aflatoksiną B1 sąveikos sumažėjimo.

Tyrimais [34] patvirtinti ankstesni rezultatai, kad PRB ląstelės sienelės peptidoglikanai dalyvauja sąveikoje su aflatoksinu B1 ir tai apsprendžia jo sumažėjimą. Terminis ir rūgštinis apdorojimas sukelia baltymų denatūraciją, dėl kurios atsiranda daugiau hidrofobinių paviršių. Be to, kai ląstelės apdorojamos organiniais tirpikliais, surištas toksinas greitai ekstrahuojamas, o tai patvirtina galimą hidrofobinę sąveiką tarp PRB ir aflatoksiną B1 [33]. Tuo tarpu vandenilinis ryšys ir elektrostatinė sąveika nėra reikšminga aflatoksiną B1 ir PRB sąveikoje, nes šis procesas neturėjo reikšmingos įtakos mono ir divalenčiams jonams arba pH (2,5 – 8,5) pokyčiui.

Nagrinėjant sąveikas, galimas iš vienos pusės tarp zearalenono ir α -zearalenolio ir PRB, tikėtina, kad šiame procese dalyvaujantys bakterijų ląstelių komponentai buvo angliavandeniai ir baltymai [35]. Paveikus gyvybingas PRB pronazę E, nesumažėjo jų geba surišti zearalenoną ir jo darinį. Tas pats fermentas buvo naudojamas ir vykdant eksperimentą su negyvybingomis PRB, praradusiomis gyvybingumą po apdorojimo karščiu ar rūgštimis. Tai įrodė PRB membranos komponentų gebą surišti mikotoksinus.

Vieni mokslininkai [15] teigė, kad peptidoglikanai yra labiausiai tikėtinos fumonizino surišimo vietos. PRB geba surišti mikotoksinus padidėjo, kai bakterijos buvo inaktyvuotos naudojant skirtingus fizinius ir cheminius apdorojimo būdus, o lizocimas ir mutanolizino fermentai, nukreipti į peptidoglikanus, iš dalies jį slopino. Fumonizino sumažėjimas aiškinamas PRB ląstelės sienelės komponentų sąveika su šiuo mikotoksinu, o ne su kovalentiniu ryšiu ar metabolizmu, nes negyvos ląstelės neprarado gebos sąveikauti su fumonizinu. Tikėtina, kad peptidoglikanai yra svarbiausi formuojant šias sąveikas. Todėl, išaiškinus įvairių PRB padermių bakterijų ląstelių sienelių komponentų savitumus, būtų galima atrinkti tokias PRB padermes, kurios būtų efektyviausios ir gebėtų sumažinti maiste ir pašaruose esančių fumonizino kiekį bei toksiškumą [15].

1.4. Salyklojų valorizacija ir panaudojimas

Alus yra vienas populiariausių alkoholinių gėrimų pasaulyje. Jis gaminamas iš salyklinių javų, vandens, mielių ir apynių, paliekant fermentuoti tam tikrą laiką (paprastai dvi ar tris savaites). Atsižvelgiant į didžiulę pramoninę salyklo ir alaus gamybą, antrinių produktų salyklojų dideli kiekiai susidaro ištiesus metus. Salyklojai (38,6 × 10⁶ tonų visame pasaulyje) [36] ir panaudotos mielės (125 000 tonų per metus Europoje) [37] yra daug energinės vertės ir baltymų turinčios žaliavos, ir gali būti naudojamos kaip pašaras gyvuliams. Jis naudojamas šlapias arba sausas ne tik gyvuliams, bet ir naminiams paukščiams, kiaulėms, ožkoms ir žuvims [38]. Taip pat neatmetama galimybė panaudoti salyklojus komposto gamybai ir žemės ūkio paskirčiai, tačiau dėl didelės drėgmės yra sunku

kompostuoti, todėl svarstoma galimybė panaudoti salyklojus, kaip vieną iš komposto sudedamųjų dalių [6].

Regionuose, kuriuose nėra išvystyta gyvulininkystė, panaudoti grūdai daugiausia paskleidžiami į laukus [39]. Tačiau pastaraisiais dešimtmečiais salyklojai tapo įvairių tyrimų objektu, davusiu gerų rezultatų, pritaikant salyklojus biokuro gamybai [40], fenolinių junginių, pieno rūgšties išgavimui ir kt. [41].

Fenoliniai junginiai – tai didelė grupė, kuri pastaruoju metu sulaukia didelio dėmesio dėl savo biologinio aktyvumo ir antioksidacinių savybių, turinčių teigiamą poveikį žmogaus sveikatai. Salyklojai gali būti gera žaliava fenolinių junginių ekstrahavimui [42] kombinuojant su naujomis ultragarso ar mikrobangų technologijomis [43]. Įvertinant tai, kad salyklojuose lieka dideli baltyminių medžiagų kiekiai, eilė tyrimų buvo skirti baltyminių medžiagų funkcionalizavimui. Vienas iš jų taikė salyklojams pirmiausiai hidroterminį apdorojimą (60 °C temperatūroje) ir po to fermentinę hidrolizę proteazėmis [44].

Nepaisant išskylančių iššūkių, tokie alaus pramonės antriniai produktai, kaip salyklojus, turi didelį panaudojimo potencialą ne tik biotechnologijų srityje, bet ir maisto pramonėje [5].

1.4.1. Salyklojų charakteristika

Salyklojų cheminė sudėtis gali skirtis priklausomai nuo alaus gamyboje naudojamos grūdinės žaliavos (miežių ar kitų grūdinių javų) kokybės, o taip pat nuo kitų veiksnių, tokių kaip derliaus nuėmimo laikas, salyklo gamybos sąlygų. Salyklojai yra nevienalytė lignoceliuliozės medžiaga, kurioje be skaidulinių medžiagų (20 – 70 %) lieka baltymų (20 – 30 %), mineralinių medžiagų ir vitaminų [5].

Lignoceliuliozines medžiagas sudaro ligninas (~ 12 – 28 %), celiuliozė (~12 – 25 %) ir daugiausiai arabinoksilanai (~ 28 %) [38]. Mineralinių medžiagų kiekis alaus daryklų salyklojuose yra 2,3 – 7,9 % [7]. Šiame antriniame produkte taip pat gausu oligo- ir polisacharidų bei fenolinių junginių [7]. Iš fenolio rūgščių salyklojuose daugiausiai yra ferulio rūgšties (1860 – 1948 mg/g) ir p-kumaro (565 – 794 mg/g), taip pat sinapo, kavos ir siringo rūgščių [7].

Salyklojams būdingas didelis drėgmės kiekis (kinta ribose nuo 75 iki 80 %), keliantis problemą jų laikymui, ypač kai jų susidaro dideli kiekiai vykdant alaus gamybą ištisus metus. Aplinkos apsaugos agentūra teigia, kad Europoje kasmet pagaminama beveik 34 – 35 mln. tonų salyklojų [45], [5]. Norint išsaugoti salyklojų kokybę ir pratęsti jų galiojimo laiką, būtina pašalinti iš jų vandenį džiovinant ar stabilizuoti jų kokybę šiuolaikine ekstruzijos technologija. Apdoroti termiškai salyklojai turėtų būti < 10 % drėgnio. Pirminis salyklojų apdorojimas ne tik apsaugo juos nuo gedimo, bet ir sumažina jų tūrinės apimtis, o tai palengvina sandėliavimą ir transportavimą, o tai yra svarbu vykdant jų valorizaciją [46].

1.4.2. Salyklojų apdorojimas ekstruzijos technologija

Iškart po salyklojų išgavimo alaus gamybos metu jų mikrobinis užterštumas yra ribotas (10^2 – 10^3 KSV/g) [47] ir jis gali būti laikomas mikrobiologiškai saugiu ir neviršijantis priimtinių maistui ribų. Tačiau per keletą valandų salyklojams vėstant iki kambario temperatūros (20 °C) mikrobiologinis užterštumas didėja. Be to, salyklojai dėl struktūros pokyčių, patiriamų salyklo maišymo metu, tampa patraukliu substratu ne tik hidroliziniams fermentams, bet ir aplinkos mikroflorai. Todėl jau po 5

dienų salyklojų laikymo 20 °C temperatūroje, mikroorganizmų koncentracija juose gali padidėti iki 10⁶ KSV/g, o vyraujančią salyklojų mikroflorą dažniausiai sudaro mikro aerofilinės, griežtos anaerobinės ir aerobinės, mezofilinės ir termofilinės bakterijos [47]. Laikant salyklojus kambario temperatūroje, gali pradėti juose daugintis mikroskopiniai grybai tokie kaip *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp. ir *Rhizopus* spp. [47]. Todėl salyklojai turi būti kuo greičiau stabilizuojami ir po to laikomi tinkamomis sąlygomis.

Ekstruzijos technologija gali būti panaudota efektyviai ir ekonomiškai sudarant galimybę nepertraukiamai perdirbti įvairias augalinės ir gyvūninės kilmės biomasės. Ekstruderyje žaliavos, veikiamos per apgaubą termiškai ir mechaniškai, struktūrizuojamos ir debakterizuojamos [48].

Apdorojant salyklojų, svarbu, kad ekstruderis būtų pilnai užkraunamas ir užtikrintas tolygus jo perdavimas ir išėjimas per antgalį. Esant didelei trinties jėgai ir temperatūrai, padidėja paviršiaus plotas ir salyklojus greitai ir tolygiai įkaista pasiekiant reikiamą apdorojimo temperatūrą. Kai tik medžiaga išspaudžiama per ekstruderio antgalį į aplinką, likęs vanduo išgaruoja ir taip medžiaga dėl slėgio perkryčio išsipučia [48].

Ekstruzija – tai aukštatemperatūrinis trumpalaikis procesas, naudojamas apdorojant lignoceliuliozinę, daug skaidulinių medžiagų turinčią žaliavą, ar krakmolingus augalinius produktus, pvz., sausųjų pusryčių ar užkandžių gamyboje. Ekstruzijos metu vyksta krakmolo kleisterizacija, baltymų denatūracija, fermentų inhibicija, antimitybinių faktorių eliminavimas bei debakterizacija sunaikinant pašalinę mikroflorą [49]. Perdirbant salyklojus ekstruzijos būdu, sumažinamas jo drėgnis ir stabilizuojama kokybė, tuo užkertamas kelias nepageidaujamų mikroorganizmų dauginimuisi. Tačiau ekstruzijos procesas nepašalina iš salyklojų viso vandens, todėl praktikoje ekstruduoti salyklojai papildomai džiovunami, kad laikymo jie išliktų mikrobiologiškai saugūs [50], [51].

1.4.3. Salyklojų PRB fermentacija ir pritaikymas maisto pramonėje

Įrodyta, kad fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB) yra vertinga biopriemonė duonos kokybės pagerinimui, pvz., leidžianti pailginti kepinų galiojimo laiką, pagerinti tešlos savybes ir padidinti kepinų savitąjį tūrį ar tekstūrą [52]. Taip pat gerina skaidulinių medžiagų sudėtį, vandens sulaikymo kepinuose gebą, dėl ko šiek tiek padidėja ir duonos saldumas [7]. Naudojant PRB fermentuotus produktus, pagerinamos kepinų juslinės savybės ir padidinama produkto mitybinė vertė, pvz., sumažinamas glikemijos indeksas [53]. Kadangi alaus gamybos procese naudojami komponentai yra patvirtinti žmonių vartojimui, salyklojai gali būti saugiai taikomi naujų maisto produktų vystymui. Nors šiuo metu šis antrinis produktas nesulaukė plataus pritaikymo maisto gamyboje, tačiau gali būti naudojamas kaip pigus priedas maisto gamybai [7].

PRB fermentuotas salyklojus, įtrauktas į duonai ruošti skirtų mišinių sudėtį, turėjo teigiamos įtakos trupinių kietumui, duonos savitajam tūriui ir juslinėms savybėms. Kitame tyrime fermentuotas salyklojus buvo išbandytas makaronų ruošimui pagerinant produkto kokybę ir maistinę vertę, lyginant su viso grūdo dalių miltais [53]. Taigi, fermentacijos technologija yra vertingas būdas pagerinti maisto produktų kokybės parametrus.

Salyklojai vis daugiau susilaukia dėmesio, kaip maisto priedas, dėl jų vertingos sudėties. Daugiausia vertinamos tirpios vandenyje skaidulinės medžiagos, sudarančios arabinoksilanus [54] ir β-gliukanus [55], kurios gali pagerinti žarnyno mikrobiotos veiklą. Manoma, kad susidarant iš arabinoksilanų ksilooligosacharidams skatinamas probiotinių bakterijų tokių kaip *Bifidobacterium* spp. ir

Lactobacillus spp. dauginimasis [55]. Be to, β -gliukanai gali sustiprinti žmogaus sveikatai naudingų mikroorganizmų, tokių kaip *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ir *Bifidobacterium animalis* subsp., veiklą ir metabolinį aktyvumą. Taip pat gali susidaryti dar vieni pageidaujami bioaktyvūs junginiai – fenoliai [56]. Daugelis tyrimų parodė, kad iš salyklojų galima išskirti fenolio rūgštis. Dažniausiai taikomi metodai yra ekstrahavimas skystis-skystis arba skystis-kietoji medžiaga (naudojant metanolio ir etilo acetato tirpiklius), rūgštinė hidrolizė ir muilinimas (NaOH) [57], [45].

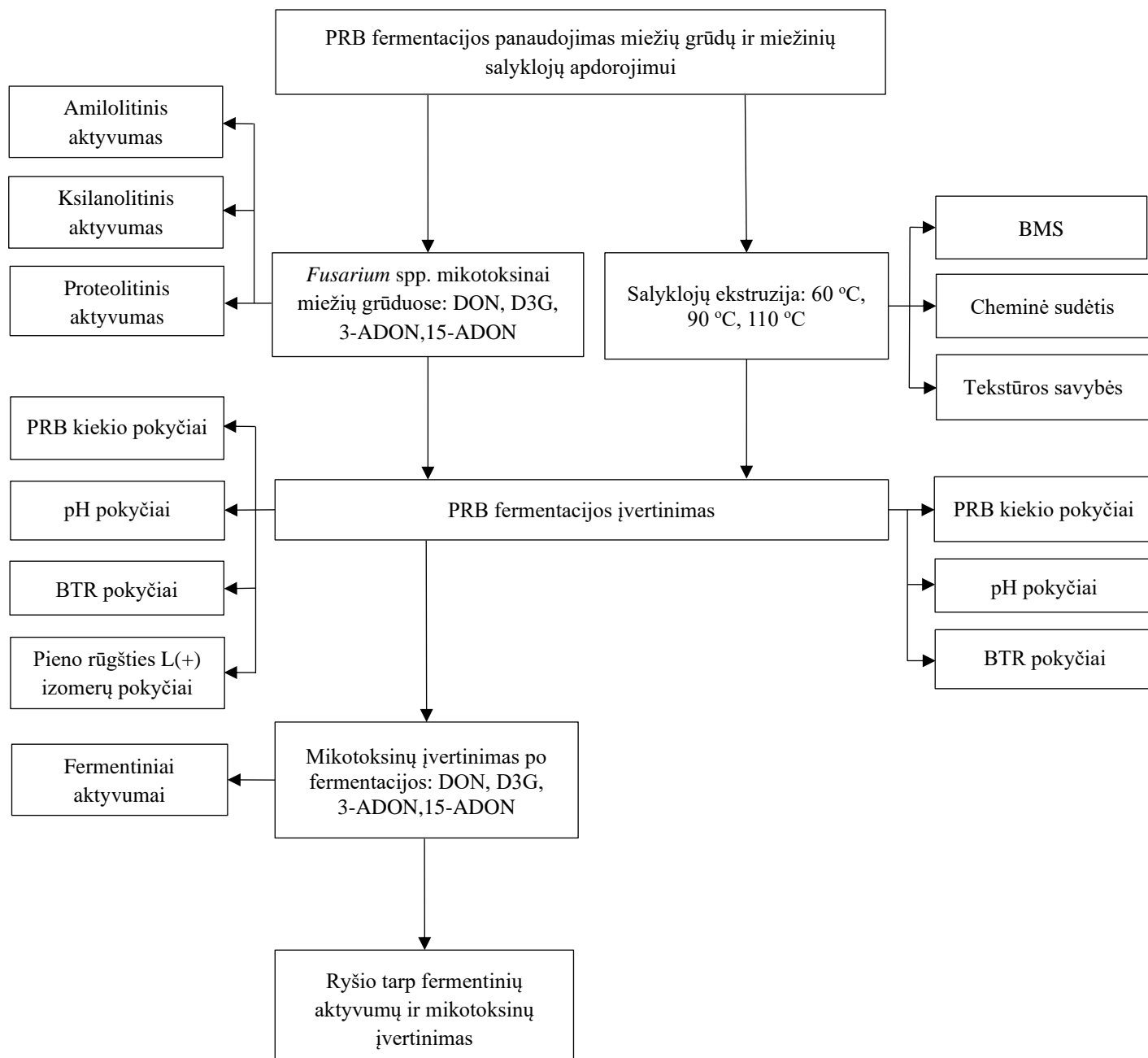
Dėl didelio maistinių skaidulų kiekio salyklojų priedu praturtintas maistas gali būti visapusiškai naudingas žmogaus sveikatai, pvz., tam tikrų lėtinių ligų prevencijai (koronarinės širdies ligos, vėžio, diabetas ir virškinimo trakto sutrikimai) [52]. Salyklojai palankiai veikia virškinimo sistemą, mažindami bendrą lipidų ir cholesterolio kiekį, ir gali sumažinti į produktus dedamų sintetinių antioksidantų kiekį [7]. Salyklojų pritaikomumas yra platus, nes juos taip pat galima perdirbti į miltus. Yra atlikta daugybė tyrimų, kurie parodė, kad salyklojus galima dėti į miltus, naudojamus daugelio maisto produktų, pvz., duonos, vaflių, sausainių, blynų, tortilijų, makaronų ir sausų pusryčių gamybai. Salyklojų priedais galima padidinti duonos maistinę vertę ir pagerinti juslines savybes. Salyklojų panaudojimas kepinių gamybai derinamas pagal grūdų rūšį, naudotą jų gamybai (pvz., salyklojai iš Pilsnerio gali praturtinti lengvą sumuštinių duoną, o Imperial stout salykklas labiau tinkamas tamsiai duonai) [7].

Salyklojai taip pat gali būti naudojamas kaip substratas fermentų gamybai, kuriuos galima naudoti ir maisto gamybai [7]. Be to, jie buvo išbandyti ir kaip substratas probiotinių mikroorganizmų dauginimui, o taip pat kultivavimui *Pleurotus ostreatus* grybo, kuris sintetina prebiotinėmis savybėmis pasižyminčius β -gliukanus [58]. Nustatyta, kad žarnyno mikrobiota, ypač *Lactobacillus* (pvz., *L. salivarius*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) ir *Bifidobakterijos* (pvz., *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*), gali iš dalies suardyti salyklojuose esantį ligniną ir metabolizuoti iš jo susidariusius junginius [59]. Gaubtinės žarnos modelyje buvo įrodytas dalinis lignino skaidymas, sąlygotas žmogaus mikrobiotos [60], [61]. Taigi, salyklojai galėtų būti valorizuoti naudojant atrinktus mikroorganizmus į antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius fermentuotus produktus, skirtus grūdų produktų kokybės ir saugos gerinimu.

2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų kryptys

Tiriamasis darbas skirtas iširti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių PRB fermentacijos įtaką DON ir DON konjugatų pokyčiams ir vykstantiems biocheminiams procesams *Fusarium* spp. užkrėstuose miežių mėginuose ir salyklojų bioapdoravimo metu. Tyrimų kryptys pateiktos 1 pav.



1 pav. Tyrimų kryptių schema

Eksperimentas vykdytas tokiais etapais:

Pirmame darbo etape Fusarium spp. užterštuose miežių grūdų mėginiuose analizuoti UHPLC-Orbitrap-HRMS įranga DON ir DON konjugatai (D3G, 3-ADON, 15-ADON).

Po to, tirta *Fusarium spp.* taršos grūduose įtaka PRB fermentacijos procesui naudojant atrinktas PRB padermes tokias kaip *Lactobacillus brevis* LUHS173, *Lactobacillus uvarum* LUHS245, *Lactobacillus plantarum* LUHS135, *Lactobacillus paracasei* LUHS244, *Lactobacillus casei* LUHS21. Tyrimo metu vertinti PRB dauginimosi savitumai, pH, BTR ir pieno rūgšties L(+) izomero pokyčiai fermentacijos metu (0 – pradiniu momentu; po 24 val. ir po 48 val. fermentacijos).

Eksperimento metu pagrindinis dėmesys skirtas PRB fermentacijos, naudojant įvairias padermes, įtakai DON ir DON konjugatų koncentracijų pokyčiams fermentacijos metu (po 48 val.). Papildomai analizuoti fermentinių aktyvumų (amilolitinių, ksilanolitinių ir proteolitinių) pokyčiai PRB fermentacijos metu ir jų ryšys su tirtais mikotoksinais *Fusarium spp.* užkrėstuose miežių grūduose prieš fermentaciją ir miežių mėginiuose po bioapdoravimo.

*Antrame darbo etape analizuotos salyklojaus panaudojimo galimybės PRB fermentuotų produktų gamyboje. Pirmiausiai miežinis salyklojus su kviečių sėlenų priedu apdorotas dviejų sraigčių ekstruderyje naudojant skirtingus temperatūrinius režimus (60 °C, 90 °C ir 110 °C). Ekstruduotų salyklojaus mėginių vertinta mikrobinė tarša, cheminė sudėtis ir funkcinės savybės. Po to atlikta salyklojų PRB fermentacija naudojant įvairias PRB padermes (*Lactobacillus brevis* LUHS173, *Lactobacillus uvarum* LUHS245, *Lactobacillus plantarum* LUHS135, *Lactobacillus paracasei* LUHS244, *Lactobacillus casei* LUHS210). Fermentacijos metu vertinti PRB dauginimosi savitumai, pH ir BTR pokyčiai (0 – pradiniu momentu; po 24 val. ir po 48 val. fermentacijos).*

2.2. Miežių grūdų mėginiai

Tyrimams naudoti skirtingo *Fusarium spp.* užterštumo miežių grūdų mėginiai (B1, B2, B3, B4, B5), kurie buvo gauti iš šiaurinės Serbijos dalies (Vaivodinos provincijos) 2019 metais. Mėginiai laikyti plastikiniuose maišeliuose šaldiklyje -18 °C temperatūroje.

Miežių grūdų mėginiai mikotoksinų (µg/kg) analizei ir jų PRB fermentacijai buvo ruošiami KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Paruošti grūdų mėginiai ištirti Latvijos maisto saugos, gyvūnų sveikatos ir aplinkos tyrimų institute „BIOR“.

2.3. Pieno rūgšties bakterijos

Mėginių fermentacijai buvo naudojamos penkios skirtingos pieno rūgšties bakterijų padermės: *Lactobacillus brevis* LUHS173, *Lactobacillus uvarum* LUHS245, *Lactobacillus plantarum* LUHS135, *Lactobacillus paracasei* LUHS244, *Lactobacillus casei* LUHS210, kurios buvo atrinktos pagal angliavandenių fermentaciją, antimikrobines ir antigrybines savybes. Šios bakterijos buvo gautos iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU), su kuriuo KTU vykdo Eureka projektą SUSFEED.

PRB laikytos iki analizės KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje 25 % glicerolio tirpale, - 70 °C temperatūroje. Fermentacijai PRB buvo atgaivintos ir dauginamos de Man, Rogosa ir Sharpe (MRS) terpėje (CM 0359, Oxoid Ltd, Hampshire, JK) 48 val. optimalioje temperatūroje (30 °C).

Miežių grūdų mėginiai (B1-B5) buvo sumalti laboratoriniu malūnu (Bühler-Miag Brunswick, Vokietija) ir toliau naudojami PRB fermentacijai. Kiekvienas mėginys (10 g) buvo sumaišytas su

distiliuotu vandeniu, kad būtų pasiekta 65 % drėgnis, tada 3 % (nuo bendro tūrio) PRB ląstelių buvo pasėta į MRS terpę. Miežių mėginiai su PRB buvo inkubuojami anaerobiniu būdu stacionariomis sąlygomis 24 valandas 30 °C temperatūroje termostate (TC160, SalvisLab Thermocenter, IL, JAV).

2.4. Salyklojus ir jo paruošimas

Miežinis salyklojus iš UAB „Gubernija“ pristatytas į „UAB Ustukių malūnas“. UAB „Ustukių malūnas“ paruoštas miežinio salyklojaus ir kviečių sėlenų mišinys, kuris ekstruduotas gamybinėje bazėje esančiu dviejų sraigtų ekstruderiu. Ekstruzijos metu keistos temperatūros (60 °C, 90 °C, 110 °C) esant pastoviam sraigtų apsisukimų greičiui (50 aps./min).

Skirtingose temperatūros sąlygose apdorotas salyklojus džiovintas, smulkintas ir supiltas į plastikinius maišelius pristatytas į KTU Maisto mokslo ir technologijos katedrą, kur laikytas iki eksperimento šaldiklyje -18 °C temperatūroje.

2.5. Miežių grūdų PRB fermentacija

Fermentacijai mėginių ruošimui naudojama 15 g miežinių miltų, 30 ml sterilaus distiliuoto vandens ir 1,35 ml (3 % nuo bendros masės) atitinkamos PRB kultūros [63].

Turinys sumaišomas steriliuose stikliniuose 80 ml talpos buteliukuose ir patalpinamas į 30 °C temperatūros termostatą, kuriame fermentuojama iki 48 valandų. Po to vertinama atrinktuose mėginiuose (po 0 val., 24 val. ir 48 val.) PRB kiekis, pH ir BTR.

2.6. Mikotoksinų analizė

Mėginių paruošimui iš miežių grūdų buvo naudotas modifikuotas buferinės QuEChERS ekstrakcijos metodas (EN 15662) pagal Reinholds ir kt. [64] aprašytą procedūrą.

Mėginio paruošimas analizei. Analizei pasverta 5 g tiriamojo mėginio, atsitiktine tvarka paimto iš 50 g ozonuoto grūdų ėminio ir patalpinta į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlį, į kurį vėliau buvo įpilti atitinkami kiekiai mikotoksinų standartų tirpalų. Po to, į mėgintuvėlį įpilta 10 ml dejonizuoto vandens ir 10 ml acetonitrilo bei subertas buferinės druskos mišinys. Turinys maišomas maišyklėje 1 min ir purtomas 10 min automatine purtykle. Vėliau mišinys centrifuguotas kambario temperatūroje 4500 aps/min greičiu 5 min Heraeus Multifuge 3L-R centrifuga. Po centrifugavimo iš mėgintuvėlio paimta 6 ml ekstrakto ir įpilta į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlį, kuris šaldomas -80 °C temperatūroje 30 min Heto Ultra šaldiklyje tam, kad būtų nusodinti šalutiniai ekstrakcijos produktai bei lipidai. Atšildytas centrifugatas vėl centrifuguojamas kambario temperatūroje 4500 aps/min greičiu 5 min tikslu, išgauti organinių junginių centrifugatą. 3 ml gauto centrifugato išgarinta vakuuminiame rotaciniame garintuve TurboVap LV ir gautos nuosėdos ištirpintos 500 μl vandens/metanolio (50:50, v/v) mišinyje. Gautas ekstraktas filtruojamas per 0,22 μm vienkartinį membraninį filtrą ir perkeliamas į automatinio dozavimo buteliukus tolesnei analizei.

Mikotoksinų nustatymui naudoti reagentai: acetonitrilas ir metanolis, gradientinio švarumo. Skruzdžių rūgštis, gradientinio švarumo (≥96.0%) ir amonio formiatas (99%). Vanduo išgrynintas, dejonizuotas Milli-QTM vandens gryninimo sistema. Buferinis druskos mišinys, susidedantis iš trinatrio citrato dihidrato (1 g), natrio chlorido (1 g), dinatrio vandenilio citratas seskvihidratas (0,5 g), ir bevandenis magnio sulfatas (4 g). Etaloniniai tiriamųjų medžiagų tirpalai ruošti naudojant jų

standartus (10 mg) - DON, D3G, 3-ADON ir 15-ADON – tirpinant acetonitrile (10 ml). Iš standartinių tirpalų ruošti 10, 40, 100, 250 ir 500 mg/kg koncentracijos analitiniai tirpalai.

Naudota aparatūra: HPLC-TOF-HRMS analizė buvo atlikta naudojant UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, JAV) didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) sistemą, sujungtą su Q-ToF masės spektrometru (Bruker, Vokietija). Chromatografinis atskyrimas buvo atliktas atvirkštinės fazės analitinėje kolonėlėje (Kinetex C₁₈, 1,7 μm, 100 Å, 50 × 3,00 mm; Phenomenex, JAV) esant 0,35 ml min⁻¹ srauto greičiui. Analizė buvo atlikta teigiamu viso skenavimo režimu visiems mikotoksinams m/z skenavimo diapazone nuo 50 iki 1000. Kiekybiniam įvertinimui taikomas masės ekstrahavimo langas buvo nustatytas į ±5 ppm esant 10 000 viso pločio pusės didžiausios (FWHM) skiriamosios gebos.

Kiekvieno analizuoto mikotoksino nustatymui, parinkti reikiami analitiniai analizės režimai, kurie užtikrino pakankamą mikotoksinų junginių detekcijos skaičių, junginių identifikavimui. Įrenginio duomenų surinkimas buvo kontroliuojamas HyStar 3.2 programine įranga (Bruker Daltonik GmbH, Brėmenas, Vokietija), o duomenų analizė atlikta QuantAnalysis 4.3 programine įranga (Bruker Daltonik GmbH, Brėmenas, Vokietija). Visi nustatymai buvo atlikti trimis egzemplioriais.

2.7. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų fermentacijos proceso vertinimas

Pieno rūgšties bakterijų kiekio įvertinimas. Pieno rūgšties bakterijų ląstelių kiekis fermentuotuose miltuose nustatytas skiedimo metodu (pagal Nr. 7 LST EN ISO 6887-1:2017 standartą).

Šviežia sterili terpė ruošama su 17,45 g „Biolife-MRS AGAR WITH TWEEN 80” agaru, kuris sumaišomas su 250 ml distiliuotu vandeniu ir laikoma termostate 60 °C temperatūroje.

Pirmam skiediniui 3 g fermentuoto preparato sumaišyta su 27 ml fiziologinio (NaCl) tirpalo (9 g/l) santykiu 1:9 ir paruošti atitinkami skiedimai iš kurių toliau imamas 1 ml mėginio ir toliau atskiedžiama. Į Petri lėkšteles su MRS agaru pasėti pasirinkti skiediniai. Lėkštelės inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis, termostate 30 °C temperatūroje 3 paras. Susidariusių kolonijų skaičius skaičiuojamas po 3 parų ir nustatomas užaugęs PRB skaičius 1 g tiriamo mėginio. PRB kolonijų skaičius išreikštas kolonijas sudarančiais vienetais mililitre (KSV/g) ir vėliau duomenys perskaičiuoti į logaritminę (log₁₀) formą. KSV/g apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = \sum C / (n1 + 0,1n2) \cdot d ;$$

čia: N- Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 ml (g) produkto; $\sum C$ - suma kolonijų, suskaičiuotų ant visų vertinimui parinktų lėkštelių; n1- skaičius pirmo skiedinio lėkštelių, kuriose buvo suskaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; n2-skaičius antro skiedinio lėkštelių, kuriose buvo skaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; d- skiedimo koeficientas, atitinkantis pirmą skiedinį, kurio lėkštelės atrinktos kolonijoms skaičiuoti.

pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo nustatymas. Mėginių pH nustatomas pagal LST EN ISO 10523:2012 standartą. Tyrimui pasveriami 2,5 g fermentuotos žaliavos ir užpilama 25 ml vandens, mišinys išmaišomas nufiltruojamas per kaproninį filtrą ir matuojama su pH-metru.

Mėginių bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) nustatomas pagal LST 1553:1998 standartą. Rūgštingumas išreikštas Neimano laipsniais (°N), t.y. 1 N šarmų tirpalo ml skaičiumi, reikalingu nutitruoti rūgštis, esančias 100 g produkto. Rūgštingumui nustatyti mėginys analogiškai ruošiamas kaip ir pH nustatymui. Mėginiai titruoti 0,1 N NaOH tirpalu, naudojant indikatorių 1 % fenolftaleiną,

iki avietinės spalvos, neišnykstančios 1 min. Terpės bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) apskaičiuotas pagal formulę:

$$BTR=2 \cdot a \cdot k ;$$

čia: a – NaOH tirpalo kiekis sunaudotas mėginio titravimui (ml); k – NaOH tirpalo titro pataisos koeficientas (k = 1).

Pieno rūgšties izomerų analizė. Pieno rūgšties L⁺ ir D- izomerų nustatymui buvo naudotas K-DLATE 07/14 reagentų rinkinys iš Megazyme International Airija. Šie izomerai nustatyti fermentinių reakcijų metu. Pirmosios reakcijos metu, veikiant D-laktato dehidrogenazei (D-LDH) D(-) izomeras oksiduojamas iki piruvato, susidarant nikotinamido-adenino dinukleotidui (NAD⁺). Antrosios reakcijos metu piruvatas paverčiamas į D-alaniną ir 2-oksoglutaratą, veikiant fermentui D-glutamato-piruvato transaminazei (D-GPT). Reakcijos metu susidaro NADH, kurio kiekis koreliuoja su D(-) pieno rūgšties izomero kiekiu. NADH kiekis įvertinamas spektrofotometru, esant 340 nm bangos ilgiui.

D(-) pieno rūgšties koncentracija (g/l) apskaičiuojama pagal formulę:

$$c = V \times MW \varepsilon \times d \times v \times \Delta AD - \text{pieno rūgšties} ;$$

čia: V – galutinis tūris (ml); MW – molekulinė D-pieno rūgšties masė (g/mol); ε – NADH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui = 6300 (l x mol⁻¹ x cm⁻¹); d – šviesos kelias (cm); v – mėginio tūris (ml)

Tų pačių reakcijų metu L(+) pieno rūgštis (L-laktatas) panaudojant L-laktato dehidrogenazę (LLDH) yra oksiduojama iki piruvato; reakcijos metu susidaro nikotinamido – adenino dinukleotidas (NAD⁺). Po to vėl veikiama D-GPT fermentu ir išmatuojamas NADH kiekis spektrofotometru, esant 340 nm bangos ilgiui. L(+) pieno rūgšties kiekis apskaičiuojamas, naudojant tą pačią formulę kaip ir D(-) pieno rūgšties izomero skaičiavimui.

2.8. Fermentinių aktyvumų analizė

Fermentiniai aktyvumai tirti nefermentuotų skirtingo užterštumo miežių grūdų mėginių, o taip pat po PRB fermentacijos įvairiomis padermėmis. Fermentinių aktyvumų tyrimams miežių grūdai buvo sumalami WZ-1 laboratoriniu malūnu (ZBPP, Lenkija) ir paruošiami ekstraktai. Ekstraktams ruošta vandeninė miežių miltų suspensija sumaišant 5 g miežių grūdų malinio ir 30 ml distiliuoto vandens. Suspensija homogenizuota 2 min (9500 aps/min) ir po to - centrifuguota 24 min (4500 aps./min). Supernatantas (skysta fazė su fermentais), naudotas fermentinių aktyvumų analizei, buvo laikoma šaldymo kameroje (-18 °C temperatūroje).

2.8.1. Amilolitinio aktyvumo nustatymas

α -amilazės aktyvumas nustatomas pagal ISO 3983:1977. Šio metodo esmė: amilolitinio aktyvumo vienetas suprantamas kaip fermento kiekis, galintis 30 °C temperatūroje per 10 min. katalizuoti 1 g tirpaus krakmolo hidrolizę į dekstrinus.

Į penkis mėgintuvėlius įpilama po 2,5 ml krakmolo tirpalo ir 10 min laikoma 30 °C vandens vonioje. Po to į mėgintuvėlius įpilama po 2,5 ml filtrato ir vėl inkubuojama 10 min 30 °C vandens vonelėje.

Iš kiekvieno mėgintuvėlio turinio imama po 0,25 ml ir sumaišoma su 25 ml jodido tirpalo (Standartinio jodido tirpalo paruošimas: 0,5 g jodido ir 5 g KJ ištirpinami 50 ml distiliuoto H₂O).

Tirpalas išmaišomas ir praskiedžiamas iki 200 ml distiliuotu H₂O. Darbinio jodido tirpalo paruošimas: praskiedžiama matavimo kolboje 2 ml standartinio jodido tirpalo su 0,5 M HCl iki 100 ml).

Toliau, gautas tiriamasis tirpalas su darbinio jodido tirpalu, krakmolu ir filtratu pilamas į Genesys 10 UV (Thermo Electron Corporation, JAV) spektrofotometro kiuvetę ir vertinamas optinis tankis. Kiekvieno mėginio absorbcija matuojama 4 kartus, kai $\lambda = 670$ nm. Analogiškai matuojamas pasiruoštas tuščias mėginys (nepilant tiriamų miltų filtrato). Apskaičiuojami nustatytų absorbcijų vidurkiai.

Hidrolizuoto krakmolo kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$m = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 0,1 ;$$

Čia: D₁ – kontrolinio mėginio absorbcija; D₂ – tiriamojo mėginio absorbcija; 0,1 – krakmolo kiekis, paimtas iš mėginio.

Grybinių amilazių aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę [65]:

$$A = \frac{7,264 \cdot m + 0,03766}{m_1 \times 5} \times PF \times V ;$$

Čia: m – ištirpusio krakmolo masė, g; m₁ – fermento kiekis standartiniame tirpale, g; V – fermento tirpalo (grūdų ekstrakto) tūris, ml; PF – praskiedimo faktorius.

2.8.2. Ksilanolitinio aktyvumo nustatymas

Ksilanolitinis aktyvumas buvo nustatytas naudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgšties) metodą [66]. Šio metodo esmė: veikiant ksilanazei, vyksta ksilano hidrolizė ir susidaro ksilozė, kuri su 3,5 – dinitrosalicilo rūgštimi stipriai šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius. Gauta spalvoto tirpalo absorbcija matuojama 4 kartus, kai $\lambda = 540$ nm. Apskaičiuojamas rezultatų vidurkis.

Vienas fermentinio aktyvumo vienetas U apibūdinamas fermentų kiekiu išlaisvinančiu 1 μ mol ksilozės per minutę. Analizei naudoti anksčiau pasiruošti miežių miltų ekstraktai.

Kalibracinei kreivei sudaryti, iš standartinio ksilozės tirpalo 10 mg/ml paruošto acetatiniame buferyje, ruošiami etaloniniai ksilozės (arba gliukozės) tirpalai 1 M natrio acetato buferiniame tirpale (bendras tūris 500 μ l). Į mėgintuvėlį pilame 0,4 ml filtrato, 0,15 ml acetatinio buferio ir 0,1 ml ksilano tirpalo (ksilano tirpalas ruoštas: beržo ksilaną (0,5 g) ištirpinant 0,1 M natrio acetato buferyje (100 ml; pH = 4,5; 50 °C temperatūroje).

Įpylus po 500 μ l DNS reagento ir 1 ml dist. H₂O₂ mėgintuvėliai kaitinami tiksliai 5 min. 100 °C temperatūros vandens vonioje. Po to tirpalai atšaldomi iki kambario temperatūros, įpilama 3 ml distiliuoto vandens (bendras tirpalo tūris 5 ml). Praskiestas tiriamasis tirpalas įvertinamas spektrofotometru Genesys 10 UV (Thermo Electron Corporation, JAV), tirpalų spalvos intensyvumas ($\lambda = 540$ nm). Lygiagrečiai atliekamas tuščiasis bandymas, tik vietoj ksilozės etaloninio tirpalo naudojamas 100 μ l distiliuoto vandens. Braižoma tiesinė priklausomybė tarp absorbcijos verčių ir ksilozės koncentracijos tirpale. Ksilanzės aktyvumas nustatomas tokiu pat būdu, kaip ir sudarant kalibracinę kreivę, vietoj ksilozės etaloninio tirpalo pilama 100 μ l fermentinio preparato tirpalo, kurio

koncentracija – 1 mg/ml. Pagal išmatuotą spalvoto tirpalo optinį tankį iš kalibracinės kreivės nustatomas ksilano hidrolizės metu susidariusios ksilozės kiekis ir perskaičiuojamas į μmol .

Javų endoksilanazių aktyvumui skaičiuoti K (AV/g) naudojama lygtis [66].

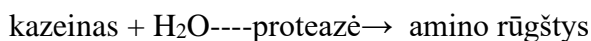
$$K = \frac{a \cdot PF \cdot \Delta A \cdot V}{b \cdot s \cdot \Delta t \cdot m};$$

čia: a – reakcijos mišinio tūris (ml); b – grūdų ekstrakto kiekis reakcijos mišinyje (ml); s – ksilozės standartinės tiesės polinkis (ml/ μmol); PF – praskiedimo faktorius; Δt – reakcijos trukmė (min); m – grūdų masė, naudota ekstraktui paruošti (g); V – grūdų ekstrakto tūris (ml); V_F – fermento darbinio tirpalo tūris (ml); g – fermento kiekis (g); d – fermento tirpalo tūris reakcijos mišinyje (ml), ΔA – absorbcijos pokytis ($\Delta A_{\text{mėginio}} - \Delta A_{\text{substr}} - \Delta A_{\text{ekstr}}$).

Norint fermento aktyvumą išreikšti nkat/g, aktyvumo vertės dauginamos iš 16,67 ($1AV = 16,67$ nkat).

2.8.3. Proteolitinio aktyvumo nustatymas

Proteolitinis aktyvumas buvo atliktas naudojant 0,65 % (m/v) kazeino kaip substratą [67]. Šio metodo esmė yra ta, kad kazeiną veikiant proteazėms susidaro amino rūgštys:



Į 10 tuščių mėgintuvėlių įpilama po 2,5 ml 0,65 % kazeino tirpalo. Mėgintuvėliai 10 minučių laikomi 37 °C temperatūroje termostate. Į pakaitintus mėgintuvėlius su kazeino tirpalu įpilama po 0,5 ml jau pasiruošto filtrato (proteazių tirpalo pasiruošto iš anksčiau) ir vėl 10 minučių inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje. Į kiekvieną pakaitintą mėgintuvėlį įpilama dar po 2,5 ml reagento TCA (trichloracto rūgšties) ir vėl 30 minučių 37 °C temperatūroje inkubuojama termostate.

Tada kiekvieno mėgintuvėlio turinys išmaišomas stikline lazdele ir nufiltruojamas. Gaunamas filtratas (II). Šalia taip pat ruošiami du kontroliniai mėgintuvėliai, tik į juos nepilamas pasiruoštas ekstraktas.

Pasiruošiama 10 mėgintuvėlių (kiekvienos rūšies miltams po 2). Į 5 mėgintuvėlius susipilstomi atitinkami kiekiai reagentų.

1 lentelė. Naudojamų reagentų kiekiai

Reagentai	Reagento kiekis, ml
Filtratas (II)	2
Reagentas E (Na_2CO_3)	5
Reagentas F–C, ruoštas 10 ml folinio fenolio reagento praskiedžiant su 40 ml distiliuoto H_2O	1

Į likusius 6 mėgintuvėlius pasiruošiama šių tirpalų dublikatus.

Visi 10 mėgintuvėlių 10 minučių laikomi 37 °C temperatūroje termostate. Po to įvertinamas kiekvieno mėgintuvėlio tirpalo (vienos rūšies miltų ekstraktams ruošti 2 mėginiai) optinis tankis spektrofotometru Genesys 10 UV (Thermo Electron Corporation, JAV) 4 kartus, kai $\lambda=660$ nm. Apskaičiuojamas absorbcijos vidurkis.

Fermento aktyvumo apskaičiavimas. Sudaroma absorbcijos verčių priklausomybė nuo tirozino koncentracijos tirpale. Tirozino ekvivalento vertė tiesėje naudojama fermento aktyvumui apskaičiuoti.

Javų proteazių aktyvumui apskaičiuoti naudojama lygtis.

$$PA = \frac{TE \times PF}{0,5 \times 10 \times 2}, PU/g ;$$

čia: TE – tirozino ekvivalentas standartinėje tiesėje (μmol/ml); PF – praskiedimo faktorius (5,5); 0,5 – tiriamojo tirpalo tūris (ml); 10 – reakcijos trukmė (min.); 2 – paimtas analizei filtrato kiekis (ml); m – medžiagos masė (g).

Standartinei kreivei braižyti ruošiami tirpalai.

2 lentelė. Naudoti reagentai

Reagentai	Tuščias mėginys	Standartinis 1	Standartinis 2	Standartinis 3	Standartinis 4
Reagentas G, ml	0,00	0,05	0,10	0,20	0,40
H ₂ O ₂ ml	2,00	1,95	1,90	1,80	1,60
Reagentas E, ml	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Reagentas D, ml	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

2.9. Salyklojų cheminės sudėties ir kokybės vertinimas

Ekstruotų salyklojų mikrobinės taršos, cheminės sudėties ir tekstūros savybių tyrimui naudoti metodai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Salyklojų kokybės vertinimui naudoti metodai

Rodiklis	Metodo esmė	Šaltinis
Mikrobinės taršos vertinimas		
Bendras mikroorganizmų skaičius (BMS)	Remiantis atitinkama metodika vykdomi skiedimai ir sėjimai Petri lėkštelėse, kuriose po inkubacijos periodo, skaičiuojamos išaugusios kolonijos, kurių kiekis apskaičiuojamas 1 g tiriamojo mėginio pagal formulę.	LST EN ISO 4833:2003 standartas
Cheminės sudėties tyrimai		
Bendras baltymų kiekis	Organinės medžiagos reaguoja su sieros rūgštimi (esant katalizatoriui) ir yra suskaidomos amonio druskų, t.y. amonio sulfato. Toliau amonio sulfatas veikiamas natrio šarmu išskiria amoniaką, kuris distiliuojamas į rūgšties tirpalą. Titruojant pagal išsiskyrusio amoniako kiekį yra nustatomas ir apskaičiuojamas azoto kiekis, kurį sudauginus su atitinkamu koeficientu (5,70) gaunamas baltymų kiekis.	ISO 20483:2013 standartas Kjeldalio metodas
Tirpių baltymų kiekis	Baltymai sąveikauja su specifiniu reagentu – Coomasee brilantinio mėlio dažikliu, su kuriuo baltymai sudaro mėlynos spalvos junginį (spalvos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo baltymų koncentracijos).	Bradfordo metodas
Mineralinės medžiagos	Pagal skirtumą, gautą pasvėrus mėginį prieš jo džiovinimą ir deginimą ir po jo, suskaičiuojamas pelenų kiekis. Rezultatai skaičiuojami g 100 g ⁻¹ arba g (100 cm ³) ⁻¹ mėginio.	ISO 2171:2007 standartas

3 lentelė (tęsinys). Salyklojų kokybės vertinimui naudoti metodai

Redukuojantys sacharidai	Gliukozė yra redukuojantis sacharidas, turinti aldehidinę grupę. Jos kiekiui nustatyti taikytas kolorimetrinis metodas pagal tirpalo optinį tankį, pagrįstas spalvotų junginių susidarymu reaguojant su DNS (3,5 – dinitrosalicilinės rūgšties) reagentu, kuris oksiduoja redukuojančių sacharidų aldehidinę grupę.	G. L. Miller (1959)
Fenoliniai junginiai	Polifenoliai reaguoja su specifiniais redokso reagentais (Folin-Ciocalteu reagentu), sudarydami mėlyną kompleksą, kurį galima kiekybiškai įvertinti spektrofotometriškai. Reakcijos metu redukuojamas Folin-Ciocalteu reagentas ir susidaro molibdeno-volframo mėlynos spalvos kompleksas.	Folin-Ciocalteu metodas
Skaidulinės medžiagos	Metodas paremtas AOAC oficialiu metodu 991.43 „Bendros, tirpiosios ir netirpiosios skaidulinės medžiagos maisto produktuose“ ir AACC metodu 32-07.01 „Tirpiosios, netirpiosios ir bendros skaidulinės medžiagos maisto produktuose“.	Megazyme analizės testas K-TDFR-100A (Megazyme International, Airija).
Tekstūros vertinimas		
Medžiagos kietumas	Tekstūrografu TA.XT (Stable Micro Systems, Godalmingas, JK) įvertinamas produkto kietumas jį paveikiant deformuojančia jėga F ir išmatuojant kietumą iki deformacijos. Tekstūrai matuoti naudojamas darbinis kūnas – pilnaviduris 20 mm aliuminio cilindras. Cilindro matavimo greitis 1 mm/s, penetracijos gylis 5 mm.	Puchner, (1999)

2.10. Salyklojų fermentacijos įvertinimas

Salyklojų PRB fermentacijos metu vertintas PRB kiekis, pH ir BTR parametrai: pieno rūgšties bakterijų ląstelių kiekis fermentuotuose miltuose nustatytas skiedimo metodu (pagal Nr. 7 LST EN ISO 6887-1:2017 standartą) (žr. 2.8 skyrelį). Mėginių pH nustatytas pagal LST EN ISO 10523:2012 standartą, o bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) – pagal LST 1553:1998 standartą (žr. 2.8.1 skyrelį).

2.11. Statistinis duomenų įvertinimas

Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta, naudojant programų IBM SPSS Statistics 23.0 ir Microsoft Excel analizės paketus. Pagrindinės tendencijos ir analizuojamų duomenų verčių išsidėstymas vertintas, naudojant aprašomąją statistiką. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti naudota dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS

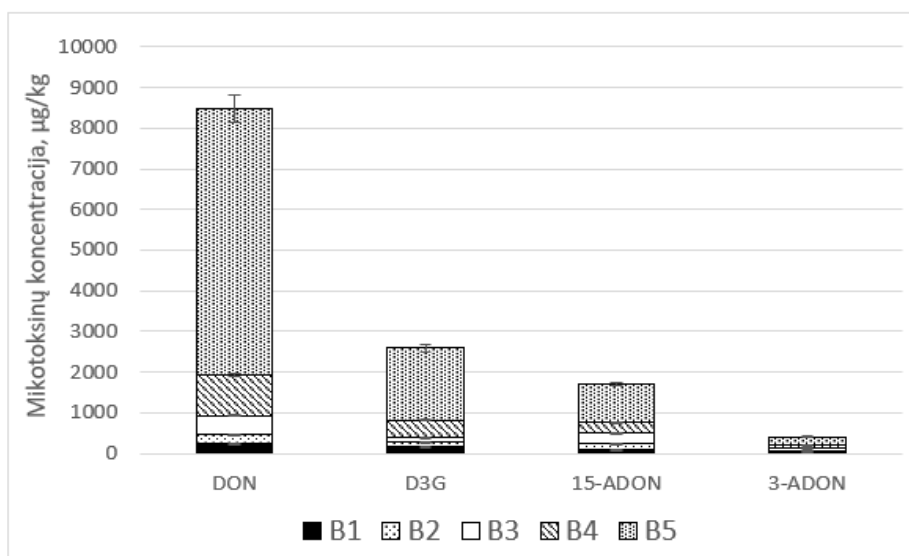
3.1. DON ir DON konjuguotų formų miežių grūduose charakteristika

Fusarium spp. tarša augaluose gali labai sutrikdyti jų medžiagų apykaitos procesus, dėl to kinta miežių grūdų sudėtis bei alaus gamyboje svarbių fermentų veikla. Be to, *Fusarium* spp. produkuojami mikotoksinai gali turėti neigiamos įtakos galutinio produkto saugai [67]. Tarp dažniausiai aluje aptinkamų *Fusarium* spp. mikotoksinų yra zearalenonas (ZEN), B tipo trichotecenai, tokie kaip nivalenolis (NIV), deoksinivalenolis (DON), deoksinivalenol-3-gliukozidas (DON-3-Glc), 3- ir 15-acetildeoksinivalenolis (3Ac- ir 15-Ac-DON) ir, kiek mažesniu mastu, fiksuojami A tipo trichotecenai (T-2 ir HT-2 toksinai) [68]. Jie sukelia daugelį ūmių ir lėtinių toksinių poveikių tiek gyvūnams, tiek žmonėms. Vykdomi tyrimai yra skirti mikotoksinų toksiškumo vertinimui ir jų analizės metodų vystymui [69] bei šių mikotoksinų paplitimo aluje ar žaliavoje nustatymui [70], [71], [72], [73], [74] ir analizavimui kaip miežių grūduose esantys mikotoksinai gali patekti į galutinį produktą ir kokie technologiniai sprendimai gali būti taikomi taršos prevencijai [75], [77], [78], [79].

Miežiai išsiskiria iš kitų grūdinių žaliavų unikalia anatominė sandara, kuri apsprendžia genotipų atsparumą infekcijai ir jautrumo infekcijai laiką. Fuzariozės požymius miežiuose sunku atpažinti lauko sąlygomis, o mikotoksinų kiekis negali būti įvertintas pagal vizualius požymius. Taigi, dėl šių priežasčių yra sunku identifikuoti miežiuose tikrąjį *Fusarium* spp. infekcijos lygį. Miežiai, kurie užkrėsti DON ir naudojami alaus gamyboje gali padidinti T-2/HT-2 toksinų poveikį juose. Be to, *Fusarium* spp. infekcija sukelia rimtų alaus kokybės problemų [1].

Šio eksperimento metu analizuota miežių grūdų kolekcija (B1–B5) vertinant HPLC-TOF-HRMS metodu, vieną iš labiausiai paplitusių mūsų klimatinėse sąlygose grūdinėje žaliavoje trichotecenų – DON, o taip pat iki šiol mažiau studijuotas šioje grūdinėje žaliavoje DON konjuguotas formas.

Sprendžiant iš tyrimo rezultatų, pateiktų 2 pav. ir 4 lentelėje, DON koncentracijos miežių mėginiuose kito plačiose ribose nuo 223 µg/kg (B2) iki 6563 µg/kg (B5). Iš DON konjuguotų formų miežių grūdų mėginiuose aptikta: DON-3-gliukozidas (D3G), 15-acetildeoksinivalenolis (15-ADON) ir 3-acetildeoksinivalenolis (3-ADON) ribose nuo 22 µg/kg (B2) iki 209 µg/kg (B5), D3G ribose nuo 97 µg/kg (B3) iki 1780 µg/kg ir 15-ADON nuo 84 µg/kg (B1) iki 929 µg/kg (B5) atitinkamai.



2 pav. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijos miežių grūdų mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5)

4 lentelė. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) miežių grūdų mėginiuose

Mėginio Nr.	DON	D3G	D3G/DON, %	15-ADON	15-ADON/DON, %	3-ADON	3-ADON/DON, %
B1	248	172	69,35	84	33,87	44	17,74
B2	223	107	47,98	162	72,65	22	9,80
B3	460	97	21,09	244	53,04	72	15,65
B4	996	440	44,18	278	27,91	65	6,52
B5	6563	1780	27,12	929	14,12	209	3,18

Mėginiai su santykinai dideliais DON koncentracijų skirtumais daugumoje atvejų taip pat reikšmingai skyrėsi pagal DON konjugatų kiekius. Miežių (B5) mėginyje (2 pav.), kuriame aptiktas didžiausias DON kiekis ($6563 \mu\text{g}/\text{kg}$), D3G kiekis buvo 3,7 kartus mažesnis nei DON, po to sekė 15-ADON ($929 \mu\text{g}/\text{kg}$), o 3-ADON fiksuota mažiausia koncentracija ($209 \mu\text{g}/\text{kg}$). Daugumoje mažiau užterštų miežių mėginių nustatytas žymiai mažesnis DON konjugatų kiekis, palyginti su jų laisva DON forma. Šis tyrimas patvirtino, kad DON konjugatai miežių grūduose yra kartu su jo laisvomis formomis. DON yra pirminis mikotoksinas, kurį augale metabolizuoja grybai, o maskuoti toksinai yra DON metabolitai [80]. Labiausiai iš maskuotų toksinų analizuotas D3G, kuris yra DON II fazės metabolitas, šis toksinas žinomas kaip mažiau toksiškas nei pirminis mikotoksinas [81]. DON-3G aptiktas miežiuose kartu su DON, pirmine jo forma. Galutiniuose produktuose didelės DON-3G koncentracijos buvo aptiktos aluje [82], [83].

Pagal literatūrą [84] žmogaus storosios žarnos mikrobiota gali D3G konvertuoti į DON. Iki šiol D3G lygis grūduose ir jų produktuose neregamentuojamas. Todėl reikia atsižvelgti į D3G/DON santykį, nes D3G gali būti konvertuotas į DON taip padidinant jo toksiškumą [2]. Šio tyrimo metu D3G/DON santykis analizuotuose miežių mėginiuose kito nuo 21,09 % iki 69,35 %. Gauti rezultatai sutampa su kitų autorių darbais, rodančiais, kad D3G santykis su DON yra ribose nuo 20 % iki 70 % [85]. Keli tyrimai parodė, kad D3G užterštumo lygis grūduose ir grūdų šalutiniuose produktuose pasiekė pusę DON lygio. D3G dažnai būna kartu su DON pasėliuose, grūdiniuose maisto produktuose ir pašaruose dideliais kiekiais (iki 100 %) ir koncentracijomis nuo $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ iki $1700 \mu\text{g}/\text{kg}$ [86], [64]. D3G/DON santykis grūduose siekė 20 %, o po apdoravimo viršijo 100 % [87], [64]. D3G/DON santykis skyrėsi miežių mėginiuose priklausomai nuo DON užterštumo juose lygio. Rezultatai rodo, kad miežių mėginiais (B1 – B4) su mažesniu DON kiekiu ($248 - 996 \mu\text{g}/\text{kg}$) buvo būdingas didesnis D3G/DON santykis (vidutiniškai 45,65 %) nei mėginys (B5) su didžiausia DON koncentracija ($6563 \mu\text{g}/\text{kg}$), kur D3G/DON santykis sudarė vidutiniškai 27,12 %.

Šie rezultatai sutampa su pateiktais literatūroje [88], pagal kuriuos D3G kiekis yra susijęs su DON užterštumu, o mėginiai su mažiausiu DON užterštumu rodo aukščiausią D3G lygį. Kadangi šis maskuotas toksinas gali būti pavojingas žmogui ir gyvuliui, reikėtų įvertinti D3G kiekius ir užtikrinti maisto ir pašarų saugą, ypač atkreipiant dėmesį į produktus, užterštus mažesniu DON kiekiu arba esant maksimaliai leistinai DON koncentracijai.

Kiti DON metabolitai, tokie kaip 3Ac-DON ir 15Ac-DON, identifikuoti šiame eksperimente miežių grūduose, taip pat aptikti maisto produktuose ir pašaruose. Šias modifikuotas DON formas virškinimo

metu žarnyno mikrobiota gali paversti pirminiu toksinu arba gali sukelti vidinį toksiškumą, lokalizavęsis organizme 15Ac-DON gali būti toksiškesnis nei DON [89].

Pagal Europos maisto saugos tarnybą [90] maskuotų DON formų tokių kaip 3Ac-DON ir 15Ac-DON kiekio santykis su DON nustatytas 10 % ir 15 % atitinkamai. Šio eksperimento metu gautos 3Ac-DON/DON ir ypač 15Ac-DON/DON vertės yra ženkliai didesnės nei paskelbtos literatūroje ir kinta atitinkamai nuo 3 % iki 17 %, ir nuo 14 % iki 72 %.

Šiuo metu ES reglamentuojamas tik DON nustatant didžiausias leistinas šio mikotoksino koncentracijas: 1250 µg/kg - neperdirbtuose grūduose, 200 – 750 µg/kg - grūdų produktuose žmonių maistui, 200 µg/kg - grūdinės kilmės kūdikių maiste [91]. DON konjugatai iki šiol dar nėra reglamentuojami. 2011 m. Jungtinės maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) ir Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) ir maisto priedų ekspertų komitetas (JECFA) atkreipė dėmesį į acetilintus DON konjugatus (3Ac-DON ir 15Ac-DON), nustatant laikinąją didžiausią leistiną paros normą kūno svoriui (1 µg/kg) [92]. ES maisto saugos tarnyba (EFSA) pastaruoju metu aktyviai dirba vertinant su konjuguotais mikotoksinais susijusią riziką ir nustatant su sveikata susijusias orientacines vertes atskiroms *Fusarium* mikotoksinų grupėms kartu ir jų konjuguotoms formoms. Abi institucijos aiškiai pabrėžė būtinybę skubiai tęsti darbą nustatant dar neapibūdintus konjuguotus mikotoksinius, kaupiant daugiau duomenų apie žinomų modifikuotų mikotoksinų atsiradimą maiste ir pašaruose ir tiriant jų toksikokinetiką bei toksiškumą.

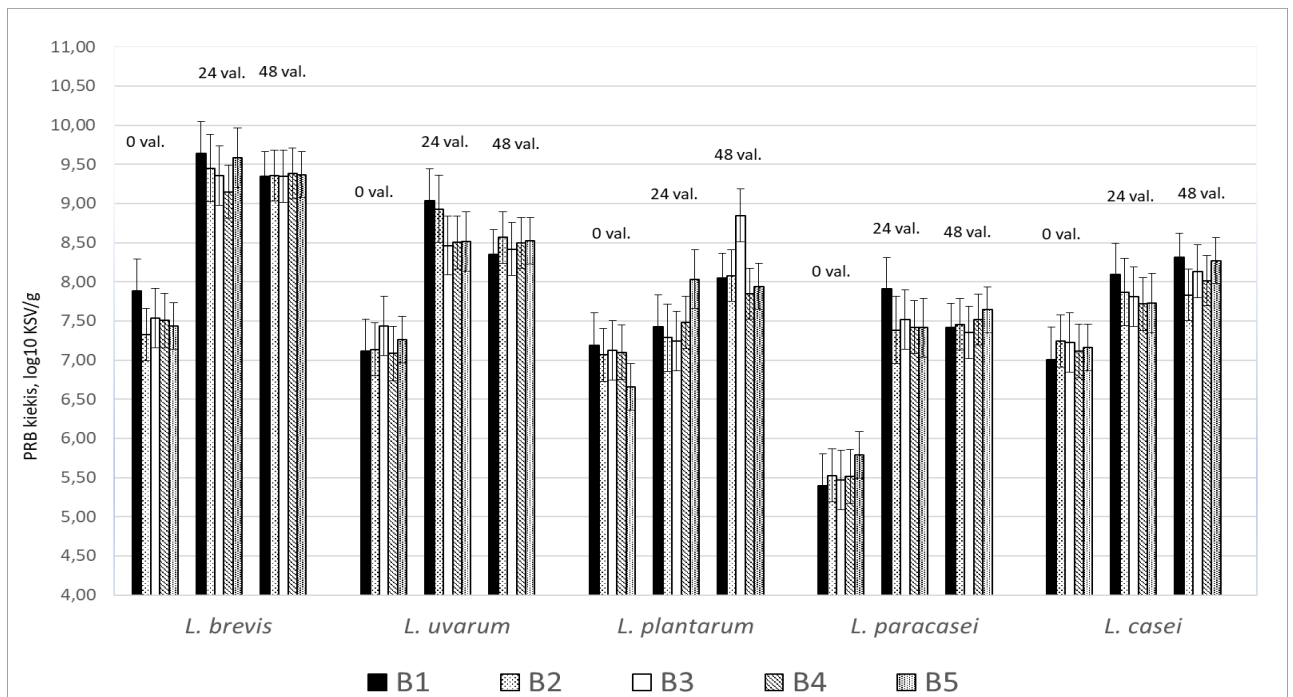
Pagal EFSA Europoje DON yra užteršta nuo 15 % iki 55 % miežių produktų [93] ir tarp 2 % ir 50 % su T-2/HT-2 [94]. Aptinkamos DON koncentracijos būtų tokios: ~ 484 µg/kg - neperdirbtuose miežiuose, 152 µg/kg - žmonių maistui skirtuose miežių grūduose; 8,4 – 11,3 µg/kg – aluje ir 187 µg/kg – pašaruose [95], [93]. DON-3G dažniausiai aptinkamas miežiuose, avižose, kviečiuose ir kukurūzuose, taip pat iš grūdų pagamintuose produktuose tokiuose kaip salyklos, alus ir duona [96]. Paskelbti duomenys rodo, kad beveik 30 % grūdų buvo užteršti DON-3G ir laisvaisiais toksinais [97]. 3Ac-DON ir 15Ac-DON taip pat dažniausiai randami grūdiniuose javuose ir jų produktuose (sausuose pusryčiuose, skaidulomis praturtintoje duonoje, avižiniuose dribsniuose ir kt. [98].

Gauti mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad miežių mėginiuose DON kiekiai gali ženkliai viršyti leistiną šio toksino ribinę koncentraciją ir tokios grūdinės žaliavos negalima naudoti nei maistui, nei pašarui. Padidinta miežių tarša, galimai, gali būti susijusi su klimato kaita, ir tai ne tik padidina grūdinių žaliavų nuostolius, bet ir kelia aktualią aplinkosaugos problemą. DON konjugatų duomenys, patvirtina palyginti didelius D3G ir 15-ADON kiekius tirtuose miežių mėginiuose ir ypač jų glaudų ryšį su DON. Taigi, svarbu vykdyti griežtą laisvųjų trichotecenų ir jų gliukozidų konjugatų stebėjimą ir taikyti tvarias valdymo priemones.

3.2. *Fusarium* spp. taršos miežiuose įtaką PRB fermentacijos procesui

Iki šiol vis dar ieškoma biologinės kontrolės metodų *Fusarium* spp. taršos grūduose sumažinimui ir saugesnės grūdinės žaliavos tolesniam panaudojimui ar perdirbimui. Viena iš alternatyvų galėtų būti grūdų apdorojimas PRB, kurios pasižymi antimikrobiniu aktyvumu. Biologinio apdorojimo poveikis PRB augimui ir pH pokyčiams esant skirtingiems užterštumo lygiams terpėje yra svarbus kriterijus vystant biokontrolės metodą ir norint išsiaiškinti mikotoksinų skaidymo mechanizmą [64].

Šiame etape vertinti PRB gyvybingumo pokyčiai skirtingos *Fusarium* spp taršos miežių grūdų fermentacijos metu (3 pav.).



3 pav. Pieno rūgšties bakterijų dauginimasis skirtingos *Fusarium* spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.)

Iš gautų rezultatų matoma, kad miežių fermentacijos procesas daugiausiai priklausė nuo naudotos PRB padermės. Geriausiai dauginosi tirtuose mėginiuose *L. brevis*, susidarant jau po 24 val. didžiausiam šios padermės kiekiui (vidutiniškai 9,44 log₁₀ KSV/g) ir jis išlieka stabilus tolesnio bioapdoravimo metu. Be to, gerai dauginosi tirtuose mėginiuose *L. uvarum* ir *L. paracasei*, kurių kiekis pirmo fermentacijos etapo metu (24 val.) padidėjo 1,2 ir 1,4 kartus, atitinkamai iki 8,69 ir 7,53 log₁₀ KSV/g tačiau tolesnės fermentacijos metu (po 48 val.) buvo linkęs mažėti vidutiniškai iki 8,47 ir 7,48 log₁₀ KSV/g. *L. plantarum* ir *L. casei* viso fermentacijos proceso metu buvo stebimas kiekio didėjimas (atitinkamai 7,50 ir 7,84 log₁₀ KSV/g), po 24 val. intensyvesnis su *L. casei*, o po 48 val. – su *L. plantarum*.

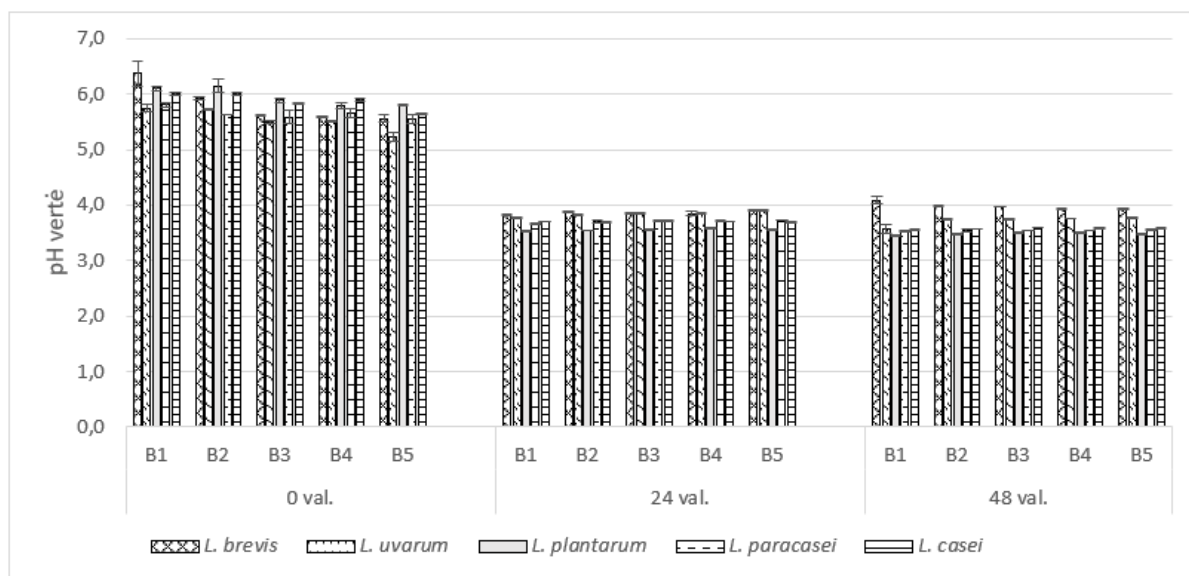
Fusarium spp. taršos įtaka PRB fermentacijos procesui priklausė nuo PRB padermės. *L. brevis* gerai dauginosi skirtingos taršos sąlygose. Kai kurios PRB, tokios kaip *L. uvarum* ir *L. casei* po 24 val., o *L. plantarum* (po 48 val.) buvo jautresnės taršai ir vidutiniškai geriau dauginasi mažiau užterštuose mėginiuose (B1-B2). Lyginant PRB fermentaciją po 48 val. skirtingo užterštumo mėginiuose, atsparesnės taršai buvo *L. uvarum* ir didėjant mėginių užterštumui kito mėginiuose nuo 8,35 iki 8,52 log₁₀ KSV/g bei *L. paracasei*, kuri didėjant mėginių užterštumui miežių mėginiuose kito nuo 7,42 iki 7,64 log₁₀ KSV/g. Pažymėtina, kad daugumoje atveju (išskyrus *L. brevis* fermentaciją) PRB dauginimosi profilis užterštuose miežių grūdų mėginiuose su pasiektomis vertėmis galinės fermentacijos metu (8,31 log₁₀ KSV/g) atitinka literatūroje pateiktus rezultatus [99].

3.2.1. pH ir BTR pokyčiai mikotoksiniais užterštuose fermentuotuose mėginiuose

Antimikrobinis PRB aktyvumas yra siejamas su žemu pH ir organinių rūgščių, tokių kaip pieno, sorbo, skruzdžių, propiono ir benzenkarboksirūgšties gamyba. Taip pat yra paskelbtų duomenų, pagal kuriuos antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių PRB padermių gaminami metabolitai priklausė nuo pH [100].

Optimaliausios pH sąlygos pieno rūgšties bakterijoms augti yra ribose 5,5 – 6,2, tačiau *Lactobacillus* genčiai priklausančios bakterijos gali būti atsparios rūgščiai terpei ir daugintis kintant pH nuo 4,5 iki 6,5. Kai kurios padermės gali daugintis ir esant dar žemesniam pH [99]. Įprastai bakterijų augimas žemiau pH 3,5 sustoja [101]. Lėtesnis PRB padermės dauginimasis užterštoje terpėje gali turėti neigiamos įtakos ir organinių rūgščių susidarymui.

Tyrimų rezultatai rodo, kad dauguma PRB padermių išlieka aktyvios užterštuose grūdų mėginiuose ir juose intensyviai kaupiasi organinės rūgštys, mažindamos terpės pH nuo 5,2 – 6,4, nustatyto fermentacijos pradžioje, iki vidutiniškai < 3,5 – po 48 val. fermentacijos (4 pav.).



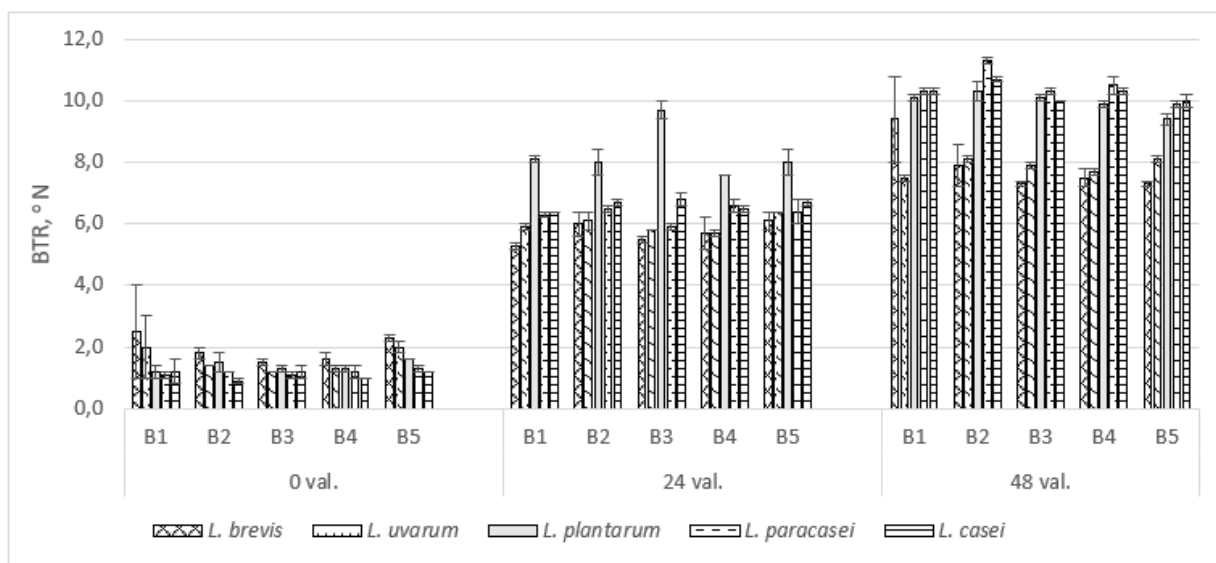
4 pav. pH pokyčiai skirtingos *Fusarium* spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.)

Fermentacijos metu (po 24 val.) nustatyti pH pokyčiai kito vidutiniškai nuo iki 3,7 (4 pav.). Tai rodo, kad visos naudotos PRB padermės yra geros organinių rūgščių producentės. Lyginant tarpusavyje PRB padermes, *L. plantarum* fermentuotuose mėginiuose (po 24 val.) pH nustatytas mažiausias (vidutiniškai 3,6), kai *L. brevis* ir *L. uvarum* atvejais vidutinės pH vertės mėginiuose fiksuotos atitinkamai 3,9 ir 3,9. Po 48 val. *L. brevis* išsiskyrė didesne pH verte (vidutiniškai 4,0), po *L. uvarum* fermentacijos pH sumažėja (vidutiniškai 3,7), tuo tarpu *L. plantarum* fermentacijos metu pH buvo mažiausias (vidutiniškai 3,5). *L. casei* ir *L. paracasei* fermentacijos metu (po 48 val.) pH vidutinės vertės fiksuotos atitinkamai 3,6 ir 3,5. Taigi, pH pokyčius daugiausiai apsprendžia PRB padermė: mažiausias pH fiksuotas *L. plantarum* fermentacijos metu, o taip pat naudojant miežių grūdų bioapdorėjimui *L. paracasei* ir *L. casei*.

Iš 4 pav. pateiktų rezultatų, matoma, kad *L. brevis* ir *L. uvarum* pH nenukrenta žemiau 3,5 ir yra optimaliose ribose, tokie duomenys sutampa ir su literatūroje pateiktais [102], taip pat tuo galima paaiškinti šių bakterijų gerą dauginimąsi. Pažymėtina, kad mėginių tarša neturėjo reikšmingos įtakos pH pokyčiams fermentacijos metu.

Antimikrobinė PRB atsiranda kaip pradinės kultūros ir kaip natūralios mikrobu populiacijos dalis fermentacijos proceso metu maisto/pašarų pramonėje. Viena iš labiausiai pageidaujamų PRB, kaip fermentuotų produktų procesų pradinės kultūros, savybių yra greita rūgščių gamyba [103], kuri gali būti įvertinta tiriant BTR.

Bendro titruojamojo rūgštingumo (BTR) tyrimų duomenys (5 pav.) rodo, kad fermentacijos metu tirtais etapais BTR vertės didėja nuo 1,4 °N (fermentacijos pradžioje – 0 val.) vidutiniškai iki 6,6 °N (po 24 val.) ir 9,3 °N (po 48 val.).



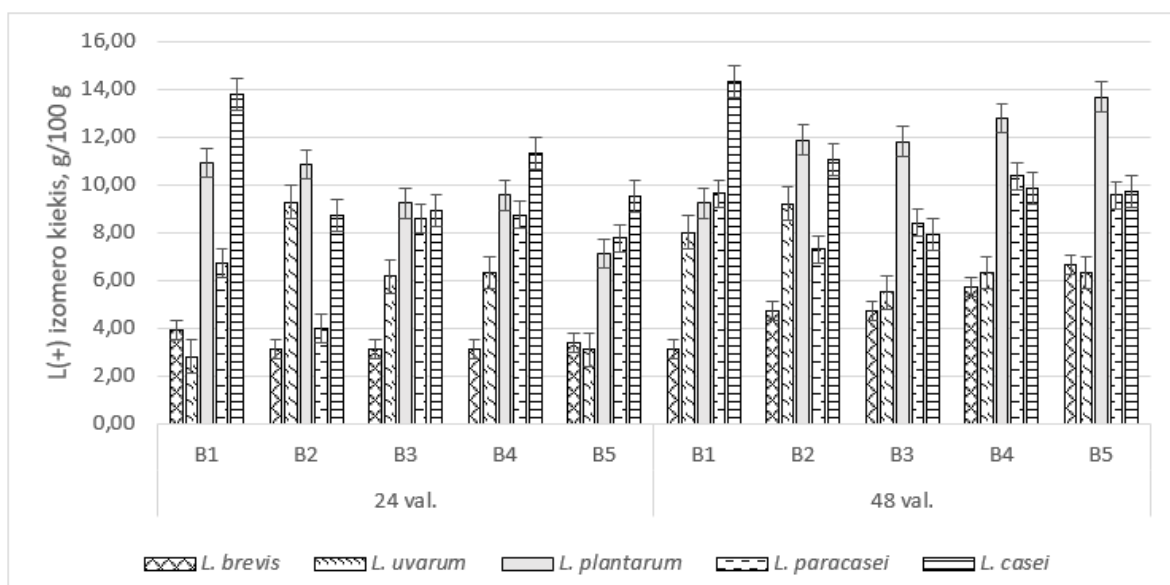
5 pav. BTR pokyčiai skirtingos *Fusarium* spp. taršos mėginių fermentacijos metu (0 val.; 24 val. ir 48 val.)

Lyginant tarpusavyje PRB padermes, didžiausios BTR vertės po 24 val. nustatytos (vidutiniškai 8,3 °N) *L. plantarum* fermentacijos metu, pH vertės naudojant šią padermę nustatytos mažiausios. Kitų PRB padermių tokių, kaip *L. uvarum*, *L. paracasei* ir *L. brevis* BTR vertės vidutiniškai siekė 6,0 °N, 6,3 °N ir 6,6 °N atitinkamai po 24 val. fermentacijos. Mažiausios BTR vertės fiksuotos su *L. brevis* – 5,7 °N. Po 48 val fermentacijos didžiausios BTR vertės fiksuotos su *L. paracasei* (vidutiniškai 10,5 °N) ir *L. casei* (vidutiniškai 10,3 °N). Šios bakterijos gerai produkavo rūgštis iki pat fermentacijos pabaigos, tai parodo ir jų mažas pH. Taigi, bendrai galima daryti prielaidą, kad *L. plantarum* intensyviausiai produkuoja organines rūgštis, pagrindinius PRB fermentacijos metabolitus.

3.2.2. Pieno rūgšties izomerų pokyčiai *Fusarium* spp. užkrėstų miežių fermentacijos metu

Daugelis organizmų gamina pieno rūgštį fermentacijos būdu, tačiau pieno rūgšties gamybai pramoniniu būdu svarbiausios padermės naudojamos yra iš *Lactobacillus* ir *Rhizopus oryzae* genties. L(+)-pieno rūgštis yra vienintelis optinis izomeras, naudojamas farmacijos ir maisto pramonėje, nes žmogaus organizmas yra pasisavina tik šią formą.

Šio eksperimento metu vertinti L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai naudojant *Fusarium* spp. užkrėstų miežių fermentacijai įvairias PRB padermes (6 pav.).



6 pav. L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai skirtingos *Fusarium* spp. taršos mėginių fermentacijos metu (po 0 val.; 24 val. ir 48 val.)

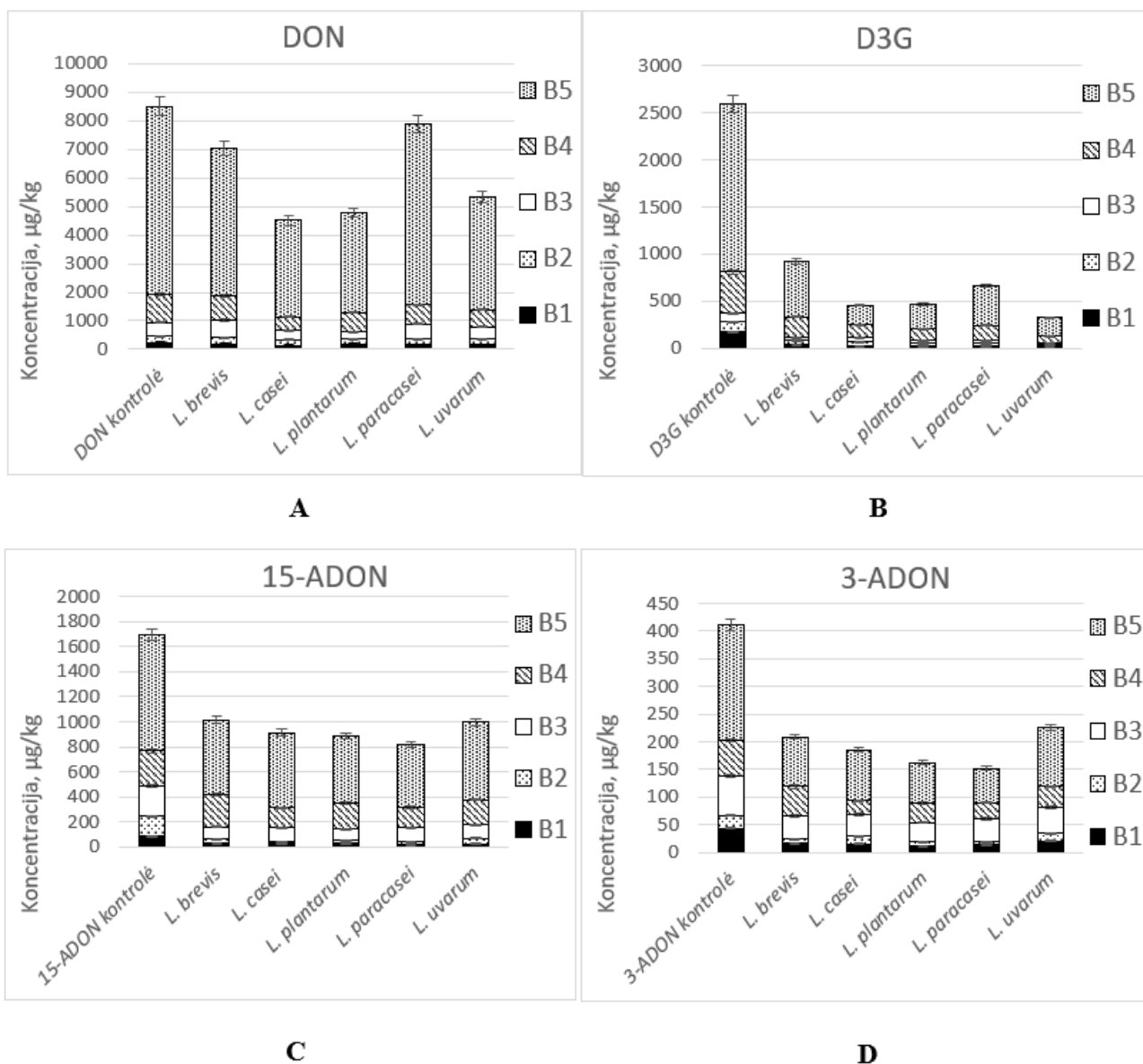
L(+) pieno rūgšties izomero, susidarancio atskirais fermentacijos etapais, koncentracijos nustatytos tokios: po 24 val. fermentacijos fiksuota vidutiniškai 7,21 g/100 g koncentracija ir po 48 val. – 8,72 g/100 g. Tarp PRB padermių nustatyti reikšmingi skirtumai pagal L(+) pieno rūgšties izomero susidarymą. Didžiausi vidutiniai šio izomero kiekiai po 24 val. *L. casei* ir *L. plantarum* fermentacijos nustatyti miežių mėginiuose atitinkamai 10,47 g/100 g ir 9,54 g/100 g. Skirtingai, *L. brevis* ir *L. uvarum* fermentuotuose mėginiuose susidarė po pirmo etapo mažos L(+) pieno rūgšties izomero koncentracijos atitinkamai 3,32 g/100 g ir 5,53 g/100 g. *L. paracasei* pagal L(+) pieno rūgšties izomero susidarymo intensyvumą užėmė tarpinę padėtį – 7,17 g/100 g. Antrojo fermentacijos etapo metu (po 48 val.) daugumoje *L. plantarum* fermentuotų grūdų mėginių buvo fiksuotas tirtu izomero koncentracijos padidėjimas vidutiniškai iki 11,88 g/100 g. Pažymėtina, fermentuojant mėginius su kitomis PRB padermėmis taip pat buvo stebimas L(+) pieno rūgšties izomero kiekio padidėjimas, tačiau jis priklausė nuo mėginio taršos lygio. Didžiausiu atsparumu fermentacijos terpės taršai pasižymėjo tokios bakterijos kaip *L. plantarum*, kuri išlieka gyvybinga net ir labiausiai užterštame mėginyje (B5) ir geba produkuoti metabolitus, tai patvirtina pH ir BTR tyrimų rezultatai. Atsižvelgiant į atliktus pH ir BTR tyrimus, *L. uvarum* ir *L. brevis* buvo jautresnės mėginių taršai.

Atlikus statistinį duomenų vertinimą, matoma, kad pieno rūgšties L(+) izomero įtaka antigrybiniam poveikiui yra vidutinė ($R^2=0,5878$) ir ji labiau pasireiškia mažiau užterštuose miežių mėginiuose. Panašūs rezultatai gauti tiriant pieno rūgšties detoksikuojantį terpei poveikį ir kituose literatūros šaltiniuose, pagal kuriuos antimikrobinis poveikis gali priklausyti nuo mikotoksinų koncentracijos, o pieno rūgštis nebūtinai yra reikšmingas komponentas mikotoksinų detoksikuojančiam poveikiui [104].

3.3. PRB fermentacijos įtaka DON ir DON konjugatams

Šiame skyriuje pateikta PRB fermentacijos proceso įtaka DON ir DON konjugatų (D3G, 3-ADON, 15-ADON) kokybinei ir kiekybinei sudėčiai skirtingo *Fusarium* spp. užterštumo miežių mėginiuose naudojant skirtingas PRB padermes (7 pav.). Visoms PRB padermėms buvo atlikta regresinė analizė, siekiant apibūdinti jų biokonversijos gebėjimą po 48 val. fermentacijos optimaliose sąlygose.

DON kiekių analizės rezultatai (prieš ir po fermentacijos) patvirtino, kad fermentacijos metu mikotoksino biotransformacijos laipsnis (išreiškiamas kaip vidutinis DON kiekis) nustatytas 31 % mažesnis nei kontrolinio mėginio (7 pav.). Fermentuojant didžiausio užterštumo mėginius (6563 µg/kg DON) DON sumažėjo 32,2 % lyginant su biologiškai apdorotais mažiau užterštais DON mėginiais (<1000 µg/kg). Taigi, naudojant *L. uvarum* fermentaciją galima pasiekti reikšmingą DON sumažėjimą esant skirtingam miežių grūdų užterštumo lygiui (6563, 996 ir 248 µg/kg DON) atitinkamai 1,7; 1,7 ir 1,6 karto. *L. casei*, *L. plantarum* ir *L. brevis* fermentacijos metu DON kiekis labai užterštuose (6563 µg/kg) fermentuotuose mėginiuose, lyginant su kontroliniais miežių mėginiais be biologinio apdorojimo, sumažėjo 48,8 %, 46,9 % ir 21,3 %, o su *L. paracasei* tik 3,6 %, (7 A pav.).



7 pav. DON ir DON konjugatų (D3G, 15-ADON, 3-ADON) koncentracijų pokyčiai PRB fermentacijos skirtingo užterštumo miežių grūdų mėginiuose naudojant skirtingas PRB padermes

Kiekybinė DON konjugatų formų analizė parodė reikšmingą D3G, 3-ADON ir 15-ADON sumažėjimą PRB fermentuotuose miežių mėginiuose. D3G kiekis fermentuotuose mėginiuose, lyginant su kontroliniais mėginiais be biologinio apdorojimo, sumažėjo vidutiniškai 78 % (7 B pav.).

15-ADON kiekis fermentuotuose mėginiuose, lyginant su kontrole, sumažėjo vidutiniškai 45,4 % (7 C pav.), o 3-ADON sumažėjimo pokytis fermentacijos metu sudarė vidutiniškai 54,6 % (7 D pav.).

Šiame eksperimente gauti rezultatai rodo, kad daugumos padermių fermentacijos metu nustatytas kelių DON konjugatų kiekio sumažėjimas išryškinant PRB padermės įtaką šiems pokyčiams. Pasak vieno tyrėjų [16], PRB detoksikacijos lygis priklauso nuo PRB ląstelių tankio ir gyvybingumo bei terpės pH. Naudotos eksperimente PRB padermės skyrėsi pagal šias savybes, todėl PRB padermių atsakas į terpės užterštumo lygį tarp mikroorganizmų taip pat buvo skirtingas. PRB padermių atsparumas fermentacijos terpės taršai buvo įrodytas šiame tyrime vertinant PRB augimo intensyvumą skirtingos *Fusarium* spp. taršos mėginiuose

Gauti rezultatai sutampa ir su kitų tyrėjų rezultatais [105], patvirtinančiais skirtingų PRB padermių gebą sumažinti mikotoksinų (tokių kaip DON ir fumonizinų B1 ir B2) kiekį. Nustatyta, kad *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sumažino DON iki 55 %, o *L. rhamnosus* GG – iki ~ 54 % [105]. Mikotoksinų tokių trichotecenų kaip DON, 3-ADON, nivalenolis (NIV), diacetoksicirpenolis (DAS), fuzarenonas (FX), T-2 toksinas (T-2) ir HT-2 toksinas (HT-2) sumažinimo fermentacijos metu galimybės taip pat buvo tiriamos ir aprašomos kituose straipsniuose [106]. Pateikti šioje publikacijoje rezultatai patvirtino, kad atitinkamos PRB padermės sugebėjo surišti septynis trichotecenus (iš skystos terpės). Autoriai įrodė, kad PRB efektyvumas mažinant trichotecenus (20 µg/ml) labai skyrėsi nuo tirtų toksinų ir PRB padermių. Veiksmingiausia padermė sugebėjo surišti keturis iš septynių tirtų toksinų neaptinkant skilimo produktų. Surištų toksinų procentas kito ribose nuo 18 % iki 93 % [106], tačiau nei viena iš naudotų PRB nesugebėjo surišti 3-ADON [64].

Biologinis mikotoksinų sumažėjimas fermentacijos terpėje galimas naudojant kelis mechanizmus, pavyzdžiui, absorbuojant gyvybingoms PRB ląstelėms arba vykstant fermentiniam mikotoksinų skaidymui ir susidarant fermentacijos metabolitų ir mikotoksinų sąveikoms [16], [107].

Siekiant užtikrinti fermentuotų miežių produktų saugumą, reikia atsižvelgti į bakterijų absorbcijos mechanizmą ir PRB-mikotoksinų komplekso toksiškumą [64].

Fermentinis grybų aktyvumas užterštuose grūduose (prieš fermentaciją) taip pat gali dalyvauti mikotoksinų skaidymo mechanizme PRB fermentacijos metu, paverčiant juos netoksiškais junginiais. Todėl kitame eksperimento etape buvo tiriami užterštų miežių mėginių fermentiniai profiliai ir jų ryšys su tirtais mikotoksinais.

3.4. Fermentinių aktyvumų pokyčiai PRB fermentacijos metu ir jų ryšys su mikotoksinais

Kai kurie aktyvūs fermentai gali dalyvauti DON ir DON konjugatų detoksikacijos mechanizme skaidant mikotoksinų struktūrą ir susidarant mažiau toksiškiems metabolitams. Literatūroje teigiama, kad grybai gali būti fermentų, galinčių paversti mikotoksinus į mažiau toksiškus ar netoksiškus produktus, šaltinis. Jie gali būti naudojami žemės ūkio produktų saugos pagerinimui arba kaip priedai pašarų gamyboje [108].

Šio eksperimento metu siekiama išsiaiškinti fermentų (amilolitinų, ksilanolitinų ir proteolitinų) vaidmenį DON toksinų miežių grūduose detoksikacijos procese vertinant:

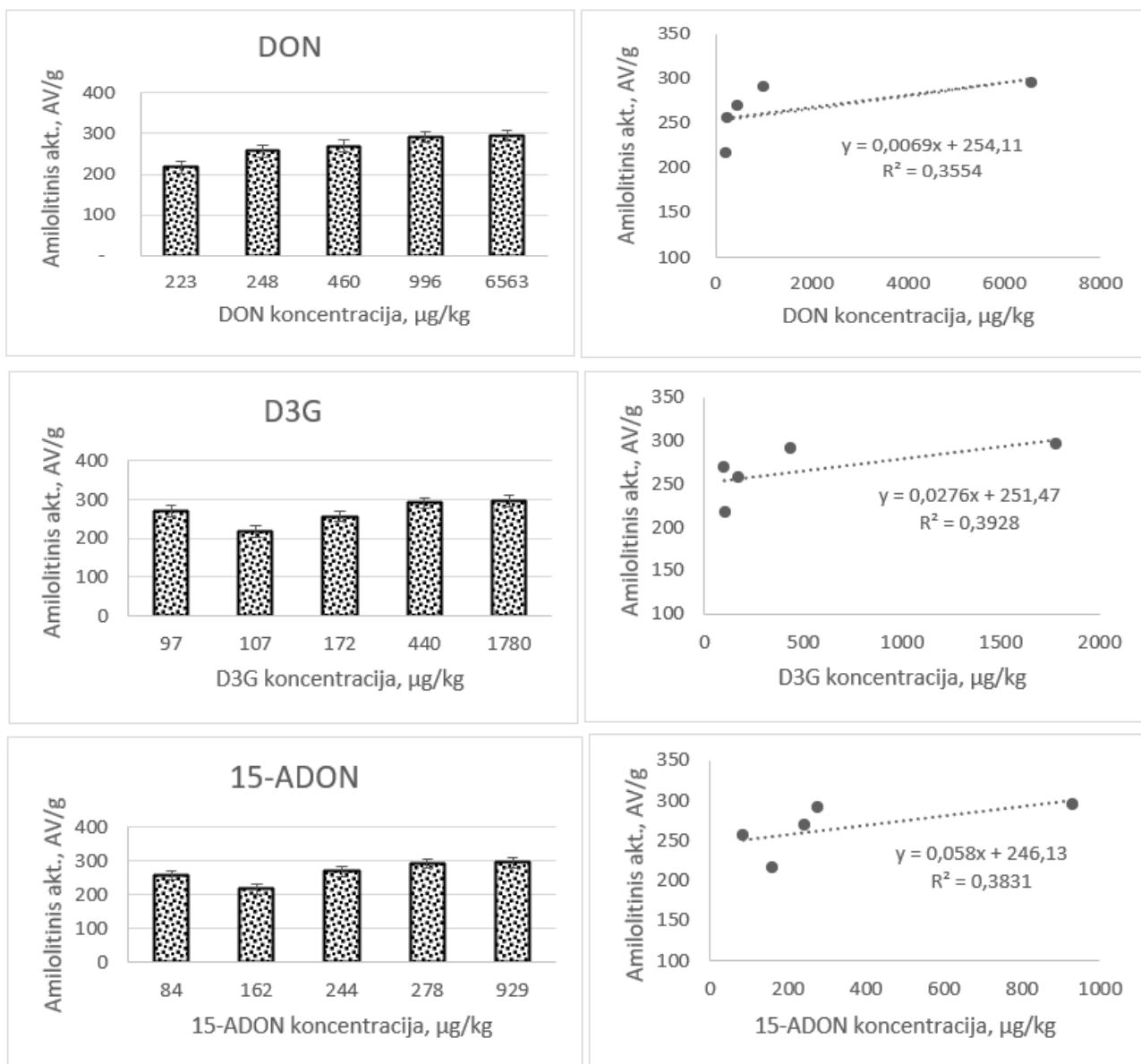
1. *Fusarium* spp. užkrėtus miežių grūdus (prieš fermentaciją) ir kitame etape
2. fermentinių aktyvumų pokyčius PRB fermentacijos metu.

3.4.1. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų fermentiniai aktyvumai ir jų ryšys su mikotoksinais

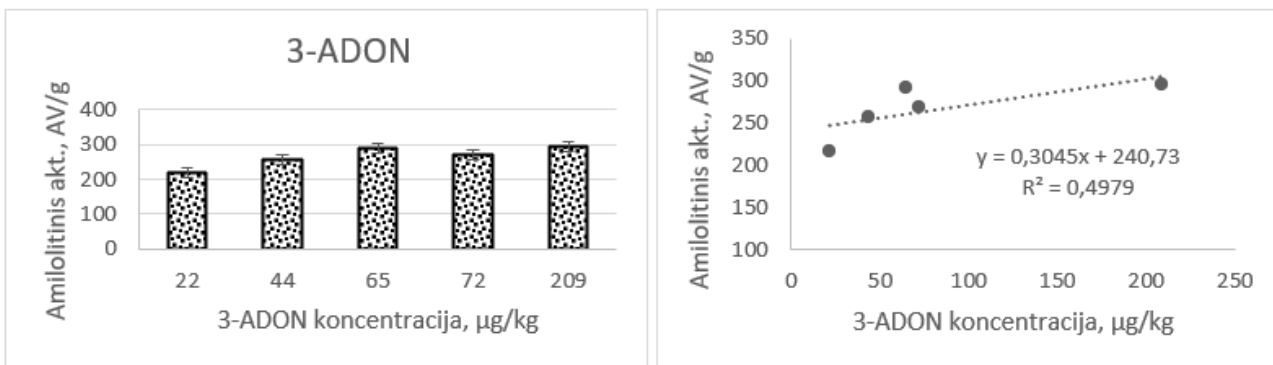
Pirmame eksperimento etape analizuojami fermentiniai aktyvumai skirtingo *Fusarium* spp. užterštumo miežių mėginių (prieš PRB fermentaciją įvertinant grybinių fermentų aktyvumą atėmus grūdų) ir jų ryšys su mikotoksinais tokiais kaip DON ir DON konjugatais.

3.4.1.1. Amilolitinis aktyvumas

Amilolitinio aktyvumo skirtingos *Fusarium* spp. taršos miežių grūduose ir ryšio su DON bei DON konjugatais tyrimų rezultatai pateikti 8 pav.



8 pav. Amilolitiniai aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis

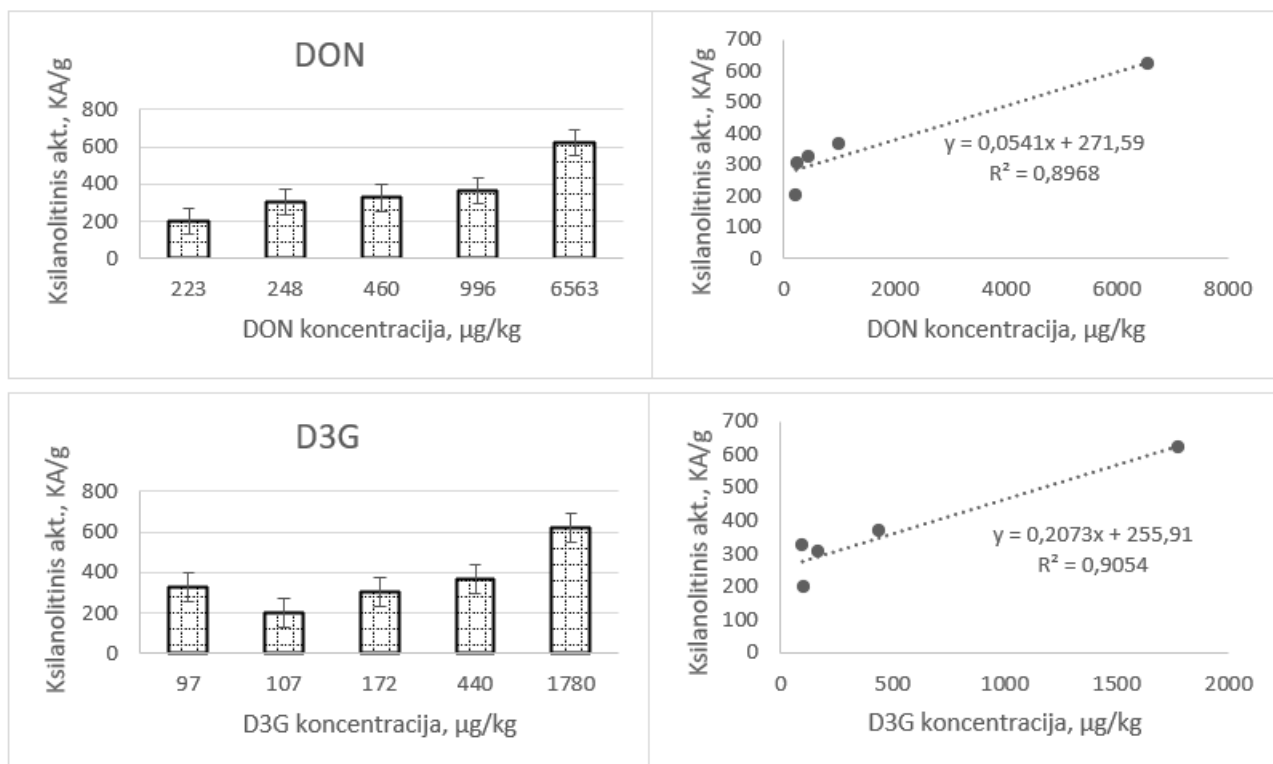


8 pav (tęsinys). Amilolitiniai aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis

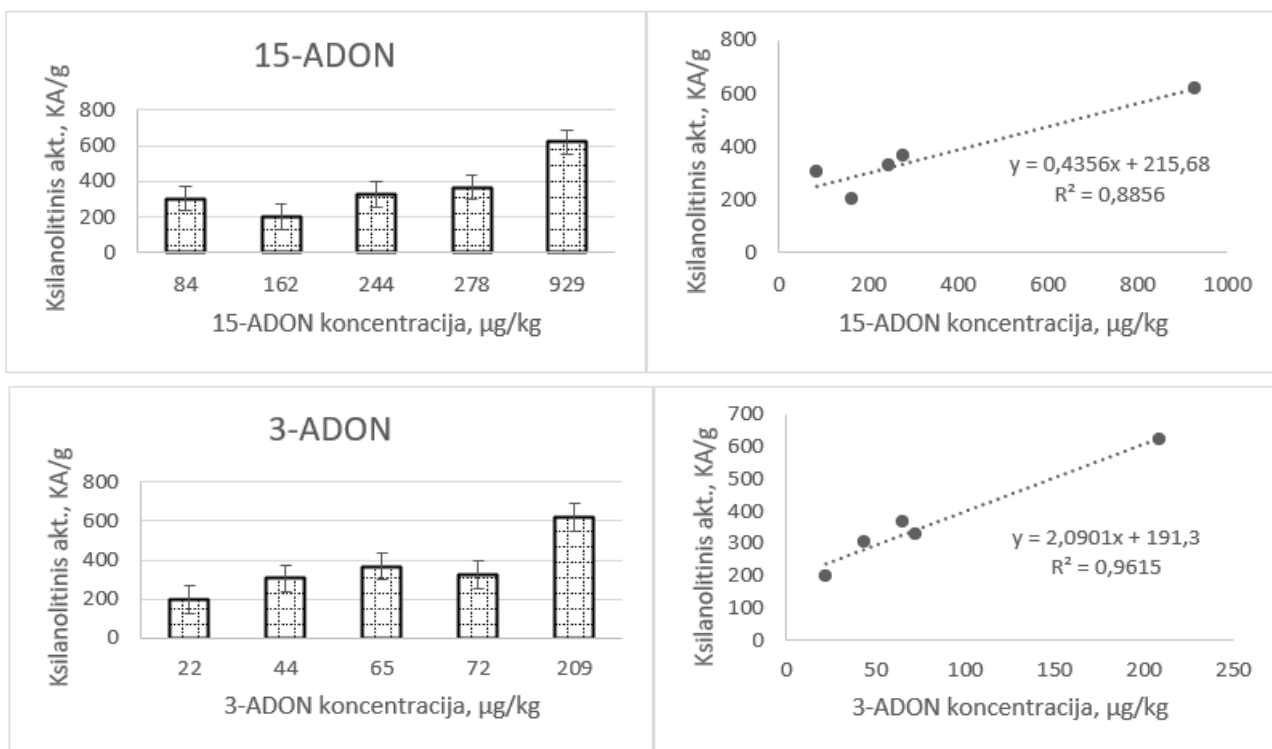
Amilolitinis aktyvumas *Fusarium* spp. užterštuose miežių grūduose kito ribose nuo 217 iki 295 AV/g (8 pav.). Tarp amilolitinio fermentinio aktyvumo skirtingos taršos grūduose ir juose esančių mikotoksinų (DON, D3G, 15-ADON) nustatytas silpnas ryšys (atitinkamai $R^2=0,3554$, $R^2=0,3928$ ir $R^2=0,3831$) rodantis, kad šiuo toksinus produkuojantys mikroskopiniai grybai nepasižymi amilolitiniu aktyvumu. Tarp amilolitinio aktyvumo ir 3-ADON nustatytas vidutinio stiprumo ryšys ($R^2=0,4979$), leidžiantis manyti, kad šį DON konjugatą produkuojantys grybai gali pasižymėti amilolitiniu aktyvumu.

3.4.1.2. Ksilanolitinis aktyvumas

Skirtingo užterštumo miežių mėginių ksilanolitinio aktyvumo ir jų ryšio su DON ir DON konjugatais tyrimų rezultatai pateikti grafiškai (9 pav.).



9 pav. Ksilanolitinių fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis

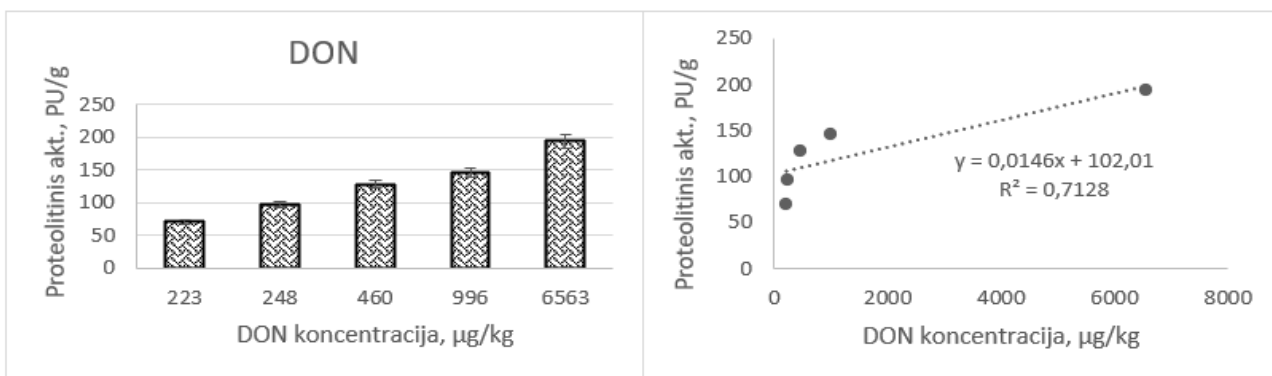


9 pav. (tęsinys). Ksilanolitinių fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis

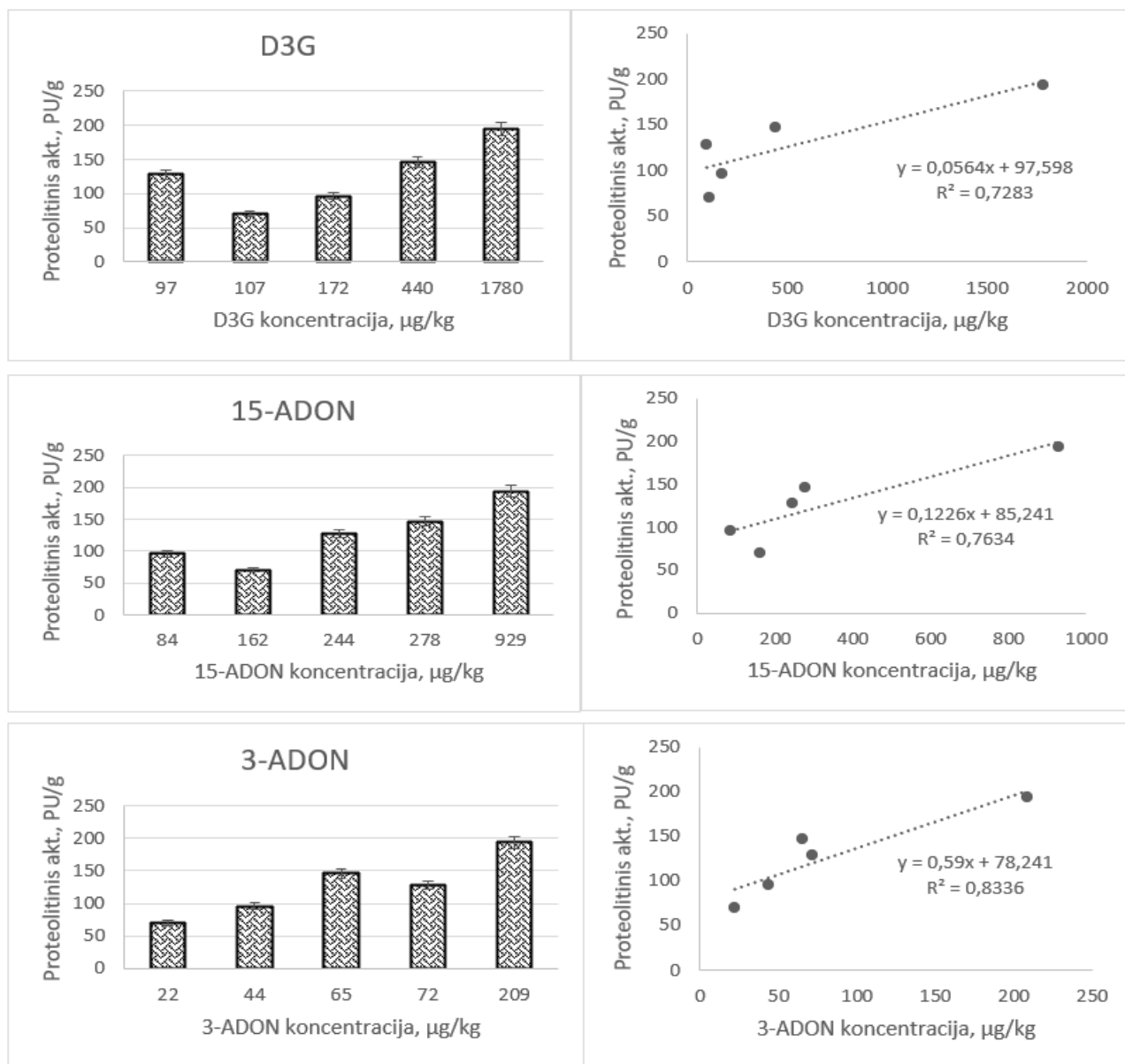
Tirtuose mėginiuose ksilanolitinio aktyvumo vertės kinta nuo 199 iki 621 KA/g. Didėjant ksilanazių aktyvumui stebimas ir mikotoksinų koncentracijos užkrėstuose mėginiuose didėjimas. Labai stiprūs teigiami ryšiai nustatyti tarp ksilanolitinio fermentų aktyvumo ir tokių mikotoksinų kaip D3G ir 3-ADON (atitinkamai $R^2=0,9054$, $R^2=0,9615$). Tarp ksilanazių aktyvumo ir kitų analizuotų mikotoksinų taip pat fiksuoti labai stiprūs teigiami ryšiai: DON ($R^2=0,8968$) ir 15-ADON ($R^2=0,8856$). Taigi, gauti rezultatai rodo kad *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai, produkuojantys DON ir tirtus DON konjugatus, pasižymi ksilanaziniu aktyvumu.

3.4.1.3. Proteolitinis aktyvumas

Šiame tyrime analizuojamas proteolitinis fermentinis aktyvumas skirtingo *Fusarium* spp. grybo užterštumo miežių grūdų mėginiuose bei jo ryšys su mikotoksinų koncentracijomis skirtingo *Fusarium* spp. užterštumo miežių mėginiuose (10 pav.).



10 pav. Proteolitinių fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis



10 pav (tęsinys). Proteolitinų fermentų aktyvumai skirtingo užterštumo miežių mėginiuose (prieš fermentaciją) ir jų ryšys su DON bei DON konjuguotomis formomis

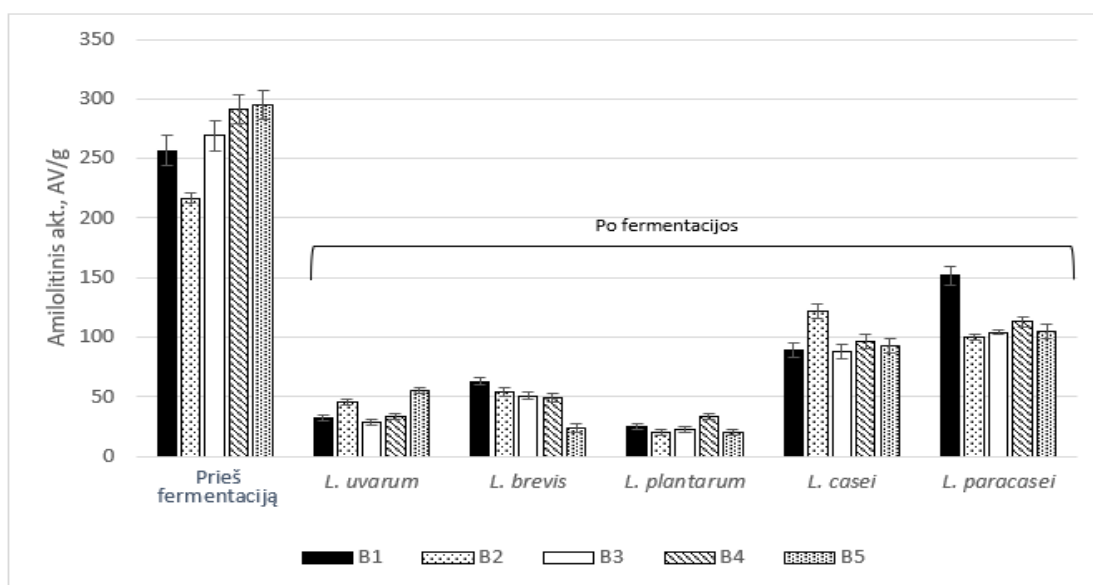
Tirtuose miežių mėginiuose (10 pav.) proteolitinis aktyvumas kinta nuo 70 iki 194 PU/g. Didėjant proteolitiniam aktyvumui, taip pat didėjo tirtų mikotoksinų koncentracijos, didžiausios tirtu fermentinio aktyvumo vertės fiksuotos didžiausios taršos mėginiuose. Stiprus ryšys nustatytas tarp proteolitinio aktyvumo ir DON ($R^2=0,7128$), o taip pat D3G ($R^2=0,7283$) ir 15-ADON ($R^2=0,7634$). Labai stiprus teigiamas ryšys nustatytas tarp proteolitinio aktyvumo ir 3-ADON ($R^2=0,8336$). Visais atvejais didesnis proteolitinis aktyvumas buvo stebimas mėginiuose, kuriuose nustatyti ir didesni 3-ADON kiekiai.

Taigi, gauti tyrimų rezultatai rodo, kad *Fusarium* spp. grybai miežių grūduose pasižymi plačiu fermentinio aktyvumo spektru, kurį patvirtina ir kitų tyrėjų darbai. Pagal C. Geißinger ir kt. [109]. *F. graminearum* infekcija gali sukelti reikšmingus angliavandenių, baltymų ir lipidų sudėties pokyčius. Tiriant gūdinius javus kepinių ruošimui, nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp *Fusarium* infekcijos ir grybų fermentų, tokių kaip amilazės, chitinazės, celiulazės, gliukanazės, ksilanazės ir proteazės, aktyvumo. Pavyzdžiui, žinoma, kad kai kurie *Fusarium* spp. gali padidinti salykle proteolizę ir

citolizę. Kai kurių fermentų perteklius taip pat gali turėti neigiamą įtaką salyklo ir alaus kokybei. Didesnis amilolitinis aktyvumas gali padidinti salyklo nuostolius gamybos metu, nes suskaidytas krakmolos sudaro palankias sąlygas patogenams maitintis. Didesnis proteolitinis aktyvumas gali sukelti alaus putojimo problemų, be to, dėl didesnio citolitinio aktyvumo salyklo gamybos metu per daug modifikuojamas salyklas.

3.4.2. Fermentinių aktyvumų pokyčiai PRB fermentacijos metu

Šio eksperimento metu analizuoti fermentinio aktyvumo profiliai (amilolitinio, proteolitinio ir ksilanolitinio aktyvumų) ir jų savitumai PRB fermentacijos metu naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius PRB padermes. Tyrimų rezultatai pateikti 11; 12 ir 13 paveiksluose.

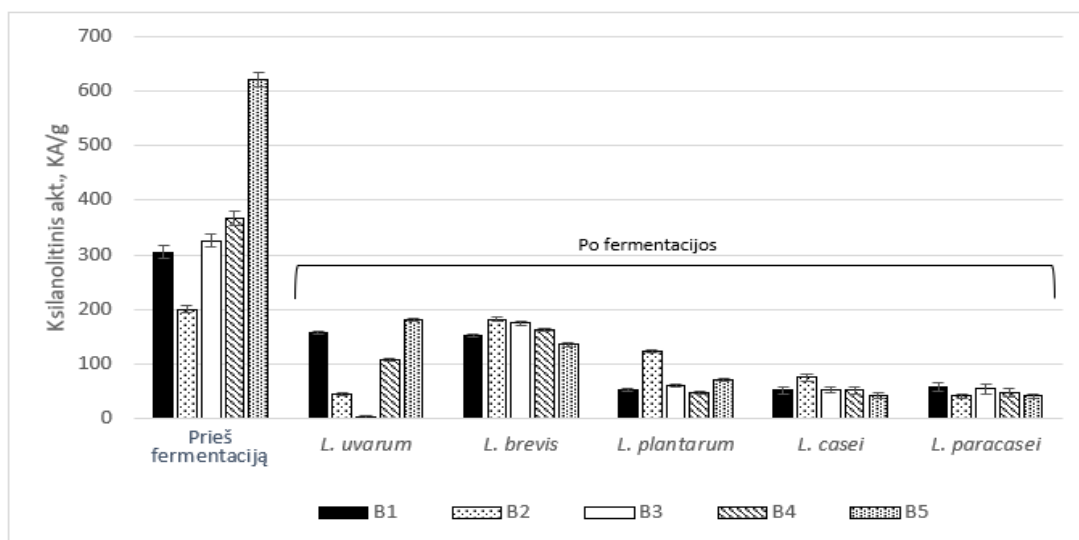


11 pav. Amilolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu

Amilolitinio fermentų aktyvumas PRB fermentacijos metu sumažėjo lyginant su šio aktyvumo tyrimų rezultatais, nustatytais grūdinėje žaliavoje prieš fermentaciją, vidutiniškai nuo 266 iki 65 AV/g. Lyginant tarpusavyje fermentuotus miežių grūdus pagal amilolitinį aktyvumą, matomas skirtumas tarp naudotų fermentacijai PRB padermių: didžiausias vidutinis fermentinis aktyvumas nustatytas *L. paracasei* ir *L. casei* fermentuotuose mėginiuose (atitinkamai 115 ir 98 AV/g), tuo tarpu reikšmingai mažesnės tirto fermentinio aktyvumo vertės fiksuotos *L. plantarum*, *L. uvarum* ir *L. brevis* fermentuotuose mėginiuose (vidutiniškai 24, 39 ir 48 AV/g).

Vertinant ryšį tarp amilolitinio aktyvumo įvairiomis PRB padermėmis fermentuotuose miežių grūduose ir DON koncentracijos, stiprus ryšys aptiktas tarp *L. brevis* ir DON ($R^2=0,9225$) ir vidutinio stiprumo – tarp *L. uvarum* ir DON ($R^2=0,6502$), tuo tarpu tarp kitų PRB padermių ir DON mikotoksino reikšmingų ryšių neaptikta (*L. plantarum* $R^2=0,0933$, *L. casei* $R^2=0,0448$ ir *L. paracasei* $R^2=0,0807$).

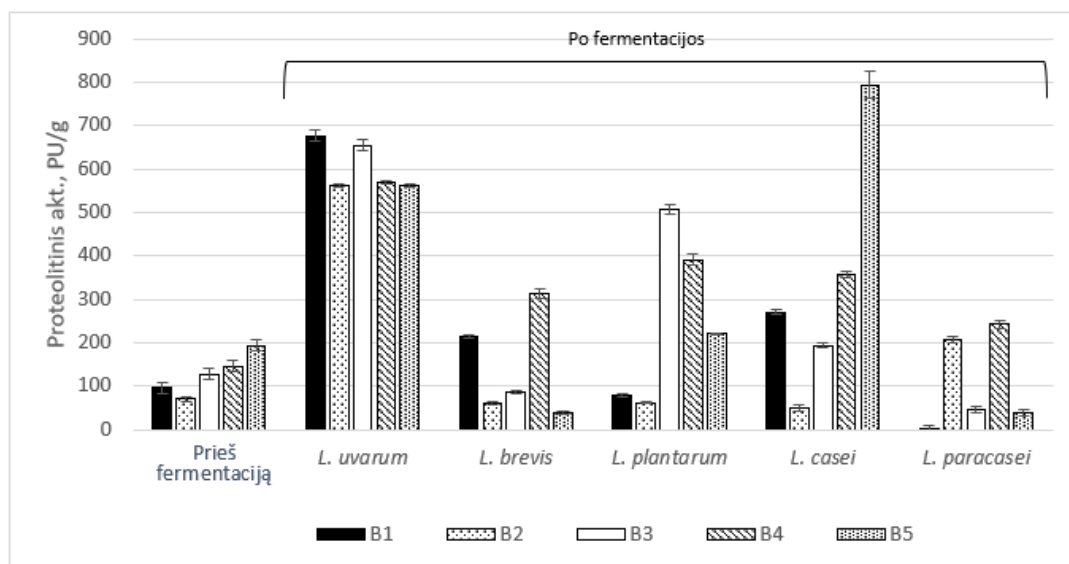
Ksilanolitinio aktyvumo PRB fermentacijos metu tyrimų rezultatai, pateikti 12 paveiksle, rodo apie reikšmingą jų sumažėjimą vidutiniškai nuo 364 KA/g (grūdinėje žaliavoje prieš fermentaciją) iki 87 KA/g (po fermentacijos).



12 pav. Ksilanolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu

Lyginant tarpusavyje skirtingomis PRB padermėmis fermentuotus miežių grūdus pagal ksilanolitinio aktyvumo vertes, *L. brevis* ir *L. uvarum* (kai kurie mėginiai), pasižymi didesniu aktyvumu nei fermentuoti tokiomis PRB kaip *L. plantarum*, *L. casei* ir *L. paracasei*. Vertinant PRB padermių ksilanolitinio aktyvumo fermentuotuose miežiuose ryšius su DON koncentracijomis, gautas silpnas ryšys tik tarp *L. uvarum* ir DON ($R^2=0,3558$), o taip pat *L. casei* ir DON ($R^2=0,3882$). Su kitomis PRB padermėmis ir DON ryšio neaptikta.

Proteolitinio aktyvumo tyrimų rezultatai miežių mėginių fermentacijos metu, pateikti 13 pav., rodo aktyvumų padidėjimą vidutiniškai nuo 127 iki 288 PU/g.

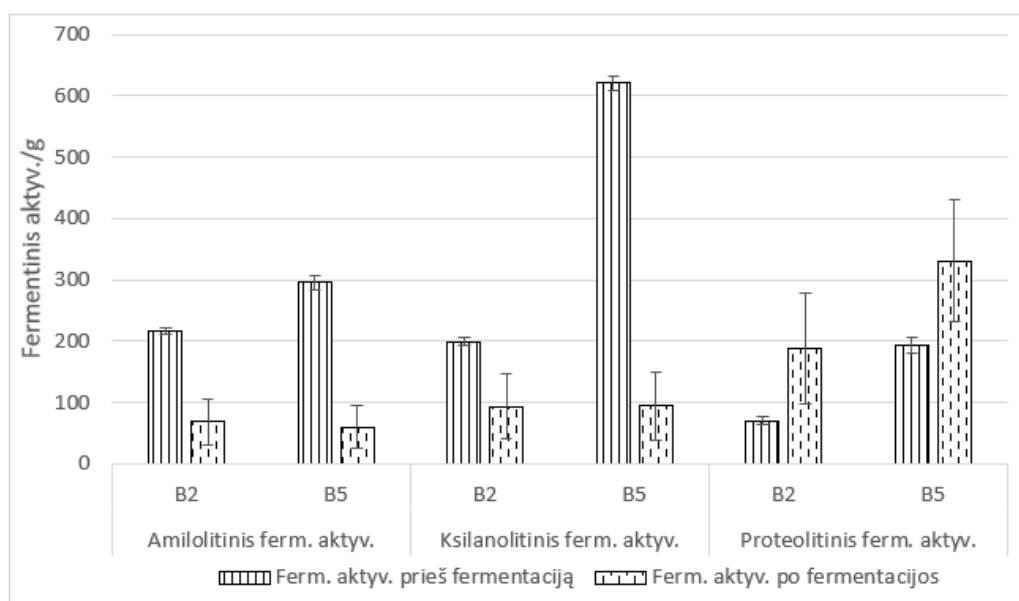


13 pav. Proteolitinio aktyvumo pokyčiai miežių mėginiuose (B1, B2, B3, B4, B5) fermentacijos metu

Didžiausias proteolitinio aktyvumo padidėjimas, lyginant su kitomis PRB padermėmis pasireiškė *L. uvarum* fermentuotuose mėginiuose (vidutiniškai 605 PU/g) ir jis nepriklausė nuo mėginio taršos lygio. Reikšmingas proteolitinio aktyvumo padidėjimas, lyginant su grūdine žaliava, fiksuotas ir *L. plantarum* ir *L. casei* fermentacijos metu ir jis labiau išryškėjo didesnės taršos mėginiuose (B3 ir B4).

Papildomai grafiškai (14 pav.) pateikti **palyginamieji** fermentinių aktyvumų (amilolitinio, ksilanolitinio ir proteolitinio) PRB fermentacijos metu (prieš ir po fermentacijos) tyrimo rezultatai mažiausio ir didžiausio DON užterštumo mėginiuose (B2 ir B5). Sprendžiant iš fermentinių aktyvumų pokyčių fermentacijos metu mažiausio užterštumo mėginyje (B2), galima prognozuoti apie PRB fermentų įtaką mikotoksinų detoksikacijos procese, o pagal didžiausio *Fusarium* spp. užterštumo mėginių (B4 ir B5) fermentinių aktyvumų tyrimų rezultatus – apie mikroskopinių grybų įtaką tirtų mikotoksinų detoksikacijos procese.

Iš grafiko (14 pav.) matomas tiek PRB, tiek ir grybų vidutinis proteolitinio aktyvumo padidėjimas fermentacijos metu atitinkamai nuo 70 iki 188 PU/g (B2 mėginyje) ir nuo 194 iki 331 PU/g (B5 mėginyje).



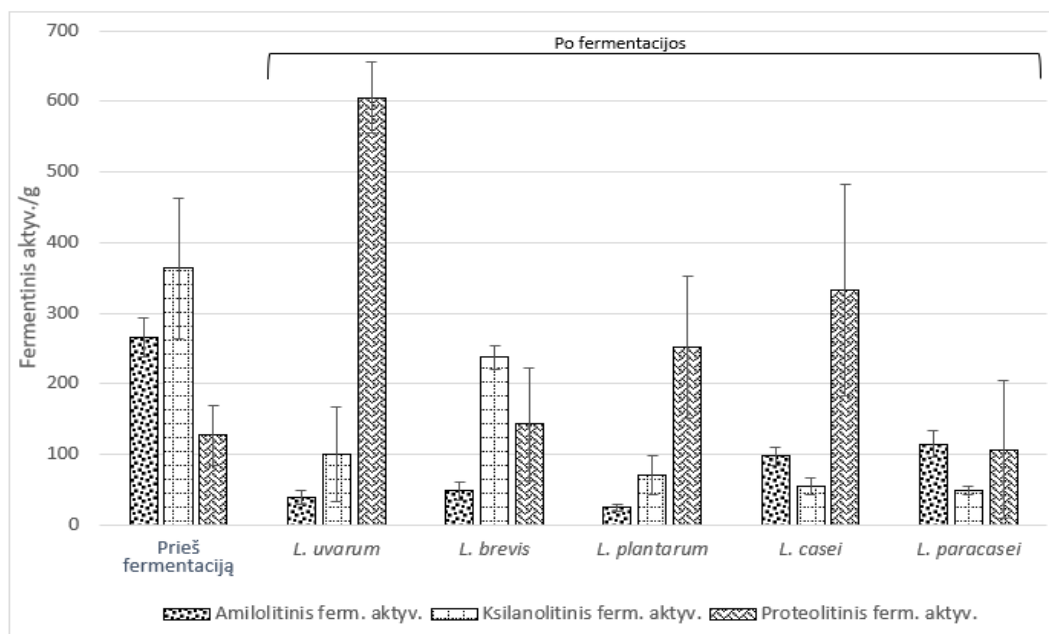
14 pav. Fermentinių aktyvumų (amilolitinio, ksilanolitinio ir proteolitinio) pokyčiai PRB fermentacijos metu vieno iš mažiausio (B2) ir didžiausio (B5) užterštumo mėginiuose

Tarp proteolitinio fermentinio aktyvumo ir DON mikotoksino didesnės taršos mėginyje nustatyta teigiamas vidutinio stiprumo ryšys ($R^2=0,5610$) leidžia manyti kas galimą grybinių proteolitinų fermentų dalyvavimą DON detoksikacijos mechanizme. Tuo tarpu kitų fermentinių aktyvumų poveikis (įskaitas ksilanolitinio aktyvumo) tirtų mikotoksinų mažinimui nebuvo reikšmingas.

Fusarium spp. išgyvena plačiame temperatūros ir pH diapazone. Pagal literatūrą [110], *F. graminearum* izoliatai reikšmingai skiriasi pagal reikalavimus temperatūrai ir pH. Nustatyta, kad geriausiai izoliatai augo esant 25 – 30 °C temperatūrų diapazone ir pH 5, tačiau augimo greitis skyrėsi [110]. Kai kurie mokslininkai skelbia apie rūgštinį pH, skatinantį visų *Fusarium* spp., *F. oxysporum* ir *F. solani* geriausią dauginimąsi esant pH 4,5 ir 6,0, o *F. graminearum* ir *F. equise* – esant atitinkamai pH 3,5 ir 6,5 [110]. Taigi, grybai gali augti ir sporas formuoti esant plačiam pH diapazonui vidutiniškai nuo 4,0 iki 8,0. Kai kurios *Fusarium* spp. rūšys auga ir sporas formuoja intervale nuo 5,0 iki 6,0 [110].

Šiame eksperimente fermentuotų miežių grūdų mėginių pH (3.2.1 skyrius) buvo ribose 3,5 – 4,0. Pagal literatūrą [110] esant tokiam pH dar galimas *Fusarium* spp. grybų dauginimasis. Įvertinant tai galima manyti, kad didelio užterštumo mėginyje suaktyvėjo grybų proteolitinis aktyvumas, galėjęs

turėti įtakos mikotoksinų detoksikacijai. Proteolitinio aktyvumo padidėjimas viename iš mažiausiai užterštų mėginių (B2) taip pat rodo apie galimą PRB dalyvavimą detoksikacijos procese.



15 pav. PRB padermių fermentinių aktyvumų (amilolitinio, ksilanolitinio ir proteolitinio) pokyčiai PRB fermentacijos metu

Didžiausiu proteolitininiu aktyvumu visuose mėginiuose išsiskyrė *L. uvarum* ir *L. casei*. Tiriant proteolitinio aktyvumo PRB fermentuotuose miežiuose ryšį su DON koncentracija fermentuotuose miežių mėginiuose, stiprus ryšys nustatytas tarp *L. casei* ir DON ($R^2=0,8693$) ir silpnas ryšys fiksuotas tarp *L. uvarum* ir DON ($R^2=0,2167$), nors ši padermė visuose mėginiuose išsiskyrė aukštomis proteolitinio aktyvumo vertėmis. Tarp kitų PRB padermių ir DON reikšmingų ryšių neaptikta. Pažymėtina, kad *L. casei* taip pat gerai dauginosi fermentacijos metu skirtingos taršos miežiuose ir gamino organines rūgštis. *L. casei* fermentuotuose mėginiuose buvo fiksuotas vienas iš efektyviausių DON koncentracijos sumažėjimų.

Sprendžiant iš gautų tyrimų rezultatų, matoma, kad amilolitininis fermentinis aktyvumas turėjo silpną ryšį su mikroskopiniais grybais, galinčiais formuoti DON ir DON konjugatus ir šis aktyvumas mažėjo PRB fermentacijos metu. Tarp kai kurių PRB padermių amilolitinio aktyvumo ir DON fermentuotuose mėginiuose aptiktas stiprus ryšys. Ksilanolitininis ir proteolitininis aktyvumas, skirtingai nei amilolitininis, turėjo sąsają su grūdinėje žaliavoje esančiais grybais, dalyvaujančiais mikotoksinų susidarymo procese. Tačiau ksilanolitinio aktyvumo vertės fermentacijos metu daugumoje atvejų mažėjo, nerodant atskirų PRB aktyvumo ryšio su tirtais mikotoksinais. Tokiu būdu, galima daryti prielaidą, kad proteolitininiu aktyvumu grūdinėje žaliavoje pasižymintys grybai gali suaktyvėti fermentacijos sąlygose ir dalyvauti kombinacijoje su PRB (pvz., *L. casei*) mikotoksinų detoksikacijos procese. Taigi, neatmetama galimybė, kad tiek mikroskopiniai grybai, tiek ir bakterijos gali veikti kompleksiskai mikotoksinų detoksikacijos procese ir jų proteolitininis aktyvumas pagal šio eksperimento rezultatus turėtų tam svarbiausią reikšmę.

3.5. Pienarūgštės fermentacijos taikymo galimybės salyklojų apdorojimui

PRB panaudojimo galimybės yra plačiai žinomos [3], [102], [15]. Jos gali pagerinti ne tik maistines savybes, bet ir gali būti naudojamos kaip biologinės kontrolės priemonės nuo kenksmingų organizmų ar toksinių grybų, tokių kaip *Fusarium* spp., o taip pat ir siekiant pagerinti salyklo apdoravimo potencialą [68]. Salyklojai yra jautri terpė mikrobiologinei taršai [104], todėl siekiant išvengti produktų užteršimo patogeniniais mikroorganizmais, pelėsiais ar mielėmis, gali būti naudojamos tam tikros PRB padermės, kurios gamina skirtingus slopinančius junginius (organines rūgštis ir kt.) [111].

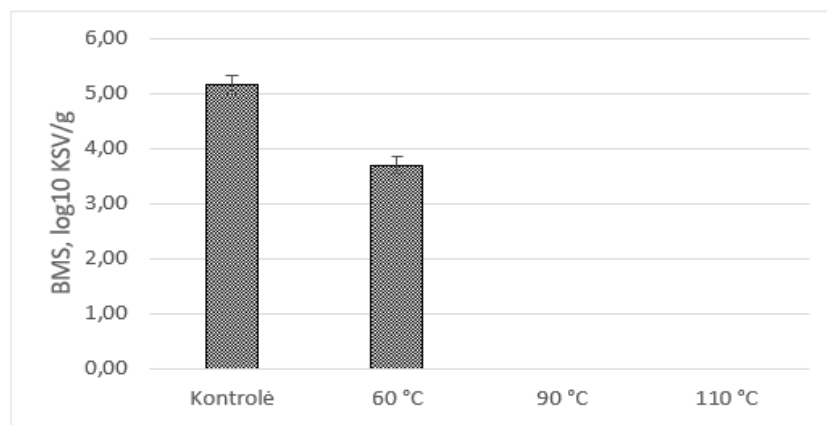
3.5.1. Ekstruzijos proceso įtaka salyklojų cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms

Maisto pramonės antriniai produktai, įskaitant padidinto drėgumo salyklojus yra jautrūs mikrobinei taršai ir jų laikymas be papildomo apdoravimo yra ribotas. Laikymo sąlygos yra svarbus veiksnys mikotoksinų ir mikrobiologinės taršos kontrolei [12]. Didelė drėgmė ir temperatūra yra du pagrindiniai veiksniai, kurie skatina laikymo metu kenksmingų organizmų augimą ir mikotoksinų susidarymą [12]. Yra pranešimų, kad mikotoksinų kiekis gali padidėti miežių dygimo metu bei salyklo ar alaus gamybos procese [112]. Literatūroje aptarti būdai salyklojų mikrobinės taršos prevencijai ar mikotoksinų mažinimui [12]. Vienas iš galimų sprendimų – fizinis apdorojimas, toks kaip žaliavos rūšiavimas, apdorojimas mikrobangomis, švitinimas, ekstruzija ir kt. [12]. Tokie fiziniai metodai, kaip ekstruzija neužtikrina visiškos žaliavos detoksikacijos, tačiau prisideda prie kenksmingų medžiagų mažinimo [12], pvz., ekstruzijos metu susidarant granulėms pasikeičia apdorojamos masės paviršiaus plotas, todėl mikotoksinų kiekis galutiniame produkte sumažėja [12]. Taip pat naudojant ekstruziją sumažėja drėgmės kiekis, kuris apsprendžia pašalinės mikrofloros dauginimąsi [12].

Daugybė šalių taiko reglamentus, nurodančius didžiausią leistiną DON koncentraciją grūdų produktuose (iki 750 µg/kg) [91]. Tačiau, nėra normų dėl priimtino mikotoksinų kiekio aluje, tik išskiriama leistina paros norma (LPN), pagal kurią DON yra 1 µg/kg kūno masės [113]. Todėl svarbu ieškoti ir taikyti efektyvius būdus, kurie galėtų sumažinti DON kiekius ir galimus nuostolius alaus pramonei ir žmogaus sveikatai.

Pradiniame darbo etape buvo analizuota ekstruzijos įtaka, naudojant skirtingus temperatūrinius režimus miežinio salyklojaus ir kviečių sėlenų mišinio mikrobiologijai (16 pav.), cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms, galinčioms turėti įtakos PRB fermentacijos procesui (5 lentelė).

Salyklojų **mikrobiologinės taršos** pokyčiai ekstruzijos metu vertinti pagal bendrą mikroorganizmų skaičių (16 pav.).



16 pav. Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) pokyčiai salyklojų ekstruzijos metu naudojant skirtingus temperatūrinius režimus (60 °C; 90 °C ir 110 °C)

Tyrimai parodė, kad salyklojuose, apdorotuose ekstruzija esant 60 °C temperatūrai, mikroorganizmų kiekis nustatytas 3,70 log₁₀ KSV/g t.y. lyginant su kontrole (5,17 log₁₀ KSV/g) sumažėjo 29 %. Pagal PSO [119], mikroorganizmų dauginimasis lėtėja esant 60 – 65 °C temperatūrai, tačiau mikroorganizmų nesunaikina. Todėl šia temperatūra apdorotus salyklojus reikėtų papildomai tikrinti arba eliminuoti iš maisto gamybos grandinės.

Ekstruduojant salyklojus 90 °C ir 110 °C temperatūrose, mikroorganizmų nebuvo aptikta, nes esant tokioms aukštoms temperatūroms dauguma mikroorganizmų negali daugintis [119] ir taip užtikrinama mikrobiologinė produkto sauga.

Iš gautų rezultatų (5 lentelė.) matoma, kad tirti mėginiai nesiskiria tarpusavyje, o taip pat ir nuo kontrolės pagal baltymų kiekį (vidutiniškai 19,75 %). Pagal literatūrą ekstruzija neturi reikšmingos įtakos bendram baltymų kiekiui, tačiau galimas tirpiųjų baltymų kiekio sumažinimas [114]. Šio eksperimento metu, tirpių baltymų kiekis sumažėjo tirtuose mėginiuose didėjant temperatūrai, lyginant su kontrole (be apdoravimo) vidutiniškai nuo 4,70 iki 5,45 μg/g. Apdorojant masę žemesnėse temperatūrose (60 °C ir 90 °C) buvo stebima fenolinių junginių didėjimo tendencija, tačiau apdorojant didžiausia temperatūra (110 °C), lyginant su kontrole, nustatytas reikšmingas bendro fenolinių junginių kiekio sumažėjimas (62 %). Literatūroje pateikti rezultatai gaminant ekstruzijos būdu avižinius dribsnius sutampa su mūsų eksperimento rezultatais, kad fenolinių junginių kiekis sumažėjo kai galinė ekstruderio temperatūra siekė 110 °C [115].

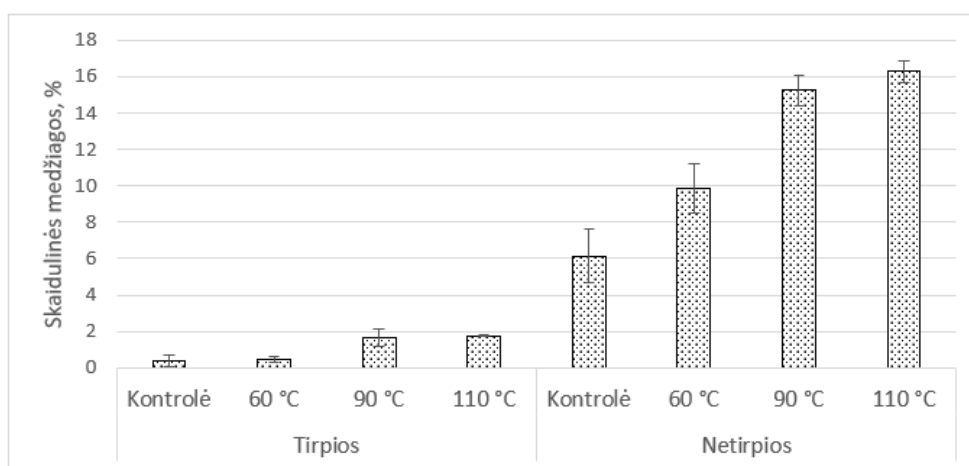
Redukuojančių sacharidų kiekis tiriamuose mėginiuose, lyginant su kontrole, mažai tarpusavyje skiriasi naudojant žemesnius temperatūrinius režimus: 60 °C – 30,38 ± 0,00 ir 90 °C – 25,38 ± 0,00 tačiau matomas ženklus jų sumažėjimas apdorojant 110 °C temperatūroje (5,38 ± 0,00). Toks redukuojančių cukrų sumažėjimas galėtų būti siejamas su Majaro reakcija, vykstant ekstruzijos metu amino rūgščių ir redukuojančių sacharidų kompleksų susidarymui [114].

Mineralinių medžiagų kiekis kinta nuo 3,11 iki 3,50 % ir jam neturi reikšmingos įtakos temperatūrinio režimo pokyčiai. Tokie duomenys yra panašūs ir paskelbtuose literatūros šaltiniuose [116].

5 lentelė. Salyklojų cheminės savybės

Temperatūriniai režimai	Bendras baltymų kiekis, %	Tirpūs baltymai, µg/g	Mineralinės medžiagos, %	Redukuojantys sacharidai, mg/g	Fenoliniai junginiai, mg/g
Kontrolė	19,67 ± 0,89	4,70 ± 0,12	3,11 ± 0,17	26,63 ± 0,00	0,13 ± 0,01
60 °C	19,74 ± 0,28	5,01 ± 0,00	3,19 ± 0,20	30,38 ± 0,00	0,16 ± 0,02
90 °C	20,37 ± 0,61	5,78 ± 0,09	3,50 ± 0,41	25,38 ± 0,00	0,18 ± 0,01
110 °C	19,24 ± 0,17	5,55 ± 0,03	3,23 ± 0,02	5,38 ± 0,00	0,05 ± 0,01

Skaidulinių medžiagų ekstruzijos metu tyrimų rezultatai pateikti 17 pav., rodo bendrą tendenciją, kad didėjant ekstruzijos metu temperatūrai, keičiasi tirpių ir netirpių skaidulinių medžiagų santykis. Pateikti tyrimų duomenys panašūs ir su literatūroje pateiktais, kuriuose buvo vykdoma ekstruzija 130 °C temperatūroje [117]. Žinoma, kad tirpios maistinės skaidulos suteikia didesnę tūrį ekstruduotiems produktams, nei netirpios skaidulos, tačiau esant per daug tirpiųjų skaidulų, gali pakisti masės tekstūra (padidėjant jos „gleivėtumui“) ir tai gali apsunkinti ekstruzijos procesą. Įvairūs tyrimai rodo, kad maistinių skaidulų, o ypač tirpių padaugėja po apdorojimo ekstruzija [118]. Miežiuose šis poveikis labiausiai siejamas su β-gliukano tirpumo padidėjimu [119]. Netirpios skaidulos turi įtakos gaminio kietumui, tekstūra tampa kietesnė. Taip pat jos turi įtakos savitajam tūriui [119]. Netirpių ir tirpių skaidulinių medžiagų pokyčius ekstruzijos metu apsprendžia vykstantys fiziniai ir cheminiai virsmai, o taip pat sąveika su krakmolu, vandens absorbcija ir kt. [118].



17 pav. Tirpių ir netirpių skaidulinių medžiagų pokyčiai salyklojuose ekstruzijos metu naudojant skirtingus temperatūrinius režimus (60 °C; 90 °C ir 110 °C)

Papildomai tirtos technologinės ekstruduotų salyklojų savybės vertinant kietumo parametą. Didžiausias kietumas (6,9 N) užfiksuotas salyklojaus mėginių, kurie buvo apdoroti 110 °C temperatūroje, šioje temperatūroje nustatytas ir didžiausias netirpių skaidulų kiekis. Pagal literatūrą, didėjantis netirpių skaidulų kiekis sąlygoja ekstruduoto produkto kietumo padidėjimą ir jo suardymui reikalingą panaudoti didesnę jėgą [119]. Mažiausias kietumas buvo nustatytas kontroliniui (temperatūra neapdorotam) mėginiui (5,5 N), o iš ekstruduotų mėginių – 90 °C temperatūra apdorotuose salyklojų (5,9 N), 60 °C temperatūra apdorotų salyklojų kietumas siekė 6,1 N.

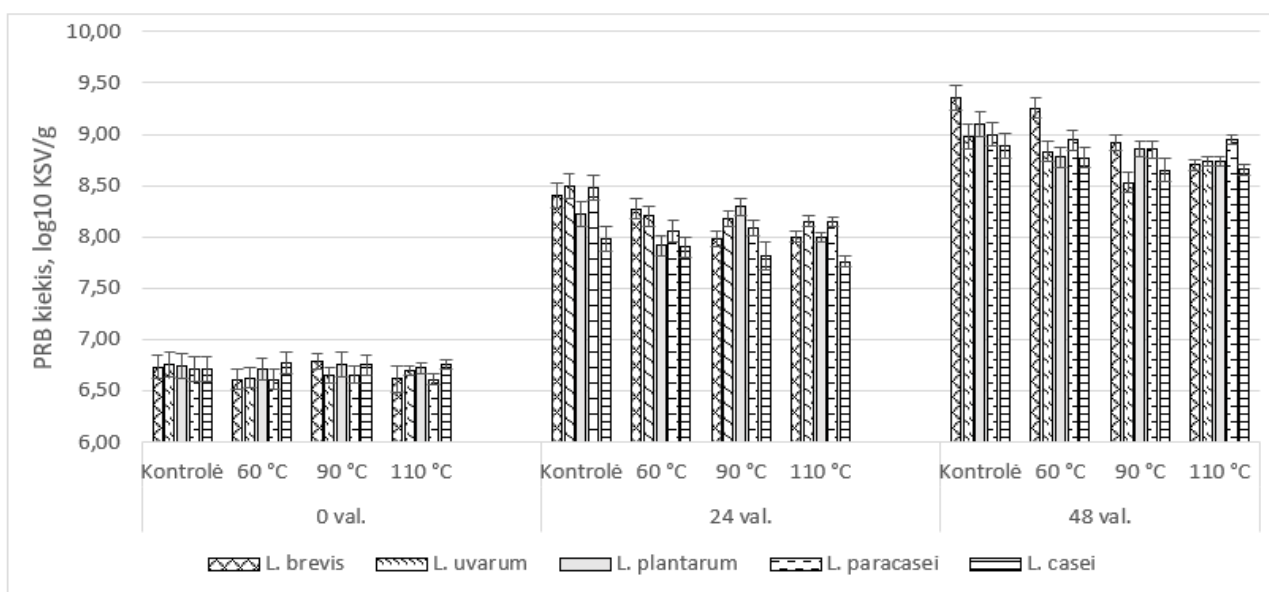
3.5.2. Ekstruduotų salyklojų PRB fermentacijos savitumai

Pieno rūgšties bakterijų dauginimasis turi didelę reikšmę salyklo ir alaus gamybos pramonėje dėl kelių priežasčių, tokių kaip geresnės alaus kokybės ir saugos užtikrinimo [67].

Šio darbo tikslas išbandyti skirtingai apdorotus salyklojus, kaip fermentacijos terpę, PRB kultyvavimui. Ekstruduoti salyklojai buvo fermentuojami naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčias pieno rūgšties bakterijas tokias kaip *L. uvarum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei* ir *L. paracasei*.

Iš PRB dauginimosi rezultatų skirtingose fermentacijos terpėse (18 pav.) matoma, kad PRB kiekis salyklojų fermentacijos metu daugiausiai padidėjo pirmo etapo metu vidutiniškai nuo 6,70 log₁₀ KSV/g (0 val.) iki 8,12 log₁₀ KSV/g (po 24 val.), tuo tarpu antrojo etapo metu PRB dauginosi lėčiau pasiekiant 8,87 log₁₀ KSV/g (po 48 val.).

PRB geriausiai dauginasi kontroliniuose salyklojuose (be apdoravimo ekstruzija) padidėjant jų kiekiui fermentacijos metu (po 48 val.) vidutiniškai nuo 6,73 iki 9,07 log₁₀ KSV/g.



18 pav. PRB dauginimosi pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdoravimo salyklojaus mėginiuose

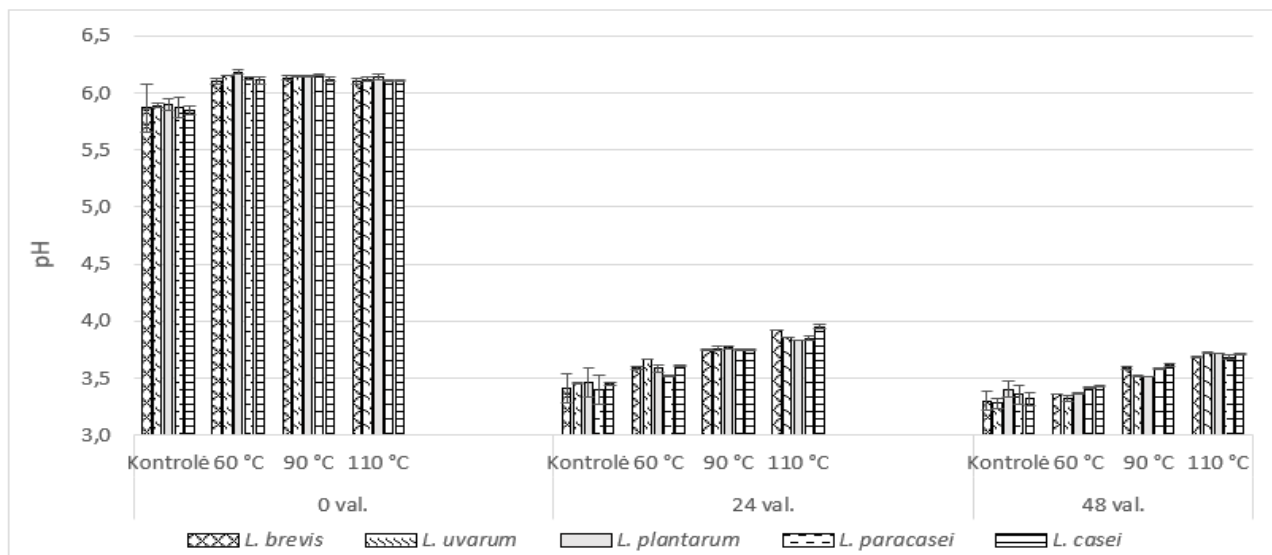
Salyklojų mėginiuose, apdorotuose ekstruzija aukštesnėse temperatūrose (60 °C, 90 °C, 110 °C), PRB kiekis pirmo fermentacijos metu (po 24 val.) padidėjo vidutiniškai iki 8,05 log₁₀ KSV/g ir dauginimasis fiksuotas lėtesnis nei kontroliniuose salyklojuose (be apdoravimo), kuriuose PRB kiekis nustatytas vidutiniškai 8,32 log₁₀ KSV/g. Tokia pati tendencija buvo stebima ir po 48 val. fermentacijos susidarant kontroliniuose mėginiuose didesniai PRB kiekiui (vidutiniškai 9,07 log₁₀ KSV/g) nei ekstruduotuose salyklojuose (vidutiniškai 8,81 log₁₀ KSV/g).

Vertinant PRB dauginimąsi tarp skirtingomis temperatūromis (60 °C, 90 °C, 110 °C) ekstruzija apdorotų salyklojų (po 24 val.), pastebėta, kad didesnis dauginimasis yra salyklojuose apdorotuose 60 °C temperatūra (vidutiniškai 8,07 log₁₀ KSV/g), o taip pat ir po 48 val. fermentacijos (vidutiniškai 8,91 log₁₀ KSV/g).

Lyginant tirtų PRB padermių dauginimosi savitumus, nustatyta, kad geriausiai dauginosi salyklų mėginiuose *L. uvarum* padidėjant kiekiui (po 24 val.) vidutiniškai iki 8,26 log₁₀ KSV/g. Kitų PRB padermių (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei*) vidutiniai kiekiai tirtose terpėse po pirmo fermentacijos etapo padidėjo atitinkamai iki 8,16; 8,11 ir 8,19 log₁₀ KSV/g. Blogiausiai dauginosi *L. casei* fiksuojant po 24 val. fermentacijos padidėjimą vidutinį iki 7,87 log₁₀ KSV/g.

Lyginant PRB padermių dauginimąsi po 48 val. fermentacijos, geriausiai dauginosi *L. brevis*, kurios kiekis vidutiniškai padidėjo iki 9,06 log₁₀ KSV/g. Kitų PRB padermių tokių kaip *L. plantarum* ir *L. casei* vidutinis kiekis fermentacijos metu padidėjo atitinkamai iki 8,87 ir 8,94 log₁₀ KSV/g. Silpniausiai dauginosi salyklojuose *L. uvarum* ir *L. paracasei*, kurių vidutinis kiekis fermentacijos metu padidėjo atitinkamai iki 8,77 ir 8,74 log₁₀ KSV/g.

Vertinant terpės pH pokyčius PRB fermentacijos metu (19 pav.), pH kito vidutiniškai nuo pH 6,1 (0 val.) iki pH 3,7 (po 24 val.) ir pH 3,5 (po 48 val.).

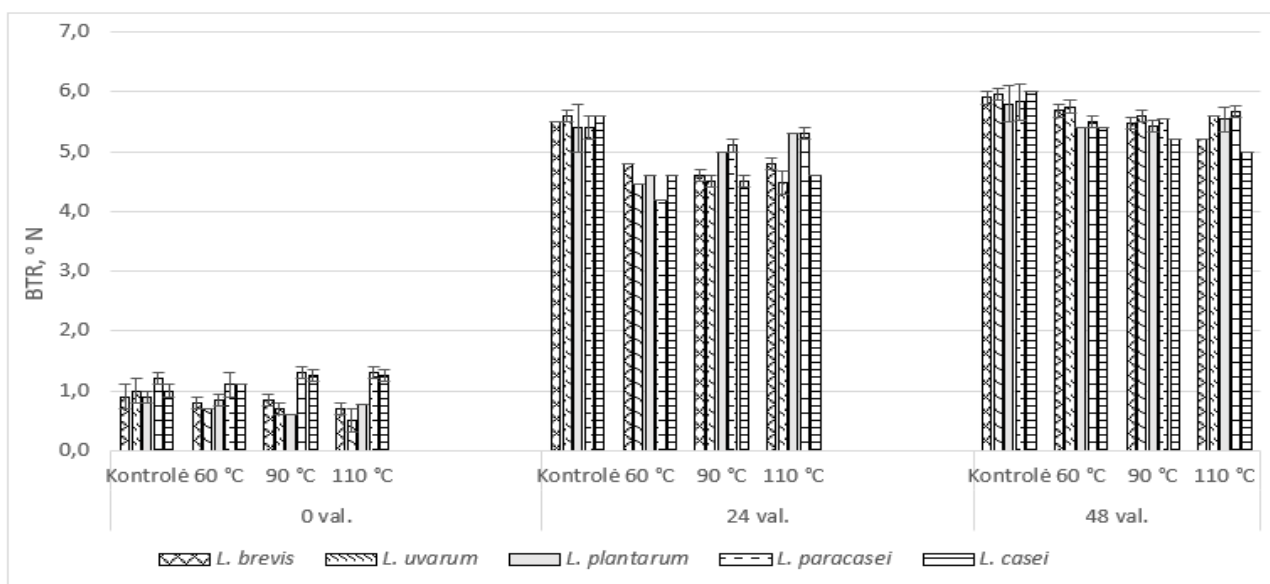


19 pav. pH pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdorojimo salyklojaus mėginiuose

Intensyviausi pH pokyčiai nustatyti pirmo fermentacijos etapo metu (po 24 val.) sumažėjant šio parametro vertėms vidutiniškai iki pH 3,7. Po 48 val. fermentacijos pH vertės sumažėjo vidutiniškai iki 3,5. Tai rodo, kad antrojo periodo pH pokytis yra reikšmingai mažesnis nei pirmojo – po 24 val. Stebima tendencija, kad pH didesni pokyčiai tiek po 24 val. (vidutiniškai 3,4) fermentacijos, tiek po 48 val. (vidutiniškai 3,3) fiksuoti kontroliniame salyklojų mėginyje (be ekstruzijos) nei tiriamuose ekstruduotuose salyklojuose vidutiniškai pH 3,7 (po 24 val.) ir pH 3,6 (48 val.). Lyginant tarpusavyje tiriamuosius salyklojų mėginius, apdorotus taikant ekstruzijos metu skirtingus temperatūrinius režimus, didėjant temperatūrai nuo 60 °C iki 110 °C pH pokytis, ypač pirmo etapo metu (po 24 val.), mažėja.

Sprendžiant iš PRB padermių prisitaikymo gebos prie salyklojų terpės, *L. paracasei* fermentacijos metu (po 24 val.) nustatytas mažiausias pH (vidutiniškai pH 3,6), PRB padermės tokios kaip *L. brevis*, *L. uvarum*, *L. plantarum* ir *L. casei* taip pat vidutinės pH vertės mėginiuose fiksuotos atitinkamai 3,7; 3,7 3,7 ir 3,7. Antrojo fermentacijos tarpsnio metu (po 48 val.) *L. uvarum* ir *L. brevis* fermentuotų salyklojų mėginiai išsiskyrė mažiausiu vidutiniu pH (atitinkamai pH 3,5 ir 3,5). *L. plantarum* *L. paracasei* ir *L. casei* fermentuotuose salyklojuose (po 48 val.) pH vidutinės vertės fiksuotos atitinkamai pH 3,5, pH 3,5 ir pH 3,5.

Bendro titruojamojo rūgštingumo (BTR) tyrimų duomenys (20 pav.) rodo, kad fermentacijos metu BTR vertės didėjo nuo 0,9 °N (pradiniame taške – 0 val.) fermentacijos metu vidutiniškai iki 4,9 °N (po 24 val.) ir 5,6 °N (po 48 val.).



20 pav. BTR pokyčiai skirtingo temperatūrinio apdorojimo salyklojaus mėginiuose

Didžiausią įtaką BTR pokyčiui po 24 val. fermentacijos turėjo kontrolinių salyklojų terpė (vidutiniškai 5,5 °N), kurioje BTR didėjo intensyviau nei ekstruduotuose salyklojuose paveiktuose temperatūra (vidutiniškai 4,7 °N). Po 48 val. kontroliniuose salyklojo mėginiuose BTR vertės išlieka didesnės (vidutiniškai 5,9 °N) nei ekstruduotuose mėginiuose (vidutiniškai 5,5 °N).

Didžiausios BTR vertės po 24 val. fermentacijos nustatytos *L. plantarum* ir *L. paracasei* fermentuotuose salyklojuose (vidutiniškai 5,1 °N ir 5,0 °N), tuo tarpu kitomis PRB padermėmis (*L. brevis*, *L. uvarum* ir *L. casei*) fermentuotuose salyklojuose jos buvo mažesnės iki kito ribose vidutiniškai (4,8 – 4,9 °N). BTR vertės fermentuotų salyklojų (po 48 val.) kito ribose nuo 5,4 °N iki 5,7 °N nepriklausomai nuo naudotos PRB padermės.

Taigi, atlikti tyrimai rodo, kad salyklojai yra gera fermentacijos terpė PRB fermentacijai, nepriklausomai nuo naudotos PRB padermės. Juose buvo stebimas geras PRB dauginimasis ir salyklojų mėginiuose PRB fermentacijos metu intensyviai kaupiasi organinės rūgštys. Salyklojuose (be apdorojimo ekstruzija) PRB fermentacijos procesas vyko intensyviau nei ekstruduotuose salyklojų mėginiuose. Lyginant tarpusavyje naudotus temperatūrinius režimus ekstruzijos proceso metu, PRB fermentacija vysta efektyviau naudojant žemesnėse temperatūrose apdorotus salyklojus nei ekstruduotus naudojant aukštesnes temperatūras. Tokios tendencijos gautos ir kitame tyrime, kur buvo analizuojama PRB fermentacijos įtaka ekstruduotoms kvietinėms sėlenoms [110] ir duomenys rodo, kad PRB geriau dauginasi ir gamina organines rūgštis žemesnėse temperatūrose apdorotuose mėginiuose. Geras PRB dauginimasis aiškinamas tuo, kad neapdorotuose ar apdorotuose žemesnėse temperatūrose kvietinių sėlenų mėginiuose nustatyta daugiau monosacharidų, dalyvaujančių PRB asimiliacijos procese.

IŠVADOS

1. *Fusarium* spp. užterštuose miežių grūduose UHPLC-Orbitrap-HRMS įranga identifikuotas miežių mėginiuose deoksinivalenolis (DON), kurio koncentracija kito nuo 223 µg/kg iki 6563 µg/kg ir DON konjugatai: DON-3-gliukozidas (D3G), 15-acetildeoksinivalenolis (15-ADON) ir 3-acetideoksinivalenolis (3-ADON) ribose nuo 22 µg/kg (B2) iki 209 µg/kg, D3G ribose nuo 97 µg/kg iki 1780 µg/kg ir 15-ADON nuo 84 µg/kg iki 929 µg/kg.

Įvertinus *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų įtaką PRB fermentacijos procesui, nustatyta: *L. brevis* gerai dauginosi skirtingos taršos sąlygose. Kai kurios PRB, tokios kaip *L. uvarum* ir *L. casei* po 24 val., o *L. plantarum* (po 48 val.) buvo jautresnės taršai ir vidutiniškai geriau dauginasi mažiau užterštuose mėginiuose.

pH pokyčius ir metabolizmo produktų susidarymą daugiausiai apsprendžia PRB padermė: mažiausias pH fiksuotas *L. plantarum* fermentacijos metu, o taip pat naudojant miežių grūdų bioapdorėjimui *L. paracasei* ir *L. casei*.

Tiriant PRB fermentacijos įtaką DON ir DON konjugatų *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų pokyčiams, nustatyta:

PRB fermentacija reikšmingai sumažino DON koncentraciją vidutiniškai nuo 1698 µg/kg iki 1180 µg/kg, D3G koncentraciją nuo 519,2 µg/kg iki 113,96 µg/kg, 3-ADON nuo 82,4 µg/kg iki 37,36 µg/kg ir 15-ADON nuo 339,4 µg/kg iki 185,2 µg/kg.

Didžiausias miežių, užterštų DON mikotoksinais, nukenksminimo efektas pasiektas naudojant fermentacijai *L. casei* padermę, bioapdorėjimo metu DON kiekis miežių mėginiuose sumažėjo vidutiniškai 47 %, D3G – 82,4 %, 15-ADON – 46,1 %, o 3-ADON – 55 %.

L. casei gerai dauginosi fermentacijos metu skirtingos taršos miežiuose ir gamino organines rūgštis.

2. Tiriant *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų fermentinius aktyvumus (amilolitinį, ksilanolitinį ir proteolitinį) ir jų ryšį su mikotoksinais užterštuose miežių grūduose (prieš ir po PRB fermentacijos) nustatyta:

Fusarium spp. mikroskopiniai grybai, produkuojantys DON ir tirtus DON konjugatus, pasižymi plačiu fermentinių aktyvumų spektru.

PRB fermentacijos metu buvo fiksuotas amilazių ir ksilanazių aktyvumo mažėjimas, skirtingai proteazių aktyvumas didėjo tiek mažo užterštumo miežių mėginiuose, tiek ir didelio užterštumo. Nustatytas ryšys tarp proteolitinio aktyvumo fermentuotuose miežiuose ir DON sumažėjimo leidžia manyti, kad grybų fermentai gali dalyvauti kombinacijoje su PRB (*L. casei*) mikotoksinų detoksikacijoje.

3. Tiriant PRB fermentacijos panaudojimo galimybę alaus gamybos metu susidariusių antrinių produktų – salyklojų valorizacijai, nustatyta:

Salyklojų tyrimai patvirtino jų vertingą sudėtį (19,75 % baltymų, 3,50 % mineralinių medžiagų), kuriuos apdorojant ekstruzijos būdu galima sumažinti mikrobiologinę taršą iki 3,70 log₁₀ KSV/g, išliekant tam pačiam baltymų kiekiui, padidinti tirpių skaidulinių medžiagų ir fenolinių junginių kiekį.

Salyklojai yra gera fermentacijos terpė PRB kultivavimui: juose gerai dauginosi PRB (vidutiniškai 8,87 log₁₀ KSV/g po 48 val.) ir kaupėsi organinės rūgštys (vidutinis pH 3,5). Salyklojuose (be apdorėjimo ekstruzija) vyko intensyviau PRB fermentacijos procesas nei ekstruduotuose salyklojų mėginiuose. Be to, fermentacija vyko intensyviau taikant žemesnį temperatūrinį režimą salyklojų ekstruzijai nei aukštesnes temperatūras.

LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. JANSSEN, E. M.; Liu, C.; VAN DER FELS-KLERX H. J., „Fusarium infection and trichothecenes in barley and its comparison with wheat,“ *World Mycotoxin Journal*, t. 11, nr. 1, pp. 33-46, 2018.
2. SIMSEK, S ir kt., „Occurrence of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in Hard Red Spring Wheat Grown in the USA,“ *Toxins*, t. 5, pp. 2656-2670, 2013.
3. BELICOVA, A; MULAŠOVA, M ir DUŠINSKY, R., „Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese,“ *BioMed Research International*, 2013.
4. BREWERY LIFE, „Valorisation of brewers' yeast and spent grain as second-generation feedstuff for aquaculture feed,“ įtraukta NAXOS2018, 2018.
5. KARLOVIC, A. ir kt., „By-Products in the Malting and Brewing Industries—Re-Usage Possibilities,“ *Fermentation*, t. 6, nr. 82, 08 08 2020.
6. THOMAS, K.; RAHMAN, P., „Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review.,“ 2006. [Tinkle]. Available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Brewery-wastes.-Strategies-for-sustainability.-A-Thomas-Rahman/2416d4c22ad22d2081860ab86dcb1a3fe6d8ba06#paper-header>. [Kreiptasi 01 02 2022].
7. RACHWAL, K. ir kt., „Utilization of brewery wastes in food industry,“ *BIOCHEMISTRY, BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY*, 14 07 2020.
8. NAZARETH, T. D. M. ir kt., „Potential Application of Lactic Acid Bacteria to Reduce Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 Occurrence on Corn Kernels and Corn Ears,“ *Toxins*, 31 12 2019.
9. AGRIOPOULU, S ir kt., „Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods,“ *Foods*, p. 48, 28 01 2020.
10. KHANEGHAH, A. M. ir kt., „Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - A review,“ *Trends in Food Science & Technology*, t. 71, pp. 13-24, 2018.
11. NASROLLAHZADEH, Ahmad ir kt., „Mycotoxin detoxification of food by lactic acid bacteria,“ *International Journal of Food Contamination*, t. 9, nr. 1, 2022.
12. AWUCHI, C. G. ir kt., „Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies—A Revisit,“ *foods*, t. 10, nr. 1279, 03 06 2021.
13. WESTBY, A.; REILLY, A.; BAINBRIDGE, Z., „Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins,“ *Food control*, t. 8, nr. 5-6, pp. 329-339, 1997.
14. TURBIC, A ir kt., „Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria,“ *Food Additives & Contaminants*, t. 19, nr. 2, pp. 144-152, 2002.
15. DALIE, D. K. D.; DESHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F., „Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review,“ *Food control*, t. 21, nr. 4, pp. 370-380, 2010.
16. MUHIALDIN, B; SAARI, N; HUSSIN, A. S. M., „Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply,“ *molecules*, t. 25, nr. 2655, 07 06 2020.
17. MAGNUSSON, J. ir kt., „Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria,“ *FEMS Microbiology Letters*, t. 219, nr. 1, pp. 129-125, 2003.

18. BATISH, V. K. ir kt., „Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria—A Review,“ *Critical Reviews in Biotechnology*, t. 17, nr. 3, pp. 209-225, 2008.
19. CRAY, J. A. ir kt. , „Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms,“ *Current Opinion in Biotechnology*, t. 33, pp. 228-259, 2015.
20. MOSS, M. O.; THRANE, U., „Fusarium taxonomy with relation to trichothecene formation,“ *Toxicology Letters*, t. 153, nr. 1, pp. 23-28, 2004.
21. RUPINDER KAUR, S, „Identification of Lactobacillus spp. by PCR based Molecular Methodology,“ *İtraukta Chemical Analysis of Value Added Dairy Products and Their Quality Assurance*, Karnal – 132 001 (Haryana) INDIA, 2011.
22. STROM, K. ir kt., „Lactobacillus plantarum MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid,“ *Applied and Environmental Microbiology*, t. 68, nr. 9, 2002.
23. KANDLER, O., „Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria,“ *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, t. 49, p. 209–224, 1983.
24. LINGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J., „Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations,“ *FEMS Microbiology Letters*, t. 87, nr. 1-2, pp. 149-163, 1990.
25. VENTURINI, M. E.; BLANCO, D.; ORIA, R., „In Vitro Antifungal Activity of Several Antimicrobial Compounds against *Penicillium expansum*,“ *Journal of Food Protection*, t. 65, nr. 5, pp. 834-839, 2002.
26. PONTS, N ir kt., „Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*,“ *FEMS Microbiology Letters*, t. 258, nr. 1, pp. 102-107, 2006.
27. GAJBHIYE, M. H.; KAPADNIS, B. P., „Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants,“ *Biocontrol Science and Technology*, t. 26, nr. 11, pp. 1451-1470, 2016.
28. CHUNG, T. C. ir kt., „In Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri*,“ *Microbial Ecology in Health and Disease*, t. 2, nr. 2, pp. 137-144, 1988.
29. EL-NEZAMI, H. ir kt., „Binding Rather Than Metabolism May Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and Its Derivative α -Zearalenol,“ *Applied and Environmental Microbiology*, t. 68, nr. 7, 2002.
30. GOURAMA, H; BULLERMAN, L. B., „Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species,“ *Journal of Food Protection*, t. 58, nr. 11, pp. 1249-1256, 1995.
31. KARUNARATNE, A; WEZENBERG, E; BULLERMAN, L, B, „Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* spp,“ *Journal of Food Protection*, t. 53, nr. 3, pp. 230-236, 1990.
32. EL-NEZAMI, H.; KANKAANPÄÄ, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., „Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria To Remove Aflatoxin from Contaminated Media,“ *Journal of Food Protection*, t. 61, nr. 4, pp. 466-468, 1998.
33. HASKARD, C. ir kt., „Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG,“ *Chemico-Biological Interactions*, t. 128, nr. 1, pp. 39-49, 2000.
34. LAHTINEN, S. J. ir kt., „Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG,“ *Food Additives and Contaminants*, t. 21, nr. 2, pp. 158-164, 2007.

35. EL-NEZAMI, H. ir kt., „Chemical Moieties and Interactions Involved in the Binding of Zearalenone to the Surface of *Lactobacillus rhamnosus* Strains GG,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 52, nr. 14, p. 4577–4581, 2004.
36. SOLANGE, M., „Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications,“ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, t. 94, nr. 7, pp. 1264-1275, 2013.
37. EUROPEAN COMMISSION , „Recycling brewer's spent YEAST in innovative industrial applications,“ [Tinkle]. Available: https://webgate.ec.europa.eu/life/publicWebsite/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n_proj_id=6265&docType=pdf. [Kreiptasi 01 02 2022].
38. RACHWAL, K. ir kt., „Utilization of brewery wastes in food industry,“ *PeerJ*, 14 07 2020.
39. YU, D. ir kt., „Recovery of protein hydrolysates from brewer's spent grain using enzyme and ultrasonication,“ *Food Science & Technology*, t. 55, nr. 1, pp. 357-368, 2019.
40. ROJAS-CHAMORRO, J. A. ir kt., „Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment,“ *Renewable Energy*, t. 148, pp. 81-90, 2020.
41. DING, C. ir kt., „Fermentation of Brewers' Spent Grain by Effective Microorganisms to Produce Proteins Feed,“ *Advanced Materials Research*, pp. 1980-1983, 2011.
42. SOCACIA, S. A. ir kt., „Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain,“ *Journal of Cereal Science*, t. 80, pp. 180-187, 2018.
43. RAMIRO, A. ir kt., „Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain: Optimization and Kinetics Modeling,“ *Antioxidants*, t. 7, nr. 45, 2018.
44. ROMMI, K. ir kt., „Impact of thermochemical pre-treatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain,“ *Journal of Cereal Science*, t. 79, pp. 168-173, 2018.
45. MCCARTHY, A, L ir kt. , „Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review,“ *Proceedings of the Nutrition Society*, t. 72, nr. 1, pp. 117-125, 2013.
46. MUSATTO, S. I. ir kt., „Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications,“ *Journal of Cereal Science*, t. 43, nr. 1, pp. 1-14, 2006.
47. ROBERTSON, J. A. ir kt., „Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production,“ *LWT - Food Science and Technology*, t. 43, nr. 6, pp. 890-896, 2010.
48. MANTIKA, UAB „Mantika“, [Tinkle]. Available: http://www.mantika.lt/lt/products/44:feed_extrusion. [Kreiptasi 01 02 2022].
49. SOBUKOLA, O. P.; BABAJIDE, J. M.; OGUNSADE, O., „Effect of brewers spent grain addition and extrusion parameters on some properties of extruded yam starch-based pasta,“ *Journal of Food Processing and Preservation*, t. 37, nr. 5, pp. 734-743, 2012.
50. IVANOVA, K. ir kt., „Extrusion of brewers' spent grains and application in the production of functional food. Characteristics of spent grains and optimization of extrusion,“ *Journal of The Institute of Brewing*, t. 123, nr. 4, pp. 544-552, 2017.
51. HEJNA, A. H. ir kt., „Sustainable upcycling of brewers' spent grain by thermo-mechanical treatment in twin-screw extruder,“ *Journal of Cleaner Production*, t. 285, nr. 20, 2021.
52. STOJCESKA, V. ir kt., „The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology,“ *Journal of Cereal Science*, t. 47, nr. 3, pp. 469-479, 2008.

53. NEYLON, E. ir kt., „Fermentation as a Tool to Revitalise Brewers' Spent Grain and Elevate Techno-Functional Properties and Nutritional Value in High Fibre Bread,“ *Foods*, t. 10, nr. 7, 2021.
54. MENDIS, M; SIMSEK, S., „Arabinoxylans and human health,“ *Food Hydrocolloids*, t. 42, nr. 2, pp. 239-243, 2014.
55. STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T., „Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims,“ *European Food Research and Technology*, t. 241, p. 303–315, 2015.
56. SEVERINI, C ir kt. , „Changes in the Aromatic Profile of Espresso Coffee as a Function of the Grinding Grade and Extraction Time: A Study by the Electronic Nose System,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 63, nr. 8, pp. 2321-2327, 2015.
57. STALIKAS, C , „Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,“ *Journal of Separation Science*, t. 30, nr. 18, pp. 3268-3295, 2007.
58. WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M., „Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain,“ *Bioresource Technology*, t. 78, nr. 3, pp. 293-300, 2001.
59. NIEMI, P ir kt., „Interactions of a Lignin-Rich Fraction from Brewer's Spent Grain with Gut Microbiota in Vitro,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 61, nr. 27, pp. 6754-6762, 2013.
60. OHRA-AHAO, T ir kt., „Structure of Brewer's Spent Grain Lignin and Its Interactions with Gut Microbiota in Vitro,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 64, nr. 4, pp. 812-820, 2016.
61. AURA, A. M. ir kt., „Release of Small Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain and Its Lignin Fractions by Human Intestinal Microbiota in Vitro,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 61, nr. 40, pp. 9744-9753, 2013.
62. VADOPALAS, L. ir kt., „Influence of the Fermented Feed and Vaccination and Their Interaction on Parameters of Large White/Norwegian Landrace Piglets,“ *Animals*, t. 10, nr. 7, p. 1201, 2020.
63. TRASKELYTE-RUPSIENE, K. ir kt., „Challenges of *Lactobacillus* fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat - based products,“ *Food Control*, t. 134, 2022.
64. NGUYEN, Q. D. ir kt., „Purification and Characterisation of Amylolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces Lanuginosus* Strain ATCC,“ *Enzyme and Microbial Technology*, t. 31, nr. 3, p. 345–352, 2002.
65. MILLER, G.; BLUM, R.; GLENNOM, W.; BURTON, A., „Measurement of Methods for Assay of Xylanase Activity.,“ *Analytical Biochemistry*, t. 2, p. 127–132, 1959.
66. SIGMA-ALDRICH, „Enzymatic Assay of Protease Casein as a Substrate. Sigma Quality Control Test Procedure SS CaSE 01.001,“ 1999. [Tinkle]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/LT/en/technical-documents/protocol/protein-biology/elisa/protease-activity-assay>. [Kreiptasi 01 02 2022].
67. BIANCO, A. ir kt., „The microbiome of Sardinian barley and malt,“ *Journal of The Institute of Brewing*, t. 124, nr. 4, pp. 344-351, 2018.
68. BERTUZZI, T. ir kt., „Known and Emerging Mycotoxins in Small- and Large-Scale Brewed Beer,“ *Beverages*, t. 4, nr. 46, 2018.
69. YANG, Y. ir kt., „Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs,“ *Trends in Food Science & Technology*, t. 96, pp. 233-252, 2020.

70. ZACARIASOVA, M. ir kt., „Deoxynivalenol oligoglycosides: new "masked" fusarium toxins occurring in malt, beer, and breadstuff,“ *J Agric Food Chem*, t. 60, pp. 9280-9291, 2012.
71. PIANCENTINI, K. C. ir kt., „Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B 1 and deoxynivalenol in beer quality,“ *Food Chem.*, t. 218, pp. 64-69, 2017.
72. SCHABO, D. C. ir kt., „Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved,“ *Food Research International*, t. 141, pp. 110-114, 2021.
73. RUBERT, J. ir kt., „Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers,“ *Food Control*, t. 30, nr. 1, pp. 122-128, 2013.
74. BRYLA, M. ir kt., „Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples,“ *Food Control*, t. 92, pp. 319-324, 2018.
75. MALACHOVA, A. ir kt. , „Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt,“ *Journal of the science of food and agriculture*, t. 90, nr. 14, pp. 495-505, 2010.
76. MASTANJEVIC, K. ir kt., „Fusarium culmorum mycotoxin transfer from wheat to malting and brewing products and by-products,“ *World Mycotoxin Journal*, t. 12, nr. 1, pp. 55-66, 2019.
77. PIETRI, A; BERTUZZI, T; AGOSTI, B ir kt., „Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process,“ *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, t. 27, nr. 1, pp. 1431-1439, 2010.
78. MASTANEVIC, K. ir kt., „From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters,“ *Food Chem.*, t. 254, pp. 115-121, 2018.
79. EUROPEAN COMMISSION, „Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed,“ *EFSA journal*, t. 12, nr. 12, 2014.
80. GRATZ, S. W., „Do Plant-Bound Masked Mycotoxins Contribute to Toxicity?,“ *Toxins*, t. 9, nr. 85, 2017.
81. GARDINER, S. A. ir kt., „Transcriptome Analysis of the Barley–Deoxynivalenol Interaction: Evidence for a Role of Glutathione in Deoxynivalenol Detoxification,“ *Molecular Plant-Microbe Interactions*, t. 23, nr. 7, p. 962–976, 2010.
82. MENG-REITERER, J. ir kt., „Tracing the metabolism of HT-2 toxin and T-2 toxin in barley by isotope-assisted untargeted screening and quantitative LC-HRMS analysis,“ *Anal Bioanal Chem.*, t. 407, p. 8019–8033, 2015.
83. JIN, Z ir kt. , „Production of deoxynivalenol (DON) and DON-3-glucoside during the malting of Fusarium infected hard red spring wheat,“ *Food Control*, t. 85, pp. 6-10, 2018.
84. GUO, H. ir kt., „Deoxynivalenol: Masked forms, fate during food processing, and potential biological remedies,“ *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, t. 19, nr. 2, pp. 895-926, 2020.
85. BERTHILLER, F. ir kt., „Determination of DON-3-Glucoside in artificially and naturally contaminated wheat with LC-MS/MS,“ *Mycotoxin Research*, t. 21, p. 205–208, 2005.
86. BERTHILLER, F. ir kt., „Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography- tandem mass spectrometry,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 53, nr. 9, pp. 3421-3425, 2005.

87. LEMMENS, M. ir kt., „Masked mycotoxins: Does breeding enhance Fusarium head blight resistance result in more deoxynivalenol-3-glucoside in new wheat varieties?“, *World Mycotoxin Journal*, t. 9, nr. 5, pp. 741-754, 2016.
88. PINTON, P. ir kt., „Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: Differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogenactivated protein kinases“, *Toxicological Sciences*, t. 130, nr. 1, pp. 180-190, 2012.
89. EFSA , „Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed“, *EFSA Journal*, t. 12, nr. 12, p. 3916, 2014.
90. COMMUNITIES THE COMMISSION OF THE EUROPEAN, „EUR-Lex“, 19 12 2006. [Tinkle]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1881>. [Kreiptasi 01 04 2022].
91. JECFA, „Evaluation of Certain Contaminants in Food: Seventy-Second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“, *WHO Technical Report Series 959*, Geneva, Switzerland, 2011.
92. EFSA, „Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed“, *EFSA Journal*, t. 15, nr. 4718, 2017b.
93. EFSA, „Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed“, *EFSA Journal*, t. 9, nr. 2481, 2011.
94. EFSA, „Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure“, *EFSA Journal*, t. 11(10), nr. 3379, 2013.
95. CREWS, C.; MACDONALD S.J., „Natural Occurrence of Masked Mycotoxins“, įtraukta *Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological Relevance*, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 14-31.
96. BERTHILLER, F. ir kt., „Occurrence of deoxynivalenol and its 3--D-glucoside in wheat and maize“, *Food Addit. Contam. A*, t. 26, p. 507–511, 2013.
97. DE BOEVRE, M. ir kt., „Human exposure to mycotoxins and their masked forms through cereal-based foods in Belgium“, *Toxicol. Lett.*, t. 218, pp. 281-292, 2013.
98. SLIZEWSKA, K; CHLEBICZ-WOJCIK, A. ir kt., „Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium“, *Biology*, t. 9, nr. 423, 2020.
99. Rizzello, C. G; Cassone, A ir kt., „Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making“, *Food Chemistry*, t. 127, nr. 3, pp. 952-959, 2011.
100. KOONING, H; UNDEN, G; FROLICH, J., *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Mainz, Germany: Springer International Publishing AG, 2017.
101. DE MUYNCK, C ir kt., „Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites“, *Microbiological Research*, t. 159, nr. 4, pp. 339-346, 2004.
102. CLARKE, C. I.; SCHOBER, T; ARENDT, E. K., „Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality“, *Cereal Chemistry*, t. 79, nr. 5, pp. 640-647, 2002.
103. JUODEIKIENE, G. ir kt., „Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for Fusarium mycotoxin reduction in malting wheat grains“, *LWT*, t. 89, pp. 307-314, 2018.

104. NIDERKORN, V; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. , „Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro,“ *Journal of Applied Microbiology*, t. 101, nr. 4, pp. 849-856, 2006.
105. EL-NEZAMI, H. ir kt., „Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium,“ *Food Additives & Contaminants*, t. 19, nr. 7, pp. 680-686, 2002.
106. ZADEIKE, D. ir kt. , „The expedient application of microbial fermentation after whole-wheat milling and fractionation to mitigate mycotoxins in wheat-based products,“ *LWT*, t. 137, 2021.
107. Li, P. ir kt., „Detoxification of mycotoxins through biotransformation,“ *Toxins*, t. 12, nr. 2, p. 121, 2020.
108. GEIBINGER, C; GASTI, M; BECKER, T, „Enzymes from Cereal and Fusarium Metabolism Involved in the Malting Process – A Review,“ *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, t. 80, nr. 1, pp. 1-16, 2022.
109. PANWAR, V ir kt., „Effect of temperature and pH on the growth of Fusarium spp. causing Fusarium head blight (FHB) in wheat,“ *South Asian Journal of Experimental Biology*, t. 6, nr. 5, pp. 186-193, 2016.
110. BARTKIENE, E. ir kt., „Combination of Extrusion and Fermentation with Lactobacillus plantarum and L. uvarum Strains for Improving the Safety Characteristics of Wheat Bran,“ *Toxins*, t. 16, nr. 163, pp. 1-21, 2021.
111. KOSTELANSKA, M. ir kt., „The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method,“ *Food Chemistry*, t. 126, pp. 1870-1876, 2011.
112. BOLGER, M. ir kt., „Fumonisin: Safety evaluation of certain mycotoxins in food,“ įtraukta In 56th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Geneva, Switzerland, 2001.
113. WHO, „who.int,“ 14 01 2015. [Tinkle]. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-FWC-WSH-15.02>. [Kreiptasi 01 02 2022].
114. ARRIBAS, C, „The impact of extrusion on the nutritional composition, dietary fiber and in vitro digestibility of gluten-free snacks based on rice, pea and carob flour blends,“ *Food & Function*, t. 8, pp. 3654-3663, 2017.
115. AINSWORTH, P ir kt., *Journal of Food Engineering*, t. 81, nr. 4, pp. 702-709, 2007.
116. KUCHIN, N.; SIZOVA, Y.; KULESHOVA, L., „The effect of extrusion on the nutrient content of barley as a feed material,“ įtraukta IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Atlanta, GA, US, 2022.
117. KIRJORANTA, S., TENKANEN, M., ir JOUPPILA, K, „Effects of process parameters on the properties of barley containing snacks enriched with brewer's spent grain,“ *Journal of food science and technology*, t. 53, nr. 1, p. 775–783, 2016.
118. TOBIAS-ESPIRONZA, J. L. ir kt., „Effects of the Addition of Flaxseed and Amaranth on the Physicochemical and Functional Properties of Instant-Extruded Products,“ *Foods*, t. 8, nr. 6, 2019.
119. ROBIN, F; SCHUMAN, H. P.; PALZER, S., „Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities,“ *Trends in Food Science & Technology*, t. 28, nr. 1, pp. 23-32, 2012.
120. EFSA, „Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin,“ *EFSA Journal*, t. 15, nr. 4972, 2017a.

121. BRYLA, M ir kt., „Natural Occurrence of Nivalenol, Deoxynivalenol, and Deoxynivalenol-3-Glucoside in Polish Winter Wheat,“ *Toxins*, t. 10, nr. 81, 2018.
122. JOSEPH, B.; KUMAR, V.; RAMTEKE, P. W., „Chapter 47 - Psychrophilic Enzymes: Potential Biocatalysts for Food Processing,“ *İtraukta Enzymes in Food Biotechnology*, Academic Press, 2019, pp. 817-825.
123. TIM, B, „mygermantable.com,“ 09 05 2021. [Tinkle]. Available: <https://www.mygermantable.com/what-does-alpha-amylase-do-in-bread-making/>. [Kreiptasi 01 03 2022].
124. GUPTA, S ir kt., „Optimization of fermentation conditions for the utilization of brewing waste to develop a nutraceutical rich liquid product,“ *Industrial Crops and Products*, t. 44, pp. 272-282, 2013.
125. SIMSEK, S ir kt., „Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in hard red spring wheat grown in the USA,“ *Toxins*, t. 5, nr. 12, pp. 2656-2670, 2013.
126. ROGERS, K. , „Britannica,“ The Editors of Encyclopaedia Britannica, [Tinkle]. Available: <https://www.britannica.com/science/amylase>. [Kreiptasi 01 02 2022].
127. GUPTA, R. ir kt. , „Microbial α -amylases: a biotechnological perspective,“ *Process Biochemistry*, t. 38, nr. 11, pp. 1599-1616, 2003.
128. ŞİMSEK, O.; CON, A. H.; TULUMOĞLU, S. , „Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes,“ *Food Control*, t. 17, nr. 4, pp. 263-270, 2006.
129. ZACHARIASOVA, M. ir kt., „Deoxynivalenol Oligoglycosides: New “Masked” Fusarium Toxins Occurring in Malt, Beer, and Breadstuff,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 60, nr. 36, pp. 9280-9291, 2012.
130. BUTT, M. S. ir kt., „Xylanases and Their Applications in Baking Industry,“ *Food Technology and Biotechnology*, t. 46, nr. 1, pp. 22-31, 2008.
131. DE BOEVRE, M. ir kt., „Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food,“ *Food Additives & Contaminants: Part A*, t. 29, nr. 5, pp. 819-835, 2012.
132. KUZDRALINSKI, A; SOLARSKA, E; MUSZYNSKA, M., „Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method,“ *Food Control*, t. 29, pp. 22-24, 2013.
133. KUSHIRO, M., „Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat,“ *International Journal of Molecular Sciences*, t. 9, pp. 2127-2145, 2008.
134. PIACENTINI, K. C. ir kt., „Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality,“ *Food Chemistry*, t. 218, pp. 64-69, 2017.
135. STORM, K. ir kt., „Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe–L-Pro) and cyclo(L-Phe–trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid,“ *Applied and Environmental Microbiology*, t. 68, nr. 9, pp. 4322-4327, 2002.
136. LANCOVA, K. ir kt., „Transfer of Fusarium mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer,“ *Food Additives & Contaminants: Part A*, t. 25, pp. 732-744, 2008.
137. CHEN, Y. ir kt., „Influence of Amylase Addition on Bread Quality and Bread Staling,“ *ACS Food Science & Technology*, t. 1, nr. 6, pp. 1143-1150, 2021.

138. GOASAERT, H. ir kt., Trends in Food Science & Technology, t. 16, nr. 1-3, pp. 12-30, 2005.
139. JUODEIKIENE, G. ir kt., „Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes: Chapter 8,“ Structure and Function of Food Engineering/Edited by: Ayman Amer Eissa. Rijeka: InTech, pp. 171-204, 2012.
140. BERTHILLER, F. ir kt., „Masked mycotoxins: A review,“ Molecular Nutrition & Food Research, t. 51, nr. 1, pp. 165-186, 2013.
141. VARGA, E. ir kt., „Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples,“ Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, t. 30, nr. 1, pp. 137-146, 2013.
142. DESMAZEAUD, J. C.; PIARD, M., „Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products,“ Lait, t. 71, nr. 5, pp. 525-541, 1991.
143. CORSETTI, A.; SETTANNI, L.; VALMORRI, S. ir kt., „Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory scale fermentations,“ Food Microbiology, t. 24, nr. 6, pp. 592-600, 2007.
144. BRYLA, M. ir kt., „Occurrence of 26 mycotoxins in the grain of cereals cultivated in Poland,“ Toxins, t. 8, nr. 160, 2016.
145. BUEHLER, E., „<https://blogs.scientificamerican.com/>,“ 28 07 2012. [Tinkle]. Available: <https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/enzymes-the-little-molecules-that-bake-bread/>. [Kreiptasi 01 03 2022].