



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Ieva Šaudytė**

**PRB BIOPREPARATŲ NAUDOJANT ĮVAIRIAS  
FERMENTACIJOS TERPES IR BIOFLAVONOIDŲ PRIEDUS  
PANAUDOJIMAS MIEŽIŲ IR KVIEČIŲ GRŪDŲ  
SVEIKATINGUMO GERINIMUI**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

**KAUNAS, 2016**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**PRB BIOPREPARATŲ NAUDOJANT ĮVAIRIAS  
FERMENTACIJOS TERPES IR BIOFLAVONOIDŲ PRIEDUS  
PANAUDOJIMAS MIEŽIŲ IR KVIEČIŲ GRŪDŲ  
SVEIKATINGUMO GERINIMUI**

Baigiamasis magistro projektas  
Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

**Vadovas**

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

**Recenzentas**

Lekt. dr. Dalia Čižeikienė

**Projektą atliko**

Ieva Šaudytė

**KAUNAS 2016**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

Cheminės technologijos

(Fakultetas)

Ieva Šaudytė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Baigiamojo projekto pavadinimas“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20 16 m. Birželio 6 d.  
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Ievos Šaudytės**, baigiamasis projektas tema „PRB biopreparatų naudojant įvairias fermentacijos terpes ir bioflavonoidų priedus panaudojimas miežių ir kviečių grūdų sveikatingumo gerinimui“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

\_\_\_\_\_  
(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

\_\_\_\_\_  
(parašas)

# TURINYS

ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Grūdų mikrobiologinė tarša.....	12
1.1.1. Mikrobiologinė tarša salyklo gamybos metu.....	14
1.2. Mikrobiologinės taršos grūduose mažinimo būdai.....	14
1.2.1. Tradicinėje žemdirbystėje.....	16
1.2.2. Ekologinėje žemdirbystėje.....	17
1.2.2.1. Naudojami mikroorganizmai.....	18
1.2.2.2. Augalinės kilmės preparatai.....	19
2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI.....	20
2.1. Tyrimo objektai.....	20
2.1.1. Miežių ir kviečių grūdai.....	20
2.1.2. Pieno rūgšties bakterijos.....	20
2.1.3. Fermentiniai preparatai.....	20
2.1.4. Fermentacijos terpės.....	20
2.1.5. Bioflavonoidų preparatai.....	21
2.1.6. Indikatoriniai mikroorganizmai.....	21
2.2. Tyrimo metodai.....	22
2.2.1. $\beta$ -gliukano kiekio nustatymas miežiuose.....	22
2.2.2. Permiato fermentacija.....	23
2.2.3. Pieno rūgšties izomerų analizė.....	23
2.2.5. Pieno rūgšties bakterijų kiekio įvertinimas.....	24
2.2.6. Pieno rūgšties bakterijų dauginimosi kinetika.....	24
2.2.7. Antimikrobinio poveikio prieš mikroskopinius grybus ir bakterijas įvertinimas.....	25
2.2.8. Grūdų mikrobiologinės taršos įvertinimas.....	26
2.2.9. Daigumo įvertinimas.....	26
2.2.10. Baltymų ekstrakcija ir 1D-SDS- PAGE elektroforezė.....	27
2.2.11. Matematinė statistinė duomenų analizė.....	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	28
3.1. $\beta$ -gliukano Lietuvoje auginamuose salykliniuose miežiuose įvertinimas.....	28
3.2. Fermentacijos terpių įtaka pieno rūgšties bakterijų dauginimosi kinetikai.....	29
3.2.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas.....	29
3.2.2. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai.....	30

3.3. Bioproduktų antimikrobinis poveikis ir jo ryšys su fermentacijos metabolizmo produktais .....	36
3.3.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas .....	36
3.3.2. Pieno rūgšties ir jos izomerų antimikrobinis aktyvumas .....	37
3.3.3. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai .....	38
3.4. Salyklinių grūdų apdorojimo bioproduktais įtaka grūdų daigumui .....	41
3.4.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas .....	41
3.4.2. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai .....	45
3.5. Grūdų apdorojimo PRB fermentuotu permiatu poveikis grūdų baltymų pokyčiams.....	49
3.6. Bioflavonoidų panaudojimo galimybės salyklinių grūdų taršos mažinimui .....	51
3.7. Grūdų apdorojimo bioflavonoidų preparatais antimikrobinis poveikis .....	52
3.8. Apdorojimo bioflavonoidų preparatais įtaka grūdų daigumui .....	54
IŠVADOS.....	57
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	58

Saudyte, Ieva. LAB Biopreparation by Using Different Fermentation Medium and Bioflavonoid Additives for the Improvement of Barley and Wheat Seeds Healthiness: *Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor prof. habil. dr. Grazina Juodeikiene. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *biopreparations, lactic acid bacteria, antimicrobial activity, malt production, permeate, arabinogalactan, bioflavonoids.*

Kaunas, 2016. 64 p.

## SUMMARY

As the popularity of organic farming increases, so does the demand to develop a pest repellent protection for plants that would be harmless to the environment and would not produce toxic waste in the final product. Lately, there has been an increased interest in microorganisms, particularly in lactic acid bacteria (acquired GRAS status), distinguished by their antimicrobial activity and their possible use in the development of various bio products, which in turn could be used in organic farming and malt production.

Rigorous investigations have taken place, in which the reproductive singularity of antimicrobial lactic acid bacteria, provided by KTU Department of Food Technology (*Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9), in different media (using arabinogalactan and permeate) and produced bioproducts antimicrobial effect along with influence on microbiological contamination reduction, that is induced by microscopic fungi, and their effect on malting barley and wheat germination was evaluated. During the second part of the investigation, the evaluation of bioflavonoid complex solutions antimicrobial effect and influence on barley germination has taken place.

Results showed that fermentation medium composition with higher amounts of arabinogalactan (without enzymatic treatment) had influence for intensity of lactic acid bacteria fermentation processes. Also this bioproduct decreased (at an average of 36 %) microbiological contamination of malting barley: (i) was found fungicidal effect against *F. poae*, *P. chrysogenum*, ir *P. expansum* fungi and (ii) fungistatic effect against *Asp. versicolor*, *Penic. cyclopium* ir *Asp. tereus* fungi growing. Bioproducts that were made using arabinogalactan, increased (at an average of 25 %) sprouts length, but had no positive influence on germination of malting grain.

Permeate was suitable medium for lactic acid bacteria cultivation but was less effective than arabinogalactan.

Permeate bioproducts, fermented with *Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 at average of 32 % increased resistance of malting barley grain against fungi and at average of 24 % reduced microbiological contamination of wheat.

*Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9 fermented permeate increased contaminated malting barley and healthy wheat germination at average of 12 % and 6 %. The best positive influence (at average of 16 %) on *Fusarium spp.* contaminated wheat germination, had permeate fermented with *Pediococcus acidilactici* KTU-7.

Bioflavonoids decreased malting barley microbiological contamination: 10 % solutions had fungistatic effect against *Asp. versicolor* and *Asp. tereus* fungi and concentrated solutions also had fungistatic effect against these fungi. Malting grain, which were treated with solutions of bioflavonoids, germination depended from composition of bioflavonoids and from concentration of active substance in them.

Šaudytė, Ieva. PRB biopreparatų naudojant įvairias fermentacijos terpes ir bioflavonoidų priedus panaudojimas miežių ir kviečių grūdų sveikatingumo gerinimui. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: biopreparatai, *pieno rūgšties bakterijos*, *antimikrobinis aktyvumas*, *salyklo gamyba*, *permiatas*, *arabinogalaktanas*, *bioflavonoidai*.

Kaunas, 2016. 64 p.

## SANTRAUKA

Didėjant ekologinės žemdirbystės populiarumui atsiranda poreikis kurti augalų apsaugos nuo kenkėjų priemones, kurios būtų draugiškos aplinkai ir vartotojas gautų saugius produktus. Pastaruoju metu didėja susidomėjimas bioproduktais ir mikroorganizmais, ypač pienu rūgšties bakterijomis (patvirtintomis GRAS), pasižyminčiomis antibakteriniu poveikiu ir jų platesnėmis panaudojimo galimybėmis ekologiniuose ūkiuose, o taip pat salyklo gamybai.

Atlikti kompleksiniai tyrimai, kurių metu įvertintas antimikrobinis pienu rūgšties bakterijų, esančių KTU Maisto mokslų ir technologijos katedroje (*Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9) dauginimosi įvairiose terpėse (naudojant arabinogalaktaną ir permiato) kinetikos savitumas ir gautų bioproduktų antimikrobinis poveikis, siekiant sumažinti mikrobiologinę taršą, o taip pat užtikrinti vystomų biopreparatų teigiamą poveikį salyklinių miežių ir kviečių grūdų daigumui. Antrame darbo etape vertintas bioflavonoidų kompleksinių preparatų antimikrobinis poveikis ir įtaka salyklinių miežių daigumui.

Nustatyta, kad pienu rūgšties bakterijų fermentacijos procesams teigiamos įtakos turėjo fermentacijos terpės sudėtis, naudojant jos ruošimui didesnius arabinogalaktano kiekius (be papildomo fermentinio apdoravimo). Be to, šis preparatas sumažino (vidutiniškai 36 %) mikrobiologinę salyklinių miežių taršą: (i) nustatytas fungicidinis poveikis prieš *F. poae*, *P. chrysogenum*, ir *P. expansum* genčių mikroskopinius grybus ir (ii) fungistatinis poveikis, slopinantis *Asp. versicolor*, *Penic. cyclopium* ir *Asp. tereus* mikroskopinių grybų augimą. Bioproduktai, pagaminti naudojant arabinogalaktaną, statistiškai reikšmingai padidino (vidutiniškai 25 %) daigelių aukštį, tačiau neturėjo teigiamo poveikio salyklinių grūdų daigumui.

Permiatas (išrūgų filtratas) buvo tinkama terpė tirtų PRB dauginimuisi, tačiau mažiau efektyvi nei naudojant fermentacijos terpės ruošimui arabinogalaktano priedus. *Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 fermentuoto permiato bioproduktai padidino (vidutiniškai 32 %) salyklinių miežių grūdų atsparumą prieš mikroskopinius grybus bei sumažino (24 %) kviečių grūdų mikrobiologinę taršą. PRB padermėmis (*Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9)



fermentuoto premiato bioproduktai, apdorojant jais salyklinių kviečių ir miežių grūdus, pagerino užkrėstų salyklinių miežių ir sveikų kviečių daigumą (atitinkamai, 12 % ir 6 %). *Fusarium spp.* užkrėstų kviečių daigumą (vidutiniškai 16 %) daugiausiai pagerino *Pediococcus acidilactici* KTU-7 fermentuotas permiatas.

Bioflavonoidų preparatai sumažino salyklinių miežių mikrobiologinę taršą: 10 % šių bioflavonoidų preparatų tirpalai pasižymėjo fungistatiniu poveikiu prieš *Asp. versicolor* ir *Asp. tereus* mikroskopinius grybus; koncentruoti bioflavonoidų preparatai taip pat pasižymėjo fungistatiniu poveikiu, slopinant mikroskopinių grybų augimą. Salyklinių grūdų, apdorotų bioflavonoidų preparatais, daigumas priklausė nuo bioflavonoidų sudėties ir nuo biologiškai veiklios medžiagos juose koncentracijos.

## **SANTRUMPOS**

KTU – 7 - *Pediococcus acidilactici*

KTU – 8 - *Pediococcus pentosaceus*

KTU – 9 - *Pediococcus pentosaceus*

PRB – pieno rūgšties bakterijos

PR – pieno rūgštis

## IVADAS

Visame pasaulyje grūdinių javų produktai užima svarbią vietą žmogaus mitybos racione ir pašarų gamyboje ir jie turi atitikti griežtus kokybės ir saugos reikalavimus. Grūdų mikrobiologinės taršos kontrolė yra vienas svarbiausių etapų žemės ūkyje, nes mikroskopinių grybų sukeltos mikotoksikozės daugiausiai priklauso nuo klimato sąlygų, kurių kontroliuoti praktiškai neįmanoma. Dėl šios priežasties grūdinės žaliavos tarša įvairiais mikromicetais ir jų produkuojamais antriniais metabolizmo produktais – mikotoksinais yra svarbus iššūkis žemės ūkiui ir maisto pramonei, todėl šios taršos sumažinimui turi būti skiriama ypatingai daug dėmesio.

Tradicinėje žemdirbystėje grūdų saugos užtikrinimui naudojamas agrocheminės apsaugos priemonės. Tuo tarpu ekologiškai auginamiems produktams taikomi griežti saugos reikalavimai. Jie turi būti išauginti augalų apsaugai nenaudojant cheminių medžiagų. Todėl didėja biologiškai aktyvių ir veiksmingų apsaugos priemonių poreikis, kurios būtų nekenksmingos aplinkai ir nepaliktų toksinių medžiagų iš ekologiškai užaugintų augalų gaminamuose maisto produktuose. Svarbu kurti veiksmingas natūralias priemones, kurios gerintų augalų atsparumą augimo metu ir būtų efektyvios po derliaus nuėmimo, laikant grūdus saugyklose.

Maisto pramonėje grūdų mikrobiologinės taršos mažinimas aktualus tiek grūdų perdirbimo procese, tiek ir salyklo gamyboje. Užkrėsti salykliniai grūdai gali turėti neigiamos įtakos grūdų daigumui, mikotoksinais gali pereiti į galutinius fermentacijos produktus ir taip sumažinti jų saugą bei kokybę. Mikrobiologinės taršos kontrolė salyklinių grūdų perdirbimo grandinėje siejama su kompleksinių technologinių sprendimų taikymu, taikant griežtą mikotoksinų kontrolę grūdinėje žaliavoje bei kuriant, vadovaujantis šiuolaikiniais biotechnologiniais sprendimais, salyklinių grūdų apdorojimui (detoksikacijai) natūralias bio-priemones.

Pastaruoju metu didelio susidomėjimo sulaukė grūdinės žaliavos detoksikacijai biotechnologiniai preparatai, pagaminti naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius mikroorganizmus. Respublikoje antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys mikroorganizmai buvo išskirti iš ruginių raugų ir sulaukė sėkmingo pritaikymo duonos pramonėje (FERMFOOD projektas). Be to, detoksikuojantis efektas prieš *Fusarium spp.* patvirtintas, apdorojant ekologines grūdų sėklas bioproduktais, ruoštais su bakteriocinus gaminančiomis pieno rūgšties bakterijomis (BIOEKOTECH projektas). Manoma, kad antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių naujų bioproduktų gamybos vystymas būtų perspektyvus salyklo gamybos efektyvumo didinimui, pritaikant naujas terpes ir biologiškai aktyvių medžiagų preparatus. Vystant juos, labai svarbu įvertinti mikroorganizmų dauginimosi naujose terpėse ypatumus, antimikrobinį preparatų poveikį, biocheminius salyklinių grūdų baltymų pokyčius ir daigumą.

Tai leistų geriau suprasti salyklinių grūdų gamyboje vykstančius biocheminius procesus bei užtikrinti fermentuotų produktų saugą.

*Darbo tikslas:* ištirti įvairių PRB biopreparatų, kurių ruošimui buvo naudojamos įvairios fermentacijos terpės (arabinogalaktano priedai ir permiatas), bei bioflavonoidų preparatų poveikį miežių ir kviečių sveikatingumo gerinimui.

Spręstini uždaviniai:

1. Ištirti skirtingų fermentacijos terpių (permiato ir naudojant arabinogalaktano priedus) įtaką PRB dauginimosi kinetikai.
2. Įvertinti pieno rūgšties bakterijų bioproduktų, ruošų naudojant arabinogalaktaną, įtaka antimikrobiniam aktyvumui prieš augalų patogenus.
3. Įvertinti apdorojimo bioproduktais įtaką salyklinių grūdų mikrobiologinės taršos mažinimui.
4. Nustatyti apdorojimo bioproduktais įtaką salyklinių grūdų daigumui.
5. Ištirti grūdų apdorojimo pieno rūgšties bakterijomis fermentuoto permiato įtaką daigintuose grūduose baltymų pokyčiams.
6. Įvertinti bioflavonoidinių preparatų antimikrobinį poveikį bei jų panaudojimo galimybes salyklinių grūdų taršos mažinimui.
7. Įvertinti bioflavonoidinių preparatų poveikį salyklinių miežių ir kviečių grūdų daigumui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Grūdų mikrobiologinė tarša

Mikrobiologinė grūdų tarša yra vienas svarbiausių aspektų žemės ūkyje, kuris turi būti kontroliuojamas tiek prieš derliaus nuėmimą, tiek jo sandėliavimo metu.

Labiausiai aplinkoje paplitę grūdus užteršiantys mikroorganizmai yra mikromicetai, kurie sukelia daugiausiai mikrobiologinių problemų grūduose. Iš jų pagaminti produktai dėl sumažėjusios produktų maistinės vertės ir dėl dažnai jų gaminamų toksinių junginių tampa netinkamais žmonių vartojimui [1, 2, 3, 4].

Kai kurie pelėsiniai grybai, kuriais grūdai gali būti užkrėsti laukuose dar prieš derliaus nuėmimą, yra vadinami “lauko pelėsiais” [5] ir gali gaminti mikotoksinius, tiek prieš pat derliaus nuėmimą, tiek ir sandėliavimo metu. [6]

Labiausiai paplitę lauko mikromicetai: *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* ir *Penicillium*, tačiau *Alternaria* ir *Fusarium spp.* sumažėjus vandens aktyvumui ( $a_w$ ), kai grūdai gerai išdžiovinami ir tinkamai laikomi, mikotoksinų negamina [6].

Lauko mikromicetai, kurie išlieka grūdų džiovavimo metu ar pakartotinai užkrečia grūdus po džiovavimo, priklausomai nuo laikymo sąlygų grūdų saugyklose, jie lėtai žūva arba išlieka gyvybingi ilgą laiką. Visa tai apsprendžia tiek laikymo sąlygos tiek ir žaliavos paruošimas laikymui [5].

Dažniausiai mikrobiologinės taršos priežastimi grūduose tampa *Fusarium spp.* genties pelėsiniai grybai. Išskiriamos dvi *Fusarium spp.* rūšys, kurios turi didžiausią potencialą mūsų klimatinėse sąlygose didinti grūdų užterštumą mikotoksinais, tai *Fusarium graminearum* ir *Fusarium verticillioides*. Svarbiausias šių *Fusarium spp.* rūšių gaminamas mikotoksinas yra trichotecenas deoksinivalenolis, dar žinomas kaip DON ar vomitoksinas [6].

Rožiniai ar juodi kviečių grūdų galiukai rodo, atitinkamai, *Fusarium* ar *Alternaria* sukeltą infekciją. Tokių grūdų maistingumas yra sumažėjęs, tačiau jie dar gali būti panaudojami (pvz, pašarų gamyboje), jei tik nėra viršijami mikotoksinų užterštumo lygiai. Stipriai užteršti grūdai gali turėti pašalinį kvapą, nebūdingą sveikiems grūdams, grūdai gali būti praradę jiems būdingą spalvą arba patamsėję, gali pasireikšti baltymų kiekio sumažėjimas, riebalų rūgščių bei kitų sudėtinių dalių pokyčiai [6, 5, 7]. Taip pat tokie grūdai pasižymi žemu daigumu ir blogomis salyklo gamybos savybėmis todėl gali būti nepriimtini aludariams [5].

Pelėsiniai grybai, galintys daugintis esant žemesniam vandens aktyvumui greitai užkrečia grūdus po derliaus nuėmimo. Šios taršos šaltiniais gali būti transportas, kuriuo pervežami grūdai, transporteriai, maišai ir pagrinde grūdų laikymo talpyklos. Dulkės, kurios susidaro

kiekvieną kartą tvarkant grūdus yra pagrindinis grybų sporų plitimo grūdų saugyklose šaltinis [5].

Mikrobiologinis grūdų gedimas sandėliavimo metu yra gerai žinomas ir dėl jo prarandama iki 30 % derliaus [1, 8].

Mikromicetų augimas grūduose gali sukelti žalingus pokyčius dėl jų gaminamų toksiškų metabolitų – mikotoksinų [6]. Užterštumas šiais junginiais yra vienas svarbiausių iššūkių maisto saugai [9].

Daugiau nei 25 % grūdinių javų pasaulyje yra užkrėsti žinomais mikotoksinais ir daugiau nei 400 grybų metabolitų yra toksiški žmogui ir gyvuliams, iš kurių svarbiausi keliantys grėsmę žmonių ir gyvūnų sveikatai yra aflatoksinai, ochratoksinas A (OTA), fumonizinais, zearalenonas (ZEA), deoksinivalenolis (DON) ir patulinas [1, 9].

Mikotoksinų gamyba priklauso nuo daugelio faktorių, įskaitant pelėsinų grybų rūšį, jų augimo trukmę, substrato sudėtį, aeraciją, santykinę drėgnį, temperatūrą ir sandėliavimo sąlygas. Karštos ir drėgnos sąlygos yra vieni svarbiausių faktorių, kurie turi įtakos grybų dauginimuisi ir mikotoksinų gamybai [9, 10].

Pelėsinų grybų vystymasis grūdų laikymo metu gali būti kontroliuojamas arba jam gali būti užkertamas kelias užtikrinant, kad grūdai yra pakankamai gerai išdžiovinti dar prieš sandėliavimą. Tolimesnė apsauga gali būti užtikrinama kontroliuojant temperatūros ir drėgmės parametrus grūdų saugyklose, vėsinant ar vėdinant grūdus [6].

Taip pat javų grūdai iš karto po derliaus nuėmimo gali būti užkrėsti bakterijomis, kurios į grūdinę žaliavą gali patekti iš dulkių, vandens, pažeistų augalų, vabzdžių, dirvos, trąšų ir gyvūnų išmatų [7,11].

Tinkamai ūkyje tvarkomi grūdai yra sausi, tokiu būdu nesudaromos sąlygos bakterijų augimui ant grūdų. Vienok, juose gali būti randama daugumos patogenų gyvybingų ląstelių, jeigu grūdus užteršė gyvūnai ar žmonės. Vabzdžiai, graužikai, paukščiai ar žmogus gali užteršti grūdus *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* ar *Klebsiella* [12]. Taip pat dažnai aptinkamos *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* ir *Alcaligenes* bakterijos [5, 13]. Iš jų daugiausiai susirūpinimo kelia *Salmonella*. Jų šaltiniais gali būti kontaktas su gyvūnais laukuose, sunkvežimiuose ir automobiliuose, kuriuose prieš tai buvo gabenami gyvūnai, mėsa, žuvis, paukštiena ar jos produktai, taip pat tarša gali būti pernešama nuo vabzdžių, pelių, žiurkių ir paukščių malūnuose ir nuo sergančių darbuotojų. Sumažėjus vandens aktyvumui grūduose, mikroorganizmai gali išlikti neaktyvūs, bet gyvybingi beveik neribotą laiką, tačiau jų skaičius tokiomis sąlygomis su laiku mažėja. Jei grūdai vėliau patenka į drėgną aplinką, įskaitant maisto produktus, gali prasidėti *Salmonella* augimas. Užkrėstumas šiais mikroorganizmais dažniausiai yra labai mažas [5, 6].

### 1.1.1. Mikrobiologinė tarša salyklo gamybos metu

Maisto pramonėje ypatingai daug dėmesio skiriama mikromicetų sukeltoms salyklinių grūdų, naudojamų salyklo gamyboje, mikrobiologinės taršos mažinimui, kuri gali sąlygoti blogą galutinio produkto kokybę ir saugą. Šio proceso metu susidaro palankios sąlygos mikroorganizmų dauginimuisi ir mikotoksinų gamybai. *Fusarium* spp. – pagrindiniai mikroskopiniai grybai aptinkami salyklo fermentacijos metu, kurie į salyklą patenka iš aplinkos kartu su užkrėsta grūdine žaliava. Dėl žemos temperatūros ir didelio vandens aktyvumo salyklo mirkymo ir daiginimo procesų metu, sudaromos palankios sąlygos šių mikromicetų dauginimuisi. [14]

*Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai bei jų produkuojami mikotoksinai turi įtakos grūdinės masės sumažėjimu [15], sumažėjusiam  $\alpha$ -amilazės aktyvumui [16] bei neigiamai veikia grūdų daigumą salyklo gamybos metu [17]. Mikromicetų sintetintos šarminės proteazės hidrolizina miežių baltymus [18].

Įvairių tyrimų atliktų salyklo gamybos metu nustatyta, kad mikotoksinų koncentracija kinta kiekviename gamybos etape: grūdų mirkymo proceso pabaigoje zearalenono kiekis padidėjo, o daiginimo proceso pabaigoje, dėl daiginamų miežių struktūrinių komponentų sąveikos su miežių fermentais ar kitais jų komponentais, šio mikotoksino kiekis sumažėjo. Toliau vykdomo džiovavimo proceso metu buvo stebimas zearalenono kiekio didėjimas, kuriam įtakos turėjo džiovavimo proceso metu susidaranti nepalankios sąlygos, kurios slopina mikroskopinių grybų augimą, tačiau *Fusarium spp.* rūšys pradeda intensyviau sintetinti zearalenoną [19, 20].

Svarbu suprasti, kad gera žemės ūkio praktika yra pagrindinis veiksnys kovai su mikrobiologine grūdų tarša, po kurio labai svarbu laikytis geros grūdų tvarkymo praktikos jų sandėliavimo ir perdirbimo į maisto produktus ir pašarą metu [21].

## 1.2. Mikrobiologinės taršos grūduose mažinimo būdai

Mikromicetų paplitimas javų grūduose yra svarbi problema daugumoje pasaulio šalių. Būdami labiau atsparūs mažesniai vandens aktyvumui nei bakterijos, mikroskopiniai grybai gali augti ir sukelti gedimą daugumoje grūdų produktų. Reikšmingas yra jų gebėjimas gaminti mikotoksinus prieš derliaus nuėmimą, džiovavimo ar sandėliavimo metu, kai nėra užtikrinamos tinkamos grūdų tvarkymo ir sandėliavimo sąlygos [5].

Siekiant sumažinti mikroskopinių grybų augimą labai svarbu tinkamos prevencijos priemonės ir efektyvus kontrolės planas. Rekomenduojama grūdų taršos prevencija apima: 1. grybų augimui atsparių augalų veislių kūrimą; 2. tinkamų priemonių prieš derliaus nuėmimą naudojamą, jo augimo ir sandėliavimo metu; 3. sandėliavimą žemose temperatūrose; 4. fungicidų

(acto rūgštis, propiono rūgštis, benzoinės rūgštis, citrinų rūgštis ir jos natrio druskų, geležies sulfato) kaip medžiagų, stabdančių mikroskopinių grybų augimą naudojimą; 5. leidžiamų priemonių pvz. ozonavimas, naudojimą sandėliavimo patalpose, siekiant kontroliuoti vabzdžių sukeltus grūdų pažeidimus [9]; 6. biologinių metodų (netoksiškų *Aspergillus flavus* ir *Aspergillus parasiticus* įterpimo į dirvožemį, augalų genetinę modifikaciją) panaudojimą [22].

Antrinės prevencijos priemonės prieš grybų augimą apima grybų augimo ribojimą papildomai džiovinant produktą, užkrėstų sėklų pašalinimą ir kt. Tretiniai veiksmai gali būti atliekami norint sustabdyti grybų ir mikotoksinų pernešimą į maistą/pašarą bei į aplinką. Be to, gali būti naudojamos griežtos priemonės: užkrėstų produktų sunaikinimas arba nukreipimas fermentacijai (bioetanolio gamybai) arba mikotoksinų detoksikacijai/ sunaikinimui iki minimalių lygių [22].

Geriausias būdas, siekiant apsaugoti vartotojus, yra tinkama mikotoksinų gamybos prevencija. Norint užkirsti kelią ar sumažinti užkrėstumą mikotoksinais ypatingai svarbu auginimo ir derliaus nuėmimo strategijos [9]. Po derliaus nuėmimo, džiovinimas ir tinkamos laikymo ir transportavimo sąlygos yra svarbiausi prevenciniai veiksmai, kurie turi būti taikomi grūdų saugos užtikrinimui [22].

Kadangi dėl klimato sąlygų prevencija ne visada galima, svarbus efektyvių detoksikacijos metodų vystymas ir įgyvendinimas praktikoje. Detoksikacija apima mikotoksinų sunaikinimą ir pašalinimą ar jų sukeltų toksinių efektų sumažinimą [9].

Norint, kad detoksikacijos būdas būtų komerciškai pritaikomas, jis turi būti efektyvus, nesukeltų naujų toksinių junginių susidarymo, nesumažintų maistinės vertės bei nepakeistų kitų pageidaujamų parametrų maiste ir pašaruose. Jis turi būti paprastas ir nebrangus [21].

Siekiant sumažinti užkrėstumą mikromicetais žemės ūkyje mikotoksinų pašalinimui yra taikomi fiziniai, cheminiai ir biologiniai metodai.

*Fiziniai metodai.* Aflatoksinais užkrėstos sėklos gali būti pašalinamos jas atrenkant mechaniškai ar naudojant fotoelektrinius aptikimo aparatus, bet tai reikalauja daug darbo ir išlaidų. Kaitinimas ir kepimas sunaikina iki 70 % aflatoksinų. Sausas skrudinimas sunaikina apie 50 – 70 % aflatoksinų, o aflatoksinais užkrėstų pašarų džiovinimas saulės šviesoje gali sumažinti toksiškumą daugiau nei 70 % [22].

Be to fiziniai būdai apima tirpiklio ekstrakciją organiniais tirpikliais, adsorbiciją, ultragarso panaudojimą, veikimą karščiu, UV radiaciją, ozonavimą, saulės spinduliuotę, gama spindulius, skrudinimą ir šildymą mikrobangomis. Pažeistų pasėlių dalių pašalinimas (užkrėstų pelėsiniais grybais) yra įmanomas, kai grūdų tarša yra nelygiai pasiskirsčius ar dalinė [23].

Įrodyta, kad organiniais tirpikliais (etanoliu, izopropanoliu, metoksimetanu) galima efektyviai pašalinti aflatoksinus iš skirtingų maisto produktų. Tačiau, dėl didelių organinių



tirpiklių kainų šį būdą nėra lengva realizuoti pramonėje, nes sunku pašalinti iš produkto detoksikacijai naudotą tirpiklį [24, 25, 23].

Kai kurie fiziniai metodai yra brangūs bei gali pašalinti svarbias maistines medžiagas grūdiniuose žaliavoje [26, 27, 9].

*Cheminiiais metodais* naudojant rūgštis, šarmus (amoniaką, kaustinę sodą), oksidatorius (vandenilio peroksidą, ozoną, natrio hipochloritą), reduktorius (bisulfatus), chlorinančius medžiagas ir formaldehidą galima sumažinti mikotoksinų, pvz., ypač aflatoksinų kiekį pašaruose. Tačiau, šie metodai taip pat nėra visiškai saugūs, dažniausiai yra brangūs ir nepriimtini vartotojams [22, 9, 28, 21].

Cheminė detoksikacija neatitinka FAO reikalavimų, kadangi kai kurie junginiai palieka toksiškus metabolitus, o kiti sumažina jais paveiktų maisto produktų ir pašarų maistinę vertę [29, 30, 21, 23].

*Biologiniai metodai.* Daug dėmesio susilaukia biologinė detoksikacija, naudojant *Saccharomyces cerevisiae* mieles ir pieno rūgšties bakterijas. Žinoma, kad mielės ir pieno rūgšties bakterijos ląstelių sienelių paviršiumi geba surišti įvairius toksinus [22].

Visų šių metodų efektyvumas labai priklauso nuo taršos lygio ir mikotoksinų pasiskirstymo grūduose [21].

### **1.2.1. Tradicinėje žemdirbystėje**

Tradicinėje žemdirbystėje pagrindinis mikroskopinių grybų sukeltos taršos mažinimo būdas – fungicidų naudojimas. Fungicidų pritaikymas laukuose gali sumažinti mikromicetų augimą ir taip sumažinti mikotoksinų susidarymą. Manoma, kad stresas, kurį patiria mikroskopiniai grybai dėl fungicidų naudojimo gali paskatinti mikotoksinų gamybą [28, 31].

Nors efektyvi ir veiksminga sėklas užkrečiančių patogeninių grybų kontrolė gali būti pasiekta naudojant sintetinius cheminius fungicidus, dauguma iš jų dėl toksiškumo negali būti naudojami grūdų apdorojimui [32, 33]. Todėl yra svarbūs tolimesni tyrimai ieškant alternatyvių, aplinkai draugiškų mikroskopinių grybų ir jų sukeltos taršos laukuose sumažinimo būdų [28].

Taip pat tradicinėje žemdirbystėje kontroliuojant mikromicetų plitimą yra naudojami beicai – efektyvios cheminės priemonės, kurios sumažina mikroskopinių grybų sukeltų ligų žalą grūdams. Tai vienos iš plačiausiai naudojamų priemonių žemės ūkyje [34].

Šių cheminių priemonių sudėtyje esančios medžiagos neigiamai veikia pasėtus grūdus, todėl kaip alternatyva dažnai naudojami fiziniai metodai, kurie apima terminį apdorojimą, poveikį aukšto dažnio elektromagnetiniais virpesiais, veikimą UV bei infraraudonąja

spinduliuote, elektronų srautu, anolito bei ozono panaudojimą [35, 36, 34].

Nors sėklų beicavimas yra gana veiksmingas sėklų apsaugos būdas, tačiau cheminių preparatų panaudojimas nėra leidžiamas ekologinėje žemdirbystėje [37, 34]. Todėl vienas iš svarbiausių uždavinių yra naujų, inovatyvių, aplinkai nekenksmingų sėklų apsaugos būdų, tinkamų naudoti ekologinėje žemdirbystėje, kūrimas.

### 1.2.2. Ekologinėje žemdirbystėje

Kadangi efektyvi cheminė ir/ar fizinė mikotoksinų prevencija ne visada galima (ar yra praktiška), išauga naujų detoksikacijos priemonių poreikis. Biologinės detoksikacijos vystymas gali tapti svarbia tyrimų kryptimi, kadangi fermentinės reakcijos turi specifinį, efektyvų ir aplinkai nekenksmingą poveikį [38].

Cheminiai fungicidai yra efektyvūs, kontroliuojant pavojingų grybų augimą miežiuose ir kituose javuose, tačiau susirūpinimas galimais chemikalų likučiais davė postūmį kurti natūralesnius metodus mikromicetų kontrolei grūduose [39].

Pagal Europos Sąjungos EEC 2092/91 direktyvą visos ekologiniuose ūkiuose naudojamos augalų apsaugos priemonės negali būti cheminės kilmės, todėl leidžiama naudoti tik biologinės kilmės preparatus, kurie gali būti taikomi tiek augalų vegetacijos metu (juos apipurškiant) tiek apveliant sėklas prieš sėją. Tokie preparatai gali sumažinti sėklų užterštumą mikromicetais bei pagerinti sėklų daigumą ir padidinti dygimo galią [40].

Literatūroje randama duomenų apie sėkmingą biologinio preparato „Biojodis“ panaudojimą. Tai skysta organinė trąša, gaminama, kaip vandeninis ekstraktas, iš bio-humuso, praturtinto aktyviu jodu, bio transformeriais ir mikroelementais, kurie gali būti naudojami ekologinėje žemdirbystėje [41].

Javų grūdų apdorojimas ir augalų apipurškimas augimo metu šiuo preparatu gali pagerinti sėklų ir derliaus kokybę. Be to buvo stebimas preparato „Biojodis“ fungicidinis poveikis. 2005 metais Aleksandro Stulginskio universitete atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad žieminių kviečių „Širvinta 1“ ir pavasarinių miežių „Ūla“ grūdų apdorojimas turėjo teigiamą įtaką grūdų daigumui ir sumažino mikromicetų kiekį grūdų paviršiuje bei jų rūšinę įvairovę [42].

Taip pat geri grūdų detoksikacijos rezultatai pasiekti naudojant *Penergetic* klasės preparatus, leidžiamus taip pat naudoti ekologinėje žemdirbystėje. Šie preparatai gaminami iš mineralų, randamų Alpių kalnuose, panaudojant natūralios kilmės medžiagas ir melasą. Įvairių Lietuvoje vykdytų tyrimų metu nustatyta, kad *Penergetic* klasės preparatai yra efektyvūs sėklų apvelimui prieš sėją bei augalų apipurškimui jų vegetacijos metu [44, 43].

### 1.2.2.1. Naudojami mikroorganizmai

Efektyvi biologinės kontrolės strategija yra netoksiškų *A. parasiticus* ir *A. flavus* padermių panaudojimas dirvožemio taršos mažinimui. Netoksiškos padermės yra taikomos laukuose, kai grūdai užkrečiami konidijų suspensija arba tiesiogiai, kaip kultūrų suspensija apipurškiama ant daigų arba įterpiama į dirvožemį [45-9]. Šios padermės sumažina toksinus gaminančių grybų užkrėstumo lygį [28].

Be to, plačiai studijuojamos biologinės mikotoksinų kontrolės taikymo galimybės, naudojant fermentinę degradaciją ar mikotoksinų modifikaciją, kurios rezultatas yra biotransformacija į mažiau toksiškus produktus [9].

Fermentacija yra vienas iš lengviausių ir pigiausių būdų maisto apsaugojimui tuo pačiu išsaugant fermentuotų produktų maistines ir juslines savybes. Fermentacija vyksta dalyvaujant natūraliai produktų mikroflorai t.y. mikroorganizmams esantiems fermentacijos terpėje ar specialiai pridėtoms pradinėms kultūroms. Mielės, ypač *S. cerevisiae* ir *Candida krusei* bei pieno rūgšties bakterijos (PRB), kaip natūrali mikroflora yra maiste vykstant fermentacijai ir kaip pradinės kultūros maisto ir gėrimų gamyboje [21]. Šio proceso metu gali būti detoksikuojama keletas mikotoksinų, įskaitant OTA, kurio kiekiai fermentacijos metu gali būti sumažinti iki 40% [9, 46].

Žinoma, kad kurios PRB gali slopinti grybų augimą ir/arba sumažinti mikotoksinų gamybą [47]. PRB apsauginis poveikis siejamas su antimikrobinių junginių, tokių kaip pieno rūgštis, acto rūgštis, vandenilio peroksidas ir bakteriocinų susidarymu [48]. Literatūroje yra duomenų apie specifinius antigrybinius PRB gaminamus junginius [49].

PRB starterinės kultūros taip pat buvo panaudotos, išpurškiant jomis salyklinių miežių grūdus laukuose sėklos dygimo metu. Tai turėjo teigiamos įtakos miežių ir iš jų pagaminto salyklo kokybei, kadangi sumažėjo *Fusarium spp.* užkrėstų grūdų kiekis, padidėjo grūduose kritimo skaičius,  $\beta$ -amilazių aktyvumas ir pagerėjo misos nufiltravimas bei sumažėjo putojimas [49].

PRB kaip starterinių kultūrų panaudojimas miežių mirkymo metu padėjo sumažinti užkrėstumą *Fusarium spp.* mikroskopiniais grybais salyklo gamybos metu tuo pačiu sumažinant deoksinivalenolio ir zearalenono susidarymą [49]. PRB turi GRAS statusą, tai reiškia, kad jos yra pripažintos saugiomis ir leidžiamomis naudoti maistui [47].

Karunaratne ir kt. [50] ir Gourama and Bullerman [51] tyrimais įrodė, kad mikroskopiniai grybai esant PRB gamino mažesnius aflatoksinų kiekius. Tai ypatingai svarbu salyklo ir alaus gamintojams, kadangi grybų augimas ir mikotoksinų gamyba tęsiasi gaminant salyklą grūdų daiginimo metu [49].

Viena iš neseniai pradėtų naudoti strategijų, skirtų mikotoksinų detoksikacijai, apima: (i) mikroorganizmų, galinčių sumažinti tam tikrų mikotoksinų kiekį, išskyrimas ir maisto produktų ir pašarų apdorojimas jais, ir (ii) tinkamų fermentacijos procesų taikymas [52].

### **1.2.2.2. Augalinės kilmės preparatai**

Aukštesniųjų augalų ekstraktai laboratorinėmis sąlygomis atliktų tyrimų metu pademonstravo antibakterinį, antigrybinį ir poveikį prieš vabzdžius. Augalų metabolitai ir augalų preparatai yra viena geriausių alternatyvų sintetiniams pesticidams, kadangi jie turi minimalų poveikį aplinkai ir vartotojams [1].

Šiuo metu Lietuvoje populiarėja nauji kompleksinį poveikį turintys preparatai „Rokiprag“ ir „Indija“, kurių dėka galima užauginti sveiką ir gausų derlių. Šiuos preparatus sudaro iš augalų išskirtų ypatingų junginių – bioflavonoidų ir pagalbinių medžiagų kompleksas. Šio imunomoduliacinio sudėtyje esantys bioflavonoidai patekę į dirvožemį, paverčia kai kuriuos sunkiai biologiškai prieinamus mikroelementus (pvz., fosforą ar geležį) labiau prieinamais augalams bei kitiems dirvos mikroorganizmams, todėl pagerėja maistinių medžiagų įsisavinimo procesai. Šiam tikslui augalai patys natūraliai iš savo šaknų išskiria flavonoidus, tačiau papildomai į dirvožemį įterpus šių junginių visi šie procesai dar labiau pagerėja. Bioflavonoidai apsaugant maistinių medžiagų įsisavinimą pagerinimo, taip pat atlieka ir svarbų vaidmenį suaktyvinant abipusiai naudingus augalų ir bakterijų bei augalų ir „gerųjų“ dirvožemio mikromicetų santykius. Dėl to pagerėja augalų augimas, subrandinamas didesnis derlius. Taip pat dėl efektyvesnio aprūpinimo maisto medžiagomis augalai sustiprėja, greičiau vystosi bei tampa atsparesni kenkėjams bei ligoms [53].

Bioflavonoidai taip pat pasižymi antigrybinu, antimikrobinu ir antivirusiniu poveikiu. Antimikrobinis natūralių antioksidantų poveikis pasireiškia ląstelių arba molekuliniam lygmenyse ir yra susijęs su ypatinga flavonoidų molekulių struktūra. Taigi, ši komponentų savybė padeda augalams vystytis natūraliu būdu, išvengiant kenksmingų žmogui ir aplinkai sintetinių pesticidų naudojimo, apsaugoti [53].

## 2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI

### 2.1. Tyrimo objektai

#### 2.1.1. Miežių ir kviečių grūdai

Tyrimams buvo naudota miežių kolekcija gauta iš Dotnuvos LŽI (1 lentelė.) bei viena rūšis salyklinių užkrėstų miežių gauta iš Vokietijos. Analitiniams tyrimams grūdai buvo sumalti laboratoriniu malūnu „WZ-1“ (ZBPP, Lenkija).

1 lentelė. Miežių veislių kolekcija.

Eil. Nr.	Veislė	Tipas
1.	NFC Tipple	salyklinė
2.	Propino	salyklinė
3.	Christopher	pašarinė
4.	Luokė	pašarinė
5.	Alisa DS	salyklinė
6.	Aura DS	pašarinė
7.	Noja DS	pašarinė
8.	Kirsna DS	pašarinė
9.	Ema DS	pašarinė

#### 2.1.2. Pieno rūgšties bakterijos

Tyrimuose naudotos Maisto mokslo ir technologijos katedroje turimos *Lactobacillus bulgaricus*, *Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9 pieno rūgšties bakterijos, turimos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje

#### 2.1.3. Fermentiniai preparatai

Arabinogalaktano hidrolizei naudotas fermentinis preparatas „CeluStar XI“ , gamintojas Dyadic International (USA).

Permiato fermentacijai naudotas  $\beta$ -galaktozidazės fermentas iš *Aspergillus oryzae*, gamintojas Sigma-Aldrich kompanija.

#### 2.1.4. Fermentacijos terpės

Arabinogalaktano preparatams paruošti buvo naudojami arabinogalaktano milteliai, gauti iš UAB „Rokiškio pragiedruliai“ (Rokiškis) ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9 PRB. Taip pat

buvo paruošti preparatai su hidrolizintu arabinogalaktanu, jo hidrolizei panaudojant ksilanazinį fermentinį preparatą „Celustar XL“.

Tyrimuose naudotas permiatas gautas iš UAB „Rokiškio pienas“.

Arabinogalaktano preparatų paruošimas:

1. 20 ml vandens + 0,5 g arabinogalaktano + 200 µl (PRB KTU-9). Kultivuota 24 val. 37 °C termostate.

2. 20 ml vandens + 0,5 g arabinogalaktano + 100 µl „Celustar XL“ fermento, inkubuota 55°C 30 min. + 200 µl (PRB KTU-9). Kultivuota 24 val. 37 °C termostate.

3. 20 ml vandens + 0,1 g arabinogalaktano + 200 µl (PRB KTU-9). Kultivuota 24 val. 37 °C termostate.

4. 20 ml vandens + 0,1 g arabinogalaktano + 100 µl „Celustar XL“ fermento, inkubuota 55°C 30 min. + 200 µl (PRB KTU-9). Kultivuota 24 val. 37 °C termostate.

### 2.1.5. Bioflavonoidų preparatai

Tyrimams naudoti 4 bioflavonoidų preparatai: „Rokiprag“, „Rokiprag 50 %“, „Indija“ ir „Agrastimul“, gauti iš UAB „Rokiškio pragiedruliai“ (Rokiškis). Preparatų aktyvusis komponentas – bioflavonoidų kompleksas, kurį sudaro aromadendrinas, dihidrokvarcetas (taksifolinas), polisacharidai išskirti iš sibirinio maumedžio medienos.

Veikimo spektras – augalų augimo stimuliavimas, gali būti naudojamas skirtingų sėklų apdorojimui ir apipurškimui vegetacijos periodo metu.

### 2.1.6. Indikatoriniai mikroorganizmai

Tiriant antimikrobinį PRB fermentuotų biopreparatų ir bioflavonoidų preparatų poveikį buvo naudojami šie KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje turimi indikatoriniai mikroorganizmai:

1. Mikroskopiniai grybai: *Penicillium verrucosum*, *Fusarium poae*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ir *Fusarium saloni*;
2. Bakterijos: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Pseudomonas gladioli* pv. *aliicola*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. facilis*, *P. aureofaciens* biovar. III, *P. marginalis*, *P. cichorii*;
3. Mielės: *Aureobasidium pullulans*, *Pichia farinosa*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida pelliculosa*, *Candida kruisii*, *Debaryomyces vanrijae*, *Geotrichum fermentans*,

*Kluyveromyces lodderae*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula rubra* ir *Sacharomyces cerevisiae*.

## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. $\beta$ -gliukano kiekio nustatymas miežuose

#### *Miežių drėgmės nustatymas.*

Drėgmės kiekis miežuose nustatytas pagal LST EN ISO 712:2010 „Grūdai ir jų produktai. Drėgmės kiekio nustatymas.“ [54]. Gauti rezultatai naudoti tolimesniame tyrime, apskaičiuojant  $\beta$ -gliukano kiekį miežuose.

***$\beta$ - gliukano kiekio nustatymas miežuose.***  $\beta$ -gliukanas miežuose nustatytas McCleary metodu, naudojant reagentus iš „Megazyme“ rinkinio skirtą  $\beta$ -gliukano nustatymui.

Metodo esmė – mėginiai yra suspenduojami ir hidratuojami buferiniame tirpale, kurio pH 6,5 ir tada inkubuojami su grynu lichenazės fermentu bei filtruojami. Filtratas galutinai hidrolizuojamas naudojant  $\beta$ -gliukozidazę.

Analizės eiga:

1. Miežiai sumalami laboratoriniu malūnu „WZ-1“ (ZBPP, Lenkija).
2. Į mėgintuvėlius pasveriami po 0,5 g tiriamo mėginio.
3. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 1 ml vandeninio etanolio tirpalo (50% v/v).
4. Įpilama po 5 ml natrio fosfato buferio (20 mM, pH 6,5) ir išmaišoma.
5. Mėgintuvėliai inkubuojami verdančiame vandenyje 2 min. Tada energingai sumaišoma ir papildomai pakaitinama verdančio vandens vonioje 3 min.
6. Mėgintuvėliai atvėsunami 40 °C temperatūroje ir pridedama 0,2 ml lichenazės. Mėgintuvėliai užkemšami, išmaišomi ir inkubuojami 40 °C temperatūroje 1 val.
7. Kiekvieno mėgintuvėlio tūris padidinamas iki 30 ml, pripilant distiliuoto vandens.
8. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir nufiltruojamas.
9. Po 0,1 ml kiekvieno filtrato atsargiai perkeliama į tris naujus mėgintuvėlius.
10. Į vieną iš mėgintuvėlių įpilama po 0,1 ml natrio acetato buferio (50 mM, pH 4), į kitus du mėgintuvėlius – po 0,1 ml  $\beta$ -gliukozidazės ir 50 mM pH 4 natrio acetato mišinio.
11. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama 3 ml GOPOD reagento ir inkubuojama 40 °C temperatūroje 20 min.
12. Spektrofotometru šmatuojama gautų mėginių absorbcija prie 510 nm.

***$\beta$ -gliukano kiekio apskaičiavimas.***  $\beta$ -gliukano kiekis buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$\beta - \text{gliukanas } \% \frac{W}{W} = \Delta A \times F \times 300 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times 27$$

čia:  $\Delta A$  – absorbcija po veikimo  $\beta$  – gliukozidaze (reakcijos) minus tuščio mėginio absorbcija.

F – Absorbcijos konversijos į gliukozės kiekį išreikštą  $\mu\text{g}$  faktorius, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{100 (\mu\text{g } D - \text{gliukozės})}{100 \mu\text{g } D - \text{gliukozės absorbcija}}$$

300 – Tūrio pataisa (pvz., 0,1 ml paimtas iš 30 ml.

$\frac{1}{1000}$  – konversija  $\mu\text{g}$  į mg

$\frac{100}{W}$  – faktorius, skirtas išreikšti  $\beta$  – gliukano kiekį procentais nuo sausų miltų masės

W – apskaičiuotas analizuojamo mėginio sausųjų medžiagų masė, mg

$\frac{162}{180}$  – faktorius paversti laisvą D – gliukozę į anhidro – D – gliukozę, kuri yra  $\beta$  – gliukane.

### 2.2.2. Permiato fermentacija

Permiato fermentacija vykdyta pridedant į 50 ml permiato 0,5 ml  $\beta$  – galaktozidazės fermento. Mėginiai išlaikyti 1 valandą 50 °C temperatūroje, kad būtų suskaidyta laktozė. Po to pridėtas 1 ml PRB ir mėginiai palikti 37°C temperatūros termostate 24 valandas. Po 24 valandų fermentacijos pridėta 3%  $\text{CaCO}_3$ . Fermentacija tęsiama dar 24 valandas. Bendra fermentacijos trukmė – 48 valandos 37 °C temperatūroje.

**Ląstelių atskyrimas.** Po permiato fermentacijos PRB ląstelės ir neištirpęs  $\text{CaCO}_3$  pašalintas centrifuguojant 5 minutes esant 2000 x centrifugos apskums. Supernatantas perfiltruotas per sterilų filtrą ir tolimesniuose tyrimuose naudotas tik sterilus preparatas.

### 2.2.3. Pieno rūgšties izomerų analizė

Pieno rūgšties L+ ir D- izomerų nustatymui buvo naudotas K-DLATE 07/14 reagentų rinkinys iš *Megazyme International Ireland Limited*.

Šie izomerai nustatyti fermentinių reakcijų metu. Pirmosios reakcijos metu, veikiant D-laktato dehidrogenazei (D-LDH) D(-) izomeras oksiduojamas iki piruvato, susidarant nikotinamido-adenino dinukleotidui ( $\text{NAD}^+$ ). 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 ir yra išmatuojamas spektrofotometru, esant 340 nm bangos ilgiui.

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

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D-pieno\ r\ugsties}$$

čia: V – galutinis tūris (ml)

MW – molekulinė D-pieno rūgšties masė (g/mol)

$\varepsilon$  – NADH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui = 6300 (l x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

d – šviesos kelias (cm)

v – mėginio tūris (ml)

Tų pačių reakcijų metu L(+) pieno rūgštis (L-laktatas) panaudojant L-laktato dehidrogenazę (L-LDH) yra oksiduojama iki piruvato; reakcijos metu susidaro nikotinamido – adenino dinukleotidas (NAD<sup>+</sup>). 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.

### 2.2.5. Pieno rūgšties bakterijų kiekio įvertinimas

PRB ląstelių kiekis fermentuotuose preparatuose nustatytas skiedimų metodu [55]. 10 ml fermentuoto preparato sumaišyta su 90 ml fiziologinio tirpalo (9g/l) ir paruošti skiedimai nuo 10<sup>-2</sup> iki 10<sup>-10</sup>. Į Petri lėkšteles su MRS agaru pasėti, atitinkamai, 10<sup>-5</sup> ir 10<sup>-10</sup> skiediniai. Lėkštelės inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis, termostate, PRB augimui optimaliose temperatūrose 4 paras. Po 4 parų suskaičiuotos PRB kolonijos ir nustatytas PRB skaičius 1 ml preparato. PRB kolonijų skaičius išreikštas kolonijas sudarančiais vienetais mililitre (ksv/ml), kuris apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{ksv/ml} = \text{ksv}_{\text{lėkštelėje}} \cdot \text{sf/a}$$

čia: ksv<sub>lėkštelėje</sub> – išaugusių kolonijų skaičius lėkštelėje; sf - skiedimo faktorius; a - mėginio kiekis (ml) naudotas sėjimams į lėkštelę.

### 2.2.6. Pieno rūgšties bakterijų dauginimosi kinetika

PRB augimo kinetinių pokyčių vertinimui paruošta po 250 ml pradinių fermentuoto arabinogalaktano preparatų. Arabinogalaktano kiekis reikalingas paruošti 250 ml preparato buvo perskaičiuotas atitinkamai pagal kiekį, kurio reikėjo paruošti po 20 ml kiekvieno preparato. Į kiekvieną suspensiją užsėta po 5 ml PRB (KTU – 9) suspensijos, kurios optinis tankis (OT) 590

= 0,7. Inokuliuoti preparatai inkubuoti 37 °C temperatūroje termostate anaerobinėmis sąlygomis. Mikroorganizmų dauginimosi kinetikos kreivei bei pH pokyčiams įvertinti, kas valandą imtas mėginys ir spektrofotometru (bangos ilgis 590 nm) išmatuotas optinis tankis iki kol pasiekta stacionari augimo fazė. Taip pat buvo vertinami pieno rūgšties bakterijų kinetiniai pokyčiai, imant mėginius kas 24 val.

### **2.2.7. Antimikrobinio poveikio prieš mikroskopinius grybus ir bakterijas įvertinimas**

Antimikrobinio poveikio įvertinimui prieš mikroskopinius grybus ir mieles, naudota MPGA mitybinė terpė sudaryta iš mielių, peptono, gliukozės ir agaro. 1 litrui šios terpės paruošti reikia: po 10 g mikologinio peptono ir mielių ekstrakto, 20 g gliukozės ir 15 g agaro. Nustatant antimikrobinį preparatų poveikį prieš bakterijas naudotas Plate count agaras (Liofilchem, 610040). Fermentuoto arabinogalaktano ir neskiestų bioflavonoidų preparatų antimikrobinis poveikis vertintas diskelių metodu, o 0,5 ir 1 % bioflavonoidų preparatų antimikrobinis poveikis vertintas difuzijos į agarą metodu.

Vertinant paruoštų preparatų poveikį prieš pelėsinius grybus buvo paruoštos skirtingų rūšių pelėsinų grybų sporų ir konidijų suspensijos iki ~ 10<sup>6</sup> sporų/konidijų gazonui. Į sterilias Petri lėkšteles pilama po 1 ml kiekvienos suspensijos, užpilama 20 ml paruoštos MPGA terpės ir išmaišoma.

Vertinant antimikrobinį preparatų poveikį prieš bakterijas ir mieles, buvo paruoštos skirtingų rūšių bakterijų ir mielių ląstelių suspensijos, naudojant McFarland'o standartą Nr. 1. Kiekvienos suspensijos sterilia pipete supilama po 200 µl į sterilias Petri lėkšteles ir, užpylus Plate count agaro terpės (Liofilchem, 610040) bakterijoms ir MPGA terpės mielėms, išmaišoma. Terpei sustingus išdėliojami 6 mm skersmens sterilūs filtrinio popieriaus diskeliai ir ant kiekvieno iš jų užlašinama po 10 µl preparato. Mikroskopiniai grybai auginti 25 °C temperatūroje, o bakterijos augintos 30 °C temperatūroje. Antimikrobinis preparatų poveikis prieš mikroskopinius grybus ir mieles vertintas po 2-3 parų, o prieš bakterijas po 24 valandų.

Difuzijos į agarą metodu vertintas 0,5 ir 1 % bioflavonoidų preparatų antimikrobinis poveikis. Sustingus terpei, steriliu cilindru išpjautos 6 mm skersmens įdubos ir agaras pašalintas. Į šulinėlius dozuota po 200 µl mėginio.

Rezultatams įvertinti išmatuotas atsiradusios skaidrios zonos aplink įdubą arba diskelį skersmuo horizontalia ir vertikalia kryptimis bei iš gautų duomenų išvestas vidurkis ir apskaičiuotas inhibicijos zonos skersmuo (išreikštas mm). Antimikrobinio poveikio įvertinimas išreikštas taip: (-) poveikiu nepasižymėjo; (+/-) silpnas fungistatinis poveikis; (+)

stipresnis fungistatinis poveikis, (++) fungistatinis poveikis ir silpnas fungicidinis poveikis; (+++) fungicidinis poveikis.

### 2.2.8. Grūdų mikrobiologinės taršos įvertinimas

Siekiant nustatyti preparatų įtaką grūdų mikrobiologinės taršos mažinimui, buvo naudojami jau užkrėsti salykliniai miežių ir kviečių grūdai.

Tyrimas atliktas salyklinių miežių ir kviečių mėginius, apdorojant paruoštais antimikrobiniais fermentuoto permiato preparatais, salyklinius miežius – fermentuoto arabinogalaktano preparatais (grūdai mirkyti 15 min.). Be to buvo vertinamas neskiestų bioflavonoidų preparatų poveikis salyklinių miežių ir kviečių mikrobiologinės taršos mažinimui (grūdai mirkyti 2 val.). Ant paruoštų Petri lėkštelių su MPGA terpe (kurios 1 litrui paruošti reikia: po 10 g mikologinio peptono ir mielių ekstrakto, 20 g gliukozės ir 15 g agarų). išdėliota po 10 grūdų, apdorotų paruoštais preparatais, iš viso po 10 lėkštelių kiekvienam tyrimui. Inkubuota termostate 25 °C temperatūroje 7 paras. Po 7 parų įvertintas mikroskopiniais grybais pažeistų grūdų skaičius, išreikštas procentais.

### 2.2.9. Daigumo įvertinimas

Sėklų daigumas nustatytas rulonų metodu [56], naudojant drėgnus filtrinio popieriaus rulonus. Tam sukarpytos 15-20 cm pločio ir 100-105 cm ilgio filtrinio popieriaus juostos. Arčiau juostos viršaus (5-6 cm nuo viršutinio krašto) nubrėžta linija, ant kurios, prieš tai sudrėkinus popierių vandeniu, 1,5 – 2 cm atstumu viena nuo kitos išdėstyta 100 sėklų darant po 4 pakartojimus. Iš viršaus sėklos pridengtos drėgna 7-8 cm pločio filtrinio popieriaus juosta. Juostos susuktos į nestandžius rulonus, kurie galais pamerkti į atskirus stiklinius indus su vandeniu. Vanduo neturi apsemti sėklų – jis turi būti ne mažesniu kaip 5 cm atstumu nuo sėklų. Salyklinių miežių daigumui įvertinti paruošti rulonai lakyti 2-3 paras kambario temperatūroje (+15-18°C), o daigelių aukštis vertintas po 7 parų. Pasibaigus inkubacijos periodui, rulonai išvyniojami ir suskaičiuojami sudygę grūdai bei išmatuotas daigelių aukštis. Grūdų daigumas išreiškiamas procentais, apskaičiuojant pagal formulę:

$$P = \frac{n}{N} \times 100$$

n – sudygusių grūdų skaičius;

N – daigintų grūdų skaičius;

### **2.2.10. Baltymų ekstrakcija ir 1D-SDS- PAGE elektroforezė**

*Baltymų ekstrakcija.* 2 g grūdų grūstuvėje 5 min laikyti skystame azote ir po to sutrinti į miltus. 100 – 150 mg miltų įpilta 400 µl urėjos buferinio tirpalo (2M urėjos, 10 % glicerolio, 13 mM DDT ir 20 mM Tris, pH 8.0). Suspensija inkubuota kambario temperatūroje 1 min ir netirpios dalelės pašalintos centrifūguojant prie 16,000x g 10 min.

*1D-SDS- PAGE elektroforezė.* Baltymų mėginiai buvo sumaišyti su buferiu (Tris-HCl (pH 6.8, SDS 4 %, bromfenolio mėlynasis 0,05 %, 2-merkaptoetanolis 10 %, glicerolis 30%) santykiu 1:5. Tada mėginiai kaitinti 99 °C temperatūros vandens vonioje 10 min tam, kad 2-merkaptoetanolis denatūruotų baltymus ir suskaidytų baltymų disulfidinius ryšius. Taip paruošti mėginiai „suleisti“ ant 12 % poliakrilamido gelių. Geliai patalpinti į elektroforezės aparatą su SDS buferiu (Tris bazė 100 mM, HEPES 100 mM ir SDS 3.5 mM), esant 150 V elektros srovei 45 minutes. Pasibaigus elektroforezei, geliai su mėginiais dažyti Coomassie™ Blue metodu. Tam SDS geliai kaitinti mikrobangų krosnelėje, naudojant Fairbanks A tirpalą, atvėsinti 5 min ir taip pat kaitinti su Fairbanks B, C ir D po minutę. Fairbanks D naudotas tiek kartų kol buvo aiškiai matomos baltymų jungtys.

### **2.2.11. Matematinė statistinė duomenų analizė**

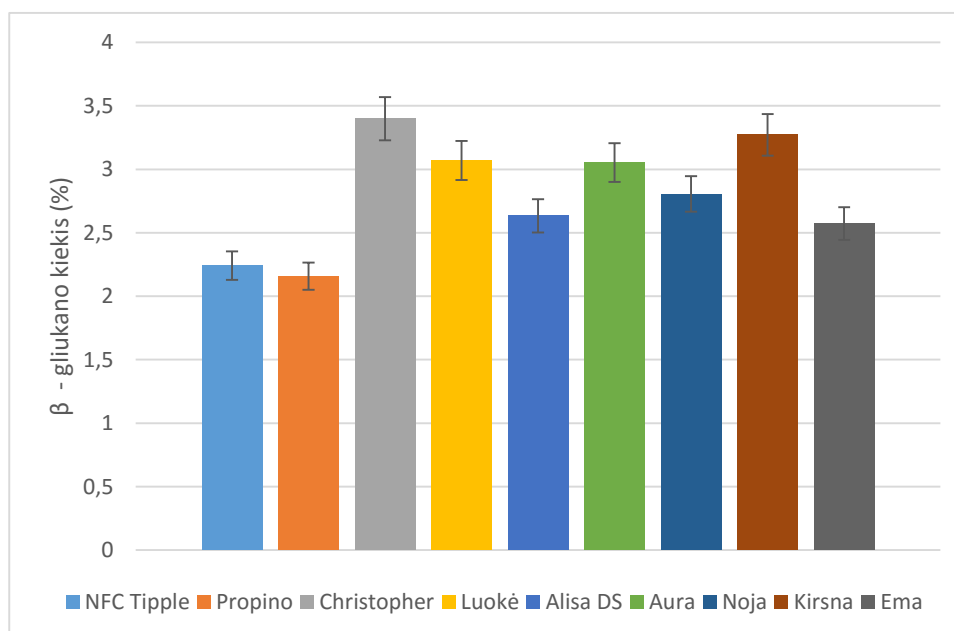
Statistinei duomenų analizei atlikti naudotas „Microsoft Excel“ statistinis paketas. Nustačius vidutines rodiklių vertes, jų skirtumų patikimumas vertintas taikant TTEST funkciją. Skirtumas statistiškai patikimu laikomas, kai  $p \leq 0,05$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. $\beta$ -gliukano Lietuvoje auginamuose salykliniuose miežuose įvertinimas

Pirmame etape tirtas drėgmės kiekis pašarinių ir salyklinių miežių grūdų kolekcijoje, kuris kito ribose nuo 10,84 % (Noja veislės miežuose) iki 12,15 % (Kirsna veislės miežuose). Gauti grūdų drėgmės duomenys naudojami perskaičiuojant  $\beta$ -gliukano kiekį į sausąsias medžiagas.

Kitame etape atliktas  $\beta$ -gliukano kiekio salykliniuose ir pašariniuose miežuose tyrimas. Nustatyta, kad didžiausiu  $\beta$ -gliukano kiekiu pasižymėjo pašariniai miežiai „Christopher“ (3,4 %) ir „Kirsna“ (3,27 %). Mažiausiu  $\beta$ -gliukano kiekiu išsiskyrė „Propino“ ir „NFC Tipple“ salykliniai miežiai, atitinkamai, 2,16 % ir 2,24 %. Luokė, Alisa DS, Aura, Noja, Kirsna ir Ema genotipuose fiksuotos tarpinės  $\beta$ -gliukano vertės, atitinkamai 3,07 %; 2,63 %, 3,05 %, 2,81 %, 3,27 % ir 2,57 % (1 pav.).



3,27 % ir 2,57 % (1 pav.).

**1 pav.**  $\beta$ -gliukano kiekis salykliniuose ir pašariniuose miežuose.

$\beta$ -gliukanai nėra pageidaujami pašaruose ir salykle, bet yra naudingi žmonių mityboje. Visų pirma, didesni  $\beta$ -gliukanų kiekiai miežuose padaro juos sunkiau virškinamus neatraujančių gyvūnų organizme, taip pat gali sumažinti salyklo modifikacijų galimybę jo gamybos metu. Antra, didesni  $\beta$ -gliukanų kiekiai salykle lemia ne visišką endospermo ląstelių sienelių suardymą ir dažniausiai yra siejami su mažesniu salyklo ekstraktyvumu. Trečia,  $\beta$ -gliukanų savybė formuoti labai klampus vandeninius tirpalus gali sukelti problemas filtravimo metu įvairiuose alaus gamybos etapuose [57]. Šie polisacharidai siejami su pablogėjusiu misos atsiskyrimu ir alaus filtracija bei su atsirandančiu alaus drumstumu jo laikymo metu [49]. Todėl

geresnė salyklo kokybė siejama su mažesniu  $\beta$ -gliukano kiekiu ir didesniu salykle  $\beta$ -gliukanazės kiekiu [58].

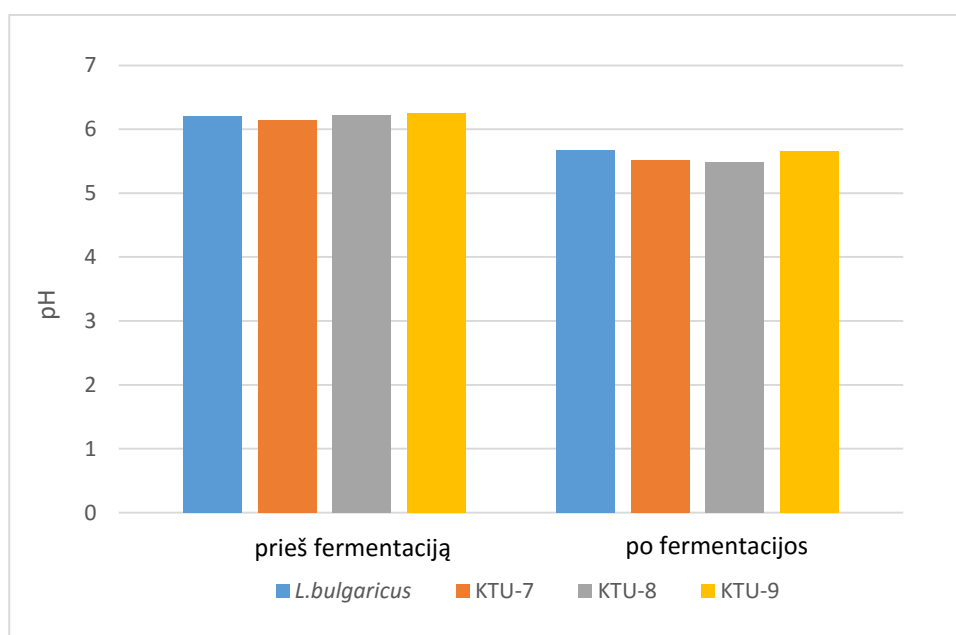
Literatūroje randama duomenų, kad PRB pridėjimas alaus gamybos pradžioje pagerina misos filtravimą (atsiskyrimo procesą) [49].

### 3.2. Fermentacijos terpių įtaka pieno rūgšties bakterijų dauginimosi kinetikai

Šiame darbo etape buvo vystomi antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys bioproduktai salyklinių miežių apdorojimui. Tam buvo naudotos bakteriocinus gaminančios PRB ir joms kultyvuoti dvi fermentacijos terpės: (i) sūrių gamybos antrinis produktas – permiatas ir (ii) arabinogalaktanas. Permiato tyrimų metu buvo vertinami pH pokyčiai, pieno rūgšties izomerų susidarymas bei PRB ląstelių dauginimas. Tiriant arabinogalaktano, kaip priedo tinkamumą fermentacijos terpės ruošimui, buvo įvertinti pH ir optinio tankio pokyčiai PRB augimo metu, imant mėginius kas valandą paros metu bei kas 24 per savaitę. Taip pat įvertintas PRB ląstelių augimas. Visi tyrimai, kuriuose kaip fermentacijos terpė buvo naudojamas permiatas atlikti ERASMUS praktikos metu Fraunhofer IME institute, Vokietija.

#### 3.2.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas

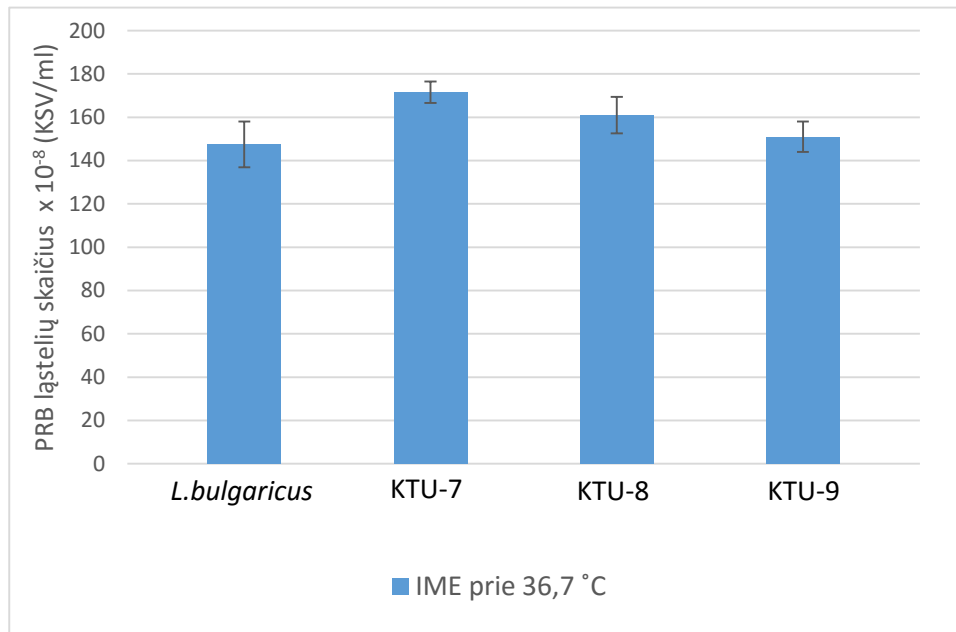
Šiame etape pateikti rezultatai gauti analizuojant fermentuojamą permiatą *pH nustatymas*. pH vertės mėginiuose prieš permiato fermentaciją buvo labai panašios ir kito nuo 6,14 iki 6,25. Po fermentacijos pH vertės mėginiuose sumažėjo ir kito nuo 5,49 iki 5,68. (2 pav.).



2 pav. pH pokyčiai prieš ir po permiato PRB fermentacijos (fermentacijos trukmė 48 val.)

Didžiausias pH sumažėjimas buvo nustatytas permiate, fermentuotame su KTU-8, mažiausias pH pokytis nustatytas permiate fermentuotame su *L. bulgaricus*, pH sumažėjo nuo 6,22 iki 5,49 (KTU-8) ir nuo 6,21 iki 5,68 (*L. bulgaricus*).

*PRB ląstelių kiekio nustatymas.* Įvertinus rezultatus gautus fermentuotame permiate didžiausiu kolonijas formuojančių vienetų kiekiu pasižymėjo KTU-7 ir KTU-8 fermentuoto permiato mėginiai, atitinkamai,  $1,71 \cdot 10^{-8}$  ir  $1,61 \cdot 10^{-8}$  KSV/ml (3 pav.).



**3 pav.** PRB ląstelių kiekis fermentuotame permiate. Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras, 36,7 °C temperatūroje

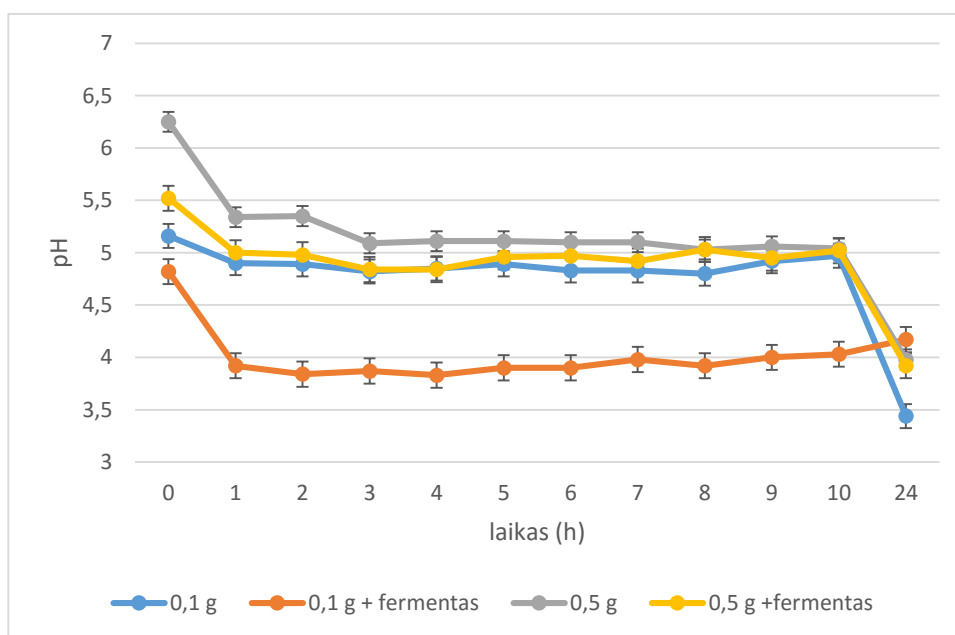
### 3.2.2. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai

Šiame etape pateikti tyrimų rezultatai, gauti analizuojant PRB fermentuojamo arabinogalaktano preparatus, kuriuos ruošiant naudoti skirtingi šio polisacharido kiekiai (0,1 g; 0,5 g). Be to, paruošti arabinogalaktano preparatai prieš fermentaciją papildomai buvo veikiami CELUSTAR fermentiniu preparatu (100 µl). Palyginimui tirta pH kitimo dinamika, kultivuojant PRB arabinogalaktano terpėse be fermentinio apdorojimo.

*pH pokyčiai (tirti kas valandą).* Vertinant pH pokyčius fermentacijos metu terpėse, ruošiose su įvairiais arabinogalaktano kiekiais (0,1 g ir 0,5 g) be fermentinio apdorojimo, pH nustatytas, atitinkamai nuo 6,25 iki 5,16 (4 pav.). Po 1 valandos fermentacijos pH mėginyje, ruošiamame su didesniu arabinogalaktano kiekiu (0,5 g), sumažėjo daugiau nei su mažesniu šio polisacharido kiekiu (0,1 g), atitinkamai, iki 5,34 ir 4,9. Tolesnės fermentacijos metu pH nekito ir šuolinis šio rodiklio vertės sumažėjimas (iki pH 3,5-4,0) fiksuotas abiem atvejais 10–24 h

fermentacijos laiku. Papildomai vertinti pH pokyčiai, fermentuojant arabinogalaktano preparatus, hidrolizintus prieš fermentaciją fermentiniu preparatu (4 pav.). Tiriant fermentinio apdorojimo įtaką pH verčių pokyčiams fermentacijos metu, stebėtos tokios tendencijos: pradiname momente pH vertės šiuose mėginiuose reikšmingai nesiskyrė nuo mėginių, ruošų be fermentinio apdorojimo ir kito ribose vidutiniškai nuo 4,8 iki 5,5. Fermentacijos metu didžiausias pH sumažėjimas (nuo 4,82 iki 3,92) fiksuotas po 1 h mėginyje, kuriam ruošti buvo naudotas mažesnis arabinogalaktano kiekis (0,1 g). Paminėtina tai, kad šio mėginio fermentacijos metu pH vertės išliko mažiausios lyginant su visais kitais tirtais mėginiais per visą fermentacijos laiką ir galinį jos etapą (10–24 h). Tuo metu fermentuojant hidrolizintą mėginį, ruošą su didesne arabinogalaktano koncentracija, pH kitimo tendencijos nustatytos analogiškos, kaip ir tiriant mėginius, ruoštus be fermentinio apdorojimo.

Tai rodo, kad arabinogalaktano apdorojimas fermentiniu preparatu turi svarbią reikšmę organinių rūgščių susidarymo procesui ir jo intensyvinimui. Tam svarbu parinkti fermentinio preparato aktyvumą.



**4 pav.** pH pokyčiai (kas valandą) preparatuose, ruošuose su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g ir 0,5 g hidrolizinto ir be fermentinio apdorojimo) *P. pentosaceus* KTU-9 fermentacijos metu.

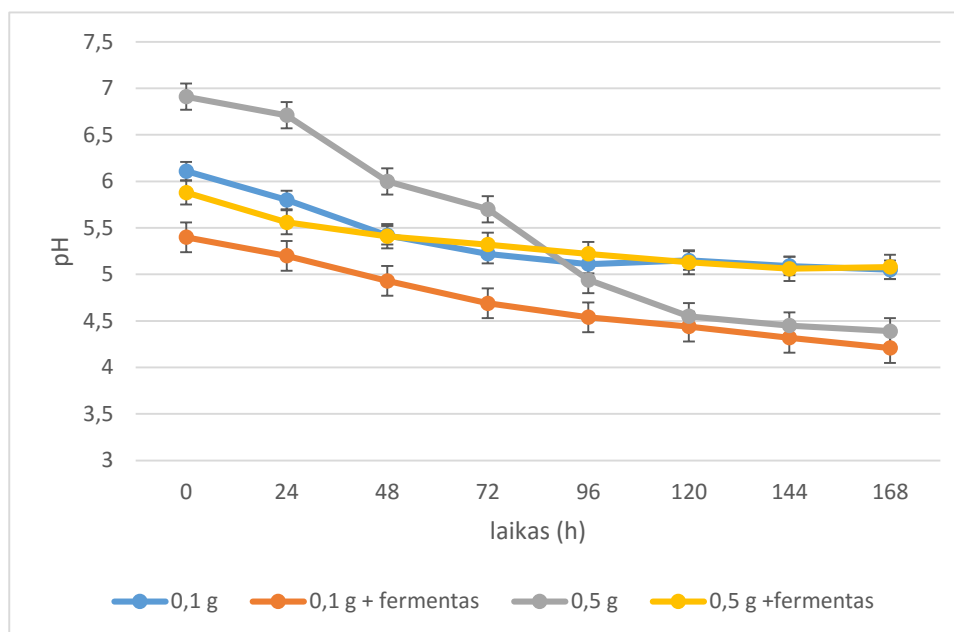
*pH pokyčiai (tirti kas 24 val).* Norint geriau įvertinti pieno rūgšties bakterijų augimo kinetiką jų dauginimosi metu pH buvo matuotas kas 24 valandas (5 pav.).

Vertinant pH pokyčius PRB augimo metu (kas 24 valandas), pradinės pH vertės arabinogalaktano preparatų, ruošų su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (su 0,1 g ir 0,5 g) (be fermentinio apdorojimo) šio parametro vertės kito ribose nuo 6,11 iki 6,91. Tiriant šiuos mėginius, buvo stebimos panašios pH pokyčių tendencijos kaip ir mėginiuose, tirtuose kas valandą paros metu. Visuose mėginiuose po pirmųjų 24 valandų fermentacijos nebuvo didelių



skirtumų tarp pH pokyčio. Šis rodiklis sumažėjo iki 6,71 mėginyje, kurio sudėtyje buvo 0,5 g arabinogalaktano ir iki 5,8 mėginyje, kurio sudėtyje buvo 0,1 g šios medžiagos. Mėginyje, turinčiame didesnį kiekį šio polisacharido (0,5 g) po 48 valandų fermentacijos buvo stebimas didesnis pH sumažėjimas, nei mėginyje su mažesniu šios medžiagos kiekiu (0,1 g), atitinkamai, iki 6 ir 5,42. Šis mėginys taip pat išsiskyrė iš visų tirtų mėginių didžiausiu pH sumažėjimu visos fermentacijos metu, vykdytos 7 paras (pH sumažėjo nuo 6,91 iki 4,39), bei išsiskyrė didžiausiu pradiniu pH – 6,91. pH mažėjimas buvo stebimas iki 120 valandos, vėliau pH nebekito.

Įvertinus pH pokyčius fermentuojant arabinogalaktano preparatus, prieš fermentaciją hidrolizintus fermentiniu preparatu, pradiniam momentu pH vertės šiuose mėginiuose buvo šiek tiek mažesnės nei mėginių, ruoštų be fermentinio apdoravimo ir kito ribose vidutiniškai nuo 5,4 iki 5,8. Fermentacijos eigoje abiejų mėginių pH kito nežymiai, nebuvo fiksuota staigus pH mažėjimo nei viename mėginių vertinimo etape. Kaip ir tiriant mėginius kas valandą, mėginyje, kuriam paruošti buvo naudotas mažesnis arabinogalaktano kiekis (0,1 g), pH vertės buvo mažiausios, lyginant su kitais mėginiais, ir fermentacijos metu kito ribose nuo 5,4 iki 4,21. Mėginio, ruošto su didesniu šio polisacharido kiekiu, pH vertės buvo artimos mėginams ruoštiems be fermentinio apdoravimo ir kito ribose nuo 5,88 iki 5,08.



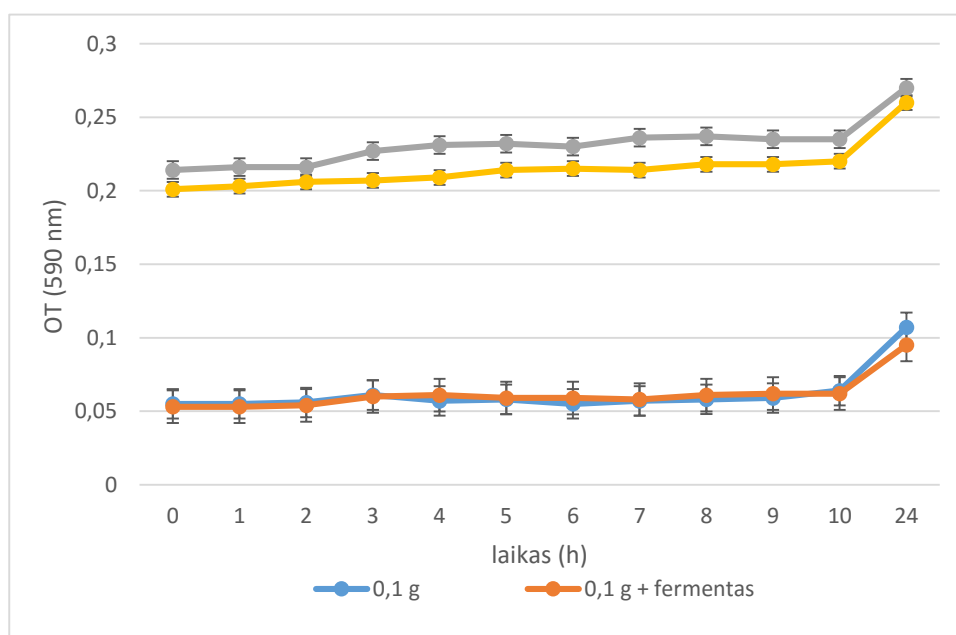
**5 pav.** pH pokyčiai (kas 24 val) preparatuose, ruoštuose su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g ir 0,5 g hidrolizinto ir be fermentinio apdoravimo) *P. pentosaceus* KTU-9 fermentacijos metu.

*Optinio tankio pokyčiai (tirti kas valandą).* Vertinant PRB augimo kinetiką, lygiagrečiai pH matavimams buvo tiriami optinio tankio pokyčiai mėginiuose, ruoštuose su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g ir 0,5 g) (6 pav.).

Mėginių, tiek neapdorotų fermentiniu preparatu, tiek apdorotų fermentiniu preparatu prieš fermentaciją, kuriems paruošti buvo naudojamas 0,1 g arabinogalaktano, pradinis optinis tankis

nustatytas, atitinkamai, 0,055 nm ir 0,053 nm. Visos fermentacijos metu optinis tankis nekito ir šuolinis šio rodiklio vertės padidėjimas (iki 0,095 nm – 0,1 nm) fiksuotas abiejuose mėginiuose 10-24 h fermentacijos laikotarpiu.

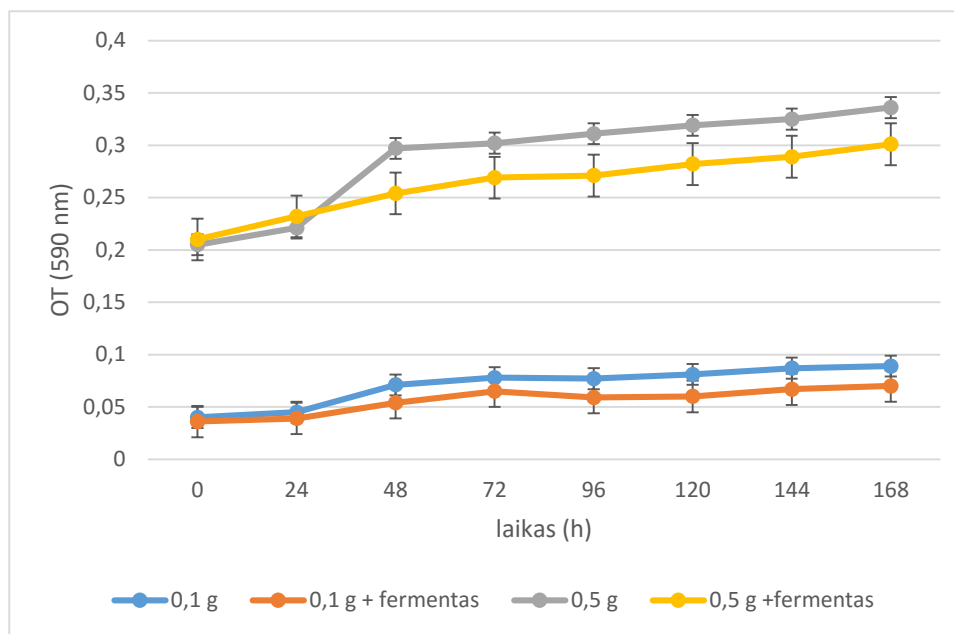
Atitinkamai vertinti optinio tankio pokyčiai fermentuojant arabinogalaktano preparatus, kurių sudėtyje buvo 0,5 g šio polisacharido, tiriant tiek neapdorotus fermentiniu preparatu tiek hidrolizintus prieš fermentaciją fermentiniu preparatu mėginius. Pradiniame momente optinio tankio vertės šiuose mėginiuose buvo fiksuojamos 0,214 nm fermentiniu preparatu neapdorotame mėginyje bei 0,201 – fermentiniu preparatu hidrolizintame mėginyje. Šių mėginių optinis tankis kaip ir mėginių, kurių sudėtyje buvo mažesnis arabinogalaktano kiekis (0,1 g), fermentacijos metu nekito ir staigus šio rodiklio padidėjimas nustatytas 10-24 h fermentacijos laikotarpiu (iki 0,26-0,27 nm).



**6 pav.** OT pokyčiai (kas valandą) preparatuose, ruoštuose su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g ir 0,5 g hidrolizinto ir be fermentinio apdoravimo) *P. pentosaceus* KTU-9 fermentacijos metu.

*Optinio tankio pokyčiai (tirti kas 24 val).* Įvertinus optinio tankio pokyčius pieno rūgšties bakterijų augimo metu, tiriant mėginius kas 24 val per savaitę, mėginiuose, ruoštuose su mažesniu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g) stebėtos tokios tendencijos: pradinis mėginių optinis tankis nesiskyrė ir sudarė 0,04 nm mėginyje be fermentinio apdoravimo ir 0,036 nm – mėginyje, kuris prieš fermentaciją buvo apdorotas fermentiniu preparatu (7 pav.). Visos fermentacijos metu optinio tankio pokyčiai buvo nedideli, didesnis šio rodiklio padidėjimas buvo stebimas tarp 24-48 valandos tiek fermentiniu preparatu hidrolizintame mėginyje (nuo 0,039 iki 0,054 nm), tiek ir mėginyje be fermentinio apdoravimo (nuo 0,045 iki 0,071 nm). Fermentacijos eigoje daugiau reikšmingų pokyčių nebuvo fiksuota. Vertinant mėginius, kuriems paruošti buvo naudotas didesnis arabinogalaktano kiekis (0,5g), optinio tankio kitimo tendencijos išliko panašios kaip ir

mėginiuose, kuriems paruošti buvo naudotas mažesnis šio polisacharido kiekis. Ryškesnis optinio tankio verčių padidėjimas vyko iki 48 valandos mėginyje be fermentinio apdorojimo (nuo 0,25 nm iki 0,297 nm), o fermentiniu preparatu hidrolizintame mėginyje šis pokytis sudarė nuo 0,21 iki 0,254 nm (7 pav.). Vėliau visos fermentacijos metu neužfiksuota reikšmingų optinio tankio pokyčių.

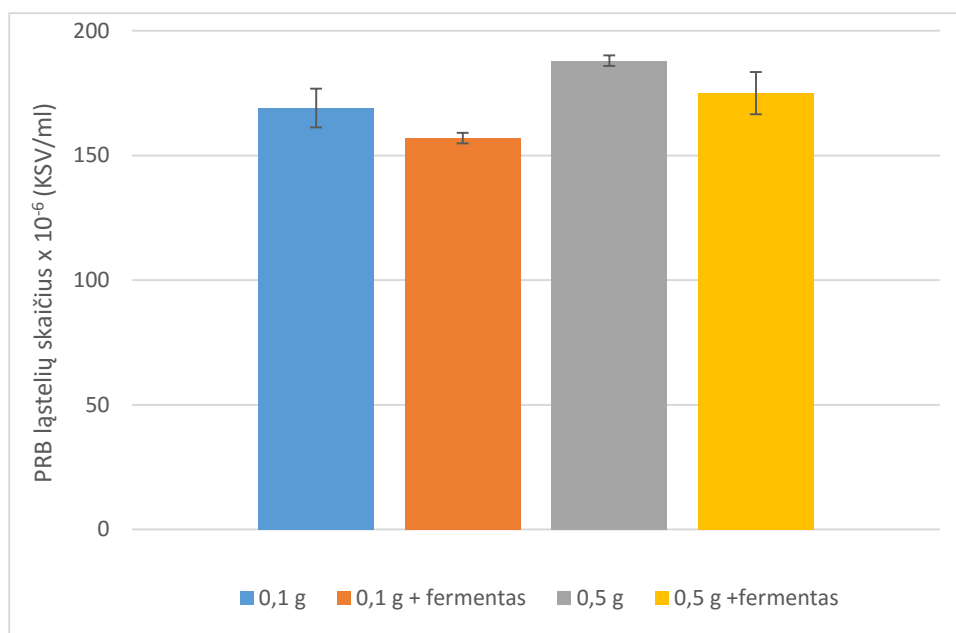


**7 pav.** OT pokyčiai (kas 24 val) preparatuose, ruoštuose su skirtingu arabinogalaktano kiekiu (0,1 g ir 0,5 g hidrolizinto ir be fermentinio apdorojimo) *P. pentosaceus* KTU-9 fermentacijos metu.

Didžiausias optinio tankio padidėjimas (vertinant mėginius kas 24 valandas) buvo stebimas po 168 valandų mėginyje, kuriam ruošti buvo naudota 0,5 g nehidrolizinto arabinogalaktano, šis rodiklis padidėjo nuo 0,205 nm iki 0,336 nm. Mažiausias optinio tankio pokytis per visą fermentaciją nustatytas mėginyje, kuriam ruošti naudota 0,1 g hidrolizinto arabinogalaktano (nuo 0,036 nm iki 0,07 nm)

Visais atvejais naudojant arabinogalaktaną, kaip PRB fermentacijos terpę, buvo stebimas optinio tankio didėjimas ir pH mažėjimas.

*PRB ląstelių kiekio nustatymas.* Šio eksperimento metu tirta arabinogalaktano įtaka PRB ląstelių kiekio pokyčiams (8 pav.). PRB kolonijas sudarančių vienetų skaičius, priklausomai nuo fermentacijos terpės, tirtas Petri lėkštelėse po fermentacijos (24 val). PRB analizė atlikta, naudojant  $10^{-6}$  skiedimą. Didžiausias KSV skaičius nustatytas mėginyje, kurio sudėtyje buvo 0,5 g arabinogalaktano (be fermentinio apdorojimo) ir naudojant fermentacijos terpės ruošimui tą pačią polisacharido koncentraciją, tačiau apdorotame fermentiniu preparatu ( $1,88 \cdot 10^{-8}$  ir  $1,75 \cdot 10^{-8}$  KSV/ml).



**8 pav.** PRB ląstelių kiekis PRB fermentuotame arabinogalaktane. Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras 37°C temperatūroje.

Tiriant skirtingų fermentacijos terpių įtaką PRB dauginimuisi ir šio proceso eigai, pastebėtos tokios tendencijos. Lyginant pH pokyčius, vykčius naudojant kaip fermentacijos terpes permiatą ir arabinogalaktaną, nustatyta, kad abiejų fermentacijų metu dėl PRB veiklos pH sumažėjo. Įvertinus pH pokyčius, įvykusius po 48 valandų (fermentuojant ta pačia PRB (KTU-9)) permiatą ir arabinogalaktaną, permiato fermentacijos metu pH pokytis (nuo 6,25 iki 5,65) (2 pav.) nustatytas mažesnis nei pH pokytis fermentacijos terpėje naudojant 0,5 g ir 0,1 g nehidrolizinto arabinogalaktano, (pH sumažėjo, atitinkamai, nuo 6,91 iki 6 ir nuo 6,11 iki 5,42), tačiau buvo didesnis nei preparatų, kuriems ruošti buvo naudojama 0,5 g ir 0,1 g hidrolizinto arabinogalaktano, kur pH sumažėjo, atitinkamai, nuo 5,88 iki 5,41 ir nuo 5,4 iki 4,93 (5 pav.).

Kaip žinoma iš literatūros, PRB fermentacijos metu susidaro pieno rūgštis ir jos padidėjimas fermentacijos terpėje sąlygoja pH mažėjimą [47].

Be to, intensyvesnis PRB fermentacijos procesas nustatytas naudojant arabinogalaktaną, neapdorotą prieš fermentaciją fermentiniu preparatu, ir tiriant PRB dauginimąsi skirtingose terpėse. Lyginant PRB ląstelių augimą fermentuotame permiate ir fermentuotoje terpėje su arabinogalaktano priedais, didesnis PRB ląstelių kiekis nustatytas fermentuoto arabinogalaktano mėginyje, turinčiame 0,5 g arabinogalaktano, prieš fermentaciją neveikto fermentiniu preparatu –  $1,88 \cdot 10^{-8}$  KSV/ml KTU-9 ląstelių (8 pav.), kai ta pačia PRB fermentuotame permiate nustatytas ląstelių kiekis sudarė –  $1,51 \cdot 10^{-8}$  KSV/ml (3 pav.).

Tokiu būdu, gauti tyrimai rodo, kad polisacharidai yra efektyvesnė terpė tirtų PRB kultivavimui nei permiatas. Šios terpės skiriasi tarpusavyje fermentuojamų sacharidų sudėtimi.

Kaip žinoma, PRB yra reiklios anglies šaltiniui ir jo trūkumas jaučiamas antrinio pieno produkto (permiato) fermentacijos metu [59].

Fermentacijos terpės įtaką PRB dauginimuisi ir metabolizmo produktų susidarymui patvirtino ir kitų tyrėjų darbai, atlikti naudojant PRB kultivavimui skirtingos sacharidų sudėties biomasės [60]. PRB yra reiklios mitybos terpei, todėl fermentacijos metu metabolizmo produktų susidarymui svarbu naudoti optimalios sudėties substratą, turintį pakankamai fermentuojamų sacharidų, azoto bei mineralinių medžiagų.

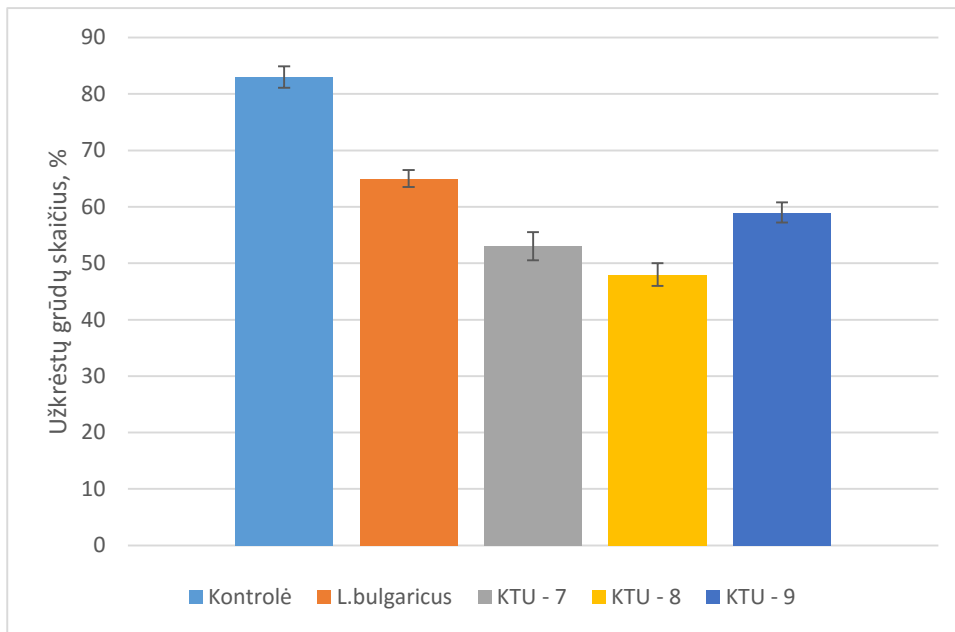
Be to, įtakos turi įvairūs veiksniai: terpės pH, temperatūra, drėgnis, deguonies koncentracija [61].

### **3.3. Bioproduktų antimikrobinis poveikis ir jo ryšys su fermentacijos metabolizmo produktais**

#### **3.3.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas**

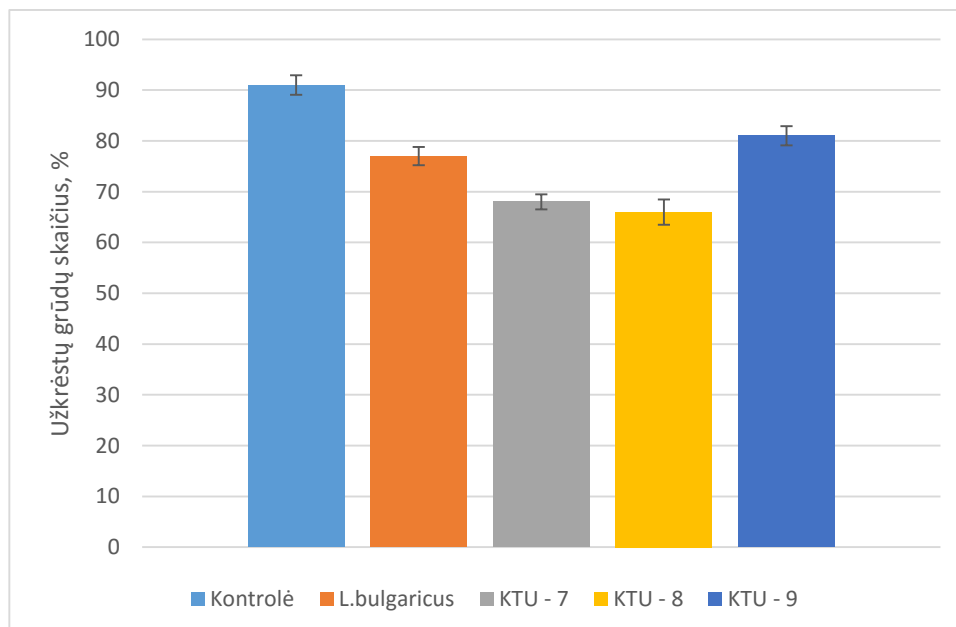
*Poveikis kviečių ir salyklinių miežių grūdų biologinės taršos mažinimui.* Šiame etape buvo tirta PRB fermentuoto permiato preparatų antimikrobinis poveikis ant grūdų paplitusiems mikroskopiniams grybams tokiems kaip *Fusarium* spp, t.y. vertinta preparatų įtaka salyklinių miežių ir kviečių grūdų biologinės taršos mažinimui. Kaip kontrolė naudotas nefermentuotas permiatas.

Mikroskopinių grybų augimą slopinantis preparatų poveikis buvo skirtingas, pagrinde dėl to, kad mėginiuose buvo skirtingas PR kiekis. Testai parodė, kad salyklinių miežių grūdų apdorojimas skirtingomis PRB fermentuotu permiatu padidino grūdų atsparumą, lyginant su kontroliniu mėginiu, prieš mikroskopinius grybus, vidutiniškai 32% fermentuojant KTU – 8 ir KTU – 7 PRB ir vidutiniškai 19 % – fermentuojant *L. bulgaricus* ir KTU – 9 PRB. Permiatas, kurio fermentacijai nebuvo naudojamos PRB, pasižymėjo žemu priešgrybiniu poveikiu (17 % nepažeistų grūdų) (9 pav.).



**9 pav.** PRB fermentuoto permeato poveikis salyklinių miežių biologinės taršos mažinimui (išlaikyta 30 min). Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras 25 °C temperatūroje

Įvertinus kviečių grūdų apdorojimo PRB fermentuotu permiatu poveikį grūdų atsparumui mikroskopinių grybų augimui, taip pat buvo stebimas šio rodiklio mažėjimas (10 pav.). KTU – 7 ir KTU – 8 PRB fermentuotas permiatas sumažino grūdų taršą vidutiniškai 24 %, kai tuo metu *L.bulgaricus* ir KTU – 9 PRB fermentuotas permiatas grūdų mikrobiologinę taršą sumažino vidutiniškai 12%.

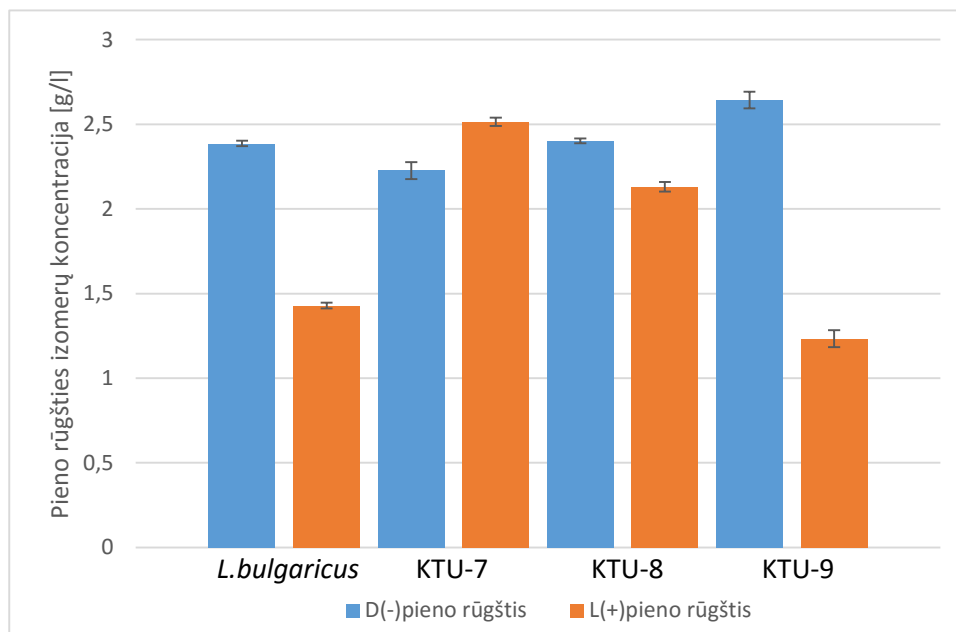


**10 pav.** PRB fermentuoto permiato poveikis kviečių biologinės taršos mažinimui (išlaikyta 30 min). Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras 25°C temperatūroje

### 3.3.2. Pieno rūgšties ir jos izomerų antimikrobinis aktyvumas

Šiame etape buvo tirti PR izomerų kiekiai skirtingomis PRB fermentuotame permiate (11 pav.). Didžiausiu D(-) izomerų kiekiu pasižymėjo KTU -9 fermentuotas permiatas (2,64 g/L). Didžiausiu L(+) pieno rūgšties izomero kiekis fiksuotas KTU-7 fermentuotame permiate (2,52 g/L) bei KTU-8 fermentuotame permiate.

Organinių rūgščių gamyba PRB fermentacijos metu reikšmingai priklausė nuo PRB padermės. *P. acidilactici* KTU-7 gamino didžiausią kiekį PR (4,74 g/L) po 48 valandų fermentacijos.



11 pav. PR izomerų kiekis skirtingomis PRB padermėmis fermentuotame permiate. Fermentacijos trukmė 48 val.

Gauti rezultatai patvirtina ir kitų tyrėjų atliktų eksperimentų metu gautus rezultatus. Literatūroje rasta duomenų, kad *L. bulgaricus* daugiausiai gamina D(-) pieno rūgšties izomerą [62]. Pagal Bartkienės ir kt. atliktą tyrimą, kurio metu pomidorų fermentacijai buvo naudotos *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici*, nustatyta, kad *P. pentosaceus* daugiausiai gamino D-pieno rūgštį, o *P. acidilactici* gamino panašius abiejų pieno rūgšties izomerų kiekius [63].

### 3.3.3. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai

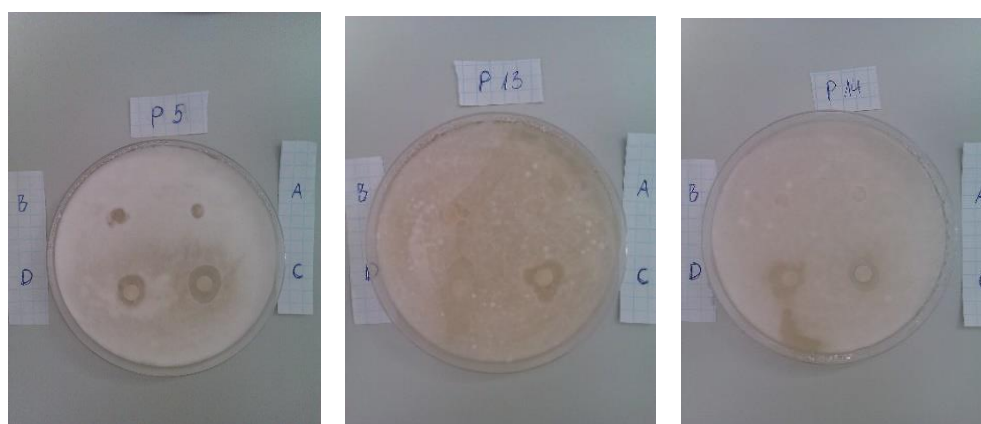
*Antimikrobinis poveikis prieš mikroskopinius grybus.* Arabinogalaktano preparatai, kurių gamyboje nebuvo naudojamos pieno rūgšties bakterijos, mikroskopinių grybų augimui neturėjo reikšmingos įtakos. Tačiau vertinant PRB fermentuotų arabinogalaktano preparatų antimikrobinį poveikį prieš mikroskopinius grybus, buvo pastebėtas preparatų, su didesniu arabinogalaktano kiekiu (0,5 g) (tiek prieš fermentaciją fermentiniu preparatu apdoroto arabinogalaktano, tiek

neveikto fermentiniu preparatu), mikroskopinių grybų augimą slopinantis poveikis prieš kai kurių mikroskopinių grybų rūšis. Preparatas, kuriam paruošti buvo naudojamas 0,5 g šio polisacharido, prieš fermentaciją neapdoroto fermentiniu preparatu, pasižymėjo fungistatinu poveikiu *Asp. versicolor*, *Penic. cyclopium* ir *Asp. tereus* mikroskopinių grybų augimui. Preparatas, kuriam paruošti buvo naudojama 0,5 g šio polisacharido, prieš fermentaciją apdoroto fermentiniu preparatu, pasižymėjo fungistatinu poveikiu tik *Asp. versicolor* grybų augimui. Tuo metu išryškėjo šių preparatų fungicidinis poveikis prieš *F. poae*, *P. chrysogenum*, ir *P. expansum* genčių mikroskopinius grybus. Rezultatai pateikti 2 lentelėje ir 12 pav.

**2 lentelė.** Arabinogalaktano preparatų antimikrobinis poveikis.

Indikatoriniai mikroorganizmai	Zonų skersmuo, mm			
	0,1 g	0,1 g hidrolizinto	0,5 g	0,5 g hidrolizinto
<i>Penic. verrucosum</i>	-	-	-	-
<i>F. poae</i>	-	-	++ 8,8 ±	++ 8,5 ±
<i>Asp. versicolor</i>	-	-	+	+
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	++ 9,6 ±	++ 9,8 ±
<i>Penic. cyclopium</i>	-	-	+	-
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	-
<i>Asp. tereus</i>	-	-	+/- 7,5 ±	-
<i>P. expansum</i>	-	-	++ 7,0 ±	++ 8,5 ±
<i>A. alternata</i>	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-
<i>F. saloni</i>	-	-	-	-

(-) poveikiu nepasižymėjo; (+/-) silpnas fungistatinis poveikis; (+) stipresnis fungistatinis poveikis, (++) fungistatinis poveikis ir silpnas fungicidinis poveikis; (+++) fungicidinis poveikis

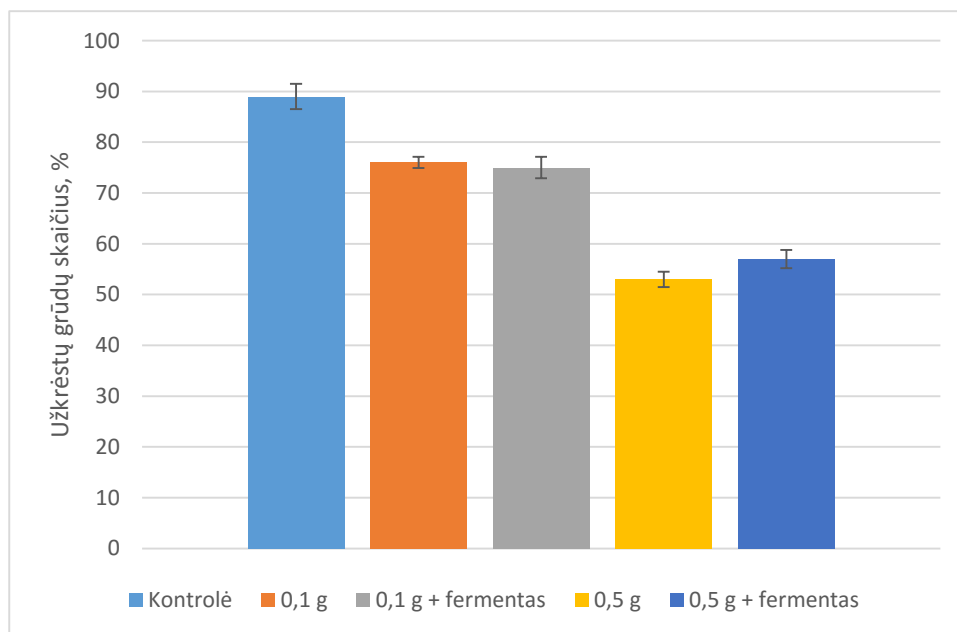


**12 pav.** Arabinogalaktano antimikrobinis poveikis prieš mikroskopinius grybus. P5 - *P. chrysogenum*; P13 - *Asp. tereus*; P14 - *P. expansum*. C - apdoroti preparatu turinčiu 0,5 g hidrolizinto arabinogalaktano; D - apdoroti preparatu turinčiu 0,5 g hidrolizinto arabinogalaktano



*Antimikrobinis poveikis prieš bakterijas.* Šio darbo etapo metu fermentuoto arabinogalaktano preparatų poveikis buvo vertinamas prieš kelias bakterijų rūšis, tačiau fermentuoto arabinogalaktano preparatai antimikrobinio poveikiu prieš bakterijas nepasižymėjo.

*Salyklinių miežių grūdų biologinės taršos mažinimas.* Šio tyrimo metu tirtas PRB fermentuoto arabinogalaktano antimikrobinis poveikis ant grūdų paplitusiems mikroskopiniams grybams, t.y. vertinta preparatų įtaka grūdų biologinės taršos mažinimui. Pastebėta, kad visi tirti preparatai sumažino ant grūdų paplitusių mikroskopinių grybų taršą. Didžiausiu teigiamu poveikiu pasižymėjo preparatas, kurio ruošimui buvo naudota 0,5 g fermentiniu preparatu neapdoroto polisacharido. Grūdų tarša sumažėjo, lyginant su kontroliniu mėginiu, 36 % (13 pav.).



**13 pav.** PRB fermentuoto arabinogalaktano (hidrolizinto ir be fermentinio apdoravimo) preparatų poveikis salyklinių miežių sėklų biologinės taršos mažinimui (išlaikyta 30 min.) Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras 25 °C temperatūroje

Palyginus PRB fermentuoto arabinogalaktano ir ta pačia PRB (KTU-9) fermentuoto permiato poveikį grūdų mikrobiologinės taršos mažinimui, pastebėta, kad arabinogalaktano preparatai, kuriems ruošti buvo naudojamas didesnis kiekis (0,5 g) šio polisacharido tiek prieš fermentaciją neapdoroto fermentiniu, preparatu tiek hidrolizinto fermentiniu preparatu, pasižymėjo didesniu efektyvumu nei ta pačia PRB fermentuotas permiatas ir sumažino grūdų taršą vidutiniškai 36 %. Preparatai, kuriems paruošti buvo naudoti mažesni šio polisacharido kiekiai (0,1 g), grūdų mikrobiologinės taršos mažinimui turėjo panašų poveikį kaip ir PRB fermentuotas permiatas ir sumažino grūdų taršą vidutiniškai (14 %) (13 pav.).

Supronienės ir kt. [64] atliktų tyrimų metu, kviečių apdorojimui panaudojant antimikrobinio aktyvumu pasižyminčias PRB, buvo gauti panašūs rezultatai, kaip ir šio

eksperimento metu. Inkubuojant mėginius 25 °C temperatūroje, buvo stebimas *Fusarium* mikroskopinių grybų sumažėjimas grūdų paviršiuje.

Kitų šaltinių duomenimis PRB atsiradimas ant salyklinių miežių paviršiaus gali teigiamai paveikti salyklo ir iš jo gaunamų produktų kokybę ir saugą. Ši savybė buvo naudojama, norint biologiškai pagerinti salyklo ir alaus gamybos procesus [65, 66].

PRB, kaip pradinių kultūrų, panaudojimas salyklo gamyboje sumažina užterštumą mikromicetais, mažina aerobinių bakterijų augimą ir sąlygoja aukštesnės kokybės salyklo gamybą (nepaisant natūralios miežių grūdų mikrofloros). PRB pridėjimas ankstyvose salyklo gaminimo stadijose yra svarbus dėl spartaus *Fusarium* augimo pirmosiomis grūdų mirkymo valandomis. Yra žinoma, kad tam tikros *Lactobacillus plantarum* ir *Pediococcus pentosaceus* padermės yra ypatingai efektyvios, mažinant užterštumą mikromicetais, kai jų pridedama į vandenį mirkymo pradžioje. Taip pat *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus acidophilus* pridėjimas į mirkymo vandenį salyklo gamybos metu sumažino DON ir ZEN gamybą [49].

Šių starterinių kultūrų efektyvumas priklauso ne tik nuo miežių sudėties, bet ir nuo jų užkrėstumo lygio [49].

### **3.4. Salyklinių grūdų apdorojimo bioproduktais įtaka grūdų daigumui**

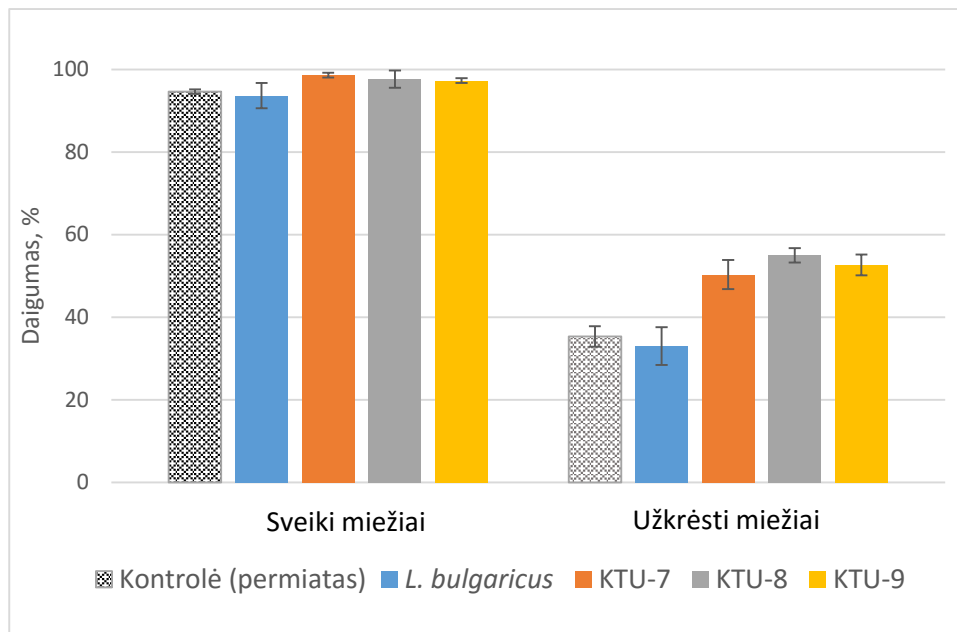
#### **3.4.1. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas permiatas**

Šio tyrimų etapo metu buvo vertinama PRB fermentuoto permiato įtaka sveikų bei mikroskopiniais grybais užkrėstų salyklinių miežių ir kviečių daigumui.

*Miežiai.* Vertinant sveikų miežių daigumo pokyčius prieš ir po apdorojimo (15 min) PRB fermentuotu permiatu, statistiškai reikšmingų pokyčių nepastebėta po 3 parų daiginimo (14 pav.). KTU-7, KTU-8 bei KTU-9 PRB fermentuotas permiatas tik vidutiniškai 4 % pagerino sveikų miežių daigumą, lyginant su kontroliniu mėginiu, kai *L. bulgaricus* fermentuotas permiatas daigumui įtakos neturėjo.

Vertinant užkrėstų miežių daigumo pokyčius, buvo stebimas daug efektyvesnis PRB fermentuoto permiato preparatų veikimas (14 pav.).

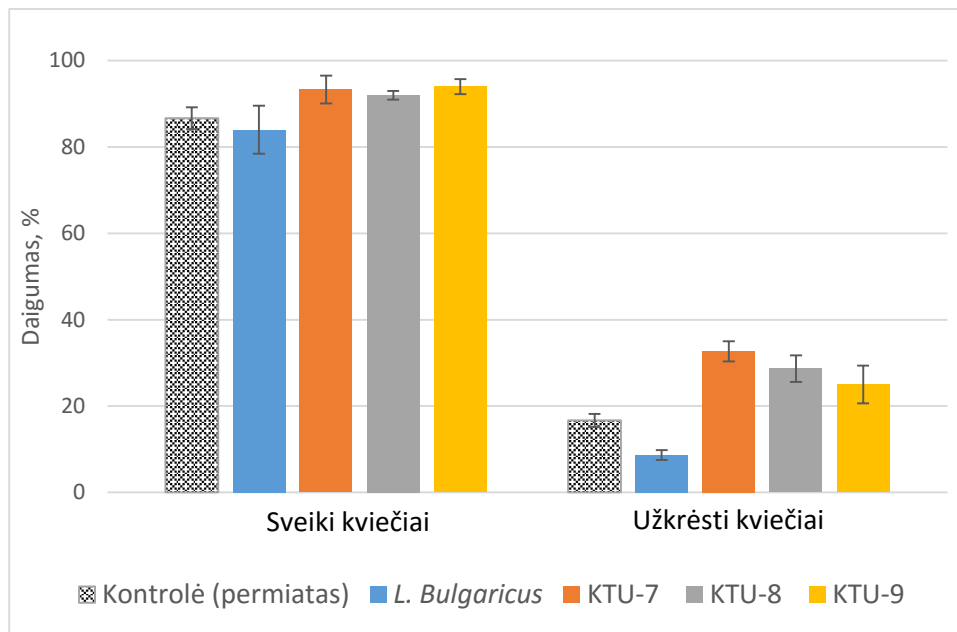
Nustatyta, kad permiatas fermentuotas naudojant KTU-7, KTU-8 bei KTU-9 PRB padermes didino miežių daigumą ir šis rodiklis buvo nustatytas vidutiniškai 12 % didesnis, nei kontroliniame mėginyje.



**14 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) PRB fermentuoto permiato preparatais įtaka sveikų ir užkrėstų salyklinių miežių daigumui (daiginta kambario temperatūroje 3 paras).

*Kviečiai.* Apdorojus sveikus kviečius PRB fermentuotu permiatu buvo stebimas teigiamas preparatų, kurių fermentacijai buvo naudotos KTU-7, KTU-8 bei KTU-9 PRB padermės, poveikis grūdų daigumui (15 pav.). Šie preparatai vidutiniškai 6 % pagerino sveikų kviečių daigumą, kai *L. bulgaricus* fermentuotas permiatas daigumą sumažino 3 %.

Vertinant preparatų poveikį užkrėstų kviečių daigumui, buvo stebimos panašios tendencijos, kaip ir apdorojus sveikus kviečius: KTU-7, KTU-8 bei KTU-9 fermentuotas permiatas gerino daigumą, o *L. bulgaricus* fermentuotas permiatas daigumą sumažino, tačiau šie pokyčiai buvo kur kas statistiškai reikšmingesni nei analizuojant miežių grūdų daigumą (15 pav.). Paminėtina, kad daugiausiai užkrėstų kviečių grūdų daigumą pagerino KTU-7 fermentuotas permiatas (16 %). Su kitomis PRB (KTU-8 ir KTU-9) fermentuotas permiatas pagerino užkrėstų kviečių daigumą mažesniu laipsniu – vidutiniškai 10 %.

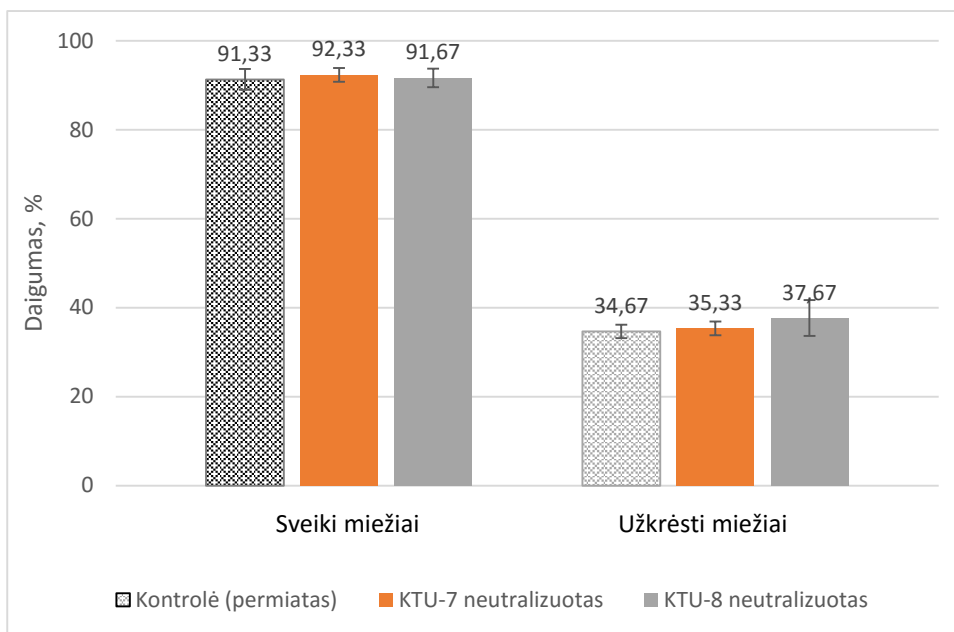


**15 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) PRB fermentuoto permiato preparatais įtaka sveikų ir užkrėstų kviečių miežių daigumui (daiginta kambario temperatūroje 3 paras).

*Naudojant neutralizuotus preparatus.* Šiame tyrimų etape buvo pasirinkti du geriausi PRB fermentuoto permiato preparatai (labiausiai pagerinę grūdų daigumą) tikslu įvertinti supernatantų, t.y. į bakteriocinus panašių medžiagų poveikį miežių ir kviečių grūdų daigumui. Tam vykdyta PRB fermentuotuose permiato mėginiuose rūgščių neutralizacija veikiant, NaOH iki pH 6,5. Po to šiais mėginiais apdoroti tiek sveiki, tiek užkrėsti miežių ir kviečių grūdai (trukmė 15 min) ir vertintas apdorojimo poveikis jų daigumui.

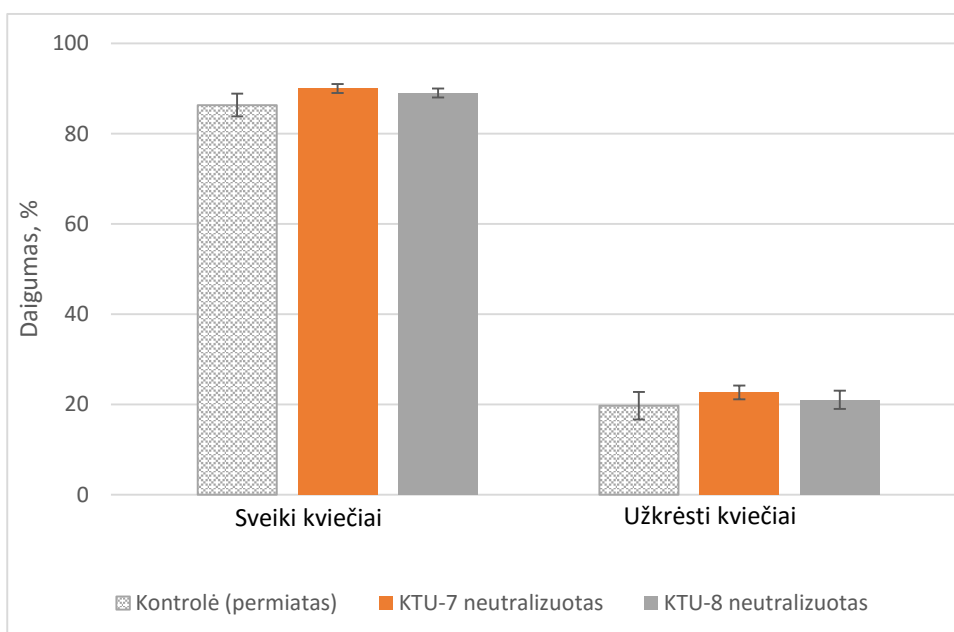
*Miežiai.* Įvertinus apdorojimo neutralizuotais PRB fermentuoto permiato preparatais poveikį sveikų miežių daigumui, nebuvo pastebėta statistiškai reikšmingų pokyčių. Daigumas išliko toks pat kaip ir kontrolinio mėginio, apdoroto nefermentuotu permiatu (vidutiniškai 92 %) (16 pav.).

PRB fermentuotas permiatas po neutralizacijos taip pat nepasižymėjo teigiamu poveikiu ir užkrėstų mikroskopiniais grybais salyklinių miežių daigumui. Pažymėtina, kad užkrėsti miežių grūdai visais atvejais blogiau dygo ir šios problemos išsprendimas aktualus salyklo gamybos įmonėms.



**16 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) PRB fermentuoto permiato neutralizuotais preparatais įtaka sveikų ir užkręstų salyklinių miežių daigumui (daiginta kambario temperatūroje 3 paras).

*Kviečiai.* Tiriant neutralizuotų PRB fermentuoto permiato preparatų poveikį tiek sveikų, tiek užkręstų kviečių daigumui, rezultatai buvo analogiški, kaip ir tiriant šių preparatų poveikį miežių daigumui – preparatai daigumui statistiškai reikšmingo poveikio neturėjo (17 pav.). Užkręsti mikroskopiniais grybais kviečių grūdai ženkliai blogiau dygo. Tokiu būdu, apart sayklo saugos aktualus turėtų būti ir gamybos efektyvumo didinimo klausimas.

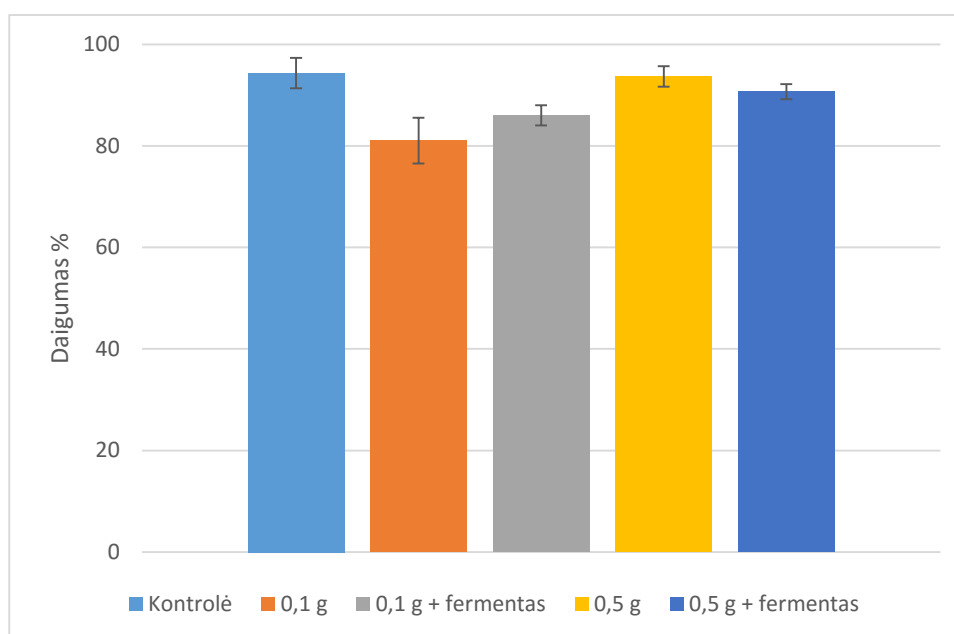


**17 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) PRB fermentuoto permiato neutralizuotais preparatais įtaka sveikų ir užkręstų kviečių daigumui (daiginta kambario temperatūroje 3 paras).

### 3.4.2. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuoti arabinogalaktano preparatai

Šiame etape vertintas PRB fermentuotų arabinogalaktano preparatų, kuriems ruošti buvo naudojamas skirtingas šio polisacharido kiekis (0,1 g ir 0,5 g), poveikis salyklinių miežių daigumui (po 3 parų trukusio grūdų daiginimo), lyginant su kontroliniu mėginiu (grūdų apdorojimui naudotas vanduo). Tyrimo metu buvo pasirinktas skirtingas grūdų apdorojimo būdas. Pirmuoju atveju grūdų apvoliojimas vykdytas mirkant juos preparatuose 15 min., antruoju atveju – apipurškiant grūdus preparatais prieš daiginimą. Papildomai buvo matuojamas daigelių aukštis po 7 parų daiginimo.

*Miežių daigumas I atvejas.* Apdorojus salyklinius miežius PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatais, ruoštais su skirtingas šio polisacharido kiekiais, (0,1 g ir 0,5 g) beveik visais atvejais buvo stebimas miežių daigumo mažėjimas, išskyrus preparatą, kurio paruošimui buvo naudota 0,5 g arabinogalaktano be fermentinio apdorojimo (daigumas išliko toks pat, lyginant su kontroliniu mėginiu). Didžiausiu neigiamu poveikiu salyklinių miežių daigumui, lyginant su kontrole, pasižymėjo preparatas, kuriam ruošti buvo naudotas 0,1 g arabinogalaktano be fermentinio apdorojimo: daigumas tiriamuose grūdų mėginiuose nustatytas 13 % mažesnis nei tiriant kontrolinius mėginius (18 pav.).

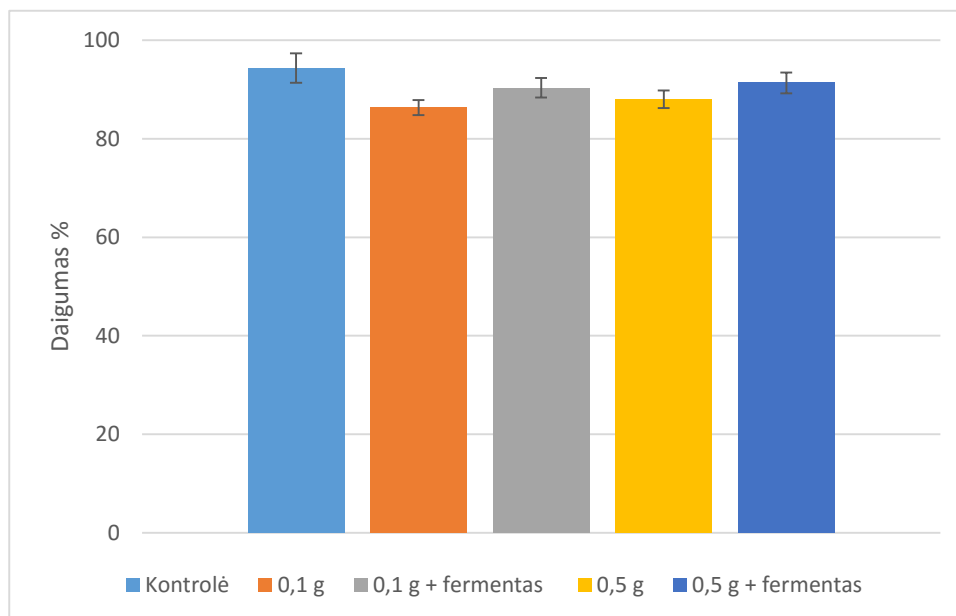


**18 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) arabinogalaktano preparatais (hidrolizuotais ir be apdorojimo fermentais) įtaka miežių grūdų daigumui (daiginta kambario temperatūroje temperatūroje 3 paras).

*Miežių daigumas II atvejis.* Apvoliojant salyklinius grūdus (be išlaikymo preparate) taip pat buvo stebimas miežių daigumo sumažėjimas. Labiausiai miežių daigumą mažino preparatas, kurio sudėtyje buvo 0,1 g šio polisacharido ir jam nebuvo taikomas fermentinis

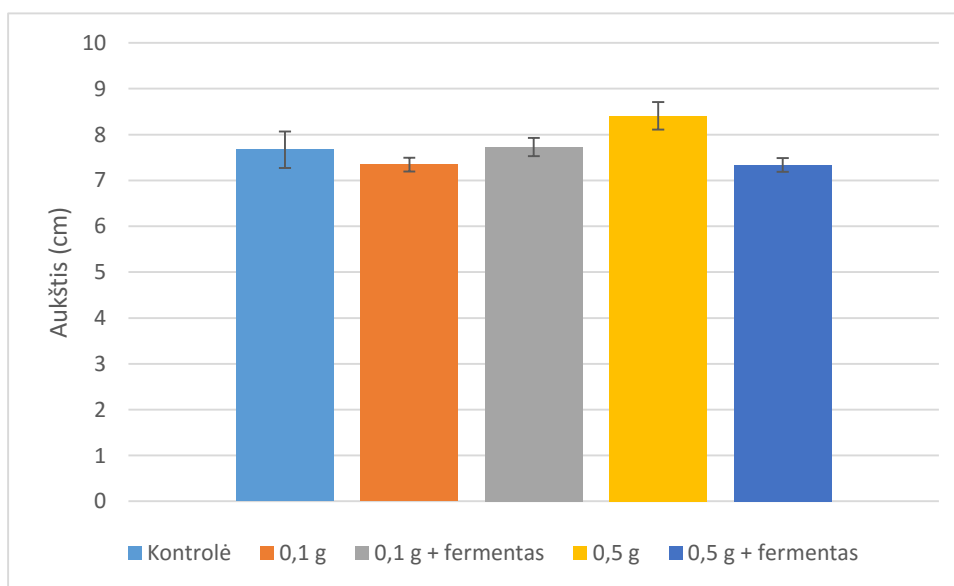
apdorėjimas. Šiuo preparatu apdorotų miežių daigumas buvo 8 % mažesnis nei kontrolinių grūdų (19 pav.).

Kito eksperimento metu PRB fermentuotų arabinogalaktano preparatų poveikis salyklinių grūdų daigumui buvo vertintas pagal daigelių aukštį.



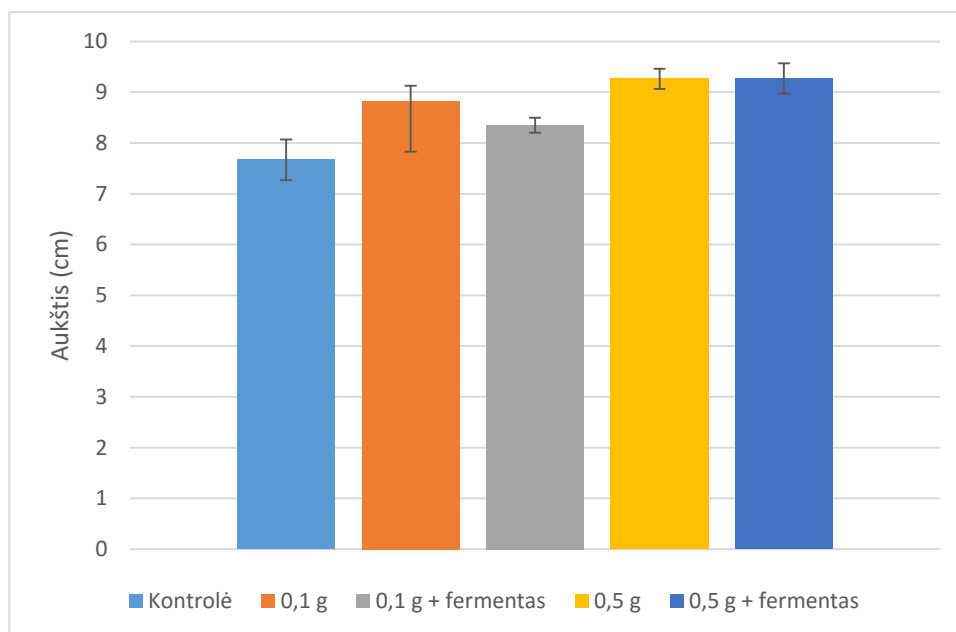
**19 pav.** Grūdų apvoliojimo (be išlaikymo) arabinogalaktano preparatais (hidrolizintais ir be apdorėjimo fermentais) įtaka salyklinių miežių daigumui (daiginta kambario temperatūroje 3 paras).

*Daigelių aukštis I atvejis.* Įvertinus miežių daigelių aukštį, kai grūdų apvoliojimo trukmė prieš daiginimą PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatais buvo 15 min (daiginimo trukmė 7 paras), statistiškai reikšmingų pokyčių nepastebėta. Tik vienas preparatas, kuriam ruošti buvo naudota 0,5 g arabinogalaktano be fermentinio apdorėjimo padidino daigelių aukštį 9 % (20 pav).



**20 pav.** Grūdų apvoliojimo (trukmė 15 min) arabinogalaktano preparatais (hidrolizintais ir be apdorėjimo fermentais) įtaka salyklinių miežių grūdų daigelių aukščiui (daiginta kambario temperatūroje 7 paras).

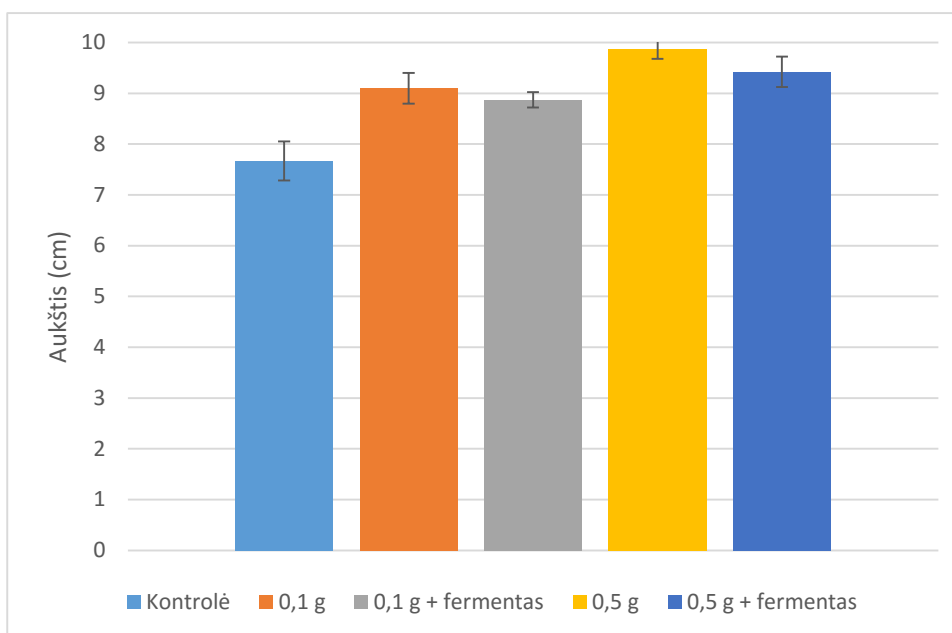
*Daigelių aukštis II atvejis.* Antrojo tyrimo metu apdorojimui pasirinktas grūdų apipurškimas po 3 parų daiginimo, daiginimo pradžioje jų neapdorojus ir daiginta iš viso 7 paras. Įvertinus rezultatus, pastebėtas didesnis teigiamas preparatų poveikis. Visi PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatai didino miežių daigelių aukštį, tačiau didžiausiu teigiamu poveikiu daigelių aukščiui pasižymėjo PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatai, kuriems ruošti buvo naudojami didesni šio polisacharido kiekiai (0,5 g). Šie preparatai padidino daigelių aukštį vidutiniškai 21 %. (21 pav.).



**21 pav.** Grūdų apipurškimo (po 3 parų daiginimo) arabinogalaktano preparatais (hidrolizintais ir be apdorojimo fermentais) įtaka salyklinių miežių grūdų daigelių aukščiui (laikant 25°C temperatūroje 7 paras).

*Daigelių aukštis III atvejis.* Panašūs rezultatai buvo gauti ir trečiojo tyrimo metu, kai grūdai buvo apipurškiami PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatais daiginimo pradžioje ir pakartotinai po 3 dienų daiginimo, daiginta iš viso 7 paras. Daigelių aukštį didino visi preparatai, bet geriausiu poveikiu pasižymėjo PRB fermentuoto arabinogalaktano preparatai, kurių sudėtyje buvo 0,5 g arabinogalaktano tiek prieš fermentaciją veikto fermentiniu preparatu, tiek nehidrolizinto. Daigelių aukštis padidėjo vidutiniškai 25 % (22 pav.).





**22 pav.** Grūdų apipurškimo (prieš daiginimą ir po 3 parų daiginimo) arabinogalaktano preparatais (hidrolizintais ir be apdorojimo fermentais) įtaka salyklinių miežių grūdų daigelių aukščiui (laikant 25°C temperatūroje 7 paras).

Palyginus skirtingus apdorojimo būdus daigelių aukščiui didinti, geriausi rezultatai gauti apipurškus grūdus daiginimo pradžioje ir pakartotinai apdorojus po 3 daiginimo parų (iš viso daiginta 7 paras), nes šio tyrimo metu, naudojant preparatą, kuriam paruošti naudota 0,5 g arabinogalaktano, prieš fermentaciją neveikto fermentiniu preparatu, daigelių aukštis padidėjo 25 % (22 pav.).

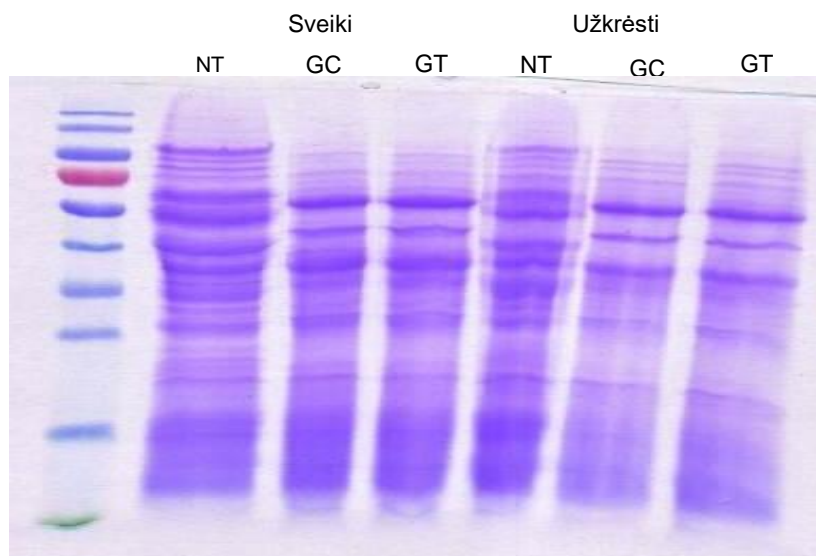
Vykdyto tyrimo metu nustatyta, kad naudojant preparatus (šiuo atveju fermentuotą arabinogalaktaną) iš kurių nepašalintos PRB ląstelės, tokie preparatai turi neigiamą poveikį grūdų daigumui, tačiau padidėja daigelių aukštis. Literatūroje nėra daug duomenų apie PRB biopreparatų panaudojimą javų grūdų daigumo pagerinimui. Galima rasti informacijos apie tai, kad PRB kaip pradinės kultūros savyklų gaminimo metu efektyviai prisideda prie miežių daigumo [49], tačiau konkrečių rezultatų nėra pateikta. Iš kitų tyrėjų atliktų tyrimų galima rasti rezultatų apie teigiamą biopreparatų, kurių sudėtyje yra PRB, poveikį saulėgrąžų sėklų daigumui [67], taip pat apie teigiamą efektyvių mikroorganizmų preparatų (sudarytų pagrinde iš PRB, fotosintetinių bakterijų, mielių ir aktinomicetų, kurie randami dirvožemyje) panaudojimą žirnių, pipirų, pomidorų, agurkų, kukurūzų, morkų, pupelių sėklų daigumo pagerinimui [68].

Atliktų tyrimų metu gautus rezultatus patvirtina Supronienės ir kt. [64] laboratorinėmis sąlygomis atliktų tyrimų rezultatai. Jų metu grūdų daigumo pagerinimui naudojant grynas PRB (*P. pentosaceus* KTU-7, *P. acidilactici* KTU-8 ir KTU-9, bei *L. sakei* KTU-6 ir *P. acidilactici* KTU-10) kultūras arba jų mišinius nustatyta, kad *L. sakei* KTU-6, *P. pentosaceus* KTU-7 ir *P. acidilactici* KTU-10 neigiamai veikė sėklų daigumą.

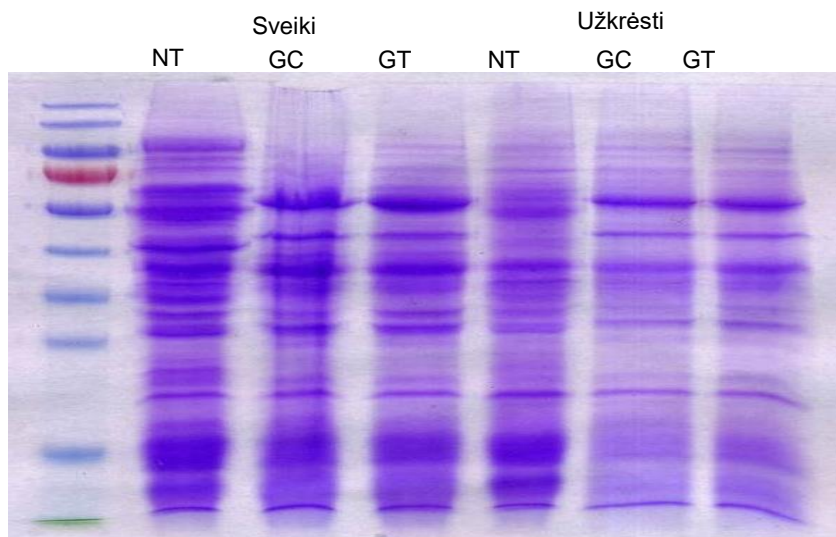
### 3.5. Grūdų apdorojimo PRB fermentuotu permiatu poveikis grūdų baltymų pokyčiams

Šio tyrimų etapo tikslas buvo nustatyti ar grūdų apdorojimas PRB fermentuoto permiato preparatais turi įtakos baltymų pokyčiams prieš ir po apdorojimo.

*Miežiai.* Atliktos elektroforezės rezultatai parodė, kad apdorojimas KTU-7 (23 pav.) ir KTU-8 (24 pav.) fermentuotu permiatu neturėjo reikšmingos įtakos sveikų ir pažeistų salyklinių miežių grūdų baltymų pokyčiams.

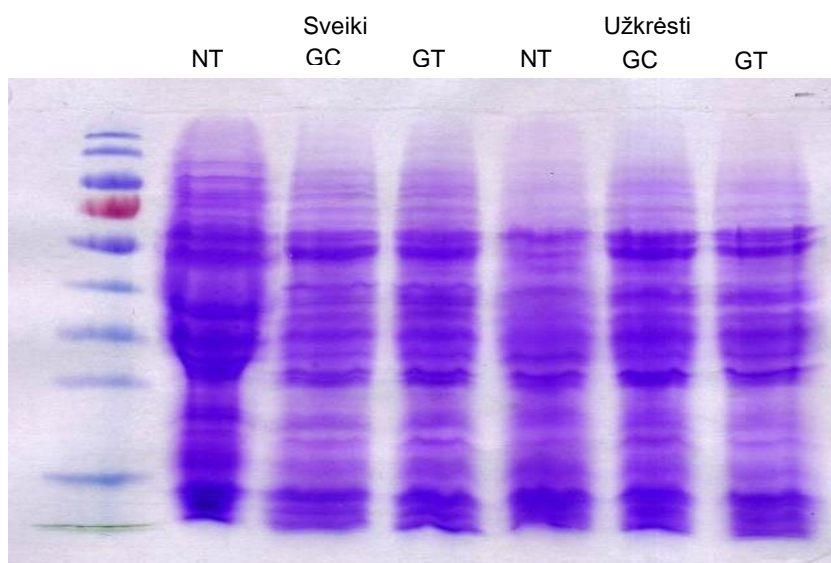


**23 pav.** Sveikų ir mikroskopiniais grybais užkrėstų miežių baltymų ekstrakcija. NT-be apdorojimo nedaiginti, GC- daiginti be apdorojimo, GT- daiginti, apdoroti KTU-7 fermentuotu permiatu.

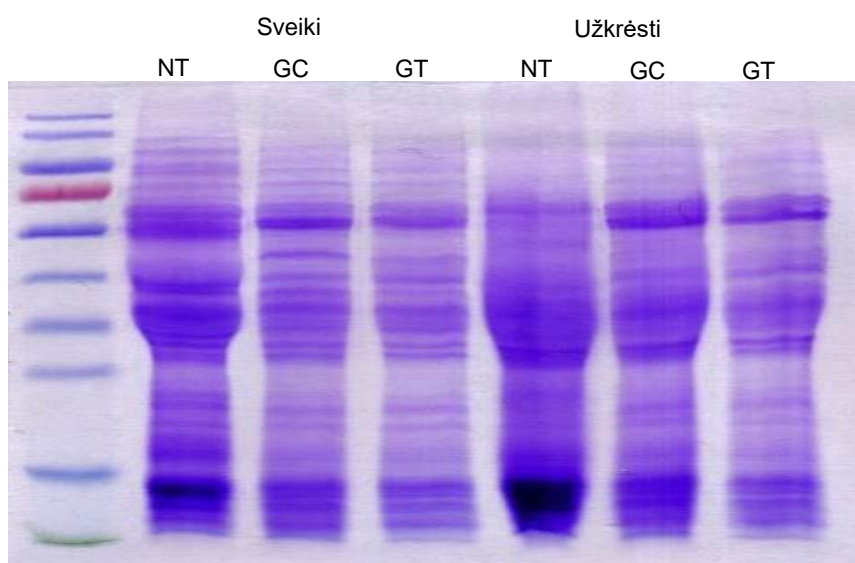


**24 pav.** Sveikų ir mikroskopiniais grybais užkrėstų miežių baltymų ekstrakcija. NT-be apdorojimo nedaiginti, GC- daiginti be apdorojimo, GT- daiginti, apdoroti KTU-8 fermentuotu permiatu .

*Kviečiai.* Įvertinus PRB fermentuoto permiato įtaką sveikų bei užkrėstų kviečių grūdų baltymų pokyčiams, taip pat nebuvo fiksuota jokių reikšmingų pokyčių nei apdorojus KTU-7 (25 pav.) fermentuotu permiatu, nei apdorojus KTU-8 (26 pav.) fermentuotu permiatu.



**25 pav.** Sveikų ir mikroskopiniais grybais užkrėstų kviečių baltymų ekstrakcija. NT-be apdoravimo nedaiginti, GC- daiginti be apdoravimo, GT- daiginti, apdoroti KTU-7 fermentuotu permiatu .



**26 pav.** Sveikų ir mikroskopiniais grybais užkrėstų miežių baltymų ekstrakcija. NT-be apdoravimo nedaiginti, GC- daiginti be apdoravimo, GT- daiginti, apdoroti KTU-8 fermentuotu permiatu .

Kitų autorių tyrimai nesutampa su šio eksperimento metu gautais rezultatais.

Fluorescencinės mikroskopijos tyrimai, naudojant „Calcofluor“ ir Kongo raudonąjį fluorochromus salyklo ir misos komponentų dažymui, parodė intensyvų baltymų ir ląstelės sienelės  $\beta$ -gliukanų irimą, kai buvo naudojamos PRB [49].

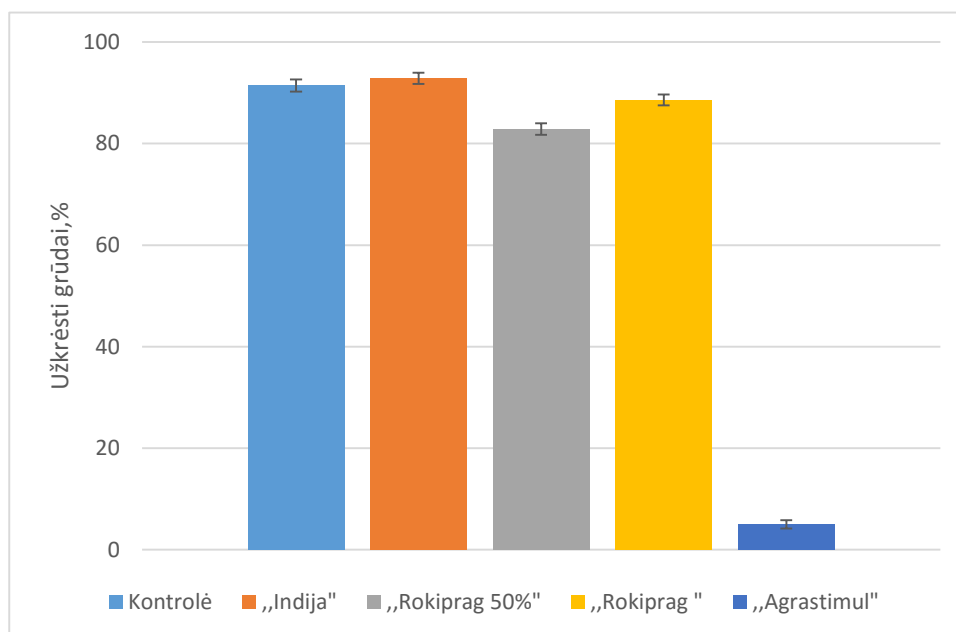
Literatūroje randama duomenų apie bakterijų, naudotų maisto produktų fermentavimui gebėjimą statistiškai reikšmingai padidinti juose laisvų amino rūgščių kiekį, kadangi

fermentacijos metu naudojami mikroorganizmai, pasižymintys fermentiniu aktyvumu, išskiria hidrolizinius fermentus, kurie skaido sudėtinius baltymus į paprastesnius baltymus, peptidus ir amino rūgštis [69, 70].

### 3.6. Bioflavonoidų panaudojimo galimybės salyklinių grūdų taršos mažinimui

Šiame etape buvo vertinamas neskiestų bioflavonoidų preparatų „Indija“, „Rokiprag 50 %“, „Rokiprag“ ir „Agrastimul“ poveikis salyklinių miežių mikrobiologinės taršos mažinimui.

Didžiausias teigiamas salyklinių miežių biologinės taršos mažinimas nustatytas „Agrastimul“ preparato (27 pav.). Salyklinių miežių biologinė tarša, apdorojus „Agrastimul“ preparatu, sumažėjo 93 % lyginant su kontroliniu variantu, vertinant po keturių parų išlaikymo, tuo tarpu išlaikius lėkšteles ilgiau (7 paras) preparato slopinamasis poveikis šiek tiek mažėjo.



**27 pav.** Bioflavonoidų preparatų „Indija“, „Rokiprag 50 %“, „Rokiprag“ ir „Agrastimul“ poveikis salyklinių miežių biologinės taršos mažinimui. Išlaikyta 2 val. koncentruotame preparate. Petri lėkštelės inkubuotos 4 paras 25 °C temperatūroje



**28 pav.** Koncentruoto bioflavonoidų preparato „Agrastimul“ fungistatinis poveikis. Neapdoroti grūdai (viršuje) ir apdoroti preparatu grūdai (apačioje). Salyklinių miežių grūdai inkubuoti 25 °C temperatūroje, 7 paras

### 3.7. Grūdų apdorojimo bioflavonoidų preparatais antimikrobinis poveikis

Įvertinus bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ antimikrobinį poveikį galimiems fitopatogenams (3 lentelė.), nustatyta, kad 0,5 ir 1 % bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ tirpalai nepasižymėjo antigrybiniu poveikiu indikatoriniams mikroorganizmams – *F. saloni*, *P. verrucosum*, *Asp. versicolor*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium*, *Asp. tereus*, *A. alternata*, *P. expansum*, *A. niger* ir *F. culmorum*. Tačiau, 10 % šių bioflavonoidų kompleksų tirpalai pasižymėjo fungistatiniu poveikiu prieš *Asp. versicolor* ir *Asp. tereus* mikroskopinius grybus, t.y. slopino šių grybų augimą, bet visiškai jų nesustabdė. Kadangi skiesti preparatai nepasižymėjo stipriu antimikrobinu poveikiu indikatoriniams mikroorganizmams, todėl papildomai atlikti neskiestų preparatų antimikrobinio poveikio tyrimai. Bioflavonoidų kompleksai „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ pasižymėjo fungistatiniu poveikiu *Asp. versicolor* ir *Asp. tereus* mikroskopinių grybų augimui

**3 lentelė.** Bioflavonoidų kompleksų antimikrobinis poveikis mikroskopiniams grybams

Preparato konc. Indikatoriniai mikroorganizmai	0,5 ir 1 %	10 %		Neskiestas preparatas	
	A, B	A	B	A	B
<i>F. saloni</i>	–	–	–	–	–
<i>P. verrucosum</i>	–	–	–	–	–
<i>Asp. versicolor</i>	–	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i>	–	–	–	–	–
<i>P. cyclopium</i>	–	–	–	–	–
<i>Asp. tereus</i>	–	+	+	+	+
<i>A. alternata</i>	–	–	–	–	–
<i>P. expansum</i>	–	–	–	–	–
<i>A. niger</i>	–	–	–	–	–
<i>F. culmorum</i>	–	–	–	–	–

A - „Indija“, B - „Rokiprag 50 %“

(–) poveikiu nepasižymėjo; (+/-) silpnas fungistatinis poveikis; (+) stipresnis fungistatinis poveikis, (++) fungistatinis poveikis ir silpnas fungicidinis poveikis; (+++) fungicidinis poveikis

Sekančio etapo metu tirta bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ antimikrobinis poveikis įvairioms mielėms, kuris pateiktas 4 lentelėje. Bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ skirtingų koncentracijų (0,5; 1,0 ir 10 %) tirpalai antimikrobinu

poveikiu tiriamoms mielėms nepasižymėjo. Vertinant neskiestų preparatų poveikį, nustatyta, kad bioflavonoidų kompleksai „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ visiškai neslopino testuotų mielių

**4 lentelė.** Bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ antimikrobinis poveikis įvairioms mielėms

Preparato konc.	0,5%	1 %	10%	Neskiestas preparatas
	A,B	A, B	A, B	A, B
Indikatorinis mikroorganizmas				
<i>Aureobasidium pullans</i>	–	–	–	–
<i>Candida kruisii</i>	–	–	–	–
<i>Candida pelliculosa</i>	–	–	–	–
<i>Debaryomyces vanrijae</i>	–	–	–	–
<i>Geotrichum fermentans</i>	–	–	–	–
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	–	–	–	–
<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	–	–	–	–
<i>Pichia farinosa</i>	–	–	–	–
<i>Pichia fermentans</i>	–	–	–	–
<i>Pichia membranaefaciens</i>	–	–	–	–
<i>Rhodotorula rubra</i>	–	–	–	–
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	–	–	–	–
<i>Rhodotorula rubra</i> M8	–	–	–	–
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	–	–	–	–
<i>Kluyveromyces lactis var. lactis</i>	–	–	–	–

Papildomai įvertinta įvairių bioflavonoidų kompleksų „Indija“, „Rokiprag 50 %“, antimikrobinis poveikis įvairioms bakterijoms (5 lentelė). Bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“, 0,5 ir 1 % tirpalai antimikrobinio poveikiu tiriamoms bakterijoms nepasižymėjo. Tiriant neskiestų bioflavonoidų kompleksų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ antimikrobinį poveikį indikatoriniams mikroorganizmams, dėl didelio tirpalų tirštumo (kas stabdo ekstrakto difuziją agaru) eksperimentas atliktas diskelių metodu. Stipriausias preparatų „Indija“ ir „Rokiprag 50 %“ poveikis nustatytas prieš *P. facilis* ir *P. aureofaciens* (slopinimo zonų skersmuo atitinkamai buvo  $8,0 \pm 0,8$  ir  $9,0 \pm 0,8$  bei  $10,0 \pm 2,2$  ir  $13,5 \pm 1,3$ ).

**5 lentelė.** Bioflavonoidų kompleksų antimikrobinis poveikis bakterijoms (slopinimo zonos skersmuo agaro terpėje, mm)

Preparato konc., %	Difuzijos į agarą metodu (200 µl)			Diskelių metodu (10 µl)	
	0,5	1	10	Neskiestas preparatas	
	A, B	A, B	A, B	A	B
Indikatorinis mikroorganizmas					
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	–	–	–	–	$8,5 \pm 1,3$
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (sporos)	–	–	–	–	$7,8 \pm 1,0$

**5 lentelės tęsinys.** Bioflavonoidų kompleksų antimikrobinis poveikis bakterijoms (slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje, mm)

<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	–	–	–	–	10,5±1,3
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (sporos)	–	–	–	–	8,0±0,8
<i>P. gladioli</i> pv. <i>aliicola</i> 3.1	–	–	–	–	–
<i>P. cepacia</i> 1.1	–	–	–	–	9,0±1,0
<i>P. fluorescens</i> biovar. V 3.3	–	–	–	–	–
<i>P. marginalis</i> 3.5	–	–	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> biovar V 1.2	–	–	–	–	–
<i>P. facilis</i> 4.1	–	–	–	8,0±0,8	9,0±0,8
<i>P. aureofaciens</i> biovar. III 2.4.1	–	–	–	10,0±2,2	13,5±1,3
<i>P. marginalis</i> 4.2	–	–	–	–	–
<i>P. cichorii</i> 7.3.1	–	–	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> biovar III 2.1.1.1.1	–	–	–	–	–

A - „Indija“, B - „Rokiprag 50 %“,  
(-) poveikiu nepasižymėjo;



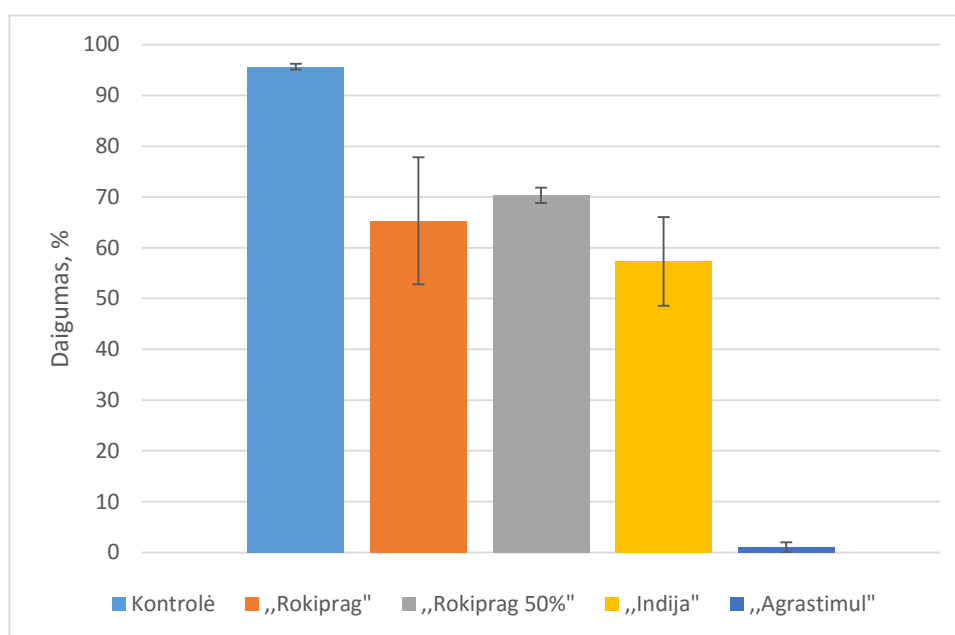
**29 pav.** Neskiesto preparato „Indija“ antimikrobinis poveikis prieš *P. facilis* 4. (Petri lėkštelių viršuje) ir 10 % jų tirpalų poveikis (Petri lėkštelių apačioje) bakterijoms, po 2 parų, 25 °C temperatūroje ant MPGA terpė

### 3.8. Apdoravimo bioflavonoidų preparatais įtaka grūdų daigumui

Šio etapo metu buvo tiriamas visų turimų bioflavonoidų preparatų poveikis salyklinių miežių daigumui.

Išryškėjo neigiamas neskiestų bioflavonoidų preparatų „Indija“, „Rokiprag 50 %“, „Rokiprag“ ypač „Agrastimul“ poveikis salyklinių miežių daigumui (30 pav.). Apdorojus

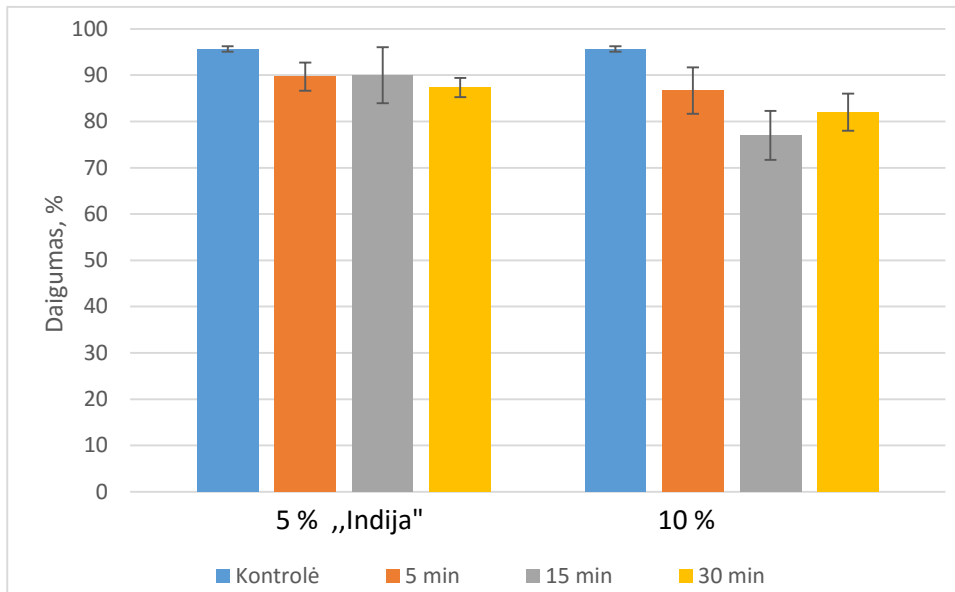
salyklinius miežius neskiestais bioflavonoidų preparatais „Indija“, „Rokiprag 50 %“, „Rokiprag“ ir „Agrastimul“, miežių daigumas sumažėjo, atitinkamai, 32, 27, 40 ir 99 %.



**30 pav.** Bioflavonoidų preparatų „Indija“, „Rokiprag 50 %“, „Rokiprag“ ir „Agrastimul“ (neskiestų tirpalų) įtaka salyklinių miežių daigumui po 3 parų daiginimo

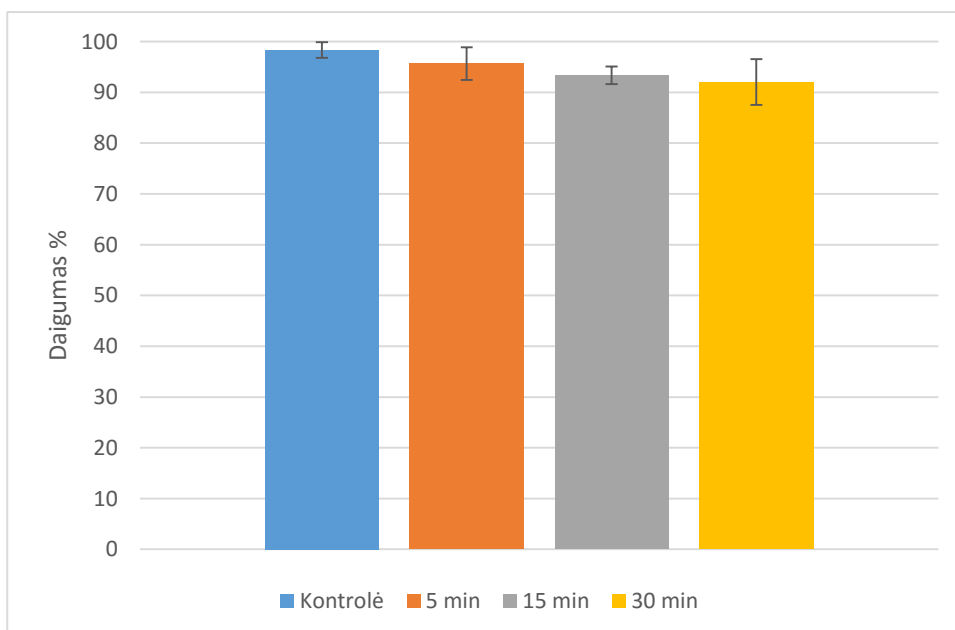
*Bioflavonoidų komplekso „Indija“ įtaka salyklinių miežių daigumui ir dygimo galiai, naudojant skirtingas preparato koncentracijas ir skirtingą apdorojimo trukmę.* Šio etapo tikslas buvo nustatyti toksifolino preparato „Indija“ įtaką salyklinių miežių daigumui ir dygimo galiai, naudojant skirtingas preparato koncentracijas ir skirtingą apdorojimo trukmę. Tam salykliniai miežiai buvo apdorojami toksifolino preparatu „Indija“, naudojant 5 % ir 10 % preparato koncentracijas ir išlaikant 5 min., 15 min., ir 30 min. Kontroliniai mėginiai įvertinti be preparato apdorojimo. Miežiai daiginti 3 paras, 25 °C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti 31 pav. Nepaisant didesnės preparato koncentracijos ir ilgesnio apdorojimo laiko, preparato panaudojimas visais atvejais mažino miežių daigumą. Didžiausias daigumo sumažėjimas, apdorojus grūdus 5 % preparatu, buvo stebimas mėginyje, kuris buvo ilgiausiai apdorojamas (30 min), daigumas sumažėjo vidutiniškai 10 %. Apdorojus grūdus didesnės koncentracijos tirpalu (10 %), taip pat buvo stebimas daigumo sumažėjimas, tačiau preparato poveikis buvo stipresnis ypatingai mėginyje, kurio apdorojimo trukmė buvo 15 min. Šiame mėginyje daigumas sumažėjo vidutiniškai 19 %.





**31 pav.** Neapdorotų ir apdorotų miežių daigumas apdorojus 5 % ir 10 % koncentracijos preparatu, kai apdoravimo trukmė 5, 15 ir 30 min., laikant 25 °C temperatūroje 62 valandas (Preparatas „Indija“)

Kadangi didesnės „Indija“ preparato koncentracijos mažino salyklinių miežių daigumą ir šis mažėjo priklausomai nuo apdoravimo trukmės, papildomai buvo įvertinta šio bioflavonoidų kompleksų preparato (1 % tirpalo) poveikis miežių daigumui, apdorojus grūdus 30 min. ir daiginus tris paras. 1 % koncentracijos preparatas „Indija“ taip pat sumažino miežių daigumą, lyginant su kontroliniu mėginiu, kuris nebuvo apdorotas preparatu, tačiau poveikis buvo silpnesnis nei didesnės koncentracijos tirpalų (5 % ir 10 %). Vidutiniškai daigumas sumažėjo 4 %. (32 pav.).



**32 pav.** Neapdorotų ir apdorotų 1 % koncentracijos preparatu „Indija“ salyklinių miežių daigumas, laikant 25°C temperatūroje 62 valandas.

## IŠVADOS

Atlikus kompleksinius tyrimus, skirtus antimikrobinų pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų bioproduktų su naujomis fermentacijos terpėmis (naudojant arabinogalaktano priedus ir permiatą) vystymui, ir bioflavonoidinių preparatų išbandymui salyklinių miežių ir kviečių mikrobiologinės taršos mažinimui, nustatyta:

1. Pieno rūgšties bakterijų fermentacijos procesams teigiamos įtakos turėjo fermentacijos terpės sudėtis, naudojant jos ruošimui didesnius arabinogalaktano kiekius (be papildomo fermentinio apdoravimo). Permiatas (išrūgų filtratas) buvo tinkama terpė tirtų PRB dauginimuisi, tačiau mažiau efektyvi nei naudojant fermentacijos terpės ruošimui arabinogalaktano priedus.

2. Biopreparatas su arabinogalaktano priedu sumažino (vidutiniškai 36 %) mikrobiologinę salyklinių miežių taršą: (i) nustatytas fungicidinis poveikis prieš *F. poae*, *P. chrysogenum*, ir *P. expansum* genčių mikroskopinius grybus ir (ii) fungistatinis poveikis, slopinantis *Asp. versicolor*, *Penic. cyclopium* ir *Asp. terreus* mikroskopinių grybų augimą.

3. Bioproduktai, pagaminti naudojant arabinogalaktaną, statistiškai reikšmingai padidino (vidutiniškai 25 %) daigelių aukštį, tačiau neturėjo teigiamo poveikio salyklinių grūdų daigumui.

4. *Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 fermentuoto permiato bioproduktai padidino (vidutiniškai 32 %) salyklinių miežių grūdų atsparumą prieš mikroskopinius grybus bei sumažino (24 %) kviečių grūdų mikrobiologinę taršą.

5. Pieno rūgšties bakterijų padermėmis (*Pediococcus acidilactici* KTU-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU-8 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU-9) fermentuoto permiato bioproduktai, apdorojant jais salyklinių kviečių ir miežių grūdus, pagerino užkrėstų salyklinių miežių ir sveikų kviečių daigumą (atitinkamai, 12 % ir 6 %). *Fusarium spp.* užkrėstų kviečių daigumą (vidutiniškai 16 %) daugiausiai pagerino *Pediococcus acidilactici* KTU-7 fermentuotas permiatas.

6. Apdorojimas pieno rūgšties bakterijomis fermentuotu permiatu neturėjo įtakos daigintuose grūduose baltymų pokyčiams.

7. Bioflavonoidų preparatai sumažino salyklinių miežių mikrobiologinę taršą: 10 % šių bioflavonoidų preparatų tirpalai pasižymėjo fungistatinium poveikiu prieš *Asp. versicolor* ir *Asp. terreus* mikroskopinius grybus; koncentruoti bioflavonoidų preparatai taip pat pasižymėjo fungistatinium poveikiu, slopinant mikroskopinių grybų augimą.

8. Salyklinių grūdų, apdorotų bioflavonoidų preparatais, daigumas priklausė nuo bioflavonoidų sudėties ir nuo biologiškai veiklios medžiagos juose koncentracijos.

## LITERATŪROS SARAŠAS

1. MOHANA, D.C. and K. A. RAVEESHA. Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic field and storage fungi. *Journal of Agricultural Technology*, 2008, 4(1), 119-137.
2. PARK, J.W., E.K KIM,. and Y.B KIM. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption. *Food additives and contaminants*, 2004, 21(1), 70-75. ISSN 0265-203X.
3. KOIRALA, P. et al. Occurrence of Aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2005, 59(8), 331-336.
4. DOMIJAN, A., et. al. Fumonisin B1, fumonisin B2, Zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food additives and contaminants*, 2005, 22(7), 677-680. ISSN 0265-203X.
5. ROBERTS, T. A. et al. Cereals and Cereal Products. In International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), eds. *Microorganisms in Foods 6*, 2009, pp 670-745. ISBN 978-0-387-28801-7.
6. HOCKING, A.D. Microbiological facts and fictions in grain storage ochratoxin A. In E.J. Wright, M.C. Webb and E. Highley, ed., *Stored grain in Australia*, 2003, pp 55-58. ISBN 0 643 06945 3.
7. KALETA A. and K. GORNICKI. Criteria of Determination of Safe Grain Storage Time. In, Stanisław Grundas, ed. *Advances in Agrophysical Research InTech*, [interaktyvus]. 2013, pp. 295-318 [žiūrėta 2016-04-22]. ISBN 978-953-51-1184-9. Prieiga per: doi: 10.5772/52235
8. CHHOKAR, R.S., Development and use of herbicides. *Pesticides Information*, 2001, 27, 25-27.
9. ASHIQ S. Natural Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed: Pakistan Perspective. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. [interaktyvus] 2015, 14(2), 159–175. [žiūrėta 2016-05-01]. Prieiga per doi: 10.1111/1541-4337.12122
10. ATANDA O et al.. Fungal and mycotoxin contamination of Nigerian foods and feeds. In: Makun HA, ed. *Mycotoxin and food safety in developing countries*, [interaktyvus]. 2013, p 3–38. [žiūrėta 2015-08-22]. ISBN 978-953-51-1096-5. Prieiga per: doi: 10.5772/3414
11. LACA, A., et al. Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*. 2006, 72 (4), 332-338, ISSN 0260-8774.

12. BROOKS, M.A. General relationships between microorganisms and insects, in Proceedings, Symposium on Biological Contamination of Grain and Animal Byproducts, University of Minnesota, Minneapolis, MN, 1969, pp. 17–20.
13. FUNG, D.Y.C. Microbiological considerations in freezing and refrigeration of bakery foods. In: K. Kulp, K. Lorenz and J. Brummer eds., *Frozen and Refrigerated Doughs and Batters*, 1995, pp. 119–254. ISBN 9780913250884
14. DWARAKANATH, C.T., E.T. RAYNER, G.E. MANN, and F.G DOLLEAR. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1968, 45(2), 93-95. ISSN 1558-9331
15. SUNDSTOL ERIKSEN G, H. PETTERSSON, T. LUNDH. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. In: Domingo L. J. ed. *Food and Chemical Toxicology*. [interaktyvus] sciencedirect, 2004, 42(4), 619–624 [žiūrėta 2016-04-03]. ISSN 0278-6915. Prieiga per doi: 10.1016/j.fct.2003.11.006.
16. KHADRE M. A., A. E. YOUSEF, J. G. KIM. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. In: E. Allen Foegeding, ed. *Journal of Food Science*. [interaktyvus] 2001, 66(9), 1242-1252. [žiūrėta 2016-04-11]. ISSN 1750-3841 Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x
17. GELDERBLOM W.C.A., et al. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. In: Domingo L. J. ed. *Food and Chemical Toxicology*, [interaktyvus]1993, 31(4), 407-414. [žiūrėta 2016-03-02]. ISSN 0278-6915 Prieiga per doi: 10.1016/0278-6915(93)90155-R.
18. McKenzie, K.S., et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. In: Domingo L. J. ed. *Food and Chemical Toxicology*, [interaktyvus]. 1997, 35, 807–20. [žiūrėta 2016-03-23]. ISSN 0278-6915. Prieiga per doi:10.1016/S0278-6915(97)00052-5.
19. FERSE I, et al. Structural elucidation of T-2 toxin thermal degradation products and investigations toward their occurrence in retail food. In: Thomas F. Hofmann ed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [interaktyvus] 2009, 57(5), 1867-75. [žiūrėta 2016-03-05]. ISSN 1520-5118 Prieiga per doi: 10.1021/jf803516s.
20. SINGH A., S. BAJAR, and N. R. BISHNOI. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their coculture. In: Huang Z. et. al. eds. *Fuel. The Science and Technology of Fuel and Energy*. [interaktyvus] 2014, 116, 699–702 [žiūrėta 2016-04-15] ISSN 0016-2361. Prieiga per doi: doi:10.1016/j.fuel.2013.08.072

21. WAGEHA A. A. et al. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. In: *Food Additives & Contaminants: Part A*, [interaktyvus] 2010, 27(4), 510-520 [žiūrėta 2016-05-04] ISSN 1944-0057. Prieiga per doi: 10.1080/19440040903571747
22. GOWDA N.K.S., H.V.L.N. SWAMY and P. MAHAJAN. Recent Advances for Control, Counteraction and Amelioration of Potential Aflatoxins in Animal Feeds,. In: Mehdi Razzaghi-Abyaneh, ed. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. [interaktyvus]. InTech, 2013, pp. 129-140 [žiūrėta 2016-05-22]. Prieiga per: doi: 10.5772/51779
23. PERAICA M., et al. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2002, 53(3): 229–237.
24. PHILLIPS T.D., B.A. CLEMENT, D.L. PARK. Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In: Eaton DL, Groopman JD, eds. *The toxicology of aflatoxins*. 1994, p. 383–406.
25. BASAPPA SC, T. SHANTHA. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds – a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 1996, 33(2). 95-107. ISSN 0022-1155
26. SAMARAJEEWA U., A.C. SEN, M.D. COHEN, C.I. WEI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*. 1990, 53(6), 489–501. ISSN: 1944-9097
27. MURPHY P.A., et al.. Food mycotoxins: an update. In: E. Allen Foegeding ed. *Journal of Food Science*. [interaktyvus] 2006, 71(5), 51–65. [žiūrėta 2016-05-26] ISSN 1750-3841 Prieiga per doi: DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x
28. YOUNG J.C., et al. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical Treatment. In: Thomas F. Hofmann ed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [interaktyvus] 1986, 34, 461–465 [žiūrėta 2016-04-04] ISSN: 1520-5118. Prieiga per doi: 10.1021/jf00069a021
29. HAGLER W.M. Potential for detoxification of mycotoxin- contaminated commodities. In: Bray G, Ryan D, eds. *Mycotoxins, cancer and health*. 1991, 253–269. ISBN 0-8071-1679-3
30. BHAT R., R. V RAI,. and A.A. KARIM. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. [interaktyvus] 2010, 9, 57–81. [žiūrėta 2016-05-11] Prieiga per doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x
31. GAREIS M, J. CEYNOWA. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*.,1994,244–8.

32. GUPTA Y.P. Polluting pesticides. *Science Reporter*. 2001, 14 -15. ISSN: 0036-8512
33. HARRIS C.A., M.J RENFREW, and M.W WOOLRIDGE. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. In: *Food additives and Contaminants*. [interaktyvus] 2001, 18, 1124-1129. [žiūrėta 2016-04-05] ISSN 1944-0057 Prieiga per doi: 10.1080/02652030110050122
34. DABKEVIČIUS Z. ir kt. Fizinių veiksnių ir cheminių priemonių svarba išvengiant vasarinių miežių ligų. *Žemės ūkio mokslai*. 2008, 15(4), 28–34. ISSN 1392-0200
35. BAGEGNI A. M., et al. Viability of *Acremonium coenophialum* in tall fescue seed after ionising radiation treatments. *Crop Science*. 1990, 30, 1272–1275.
36. BLASZCZAK W., et al. Effect of  $\gamma$ -radiation and microwave heating on endosperm microstructure in relation to some technological properties of wheat grain. In: Hans-Ulrich Hump ed. *Molecular Nutrition & Food Research*. [interaktyvus] 2002, 46, 122–129 [žiūrėta 2016-03-02] ISSN: 1613-4133. Prieiga per doi: 10.1002/1521-3803(20020301)46:2<122::AID-FOOD122>3.0.CO;2-J.
37. DABKEVIČIUS Z., J. KREIMERIS. Žieminių kviečių sėklų priešsėjimo veikimo įvairiomis priemonėmis palyginimas. *Augalų apsauga. Mokslinių straipsnių rinkinys*. 1995, 45, 59–70.
38. KARLOVSKY P. Biological Detoxification of Fungal Toxins and its Use in Plant Breeding, Feed and Food Production. *Natural Toxins*. 1999, 7, 1-23. ISSN 1056-9014
39. LAITILA A., et al. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, 93, 566–576. ISSN: 1365-2672.
40. SINKEVIČIENĖ J., J. Pekarskas ir A. Krasauskas. Biologinių produktų poveikis ekologinių žieminių kviečių sėklai. *Žemės ūkio mokslai*. 2015, 22(2), 74–80. ISSN 2424-4120
41. GAURILČIKIENĖ I., S. SUPRONIENĖ, A. RONIS. The impact of the biological agent Biojodis on the incidence of pathogenic fungi in winter wheat and spring barley. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008, 95(3), 406–414. ISSN 1392-3196
42. PEKARSKAS J. ir kt. The effect of biojodis on winter wheat and spring barley organic seed germination and contamination with fungi. *Ekologija*. 2013, 59(2), 77–84. ISSN 2029-0586
43. PEKARSKAS J. Augimo aktyvatoriaus Penergetic-p įtaka ekologiškai auginamiems vasariniams kviečiams. *Žemės ūkio mokslai*. 2012, 19(3), 151–160. ISSN 1392-0200
44. PEKARSKAS J., J. SINKEVIČIENĖ, A. KRASAUSKAS. Influence of biological preparation on viability, germination energy and fungi contamination of organic winter

- rye grain. Rural Development 2009: The Fourth International Scientific Conference Proceedings. 2009, 4(1), 385–389. ISSN 1822-3230.
45. DORNER J.W., R.J. COLE. Effect of application of nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research*. [interaktyvus] 2002, 38(4), 329–39 [žiūrėta 2016-02-15] Prieiga per doi: 10.1016/S0022-474X(01)00035-2.
  46. BAXTER E.D., I.R. SLAIDING, B. KELLY. Behavior of ochratoxin A in brewing. In: Charlie Bamforth ed. *Journal of the ASBC*. [interaktyvus] 2001, 59(3), 98–100. [žiūrėta 2016-03-15] Prieiga per doi: 10.1094/ASBCJ-59-0098.
  47. VAUGHAN A., T. O’SULLIVAN and D. van SINDEREN. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, 111(4), 355–371. Prieiga per doi: DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x
  48. STILES M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. In: *Antonie van Leeuwenhoek*. [interaktyvus] 1996, 70, 331–345. [žiūrėta 2016-04-15] Prieiga per doi: 10.1007/BF00395940
  49. LOWE D. P. and E. K. ARENDT. The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2004, 110(3), 163–180 Prieiga per doi: DOI: 10.1002/j.2050-0416.2004.tb00199.x
  50. KARUNARATNE A., E. NEZENBERS, and L.B. BULLERMAN. Inhibition of mould growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *Journal of Food Protection*. 1990, 53, 230–236. ISSN: 1944-9097.
  51. GOURAMA H. and L.B. BULLERMAN. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*. 1995, 58, 1249–1256. ISSN: 1944-9097.
  52. JUODEIKIENĖ G. et al. Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes. In: Ayman Amer Eissa, ed. *Structure and Function of Food Engineering*. [interaktyvus]. Intech, 2012, pp. [žiūrėta 2016-04-12]. ISBN 978-953-51-0695-1. Prieiga per: doi: 10.5772/46184
  53. Rokių informacija. [interaktyvus] [žiūrėta 2016-05-11]. Prieiga per internetą: <<http://www.rokių.com/lt/informacija>>.
  54. LST EN ISO 712:2010 „Grūdai ir jų produktai. Drėgmės kiekio nustatymas.“ Cereals and cereal products – Determination of moisture content – Reference method (ISO 712:2009). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2010

55. LST EN ISO 4833:2003 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas (ISO 4833:2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C (ISO 4833:2003). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2003.
56. DAPKEVIČIUS Z., I. GAURILČKIENĖ, R. SEMAŠKIENĖ, Varpinių javų ligos. Žemės ūkio augalų kenkėjai, ligos ir jų apskaita. 2002, 80 – 134. ISBN 9986-527-88-0.
57. HAN F. et al. Mapping of  $\beta$ -glucan content and  $\beta$ -glucanase activity loci in barley grain and malt. Theoretical and Applied Genetics. 1995, 91, 921-927.
58. WANG J. The changes of  $\beta$ -glucan content and  $\beta$ -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities. Food Chemistry. [interaktyvus] 2004, 86, 223–228 [žiūrėta 2016-03-15] Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2003.08.020.
59. MARTINEZ F.A.C. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends in Food Science & Technology. 2013, 30, 70-83.
60. BARTKIENE E. et al. The influence of lactic acid fermentation on biogenic amines and volatile compounds formation in flaxseed and the effect of flaxseed sourdough on the quality of wheat bread. LWT - Food Science and Technology. [interaktyvus] 2014, 56, 445-450. [žiūrėta 2016-03-15] ISSN: 0023-6438. Prieiga per doi: doi:10.1016/j.lwt.2013.11.033
61. JUODEIKIENĖ G., et al. Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products. In: Prof. Marian Petre ed. Advances in Applied Biotechnology. [interaktyvus] 2012, 63-100. [žiūrėta 2016-03-15] ISBN 978-953-307-820-5. Prieiga per doi: 10.5772/30692.
62. GARMIENĖ G., M. KULIKAUSKIENĖ, V. SAIKAUSKIENĖ. Probiotinių mikroorganizmų įtaka pieno rūgšties izomerų kiekiui jogurte. *Maisto chemija ir technologija*. 2005, 39(1), 12-15. ISSN 1392-0227.
63. BARTKIENE E. et al. Lactic Acid Fermentation of Tomato: Effects on cis/trans Lycopene Isomer Ratio,  $\beta$ -Carotene Mass Fraction and Formation of L(+)- and D(-)-Lactic Acid. *Food Technol. Biotechnol.* 2013, 51 (4), 471–478. ISSN 1330-9862.
64. SUPRONIENE S. et al. Seed treatment with lactic acid bacteria against seed-borne pathogens of spring wheat. *Biocontrol Science and Technology*, [interaktyvus] 2015 Vol. 25, No. 2, 144–154. [žiūrėta 2016-03-15] Prieiga per doi: 10.1080/09583157.2014.964661.



65. O'MAHONY A., et al., Characterisation of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley. *Journal of the Institute of Brewing*. [interaktyvus] 2000, 106, 403–410. [žiūrėta 2016-04-20] Prieiga per doi: DOI: 10.1002/j.2050-0416.2000.tb00531.x.
66. VAUGHAN A., et al. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *Journal of Applied Microbiology*. [interaktyvus] 2001, 91, 131–138. [žiūrėta 2016-03-28] Prieiga per doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01365.x
67. SEKUTOWSKI T. R. Evaluation of germination capacity and selected biometric parameters (length and dry weight of roots and coleoptile) of sunflower seeds (*Helianthus annuus*) after application of preparations containing effective microorganisms (EM). *Journal of Central European Agriculture*. [interaktyvus] 2015, 16(3), 307-318. [žiūrėta 2016-03-12] Prieiga per doi: 10.5513/JCEA01/16.3.1625.
68. SIQUEIRA M. F. B. Influence of Effective Microorganisms on Seed Germination and Plantlet Vigor of Selected Crops. In: J.F. Parr, S.B. Hornick, M.E. Simpson eds. *Proceedings of the Third Intern. Conf. on Nature Farming* pp. 2015, 22-45.
69. ARORA S., S. JOOD, N. KHETERPAUL. Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures. *Food Chemistry*. [interaktyvus] 2010, 119, 779–784 [žiūrėta 2016-03-12] Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.035.
70. AHMAD G. N., A. E. MUBARAK and A. E. EL-BELTAGY. Nutritional potential and functional properties of tempe produced from mixture of different legumes. 1: Chemical composition and nitrogenous constituent. *International Journal of Food Science and Technology*. [interaktyvus] 2008, 43, 1754–1758 [žiūrėta 2016-03-12] Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01683.x.