



K A R O L I N A T R A K Š E L Y T Ė - R U P Š I E N Ė

**BIOPRIEMONIŲ IR ULTRAGARSO
TAIKYMAS BALTYMŲ
HIDROLIZATŲ IR ANTIMIKROBINIŲ
BIOPRODUKTŲ GAMYBAI IŠ
AUGALINIŲ ŽALIAVŲ PERDIRBIMO
ŠALUTINIŲ PRODUKTŲ
PAPRASTŲJŲ ŽIEMINIŲ KVIEČIŲ
(*Triticum Aestivum*) AUGIMO
SKATINIMUI IR SAUGAI**

D A K T A R O D I S E R T A C I J A

K a u n a s
2 0 2 3

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

KAROLINA TRAKŠELYTĖ-RUPŠIENĖ

BIOPRIEMONIŲ IR ULTRAGARSO
TAIKYMAS BALTYMŲ HIDROLIZATŲ IR
ANTIMIKROBINIŲ BIOPRODUKTŲ
GAMYBAI IŠ AUGALINIŲ ŽALIAVŲ
PERDIRBIMO ŠALUTINIŲ PRODUKTŲ
PAPRASTŲJŲ ŽIEMINIŲ KVIEČIŲ (*Triticum
aestivum*) AUGIMO SKATINIMUI IR SAUGAI

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (T 005)

2023, Kaunas

Disertacija rengta 2019–2023 metais Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Eksperimentas vykdytas glaudžiai bendradarbiaujant su pramonės atstovu – UAB „Nando“ (organizacija, kuri suinteresuota inovacijas diegti praktikoje). Dalis tyrimų atlikta Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre (LAMMC), Genetikos ir fiziologijos laboratorijoje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė:

prof. habil. dr. Gražina JUODEIKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Disertaciją redagavo: anglų kalbos redaktorė Dovilė Blaudžiūnienė (leidykla „Technologija“), lietuvių kalbos redaktorė Rozita Znamenskaitė (leidykla „Technologija“).

Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

prof. dr. Naglis MALYS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005) – **pirmininkas**;

doc. dr. Loreta BAŠINSKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

doc. dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

doc. dr. Dace KLAVA (Latvijos gyvybės mokslų ir technologijų universiteto Maisto technologijų fakultetas, Latvija, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

prof. dr. Aušra ŠIPAILIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Disertacija bus ginama viešame chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2023 m. birželio 5 d., 13:00 val., Kauno technologijos universiteto „Santakos“ slėnyje, A228 posėdžių kambaryje.

Adresas: K. Baršausko g. 59, Kaunas, LT-51423, Lietuva

Tel.: (+370) 608 28 527; el. paštas doktorantura@ktu.lt

Disertacija išsiųsta 2023 m. gegužės 5 d.

Su disertacija galima susipažinti internetinėje svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, Kaunas, LT-44239, Lietuva).

KAUNAS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

KAROLINA TRAKŠELYTĖ-RUPŠIENĖ

APPLICATION OF BIOTOOLS AND
ULTRASOUND TREATMENT FOR
VALORIZATION OF PLANT-BASED FOOD
PROCESSING BY-PRODUCTS INTO PROTEIN
HYDROLYZATES AND ANTIMICROBIAL
BIOPRODUCTS TO IMPROVE THE GROWTH
AND SAFETY OF WINTER WHEAT (*Triticum
aestivum*)

Doctoral dissertation
Technological Sciences, Chemical Engineering (T 005)

2023, Kaunas

This Doctoral dissertation was prepared at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Department of Food Science and Technology during years 2019–2023. A part of the research was performed in collaboration with industry – „Nando“ and at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. The studies were supported by Research Council of Lithuania.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Hab. Gražina JUODEIKIENĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005)

The dissertation was edited by: English language editor Dovilė Blaudžiūnienė (Publishing House *Technologija*), Lithuanian language editor Rozita Znamenskaitė (Publishing House *Technologija*)

Dissertation Defense Board of Chemical Engineering Science Field:

Prof. Dr. Naglis MALYS (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005) – **chairperson**;

Assoc. Prof. Dr. Loreta BAŠINSKIENĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005);

Assoc. Prof. Dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Chemistry, N 003);

Assoc. Prof. Dr. Dace KLAVA (Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Food Technology, Latvia, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005);

Prof. Dr. Aušra ŠIPAILIENĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005).

The public defense of the dissertation will be held at 1 p.m. on 5 June, 2023 at the public meeting of Dissertation Defense Board of Chemical Engineering Science Field Hall at Santaka Valley, Kaunas University of Technology.

Address: K. Baršausko 59, Kaunas, LT-51423, Lithuania

Phone: (+370) 608 28 527; e-mail doktorantura@ktu.lt

Doctoral dissertation was sent on 5 May, 2023.

The doctoral dissertation is available on the internet <http://ktu.edu> and at the library of Kaunas University of Technology (Donelaičio 20, Kaunas, LT-44239, Lithuania).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	7
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Biostimuliatorių gamyba iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų..	13
1.1.1. Biostimuliatoriai ir jų gamybos tvarumo principas.....	13
1.1.2. Baltyminių žaliavų šaltiniai hidrolizatų gamybai.....	15
1.2. Biostimuliatoriai iš baltyminėmis medžiagomis turtingų šalutinių produktų ...	17
1.2.1. Baltymų hidrolizatai	18
1.2.2. Aminorūgštys	19
1.3. Biomasės perdirbimas į baltyminius biostimuliacinius.....	19
1.4. Bioproduktų su biologinėmis apsauginėmis funkcijomis kūrimo strategija.....	22
1.4.1. <i>Fusarium</i> spp. tarša javuose: DON ir DON konjuguotos formos.....	22
1.4.2. Mikotoksinų kontrolės strategijos	24
1.4.3. Biokontrolės priemonės mikotoksinų prevencijai	25
1.5. Ultragarso apdorojimo taikymas bioprocesuose	28
1.5.1. Ultragarso poveikis fermentinės hidrolizės procesui.....	28
1.5.2. Ultragarso poveikis baltymų funkcionalumo didinimui	30
1.5.3. Ultragarso poveikis mikrobinės fermentacijos procesui.....	31
1.6. Baltymų hidrolizatų įvertinimas ir jų veikimo mechanizmas	33
1.6.1. Baltymų pagrindu pagamintų biostimuliatorių efektyvumo kriterijai	33
1.6.2. Baltyminių biostimuliatorių veikimo mechanizmas	34
1.7. Augalų atsakas į biostimuliatorių poveikį	36
1.7.1. Augalų fiziologija ir metabolizmas	36
1.7.2. Augalų apsauga nuo abiotinio ir biotinio streso	37
1.7.3. Biostimuliatorių naudojimo būdai	39
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas	40
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI.....	42
2.1. Tyrimų objektai	42
2.1.1. Medžiagos, mikroorganizmai ir fermentai tyrimų objektams ruošti	42
2.1.2. Ultragarsu apdorotų mėginių paruošimo sąlygos	45
2.1.3. Baltymų hidrolizatų iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų paruošimas	46
2.1.4. PRB fermentuotų mėginių paruošimo sąlygos	47
2.1.5. Žeminių kviečių paruošimo šaldymo eksperimentui sąlygos	48
2.2. Reagentai	51
2.3. Tyrimų metodai	52
2.3.1. Žaliavų cheminės sudėties nustatymo metodai.....	52
2.3.2. Fermentinės hidrolizės proceso efektyvumo įvertinimas	53
2.3.3. Laisvųjų aminorūgščių analizė taikant efektyviają skysčių chromatografiją..	54
2.3.4. Mikrobiologinės analizės.....	55
2.3.5. Mikotoksinų tyrimai efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	57
2.3.6. Fermentinių aktyvumų įvertinimas <i>Fusarium</i> spp. užterštuose kviečių mėginiuose.....	58

2.3.7. Kviečių grūdų daigumo įvertinimas	58
2.3.8. Kviečių atsparumo šalčiui įvertinimas.....	59
2.3.9. Statistinė duomenų analizė	59
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	61
3.1. Augalinės kilmės žaliavų perdirbimo šalutinių produktų, skirtų biostimuliatorių gamybai, parinkimas ir charakteristikos	61
3.1.1. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas	61
3.1.2. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (išspaudos)	62
3.1.3. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (permeatai)	63
3.2. Augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų funkcionalumo didinimas taikant ultragarsą	65
3.2.1. Tirpiųjų baltymų pokyčiai kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte.....	65
3.2.2. Tirpiųjų baltymų ir skaidulinių medžiagų pokyčiai sojų išspaudose.....	67
3.3. Baltymų hidrolizatų gamyba iš kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentinės hidrolizės būdu kartu su išankstiniu žaliavos apdorojimu ultragarsu	68
3.3.1. Ultragarso poveikis fermentinės hidrolizės procesui.....	69
3.3.2. Ultragarso poveikis kinetiniams fermentinės hidrolizės parametrams	76
3.3.3. Ultragarso poveikis laisvųjų aminorūgščių susidarymui kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų baltymų hidrolizatuose.....	77
3.4. Antimikrobinių bioproduktų gamyba taikant PRB fermentaciją kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu ultragarsu.....	79
3.4.1. Ultragarso taikymas sojų produktų PRB fermentacijos su <i>Lactobacillus paracasei</i> (LUHS 244) proceso efektyvumo didinimui	80
3.4.2. Augalinių gėrimų gamybos šalutinių produktų (permeatų) konversija į antimikrobinius bioproduktus.....	83
3.4.3. PRB fermentacijos ir jos metu susidariusių metabolitų įtaka <i>Fusarium</i> spp. mikroskopinių grybų augimui kviečių biomasėje.....	86
3.5. Gautų produktų biostimuliacinio aktyvumo įvertinimas	94
3.5.1. Baltymų hidrolizatų įtaka kviečių grūdų fiziologiniams pokyčiams <i>in vivo</i> ..	94
3.5.2. Antimikrobinių bioproduktų biostimuliacinio poveikio tyrimai	104
Apibendrinimas ir rekomendacijos.....	106
IŠVADOS.....	108
SANTRAUKA	110
LITERATŪRA	132
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	147
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS	149
INFORMACIJA APIE AUTOREĮ	151
PADĖKA.....	151

SANTRUMPOS

3-ADON – 3-acetil-deoksinivalenolis
15-ADON – 15-monoacetildeoksinivalenolis
Ala – alaninas
AP – avižų permeatas
Arg – argininas
Asp – asparto rūgštis
AV – aktyvumo vienetai
BABA – β -aminosviesto rūgštis
BH – baltymų hidrolizatas
BTR – bendrasis titruojamasis rūgštingumas
Cys – cisteinas
D3G – deoksinivalenol-3- β -D-gliukozidas
DON – deoksinivalenolis
DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentas
ELISA – imunofermentinis metodas
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
GABA – α -aminosviesto rūgštis
Gly – glicinas
Glu – glutamo rūgštis
GRAS – pripažintas saugiu vartoti (angl. *generally recognized as safe*)
HB – suhidrolizuotų baltymų kiekis
His – histidinas
Hyp – hidroksiprolinas
HL – hidrolizės laipsnis
Ile – izoleucinas
KKGŠP – kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas
KP – kokosų permeatas
KSV – kolonijas sudarantys vienetai
LAR – laisvosios aminorūgštys
Leu – leucinas
LOD – aptikimo limitas
LOQ – kiekybinio įvertinimo limitas
LT₅₀ – temperatūra, kurioje žūva 50 % augalų
LUHS 244 – *Lactobacillus paracasei*
LUHS 210 – *Lactobacillus casei*
LUHS 135 – *Lactobacillus plantarum*
LUHS 245 – *Lactobacillus uvarum*
LUHS 173 – *Lactobacillus brevis*
LUHS 206 – *Lactobacillus farraginis*
LUHS 236 – *Pediococcus acidilactici*
Lys – lizinas
MAPK – mitogeno aktyvintosios proteinkinazės

MAPKK – mitogeno aktyvintosios proteinkinazės kinazės
Met – metioninas
MP – migdolų permeatas
MRS – de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė
MSP – maltos sojų pupelės
OT – optinis tankis
PDA – bulvių dekstrozės mitybinė terpė
Phe – fenilalaninas
PR – pieno rūgštis
PRB – pieno rūgšties bakterijos
Pro – prolinas
RP – ryžių permeatas
Ser – serinas
SHB – suhidrolizuotų baltymų koncentracija
SI – sojų išspaudos
SP – sojų permeatas
StN – standartinis nuokrypis
Thr – treoninas
Trp – triptofanas
Tyr – tirozinas
UG – ultragarsas
Val – valinas

IVADAS

Temos aktualumas

Kintantis žemės ūkio požiūris į tvarią augalininkystės produktų gamybą skatina vis daugiau dėmesio skirti cheminių trąšų vartojimo mažinimui naudojant aplinkai draugiškus biostimuliuojančius. Biostimuliuojantys – tai natūralios kilmės įvairios medžiagos ir / ar mikroorganizmai, kurie skatina augaluose fiziologinius procesus, gerina maistinių medžiagų įsisavinimo efektyvumą, skatina augalų vystymąsi ir turi teigiamą įtaką pasėlių derlingumui bei didina augalų atsparumą abiotiniam ir biotiniam stresui. Dažniausiai biostimuliatorių sudėtyje yra humusinių medžiagų, organinių medžiagų, praturtintų biologiškai aktyviais komponentais, neorganinių druskų (įskaitant fosfitą), jūros dumblių ekstraktų, chitino ir chitozano darinių, laisvųjų aminorūgščių ir baltymų hidrolizės produktų.

Plėtojant žemdirbystę klimato kaitos sąlygomis, atkreiptas dėmesys į baltyminės kilmės biostimuliatorių savybę stimuliuoti augalų augimą, didinti derlingumą ir jų atsparumą abiotiniam bei biotiniam stresui. Maisto pramonėje susidarantiuose šalutiniuose perdirbimo produktuose lieka daug organinių medžiagų, įskaitant ir baltymines medžiagas, kurios naudojamos neracionaliai, kompostavimui ir pašarų gamybai. O štai susidarantys dideli atliekų kiekiai kelia rimtą aplinkosaugos problemą. Biotechnologinių sprendimų parinkimas ir taikymas šalutinių produktų konversijai į pridėtinės vertės produktus, įskaitant biostimuliuojančius, betarpiškai susijęs su žiedinės ekonomikos veiksmų plano realizavimu: žaliavinių išteklių kiekiu didinimu ir tvarios gamybos organizavimu.

Augalinės kilmės baltymų hidrolizatai gaminami, taikant fermentinę hidrolizę, gaunant aminorūgščių ir skirtingo dydžio peptidų mišinius. Parenkant baltymų šaltinį biostimuliatorių gamybai, vienas iš svarbiausių veiksnių yra baltyminių medžiagų sudėtis, turinti įtakos hidrolizatų tirpumui, hidrolizės laipsniui ir biologiniam pasisavinamumui. Kita vertus, aktualu parinkti tinkamą proteazinį preparatą, jo santykį su substratu ir proceso efektyvumą pagrįsti fermentinės kinetikos analize. Literatūroje atkreiptas dėmesys į ultragarsinio apdorojimo įtaką baltyminių medžiagų pokyčiams ir ultragarso panaudojimo galimybes fermentinės hidrolizės efektyvumui didinti. Ultragarsas kartu su membraninėmis technologijomis pritaikytas augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių išspaudų apdorojimui ir baltyminių medžiagų išgavimui, o gauti šalutiniai produktai (permeatai) galėtų rasti pritaikymą antimikrobinių bioproduktų gamybai.

Parenkant biomasės biostimuliatorių gamybai, didelis dėmesys skiriamas jų saugai. Siekiant išvengti aplinkos teršalų patekimo į pasėlius, patvirtinti ekstrakcijos protokolai biologiškai aktyvių medžiagų išgavimui tvariais metodais, nenaudojant aplinką teršiančių organinių tirpiklių. Augalinės kilmės baltymų hidrolizatai yra pranašesni nei gyvūninės kilmės, nes jų gamybai reikalingos mažesnės energijos sąnaudos, taip pat yra mažesnė tikimybė užkrėsti pasėlius patogeniniais mikroorganizmais. Naudojant augalinės kilmės biomasės biostimuliatorių gamybai, atkreiptinas dėmesys į *Fusarium* spp. taršą ir galimą antrinių metabolizmo produktų –

mikotoksinų, tokių kaip deoksinivalenolis (DON) ir DON konjugatai – susidarymą. *Fusarium* spp. užkratas gali sukelti sėkliniuose grūduose pavasarinį puvinį, tradicinėje žemdirbystėje jo prevencijai taikomas sėklų apdorojimas fungicidais.

Fermentacija – svarbus procesas maisto pramonėje, taikant starterines pieno rūgšties bakterijų (PRB) kultūras, kurių išskirtinis privalumas – GRAS statusas (angl. *generally recognized as safe*). Pagal PRB genotipą bei kultivavimo sąlygas fermentuotam produktui galima suteikti norimų technologinių savybių. Pastaruoju metu vis didesnio dėmesio sulaukė antimikrobinį aktyvumą turinčios PRB ir jų panaudojimas grūdinės žaliavos saugai didinti. Literatūroje pateikiama duomenų apie tai, kad PRB fermentacijos metu gali būti sumažintas mikotoksinų kiekis. Tai atveria naujas perspektyvas biostimuliatorių kūrimui bei tobulinimui ir jų funkcinių savybių spektro plėtrai. Šiuo požiūriu biologinės taršos prevencijos priemonės įgauna vis didesnę pranašumą nei tradicinės, nes jos yra draugiškos aplinkai ir labiau priimtinos vartotojui. Tolesnis PRB fermentacijos proceso efektyvumo didinimas galėtų būti siejamas su ultragarsinės technikos išbandymu fermentacijos terpei apdoroti ir jos sudėčiai gerinti.

Siekiant paspartinti naujų biostimuliatorių gamybą ir atranką, būtina plėsti mokslines žinias apie biostimuliatorių poveikį augalų fiziologijai. Paminėtina, kad biostimuliatoriai, nepriklausomai nuo jų sudėtinių komponentų, pasižymi savitu veikimo mechanizmu, kitokiu nei trąšos. Laboratorinėmis sąlygomis išbandant potencialių biostimuliatorių, tokių kaip baltymų hidrolizatai ir kt., biostimuliatorinį veikimą, atliekami kompleksiniai tyrimai, apimančys sėklų augimo kriterijų pokyčius ir sėklų atsparumo abiotiniam stresui didinimą. Šiuo požiūriu Lietuvos klimatinėmis sąlygomis vis didesnio dėmesio sulaukia sėklos atsparumo šalčiui didinimas, siejant jį su baltyminės kilmės biostimuliatorių pritaikymu kviečiams auginti.

Darbo tikslas: įvertinti apdorojimo ultragarsu ir biopriemonių – fermentinės hidrolizės bei fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis – pritaikymo galimybes baltymų hidrolizatų ir antimikrobinų bioproduktų gamybai iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų žieminių kviečių (*Triticum aestivum*) augimui pagerinti ir saugai užtikrinti.

Darbo tikslui pasiekti suformuluoti šie uždaviniai:

1. ištirti ir atrinkti augalinių žaliavų perdirbimo šalutinius produktus, tinkamus baltymų hidrolizatų bei antimikrobinų bioproduktų gamybai ir įvertinti apdorojimo žemojo bei aukštojo dažnio ultragarsu įtaką šalutinių produktų funkcionalumo didinimui, nustatant tirpių baltymų pokyčius;
2. įvertinti apdorojimo ultragarsu įtaką kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų hidrolizei proteolitiniais fermentais, parenkant optimalias sąlygas baltymų hidrolizatų gamybai;
3. įvertinti antimikrobinų bioproduktų gamybos galimybes iš augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių šalutinių produktų (permeatų), taikant apdorojimą

- ultragarsu bei fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis, ir nustatyti fermentacijos proceso įtaką kviečių bei jų produktų saugai;
4. įvertinti gautų produktų biostimuliacinį poveikį žieminių kviečių (*Triticum aestivum*) sėklų daigumui ir augalų augimo kriterijams bei atsparumui prieš abiotinį stresą.

Mokslinio darbo naujumas

Taikant atrinktus proteazių preparatus kartu su pirminiu mėginio apdorojimu žemojo (37 kHz) ir aukštojo (850 kHz) dažnio ultragarsu, efektyviai padidintas hidrolizės laipsnis ir laisvųjų aminorūgščių kiekis kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų baltymų hidrolizatuose. Nustatyta, kad kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto baltymų hidrolizatas reikšmingai didina kviečių (*Triticum aestivum*) atsparumą šalčio stresui, gaunant reikšmingai didesnę išlikusių augalų skaičių.

Įvertintas antimikrobinių bioproduktų, pagamintų fermentuotų augalinių gėrimų gamybos šalutinių produktų (permeatų) pagrindu, poveikis kai kurių *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų augimo slopinimui ir užkrėstų kviečių augimo stimuliavimui. Fermentacija pieno rūgšties bakterijomis leidžia reikšmingai sumažinti deoksinivalenolio ir jo konjugatų koncentracijas žieminiuose kviečiuose (*Triticum aestivum*), taip pat aptiktas ryšys tarp mikotoksinų kiekio sumažėjimo ir fermentinių sistemų aktyvumo.

Praktinė darbo vertė

Maisto pramonėje gaunami dideli kiekiai šalutinių produktų, kurie paprastai yra neefektyviai panaudojami – išmetami. Taikant kompleksinius biotechnologinius sprendimus, maisto pramonės šalutiniai produktai buvo efektyviai perdirbti į baltymų hidrolizatus ir antimikrobinius bioproduktus. Parinkti proteazių fermentiniai preparatai kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte ir sojų išspaudose esančių baltyminių medžiagų hidrolizavimui bei laisvųjų aminorūgščių susidarymui. Taikant fermentinę hidrolizę kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu žemojo (37 kHz) ir aukštojo (850 kHz) dažnio ultragarsu, pasiekta didesnė bioaktyviųjų komponentų, t. y. laisvųjų aminorūgščių, išeiga galutiniuose produktuose. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto baltymų hidrolizatai išbandyti kviečiams auginti ir jų atsparumui prieš šalčio stresą didinti. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (permeatai), panaudoti antimikrobinių bioproduktų gamybai taikant fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis ir nustatytas jų poveikis kai kurių *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų augimo slopinimui bei užkrėstų sėklų daigumo gerinimui. *Fusarium* spp. taršos mažinimui atrinktos pieno rūgšties bakterijų padermės, kurias naudojant kvietinės biomasės fermentacijos metu, gaunamas didžiausias deoksinivalenolio ir jo konjugatų kiekio sumažėjimas.

Darbo rezultatų publikavimas

Disertacijos tema paskelbti 4 straipsniai *Clarivate Analytics WOS* pagrindinio sąrašo leidiniuose. Darbo rezultatai pristatyti 3 tarptautinėse konferencijose ir tarptautinių kursų metu (1).

Disertacijos struktūra

Disertacija yra parašyta lietuvių kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, santrauka anglų kalba, naudotos literatūros sąrašas (225 šaltiniai) ir disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas. Disertacijos medžiaga išdėstyta 152 puslapiuose, ten pateiktos 27 lentelės ir 18 paveikslų.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Baltymų hidrolizatų iš kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų gamybos efektyvumą galima padidinti, taikant apdorojimą ultragarsu ir fermentinę hidrolizę šarmine proteaze.
2. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (permeatai) yra tinkama terpė pieno rūgšties bakterijų dauginimui ir bioproduktų, slopinančių kai kurių *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų augimą bei gerinančių užkrėstų kviečių augimo parametrus, kūrimui.
3. Žieminių kviečių augimą galima reikšmingai pagerinti, grūdų apvėlimui panaudojus kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų baltymų hidrolizatus; kviečių atsparumą šalčio stresui efektyviai pagerina želmanų lapų purškimas kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto baltymų hidrolizatu prieš šalčio sąlygas ir po jų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Biostimuliatorių gamyba iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų

Greitai augantis žmonių populiacijos skaičius, urbanizacija ir ekonominė plėtra didina suvartojamo maisto kiekį visame pasaulyje, o esant didesnei sveiko ir šviežio maisto paklausai, maisto ir žemės ūkio pramonės susiduria su iššūkiais: didžiuliais antrinių produktų kiekiais (organinės biomasės), susidaranciais gamybos ar perdirbimo procesų metu [1, 2]. Susidarantys dideli kiekiai antrinių produktų dažniausiai viršija vietinio panaudojimo ir saugojimo pajėgumus, dėl to yra neefektyviai panaudojami – išmetami, o netinkamas ir neefektyvus atliekų apdorojimas kelia grėsmę ekosistemoms ir žmonių sveikatai, nes dėl nekontroliuojamo atliekų patekimo į aplinką padidėja vandens tarša, atsiranda perteklinis tręšimas, plinta toksiškas amoniakas, padidėja žmonių užkrėtimo patogenais rizika ir kt. [3]. Be to, toks neefektyvus šalutinių produktų panaudojimas mažina natūralius išteklius. Siekiant išvengti aplinkos taršos ir skatinant tvarią gamybą, pagrindinis žingsnis yra mokslinių tyrimų plėtra ieškant alternatyvių būdų, kaip pakartotinai panaudoti šias medžiagas ir optimizuoti pramoninių atliekų perdirbimą [1].

Organinių atliekų perdirbimas į biotrašas istoriškai yra įprasta praktika, o šiuo metu didelis dėmesys skiriamas biostimuliatorių gamybai iš šalutinių maisto pramonės produktų. Didėjant biostimuliatorių pasaulinei rinkai, didėja poreikis mokslinių tyrimų šioje srityje ir tikimasi, kad bus praplėstas sąrašas biostimuliatorių, pagamintų iš šalutinių maisto pramonės produktų [1, 2].

1.1.1. Biostimuliatoriai ir jų gamybos tvarumo principas

Augalų biostimuliatoriai yra viena iš naujovių, leidžiančių padidinti pasėlių derlingumą ir sumažinti cheminių trąšų naudojimą augalininkystės ūkiuose. Žemės ūkio produkcijos didinimas turėtų būti grindžiamas ne ariamos žemės ploto didinimu, o augalų produktyvumo didinimu [4]. Kita vertus, naftos kainų augimas turi tiesioginį poveikį trąšų kainų augimui, o tai skatina ūkininkus ieškoti naujų būdų ūkininkavimo sąnaudoms mažinti.

Praėjusį dešimtmetį vyko aršios diskusijos dėl augalų biostimuliatorių apibrėžimo [2] ir neseniai (2019 m.) pagal naująją Europos Sąjungos (ES) reglamentą 2019/1009 [5] pateiktas augalų biostimuliatorių apibrėžimas: tai ES tręšiamasis produktas, stimuliuojantis augalų mitybos procesus nepriklausomai nuo jame esančio maisto medžiagų kiekio, siekiant pagerinti vieną arba daugiau iš šių augalo ir augalo rizosferos savybių: maisto medžiagų įsisavinimo efektyvumą; atsparumą abiotiniam stresui; kokybines savybes; laisvai neįsisavinamų maisto medžiagų prieinamumą dirvožemyje ir rizosferoje. Šis apibrėžimas yra labiausiai paplitęs ir dažniausiai taikomas naujausiose mokslinėse publikacijose [6, 7, 8], taip pat šis biostimuliatorių apibrėžimas yra įtrauktas į 2019 m. Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijos

įsakymą dėl LR rinkai pateikiamų ir teikiamų trešiamųjų produktų identifikavimo [9]. Pagal Du Jardin [10], 2015 m. biostimuliatoriai buvo suskirstyti į 7 klases: 1) humino ir fulvo rūgštys; 2) baltymų hidrolizatai (BH); 3) jūros dumblių ekstraktai; 4) chitozanai; 5) neorganiniai junginiai; 6) naudingieji grybai ir 7) naudingosios bakterijos. Naujausiais duomenimis, 2021 m. vykusiame 5-ajame pasauliniame biostimuliatorių kongrese (Majamis, JAV) [6], pateiktas išsamesnis biostimuliatorių klasifikavimas į 9 grupes: 1) humusinės medžiagos; 2) sudėtingos organinės medžiagos (gautos iš agrarinės pramonės ir miesto atliekų, nuotekų dumblo ekstraktai, kompostas ir mėšlas); 3) naudingi cheminiai elementai (Al, Co, Na, Se ir Si); 4) neorganinės druskos, įskaitant fosfitą; 5) dumblių ekstraktai (rudųjų, raudonųjų ir žaliųjų); 6) chitino ir chitozano dariniai; 7) antiperspirantai (kaolinas ir poliakrilamidas); 8) laisvosios aminorūgštys ir azoto turinčios medžiagos (peptidai, poliaminai ir betainai); 9) augalų augimą skatinančios rizobakterijos, arbuskuliniai mikoriziniai grybai ir *Trichoderma* spp.

Žiedinės bioekonomikos koncepcija sudaro realias galimybes žemės ūkio ir maisto sektoriui siekiant perdirbti šalutinius produktus ir / ar atliekas, kuriuose gausu vertingų maistinių medžiagų, į biochemikalus ar biomedžiagas suteikiant joms pridėtinę vertę [11, 12, 13]. Sukurtus natūralius produktus į rinką galima įdiegti greičiau ir su mažesnėmis reglamentavimo išlaidomis nei sintetines trąšas.

Biologiškai aktyvių organinių medžiagų išgavimas iš atliekų yra pirmasis žingsnis siekiant tvarios gamybos. Be žaliavų išteklių didinimo, antriniai produktai gali būti paverčiami į biologines chemines medžiagas, biostimuliatorius ir dirvožemio pakaitalus, taip pat pridėtinės vertės produktus kitų biomedžiagų (pvz., bioplastikų, lignino ir alginato) pramonei [14]. Pirminiai biostimuliatorių šaltiniai yra įvairios kilmės biomasėje esančios veikliosios medžiagos, pirminiai metabolitai, kurie gali pasižymėti biostimuliaciniu aktyvumu: aminorūgštys, cukrūs, nukleotidai, lipidai, fitohormonai (citokininai, auksinai, giberelinai, brasinosteroidai, etilenas ir abscizo rūgštis), poliaminai [15, 16] ir kt. Pirminių metabolitų medžiagų apykaitos metu susidaro antriniai metabolitai: alifatinės ir aromatinės aminorūgštys, fenoliniai junginiai, azoto turintys junginiai (alkaloidai) ir sieros turintys junginiai (gliukozinatai), kurie pasižymi biostimuliuojančiu poveikiu [16]. Dažnu atveju biostimuliatoriai gali turėti daugiakomponentę sudėtį ir veikti kompleksiskai apimant tokias medžiagas kaip augalų hormonai arba į jas panašios medžiagos, aminorūgštys, betainai, peptidai, baltymai, cukrūs (oligo- ir polisacharidai), aminopolisacharidai, lipidai, vitaminai, nukleotidai ar nukleozidai, humusinės medžiagos, naudingieji elementai, fenoliniai junginiai, glikozidai, steroliai ir kt. Veikliųjų medžiagų biostimuliatoriuose nustatymui paprastai taikomi metodai yra chromatografija, masių spektrometrija, BMR spektroskopija, elementų analizė, ELISA metodai, spektrometrija ir kt. [16]. Įrodyta, kad jūros dumblių ekstraktuose yra fitohormonų, ir jie laikomi šios kategorijos biostimuliatorių sudėtiniais komponentais. Be fitohormonų, dumblių ekstraktuose taip pat yra įvairių angliavandenių, tokių kaip alginatas, fukoidanas, betainai, taip pat baltymų ir mineralų, kurie skatina augalų augimą [17]. Pavyzdžiui, bulvių luobelėse yra steroidinių alkaloidų, kurių poveikis

gali būti siejamas su galima apsauga nuo patogeninių bakterijų, grybelių ir vabzdžių [18].

Kriterijai, pagal kuriuos atrenkami antriniai produktai biostimuliatorių gamybai, aplinkosaugos požiūriu yra šie: pesticidų likučių nebuvimas, mažos surinkimo ir saugojimo išlaidos, pakankamas tiekimas ir sinergija su kitais perdirbimo būdais [1]. Vadovaujantis šiais kriterijais, taip pat atliekant mokslinius tyrimus ir plėtojant biomasių perdirbimą į biostimuliacinius, galima žengti esminius žingsnius siekiant optimizuoti turimus išteklius ir jų panaudojimo efektyvumą bei tvarumą [19]. Teisiniu požiūriu Europos Komisijos priimtas reglamentas (ES) 2019/1009 [5] palengvins organinių ir atliekų pagrindu pagamintų biostimuliatorių patekimą į ES rinką ir padės ūkininkams tenkinti augančius žemės ūkio tvarumo poreikius.

Biostimuliatorių tobulinimas pasėlių derlingumui didinti yra viena iš šiuolaikinių strategijų, kurias plėtojant vykdomi moksliniai tyrimai [2] ir Europos Komisijoje finansuojami projektai [1]. SUNNIVA projektas skirtas daržovių perdirbimo atliekų kiekio mažinimui. Jame numatyta panaudoti maisto pramonės antrinius produktus ir sukurti trąšas iš susidariusių atliekų (lauke bei sandėliavimo metu), taip pat perdirbimo proceso šalutinių srautų, pavyzdžiui, išbandytos augalinių atliekų ir daržovių perdirbimo sraute susidariusių antrinių produktų panaudojimo galimybės organinių trąšų gamybai. Žaliavos buvo frakcionuotos ir įvertintas gautų medžiagų poveikis augalų augimui bei apsaugai ir savybei pritraukti naudingus augalus mikroorganizmus. „Bio-Based Industries Joint Undertaking“ (BBI-JU) projektų H2020 programoje viena iš pagrindinių krypčių yra atliekų kiekio mažinimas ir atliekų perdirbimo strategijų paieška. Šiuo aspektu AgriMax4, FUNGUSCHAIN5 ir NEWFERT6 projektai daugiausia dėmesio skiria organinių atliekų perdirbimui ir žaliavinių resursų stygiaus maisto ir trąšų pramonėje kompensavimui. Teigiama, kad bulvių, pomidorų, grūdų ir alyvuogių perdirbimo atliekos ir šalutiniai produktai turi didelį panaudojimo potencialą ES rinkoje kaip maisto priedai, žemės ūkio medžiagos, pakavimo medžiagos ir biologinės trąšos [18]. Pasaulinei biostimuliatorių rinkai ir toliau augant [8], tikimasi, kad mokslinių tyrimų plėtra šioje srityje išplės biostimuliatorių iš šalutinių produktų sąrašą. Pasaulinis maistinių medžiagų disbalansas taip pat reikalauja, kad tikslinei rinkai būtų sukurtas biostimuliacinis.

1.1.2. Baltyminių žaliavų šaltiniai hidrolizatų gamybai

Siekiant sumažinti gamybos sąnaudas, optimizuoti gamtos išteklius ir sumažinti jų poveikį aplinkai, žemės ūkio ir maisto pramonės atliekų ar antrinių produktų perdirbimui reikalingi novatoriški procesai ir naujos technologijos. Kai kurie skaičiavimai rodo, kad per metus išmetama apie 9 tūkst. tonų pieno baltymų, 3 mln. tonų baltymais turtingų jūros gėrybių atliekų ir 8 mln. tonų gyvūninės kilmės baltymų, turinčių didžiulį neigiamą poveikį aplinkai [4]. Visi šie baltymų šaltiniai yra geri substratai baltyminės kilmės biostimuliatorių gamybai. Aminorūgščių sudėtis yra pagrindinis veiksnys renkantis baltymų šaltinį, nes šios rūgštys yra baltymų molekulių sudedamoji dalis. Be to, aminorūgščių seka baltymų molekulėse turi didžiulę įtaką substrato tirpumui, hidrolizės laipsniui, aminorūgščių balansui ir augalų biologiniam

prieinamumui. Pavyzdžiui, šiuo metu daugiau nei 90 % rinkoje prieinamų komercinių baltymų hidrolizatų yra pagaminti iš gyvūninės kilmės šalutinių produktų (odos, kaulai, galvos, uodegos ir skerdenos, jūros gėrybių perdirbimo šalutiniai produktai, plunksnos ir kt.), kurių pagrindinis baltymas yra kolagenas [4]. Šiame baltyme yra daug prolino, pagrindinės aminorūgšties, kuri yra svarbi augalų fiziologijai. Prolinas, būdamas fitohormono pirmtaku, reguliuoja augaluose žiedadulkių vaisingumą ir vandens balansą [20]. Todėl šios rūšies atliekos yra labai patrauklios gaminant baltymais praturtintus biostimulius.

Kita vertus, kai kurių modifikuotų aminorūgščių, tokių kaip hidroksilizinas ir hidroksiprolinas, taip pat yra kolagene, tačiau jos yra neįprastos augalams ir gali būti apribotas jų metabolizmas. Be to, kolagenas yra iš dalies netirpus, ir tai gali būti viena iš jo atsparumo proteazių hidrolizei priežasčių, todėl hidrolizato gamybos metu reikia atlikti papildomą pirminį apdorojimą [21]. Panaši tirpumo stoka būdinga ir vištienos plunksnų keratinui, kurio perdirbimas reikalauja didelių energijos sąnaudų. Taigi, hidrolizatams iš šio šaltinio gauti labiau tinka fermentiniai arba fermentaciniai procesai (proteazę gaminančios mikroorganizmų padermės). Kita vertus, pieno baltymai (kazeinai, išrūgų baltymai) arba šalutiniai gyvulininkystės produktai (hemoglobinas, plazmos baltymai) turi savo pirminėse struktūrose daugybę hidrofobinių bei polinių aminorūgščių ir daugybę galimų proteazių skaidymui vietų [22], sudarančių galimybę išgauti peptidų ir olipeptidų, turinčių įvairias chemines savybes ir galimas bioaktyvias funkcijas, mišinį.

Keli gyvūninės kilmės baltymų hidrolizatai (BH) buvo pagaminti iš jungiamojo audinio, odos ir plazmos baltymų, kurie sėkmingai naudojami auginant komercinius augalus ir gaunami teigiami rezultatai [23]. Tačiau buvo gauta informacija ir apie neigiamą jų poveikį, pavyzdžiui, fitotoksinius ir chlorozės reiškinius, kurie siejami su nepalankia aminorūgščių sudėtimi, per dideliu laisvųjų aminorūgščių kiekiu [24], t. y. kriterijais, glaudžiai susijusiais su BH gamybos būdu. Šiandien stabilūs ir saugūs gyvūninės kilmės hidrolizatai, naudojami žemės ūkio augalams, gali būti gaminami fermentiniu būdu ir naudojami komercinėje praktikoje [25, 26].

Literatūroje aprašomas ne tik gyvūninės kilmės, bet ir augalinės kilmės maisto gamybos atliekų ar šalutinių produktų tinkamumas baltyminių biostimulių gamybai. Šalutiniai žemės ūkio produktai šiam tikslui yra vieni iš populiariausių substratų. Pavyzdžiui, burnočiai, liucernos šienas ir ankštinių augalų sėklos, galbūt dėl jų paplitimo ir fitohormonų, fenolių ir mineralinių elementų, turinčių augalams papildomą biostimuliacinį poveikį, yra įprasti komercinių biostimulių substratai [27]. Šių dienų moksliniuose tyrimuose ir komercinėse įmonėse didelis dėmesys skiriamas daržovių ir kukurūzų perdirbimo metu susidarantių šalutinių produktų, tokių kaip sojų išspaudos, kviečių ir kukurūzų perdirbimo šalutiniai produktai ir kt. panaudojimui baltyminiams biostimuliams kurti, nes jos galėtų būti tvirtos, ekonomiškai, ir tai prisidėtų prie ekologiško atliekų šalinimo [28, 29]. Be to, šiuo metu didžiąją dalį rinkoje esančių baltyminių biostimulių sudaro gyvūninės kilmės produktai, o mažesniąją dalį – augalinės kilmės produktai. Renkantis augalinės kilmės produktus biostimuliams kurti užtikrinamas ne tik gamybos tvarumas (mažesnės energijos sąnaudos), bet ir saugumas – išvengiama

galimo dirvožemio užteršimo patogenais [1]. Taip pat, remiantis ES reglamentu 354/2014 [4], iš gyvūninės kilmės šalutinių produktų pagamintiems baltyminiams biostimuliatoriams Europos Sąjungoje taikomi apribojimai, kai gyvūninės kilmės biostimuliatorius galima naudoti tik galutiniame gamybos taške, ypatingą dėmesį skiriant žmonių, gyvūnų ir aplinkos saugai. Taip pat taikomi tokių produktų panaudojimo būdai, kai gyvūninės kilmės biostimuliatoriai negali būti nutaikyti tiesiai į valgomąsias augalų dalis ir juose turi būti užtikrinta maksimali neaptinkama sunkiųjų metalų koncentracija [4].

Bioinformatikos pažanga leidžia virtualiai tikrinti maisto ir ne maisto kilmės baltymus siekiant nustatyti galimus substratus baltymų hidrolizatų gamybai. Pavyzdžiui, „UniProt“ duomenų bazė buvo sukurta didelio našumo baltymų sekų analizei, ją naudojant galima atlikti greitą baltymų grandinės sekos analizę, kad būtų galima nustatyti *in-silico* skilimo vietą, kurią sukelia įvairios proteazės. Šiuo atveju visos galimos peptidų sekos gali būti numanomos pagal konkrečios proteazės skaidymo vietų padėtį. Taikant šią technologiją, gali būti vertinami daugelis šalutinių produktų baltymų (kolageno, želatinos, albuminų). Nors praktiškai šis metodas buvo taikomas maisto ir biomedicinos tikslais, jį galima pritaikyti ir aminorūgščių subalansavimui bei peptidų savybių įvertinimui atrenkant tinkamus substratus biostimuliatoriams kurti [27].

Kuriant biostimuliatorius iš organinių atliekų, labai svarbu pasirinkti biomasės išteklius. Įvairios veikliosios medžiagos, esančios pramoninių atliekų srautuose ir biologinės kilmės šalutiniuose produktuose, suteikia puikią galimybę išgauti medžiagas, tinkamas augalų augimui ir atsparumo prieš patogenus didinimui. Be to, reikia suprasti esmines žaliavų biochemines savybes, pavyzdžiui, išsaugoti specifines bioaktyviąsias sudedamąsias dalis [30]. Taip pat turi būti atliktas aplinkosauginis ir ekonominis vertinimas, siekiant nustatyti, ar naujas biostimuliatorius yra perspektyvus ir gali tapti sėkmingu rinkoje. Norint įvertinti, ar biomasės tinkamos biostimuliatoriams kurti, reikia atsižvelgti į keletą veiksnių, tokių kaip pesticidų nebuvimas, mažos surinkimo ir sandėliavimo išlaidos, pakankamas prieinamumas.

1.2. Biostimuliatoriai iš baltyminėmis medžiagomis turtingų šalutinių produktų

Baltyminės kilmės biostimuliatoriai išsiskiria specifiniu veikimu, siejamu ne tik su augalų augimo skatinimu, bet ir su augalų tolerancijos didinimu abiotiniam ir biotiniam stresui. Toks augalus stimuliuojantis poveikis skiriasi nuo papildomo azoto kaip maisto šaltinio poveikio [31]. Pagrindinės baltyminių biostimuliatorių veikliosios medžiagos yra aminorūgštys ir mažos molekulinės masės peptidai, kuriuos augalai gali lengvai tiesiogiai pasisavinti absorbuodami tiek per šaknis, tiek per lapus, ir toliau šios veikliosios medžiagos dalyvauja augalų metabolizmo mechanizmuose [31, 32]. Teigiamas tokių produktų poveikis siejamas taip pat su biocheminiais procesais, vykstančiais augaluose, ir neapsiriboja „padidintu mitybinių komponentų“ kiekiu. Nustatyta, kad: 1) BH skatina maistinių medžiagų įsisavinimą ir maistinių medžiagų naudojimo efektyvumą pasėliuose, šis augalų augimą skatinantis poveikis pasireiškia per šaknis; 2) BH gali turėti netiesioginį poveikį

didinat makro- bei mikroelementų įsisavinimą ir veiksmingą jų naudojimą; 3) taip pat BH biostimuliuojantis poveikis susijęs su laisvųjų aminorūgščių ir peptidų veikla, panašia į fitohormonų biosintezės pirmtakų (augalų augimo reguliatorių) ir kitų metaboliškai svarbių bioaktyviųjų junginių veiklą, kuri prisideda prie augalų augimo skatinimo.

Tačiau tai ne vieninteliai minėto produkto veikimo mechanizmai; moksliniais tyrimais įrodyta, jog baltymų pagrindu pagaminti biostimuliatoriai gali būti naudojami dirvožemio atkūrimui ar dirvožemio erozijos prevencijai. Dirvožemyje esantys mikroorganizmai lengvai įsisavina tirpiuosius peptidus ir laisvąsias aminorūgštis, o tai padeda gerinti dirvožemio struktūrą, padidėja organinių medžiagų kiekis dirvožemyje ir pagerėja maistinių medžiagų, esančių dirvožemyje, prieinamumas augalams [32, 4]. Baltymų pagrindu pagaminti biostimuliatoriai gali būti suskirstyti į dvi pagrindines kategorijas: baltymų hidrolizatus, sudarytus iš gyvūninės arba augalinės kilmės aminorūgščių ir peptidų mišinio arba atskirų aminorūgščių, tokių kaip glutamatas, glutaminas, prolinas ir glicino betainas.

1.2.1. Baltymų hidrolizatai

Cheminė baltymų hidrolizatų charakteristika priklauso nuo pirminio baltymų šaltinio, naudoto jų gamybai, ir pritaikyto gamybos būdo. Gyvūninės kilmės baltymų hidrolizatai dažniausiai gaminami naudojant gyvūnų liekanas (įskaitant epitelio ir jungiamuosius audinius), gyvūninį kolageną ir elastiną, taikant cheminę hidrolizę, aukštą temperatūrą ir didelį slėgį. Cheminės hidrolizės metu suskaidomos visos peptidinės jungtys, dėl šios priežasties gauti produktai pasižymi dideliu hidrolizės laipsniu ir yra sudaryti iš didelio kiekio laisvųjų aminorūgščių bei mažesnio kiekio tirpiųjų peptidų, tačiau, naudojant agresyvias rūgštis / šarmus, kai kurios aminorūgštys, tokios kaip triptofanas, cisteinas, serinas ar treoninas, gali būti iš dalies arba visiškai sunaikintos gamybos proceso metu, ir gali būti prarastas jų biologinis aktyvumas. Be to, cheminės hidrolizės metu taikant aukštą temperatūrą gali būti sunaikinti ir kiti naudingi junginiai, pavyzdžiui, vitaminai. O štai augalinės kilmės baltymų hidrolizatai gaminami švelnesiu būdu – biomasių (liucernų likučiai, kvietiniai žlaugtai) apdorojimui taikant fermentinę hidrolizę proteolitiniais fermentais žemesnėje temperatūroje (~60 °C). Tokiu būdu gauti galutiniai produktai pasižymi didesniu kiekiu tirpiųjų baltymų, kurių dydis svyruoja nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių daltonų, ir mažesniu kiekiu laisvųjų aminorūgščių, lyginant su chemine hidrolize, tačiau neprarandamas peptidų ir laisvųjų aminorūgščių biologinis aktyvumas [28, 32].

Literatūroje aprašomi komerciniai biostimuliatoriai, pavyzdžiui, „Trainer“ – produktas, gautas iš ankštinių augalų sėklų fermentinės hidrolizės būdu, kurio sudėtyje yra 50 g/kg laisvųjų aminorūgščių ir tirpiųjų peptidų [33]. „SiaptonR“ arba „Aminoplant“ (*Isagro Spa*, Italija), ILSATOP produktai (ILSA, Italija) ir „Macro-Sorb“ (*Bioiberica Corp.*, Ispanija), kuriuose baltymų / peptidų ir laisvųjų aminorūgščių kiekiai svyruoja atitinkamai 1–85 g/100 g ir 2–18 g/100 g. Pagrindinės aminorūgštys šiuose produktuose yra glutamo ir asparto rūgštys, argininas, prolinas,

alaninas, glicinas, valinas ir leucinas. Taip pat kiti šiuose hidrolizatuose esantys nebaltyminiai komponentai, tokie kaip riebalai, angliavandeniai, mikro- ir makroelementai ar fitohormonai gali turėti biostimuliacinį poveikį augalų augimui [31]. Rinkoje taip pat yra ir gyvūninės kilmės komercinių baltymų hidrolizatų „Siapton“, „Pepton“ ir „Hydrostim“. Augant gyvūninės ir augalinės kilmės biostimuliatorių rinkai, didėja poreikis mokslinių tyrimų plėtrai šioje srityje bei papildomam naudojimo taisyklių reguliavimui [4].

1.2.2. Aminorūgštys

Antroji baltymų pagrindu pagamintų biostimuliatorių kategorija – atskiros aminorūgštys. Aminorūgštys atlieka svarbų vaidmenį augalų biocheminiuose procesuose: dalyvauja kaip antistresiniai (Hyp, Pro) ar chelatiniai agentai (Cys, Glu, Gly, His, Lys), taip pat jos stimuliuoja chlorofilo sintezę (Ala, Lys, Ser), sėklų daigumą (Asp, Glu, Lys, Met, Phe, Thr) ir dalyvauja hormonų metabolizmo procesuose (Ala, Pro) [34]. Tiesioginis augalų veikimas grynomis aminorūgštimis energetiškai yra naudingesnis, lyginant su augalų veikimu azotu ar biologine azoto fiksacija, kadangi tokiu būdu augalui nereikia naudoti savo energijos pasisavintam azotui asimiliuoti ir vėliau jam įtraukti į aminorūgštis [35]. Tai apima pagrindines dvidešimt baltymų sudėtyje esančių aminorūgščių, dalyvaujančių baltymų sintezėje, taip pat nebaltymines aminorūgštis, kurių gausu kai kuriuose augaluose [31]. Yra daug įrodymų, kad eksogeninis struktūrinių (histidino bei prolino) ir nebaltyminių aminorūgščių, įskaitant glutamatą ir glicino betainą, naudojimas gali apsaugoti augalus nuo aplinkos poveikio, arba kad aminorūgštys yra aktyvios ir dalyvauja perduodant medžiagų apykaitos signalus. Taip pat buvo įrodyta, kad jos atlieka augalų apsaugos funkciją [31]. Aminorūgščių panaudojimas augalų sėklų apdorojimui skatina augalų vystymąsi sukeliant palankius fiziologinius procesus augaluose, o teigiamas aminorūgščių ar jų mišinių panaudojimo lapų purškimui poveikis pasižymi efektyvesniu augalų produktyvumu skatinant chlorofilo, angliavandenių ir polisacharidų kaupimąsi [35].

1.3. Biomasės perdirbimas į baltyminius biostimuliuojančius

Baltymų hidrolizatų gamyba siejama su biologiškai aktyvių peptidų gavyba parenkant tam pigų substratą ir tvarų bioapdorojimo būdą. Molekulinė masė (MM) ir aminorūgščių kiekis yra svarbiausi peptidų biologinį aktyvumą charakterizuojantys kriterijai. Mažesni peptidai (<7 aminorūgščių arba kurių MM – 700–800 Da) yra paprastai aktyviausi, tačiau dėl trumpos grandinės labiau tikėtina, kad jie bus priskiriami keliems baltymams, o jų analizė įprastiniais proteomikos metodais yra sudėtinga. Vidutinio dydžio peptidai, kurių grandinės ilgis 7–25 aminorūgščių arba 800–3000 Da, taip pat pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu ir dažniausiai nustatomi taikant proteominę analizę (naudojant tripsiną), nes dauguma jų yra unikalūs konkrečiam baltymui. Priešingai, sunku analizuoti didelius peptidus ir yra žinomi tik keli bioaktyvūs peptidai [27].

Bioaktyvūs peptidai (BAP) yra baltymų fragmentai, sudaryti daugiausia iš 2–20 aminorūgščių (AA), atliekantys įvairias funkcijas, pavyzdžiui, antimikrobines, antioksidacines, antikoaguliacines ir kt. BAP gaunami baltymų hidrolizės būdu, kurių savybės priklauso nuo jų AA sudėties ir sekos. Pagal pirminį šaltinį BAP skirstomi į tris kategorijas: gyvūniniai, augaliniai ir mikrobiniai. Augalinės kilmės BAP paklausa išaugo dėl vartotojams prieinamos informacijos apie žmonių sveikatą, maisto saugos problemų sprendimą, gyvūnų gerovę, aplinkos tvarumą ir mažesnes išlaidas [36].

Tarp augalinės kilmės BAP šaltinių grūdai jau seniai buvo pagrindinė žmonių mitybos dalis visame pasaulyje. Javų perdirbimo metu kasmet susidaro dideli kiekiai šalutinių produktų, kuriuose yra daug vertingų junginių, tokių kaip skaidulos, lipidai, fenoliniai junginiai, baltymai ir peptidai. Tačiau didžioji dalis šių šalutinių produktų yra išmetami ir tik nedidelė dalis panaudojama gyvulių šėrimui ar bioenergijos reikmėms [36]. Todėl grūdų perdirbimo šalutinių produktų, pavyzdžiui, kukurūzų perdirbimo, kaip nebrangių BAP šaltinių, pritaikymas biostimuliatorių gamybai yra ekonomiškai perspektyvi ir aplinkai draugiška panaudojimo kryptis.

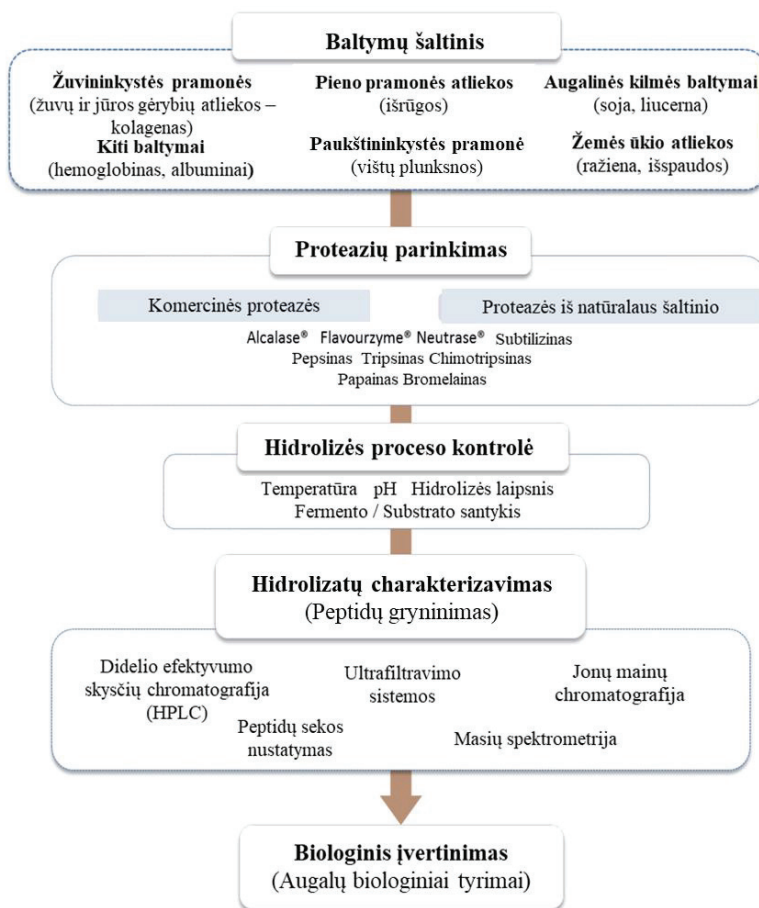
BAP išgavimui iš baltyminėmis medžiagomis turtingų biomasių naudojama daugybė biologinių, cheminių ir fizinių hidrolizės metodų. Cheminės hidrolizės metodai, kurie apima rūgštinį ir šarminį apdorojimą, yra pigūs, paprasti ir greiti, tačiau BAP gamybos apimtys šiuo metodu yra nedidelės, nes nustatyta, kad taikant šį metodą kartu su peptidais susidaro ir nepageidaujamų medžiagų (organinių tirpiklių liekanų). Biologinė hidrolizė apima mikrobine fermentaciją ir fermentinę hidrolizę, kuri turi didžiausią perspektyvumą BAP gamyboje, nes fermentai veikia specifiskai ir hidrolizės trukmė yra trumpesnė [36].

Baltymų hidrolizatų (BH) gamybai gali būti naudojamos gyvūninės, augalinės ir bakterinės kilmės proteazės, o šios yra saugios, efektyvesnės ir pigesnės. Naudojamų proteazių tipas priklauso nuo optimalaus fermentinio aktyvumo sąlygų, taip pat nuo jo specifiskumo tam tikriems substratams: asparto proteazės (Asp likutis katalizinėje vietoje), pavyzdžiui, gyvūninės kilmės pepsinas ir *Onopordum acanthium* augalo onopordozinas, pirmiausia hidrolizuoja baltymus esant rūgštinei terpei, cisteino proteazės (Cys liekanos katalizinėje vietoje), tokios kaip chimotripsinas, papainas ir bromelainas, katalizuoja reakcijas neutraliomis sąlygomis, o serino proteazės (Ser likutis katalizinėje vietoje), pavyzdžiui, tripsinas ir kurkuminas iš meliono, yra aktyvesnės šarminėje terpėje. Metaloproteazėse, tokiose kaip kolagenazės ir keratinazės, yra metalų, kurie dalyvauja reakcijose kaip kofaktoriai, ir jos pasižymi aktyvumu platesniame pH diapazone [27]. Mazorra-Manzano ir kt. [37, 38], taip pat Faulds ir kt. [39] paskelbė, kad augalų proteazės gali būti taikomos maisto gamybos metu susidariusių antrinių produktų perdirbimui į BPA. Šie fermentai sėkmingai naudojami specifinei miofibrilinių baltymų, hemoglobino ir kolageno, taip pat grūdų ir pieno baltymų (išrūgų, kazeinų) hidrolizei.

Proteazės specifiskumas apsprendžia padėtį, kurioje fermentas katalizuoja peptidinės jungties hidrolizę, pavyzdžiui, tripsinas pirmiausia atskiria N-galuose Arg ir Lys, pepsinas skyla hidrofobinėse ir aromatinėse liekanose, o subtilizinas peptiduose jungiasi tarp didelių neįkrautų liekanų. Naudojant šias proteazes (vieną katalizatorių arba mišinį), nustatomas hidrolizės laipsnis (HL), laisvųjų

aminorūgščių / peptidų santykis ir peptidų sekos baltymų hidrolizate (BH). Pavyzdžiui, naudojant *Flavourzyme*, *Alcalase*, *Novo Pro-D* ir koralazes hidrolizatų iš bulvių atliekų gamybai pasiekiamas HL yra atitinkamai 22 %, 8 %, 3 % ir 2 %, tačiau kombinuojant jas su 2 % *Alcalase* + 5 % *Flavourzyme* hidrolizės laipsnį galima padidinti iki 44 % [27].

Kadangi hidrolizės laipsnis turi reikšmingos įtakos hidrolizato absorbcijai ir peptidų biologiniam įsisavinimui augaluose, profiliuojant biostimulius šį parametą reikia atidžiai kontroliuoti hidrolizės proceso metu. Taigi, turi būti atkreiptas dėmesys į fizikines, chemines ir biologines BH savybes siejant jas su naudojimo paskirtimi. Principinė baltymų pagrindu pagamintų biostimulių gamybos ir profiliavimo diagrama pateikta 1.1 paveiksle.



1.1 pav. Principinė baltymų pagrindu pagamintų biostimulių gamybos ir profiliavimo diagrama [27]

Norint identifikuoti peptidų seką, apsprendžiančią biostimulių aktyvumą, būtina atlikti keletą jų gryninimo, charakterizavimo ir tariamo bioaktyvumo

įvertinimo procedūrų. Paprastai BH gryninimas atliekamas taikant jonų mainų chromatografiją ar molekulinį baltymų išskyrimą taikant gelio filtravimą. Ultrafiltracija taip pat gali būti naudojama baltymų hidrolizatų frakcionavimui ar praturtinimui kai kuriomis peptidų frakcijomis. Tačiau trūksta mokslinių tyrimų, apibūdinančių BH peptidines medžiagas, pasižyminčias biostimuliuojančiu poveikiu augalams. Kai kurios publikacijos yra skirtos tik bendro augalo atsako į tam tikrą BH įvertinimui (pvz., giberelinui ir auksinui panašių junginių aktyvumas, hormoniniai pokyčiai ir mazgelių efektoriai); bet jokia specifinė peptidų seka nebuvo susieta su šiais augalo funkciniais aktyvumais. Taigi, jei reikia atlikti tolesnius BH esančių peptidų gryninimo ir sekos nustatymo tyrimus, taip pat rekomenduojama įvertinti ryšį tarp baltyminės kilmės augalų biostimuliatorių struktūros ir funkcinio ryšio [27].

1.4. Bioproduktų su biologinėmis apsauginėmis funkcijomis kūrimo strategija

Kai kurios bakterijos ir grybai sukelia visame pasaulyje daug augalų ligų ir didelius produkcijos nuostolius, ši problema ypač opi mažas ir vidutines pajamas gaunančiose šalyse. Numatoma, kad klimato kaita šią problemą paaštrins, o antibiotikų ir priešgrybelinių preparatų poreikis kartu didės, nes senesnės priemonės tampa neveiksmingos ir nutraukiamas jų vartojimas, nors ligų našta ir toliau didėja. Taip pat didėja susirūpinimas, kad antimikrobinės medžiagos praranda savo veiksmingumą visuose sektoriuose – ne tik veterinarijoje bei žmonių medicinoje, bet ir sodininkystėje bei žemės ūkyje. Platus antimikrobinių medžiagų naudojimas ir piktnaudžiavimas jomis skatina atsparumo antimikrobinėms medžiagoms vystymąsi ir plitimą, turint omenyje augalų patogenus, dirvožemio organizmus, gedimą sukeliančius organizmus ir zoonozų sukėlėjus, esančius augalinės kilmės maisto produktuose [40].

1.4.1. *Fusarium* spp. tarša javuose: DON ir DON konjuguotos formos

Fuzariozė yra plačiai paplitusi visame pasaulyje kviečių (*Triticum aestivum* L.) liga, daugiausiai sukeliamą *Fusarium graminearum*. Kviečiai gali būti užkrėsti *F. graminearum* nuo žydėjimo (*anthesis*) iki pieninės brandos stadijos. Derlius prarandamas dėl nesėkmingo branduolio vystymosi arba užkrėstų branduolių, kurie yra susitraukę, pakitusios spalvos ir lengvesni vertinant pagal hektolitro masę [41, 42]. Sėklos, gautos iš fuzariozės paveiktų laukų, tampa infekcijos plėtos per sėklą šaltiniu, kuris gali sukelti naujas epidemijas, o auginant *F. graminearum* užkrėstus grūdus dėl mažesnio sėklų gyvybingumo ir daigumo augalai blogiau krūmijasi [43–45].

Siekiant valdyti sėklose ir dirvožemyje plintančius patogenus ir padidinti sėklų daigumą, Kanadoje kviečius rekomenduojama apdoroti fungicidais, tačiau daugumos šiuo metu registruotų fungicidų veikimas yra nukreiptas į kitus patogenus nei *F. graminearum*, todėl javų pasėliuose fungicidų poveikio veiksmingumas prieš sėklomis plintančią *F. graminearum* nėra stabilus ir nuoseklus. Sėklų apdorojimas mikrobinėmis biokontrolės priemonėmis buvo ištirtas kaip galima alternatyva

sintetiniams fungicidams, tačiau šios biokontrolės pastangos daugiausia apsiribojo laboratoriniais ir šiltnamių tyrimais [46].

Svarbiausios per sėklas plintančios kviečių ligos Lietuvoje yra paprastoji smėlinė (*Tilletia caries*) ir sėjinukų maras (patogenų kompleksas, apimantis *Fusarium* rūšis ir *Bipolaris sorokiniana*), antroji liga labiausiai paplitusi tarp vasarinių kviečių. Yra du pagrindiniai sėklų infekcijų kontrolės būdai: cheminė kontrolė ir alternatyvūs biologinės, fizikinės bei mechaninės kontrolės metodai.

Deoksinivalenolį (DON), dar vadinamą vomitoksinu, gamina *Fusarium* genties grybai, daugiausia *F. graminearum* ir *F. culmorum*, kurių buvimas ir fuzariozinio puvinio liga siejama su grūdinais javais, tokiais kaip kviečiai, miežiai, avižos, rugiai ir kukurūzai, o rečiau aptinkama ryžiuose, sorguose ir kvietrugiuose [47]. Pasėlių užterštumas DON yra pasaulinė problema, kuri sukelia didelius ekonominius nuostolius maisto ir pašarų perdirbimo pramonei [48, 49]. Saugant vartotojus Europos Komisija [50] nustatė didžiausius leistinus DON kiekius grūduose (1750 µg/kg), javų miltuose ir makaronuose (750 µg/kg), duonoje (500 µg/kg) ir kūdikiams bei mažiems vaikams skirtuose grūdų produktuose. Patekęs į žmogaus organizmą DON, prisijungdamas prie ribosomų, inhibuoja baltymų sintezę ir sukelia neigiamus efektus organizme: citotoksiškumą, aktyvina ląstelių dalijimąsi kaulų čiulpuose, blužnyje, limfmazgiuose, užkrūčio liaukoje bei žarnose, silpnina imuninę sistemą bei mažina organizmo atsparumą susirgimams ir kt. Toksiškas poveikis nustatytas ne tik žmonėms, bet ir gyvūnams. Suvartojus mikotoksinais užteršto produkto, gali pasireikšti ūmūs virškinamojo trakto sutrikimo simptomai, tokie kaip vėmimas, viduriavimas ir maisto netoleravimas. Tokie simptomai, kaip anoreksija, sumažėjęs kūno svorio prieaugis, toksinis poveikis kepenims, dermatologinės problemos ir pakitusi mityba, atsiranda po ilgalaikio vartojimo maisto, užteršto DON mikotoksinu [47].

DON konjugatai yra dažnai aptinkami įvairiuose grūduose, grūdų produktuose ir pašaruose kartu su jų laisvomis formomis. *Fusarium* spp. gamina DON ir du acetilintus DON metabolitus: 3-acetildeoksinivalenolis (3-ADON) ir 15-acetildeoksinivalenolis (15-ADON). Be šių mikroskopinių grybų, produkuojamų metabolitų grūduose ir jų produktuose, aptinkamas dominuojantis transformuotas mikotoksinas deoksinivalenol-3-gliukozidas (D3G), kurį augalas produkuoja kaip atsaką į grybelinę infekciją [51]. DON yra labai jautrus transformacijoms, ir abipusė mutacija, apimanti šių maskuotųjų mikotoksinų, ypač D3G, susidarymą yra labai rizikinga [52–54].

Žmonėms ir gyvūnams DON sumažina maisto suvartojimą bei maistinių medžiagų įsisavinimą ir sukelia vėmimą, tačiau nepakanka informacijos apie DON konjugatų toksiškumą [55]. Juan-Garcia ir kt. [56, 57] teigė, kad 15-ADON yra mažiau toksiškas nei 3-ADON, tačiau kiti tyrimai parodė priešingus rezultatus ir nurodė, kad 15-ADON gali būti toksiškesnis [58]. Pasak Europos Maisto saugos tarnybos [59], acetilinti DON dariniai (3-ADON ir 15-ADON) gali sukelti tokį patį ūminį ar lėtinį poveikį, kaip ir pirminis toksinas DON. Europos Maisto saugos tarnyba [60] paskelbė, kad D3G gali grįžti į pradinę DON formą veikiant žmogaus virškinamojo trakto bakterijoms, ir gali reaktyvuotis jo toksiškumas. Šiuo metu

plačiausiai ištirtas DON konjugatas yra D3G, kuris pirmą kartą buvo nustatytas *Zea mays* suspensijose ir įvardintas kaip pagrindinis DON metabolitas [61]. Keletas tyrimų įrodė, kad D3G dažnai aptinkamas kartu su DON pasėliuose (kviečių, kukurūzų, miežių ir avižų), taip pat grūdų produktuose ir pašaruose koncentracijų ribose nuo 2 mg/kg iki 1700 mg/kg [62–65]. Dėl didelių D3G kiekių, randamų grūdų produktuose ir galimos rizikos dėl jo transformacijos į laisvą formą virškinimo metu, maskuotieji toksinai turėtų būti pridedami prie reguliuojamo DON bendro kiekio. Europos Maisto saugos tarnyba [60] nustatė didžiausią leistiną suvartojamų mikotoksinų (DON ir jo konjugatų 3-ADON, 15-ADON, G3G suma) paros normą (angl. *total daily intake*, TDI) – 1 µg/kg kūno svorio.

Iki šiol duomenų apie konkrečiai šaliai būdingų maskuotųjų mikotoksinų paplitimą ir geografiniame regione pasauliniu mastu yra labai ribotas kiekis, todėl norint vienareikšmiškai įvertinti maisto ir pašarų mikotoksikologinę būseną, būtini nuolatiniai pasaulinio masto maskuotųjų mikotoksinų tyrimai. Kadangi DON ir DON konjugatų tarša užterštuose grūduose yra susijusi su fuzarinio puvinio paplitimu laukuose, jo kontrolė grūdų auginimo metu yra geriausias būdas mikotoksinų grūduose prevencijai.

1.4.2. Mikotoksinų kontrolės strategijos

Yra dvi taršos mikotoksinais kontrolės strategijos: 1) prevencijos strategija ir 2) nukenksminimo strategija [66]. Šios strategijos gali būti taikomos įvairiuose gamybos proceso etapuose, dažnai klasifikuojamos taip: prieš derliaus nuėmimą ir po derliaus nuėmimo.

Veiksmai prieš derliaus nuėmimą apima genotipų ar hibridų, atsparių grybelinėms infekcijoms ir vabzdžiams kenkėjams, atranką; veiksnus, leidžiančius sumažinti augalų poveikį stresui (pvz., sausrą); saikingą insekticidų ir herbicidų naudojimą; sėjomainą; savalaikį derliaus nuėmimą; gerą dirvožemio valdymą, siekiant pašalinti, sunaikinti arba užkasti užkrėstus derliaus likučius. Prevencinių priemonių taikymo gairės pateiktos ES reglamente 1881/2006 ir ES Komisijos rekomendacijoje 583/2006 (dėl *Fusarium* toksinų prevencijos ir mažinimo grūduose ir grūdų produktuose) [67, 68].

Siekiant užkirsti kelią toksikogeninių grybų plitimui, metodai, taikomi po derliaus nuėmimo mikotoksinų prevencijai, apima pasėlių laikymą tinkamomis sąlygomis (drėgmės ir temperatūros) arba cheminių fungicidų naudojimą. Jei, nepaisant šių metodų, produktai yra užteršti mikotoksinais, gali būti taikomi biokontrolės būdai mikotoksinų kiekio sumažinimui. Tai apima tradicinius ir naujoviškus fizikinius metodus (pvz., frakcionavimą, terminį apdorojimą, UV spinduliuotę, šaltą plazmą, švitinimą elektronų pluoštu, impulsinį elektrinį lauką, adsorbentus), taip pat cheminius metodus (oksidantų, tokių kaip vandenilio peroksidas, sieros dioksidas, natrio hipochloritas, ozonas arba amoniakas naudojimą) [66]. Tačiau kai kurie iš šių metodų praktikoje netaikomi, nes gali susidaryti toksiškų likučių arba patys metodai gali pakenkti produktų maistinei vertei ir juslinėms savybėms. Be to, šiuo metu nėra jokių teisinių reglamentų dėl maisto

nukenksminimo. Pagal Reglamentą 1831/2003 [67], maisto produktai, kurie neatitinka nustatytų didžiausių toksinų kiekių, neturėtų būti naudojami kaip maisto sudedamosios dalys, maišomi su kitais maisto produktais ir neturėtų būti sąmoningai detoksikuojami naudojant cheminį apdorojimą. Teršalų buvimas maiste turi būti kiek įmanoma sumažintas laikantis geros gamybos praktikos (GGP), geros žemės ūkio praktikos (GAP) ir taikant Rizikos veiksnių analizės ir svarbių valdymo taškų sistemą (RVASVT). Rūšiavimas ar kiti fizikinio apdorojimo metodai leidžia sumažinti mikotoksinų kiekį žemės riešutuose, riešutuose, džiovintuose vaisiuose ir grūduose [66]. Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas aplinkai draugiškų biokontrolės priemonių kūrimui ir panaudojimui.

1.4.3. Biokontrolės priemonės mikotoksinų prevencijai

Biologinė detoksikacija apibrėžiama kaip mikroorganizmų fermentų ir jų metabolizmo produktų panaudojimas mikotoksinų skaidymui. Biologinė detoksikacija yra labai perspektyvi alternatyva su galimybe panaudoti šimtus ir (arba) tūkstančius tinkamų mikroorganizmų ir jų metabolitų. Kita vertus, mikrobine detoksikacija identifikuojama kaip mikotoksinų biotransformacija į mažiau arba visai netoksiškus junginius. Detoksikacijai naudojamas mikroorganizmas turi atitikti tam tikrus kriterijus, pavyzdžiui, turi būti saugus naudoti, nepatogeniškas, gaminti stabilūs žinomi netoksiški metabolitai, skaidyti mikotoksinus, sudaryti kompleksus, kurių negalima pakeisti, būti aktyvus sandėliavimo metu, nesuteikti nepriimtino kvapo ar skonio, nepakeisti maistinės vertės ir atitikti minimalius reikalavimus jo auginimui bei gamybai [69]. Grybai, mielės ir bakterijos yra labiausiai paplitę mikroorganizmai, naudojami pašarų ir maisto detoksikacijai [70] (1.1 lentelė). Ragoubi ir kt. [71], Sadiq ir kt. [72], bei Yao su bendraautorais [73] pateikė išsamią apžvalgą apie pieno rūgšties bakterijų vaidmenį mažinant mikotoksinų kiekį maisto produktuose, naudojant įvairius mechanizmus, apimančius grybų augimo slopinimą, mikotoksinų absorbciją ir mikotoksinų degradaciją. O štai Papp su bendraautorais [74] apžvelgė mielių panaudojimo galimybes mikotoksinų detoksikacijai, B2 ir B3 siejant šį virsmą su fermentų veikla. Ji ir kt. [75] aprašė *Aspergillus* spp. genčiai priklausančių grybų galimybę skaidyti maisto produktuose esančius aflatoksinus B1 ir juos paversti į mažiau toksiškus aflatoksinus.

1.1 lentelė. Mikroorganizmų panaudojimas mikotoksinų detoksifikacijai

Mikroorganizmas	Mikotoksinas	Pašalintų mikotoksinų kiekis	Literatūra
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP: 76.13T	DON	8,8–30,5 %	[71]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIP: 101027T	DON	5,4–30,0 %	[71]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DON ir T-2	20,0 %	[72]
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	AFB1	98,0 %	[72]
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Fumonizina B1 ir B2	atitinkamai 9,0 % ir 92,0 %	[72]
<i>Bacillus subtilis</i> WXBs-042	DON	75,5 %	[73]
<i>Aspergillus oryzae</i> As-W6	DON	90,0 %	[73]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DON ir ZEA	atitinkamai 11,0–40,0 % ir 17,0 %	[73, 74]
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DON ir ZEA	atitinkamai 31,0 % ir 72,0 %	[74]

Gyvų mikroorganizmų ir bioaktyviųjų metabolitų, pavyzdžiui, tam tikrų mikroorganizmų gaminamų fermentų, naudojimas turi didelį potencialą maisto ir pašarų pramonėje atliekant mikotoksinų detoksikaciją. Kai kurie mikroorganizmai produkuojamais fermentais gali skaidyti mikotoksinus ir naudoti juos kaip anglies šaltinį, todėl į juos reikėtų atsižvelgti jau pradiniam naujų detoksikuojančiųjų mikroorganizmų atrankos etape. Taigi, labai svarbu yra mikroorganizmų atranka, o biologinė detoksikacija yra perspektyvus metodas, kurį galima dar labiau patobulinti sutelkiant dėmesį į fermentų, gebančių skaidyti ir detoksikuoti mikotoksinus, gamybą ir panaudojimą. Tinkamų mikroorganizmų išskyrimas, jų augimo ir gamybos sąlygų optimizavimas, nebrangių gamybos terpių paruošimas ir tolesnių metodų sukūrimas jų pagrindu yra kertinis žingsnis į sėkmingą fermentų naudojimą maisto pramonėje ir pašarų gamyboje. Biologinio mikotoksinų skaidymo pranašumai yra maža kaina, platus tikslinių mikotoksinų spektras, minimalus šalutinis poveikis maistinėms medžiagoms, greitas personalo apmokymas ir tinkamumas įvairiems maisto produktams (skystiems ir kietiems) [69].

Mikrobinė fermentacija: antimikrobinis aktyvumas pasižymintis pieno rūgšties bakterijos (PRB). PRB atlieka svarbų vaidmenį maisto fermentacijoje suteikiant produktui ne tik priimtinas vartotojui juslines savybes, bet ir didinant paruošto produkto saugą [76]. Antimikrobinis PRB poveikis daugiausia susijęs su metabolitų, tokių kaip organinės rūgštys, vandenilio peroksidas, diacetilas, etanolis, fenolis ir baltyminiai junginiai, susidarymu fermentacijos metu [77]. PRB pasižymi tiek antibakteriniu, tiek ir antigrybiniu aktyvumu. Iš antigrybinių žinomas *Lactobacillus* spp. aktyvumas prieš toksinus gaminančią *Penicillium nordic*, *Lactobacillus plantarum* priešgrybelinis aktyvumas ir PRB (iš įvairių terpių) geba

slopinti *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus*, *Penicilius nidulianids*, *Fusrichotimulium nidulioides* ir *commulionides* augimą [78–80].

Ankstesniuose KTU tyrimuose įrodyta, kad PRB (*Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, ir *Pediococcus pentosaceus*), išskirtos iš ruginių raugų, pasižymi antimikrobiniu aktyvumu prieš *Bacillus subtilis* ir antigrybiniu aktyvumu prieš *Fusarium culmorum* ir *Fusarium poae* slopinant jų vegetatyvinį augimą ir dauginimąsi [81, 82]. Tai paskatino idėją naudoti PRB kovojant su kviečių grūdų sėklomis pernešamomis augalų ligomis, kurias sukelia *Fusarium* spp. ir kt. mikroskopiniai grybai. Siekiant išsiaiškinti PRB antigrybinį aktyvumą, eksperimentas vykdytas laboratorinėmis sąlygomis su natūraliai *Fusarium* spp. užterštais kviečių grūdais. Taip pat buvo tiriama lauko sąlygomis PRB apvoliojimo įtaka sėklų daigumui ir daigų parametrams [83].

PRB veikimo mechanizmas mikotoksinų mažinimui. Pieno rūgšties bakterijos, įskaitant probiotines padermes, kurios tradiciškai yra naudojamos kaip natūralūs maisto ir pašarų konservantai, yra ypač patrauklios dėl jų teigiamo fiziologinio poveikio žmonių ir gyvūnų sveikatai bei gebėjimo surišti mutagenus iš maisto ir aplinkos. Be to, pirmenybė teikiama PRB bakterijoms, nes jos natūraliai auga žmogaus žarnyne, yra saugios naudoti (turi GRAS statusą, angl. *generally recognized as safe*) ir yra daug padermių, kurias lengva kultivuoti bei prižiūrėti [69]. Detoksikacija pieno rūgšties bakterijomis siejama su trimis pagrindiniais mechanizmais: mikotoksinų degradacija veikiant PRB produkuojamiems fermentams, mikotoksinų absorbcija gyvybingomis PRB ląstelėmis ir mikotoksinų sąveika su PRB metabolitais [69].

PRB produkuoja daugybę proteolitinių fermentų, kurie atlieka svarbų vaidmenį maisto produktuose esančių mikotoksinų degradacijos procese. Mikotoksinų absorbcija gyvybingų PRB ląstelių sienelėmis siejama su polisacharidų, baltymų ir peptidoglikanų buvimu jose. Taip pat autoriai pažymi, kad mikotoksinų prisijungimas prie PRB ląstelių priklauso nuo pradinės mikotoksino koncentracijos, PRB padermės ir ląstelių skaičiaus bei terpės pH, inkubavimo temperatūros. Pagrindiniai metabolitai, susidarantys PRB fermentacijos metu ir atliekantys svarbiausią vaidmenį detoksikacijos mechanizme, yra organinės rūgštys, fenoliniai junginiai, riebalų rūgštys, reuterinas ir mažos molekulinės masės bioaktyvieji peptidai. Šie metabolitai gali jungtis su mikotoksinais sumažindami jų toksiškumą. PRB ląstelių ir metabolitų mikotoksinų skaidymo mechanizmai dar nėra iki galo ištyrinėti [69]. Naujausi tyrimai rodo, kad negyvos PRB ląstelės taip pat gali absorbuoti mikotoksinus, o jų geresnė mikotoksinų adsorbciją, palyginti su gyvomis ląstelėmis, gali sąlygoti bakterijų ląstelių sienelių struktūrų pokyčiai, veikiant aukštai temperatūrai, t. y. baltymų denatūracija, porų susidarymas ląstelės sienelės struktūroje (tai padidina išorinių ląstelės sienelės sluoksnių pralaidumą) ir padidėjęs aktyviųjų sričių, atsakingų už įvairių junginių adsorbciją, skaičius [66].

Antroji sąlyga, kurią turi atitikti mikrobiologinis detoksikacijos metodas, yra proceso negrįžtamumas. Norint išvengti desorbcijos ir pakartotinio toksinų poveikio, mikotoksino–adsorbento kompleksas turi būti stabilus, ypač esant virškinamojo trakto

sąlygoms. Tačiau kai kuriais atvejais adsorbuoti mikotoksinai išsiskiria ir grįžta į laisvąją formą. Modelinėse sistemose tyrimais buvo įrodyta, kad toksinai, surišti naudojant termiškai suaktyvintas LAB ląsteles, yra stabilesni nei toksinai, surišti naudojant gyvas bakterijas [69].

1.5. Ultragarso apdorojimo taikymas bioprocesuose

Ultragarso (UG) priklauso technologijoms, skleidžiančioms akustines bangas, viršijančias žmogaus klausos ribą – >16 kHz [84]. Vienas iš svarbiausių veiksnių, turinčių įtakos sonocheminių reakcijų efektyvumui, yra ultragarso dažnis [85]. Pagal dažnį UG skirstomas į kategorijas: žemojo dažnio UG (20–100 kHz) ir didelio intensyvumo poveikis ($10\text{--}1000\text{ W/cm}^2$) arba aukštojo dažnio UG (100 kHz–1 MHz) ir mažo intensyvumo poveikis ($<1\text{ W/cm}^2$) [86, 87]. Didelio intensyvumo ultragarso ($10\text{--}100\text{ W/cm}^2$, kurio dažnis svyruoja nuo 20 kHz iki 100 kHz) yra ekonomiškai efektyvi ir greita technologija, kuri buvo naudojama struktūriniam ir funkciniam globulinių baltymų modifikavimui [88–90]; aukštojo dažnio ultragarso daugiausiai naudojamas maisto fizikinių ir cheminių savybių vertinimui [86, 87].

Naudingas ultragarso poveikis siejamas su kavitacijos reiškiniu, kuris dėl ultragarso bangų sukurtos slėgių skirtumo pasireiškia staigiu dujų burbuliukų susidarymu, o po to vykstančiu jų suirimu [91]. Kavitacijos burbuliukai, pasiekę optimalų dydį (Bleiko spindulį), sukelia stiprias mikrosroves ir smūgines bangas, kurių sąveika sukuria hidrodinaminio slėgio smailes, siekiančias kelis šimtus MPa medžiagų paviršiuje, galinčių pakeisti medžiagų formą ir sudėtį. Skysčiuose ultragarsinė kavitacija formuoja unikalią energijos ir medžiagos sąveiką. Didelė temperatūra ir slėgis, atsirandantis dėl kavitacijos burbuliukų suirimo dujinėje ertmėje, sukelia laisvųjų radikalų ir kitų junginių susidarymą. Išsiplėtusių burbuliukų potenciali energija virsta kinetine energija, o skysčio srovė juda per burbulo vidų ir prasiskverbia per burbulo sienelę. Skysčio srovė, skriejanti į paviršių, turi didelį greitį ir labai stipriai veikia kietą paviršių. Dėl UG kavitacijos atsiranda hidrodinaminis kirpimas (išilginis poslinkis), nuo kurio terpė ir jos sudėtiniai komponentai yra spaudžiami ir retinami [91–93].

Kadangi ultragarsinė kavitacija linkusi didinti sistemos temperatūrą, dauguma šio proceso gerinimo tyrimų atliekami kambario temperatūroje arba esant recirkuliaciniam aušinimui (vandens apgaubu). Proceso temperatūra, didesnė nei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ veikiant ultragarsu, veiksmingai sumažina bakterijų kiekį. Kai didelio intensyvumo ultragarso sklinda per nedidelės klampos skysčius, dujas ir kietąsias medžiagas ar skysčių ir kietųjų medžiagų sąsają, akustinės bangos dažniausiai sukelia ekstremalią turbulenciją, vadinamą „mikrosrautu“ arba „akustiniu srautu“ [93].

1.5.1. Ultragarso poveikis fermentinės hidrolizės procesui

Pagrindiniai tradicinės fermentinės hidrolizės trūkumai yra ilga trukmė ir žemas hidrolizės laipsnis. Dauguma mokslinių tyrimų buvo atlikti tobulinant metodus, skatinančius substrato konversijos efektyvumą ir mažinančius hidrolizės trukmę [94].

Ultragarsinis apdorojimas sulaukė didelio dėmesio, kaip nauja fizikinio apdorojimo technologija, skirta pagerinti bioaktyviųjų komponentų ekstrahavimo procesą ir pagreitinėti fermentinę hidrolizę [95, 96]. Jin su bendraautoriais [85] pranešė, kad ultragarsinis apdorojimas žymiai pagerina pasirinktų produktų biologinį aktyvumą, substrato konversijos efektyvumą ir reakcijos greitį.

Pagrindinis principas, kuriuo grindžiamas ultragarso technologijos naudingasis poveikis – akustinės kavitacijos reiškinys, dėl kurio atsiranda didelis šlyties jėgos intensyvumas, laisvieji radikalai ir smūginės bangos. Ultragarso terminis poveikis, sukeliantis temperatūros ir entalpijos pokyčius, yra fazių pokyčių rezultatas. Todėl baltymo molekulinė struktūra gali būti pakeista taikant išankstinį apdorojimą ultragarsu tokiuose bioprocesuose kaip fermentinis apdorojimas, siekiant sumažinti Gibbso laisvąją energiją ir reakcijos aktyvacijos energiją, sumažinant Michaelio konstantą (matuoja fermento reakcijos kinetiką bei jos ekvivalentą substrato koncentracijai, kuriai esant vyksta reakcija) ir padidinant pradinį fermento reakcijos greitį. Be to, burbuliukai, atsirandantys dėl akustinės kavitacijos reiškinio, sprogsa ir sukelia labai didelę mechaninę šlyties jėgą, kuri gali inicijuoti baltymų denatūravimą, kad išsilaisvintų hidrofilinės grupės, o tai didina baltymų tirpumą ir leidžia fermentams lengviau sąveikauti su substratu, taip padidinant bendrą fermentinės hidrolizės proceso efektyvumą [97].

Kai kurie tyrėjai vertino ultragarso poveikį fermentinės hidrolizės procesui, siekdami jį pagreitinėti ir sutrumpinti fermentinės hidrolizės trukmę. Ultragarso teigiamas poveikis buvo patvirtintas tyrimuose naudojant skirtingos kilmės mėginius. Abadia-Garcia ir kt. [98], taikant išankstinį ultragarsinį apdorojimą išrūgų baltymų hidrolizei augalinės kilmės proteazėmis, pavyko sumažinti bromelaino hidrolizatų hidrolizės laiką 95,0 %. Ultragarsu apdorotuose mėginiuose hidrolizės laipsnis padidėjo 26–63 %, o tai rodo, kad ultragaras padidino bendrą fermentinės hidrolizės proceso efektyvumą, ypač hidrolizės laiko sąskaita. Uluko ir kt. [99] taip pat nustatė hidrolizės greičio ir efektyvumo padidėjimą po išankstinio ultragarsinio apdorojimo. Jia ir kt. [100] pažymėjo, kad ultragarsinis nuriebalintų kviečių gemalų baltymų apdorojimas (20 kHz dažniu ir 40 W galia, trukmė – 210 min) palengvino hidrolizės procesą ir leido padidinti hidrolizės laipsnį.

Nustatyta, kad ultragaras veiksmingai padidina hidrolizatų išeigą fermentinės hidrolizės ar baltymų ekstrakcijos metu. Lyginant su kitais metodais, tokiais kaip mikrobangų, slėginių skysčių ir superkritinių skysčių ekstrakcija, ultragarsinis apdorojimas labiausiai pasiteisino dėl proceso paprastumo, mažų energetinių sąnaudų bei instrumentinių reikalavimų ir reikšmingo rezultato: teigiamo poveikio galutinio gaminio išeigai bei hidrolizės procesui [97].

Daugybėje darbų buvo taikomas išankstinis ultragarsinis apdorojimas, siekiant pagerinti bendrą fermentinės hidrolizės procesą. Liang ir kt. [101] atlikti tyrimai rodo, kad kukurūzų baltymų hidrolizatų gamyboje taikant 28 kHz dažnio ultragarsą galima padidinti hidrolizės laipsnį ir baltymų hidrolizės greitį, atitinkamai 5,4 % ir 11,3 %, lyginant su tradiciniu enzimolizės procesu (be išankstinio ultragarsinio apdorojimo), o gautas teigiamas efektas gali būti siejamas su dalelių dydžio sumažėjimu ir baltymų struktūros pokyčiais [97]. Kiti autoriai patvirtino išankstinio apdorojimo ultragarsu

poveikį augalinės kilmės baltymų fermentinės hidrolizės procesui, konstatuodami apie hidrolizės laipsnio padidėjimą nuo 2,4 % iki 6,0 % [102]. Fathi ir kt. [36] išbandė kombinuotą fizikinį-fermentinį (ultragarsu-alkalaze) metodą ryžių sėlenų baltymų (RSB) apdorojimui, gauti rezultatai parodė, kad baltymų hidrolizės laipsnis didėja, didėjant galiai ir ilgėjant apdorojimo trukmei, didžiausias hidrolizės laipsnis ($27,35 \pm 0,45$ %) buvo gautas taikant fermentinę hidrolizę kartu su RSB pirminiu ultragarsiniu apdorojimu (20 kHz, 150 W, 40 min). Ultragarso taikymas skirtingomis sąlygomis prieš fermentinę hidrolizę turėjo įtakos biologiškai aktyvių baltymų, išgautų iš ryžių baltyminių medžiagų, biologinėms savybėms.

1.5.2. Ultragarso poveikis baltymų funkcionalumo modifikavimui

Daug tyrimų, skirtų augalinės kilmės baltymų funkcionalumo didinimui, rodo teigiamą UG apdorojimo įtaką. Ultragarsinis apdorojimas sukelia baltymų polimerizaciją ir depolimerizaciją (baltymų molekulių susilankstymą ir išsilankstymą), o tai savo ruožtu paveikia baltymų tirpumą, emulsifikavimo, putojimo ir gelių sudarymo savybes. Akustinė kavitacija suardo tarp molekulinis ryšius, jungiančius baltymų molekules, ir susilpnina baltymo–baltymo tarpusavio ryšį, kartu sumažina baltymų molekulių dalelių dydį ir padidina baltymų dalelių paviršiaus plotą, o jis skatina baltymų molekulių sąveiką su vandens molekulėmis, dėl kurios padidėja baltymų tirpumas [103].

Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas sojų baltymams, dėl jų mažos kainos ir didelės maistinės vertės, tai skatina sojų tyrimus ir komercinį naujų maisto produktų kūrimą. Žinoma, kad sojų baltymai dėl dviejų pagrindinių komponentų, 7S ir 11S globulinių, kurie sudaro maždaug 70 % visų sojų baltymų, tretinių ir ketvirtinių struktūrų sudėtingumo yra atsparūs fermentinei hidrolizei [104]. Be to, komercinėje sojų baltymų izoliatų gamyboje taikomos sąlygos, įskaitant džiovinimą purkštuvinėje džiovykloje ir sterilizavimą aukšta temperatūra, tai gali sukelti visišką baltymų molekulių denatūravimą ir agregaciją prarandant jiems būdingas funkcines savybes [105, 106]. Todėl siekiant didinti sojų baltymų fermentinės hidrolizės efektyvumą ir gerinti funkcines savybes būtina taikyti jų struktūros modifikavimui pirminį UG apdorojimą. Baltyminių medžiagų išankstinis apdorojimas ultragarsu išbandytas siekiant padidinti sojų baltymų fermentinės hidrolizės efektyvumą. Nustatyta, kad apdorojimas didelio intensyvumo ultragarsu (dažnis nuo 16 kHz iki 100 kHz, intensyvumas nuo 10 W/cm² iki 1000 W/cm²) gali pakeisti baltymų konformaciją, paveikti vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas, suardyti ketvirtinę ir (arba) tretinę globulinių baltymų struktūrą, o tada buvo atskleista daugiau hidrolizės vietų, kurios galėjo būti prieinamos proteazių. Ultragarsinis apdorojimas skaido kryžminius ryšius baltymų struktūroje, o tai savo ruožtu gali padidinti substrato ir fermento sąveiką [107].

Taigi, pirminis ultragarsinis apdorojimas ir kontroliuojamos fermentinės hidrolizės kombinacija gali būti perspektyvus būdas keičiant globulinių baltymų funkcionalumą.

1.5.3. Ultragarso poveikis mikrobinės fermentacijos procesui

Ultragarsinė „stimuliacija“ įgijo didelę reikšmę gerinant vertingų biologiškai aktyvių medžiagų susidarymą mikroorganizmuose, įskaitant grybus, mieles ir bakterijas. Nors ultragarsas yra gerai žinomas dėl ląstelių ardymo, jis taip pat gali būti taikomas jų produktyvumui didinti. Tiksliau, žemojo dažnio ultragarsui teikiama pirmenybė siekiant mikrobinių produktų gamybos tobulinimo. Produktyvumo didinimo ultragarsu mechanizmas dar iki galo neišaiškintas, tačiau jo teigiamo poveikio mechanizmas gali būti siejamas su mikroorganizmų ląstelių membranų pralaidumo padidėjimu, kalcio kanalų paviršiuje aktyvinimu, ląstelės sienelės susilpnėjimu, skatinamas veiksmingas selektyvių maistinių medžiagų transportavimas, vidutiniškai tirpių junginių tirpumo didinimas ir sustiprinamas tirpiųjų junginių pernešimas ląstelės viduje ir tarp ląstelės bei aplinkos.

Literatūros, skirtos mikrobinės fermentacijos produktyvumo didinimui, yra labai nedaug, todėl artimiausiu metu tikslinga plačiau ištirti šį procesą. Neseniai atliktas tyrimas taip pat suteikė žinių apie galimą kitą ultragarsinio poveikio mechanizmą, teigiantį, kad kavitacijos metu susidariusių mikroburbuliukų staigus irimas gali suardyti ląstelę į daleles arba padaryti ją porėtesnę, o tai padeda pernešti deguonį į ląstelės vidų ir dėl šios priežasties padidėja junginių pernešimas ląstelėje.

Susidariusios poros padeda pernešti nepralaidų substratą per ląstelės membraną, padidindamos transmembraninę srovę ir galiausiai pagerindamos ląstelių dauginimąsi. Permealizuota membrana sudaro sąlygas geresniam fermentų patekimui į substratą, o tai sąlygoja padidėjusį fermento ir substrato sąlytį ir padidėjusį biokonversijos greitį. Kita vertus, didėjantis susidarančių burbuliukų skaičius apsprendžia mikrosrautą fermentacijos terpėje. Šie burbuliukai taip pat sukuria mechaninę šlytį ir esminį poveikį fermentacijos procesui, galintį turėti neigiamos įtakos mikroorganizmų veiklai. Taigi, ultragarso poveikis mikrobinei fermentacijai yra kompleksinis ir teigiamo efekto paieška tyrimuose siejama su mikroorganizmų rūšimi, ultragarso taikymu skirtingoms jų augimo fazėms, o taip pat taikomais ultragarso parametrais [93].

Įvairūs veiksniai vaidina svarbų vaidmenį taikant ultragarsą mikrobinės fermentacijos procesuose. Vienas iš jų yra mikroorganizmų ląstelės sienelės sandara ir sudėtis, kuri apibūdinama dažant Gram būdu. Todėl, taikant ultragarsą, reikia įvertinti bakterijų tipą, besiskiriantį pagal morfologinę struktūrą. Gramteigiamosios bakterijos yra atsparesnės ultragarsui nei gramneigiamosios, nes gramteigiamosios bakterijos turi tvirtesnę ląstelių sienelę, sudarytą iš teicho rūgšties ir peptidoglikano. Be to, bakterijų forma yra lemiamas veiksnys, apsprendžiantis jų jautrumą ultragarsiniam apdorojimui. Lazdelių formos bakterijos yra jautresnės ultragarsui nei kokai / sferinės bakterijos, kadangi, pirmuoju atveju, ultragarsu veikiamas didesnis paviršiaus / tūrio plotas. Tokia išvada konstatuota tiriant ultragarso poveikį probiotinėms pieno rūgšties bakterijoms, nes *Lactobacillus* genties bakterijos buvo labiau paveiktos ultragarsu nei *Lactococcus* genties bakterijos. Be to, ultragarso efektyvumas priklauso nuo tiriamų bakterijų suspensijos kiekio [93].

Apdorojimo ultragarsu režimas, tinkamas vienam organizmui ar vienam procesui, gali būti netinkamas kitam organizmui ar procesams. Kiekvienam procesui reikia nustatyti optimalius ultragarsinio apdorojimo parametrus, nes ultragarso dažnio ir galios kitimas turi skirtingą poveikį organizmams ir biologiniams procesams. Toliau aptariami kai kurie esminiai ultragarso parametrai ir jų poveikis fermentacijos procesui.

Bendras fermentacijos proceso intensyvinimas labai priklauso nuo ultragarso parametrų, tokių kaip ultragarso dažnis ir apdorojimo trukmė, mikrorganizmų augimo stadijos: prisitaikymo fazė (angl. *lag phase*), logaritminė arba augimo fazė (angl. *log phase*), stacionari fazė (angl. *stationary phase*) ir mirties fazė (angl. *death phase*), kurioje mikroorganizmai veikiami ultragarsu, ir darbo ciklo. Darbo ciklas reiškia ultragarso veikimo režimą, kuris gali būti impulsinis ir nuolatinis. Žinoma, kad ultragarsinis apdorojimas impulsiniu režimu mažiau pažeidžia mikrorganizmų ląsteles ir padidina jų produktyvumą lyginant su nepertraukiamu režimu. Nustatyta, kad 10 % ir 20 % (10 % darbo ciklas atitinka 1 s ultragarsinio apdorojimo, po kurio eina poilsio laikas – 10 s, o štai 20 % darbo ciklas atitinka 1 s ultragarsinio apdorojimo ir 5 s poilsio) darbo ciklai skatina mielių augimą, tarp kurių 20 % darbo ciklai buvo laikomi optimaliais, nes jie leido padidinti etanolio produktyvumą 3,5 karto lyginant su kontroline fermentacija (darbo ciklas daugiau nei 70 %) [93, 108]. Shokri ir kt. [109] atlikti tyrimai parodė, kad *Lactobacillus brevis* (LMG 6906) fermentacija kartu su ultragarsiniu apdorojimu (23 kHz, 10 μ m amplitudė, 3 min ir 5 min) lėmė 1,09 log KSV/mL didesnę ląstelių skaičių, specifinis ląstelių augimo greitis padidėjo 58,2–82,6 %, o ląstelių membranų pralaidumas padidėjo 16,0–36,3 %.

Ultragarso galia apsprendžia ultragarso sukeltą kavitacijos intensyvumą, kuris turi reikšmingos įtakos sonikuojamo bioproceso produktyvumui. Mažo intensyvumo ultragarso taikymas bioprocusuose yra nepakankamai ištirtas, nes energijos sąnaudos yra pernelyg mažos, kad sutrikdytų mikrorganizmų funkcijas. Kita vertus, didelio intensyvumo ultragarsas, taikomas ląstelių ardymui, yra siejamas su daugelio fermentų aktyvumo sumažėjimu, todėl jis laikomas mikrobicidiniu. Padidėjus ultragarso galiai, dėl padidėjusios kavitacijos susidaro mikroburbuliukai. Jų dydis priklauso nuo ultragarso dažnio, o štai burbuliukų skaičius labiau priklauso nuo galios. Esant pastoviam dažniui, kai didėja ultragarso galia, proporcingai didėja pagal energijos tvermės dėsnį ir mikroburbuliukų skaičius, kai burbuliukų dydžiai yra vienodi. Toks mikroburbuliukų susidarymo procesas sąlygoja laikinų porų ląstelės membranoje atsiradimą, dėl kurio padidėja mikroorganizmo membranos pralaidumas [93].

Ultragarsinio apdorojimo trukmė turi reikšmingą poveikį fermentacijos kinetikai, kuri gali teigiamai arba neigiamai paveikti gaunamą produktą, tai priklauso nuo apdorojimo intensyvumo. Sistemingas apdorojimo trukmės tyrimas padeda sužinoti optimalią poveikio trukmę, kurią taikant galima pasiekti didžiausią proceso našumą. Per ilgą poveikį gali pakenkti mikrorganizmų ląstelėms, o štai trumpesnės sonifikacijos trukmės gali nepakakti, norint reikšmingai padidinti produkto išeigą. Pernelyg ilgą ultragarsinį poveikį sukelia stiprią mechaninę šlytį bei stiprias

smūgines bangas, kurių mikroorganizmo ląstelė gali neatlaikyti, ir taip sumažėja fermentacijos proceso efektyvumas.

Taigi, yra keletas proceso patobulinimo mechanizmų, kuriuos ultragarsinis apdorojimas sukelia mikroorganizmams fermentacijos metu, ir jie dar nepakankamai ištirti įvairių bioproduktų gamybos sąlygomis. Optimalūs ultragarso parametrai yra labai svarbūs bioprocesams, nes nedidelis nukrypimas nuo jų gali turėti neigiamos įtakos ląstelėms ir sumažinti jų veiklos efektyvumą.

1.6. Baltymų hidrolizatų įvertinimas ir jų veikimo mechanizmas

1.6.1. Baltymų pagrindu pagamintų biostimuliatorių efektyvumo kriterijai

Baltymų hidrolizatų, kaip augalų biostimuliatorių, stimuliuojamojo poveikio augalų auginimui įvertinimas apima daugybę svarstymų ir pakopinių bandymų, kad būtų galima stebėti pagrindines augalų reakcijas tiek fiziologiniu, tiek ir metaboliniu lygiu.

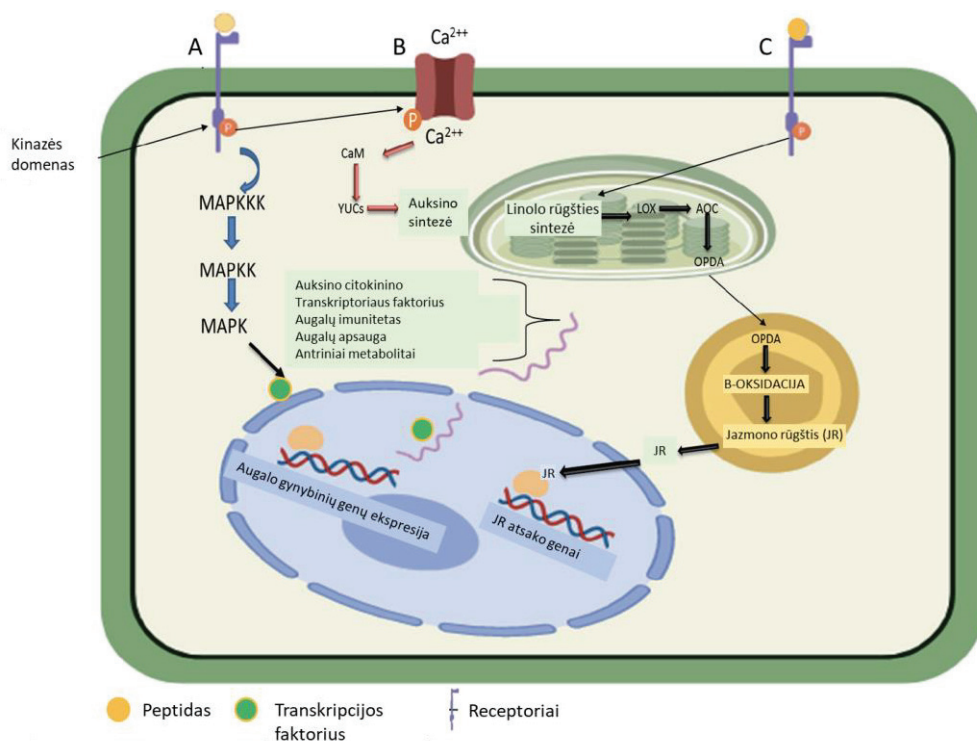
Augalų atsakas į biostimuliaciją buvo ištirtas hidroponinių pasėlių, augimo kamerų, šiltnamių, vazonų ir lauko tyrimuose. Modelinių sistemų tyrimai *in vitro* leidžia efektyviau įvertinti augalų reakciją į biostimuliaciją, nes taikant šį metodą galima valdyti klimato sąlygas, kontroliuoti biotinius bei abiotinius veiksnius, šviesos ciklus, maistinių medžiagų terpės sudėtį ir tyrimus galima atlikti naudojant įvairias augalų rūšis. Poveikis šaknų sistemų vystymuisi, stiebo augimui ar kalio indukcijai augalų audiniuose leidžia identifikuoti medžiagas, kurios skatina specifinę audinių augimą. Tyrimai šiltnamio sąlygomis, taikant BH tręšimą arba purškimą per lapus, yra labiausiai paplitusios strategijos. Maistinių medžiagų tirpalo sudėtis yra pagrindinis veiksnys atliekant šio tipo tyrimus. Peptidų absorbcijos koeficientas per šaknų sistemą, proteolitinių fermentų sekrecija iš šaknų, dirvožemio komponentai ir mikrobiota taip pat yra svarbūs veiksniai, į kuriuos reikia atsižvelgti, norint įvertinti maistinių medžiagų įsisavinimą [27].

Kaip rodo tyrimų rezultatai, daugelis baltyminių biostimuliatorių sėkmingai pagerino augalų vystymąsi, vaisių derlių, kokybę ir maistines savybes. Pavyzdžiui, komercinis biostimuliacijos „Trainer“, naudojamas tręšiant pomidorus šiltnamio sąlygomis, pagerino augalų maistinę vertę, padidino augalų aukštį, ūglių biomasę ir vaisių derlių [110]. Panašūs rezultatai gauti, naudojant šį biostimuliatorių salotoms [111]. Teigiamas baltymų hidrolizatų poveikis siejamas su fermentų, susijusių su N ir C metabolismu, aktyvinimu, siekiant palaikyti intensyvų augalų augimo greitį ir biomasės produktyvumą [33]. Daugumos pasėlių, apdorotų baltyminių biostimuliacijos, atveju padidėja augalų aukštis, lapų skaičius, pagerėja šaknų vystymasis, vaisių mezgimas ir užpildymas [112, 113]. Be to, keli tyrimai taip pat parodė antrinių metabolitų susidarymo padidėjimą. Pavyzdžiui, liucernos hidrolizato naudojimas auginant pipirus padidino fitocheminių medžiagų kiekį juose [114].

1.6.2. Baltyminių biostimuliatorių veikimo mechanizmas

BH tipo biostimuliatorių veikimo mechanizmas augalams lieka iki šiol neaiškus, tačiau daugelis tyrimų rodo, kad specifinės aminorūgštys ir (arba) peptidai hidrolizatuose gali imituoti natūraliai augaluose esančių peptidinių hormonų (taip pat žinomų kaip signalizuojantys peptidai) poveikį. Šios molekulės dalyvauja reguliuojant keletą augimo ir vystymosi procesų, siejamų su lapų ir žiedų formavimusi, dalyvauja kontroliuojant šaknų ilgį ir stiebo storį arba skatinant antrinę metabolizmo biosintezę. BH veikimo mechanizmas, manoma, yra panašus į aprašytą augalų peptidinių hormonų veikimo mechanizmą [115, 116].

Bendras veikimo mechanizmas (1.2 pav.) [27] prasideda, kai peptido signalą atpažįsta atitinkamas receptorių, o tada signalas perduodamas mitogeno aktyvintos proteinkinazės (MAPK) keliais į tarpląstelinį signalizacijos tinklą, per kuriuos sukuriamas ląstelių atsakas. MAPK kaskados yra pagrindinis tarpląstelinis kelių konvergencinis modulis. MAPK kaskadoje yra trys nuosekliai aktyvinamos kinazės: MAPK kinazės, kinazės (MAPKKK), ir MAPK, kurios gali toliau fosforilinti įvairius baltymų substratus, kad reguliuotų augalų augimą, vystymąsi ir imunitetą (1.2 pav.).



1.2 pav. Bendra baltyminių biostimuliatorių veikimo mechanizmo schema. A) Peptidų-receptorių ir MAPK kaskados sąveika; B) auksino tarpininko biosintezę aktyvinant Ca^{2+} kanalą; C) peptido poveikis jazmono rūgšties (JR) biosinтеzei [27]

Tokiu būdu MAPK kaskados gali kontroliuoti daugybę gynybinių augalo reakcijų, įskaitant imuninių genų ekspresiją, etileno indukciją, kamaleksino biosintezę ir reaktyviųjų deguonies rūšių (RDR) gamybą, atsakus, kurie padidina signalinių molekulių ir hormonų, tokių kaip giberelinai, kaupimąsi, slopina abscizo rūgšties (ABR) biosintezę dygimo metu, mažina viršūninį augimą dėl indol-3-acto rūgšties (IAR) kaupimosi arba sumažina kiekį transkripcijos faktoriaus, dalyvaujančio reguliuojant ABR biosintezę ir apsaugą nuo abiotinio streso. Kita vertus, peptidas jungiasi prie fitosulfokino receptorių (FSR), padidina citozolinio Ca^{2+} kiekį, sukeldamas nuo auksino priklausomą imuninį atsaką, padidinant kalmodulino (KAM) ir auksino biosintetinio YUC baltymo (flavino turinčio monooksigenazės) jungimosi aktyvumą auksino biosinтеzei nuo indol-3-piruvato (IPA) iki IAA (1.2B pav.) Be to, peptido ir jo receptoriaus sąveika skatina jazmono rūgšties (JR) biosintezę oktaidekanoidiniu keliu; JR skatina gynybinio geno ekspresiją gynybinio proteinazės inhibitoriaus sintezei (1.2 pav.) [27].

Nors baltyminių hidrolizatų įtaka medžiagų apykaitos virsmų aktyvinimui vis dar tirama, atsakai, nustatyti pasėliuose pirminio ir antrinio metabolizmo metu, veikiamuose BH, rodo panašius signalizacijos mechanizmus. Neseniai buvo pasiūlyta didelio našumo fenotipų nustatymo platforma ir metabolominės technologijos, siekiant išsiaiškinti augalų atsaką į baltyminius biostimuliacinius [117, 118]. Paul ir kt. [119] taikė šiuos metodus, kad apibūdintų BH poveikį pomidorų auginimui kontroliuojamoje kameroje ir parodė, kad yra perprogramuojamas metabolizmas, susijęs su etilenu, poliaminiais ir RDR tarpininkaujamais signalizacijos keliais.

Ši neinvazinė technologija leido sukurti galingą tyrimo priemonę įvertinti biostimuliatorių įtaką augalų augimui, morfologijai, spalvos ir fotosintezės efektyvumui medžiagų apykaitos procesuose. Artimoje ateityje, manoma, ši technologija gali būti taikoma augalų atsako modifikacijai skirtingomis streso sąlygomis, leidžiant kurti baltyminius biostimuliacinius ir išaiškinant sudėtingą BH (eksperimentinio ar komercinio preparato) įtaką visam augalo mechanizmui bei jo atsakui į aplinkos sąlygas. Taip pat naujausi tyrimai rodo, kad biostimuliatorių veikimo mechanizmo išaiškinimui ir jo apibūdinimui neapsiribojant eksperimentiniais laboratoriniais tyrimais bei naujų duomenų kaupimu, esamų duomenų apdorojimui turėtų būti taikomos pažangios technologijos, tokios kaip statistiniai / matematiniai įrankiai (mašininis mokymasis (angl. *deep learning*); didžiųjų duomenų analizės (angl. *big data analysis*); dirbtinis intelektas) kuriant algoritmus, kad būtų galima visokeriopai suprasti biostimuliatorių veikimo mechanizmą [8].

Analizuojant baltyminių biostimuliatorių veikimo mechanizmą augalų augimo stimuliavimo aspektu, mokslinėje literatūroje aprašomi ir atskirų aminorūgščių teigiamo poveikio mechanizmai. Nustatyta, kad prolinas, kuris yra viena iš 20 baltyminių aminorūgščių, atlieka svarbų vaidmenį visame augalų augimo ir vystymosi cikle. Jis kaupiasi augaluose tiek esant normalioms augimo sąlygoms, tiek augalams patiriant stresą. Yra žinoma, kad prolinas atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį reguliuojant bendrą baltymų sintezę augaluose [120]. Nustatyta, kad sėklų apvėlimas prolino produktais stimuliuoja augalų augimą – pagerina mineralinių

medžiagų įsisavinimą ir fotosintezę; padidina azoto prieinamumą ląstelių metabolizmui; sumažina neigiamą kadmio poveikį ir padidina augalų fotosistemos aktyvumą bei antioksidacinį potencialą; gali užkirsti kelią stomatiniam CO₂ fiksavimo apribojimui; be to, prolino metabolizmas veikia deguonies pentozės fosfato kelią (angl. *oxygen pentose phosphate pathway*, OPPP), kuris yra labai svarbus sėklų daigumui ir daigų augimui [121]. Aminorūgščių, tokių kaip glicinas, naudojimas taip turi teigiamą poveikį lapinių daržovių ir pasėlių kokybei. Glicinas yra proteinogeninė hidrofilinė ir nepolinė aminorūgštis, kuri dėl savo cheminės struktūros skirtingose terpėse gali dalyvauti rūgštinėse ir šarminėse reakcijose. Taip pat glicinas pasižymi tuo, jog jo pramoninės sintezės procesas yra paprastas ir dėl šios priežasties jis yra patrauklus pramoniniam naudojimui. Glicinas veikia kaip chelatinis agentas ir palengvina maistinių medžiagų įsisavinimą augaluose [122]. Glutaminas taip pat yra gyvybiškai svarbi aminorūgštis augalų fiziologijoje, atliekanti pagrindinius vaidmenis dalyvaujant medžiagų apykaitos procesuose, įskaitant azoto asimiliacijos kelius. Glutaminas, argininas ir asparaginas dalyvauja daugelyje metabolinių ir biocheminių reakcijų, vykstančių augaluose, įskaitant toksinų detoksikaciją, vandenilio jonų neutralizavimą bei atsparumo stresinėms sąlygoms didinimą [122].

1.7. Augalų atsakas į biostimuliatorių poveikį

1.7.1. Augalų fiziologija ir metabolizmas

„Veikimo būdas“ (angl. „*Mode of action*“) reiškia išsamius biocheminius ir fiziologinius augalų pokyčius, vykstančius naudojant biostimuliacinius. Nepaisant didelio susidomėjimo naujų biostimuliatorių kūrimu, rinkoje yra nedaug gerai charakterizuotų produktų, pasižyminčių patikimu veikimu. Paprastai įžvalga apie biostimuliatorių veikimo mechanizmą yra ribota, daugiausia dėl žaliavų įvairovės ir gaunamo produkto sudėtingumo, kuris dažniausiai chemiškai yra nepakankamai apibūdintas. Tačiau, nepaisant cheminių medžiagų mišinio sudėtingumo, bandymai apibūdinti biologiškai aktyvius ingredientus yra labai svarbūs siekiant įgyti parduodamo produkto patikimumą. Be to, reikia atsižvelgti į tolesnius (po panaudojimo) veikimo augaluose etapus: prasiskverbimą į audinius, reakciją su augalų metabolitais ir cheminį stabilumą, prisijungimą prie metabolinių fermentų ir junginio poveikį augalo fiziologijai bei genų ekspresijos moduliavimą, o tam reikalingas sistemingas ir tarpdisciplininis požiūris, pagal kurį reikia derinti įvairias technologijas chemijos, biologijos ir genomikos srityse. Norint iširti biostimuliacinio veikimo mechanizmą, reikia atlikti du iš eilės etapus: nustatyti veikliąją (-ias) sudedamąją (-sias) dalį (-is) ir jos (jų) veikimo augalams būdą. Genominiai metodai įprastai taikomi šiuolaikiniame gyvosios gamtos moksle ir apima didelio našumo technologijas, galinčias išmatuoti globalius mRNR nuorašų (transkripto), proteomų ir metabolomų gausos pokyčius sudėtingose biologinėse sistemose dėl biocheminių stimuliacijų ar perturbacijų. Jie suteikia patikimas ir informatyvias priemones, leidžiančias atskleisti biostimuliatorių veikimo būdą, taigi

ir atlikti veikimo būdo tyrimus, kuriuose labai daug dėmesio skiriama genominių priemonių taikymui [1].

Maini [123] apibendrina ankstyvuosius tyrimus su pirmuoju komerciniu baltymų hidrolizatu iš gyvūnų epitelio audinių „Siapton“, kuris buvo sukurtas 1969 m. Italijoje, skirtas naudoti per lapus ir buvo naudojamas Europoje, Vidurio ir Tolimuosiuose Rytuose, Pietų ir Centrinėje Amerikoje. Paskelbta informacija apie šio preparato teigiamą poveikį daugelio javų augimui ir derliui, tačiau tyrimai buvo pateikti vidinėse ataskaitose arba nerecenzuojamuose žurnaluose, kurių prieinamumas buvo ribotas. Naujausi tyrimai patvirtina, kad baltymų hidrolizatų naudojimas turi reikšmingą poveikį daugeliui pasėlių savybių, susijusių su jų produktyvumu ir kokybe, įskaitant šaknų vystymąsi, fitohormonų pokyčius, fotosintezės greitį, padidėjusį pigmentų, baltymų ir fenolinių junginių kiekį, skatina augalų augimą, antioksidacinį aktyvumą ir makro- bei mikroelementų kiekį augaluose [124].

1.7.2. Augalų apsauga nuo abiotinio ir biotinio streso

Pagrindinis XXI a. iššūkis yra klimato kaita, kuri daro neigiamą įtaką pasėlių derliui: apskaičiuota, kad vidutinei temperatūrai padidėjus 1 °C numatoma, jog kviečių derlius gali sumažėti ~6 % [125, 126]. Norint valdyti klimato kaitos poveikius žemdirbystės sektoriuje, turi būti taikomos naujos strategijos žemės ūkiui, siekiant pagerinti pasėlių reakciją į abiotinį stresą.

Didėja žemės ūkio mokslininkų susidomėjimas biostimuliatorių panaudojimu, siekiant padidinti augalų toleranciją įvairiems abiotiniams stresams. Biostimuliatoriai, sąlygodami fiziologinius procesus augaluose, gali pagerinti pasėlių derlių, kokybę ir padidinti jų toleranciją arba atsigavimą patyrus abiotinį stresą. Visų pirma akcentuojami baltymų pagrindu gaminami biostimuliatoriai, kurie, naudojami kartu taikant gerą agronominę praktiką, turi teigiamą poveikį augalų metabolizmui, pavyzdžiui, N dinamikos padidėjimui, išaugusiam angliavandenių biosintezės bei fotosintezės greičiui ir geresniam augalų šaknų vystymuisi [10, 27]. Yra daug įrodymų, kad baltymų hidrolizatai ir specifinės aminorūgštys gali sąlygoti augalų gynybines reakcijas ir padidinti augalų toleranciją įvairiems abiotiniams stresams, įskaitant druskingumą, sausrą, temperatūrą ir oksidacines sąlygas [31].

Pagal Ertani ir kt. [127], liucernos hidrolizatas, naudojamas kukurūzams, auginamiems hidroponiškai, esant didėjančiam druskos stresui, padidina augalų biomasę, sumažina antioksidantų fermentų aktyvumą ir fenolių sintezę, padidina lapuose prolino ir flavonoidų kiekį, fenilalanino amoniako-liazės aktyvumą ir genų ekspresiją druskos streso kontrolei. Egzogeninių glutamato ir (arba) ornitino, prolino pirmtakų naudojimas taip pat gali padidinti toleranciją druskos stresui [32]. Kitų tyrėjų moksliniai tyrimai rodo, jog augalų lapų purškimas prolino pagerina augalų atsparumą abiotiniam stresui padidinant fermentinius aktyvumus. Be to, prolino atsargos augalams yra naudingos aklimatizuojantis prie temperatūros arba atsigauant po patirto streso. Tačiau svarbu nustatyti tinkamą naudojamo preparato koncentraciją, kadangi apsauginis poveikis stebimas naudojant mažas BH preparatų koncentracijas (pvz., 30 mM prolino), nes didesnės dozės (pvz., 40–50 mM prolino) gali turėti

augalams neigiamą, t. y. toksinį, poveikį [128, 129]. Be prolino, pažymėtinos kitos aminorūgštys, dalyvaujančios augalų metabolizmo procesuose, atsakinguose už atsparumą abiotiniam stresui. Metioninas yra su stresu susijusių baltymų dalis. Metioninas gali reguliuoti augalų redokso būseną ir pagerinti augalų augimą esant stresinėms sąlygoms, didinant suderinamumą su osmolitiniais junginiais. Metionino liekanos baltymuose gali apsaugoti augalų makromolekules prieš oksidantus užkertant kelią kitų baltymų liekanų žalojimui. Taip pat metioninas gali būti lengvai oksiduojamas veikiant įvairių tipų oksiduojančiomis medžiagomis, o oksidacijos produktai gali būti paversti atgal į metioniną, veikiant metionino sulfoksido reduktazei, t. y. fermentu, kuris kontroliuoja metionino redokso būseną ir dalyvauja augalų gynybos nuo streso mechanizmuose [130]. Glutamo rūgštis ir argininas yra svarbūs augalų augimui ir vystymuisi, ypač esant šalčio stresui [131, 132]. Glutamo apsauginis poveikis siejamas su antioksidacinio aktyvumo padidėjimu, padidinant superoksido dismutazės ir katalazės aktyvumus. Taip pat teigiamas poveikis siejamas su osmolitinių junginių kiekio ir prolino biosintezės genų lygio didinimu. Be to, Glu yra pirmtakas antioksidanto peptido glutathiono, taip pat kitų su stresu susijusių aminorūgščių, tokių kaip prolinas, pirmtakas. Cisteinas yra pagrindinis antioksidanto tripeptido glutathiono pirmtakas, kuris atlieka svarbų vaidmenį apsaugant augalus nuo oksidacinio streso ir sunkiųjų metalų detoksifikacijos [130]. Egzogeninis aminorūgščių panaudojimas padeda išvengti baltymų skilimo ir leidžia taupyti energijos išteklius augaluose, net jei tikslus veikimo mechanizmas nėra iki galo išaiškintas [133, Popko].

Be baltymus sudarančių (baltyminių) aminorūgščių, augaluose taip pat randamos kitos nebaltyminės aminorūgštys ar jų dariniai, kurių biosintezę gali turėti įtakos augalų atsakui į stresą. Nebaltyminės aminorūgštys padidina augalų atsparumą stresui per ląstelių osmoreguliaciją, stiprinant antioksidacines sistemas, apsaugant membranų vientisumą ir stabilizuojant fermentų / baltymų sąveiką [130]. Glicino-betaino darinys taip pat pasižymi apsauginėmis funkcijomis; įrodyta, kad lapų ir šaknų veikimas šiuo dariniu padėjo neutralizuoti druskos ir sausros streso poveikį įvairių rūšių augaluose (pupelėse, pupose, miežiuose, pomidoruose, salotose ir kt.). Be to, yra atvejų, kai dėl glicino-betaino panaudojimo gautas geresnės kokybės kukurūzų ir didesnės išeigos kukurūzų sėklų aliejaus derlius [130]. γ -aminosviesto rūgštis (GABA) yra plačiai paplitusi augalų karalystėje ir greitai kaupiasi, kai augalas patiria stresą. Pasireiškiant sausrui, GABA padidina augalų atsparumą stiprindama osmoreguliacijos metabolizmą, skatina energijos ir antrinių metabolitų gamybą. Augalams patiriant druskingumo stresą, GABA pagerina fotosintezės procesą ir chlorofilo fluorescenciją, padidina antioksidacinį augalų aktyvumą ir pagerina prolino kaupimąsi. Taip pat GABA padidina augalų toleranciją druskų-šarmių sukeltam stresui, mažinant NaC/KC santykį ir didinant laisvųjų poliaminų koncentraciją [130]. Garcia-Garcia ir kt. [130] taip pat aprašė ir β -aminosviesto rūgšties (BABA) apsaugines funkcijas augalams patiriant įvairų stresą. Sausros metu BABA sustiprina augalų atsparumą didinant atitinkamų genų transkripciją, taip pat jazmono rūgšties keliu aktyvina antioksidacinę augalų apsaugą. Augalams patiriant stresą dėl per didelio druskingumo, BABA pagerina augalų fotosintezės veiklą, aktyvina

antioksidantų apsaugą, pagerina prolinų kaupimąsi ir sumažina malono dialdehido kiekį augaluose.

Šalčio stresas (žema temperatūra) sumažina augalų metabolizmą ir lėtina fiziologines reakcijas. Sumažėjęs metabolizmas, atsirandantis patyrus šalčio stresą, sukelia fotosistemos aktyvumo slopinimą, vadinamą „fotoslopinimu“. Šaltis sukelia ląstelių membranų pažeidimus ir destabilizuoja fosfolipidų sluoksnius. Teigiamas baltymų hidrolizatų poveikis kalendros augalams, auginamiems šaltose vegetacinėse kamerose, buvo išanalizuotas. Rezultatai, gauti tiriant streso rodiklius, tokius kaip antioksidacinis aktyvumas, fotosintezės pigmento koncentracija ir aktyvumas, vandenilio peroksido ir malono dialdehido kiekis, parodė, kad biostimuliatorių panaudojimas teigiamai paveikė skirtingus medžiagų apykaitos mechanizmus, todėl stresą patiriantys augalai esant žemai temperatūrai pereina į aklimatizacijos fazę. Biostimuliuojantis veikimas prieš šalčio stresą paprastai padidina osmosinių molekulių kaupimąsi, stimuliuodamas biosintezės kelius ir nuo šalčio apsaugančių medžiagų susidarymą. Šie biostimuliatoriai taip pat padidina membranos termotabilumą ir sumažina neigiamą dėl šalčio patiriamą žalojantį poveikį [134, Bulgari].

1.7.3. Biostimuliatorių naudojimo būdai

Biostimuliatoriai gali būti naudojami skirtingais laikotarpiais: prieš streso poveikį auginimui, streso metu ar net po streso. Pagal norimus rezultatus, jie gali būti naudojami ant sėklų, kai augalai yra ankstyvojoje augimo stadijoje, arba kai pasėliai yra visiškai išsivystę. Apskritai, biostimuliatoriai, kuriuose yra antistresinių junginių, tokių kaip prolinas arba glutamo rūgštis, gali būti naudojami streso metu arba susidarius streso sąlygoms. Priešingai, tie komponentai, kurie dalyvauja bioaktyviųjų junginių biosintezės aktyvinime, turi būti naudojami prieš atsirandant stresui. Tinkamas naudojimo laikas pasėlių auginimo metu priklauso nuo augalo rūšies ir nuo svarbiausių pasėlių produktyvumo fazių. Biostimuliatoriai gali būti purškiami ant lapų arba ant šaknų, naudojami sėjos metu, siekiant apsaugoti daigą ankstyvosiose vystymosi stadijose arba žydėjimo ar derėjimo metu [134]. Taigi, tinkamo biostimuliatorių panaudojimo laiko nustatymas yra toks pat svarbus kaip tikslios dozės nustatymas, kad būtų išvengta produkto švaistymo, didelių gamybos sąnaudų ir netikėtų rezultatų. Nėra bendro recepto, kuris būtų tinkamas pasėlių rūšiai ir kiekvienoje stresinėje situacijoje. Vis didesnio dėmesio sulaukia tyrimai, skirti biostimuliatorių apsauginiam poveikiui. Šie produktai gali įvairiais būdais padidinti augalo atsparumą aplinkos stresui, pavyzdžiui, vandens trūkumui, dirvožemio druskėjimui ir temperatūros (neoptimalios) augalų augimo metu poveikiui. Naujausi rezultatai, susiję su augalų atsparumu stresui, buvo gauti išbandžius skirtingus apdorojimo būdus [135, 136]. Kitas įdomus būdas padidinti augalo atsparumą abiotiniam stresui yra augalų sėklų mirkymas su įvairiais sintetiniais ar natūraliais junginiais. Ši strategija paprastai vadinama sėklų gruntavimu, ją nuodugniai apžvelgė Asharaf ir kt. [137].

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas

Augant pasaulio gyventojų skaičiui, didėja maisto ir grūdinių žaliavų paklausa, žemės ūkis suinteresuotas didinti aplinkos tvarumą, mažinti gamybos sąnaudas, gerinti augalų kokybę ir didinti derlių, taip pat augalų atsparumą įvairiems biotiniams bei abiotiniams stresams. Vienas iš sprendimo būdų yra augalinės kilmės šalutinių produktų perdirbimas į biostimuliacinius, tokius kaip baltymų hidrolizatai ir bioproduktai, pasižymintys antimikrobinėmis savybėmis, kurie gali pagerinti grūdų derlingumą, jų atsparumą abiotiniam bei biotiniam stresui ir taip padidinti augalininkystės efektyvumą. Biostimuliaciniai yra medžiaga, mikroorganizmas ar bet koks kitas organinis junginys, kuris ne tik aprūpina augalą maistinėmis medžiagomis, didina jo gyvybingumą ir bendrai jo sveikatingumą, bet ir pagerina sėklos kokybę. Biostimuliacinių preparatuose esančios biologiškai aktyvios medžiagos yra laisvosios aminorūgštys ir skirtingo ilgio peptidai, jūros dumblių ekstraktai, fulvo rūgštys, humusinės rūgštys, azoto junginiai, naudingosios bakterijos ir grybelinės medžiagos.

Literatūrinėje apžvalgoje pagrindinis dėmesys skiriamas baltyminiams biostimuliaciniams, t. y. baltymų hidrolizatams, ir jų gamybai bei baltymų hidrolizatų gamybos efektyvumo didinimui taikant naujus fizikinius būdus, pavyzdžiui, žemojo ir aukštojo dažnio ultragarsinį substrato apdorojimą kartu su kitais bioprocesais – fermentine hidrolize ir mikrobine fermentacija, augalinės kilmės šalutinių produktų / atliekų perdirbimui suteikiant jiems pridėtinę vertę. Ultragaras yra saugus ir netoksiškas apdorojimo būdas. Pagal ultragarso dažnį bei intensyvumą ir sukeltą akustinę kavitacijos efektą, ultragaras gali turėti skirtingą poveikį baltymų struktūriniam pokyčiams ir jų funkcionalumui. Ultragaras gali suardyti ryšius baltymo molekulėje ir aktyvinti arba inhibuoti (sulėtinti) fermentus. Taip pat jis turi teigiamą poveikį fermentacijos procesui: paspartina masių pernašos procesus ir padidina bakterinių ląstelių pralaidumą. Ultragaras šiuo metu pradėtas taikyti bioprocesų efektyvumo didinimui, parinkus tam optimalių parametrų derinį.

Literatūroje pateikiama informacijos apie baltymų hidrolizatų gamybai tinkamų skirtingos kilmės, gyvūninės ir augalinės kilmės, šalutinių produktų / atliekų tinkamumą biostimuliacinių gamybai nustatant jų teigiamą poveikį augalų auginimui. Mažiau tirti augalinės kilmės šalutiniai perdirbimo produktai, gaunami kukurūzų krakmolo ir augalinių gėrimų gamybos metu (pvz., sojų, ryžių, avižų, migdolų, kokosų išspaudos), kuriuose lieka daug vertingų maistinių medžiagų, įskaitant baltymus. Be to, dėmesys skirtas augalinės kilmės bioproduktų, pasižyminčių antimikrobinėmis savybėmis, kūrimui atsižvelgiant į saugos reikalavimus ir taršos grūdinėse biomasėse, pavyzdžiui, *Fusarium* spp., bei mikotoksinų eliminavimui. Fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB), turinčiomis GRAS statusą, iki šiol išlieka svarbi biopriemonė didinant maisto saugą. Daugybėje publikacijų pateikta informacija apie galimą jos taikymą mikotoksinų eliminavimui [71–80]. Derinant proceso parametrus ir mikroorganizmų rūšis bei padermes, galima išgauti skirtingus pokyčius fermentuojamoje žaliavoje. Šis fenomenas daugiausiai siejamas su PRB membranų savybe absorbuoti toksines medžiagas. Kai kurie tyrimų rezultatai rodo galimą mikotoksinų skaidymą fermentais. Remiantis literatūros duomenimis,

PRB fermentacija taikyta grūdinės žaliavos apdorojimui įrodant jos antigrybinį poveikį, taip pat DON kiekio grūdinėje žaliavoje sumažinimui, tačiau jos įtaką DON konjugatams nėra įvertinta. Todėl būtų tikslinga įvertinti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių PRB fermentacijos įtaką DON ir jo konjugato pokyčiams.

Grūdinės biomasės detoksifikacijos strategija susideda iš PRB padermės parinkimo, substrato fermentacijai paruošimo ir fermentacijos proceso tiriant PRB dauginimosi kinetiką bei pagrindinių metabolizmo produktų, pavyzdžiui, pieno rūgšties, susidarymą. Taigi, PRB fermentacija galėtų praplėsti biostimuliatorių poveikio spektrą suteikiant jiems papildomo antigrybinio aktyvumo. Biomasės su padidėjusiu mikotoksinų kiekiu iki šiol dažniausiai vertinamos kaip bevertis šalutinis produktas ir turi būti šalinamos kaip atliekos. Tačiau po nukenksminimo taikant tvarius sprendimus jos gali tapti vertingu žaliavų atkūrimo šaltiniu, naudotinu pridėtinės vertės produktams išgauti.

Sprendžiant biostimuliatorių panaudojimo galimybes žieminių kviečių auginimui, svarbu atlikti augalų auginimo eksperimentą *in vivo* sąlygomis. Pastaruoju metu, įrodant teigiamą baltyminių hidrolizatų poveikį kviečių kultivavimui abiotinio streso sąlygomis, svarbu įvertinti kuriamų biostimuliatorių poveikį auginant kviečius temperatūrinio (šalčio) streso sąlygomis. Taigi, darbas skirtas augalinės kilmės šalutinių produktų perdirbimui į baltymų hidrolizatus ir bioproduktus, pasižyminčius antimikrobinio aktyvumu, tam taikant kompleksines konvertavimo technologijas (ultragarsinį apdorojimą, fermentinę hidrolizę ir mikrobinę fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis). Atsižvelgiant į klimato kaitą, baltyminiai biostimuliatoriai (baltymų hidrolizatai) bus išbandyti žieminių kviečių šalčio atsparumui didinti.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

2.1.1. Medžiagos, mikroorganizmai ir fermentai tyrimų objektams ruošti

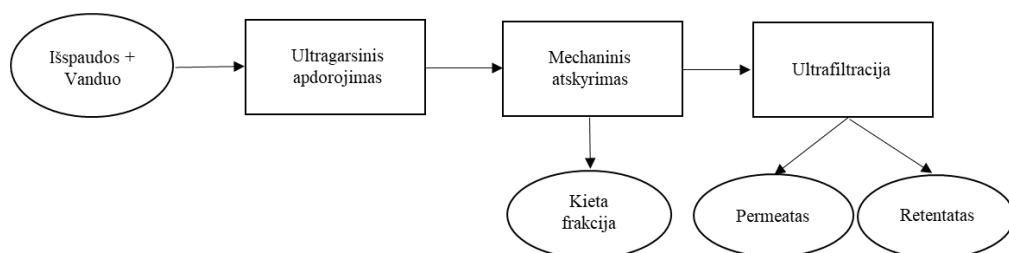
Augalinės kilmės žaliavos ir jų perdirbimo šalutiniai produktai

Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP), gautas iš UAB „Nando“ (Lietuva).

Kukurūzų krakmolo gamyboje plačiai taikomas šlapiasis malimo būdas, o norint pasiekti optimalų šlapio malimo rezultatą, kukurūzų grūdai suminkštinami pradiniam mirkymo procese (40–48 valandas, 45–52 °C temperatūros vandenyje). Siekiant užkirsti kelią mikrobų augimui bei pagerinti medžiagų tirpumo procesą, naudojamas sieros dioksidas (SO₂), kurio pradinė koncentracija yra nuo 0,1 % iki 0,2 % (pH nuo 3,8 iki 4,5), o po 5 ir 10 valandų sumažėja atitinkamai iki 0,05 % ir 0,01 %. Skystyje išbrinkę kukurūzų grūdai atskiriami ir toliau nukreipiami į krakmolo gamybą, o gauta skysta frakcija sukonzentruojama ir gaunamas kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP), kuris toliau naudotas eksperimentiniams tyrimams. Pradinis mėginio pH = 4,2 ± 0,2.

Sojų produktai – maltos sojų pupelės (8 % drėgmės), liofilizuotos sojų išspaudos (11 % drėgmės) ir liofilizuotos ultragarsu (18 kHz) apdorotos sojų išspaudos (11 % drėgmės), gautos iš augalinių gėrimų gamybos įmonės „Berief“ (Vokietija) ir Fraunhofer instituto UMSICHT (Vokietija).

Sojų, kokosų, avižų, migdolų ir ryžių permeatai gauti iš Fraunhofer instituto UMSICHT (Vokietija) taikant ultragarsą, mechaninį atskyrimą bei ultrafiltraciją augalinių gėrimų išspaudų apdorojimui (2.1 pav.). Permeatų iš skirtingų augalinių žaliavų išspaudų gamybos procesų savitumai pateikti 2.1 lentelėje. Permeatai gauti 15 kg išspaudų sumaišius su 37,5 l vandens ir gautą mišinį apdorojus 60 °C temperatūroje. Vėliau mišinys ištisinio tekėjimo reaktoriuje 2 min veiktas ultragarsu (dažnis – 18 kHz, amplitudė – 60 μm). Skysta ir kieta frakcijos mechaniškai atskirtos viena nuo kitos sraigtiniu presu. Jei šis atskyrimo metodas negali būti pritaikytas, tada naudojami audinio sietai. Skystai frakcijai taikyta ultrafiltracija naudojant polietersulfono (PES) membraną, kurios paviršiaus plotas ~0,7 m², o atskiriamų baltymų dalelių dydis – 10 kDa. Filtracijos trukmė – 3 valandos, jei filtruojamas mišinys smarkiai putoja, tai filtracijos laikas ilgėja iki 4 valandų. Po ultrafiltracijos gauti permeatai ir retentatai užšaldyti. Gauta kieta frakcija džiovinta 60–100 °C temperatūroje.



2.1 pav. Augalinių gėrimų gamybos išspaudų permeatų gamybos schema

2.1 lentelė. Permeatų, gautų iš skirtingos augalinės žaliavos išspaudų, gamybos proceso charakteristika

Apdorojimas	Sojos	Migdolai	Kokosai	Avižos	Ryžiai
Mechaninis atskyrimas	Sraigtniu presu	Sraigtniu presu	Sraigtniu presu	Audinio sietais	Sraigtniu presu
Atskirtos skystos frakcijos tūris, l	31,5	33,5	29,5	22,5	26,5
Ultrafiltracijos laikas, val.	3	3	3	4	4
Gauto permeato tūris, l	23,0	19,5	19,5	15,7	15,0
Gauto retentato tūris, l	8,0	10,5	9,0	5,0	9,0
Kietos frakcijos džiovavimo temperatūra, °C	100	60	80	80	80

Fermentai. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto (KKGŠP) ir sojų išspaudų baltymų hidrolizei naudota šarminė proteazė (400 000 AV/g) gauta iš UAB „Baltijos enzimai“ (Vilnius, Lietuva). Papildomai buvo vykdyta KKGŠP fermentinė hidrolizė naudojant įvairias proteazių kombinacijas (žr. 2.6 lentelę). Endo- ir egzo-proteazės (*Novozymes*, Danija) gautos iš UAB „Nando“, jų charakteristikos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Endo- ir egzoproteazių charakteristikos

Fermentas	Tipas	Optimalus pH	Optimali temperatūra, °C
<i>Protana Prime</i>	Egzopeptidazė	6,0–7,0	55–60
<i>Alcalase</i>	Endopeptidazė	7,0–9,0	55–70
<i>Formea Prime</i>	Endopeptidazė	7,0–10,0	50–75
<i>Phytaflow</i>	Fitazė	4,0–6,0	45–65
<i>Novozyme 37071</i>	Endopeptidazė	7,0–9,0	55–70
<i>Flavourzyme</i>	Endo- ir egzopeptidazė	5,5–7,5	50–55
<i>Novozyme 11028</i>	Endopeptidazė	7,5–10,0	55–70
<i>Neutrase</i>	Endopeptidazė	6,5–8,0	40–55
<i>Novocor AGB</i>	Endopeptidazė	3,5–5,5	40–60

Pieno rūgšties bakterijos (PRB). Fermentacijai parinktos pieno rūgšties bakterijos, kurios fermentuoja pentozes ir heksozes, gautos iš LSMU Maisto saugos ir kokybės katedros kolekcijos (*L. paracasei* LUHS 244, *L. casei* LUHS 210, *L. plantarum* LUHS 135, *L. uvarum* LUHS 245, *L. brevis* LUHS 173, *L. farraginis* LUHS 206, *P. acidilactici* LUHS 236). Jos saugomos KTU Maisto

mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje, 25 % glicerolio tirpale, –80 °C temperatūros šaldiklyje (*Angelatoni Platilab 110*, Italija) *Microbank* sistemoje. Prieš eksperimentą PRB atgaivintos skystoje MRS terpėje. PRB paruošimo fermentacijos procesui sąlygos pateiktos 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. PRB ruošimo fermentacijai sąlygos

Pieno rūgšties bakterijos	PRB kodas	Kultivavimo temp., °C	Kultivavimo trukmė, val.	Terpė (skysta)	Koncentracija, log KSV/ml
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LUHS 244	30 ± 2	48	MRS*	8,9 ± 0,5
<i>Lactobacillus casei</i>	LUHS 210	30 ± 2	48	MRS	8,9 ± 0,6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LUHS 135	30 ± 2	48	MRS	9,1 ± 0,4
<i>Lactobacillus uvarum</i>	LUHS 245	30 ± 2	48	MRS	9,2 ± 0,5
<i>Lactobacillus brevis</i>	LUHS 173	30 ± 2	48	MRS	9,4 ± 0,7
<i>Lactobacillus farraginis</i>	LUHS 206	30 ± 2	48	MRS	10,3 ± 0,5
<i>Pediococcus acidilactici</i>	LUHS 236	30 ± 2	48	MRS	10,4 ± 0,6

*De Man Rogosa ir Sharpe terpė (*Biolife*, Italija)

Indikatoriniai *Fusarium spp. grybai.* Antigrybiniam aktyvumui nustatyti naudoti grybai (*F. graminearum* F, *F. graminearum*, *F. culmorum*) gauti iš Lietuvos agrarinių miškų ir mokslų centro (LAMMC) ir iki tyrimų pradžios laikyti KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje, –80 °C temperatūroje (*Microbank* sistemoje). Indikatorinių mikroskopinių grybų (*F. graminearum* F, *F. graminearum*, *F. culmorum*) dauginimas vykdytas aseptinėmis sąlygomis naudojant standžią PDA (*Potato Dextrose Agar*, *Liofilchem s. r. l.*, Italija) terpę Petri lėkštelėse. Mikroskopiniai grybai kultivuoti termostate, esant pastoviai 25 °C temperatūrai, 7 paras, tamsoje.

Fusarium spp. užteršti kviečių grūdai. Buvo gauti 6 žieminių kviečių (*Triticum aestivum*) mėginiai, surinkti 2019 m. šiaurinėje Serbijoje, autonominės Vaivodinos provincijoje. Mėginiai buvo užkoduoti trumpiniais W1–W6, jie buvo natūraliai pažeisti *Fusarium spp.* ir užteršti mikotoksinais (papildomai mėginiai nebuvo užteršti mikotoksinais). Visi mėginiai buvo sudėti į sandarius plastikinius maišelius, transportuoti šaldytuve (4–6 °C temperatūroje) ir iki tyrimų pradžios laikyti šaldiklyje –18 °C temperatūroje.

Sveiki ir Fusarium spp. užteršti žieminių kviečių grūdai. Sveiki ir *Fusarium spp.* užkrėsti žieminiai kviečiai (*Triticum aestivum*) gauti iš UAB „Kauno grūdai“ 2019–2020 metais. Visi mėginiai laikyti sausose ir tamsiose sąlygose (10–12 °C temperatūroje). Prieš apveliant sveikus grūdus bioproduktais, jų paviršius buvo sterilizuotas 2 % natrio hipochlorito (NaOCl) tirpalu (trukmė – 15 min), po to grūdai šešis kartus buvo kruopščiai perplauti autoklavuotu distiliuotu vandeniu. Sterilizuotos

sėklos naudotos daigumo tyrimams. *Fusarium* spp. užkrėsti grūdai nebuvo apdoroti NaOCl.

Paruošti grūdai apvelti skirtingais tirtais bioproduktais (trukmė – 30 min):

- 10 % KKGŠP baltymų hidrolizatais; naudotas suspensijos kiekis – 100 µl/g sėklų;
- sojų išspaudų baltymų hidrolizatais; naudotas suspensijos kiekis – 100 µl/g sėklų;
- permeatų (nefermentuotų ir fermentuotų) mėginiais; naudotas suspensijos kiekis – 300 µl/g sėklų;
- kontroliniai mėginiai veikti distiliuotu vandeniu ar mėginiais be bioapdoravimo.

Žieminių kviečių, naudotų šalčio eksperimentui, charakteristika.

Eksperimentui naudoti trys žieminių kviečių (*Triticum aestivum*) genotipai, kurie skiriasi atsparumu šalčiui („Gaja“, „Capone“ – mažiau atsparios, o „Galerista“ – atsparesnė šalčiui), gauti iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC) Genetikos ir fiziologijos laboratorijos.

2.1.2. Ultragarsu apdorotų mėginių paruošimo sąlygos

Šalutinių produktų (KKGŠP ir SI) apdorojimui naudotas skirtingo dažnio ultragarsas:

- žemojo dažnio (18 kHz) 4,5 kW galios ultragarsas, kurio amplitudė 60 µm (Fraunhofer institutas UMSICHT, Vokietija);
- žemojo dažnio (37 kHz) skirtingo intensyvumo (1,7; 3,0; 4,3; 5,1 W/cm²) ultragarsinė vonelė PROCLEAN 3.0 DSP (Ulsonix, Vokietija), kurios parametrai: 37 kHz, 160 W;
- aukštojo dažnio (850 kHz) skirtingo intensyvumo (0,9; 1,3; 2,0 W/cm²) ultragarsinis prietaisas, kurį sudaro ultragarsinė vonelė (5/1575), sujungta su 120 W-HF generatoriumi (Meinhardt Ultraschalltechnik, Vokietija);

Mėginiai, sudėti į sandarius plastikinius maišelius (6 cm × 8 cm) ir veikti ultragarsu, kurio sąlygos pateiktos 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Šalutinių produktų (KKGŠP ir SI) apdoravimo ultragarsu sąlygos

Šalutinis produktas	Mėginio paruošimas	Taikytas ultragarsinis apdorojimas	Ultragarsinio apdoravimo sąlygos
Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas	20 g KKGŠP mėginio; *pradinis mėginio pH 4,2 ± 0,2 sureguliuotas iki pH 7,0 ir 9,0, naudojant 6 M NaOH	37 kHz ir 850 kHz visais intensyvumais	50 °C temp., 30 min
Sojų išspaudos	8 % vandeninės suspensijos; *pradinis mėginio pH 6,2 ± 0,2 sureguliuotas iki pH 7,0, 9,0 ir 11,0, naudojant 1 M NaOH	18 kHz 37 kHz ir 850 kHz visais intensyvumais	50 °C temp., 2 min 50 °C temp., 30 min

Ultragarsinio apdorojimo efektyvumas tirtas pagal tirpiųjų baltymų kiekio pokyčius, kurie nustatyti taikant Bradfordo metodą (žr. 2.3.1 skyrelį).

2.1.3. Baltymų hidrolizatų iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų paruošimas

Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentinei hidrolizei (2.5 lentelė) buvo pasirinkta koncentruota skysta šarminė proteazė, kurios aktyvumas 400 000 AV/g (UAB „Baltijos enzimai“, Vilnius). Hidrolizės eksperimentas vykdytas esant skirtingoms substrato koncentracijoms, skirtingoms fermentinio preparato koncentracijoms ir skirtingiems terpės pH, 120 min, 70 °C temperatūros vandens vonelėje (su purtykle). Fermentinės hidrolizės sąlygos kiekvienos žaliavos atveju pateiktos 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentinės hidrolizės sąlygos

Žaliava	Fermentas	Substrato koncentracijos	Fermento koncentracijos	pH
Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas	Šarminė proteazė	21–210 g substrato/l	1,05–10,5 g/l	7; 9
Sojų išspaudos	Šarminė proteazė	8 % vandeninė suspensija	10–160 µl/100 g	7; 9; 11

Hidrolizės metu mėginio pH reguliuotas su NaOH tirpalu (6 M KKGŠP ir 0,1–1,0 M sojos išspaudoms), periodiškai kas 20 min buvo matuojamas hidrolizės laipsnis (žr. 2.3.2 skyrelį). Hidrolizės pabaigoje fermentai inaktyvuoti (90 °C temp., 15 min). Įvertinus hidrolizės proceso efektyvumą, parinktos optimalios fermentinės hidrolizės sąlygos, atrinkti mėginiai laisvųjų aminorūgščių analizei ir kviečių sėklų apvėlimui.

Fermentinė KKGŠP hidrolizė veikiant endoproteazėmis kartu su egzopeptidazėmis vykdyta pagal 2.6 lentelėje pateiktus duomenis. KKGŠP hidrolizei naudotos įvairios proteazės ir jų mišiniai (*Novozyme*, *Novocor*, *Protana Prime*, *Alcalase*, *Flavourzyme*, *Formea Prime* ir *Phyta Flow*), gauti iš UAB „Nando“, jų pagrindinės savybės pateiktos 2.1.1 skyrelyje, 2.2 lentelėje.

2.6 lentelė. Fermentinė KKGŠP hidrolizė veikiant endoproteazėmis kartu su egzopeptidazėmis

Mėginiai	Naudoti fermentai	pH	Temperatūra ir trukmė	
I	1,6 % <i>Novocor</i> /g baltymų ir 2,0 % <i>Protana Prime</i> /g baltymų	6,04 (pH reguliuota su NaOH)	50 °C, 6 val.	
II		4,06		
III	Pirmas etapas: 0,5 % <i>Alcalase</i> /g baltymų	4,00	Pirmas etapas: 75 °C, 3 val.	
IV	Antras etapas: <i>Novocor</i> , <i>Protana Prime</i> , <i>Formea Prime</i> ir <i>Phytasflow</i> . Visų fermentų dėta po 0,5 %/g baltymų	7,0 (pH reguliuota su NaOH)	Antras etapas: 55 °C, 3 val.	
V	0,5 % fermento/ml KKGŠP. <i>Novozyme 37071</i> , <i>Formea Prime</i> ir <i>Flavourzyme</i>	7,0 (pH reguliuota su KOH)	60 °C, 6 val.	
VI	1,0 % fermento/ml KKGŠP. <i>Novozyme 37071</i> , <i>Formea Prime</i> ir <i>Flavourzyme</i>			
VII	Pirmas etapas: 1,0 % <i>Novozyme</i> /ml KKGŠP	8,5 (pH reguliuota su NaOH)	Pirmas etapas: 70 °C, 2 val. Antras etapas: 60 °C, 2 val. Trečias etapas: 50 °C, 2 val.	
	Antras etapas: 1,0 % <i>Neutrase</i> /ml KKGŠP ir 1,0 % <i>Formea Prime</i> /ml KKGŠP			
VIII	Trečias etapas: 1,0 % <i>Novocor AGB</i> /ml KKGŠP ir 1,0 % <i>Flavourzyme</i> /ml KKGŠP	Pirmas etapas: 8,5 (pH reguliuota su NaOH) Antras etapas: pH sumažintas iki pH 7,5 (37 % HCl) Trečias etapas: pH sumažintas iki 5,8 (naudojant H ₃ PO ₄)		
	Pirmas etapas: 1,0 % <i>Novozyme</i> /mL KKGŠP			
	Antras etapas: 1,0 % <i>Neutrase</i> /mL KKGŠP ir 1,0 % <i>Formea Prime</i> /mL KKGŠP			
	Trečias etapas: 1,0 % <i>Novocor AGB</i> /mL KKGŠP ir 1,0 % <i>Flavourzyme</i> /mL KKGŠP			

2.1.4. PRB fermentuotų mėginių paruošimo sąlygos

Sojų produktų (sojų pupelių ir sojų išspaudų) fermentacijai buvo parinkta antimikrobinėmis savybėmis pasižyminti pieno rūgšties bakterijų padermė *L. paracasei* LUHS 244 [138]. Sojų produktai buvo fermentuoti taikant skystafazę fermentaciją, kai mėginiai buvo sumaišyti su vandeniu iki 65 % drėgmės, tada įdėta paruoštos bakterijos (2.3 lentelė) suspensija (3 % nuo bendros mėginio masės). Fermentacija vykdyta nemodifikuotos atmosferos sąlygomis 30 val. termostate (TC160, *SalvisLab Thermocenter*, Iliojaus valstija, JAV) palaikant 30 °C temperatūrą. Skirtingose fermentacijos stadijose (0; 6; 18; 24; 30 val.) rinkti mėginiai fermentacijos proceso vertinimui (pH, bendro titruojamojo rūgštingumo, optinio tankio ir pieno rūgšties D(–) ir L(+) izomerų įvertinimui).

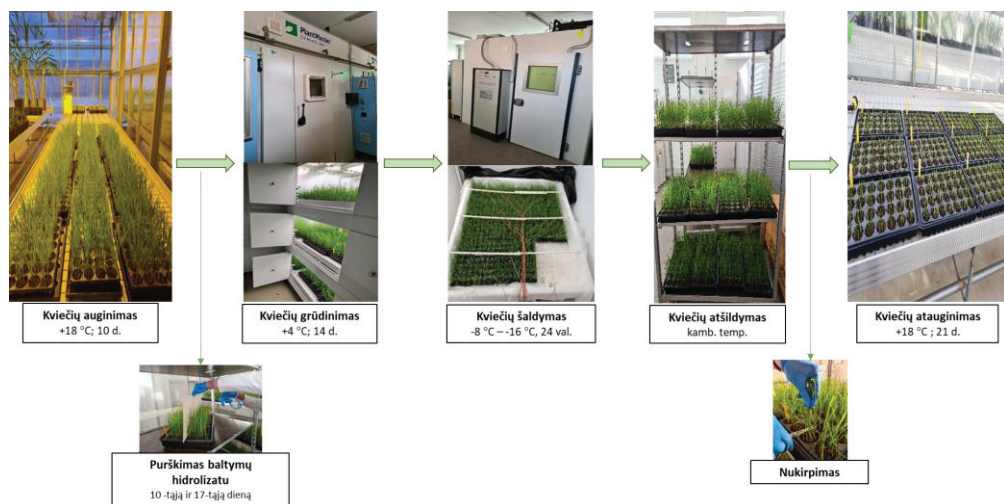
Permeatų fermentacijai naudotos trys PRB padermės: *L. brevis*, *L. farraginis*, *P. acidilactici* (2.3 lentelė). Augalinių išspaudų permeatai (200 ml) sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje, trukmė – 15 min. Atvėsinus iki 30 °C temperatūros, permeatų mėginiai sumaišyti su 5 ml padaugintų bakterijų suspensijomis.

Fermentacija vykdyta nemodifikuotos atmosferos sąlygomis 48 val., laikant mėginius 30 °C temperatūros termostate (TC160, *SalvisLab Thermocenter*, Iliojaus valstija, JAV). Mėginiai rinkti skirtingose fermentacijos stadijose (0; 24 ir 48 val.), nustatant jų pH, BTR ir bendrą PRB kiekį.

Mikotoksinais užkrėstų kviečių grūdų fermentacijai mėginiai (W1–W6) buvo sumalti laboratoriniu malūnu (*Bühler-Miag*, Brunsvikas, Vokietija). Kiekvienas mėginys (50 g) buvo sumaišytas su distiliuotu vandeniu iki 65 % drėgmės, tada 3 % (nuo bendros mėginio masės) PRB ląstelių buvo pasėta į šviežią terpę. Kviečių mėginių fermentacijai naudotos skirtingos PRB padermės: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ir *L. uvarum* (2.3 lentelė). Kviečių mėginiai fermentuoti nemodifikuotos atmosferos sąlygomis 24 valandas 30 °C temperatūroje termostate (TC160, *SalvisLab Thermocenter*, Iliojaus valstija, JAV). Fermentacijos proceso įvertinimui (pH, BTR, PRB kiekis, mikotoksinų kiekiai) mėginiai tirti prieš ir po fermentacijos.

2.1.5. Žieminių kviečių paruošimo šaldymo eksperimentui sąlygos

Eksperimentas atliktas laboratorinėmis sąlygomis Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre (LAMMC) genetikos ir fiziologijos laboratorijoje 2021/2022 mokslo metų rudens semestro laikotarpiu. Šaldymo eksperimento sąlygos parinktos remiantis literatūroje pateiktais duomenimis [139, 140], eksperimento schema pavaizduota 2.2 paveiksle.



2.2 pav. Kviečių auginimo ir šaldymo eksperimento schema

Augalų paruošimas. Kiekvieno genotipo sėklos atsitiktiniu būdu pasėtos į durpių substratą (po 10 vnt. į vieną kasetės šulinėlį, vienoje kasetėje 28 šulinėliai). Kiekvienam apdorojimui skirtos 3 kasetės (3 pakartojimai). Pasėti kviečiai 10 parų auginti šiltnamyje reguliuojamomis sąlygomis (16–18 °C temperatūra, fotoperiodas – 12 val.).

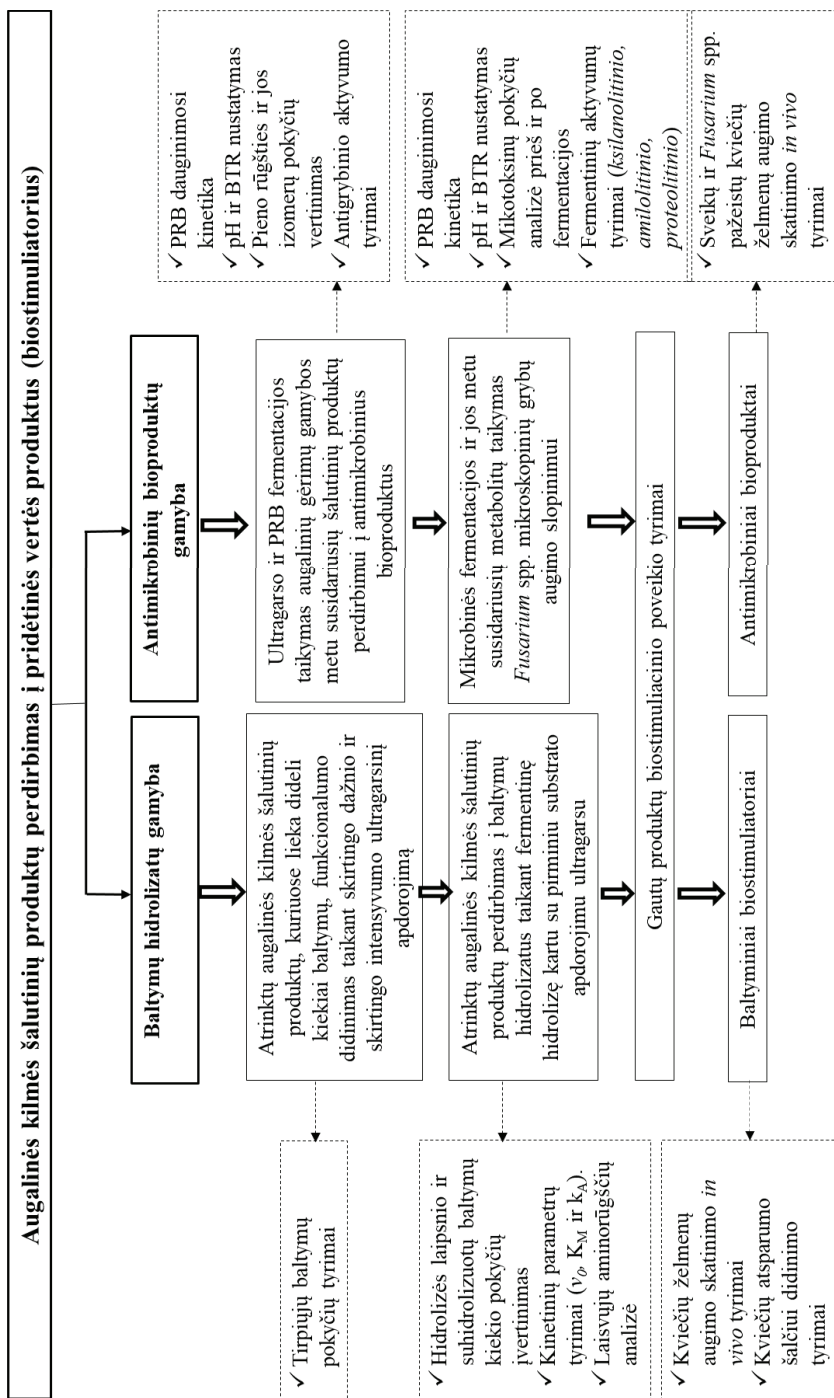
Kviečių grūdinimas. Kviečių daigai (želmenys), pasiekę dviejų lapelių stadiją, perkelti grūdinimui į klimato kamerą (*CLF Plant Climatics*, Vokietija), kurioje laikyti 2 savaites reguliuojamose sąlygose – +4 °C temperatūroje, fotoperiodas 12 val., esant šviesos intensyvumui 200 μmol m²/s. Grūdinimo metu dalis augalų veikti KKGŠP bioproduktais per lapus pagal toliau pateiktą metodiką. Analizei želmenų mėginiai rinkti skirtingose grūdinimo stadijose: grūdinimo pradžioje (11-ąją dieną); grūdinimo viduryje (18-ąją augimo dieną) ir grūdinimo pabaigoje (24-ąją dieną).

Augalų šaldymo procesas. Grūdinti želmenys patalpinti į programuojamą šaldymo kamerą (*Angelantoni Industrie*, Italija), kurioje temperatūra laipsniškai mažinama nuo +4 °C iki –6 °C (1,2 °C per valandą greičiu). Pasiekus nustatytą temperatūrą laikoma, kol durpių substratas peršals, tada temperatūra sumažinama iki –14 °C ir laikoma 24 val., vėliau temperatūra laipsniškai pakeliama iki +2 °C ir mėginiai šioje temperatūroje išlaikomi papildomai 24 valandas. Baigus šaldymą, augalai pernešami atšildymui į kambario temperatūrą (trukmė ~2 val.). Tada augalų lapai nukerpami (ties krūmijimosi mazgu) ir augalai perkeliama į šiltnamį, ten palaikoma 18 °C temperatūra. Po 3 savaičių vertinamas išlikusių augalų kiekis procentais („Gaja“ ir „Capone“ genotipų).

KKGŠP baltymų hidrolizatų naudojimas šalčio eksperimentui. Siekiant padidinti žieminių kviečių atsparumą šalčio stresui buvo naudotas KKGŠP hidrolizatas (2.1.3 skyrelyje, 2.6 lentelėje, mėginys nr. VI), kuriame yra 10,16 g/100 ml laisvųjų aminorūgščių, kontrolei naudotas KKGŠP be apdoravimo. Produktai tirti taikant skirtingus panaudojimo būdus.

- **Sėklų apvėlimui:** prieš šaldymą kviečių sėklos sudėtos į plastikinius maišelius ir veiktos 10 % KKGŠP ir BH mėginių suspensijomis norma 100 μl/g sėklų. Sėklos mirkytos 30 min., po to išdžiovintos kambario temperatūroje ir sėtos į durpių substratą, kaip aprašyta augalų paruošimo metodikoje. Kontrolinio mėginio sėklos apveltos distiliuotu vandeniu.
- **Lapų purškimui prieš šalčio stresą:** kviečių daigai buvo purškiami 2 % vandeniniais KKGŠP ir BH tirpalais naudojant rankinį purkštuvą, taikant 12 ml tirpalo 14 šulinėlių. Augalai preparatais buvo nupurkšti du kartus, t. y. prieš grūdinimo pradžią (10-ąją augimo dieną) ir grūdinimo viduryje (17-ąją augimo dieną). Kontroliniai mėginiai buvo apdoroti distiliuotu vandeniu.
- **Lapų purškimas po šalčio streso:** ši grupė kviečių augalų grūdinimo metu nebuvo veikti KKGŠP ir BH tirpalais. Jie po šaldymo buvo perkelti į kambario temperatūros patalpą, kurioje pasiekę 16–18 °C temperatūrą buvo apdoroti paruoštais 2 % vandeniniais KKGŠP ir BH tirpalais, naudojant 24 ml tirpalo 14 šulinėlių. Kontroliniai mėginiai buvo veikiami distiliuotu vandeniu.

Projekto tyrimų schema pateikta 2.3 paveiksle.



2.3 pav. Tyrimų schema

2.2. Reagentai

Kjeldalio tabletės (*Thompson & Capper Ltd.*, Jungtinė Karalystė), jaučio serumo albuminas (≥ 96 %, *Sigma-Aldrich*, JAV), Kumasi briliantinis mėlynasis G250 (*VWR International Ltd.*, Anglija), L/D-pieno rūgšties nustatymo testas K-DLATE 07/14 (*Megazyme*, Airija), skaidulinių medžiagų nustatymo testas K-TDFR-100A (*Megazyme*, Airija), akrilamidas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), N,N'-metilenbisakrilamidas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), TRIS ($\geq 99,9$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), natrio dodecilsulfatas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), glicinas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), amonio peroksidisulfatas ($\geq 98,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), TEMED ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), 5-sulfosalicilo rūgšties dihidridas ($\geq 98,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), kazeinas (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), 2-merkaptioetanolis ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), bromfenolio mėlynasis ($\geq 90,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Austrija), DTT (ditiotreitolis) ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), natrio kalio tartas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), kalio dihidrofosfatas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), dikalio hidrofosfatas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), acetonitrilas (HPLC, *Penta*, Čekija), metanolis (HPLC, *Macron*, ES), 3-merkaptio propiono rūgštis ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), orto-ftaldehidas ($\geq 99,0$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), 9-fluorenil-metilchloroformatas ($\geq 99,0$ %) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) gauti iš UAB „Labochema LT“ (Vilnius, Lietuva).

NaCl ($\geq 99,5$ %, *Reachem s. r. o.*, Slovakija), NaOH ($\geq 99,9$ %, *Reachem s. r. o.*, Slovakija), CaCl₂ ($\geq 97,0$ %, *Reachem s. r. o.*, Slovakija), (D-gliukozė ($\geq 99,5$ %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), fosforo rūgštis (85,0 %), druskos rūgštis (37,0 %), sieros rūgštis ($\geq 98,0$ %), acto rūgštis ledinė, izopropilo spiritas ($\geq 99,9$ %, *Reachem s. r. o.*, Slovakija) gauti iš UAB „Eurochemicals“ (Vilnius, Lietuva).

MRS BROTH WITH TWEEN 80 (*Biolife*, Italija), MRS AGAR (*Biolife*, Italija), DRBC AGAR (*Liofilchem s. r. l.*, Italija), PDA terpė (*Liofilchem s. r. l.*, Italija), „Plate Count“ agaras (*Liofilchem s. r. l.*, Italija) ir peptonas (*Liofilchem s. r. l.*, Italija) gauti iš UAB „Biometrija“ (Vilnius, Lietuva). 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (98,0 %, *Sigma-Aldrich*, Vokietija), Folin-Ciocalteu's reagentas (2N, *Sigma-Aldrich*, Vokietija) gauti iš UAB „Bioeksma“ (Vilnius, Lietuva).

Etanolis (96,6 %) gautas iš AB „MV Group Production“ (Kaunas, Lietuva). Skystas azotas gautas iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (Babtai, Lietuva). Borato buferio tabletės (pH = 9,2) (*Fluka Analytical*, Vokietija).

2.3. Tyrimų metodai

Šiame skyriuje pristatomi metodikų aprašai buvo publikuoti disertacijos tema paskelbtuose straipsniuose: leidyklos „Elsevier“^{1,2,3} žurnaluose (poskyriai: 2.3.1; 2.3.4; 2.3.5; 2.3.6; 2.3.9) ir leidyklos MDPI⁴ žurnale (poskyriai: 2.3.2; 2.3.3; 2.3.7).

2.3.1. Žaliavų cheminės sudėties nustatymo metodai

Drėgmės kiekis mėginiuose nustatytas mėginius kaitinant 105 ± 2 °C temperatūroje iki pastovios masės pagal AACC metodą 44-15.02 [141].

Bendras baltymų kiekis (angl. *crude protein*) nustatytas Kjeldalio metodu pagal standartinį AACC metodą 46-12.01 [142], įvertinant bendrą azoto kiekį (baltyminio bei nebaltyminio azoto suma) ir taikant perskaičiavimo koeficientą 6,25 kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniam produktui, 5,7 – sojų išspaudoms. Atsižvelgiant į tai, kad nebaltyminio azoto maisto produktuose randama labai mažai, 3–9 % nuo bendro azoto kiekio [143], papildomi tyrimai įvertinant nebaltyminio azoto kiekį žaliavoje nebuvo atlikti.

Tirpiųjų baltymų kiekis nustatytas Bradfordo metodu [144]. Bradfordo reagentas buvo paruoštas ištirpinant 50 mg Kumasi brilliantinio mėlynojo G250 25 ml 95 % etilo alkoholyje ir sumaišant su 50 ml 85 % fosforo rūgštimi. Gautas tirpalas praskiestas su distiliuotu vandeniu iki 0,5 l ir filtruotas per popierinį filtrą. Kalibracinei kreivei sudaryti ruošiamas 2 mg/ml jaučio serumo albumino (JSA) tirpalas distiliuotame vandenyje ir ruošti skiedimai 0–1,5 mg/ml ribose, naudojant standartinio JSA tirpalo skirtingus kiekius (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5 mg/ml). Į paruoštus standartinius tirpalus ir 100 µl tiriamųjų mėginių įpilama 3 ml Bradfordo reagento, reakcijos mišinys išmaišomas purtykle ir inkubuojamas nuo 5 min iki 45 min. Šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru („Genesys 10UV“, *Thermo Fisher Scientific*, JAV) esant 595 nm bangos ilgiui. Tirpiųjų baltymų koncentracija apskaičiuota pagal kalibracinės kreivės tiesės lygtį (KKGŠP analizei

¹ Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Hajnal, E. J., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaitė, D., Cernauskas, D., Lele, V., Zadeike, D., Bartkiene, E. Challenges of Lactobacillus fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat - based products. *Food Control*. 2022, 134(108699). ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108699>

² Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass *in vivo*. *Food Bioscience*. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

³ Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsienė, K., Navickaitė, B., Zadeike, D., Bendoraitienė, J., Bartkiene, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with Lactobacillus paracasei LUHS244 for wheat bread production. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

⁴ Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaitė, D., Zadeike, D., Bendoraitienė, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaitė-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings *In Vivo*. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>

$y = 0,8415x + 0,005$, $R^2 = 0,9925$; per meatų analizei $y = 0,8952x$, $R^2 = 0,9767$) ir rezultatai išreikšti mg JSA ekvivalento 1 ml ruošto tirpalo.

Baltymų ekstrakcijai 2 g mėginio ištirpinta distiliuotame vandenyje (10 ml). Baltymai ekstrahuoti 30 min ant magnetinės maišyklės. Po baltymų ekstrakcijos vykdytas centrifugavimas 5000 aps./min, 20 min, 12 °C temperatūroje. Surinkti supernatantai toliau naudoti tirpiųjų baltymų analizei.

Krakmolo kiekis nustatytas taikant standartinį poliarimetrinį metodą ISO10520:2019 [145].

Skaidulinės medžiagos (tirpiosios, netirpiosios ir bendras skaidulinių medžiagų kiekis) nustatytos taikant fermentinį *Megazyme* analizės testą K-TDFR-100A (*Megazyme International*, Airija), kuris paremtas AOAC oficialiu metodu 991.43 „Bendros, tirpiosios ir netirpiosios skaidulinės medžiagos maisto produktuose“ [146] ir AACC metodu 32-07.01 „Tirpiosios, netirpiosios ir bendros skaidulinės medžiagos maisto produktuose“ [147].

Redukuojančiųjų sacharidų koncentracija nustatyta naudojant DNS reagentą [148]. Kalibracinei kreivei nubrėžti reikalingi mėginiai ruošti naudojant darbinį 1 mg/ml gliukozės tirpalą atliekant reikalingus skiedimus (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ir 1,0 mg/ml), šviesos sugertis matuota esant 540 nm bangos ilgiui. Redukuojančiųjų sacharidų koncentracija nustatyta iš kalibracinės kreivės tiesės lygties ($y = 0,8358x$, $R^2 = 0,9988$).

Riebalų kiekis nustatytas ekstrakcijos heksanu metodu, Soksleto aparatu pagal AACC metodą 30-25.01 [149].

Pelenų kiekis nustatytas išdeginant mėginį 600 °C temperatūroje pagal standartinį AACC metodą 08-01.01 [150].

2.3.2. Fermentinės hidrolizės proceso efektyvumo įvertinimas

Fermentinės hidrolizės proceso kinetiniai parametrai vertinti nustatant hidrolizės laipsnį (HL), suhidrolizuotų baltymų kiekį (C_t), hidrolizės greitį (v_0), Michaelis-Menten konstantą (K_M) ir ryšių nutraukimo konstantą (k_A).

Hidrolizės laipsnis (HL) nustatytas taikant pH-stat metodą [85] ir apskaičiuotas pagal (1) formulę:

$$HL (\%) = \frac{h}{h_{tot}} = \frac{N_b \times B \times 100}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \quad (1);$$

čia: h – suardytų (hidrolizuotų) peptidinių ryšių skaičius; N_b – NaOH koncentracija (mol/l); B – sunaudotas NaOH tūris (ml); α – vidutinis NH_2 grupių disociacijos laipsnis; M_p – hidrolizuojamų baltymų kiekis (g); h_{tot} – bendras peptidinių ryšių skaičius baltymų substrate (kuris kukurūzų baltymams yra 9,2 mmol/g; sojos baltymams – 8,0 mmol/g).

Papildomai apskaičiuotas suhidrolizuotų baltymų kiekis (C_t) pagal (2) formulę ir hidrolizės greitis, taip pat išreikštos K_M ir k_A konstantos pagal (3) formulę.

$$C_t (g/L) = C_0 \times HL \times 0,01 \quad (2);$$

čia: C_0 – pradinis baltymų kiekis (g/l); C_t – suhidrolizuotų baltymų kiekis (g/l); HL – hidrolizės laipsnis (%).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{k_A E_0} \times \frac{1}{C_0} + \frac{1}{k_A E_0} \quad (3);$$

čia: v_0 – pradinis reakcijos greitis (g/(l·min)); K_M – Michaelis-Menten konstanta (g/l); k_A – ryšių nutraukimo konstanta (1/min); E_0 – fermento koncentracija (g/l); C_0 – substrato koncentracija (g/l).

Toliau brėžiamas fermentinės reakcijos greičio priklausomybės nuo substrato koncentracijos atvirkštinėse koordinatėse ($1/v_0$ nuo $1/S$) grafikas ir gaunama tiesinė lygtis „ $y = mx + b$ “, tiesės polinkis m (angl. *slope*) atitinka $K_M/(k_A E_0)$, o susikirtimo su ordinačių ašimi taškas b (angl. *intercept*) atitinka $1/(k_A E_0)$.

2.3.3. Laisvųjų aminorūgščių analizė taikant efektyviąją skysčių chromatografiją

Mėginio paruošimas. Analizei naudoti liofilizuoti baltymų hidrolizatai (kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų). Laisvųjų aminorūgščių ekstrakcija vykdyta naudojant 0,1 M HCl (pH 2,2) tirpalą: liofilizuoto mėginio ir tirpiklio santykis 1:7,5. Ekstrakcija vykdyta 60 min ant magnetinės maišyklės. Po ekstrakcijos, baltymai nusodinti 5 ml 6 % sulfosalicilo rūgštimi. Gautas tirpalas centrifuguojamas visoms nuosėdoms pašalinti (6000 aps./min, 12 °C temperatūra, 14 min). Prieš chromatografinę analizę visi mėginiai filtruojami per 0,45 µm filtrus (*Merck Millipore*, JAV). Gautas tirpalas naudotas laisvųjų aminorūgščių nustatymui efektyvios skysčių chromatografijos būdu.

Chromatografinė analizė. Laisvųjų aminorūgščių atskyrimas atliktas taikant efektyviąją skysčių chromatografiją (ESCh) (*Shimadzu*, Japonija) su automatizuota mėginio derivatizacija ir matuojant fluorescencijos emisiją, naudojant fluorescencijos detektorius RF-10AXs, esant 450 nm (prolino atveju – 305 nm). Pirmiausia mėginys automatiškai derivatizuojamas: 7,5 µl mėginio sumaišoma su 45,0 µl merkaptopropiono rūgštimi ir 22,0 µl derivatizacijos reagentu OPA (orto-ftalaldehido tirpalas*), mišinys maišomas, laikomas 1 min, toliau įterpiama 10 µl reagento FMCO (9-fluorenil-metilchloroformato tirpalas*), maišoma, laikoma 2 min ir injektuojama. Derivatizuoto mėginio chromatografinis atskyrimas atliktas atvirkščių fazių analitinėje kolonėlėje YMC-Triart C18 (1,9 µm, *YMC Co. Ltd.*), nejudri fazė, kurios dalelės 3 µm, kolonėlės ilgis – 150 mm, vidinis skersmuo – 3,0 mm. Naudota to paties gamintojo prieškolonė C18.

* Reagentų paruošimas:

merkaptopropiono rūgšties-borato buferio tirpalas – 10 µl 3-merkaptopropiono rūgšties sumaišoma su 10 ml 0,1 mol/l borato buferiu;

borato buferis (0,1 mol/l) – 1 borato buferio tabletė ištirpinama 100 mL distiliuoto vandens;

OPA tirpalas – užpilama 0,3 ml etanolio ant 10 mg orto-ftaldehido ir visiškai ištirpinama. Pridedama 0,7 ml borato buferio ir 4 ml distiliuoto vandens.

FMOC tirpalas – ištirpinama 4 mg 9-fluorenil-metil-chloroformato 20 mL acetonitrilo;

mobilioji fazė A – 2,04 g kalio dihidrofosfato ir 0,87 g dikalto hidrofosfato ištirpinama 1000 ml distiliuoto vandens;

mobilioji fazė B – sumaišoma 225 ml acetonitrilo, 200 ml metanolio ir 75 ml distiliuoto vandens.

Analizės darbo sąlygos: mobiliosios fazės tekėjimo srautas – 0,5 ml/min, injekcijos tūris – 1 µl; kolonėlės temperatūra – 35 °C; detektoriaus matavimo bangos ilgis 450 nm ir 305 nm; eliuacija – gradientinis, mobili fazė A (kalio fosfatinis buferis* pH 6,5) ir B (acetonitrilo-metanolio tirpalas*) (1,46 min – 11; 10,46 min – 13; 16,46 min – 31; 23,96 min – 37; 31,46 min – 70; 31,49 min – 100; 40,46 min – 100; 40,49 min – 11 pagal tūrį).

Analizei naudoti standartiniai aminorūgščių (alanino, asparto rūgšties, arginino, cisteino, glicino, valino, leucino, izoleucino, treonino, serino, prolino, metionino, glutamo rūgšties, fenilalanino, lizino, histidino, tirozino, triptofano) tirpalai (A9781, *Sigma-Aldrich*, Vokietija). Naudotas penkių lygių kalibravimo rinkinys, apimantis koncentracijos diapazoną 0,006–0,20 µmol/l, išskyrus alaniną ir cisteiną, kurių koncentracijos diapazonas apima 0,06–1,00 µmol/L. Visi nustatymai buvo atlikti su trimis pakartojimais. Gauti rezultatai perskaiciuoti į išraišką g/100 ml ar mg/100 g produkto.

2.3.4. Mikrobiologinės analizės

Bendras mikroorganizmų skaičius (BMS) permeatuose, gautuose iš augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių išspaudų (žr. aprašymą 2.1.1 skyrelyje) nustatytas pagal LST EN ISO 4833-1:2013 standarto kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodą [151].

PRB fermentacijos proceso įvertinimas

Pieno rūgšties bakterijų kiekis fermentuotuose mėginiuose nustatytas atliekant dešimtkarčius skiedimus ir jų sėjimus į standžią terpę [152]. 10 g fermentuoto mėginio sumaišoma su 90 ml sterilaus fiziologinio tirpalo (0,9 % NaCl) ir homogenizuojama. Toliau atliekami mėginio skiedimai (iki 10⁹): 1 ml mėginio maišoma su 9 mL sterilaus fiziologinio tirpalo. Į Petri lėkštes su sterilia de Man, Rogosa ir Sharpe (MRS) agaro terpe pilama po 1 ml pasirinkto skiedinio (10⁴–10⁸). Lėkštelės inkubuojamos 72 ± 3 val. termostate (TC160, *SalvisLab Thermocenter*, Iliojaus valstija, JAV) nemodifikuotos atmosferos sąlygomis optimalioje PRB kultivavimo temperatūroje (2.3 lentelė). Analogiškai atliktas mielių ir mikroskopinių grybų kiekio (MMGK) nustatymas naudojant DRBC agaro terpę lėkštes laikant 25 ± 2 °C temperatūroje 5 paras. PRB ir MPK kiekis išreiškiamas KSV/g mėginio pagal (4) formulę:

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot [n_1 + (0,1 \cdot n_2)] \cdot d} \quad (4);$$

čia: $\sum c$ – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra 15–300 kolonijų; V – užsėtos medžiagos ar skiedinio tūris lėkštelėje (ml); n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas ($d = 1$, kai tiriamasis skystas produktas (tiriamasis mėginys) yra neskiestas).

Papildomai **PRB augimo kreivė** fermentuotuose sojų mėginiuose buvo nustatyta įvertinant optinio tankio (OT) pokyčius spektrofotometru „Genesys 10UV“ (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) esant 590 nm bangos ilgiui [153]. Prieš spektrofotometrinę analizę kontroliniai ir fermentuoti mėginiai buvo nufiltruoti naudojant medicininius kaproninius filtrus ir gautuose filtratuose buvo matuojama absorbcija.

pH vertės nustatymas. Mėginiai (10 g) sumaišomi su steriliu distiliuotu vandeniu (90 ml) ir filtruojami per „Whatman“ filtrinį popierių (nr. 1). Gautu filtrato pH vertė matuojama tiesiogiai naudojant pH-metrą (PP-15, *Sartorius*, Getingenas, Vokietija).

Mėginių bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) nustatomas pagal LST 1553:1998 standartą [154]. Rūgštingumo vertinimui mėginiai buvo paruošti analogiškai kaip ruošiant pH matavimams. Gauti filtratai titruoti 0,1 M NaOH tirpalu, naudojant indikatorių 1 % fenoltaleiną, iki pH vertės 8,2. Terpės bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) apskaičiuotas pagal (5) formulę:

$$\text{BTR } (^{\circ}\text{N}) = 2 \cdot a \cdot k \quad (5);$$

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

Pieno rūgšties L(+) ir D(–) izomerų kiekio nustatymui buvo naudojamas „Megazyme“ K-DLATE 07/14 testo rinkinys (*Megazyme International*, Airija). Pieno rūgšties izomerai nustatyti fermentinių reakcijų metu, o D(–) ir L(+) pieno rūgšties izomerų koncentracijos yra apskaičiuojamos pagal (6) formulę:

$$c = \frac{V \cdot MM}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{\text{L arba D-pieno rūgštis}} \quad (6);$$

čia: V – galutinis tūris, ml; MM – pieno rūgšties molekulinė masė, g/mol; ε – NADH ekstinkcijos koeficientas 340 nm bangos ilgiui = 6300 (l/(mol·cm)); d – šviesos kelias ($d = 1,0$), cm; v – tiriamo mėginio tūris, ml.

Antigrybinio aktyvumo nustatymas

Antigrybinis aktyvumas tirtas fermentuotų permeatų, gautų iš augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių išspaudų (žr. aprašymą 2.2.1 skyrelyje).

Mikroskopinių grybų suspensijų paruošimas. Šiam tikslui naudotas peptono tirpalas (200 ml vandens ištirpinta 2 g peptono ir 1 g NaCl). Paruoštas tirpalas išpilstytas į mėgintuvėlius (po 10 ml), kurie autoklavuoti 121 °C temperatūroje, trukmė – 15 min. Prieš atliekant antigrybinio aktyvumo tyrimą nustatyta mikroskopinių grybų koncentracija (*F. graminearum* F ($5,5 \cdot 10^5$ sporų/ml), *F. graminearum* ($5,7 \cdot 10^5$ sporų/ml) ir *F. culmorum* ($2,95 \cdot 10^5$ sporų/ml)) mikroskopinio skaičiavimo metodu naudojant skaičiavimo (Goriajevo) kamerą [155].

Antigrybinio aktyvumo nustatymas difuzijos į agarą būdu. Aseptinėmis sąlygomis indikatoriniai grybai (*F. graminearum* F , *F. graminearum*, *F. culmorum*)

sėti į Petri lėkšteles su sterilia ir sustingusia PDA terpe, iš mėgintuvėlių įpilant 100 µl tirpalo. Dezinfekuotu stikliniu sklaidytuvu turinys tolygiai paskirstomas po visą terpės paviršių. Tada metaliniu vamzdeliu padaromi 4 šulinėliai, kurių skersmuo 6,0 mm, kiekvienoje Petri lėkštelėje. Į šulinėlius pipete įlašinama 100 µl tiriamojo mėginio, tada lėkštelės dedamos į termostatą, kuriame palaikoma pastovi 25 °C temperatūra. Per 24 val. dalis mėginio išgaruoja, todėl į šulinėlius papildomai įpilama 100 µl tiriamojo mėginio, lėkštelės iškart dedamos į termostatą. Po 48 val. inkubacijos lėkštelės išimamos ir su liniuote išmatuojamas inhibavimo zonos skersmuo (mm).

2.3.5. Mikotoksinų tyrimai efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Mikotoksinų (µg/kg) analizė atlikta Latvijos maisto saugos, gyvūnų sveikatos ir aplinkos tyrimų institute „BIOR“. Analizei naudota efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) sistema „UltiMate 3000“ (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), sujungta su elektropurkštuvinės jonizacijos Q-TOF (angl. *compact time-of-flight*) masių spektrometru (*Bruker*, Vokietija).

Mėginio paruošimas. Analizei naudoti mėginiai buvo paruošti taikant modifikuotą QuEChERS metodą pagal Reinholds ir kt. [156]. Analizei pasverta 5 g tiriamojo mėginio ir patalpinta į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlį, į kurį vėliau buvo įpilti atitinkami kiekiai mikotoksinų standartų tirpalų. Tada į mėgintuvėlį įpilta 10 ml dejonizuoto vandens bei 10 ml acetonitrilo ir subertas buferinės druskos mišinys (4 g bevandenio magnio sulfato, 1 g natrio chlorido, 1 g trinatrio citrato dihidrido ir 0,5 g dinatrio vandenilio citrato seskvihidrato). Turinys maišomas maišyklėje 1 min („MaxiMix™“, *Thermo Fisher Scientific*, JAV) ir purtomas 10 min automatine purtykle („Multi R-60“, BIOSAN, Latvija). Vėliau mišinys centrifuguotas (4500 aps./min, 5 min, kambario temp.) „Heraeus Multifuge 3L-R“ centrifuga (*Thermo Fisher Scientific*, JAV). Po centrifugavimo iš mėgintuvėlio paimta 6 ml ekstrakto ir įpilta į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlį, kuris šaldomas –80 °C temperatūroje 30 min šaldiklyje („Heto Ultra“, *Thermo Fisher Scientific*, JAV) tam, kad būtų nusodinti šalutiniai ekstrakcijos produktai ir lipidai. Atšildytas centrifugatas vėl centrifuguojamas (4500 aps./min., 5 min, kambario temp.), kad būtų galima išgauti organinių junginių frakciją. 3 ml gauto centrifugato išgarinta vakuuminiame rotaciniame garintuve („TurboVap LV“, *Biotage*, Švedija) ir gautos nuosėdos ištirpintos 500 µl vandens/metanolio (50:50, v/v) mišinyje. Gautas ekstraktas filtruotas pro 0,22 µm vienkartinį „Ultrafree®PVDF“ membraninį filtrą ir perkeltas į automatinio dozavimo buteliukus tolesnei analizei.

Chromatografinė analizė. Tiriamųjų junginių atskyrimui naudota „Kinetex“ C₁₈ atvirkščių fazių analitinė kolonėlė (1,7 µm, 100 Å, 50 × 3,00 mm, *Phenomenex*, JAV) esant 0,35 ml/min srauto greičiui. Chromatografinės metodikos mobilioji fazė sudaryta iš elientų A (0,05 mM amonio acetato ir 0,1 % skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas) ir B (0,05 mM amonio acetato ir 0,1 % skruzdžių rūgšties metanolio tirpalas). Eliuavimo gradientas: eliuentas B – 2 min 57 %, 2–6 min 57–98 %, 6–7 min 98–10 %, 7–8 min 10 %, 8–11 min 10–57 %, 11–12 min 57 %. Injekcijos tūris 15 µL. Mėginio temperatūra – 14 °C, kolonėlės temperatūra – 40 °C.

Analizė buvo atlikta teigiamuoju viso skenavimo režimu visiems mikotoksinams m/z skenavimo diapazone nuo 50 iki 1000. Kiekybiniam įvertinimui taikomas masės ekstrahavimo langas buvo nustatytas į ± 5 ppm esant 10 000 viso pločio pusės didžiausios (FWHM) skiriamosios gebos. Duomenų surinkimas buvo kontroliuojamas „HyStar 3.2“ programine įranga (*Bruker Daltonik GmbH*, Brėmenas, Vokietija), o duomenų analizė atlikta „QuantAnalysis 4.3“ programine įranga (*Bruker Daltonik GmbH*, Brėmenas, Vokietija). Visi nustatymai buvo atlikti su trimis pakartojimais.

Tirti mikotoksinais ir jų aptikimo bei kokybinio įvertinimo ribos: deoksinivalenolis (DON) (LOD = 4 $\mu\text{g/kg}$, LOQ = 12 $\mu\text{g/kg}$), deoksinivalenol-3-gliukozidas (D3G) (LOD = 4,5 $\mu\text{g/kg}$, LOQ = 13 $\mu\text{g/kg}$), 3-ADON (LOD = 3,6 $\mu\text{g/kg}$, LOQ = 11 $\mu\text{g/kg}$) ir 15-ADON (LOD = 14 $\mu\text{g/kg}$, LOQ = 42 $\mu\text{g/kg}$).

2.3.6. Fermentinių aktyvumų įvertinimas *Fusarium* spp. užterštuose kviečių mėginiuose

Mėginio paruošimas. Fermentinių aktyvumų tyrimams kviečių grūdai (W1–W6) buvo sumalti WZ-1 laboratoriniu malūnu (ZBPP, Lenkija) ir iš jų buvo paruošti vandeniniai ekstraktai. Ekstraktams ruošti atsverta 5 g grūdų miltų ir sumaišyta su 30 ml distiliuoto vandens. Mišinys homogenizuotas 2 min (9500 aps./min) ir centrifuguotas (4500 aps./min, 24 min). Supernatantas, kaip fermentų tirpalas, naudotas tolimesniems tyrimams. Iki analizės ekstraktai laikyti -18°C temperatūroje. Mėginių fermentiniai aktyvumai buvo nustatyti pradinuose kviečių mėginiuose, t. y. prieš fermentaciją.

Amilolitinio aktyvumo nustatymas. α -amilazės aktyvumas nustatytas pagal ISO 3983:1977 [157] metodą, kurio esmė: veikiant α -amilazei 30°C temperatūroje krakmolas hidrolizuojamas iki dekstrinų, o likęs (nehidrolizuotas) krakmolas sudaro spalvotą junginį su jodo tirpalu, kurio absorbcija išmatuota spektrofotometru esant 670 nm bangos ilgiui. **Ksinalolitinio aktyvumo nustatymas.** Ksilanolitinis aktyvumas nustatytas Bailey ir kt. [158] aprašytu metodu, naudojant DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgštis). **Proteolitinio aktyvumo nustatymas.** Proteolitinis aktyvumas nustatytas pagal Cupp-Enyard aprašytą metodiką [159], naudojant 0,65 % (m/v) kazeiną kaip substratą.

2.3.7. Kviečių grūdų daigumo įvertinimas

Grūdų daigumas nustatytas rulonų metodu [160]. Šiam metodui naudotas drėgnas filtrinis popierius (20 cm pločio ir 100 cm ilgio), kuriame 1,5 cm atstumu išdėliota 100 biostimuliatoriuje apvoliotų sėklų. Tai atlikta su visais mėginiais po keturis pakartojimus. Uždengus sėklas drėgno filtrinio popieriaus juosta, filtras susuktas į standų ruloną ir perkeltas į stiklinį indą su vandeniu. Vandens lygis palaikomas 5 cm atstumu nuo sėklų. Tokie filtrinio popieriaus rulonai palikti

kambario temperatūroje 7 paras. Daigumas įvertintas pagal sėklų po 3 parų sudygimo procentą (*SP*, %), kuris apskaičiuojamas pagal (7) formulę:

$$SP = \frac{\text{Sudygusių sėklų skaičius}}{\text{Bendras daiginamų sėklų skaičius}} \times 100 \quad (7).$$

Po septynių parų išmatuojamas želmenų stiebų ir šaknų ilgis (cm) bei pasveriama gautoji šaknų ir želmenų biomasė (g).

2.3.8. Kviečių atsparumo šalčiui įvertinimas

Temperatūrinės tolerancijos (*LT*₅₀) nustatymas. Šiam eksperimentui naudotos trys žieminių kviečių veislės: „Gaja“, „Capone“ ir „Galerista“. Visi trys genotipai šaldymui buvo paruošti pagal 2.1.5 skyrelyje pateiktą schemą. Šaldymo eksperimentas vykdytas programuojamoje šaldymo kameroje iki tikslinės temperatūros (–8 °C, –10 °C, –12 °C, –14 °C, –16 °C) ir, pasiekus tikslinę temperatūrą, palaikyta 12 valandų. Kiekviename žingsnyje išimta po 3 kasetes. Įvertintas išlikusių ir žuvusių augalų skaičius, *LT*₅₀ vertė, t. y. temperatūra, kurioje žūva 50 % augalų, apskaičiuota naudojant *R* paketą „MASS“ [161].

Baltyminių medžiagų tyrimas elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje metodu. Pirmiausia atlikta kviečių želmenų baltymų ekstrakcija. Žieminių kviečių mėginiai surinkti pagal 2.1.5 skyrelyje apibūdintas sąlygas. Švieži kviečių lapai (5 g) surinkti į 2,0 ml talpos „Eppendorf“ mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai su mėginiais iškart užšaldyti skystame azote. Toliau mėginiai buvo sumalti (taikant 30/s vibracijos dažnį, vieno ciklo trukmė 50 s) iki miltų naudojant „MM400/Retsch“ malūną (Vokietija). Sumalti mėginiai buvo laikomi 2,0 ml talpos „Eppendorf“ mėgintuvėliuose –80 °C temperatūroje (*Microbank* sistemoje). Baltymų ekstrakcijai 1 g mėginio sumaišyta su 5 ml baltymų ekstrahavimo buferio (5 mM Tris, pH = 7,5; 1 mM CaCl₂; 20 mM DTT). Suspensija inkubuota kambario temperatūroje 5 min, o netirpioji frakcija pašalinta centrifuguojant (6000 aps./min, 10 min, 4 °C temp.). Gautas supernatantas, kuriame yra tirpiųjų baltymų frakcija, naudota poliakrilamidinio gelio elektroforezei. **Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje** vykdyta naudojant „SDS-PAGE omniPage mini 2-D“ elektroforezės sistemą (*Cleaver Scientific*, Regbis, Didžioji Britanija) pagal Vidmantienės ir Juodeikienės aprašytą metodiką [162]. Tiriamasis baltymų tirpalas buvo atskiestas santykiu 1:1 su baltymų denatūravimo buferiu ir kaitintas verdančio vandens vonelėje 5 min. Analizei 20 μl paruošto baltymų mėginio įdėta į gelio tarpus. Baltymų elektroforezė vykdyta naudojant 12 % poliakrilamido gelius, esant 40 mA ir 220 V galiai 1–3 val. Baltymų juostelių dažymui naudotas 0,006 % „Coomassie Blue G-250“ dažų tirpalas. Baltymai buvo vertinami lyginant jų molekulinės masės dydį su baltymų standartu (220–8 kDa; „ColourBurst Protein Marker“; *Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV).

2.3.9. Statistinė duomenų analizė

Eksperimentai kartoti 3 kartus, rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti naudojant „Microsoft Excel“ programinę įrangą. Matematinė statistinė

duomenų analizė atlikta „SPSS Windows XP V15.0“ (2007; *SPSS Inc.*, Čikaga, Ilinojaus valstija, JAV) programa, taikant vieno faktoriaus ir dviejų faktorių dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Skirtumai tarp mėginių įvertinti taikant Kruskal-Wallis ir Tukey kriterijus. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp mėginių yra tada, kai reikšmingumo lygis $p < 0,05$. Siekiant kiekybiškai įvertinti ryšio stiprumą tarp kintamųjų buvo nustatyta tiesinė Pirsono koreliacija (r).

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Augalinės kilmės žaliavų perdirbimo šalutinių produktų, skirtų biostimuliatorių gamybai, parinkimas ir charakteristikos

Skatinant tvarią maisto produktų gamybą ir taupant energijos sunaudojimą bei mažinant gamybos procesų poveikį aplinkai, didelis dėmesys skiriamas atliekų nesudarančių technologijų plėtrai. Šalutinių produktų perdirbimas suteikiant jiems pridėtinę vertę, pavyzdžiui, biostimuliatorių gamybai, tampa populiaria tendencija, nes šiuolaikinės žemės ūkio plėtos tendencijos yra orientuotos į neigiamo poveikio aplinkai mažinimą ieškant efektyvių atsinaujinančių šaltinių, kuriant naujas biostimuliatorių formules ir siekiant pagerinti pasėlių derlių tvariame žemės ūkyje.

Šiame darbo etape įvertinti potencialūs augalinės kilmės žaliavų perdirbimo šalutiniai produktai, naudotini baltyminių biostimuliatorių gamybai, ir taikytini technologiniai sprendimai jų perdirbimui.

3.1.1. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas ⁵

Kukurūzų krakmolo gamybos metu, taikant plačiai paplitusį šlapiąjį malimo būdą, susidaro kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP, angl. *corn steep liquor*), kurio gamybos apimtys pasaulyje siekia iki milijardo tonų per metus [163]. Šio eksperimento metu nustatyta KKGŠP cheminė sudėtis pateikta 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto cheminė sudėtis (% s. m.)

Komponentai	Kiekis, %
Baltymai (bendras azotinių medžiagų kiekis)	44,40 ± 0,57
Krakmolas	1,30 ± 0,02

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN*; *StN* – standartinis nuokrypis

Rezultatai rodo, kad tirtuose KKGŠP mėginiuose nustatyta 44,40 % s. m. baltymų. Tai patvirtina, kad KKGŠP galėtų būti potencialus nebrangus azoto šaltinis baltymų hidrolizatų gamybai taikant fermentinę hidrolizę. Pagrindinės baltyminės medžiagos, daugiausiai aptinkamos kukurūzų grūduose, yra prolaminai. Tai globuliniai baltymai, kurie dar žinomi kaip zeinas, ekvivalentas kviečiuose – gliadinui, o miežiuose – hordeinui. Beveik visas zeinas (45–50 % visų baltymų), kuriame yra daug hidrofobinių aminorūgščių (prolino ir glutamino), lokalizuojasi endosperme, o glutelinas pasiskirstęs tarp endospermo ir gemalo [164, 165].

⁵ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaitė, D., Zadeikė, D., Bendoraitienė, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. Plants. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>

Albumino ir globulino frakcijų daugiausia aptinkama gemaluose [165]. Kukurūzus perdirbant šlapiuoju būdu gaunami šalutiniai produktai skiriasi tarpusavyje baltyminių medžiagų sudėtimi: kukurūzų glitimo miltuose (CGM) daugiausiai aptinkama endospermo baltymų, o kukurūzų glitimo pašaruose (CGP) ir kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte (KKGŠP) – gemalo baltymų. Xiao ir kt. [166], tyrę KKGŠP laisvąsias aminorūgštis ir jų darinius, konstatavo, kad laisvųjų aminorūgščių analizė ir DNR testai naudotini KKGŠP kokybės įvertinimui.

Šiame darbe pagrindinis dėmesys skirtas KKGŠP baltymų fermentinei hidrolizei bei jos efektyvumo didinimui ir laisvųjų aminorūgščių susidarymui, vienam iš pagrindinių kriterijų, apsprendžiančių baltyminių biostimuliatorių funkcionalumą.

3.1.2. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (išspaudos)⁶

Kita potenciali antrinių produktų grupė biostimuliatorių gamybai galėtų būti išspaudos, gautos augalinių gėrimų iš sojų, javų (ryžių, avižų) ir riešutų (migdolų, kokoso) gamybos metu. Šių produktų gamyba sparčiai auga, nes jie yra alternatyva karvės pienui, kurio vartojimas ribojamas laikantis specialių dietų (veganizmo, žaliavalgystės, pusiau vegetarizmo) arba turint sveikatos problemų, tokių kaip alergija, arba sergant širdies ir kraujagyslių ligomis.

Pagrindinis antrinis produktas, gaunamas sojų gėrimo gamybos metu, yra turtingos baltyminėmis medžiagomis sojų išspaudos (SI). Pasaulyje kasmet pagaminama apie 1,4 milijardo tonų SI, didžioji jų dalis tenka Azijos šalims, o ES šalyse auga tiek augalinių gėrimų, tiek ir antrinių produktų kiekiai [167]. Eksperimento metu vertinta maltų sojų pupelių (MSP), naudotų sojų gėrimo gamybai, ir sojų išspaudų cheminė sudėtis (drėgmė, baltymai, maistinės skaidulos ir riebalai) (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Sojų išspaudų ir sojų pupelių cheminė sudėtis

Komponentai		Maltos sojų pupelės	Sojų išspaudos
Drėgnis (%)		7,93 ± 0,20	10,00 ± 0,23
Baltymai (%)		42,75 ± 0,71	28,22 ± 0,06
Skaidulinės medžiagos (%)	Netirpiosios	26,44 ± 0,13	50,01 ± 0,23
	Tirpiosios	3,22 ± 0,04	2,90 ± 0,05
Riebalai (%)		19,67 ± 0,29	9,21 ± 0,11

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN*; *StN* – standartinis nuokrypis

Lyginant sojų išspaudų ir sojų pupelių cheminės sudėties rezultatus, matoma, kad ekstrahuojant sojų pupeles, trečdalis pradinės žaliavos baltymų patenka į gėrimą, o likusioji baltymų dalis (66,0 %) lieka išspaudose. Sprendžiant iš maistinių skaidulų

⁶ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsiene, K., Navickaite, B., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Bartkiene, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. LWT – Food Science and Technology. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

analizės rezultatų (3.2 lentelė), didžioji dalis jų sojų pupelėse yra netirpiosios (88,7 %). Po ekstrahavimo išspaudose nustatytas reikšmingai didesnis netirpiųjų skaidulų kiekis (50,01 g/100 g) lyginant su pradine žaliava – maltomis sojų pupelėmis (26,44 g/100 g), tirpiųjų skaidulų kiekis sojų išspaudose (2,90 g/100 g) nustatytas mažesnis negu sojų pupelėse (3,22 g/100 g). Vertinant riebalų pokyčius sojų pupelių perdirbimo metu, matoma, kad pusė jų kiekio pateko į gėrimą, o kita dalis (46,82 %) liko išspaudose (3.2 lentelė).

Eksperimento metu gauti rezultatai analogiški kaip ir kitų tyrėjų duomenys: sojų išspaudose yra daug skaidulinių medžiagų (50 %), baltymų (25 %), riebalų (10 %) ir kitų maistinių medžiagų [168, 169]. Tačiau cheminė sudėtis gali skirtis pagal sojų pupelių genotipą [168]. Taigi, sojų išspaudose lieka daug vertingų maistinių medžiagų, įskaitant baltymus, kurie turi didžiulį potencialą atsinaujinančių išteklių plėtojimui [170]. Racionalus sojų išspaudų panaudojimas yra labai aktualus maisto pramonėje, nes padidintas jų drėgnis riboja laikymą ir kelia aplinkosaugos problemą. Pažymėtina, kad augalinių gėrimų gamybos pramonėje generuojami dideli kiekiai ne tik sojų, bet ir kitų žaliavų išspaudų, tokių kaip avižos, ryžiai, migdolai ir kokosai. Šių problemų sprendimas yra kompleksinis ir susijęs su alternatyvių terminiam apdorojimui būdų paieška siekiant racialesnio išspaudų (sojų, avižų, ryžių, kokoso, migdolų) apdorojimo ir kokybės stabilizavimo, inovatyvių biotechnologinių priemonių – fermentinės hidrolizės ir mikrobinės fermentacijos – taikymu išspaudų perdirbimui į pridėtinės vertės produktus, pavyzdžiui, antimikrobinis bioproduktas. Siekiant užtikrinti tvarią augalinių gėrimų gamybą ir didinti žaliavų, skirtų maisto pramonei, išteklius, yra poreikis taikyti biorafinavimo koncepciją augalinių gėrimų išspaudoms perdirbti.

3.1.3. Augalinių gėrimų gamybos šalutiniai produktai (permeatai) ⁷

Idealus biorafinavimo metodas turi duoti ekonominę naudą ir kartu užtikrinti maisto sektoriaus aplinkos tvarumą bei siekti galutinio tikslo – žiedinės atliekų nesudarančios ekonomikos [171, 172]. Vykdam tarptautinį projektą DISCOVERY Fraunhofer institute UMSICHT (Vokietija) buvo sukurta augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių išspaudų (sojų, avižų, ryžių, migdolų ir kokosų) biorafinavimo koncepcija, sujungianti apdorojimą ultragarsu ir biomasės skaidymą, mechaninį atskyrimą ir ultrafiltraciją. Augalinių gėrimų gamybos metu susidariusiose išspaudose yra daug vandens, kuris lokalizuotas netirpiojoje skaidulų frakcijoje [173]. Veikiant ultragarsu, polisacharidų grandinėje atsiradę įtrūkimai suardo pluoštinį audinį, todėl iš jo lengviau išskiriamas vanduo, o kartu su juo – ir ištirpusios organinės bei neorganinės medžiagos [174]. Po pirminio išspaudų ultragarsinio apdorojimo ir papildomo filtravimo gautai skystajai fazei taikytas ultrafiltravimas. Membraninių technologijų taikymas vertingų komponentų išskyrimui, palyginti su tradiciniais

⁷ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass in vivo. Food Bioscience. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

metodais, turi pranašumą, nes išvengiama nepageidaujamų sąlygų, kurios gali pakeisti natūralių vertingų junginių, tokių kaip baltymai, savybes [175, 176]. Ultrafiltravimo metu, plačiai naudojamų maisto pramonėje didelės molekulinės masės makromolekulių išgavimui [175], buvo atskiriami į retentatą (arba koncentratą) baltymai, riebalai ir koloidiniai mineralai, kurie gali būti naudojami maisto produktams praturtinti. Tokio proceso metu gautas filtratas, dar vadinamas permeatu, šiame darbe išbandytas gaminant biostimuliuojantį.

Pirmiausia buvo nustatyta gautų permeatų cheminė sudėtis ir įvertintas jų mikrobiologinis užterštumas, galintis turėti įtakos permeato bioapdorojimui (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Permeatų cheminė sudėtis

Mėginys	Sausosios medžiagos, %	Mineralinės medžiagos, %	Tirpieji baltymai, mg/mL	Redukuojantieji sacharidai, mg/ml	BMS, logKSV/mL
KP	0,03 ± 0,015 ^a	0,015 ± 0,009 ^a	0,028 ± 0,007 ^{ab}	0,004 ± 0,0007 ^a	7,17 ± 0,02 ^d
RP	1,48 ± 0,010 ^d	0,008 ± 0,0002 ^a	0,024 ± 0,009 ^{ab}	12,04 ± 0,03 ^d	1,35 ± 0,01 ^a
SP	0,38 ± 0,050 ^b	0,103 ± 0,004 ^b	0,037 ± 0,006 ^b	0,204 ± 0,002 ^b	2,44 ± 0,18 ^b
MP	0,02 ± 0,005 ^a	0,009 ± 0,003 ^a	0,038 ± 0,001 ^b	0,002 ± 0,001 ^a	5,28 ± 0,21 ^c
AP	1,26 ± 0,002 ^c	0,011 ± 0,003 ^a	0,017 ± 0,001 ^a	9,620 ± 0,01 ^c	1,42 ± 0,05 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± *StN*, (*n* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; KP – kokosų permeatas; RP – ryžių permeatas; SP – sojų permeatas; MP – migdolų permeatas; AP – avižų permeatas, BMS – bendras mikroorganizmų skaičius. *a–d* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05)

Po augalinių gėrimų išspaudų apdorojimo ultragarsu ir ultrafiltravimo skystojoje frakcijoje – permeatuose sausųjų medžiagų kiekis, pagal išspaudų rūšį, kito nuo 0,02 % iki 1,48 %. Permeatuose nustatyti nedideli mineralinių medžiagų kiekiai rodo, kad didžioji jų dalis po ultrafiltravimo lieka retentatuose. Grūdinės kilmės permeatuose (ryžių ir avižų) buvo aptikta daugiausiai redukuojančiųjų sacharidų, kurie sudarė didžiausią dalį sausųjų medžiagų. Sojų ir migdolų permeatuose buvo nustatytas didesnis tirpiųjų baltymų kiekis, palyginti su kitais permeatais. Be to, sojų permeate nustatytas didžiausias mineralinių medžiagų kiekis.

Analizuojant permeatų pritaikymą biostimuliuojančių gamybai, sojų ir migdolų permeatai, be papildomo apdorojimo, galėtų būti išbandyti augalų auginimui. Ryžių ir avižų permeatai, kuriuose nustatytas didžiausias redukuojančiųjų sacharidų kiekis, galėtų būti pritaikyti antimikrobinių medžiagų gamybai kuriant fungicidų tipo biopesticidus, permeatams pritaikant fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis. Permeatų panaudojimas fermentacijos procesuose kelia klausimą dėl jų mikrobiologinio užterštumo, kadangi fermentacijos terpėje (permeatuose) padidėjęs pašalinės mikrofloros kiekis gali turėti neigiamos įtakos tiek pieno rūgšties bakterijų dauginimuisi, tiek metabolitų susidarymui fermentacijos proceso metu. Šiame eksperimente permeatų mikrobiologinis užterštumas buvo įvertintas pagal bendrą mikroorganizmų skaičių (3.3 lentelė) ir nustatyta, kad PRB fermentacijai tinkantys permeatai (ryžių ir avižų) pasižymėjo mažiausiu BMS kiekiu (vidutiniškai 1,39 log KSV/ml).

Literatūroje aprašyta, kad eksperimente taikomos technologijos (ultragarsas ir ultrafiltravimas) gali žymiai sumažinti mėginių mikrobine taršą [177]. Šiuo atveju pastebėti skirtumai tarp atskirų mėginių, kai buvo taikomos vienodos apdorojimo sąlygos. Tai rodo, kad taršos kilmė galėtų būti susijusi su žaliava, t. y. augalinių gėrimų išspaudomis ir jų mikrobiologiniu užterštumu, pavyzdžiui, laikymo ar perdirbimo metu. Todėl didelis dėmesys turėtų būti skiriamas higienos ir sanitarijos reikalavimams patalpoje, kurioje laikoma žaliava ar vykdomas jos apdorojimas.

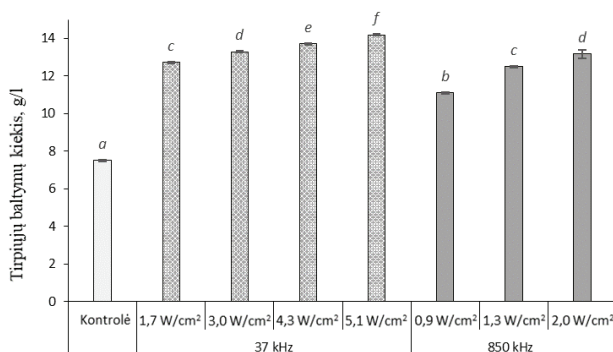
3.2. Augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų funkcionalumo didinimas taikant ultragarsą

Vis dar ieškoma alternatyvių technologinių priemonių, kaip padidinti baltymų skaidymo efektyvumą ir gauti didesnę laisvųjų aminorūgščių išeigą iš šalutinių maisto pramonės produktų. Pastaruoju metu atsirado didelis susidomėjimas naujų fizikinių metodų, tokių kaip ultragarsas, taikymu pirminiam substrato ar biomasės apdorojimui. Ultragarso (UG) poveikis produkto cheminei sudėčiai ir jo funkcinėms savybėms yra esminis veiksnys kuriant naujus biostimuliatorius ir tobulinant jų gamybos procesą. Norint nustatyti ultragarsinio apdorojimo (įvairaus dažnio bei skirtingo intensyvumo) įtaką maisto gamybos šalutinių produktų funkcionalumo įvertinimui, parinktos modelinės augalinių biomasės sistemos: kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP) ir sojų išspaudos (SI).

3.2.1. Tirpiųjų baltymų pokyčiai kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte⁸

Šiame etape vertinta žemojo ir aukštojo dažnio UG apdorojimo įtaka KKGŠP tirpiųjų baltymų susidarymui (3.1 pav.). Gauti tyrimų rezultatai rodo, kad tiek žemojo (37 kHz), tiek aukštojo dažnio (850 kHz) ultragarsas, lyginant su neapdorota žaliava, turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) įtaką kukurūzų tirpiųjų baltymų pokyčiams ir sąlygojo didesnę tirpiųjų baltymų kiekį UG veiktuose mėginiuose, atitinkamai 79,7 % ir 63,4 %. Didžiausias tirpiųjų baltymų kiekis (14,2 g/l) buvo nustatytas mėginyje, apdorotame 37 kHz ultragarsu esant didžiausiam intensyvumui (5,1 W/cm²), kurio vertė nustatyta 89,3 % didesnė nei kontrolinio mėginio. Mažinant intensyvumą (4,3–1,7 W/cm²) esant žemajam dažniui (37 kHz), buvo stebimas mažiau efektyvus poveikis baltymams ir tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiams, lyginant su kontroliniu mėginiu, atitinkamai 82,8 %, 77,2 % ir 69,9 %.

⁸ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaite, D., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>



3.1 pav. Tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai kukurūzų (KKGŠP) mėginiuose, veiktuose žemojo (37 kHz) bei aukštojo (850 kHz) dažnio ultragarsu skirtingu intensyvumu (1,7; 3,0; 4,3 bei 5,1 W/cm² – 37 kHz ir 0,9; 1,3 bei 2,0 W/cm² – 850 kHz), trukmė – 30 min, esant 50 °C temperatūrai, pH = 9,0. Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$; a–f – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

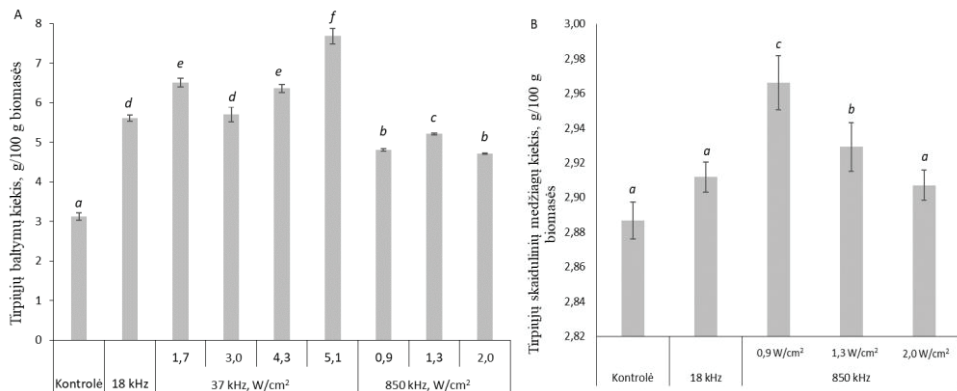
Dauguma tyrimų skirti siekiant nustatyti žemojo dažnio (20 kHz) ir didelio intensyvumo ultragarsinio apdorojimo įtaką augalinės kilmės baltymams ir jų struktūrinių bei funkcinių savybių pokyčiams [37, 87, 107, 178]. Gauti rezultatai sutampa su literatūroje pateikta informacija, kad žemojo dažnio (20 kHz) ultragarsinių bangų sukurta kavitacija veikia baltymų struktūrą ir gali suardyti baltymų molekulėje molekulinis ryšius, pavyzdžiui, vandenilinius. Tokie pokyčiai baltyminėse medžiagose padidina tirpiųjų baltymų kiekį. Li ir kt. [178] nustatė, kad didžiausias tirpiųjų baltymų kiekis rapsuose (16,71 mg/ml), lyginant su kitais apdorojimo būdais, gali būti gaunamas veikiant mėginius fiksuotu 20 kHz ultragarsu. Tokie pokyčiai siejami su ultragarsinės kavitacijos reiškiniu, pagerinančiu baltymų ir vandens sąveiką, dėl kurios susidaro daugiau smulkiųjų baltymų fragmentų, ir tokiu būdu padidėja baltymų tirpumas.

Iš 3.1 paveiksle pateiktų tyrimų rezultatų matyti, kad KKGŠP apdorojimas aukštojo dažnio (850 kHz) ultragarsu yra taip pat veiksmingas ir sąlygoja tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimą. Taikant aukštojo dažnio ultragarsą buvo nustatytas reikšmingas intensyvumo poveikis KKGŠP tirpiųjų baltymų susidarymui. Didžiausias KKGŠP tirpiųjų baltymų kiekis (13,2 g/l) gautas taikant mėginių apdorojimui didžiausią ultragarsinio apdorojimo intensyvumą (2,0 W/cm²); taikant mažesnius intensyvumus (0,9 ir 1,3 W/cm²), gauti mažesni tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai (atitinkamai 11,1 ir 12,5 g/l).

Tolimesniems tyrimams, skirtiems nustatyti ultragarso poveikį fermentinei kukurūzų baltymų hidrolizei, bus naudojami KKGŠP mėginiai, apdoroti žemojo dažnio (37 kHz) ir didžiausio intensyvumo (5,1 W/cm²) ultragarsu, taip pat aukštojo dažnio (850 kHz) ir didžiausio intensyvumo (2,0 W/cm²) ultragarsu.

3.2.2. Tirpiųjų baltymų ir skaidulinių medžiagų pokyčiai sojų išspaudose⁹

Sojų pupelių ekstrahavimo metu dauguma tirpiųjų baltymų išekstrahuojama ir patenka į sojų gėrimą, o sojų išspaudose (okaroje) lieka netirpieji baltymai. Dėl šios priežasties siekiant išspaudose padidinti tirpiųjų baltymų kiekį, tikslinga taikyti pirminį ultragarsinį apdorojimą. Šiame eksperimento etape buvo lyginami tirpiųjų baltymų okaroje analizės rezultatai, gauti apdorojant mėginius skirtingo dažnio (18; 37 ir 850 kHz) ir skirtingo intensyvumo (1,7; 3,0; 4,3 ir 5,1 W/cm² – 37 kHz ir 0,9; 1,3 ir 2,0 W/cm² – 850 kHz) ultragarsu. Gauti rezultatai pateikti 3.2 paveiksle.



3.2 pav. Tirpiųjų baltymų (A) ir tirpiųjų skaidulinių medžiagų (B) pokyčiai sojų išspaudų mėginiuose, apdorotuose žemojo dažnio (18 kHz ir 37 kHz skirtingo intensyvumo 1,7; 3,0; 4,3 ir 5,1 W/cm²) ultragarsu bei aukštojo dažnio (850 kHz) skirtingo intensyvumo (0,9; 1,3 ir 2,0 W/cm²) ultragarsu, trukmė – 30 min, esant 50 °C temperatūrai. Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$; a–f – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

Visais atvejais ultragarsu veiktuose sojų išspaudų mėginiuose, lyginant su kontroliniu mėginiu, buvo gautas statistiškai reikšmingas tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimas ($p < 0,05$). Didžiausi šių baltyminių medžiagų pokyčiai, lyginant su kontroliniu mėginiu, nustatyti taikant žemojo dažnio (18 kHz ir 37 kHz) ultragarsinį sojų išspaudų apdorojimą. Didžiausias tirpiųjų baltymų kiekis (2,5 karto didesnis nei kontroliniame mėginyje) buvo fiksuotas SI mėginyje, veikta žemojo dažnio (37 kHz) didžiausio intensyvumo (5,1 W/cm²) ultragarsu. O štai mėginiuose, veiktuose 37 kHz mažesnio intensyvumo (1,7–4,3 W/cm²) ir 18 kHz ultragarsu, tirpiųjų baltymų kiekis vidutiniškai padidėjo 2 kartus. Sojų išspaudų apdorojimas aukštojo dažnio ultragarsu tirpiųjų baltymų kiekį padidino vidutiniškai 1,6 karto.

⁹ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsiene, K., Navickaite, B., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Bartkiene, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

Taigi, sprendžiant pagal tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimą, žemojo dažnio (18 kHz ir 37 kHz) ultragarsinis apdorojimas yra veiksmingesnė priemonė baltymų ekstrahavimui iš sojų išspaudų nei aukštojo dažnio ultragarsas. Pagal literatūrą, ultragarso veikimo metu susidarę kavitacijos burbuliukai skatina baltymų išsiskleidimą, padidindami aminorūgščių likučių sąveiką su vandens molekulėmis, taip prisidedami prie tirpiųjų baltymų susidarymo [87].

Lygiagrečiai buvo analizuojami tirpiųjų skaidulinių medžiagų pokyčiai kontroliniuose ir ultragarsu apdorotuose mėginiuose. Gauti rezultatai rodo, kad žaliavos veikimas aukštojo dažnio ultragarsu gali padidinti tirpiųjų skaidulinių medžiagų kiekį mėginiuose nuo 2,89 iki 2,97 g/100 g, lyginant su kontroliniu mėginiu. Tai rodo, kad dalis skaidulinių medžiagų veikiamos ultragarsu pereina iš netirpiosios formos į tirpiąją. Pagal Huang ir kt. [179], ultragarsas gali suardyti chemines polisacharidų jungtis. Skaidulinių polimerų skaidymo mechanizmas gali būti sąlygotas kavitacijos sukeltų burbuliukų sprogimų ir cheminių virsmų, vykstančių tarp polimero bei didelės energijos molekulių [180]. Cheminių ryšių suardymas daugiausiai skatina netirpiųjų medžiagų pokyčius ir jų tirpumo padidėjimą, keičiantis paviršiaus hidrofiliškumui [174].

Šis tyrimas patvirtino, kad tiek tirpiųjų baltymų, tiek ir tirpiųjų skaidulinių medžiagų kiekio padidėjimas priklauso nuo ultragarso galios ir intensyvumo. Ultragarsinio apdorojimo parametrai gali pakeisti funkcinės augalinių žaliavų savybes. Tolimesniems tyrimams, skirtiems nustatyti ultragarso poveikį fermentinei sojų baltymų hidrolizei, bus naudojami sojų išspaudų mėginiai, apdoroti žemojo dažnio (37 kHz, esant 5,1 W/cm² intensyvumui) ir aukštojo dažnio (850 kHz esant 2,0 W/cm² intensyvumui) ultragarsu.

3.3. Baltymų hidrolizatų gamyba iš kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentinės hidrolizės būdu kartu su išankstiniu žaliavos apdorojimu ultragarsu¹⁰

Iki šiol didžiausio praktinio pritaikymo sulaukė baltyminiai augalinės kilmės biostimuliatoriai. Jų gamybai įprastai taikoma šarminė fermentinė hidrolizė, panaudojant mikrobinės kilmės proteazes (alkalazes) [181], išgaunant aminorūgščių ir skirtingo ilgio peptidų mišinius su mažu druskingumu, taip pat išvengiant galimos taršos pavojingais patogenais [1]. O štai gyvūninės kilmės žaliavų perdirbimui į biostimuliacinius taikoma cheminė hidrolizė naudojant stiprias rūgštis ar šarmus. Pagrindiniai tradicinės fermentinės hidrolizės trūkumai yra ilga trukmė ir mažas baltymų hidrolizės laipsnis (*HL*). Dauguma tyrimų skirti metodų, leidžiančių pagerinti substrato konversijos efektyvumą ir sutrumpinti hidrolizės laiką, kūrimui [94]. Ultragarsinis apdorojimas sulaukė didelio dėmesio bioaktyviųjų komponentų ekstrahavimo procese [95], taip pat pagerinant fermentinės hidrolizės

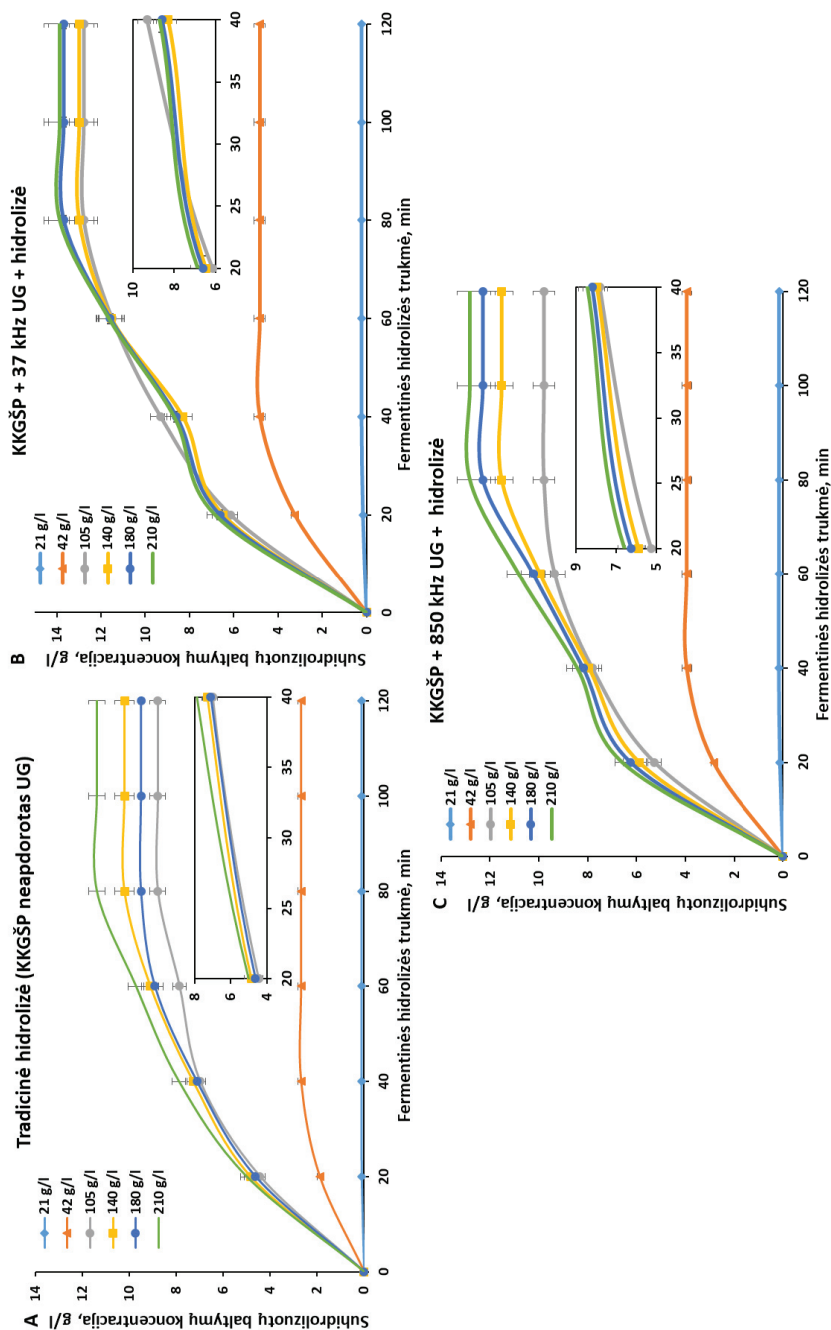
¹⁰ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaitė, D., Zadeike, D., Bendoraitienė, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaitė-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>

procesą [94, 96]. Šiame darbo etape tirta skirtingo dažnio ultragarsinio apdorojimo įtaka baltyminių šalutinių produktų fermentinės hidrolizės procesui, naudojant įvairias modelines sistemas (KKGŠP, sojų išspaudas); taip pat tirta fizinio apdorojimo įtaka fermentinės kinetikos parametrams ir laisvųjų aminorūgščių susidarymui.

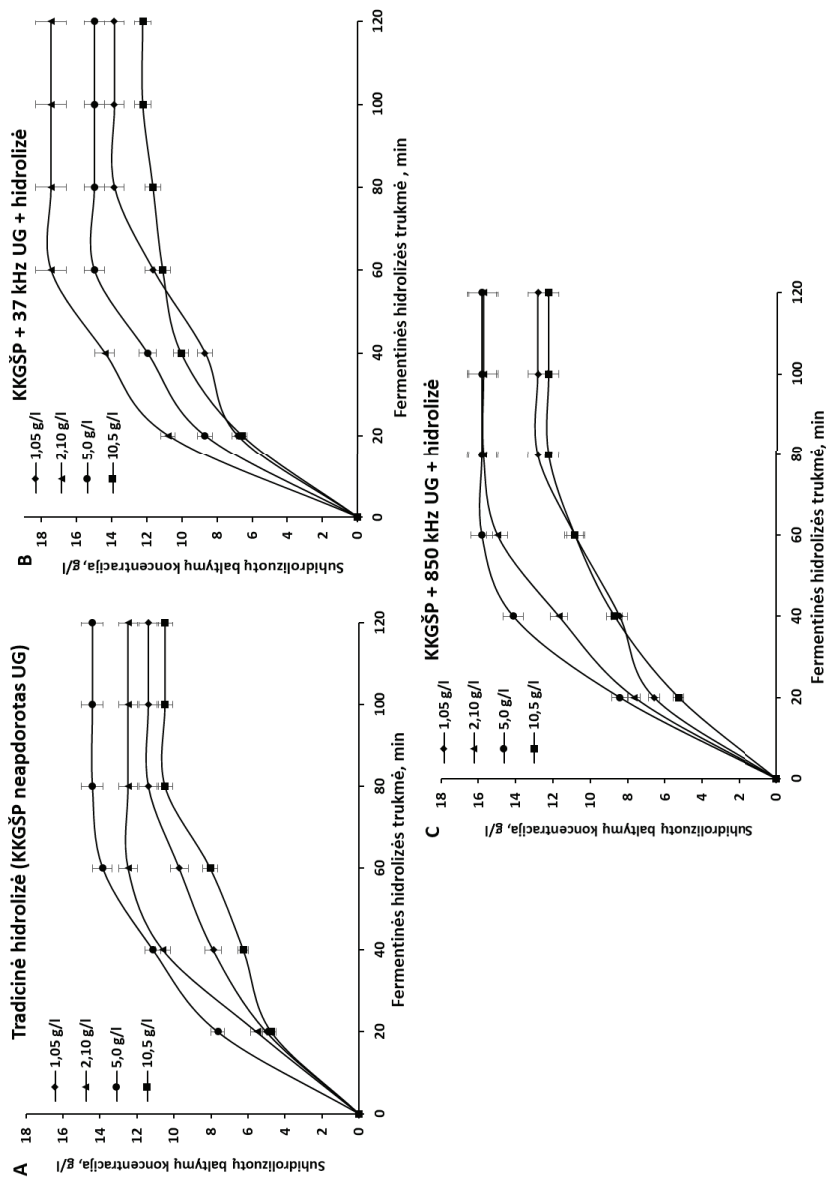
3.3.1. Ultragarso poveikis fermentinės hidrolizės procesui

Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP). Šiame eksperimente tirta žemojo dažnio (37 kHz, esant 5,1 W/cm²) ir aukštojo dažnio (850 kHz esant 2,0 W/cm² intensyvumui) ultragarsinio apdorojimo įtaka (trukmė 120 min) KKGŠP fermentinei hidrolizei, naudojant šarminės proteazės preparatą. Suhidrolizuotų baltymų pokyčiai fermentinės hidrolizės metu taikant skirtingo dažnio ultragarsinį apdorojimą, esant skirtingoms substrato koncentracijoms, skirtingiems fermento kiekiams ir skirtingiems pH pateikti atitinkamai 3.3–3.5 paveiksluose.

Kruskal-Wallis *H* testas rodo, jog vertinant ultragarsinio apdorojimo įtaką suhidrolizuotų baltymų (SHB) koncentracijai fermentinės hidrolizės metu buvo gauti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,005$). Nustatyta, kad žaliavos apdorojimas ultragarsu pagerino hidrolizės procesą (3.3 pav.); tai ypač matoma mėginiuose su didesniu pradiniu substrato kiekiu (105; 140; 180 ir 210 g/l). Vertinant mėginį su didžiausiu pradiniu substrato kiekiu (210 g/l), nustatyta, kad žemojo dažnio (37 kHz) ultragarsinis apdorojimas buvo efektyvesnis negu aukštojo dažnio (850 kHz), ir tai turėjo įtakos tiriamuose mėginiuose, lyginant su tradicine hidrolize; suhidrolizuotų baltymų koncentracija padidėjo, atitinkamai 36,8 % ir 31,6 %, jau po pirmojo fermentinės hidrolizės tarpsnio (20 min). Vertinant SHB pokyčius tolesniuose fermentinės hidrolizės etapuose, nustatyta, kad didžiausia SHB koncentracija gauta tiriamuose mėginiuose (13,9 g/l– 37 kHz ir 12,8 g/l– 850 kHz) praėjus 80 min lyginant su kontroliniu mėginiu (11,4 g/L). Norint nustatyti optimalias fermentinės hidrolizės sąlygas, tirta skirtingų fermentų kiekių įtaka SHB susidarymui fermentinės hidrolizės metu (3.4 pav.).



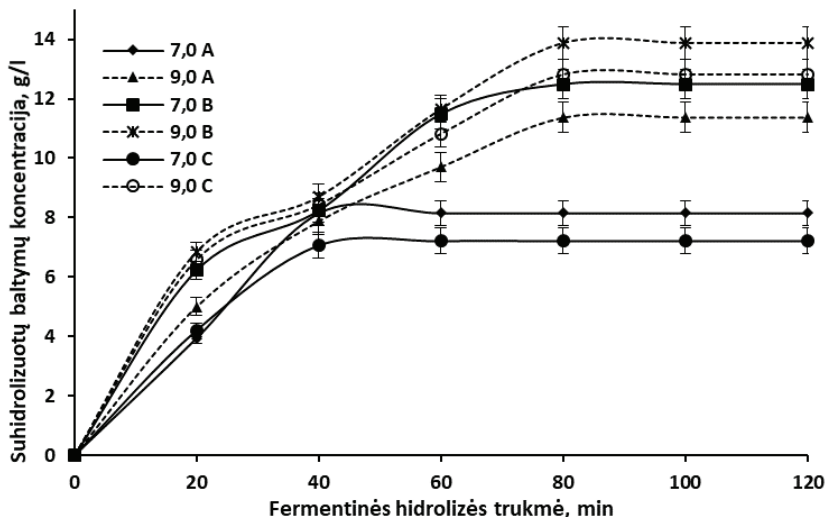
3.3 pav. Suhidrolizuotų baltymų koncentracija kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto mėginiuose, gautuose taikant: A – KKGŠP tradicinę hidrolizę; B – KKGŠP apdorojimą 37 kHz ultragarsu ir hidrolizę; C – KKGŠP apdorojimą 850 kHz ultragarsu ir hidrolizę, esant skirtingoms substrato koncentracijoms (21–210 g/l), kai fermento koncentracija yra pastovi ($E_0 = 1,05$ g/l), pH = 9,0, $T = 70$ °C.



3.4 pav. Suhidrolizuotų baltymų koncentracija kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto mėginiuose, gautuose taikant: A – KKGŠP tradicinę hidrolizę; B – KKGŠP apdorojimą 37 kHz ultragarsu ir hidrolizę; C – KKGŠP apdorojimą 850 kHz ultragarsu ir hidrolizę, esant skirtingoms fermento koncentracijoms (1,05–10,5 g/l), kai baltymų koncentracija yra pastovi ($C_0 = 210$ g/l), pH = 9,0, $T = 70$ °C

Vertinant tradicinės fermentinės hidrolizės metu gautus SHB rezultatus, nustatyta, kad maksimali SHB koncentracija buvo pasiekta po 80 min fermentacijos, naudojant 5 g/l fermentinio preparato koncentraciją. Žaliavos apdorojimas aukštojo dažnio ultragarsu (850 kHz) pagreitino hidrolizės procesą ir maksimali SHB koncentracija (15,8 g/l) buvo gauta po 60 min hidrolizės naudojant analogišką fermento kiekį (5 g/l). Gauti rezultatai rodo, jog pirminis žaliavos apdorojimas žemojo dažnio (37 kHz) ultragarsu reikšmingai padidino hidrolizės proceso intensyvumą. Nustatyta, kad taikant žemojo dažnio ultragarsinį KKGŠP apdorojimą (prieš fermentinę hidrolizę) gaunama didžiausia SHB koncentraciją (17,5 g/l), naudojant dvigubai mažesnę fermento kiekį (2,1 g/l), lyginant su tradicine hidrolize, per trumpiausią hidrolizės laiką (60 min).

Suhidrolizuotų baltymų koncentracijos, gautos taikant skirtingus terpės pH tradicinės KKGŠP fermentinės hidrolizės atveju ir tiriamiems mėginiams, apdorotiems skirtingo dažnio ultragarsu, pateikti 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Suhidrolizuotų baltymų koncentracija kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto mėginiuose, gautuose taikant: A – KKGŠP tradicinę hidrolizę; B – KKGŠP apdorojimą 37 kHz ultragarsu ir hidrolizę; C – KKGŠP apdorojimą 850 kHz ultragarsu ir hidrolizę, esant skirtingiems pH (7,0 ir 9,0), kai baltymų ir fermentų koncentracijos yra pastovios (atitinkamai, $C_0 = 210$ g/l ir $E_0 = 1,05$ g/l), $T = 70$ °C.

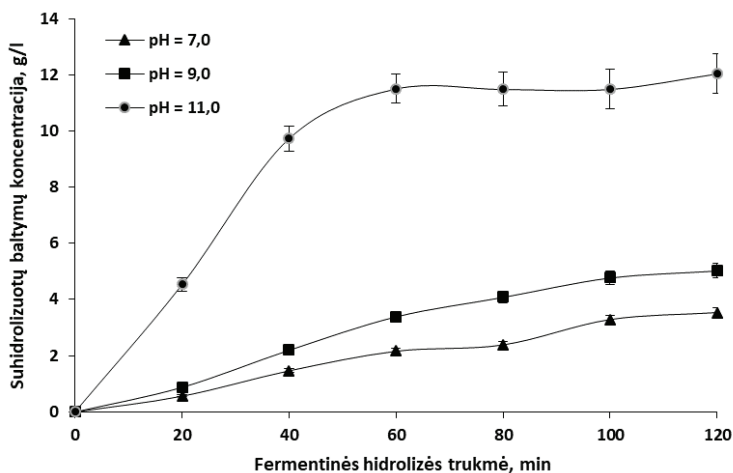
Nustatyta, kad didėjant terpės pH vertėms didėja SHB koncentracija tiek tradicinės hidrolizės metu, tiek ir ultragarsu apdorotų KKGŠP mėginių. Visais atvejais didžiausios SHB koncentracijos gautos kai terpės pH = 9,0, o ultragarsinis apdorojimas padidino galutinę SHB koncentraciją vidutiniškai 17,3 %. Vertinant žemojo dažnio (37 kHz) ultragarso poveikį fermentinės hidrolizės procesui su pH = 7,0 matomas SHB koncentracijos padidėjimas (vidutiniškai 53,1 %). Priešingai, sumažinus pH (pH = 7,0) ir taikant aukštojo dažnio (850 kHz) ultragarsinį

apdorojimą, teigiamos įtakos baltyminių medžiagų hidrolizei nenustatyta, galutinė SHB koncentracija tirtuose mėginiuose sumažėjo vidutiniškai 11,5 %.

Gauti šarminės KKGŠP hidrolizės rezultatai patvirtina, kad fermentinio preparato koncentracija ir fermentinės hidrolizės trukmė turi didžiausią įtaką baltymų hidrolizei ir apsprendžia šio proceso efektyvumą. Atliktas tyrimas įrodė, kad išankstinis kukurūzų biomasės apdorojimas žemojo dažnio (37 kHz) ultragarsu esant $5,1 \text{ W/cm}^2$ intensyvumui galėtų būti alternatyvus metodas tradicinės fermentinės hidrolizės efektyvumo didinimui, leidžiantis pasiekti didesnę hidrolizės efektą su mažesnėmis fermentų sąnaudomis.

Dauguma mokslinių tyrimų patvirtina, kad baltymų savybes galima pagerinti taikant ultragarsinį apdorojimą [182], taip pat galima padidinti fermentų aktyvumą [94, 183] bei pagerinti kitų substrato komponentų ekstraktyvumą [184]. Jin ir kt. [85] nustatė, kad išankstinis ultragarsinis apdorojimas reikšmingai pagerina kukurūzų baltymų fermentinę hidrolizę, ir ši technologija galėtų būti pritaikyta mažesnės molekulinės masės peptidų išgavimui baltymų proteolizės pramonėje.

Sojų išspaudos – kita potenciali žaliava baltyminių biostimuliatorių gamybai, nes jose po gėrimų gamybos lieka didelis kiekis baltymų (~28,2 %, žr. 3.1.2 skyrelį, 3.2 lentelę), kurie galėtų būti naudojami baltymų hidrolizatų gamyboje. Įvertinant tai, papildomai buvo tirta skirtingo dažnio ultragarso įtaka SI baltymų fermentinės hidrolizės procesui. Pradiniam etape buvo renkamos optimalios fermentinės hidrolizės sąlygos pagal suhidrolizuotų baltymų koncentracijos pokyčius esant skirtingiems terpės pH (pH = 7; 9 ir 11) (3.6 pav.).

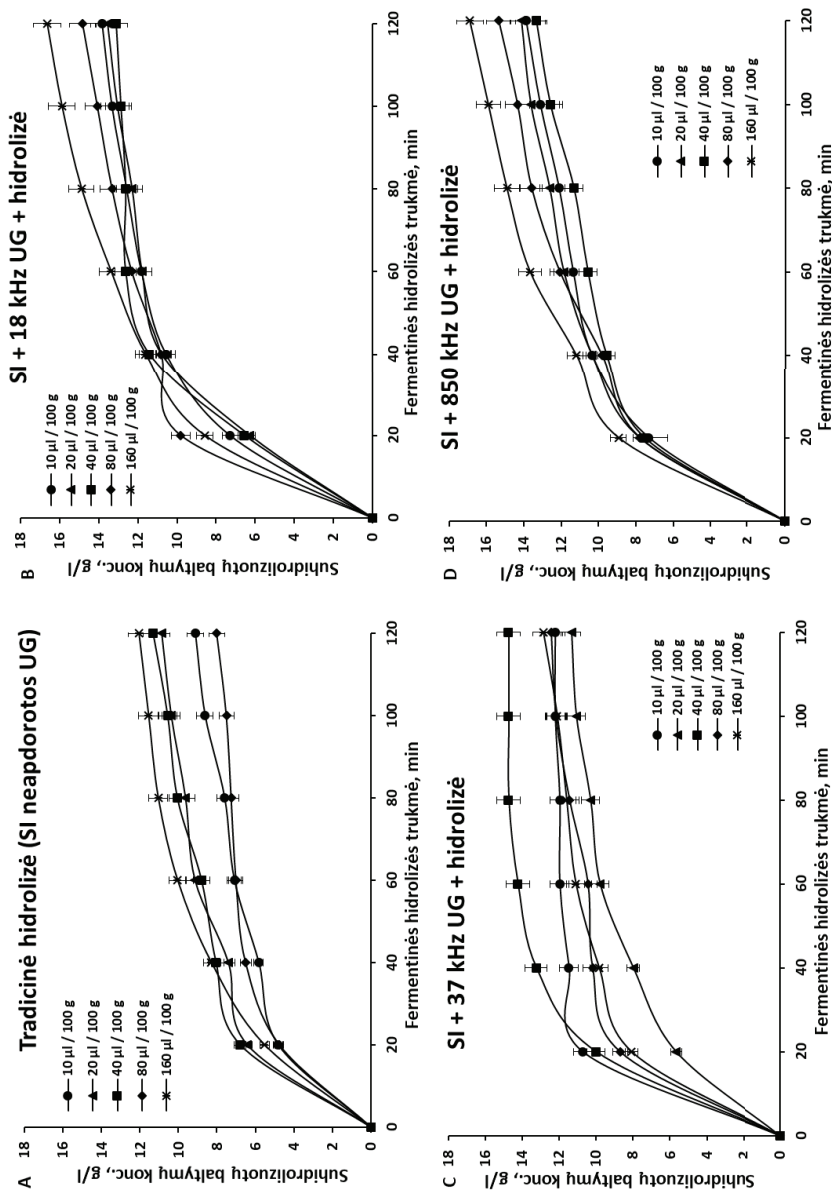


3.6 pav. Suhidrolizuotų baltymų koncentracija sojų išspaudų mėginiuose, gautuose taikant sojų išspaudų tradicinę fermentinę hidrolizę (be SI apdorojimo ultragarsu) esant skirtingiems pH (pH = 7,0; 9,0 ir 11,0), kai substrato ir fermento koncentracijos yra pastovios (atitinkamai, $C_0 = 3,0 \text{ g/l}$ ir $E_0 = 1,05 \text{ g/l}$), $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$

Nustatyta, kad terpės pH turi statistiškai reikšmingą įtaką sojų išspaudų baltymų fermentinės hidrolizės procesui ($p < 0,05$). Mažiausia suhidrolizuotų baltymų

koncentracija (3,53 g/l) buvo gauta po 120 min hidrolizės esant mažiausiam terpės pH (7,0), o didžiausia suhidrolizuotų baltymų koncentracija (12,05 g/l) nustatyta po 120 min trukmės fermentinės hidrolizės esant didžiausiam terpės pH (11,0). Gauti rezultatai leidžia teigti, kad SI baltymų hidrolizei tinkamiausia terpė yra pH = 11,0, todėl su šiuo pH toliau bus vertinama skirtingo dažnio ultragarso įtaka SI baltymų fermentinės hidrolizės procesui (3.7 pav.).

Kai fermentinė hidrolizė kombinuojama su pirminiu ultragarsiniu žaliavos apdorojimu, visais atvejais gaunama didesnė suhidrolizuotų baltymų koncentracija. Lyginant skirtingo dažnio ultragarsinio poveikio įtaką SI apdorojimui ir SHB susidarymui, gautos tokios tendencijos. Efektyviausias sojų išspaudų apdorojimas buvo taikant 37 kHz ultragarsą, kai didžiausia SHB koncentracija (14,74 g/l) nustatyta po 80 min hidrolizės naudojant 4 kartus mažiau fermento (40 µl/100 g) nei tradicinės fermentinės hidrolizės metu (160 µl/100 g) (be ultragarsinio SI apdorojimo). Po 120 min trukusios fermentinės hidrolizės suhidrolizuotų baltymų koncentracija padidėjo vidutiniškai 39,2 % nepriklausomai nuo taikyto ultragarso dažnio (18 kHz ar 850 kHz), naudojant tą pačią fermento koncentraciją (160 µl/100 g). Taigi, gauti rezultatai leidžia manyti, kad žemojo dažnio (37 kHz) ir didžiausio intensyvumo (5,1 W/cm²) SI ultragarsinis apdorojimas galėtų būti pritaikytas šių antrinių produktų funkcionalumo didinimui. Siekiant nuodugniau išsiaiškinti ultragarsinio apdorojimo įtaką SI baltymų skaidymui, 3.3.3 skyrelyje bus pateikti laisvųjų aminorūgščių kiekiai atrinktuose mėginiuose (3.6 lentelė).



3.7 pav. Suhidrolizuotų baltymų koncentracija sojų išspaudų mėginiuose, gautuose taikant: A – tradicinę hidrolizę; B – SI apdorojamą 18 kHz ultragarsu ir hidrolizę; C – SI apdorojamą 37 kHz ultragarsu ir hidrolizę; D – SI apdorojamą 850 kHz ultragarsu ir hidrolizę, esant skirtingoms fermento koncentracijoms (10–160 $\mu\text{l}/100\text{ g}$), kai substrato koncentracija yra pastovi ($C_0 = 3,0\text{ g}/100\text{ g}$), $\text{pH} = 11,0$, $T = 70\text{ }^\circ\text{C}$

3.3.2. Ultragarsio poveikis kinetiniams fermentinės hidrolizės parametrams

Šiame skyrelyje nagrinėjama ultragarsinio apdorojimo įtaka KKGŠP fermentinės hidrolizės procesui vertinant fermentinės hidrolizės kinetinius parametrus (hidrolizės greitis (v_0), Michaelis-Menten konstanta (K_M) ir ryšių nutraukimo konstanta (k_A), kurie nustatyti pagal 2.3.2 skyrelyje pateiktą metodiką. Šiame etape nagrinėtas KKGŠP fermentinės hidrolizės procesas esant skirtingoms substrato koncentracijoms (21–210 g/l), kai fermento koncentracija pastovi ($E_0 = 1,05$ g/l), terpės pH = 9,0, o fermentinės reakcijos vykdytos 70 °C temperatūroje 120 min. Tyrimo rezultatai, gauti taikant skirtingo dažnio ultragarsą substrato apdorojimui prieš fermentinę hidrolizę, pateikti 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Kinetiniai parametrai (v_0 , K_M , k_A) gauti taikant kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto tradicinę fermentinę hidrolizę ir fermentinę hidrolizę taikant kartu su išankstiniu mėginio apdorojimu skirtingo dažnio ultragarsu

Mėginiai	v_0 , (g/(l•min))	$K_M/(k_A E_0)$	$1/(k_A E_0)$	K_M , (g/l)	k_A , (1/min)
KKGŠP tradicinė fermentinė hidrolizė	$0,28 \pm 0,01^a$	$113,34 \pm 0,27^a$	$3,21 \pm 0,07^a$	$35,35 \pm 0,91^a$	$0,30 \pm 0,005^a$
KKGŠP + 37 kHz UG + hidrolizė	$0,37 \pm 0,01^b$	$57,63 \pm 0,23^c$	$2,45 \pm 0,03^b$	$23,50 \pm 0,40^c$	$0,39 \pm 0,002^b$
KKGŠP + 850 kHz UG + hidrolizė	$0,36 \pm 0,01^b$	$66,26 \pm 0,34^b$	$2,59 \pm 0,04^b$	$28,74 \pm 0,38^b$	$0,37 \pm 0,004^b$

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$; StN – standartinis nuokrypis; $a-d$ – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); v_0 – pradinis hidrolizės greitis; K_M – Michaelis-Menten konstanta; k_A – ryšių nutraukimo konstanta; E_0 – fermento koncentracija; UG – ultragarsas

Nustatyta, kad ultragarsinis apdorojimas pagreitina fermentinės hidrolizės procesą: ultragarsu apdorotų mėginių hidrolizės greitis (v_0) vidutiniškai padidėjo 36,2 %. Vertinant 37 kHz ultragarsinio apdorojimo įtaką KKGŠP fermentinės hidrolizės procesui, nustatytas reikšmingas Michaelis-Menten konstantos (K_M) sumažėjimas, vidutiniškai 33,5 %. Konstantos sumažėjimas rodo, kad ultragarsinis apdorojimas padidino fermento giminingumą substratui. Be to, lyginant žemojo dažnio ultragarsu paveiktą hidrolizę su tradicine fermentine hidrolize, buvo stebimas k_A vertės padidėjimas (~30 %). Lyginant aukštojo dažnio ultragarsu paveiktą hidrolizę su tradicine fermentine hidrolize (be ultragarsinio apdorojimo), buvo stebimas hidrolizės greičio (v_0) padidėjimas (vidutiniškai 34,8 %), Michaelis-Menten konstantos (K_M) sumažėjimas (vidutiniškai 20,4 %) ir k_A vertės padidėjimas (~23,3 %). Gauti rezultatai sutampa su Jin ir kt. [85] tyrimų rezultatais, pagal kuriuos

ultragarsinis apdorojimas, lyginant su tradicine hidrolize, reikšmingai pagerino KKGŠP fermentinę hidrolizę: K_M vertė sumažėjo 26,1 %, o k_A vertė padidėjo 7,3 %.

Kitame etape bus nagrinėjama KKGŠP ultragarsinio apdorojimo įtaka laisvųjų aminorūgščių pokyčiams, taip pat bus nustatytos aminorūgštys, galinčios turėti teigiamą poveikį baltymų hidrolizato biostimuliaciniam aktyvumui.

3.3.3. Ultragarso poveikis laisvųjų aminorūgščių susidarymui kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų baltymų hidrolizatuose

Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas (KKGŠP). Norint įvertinti gautų baltymų hidrolizatų kokybę, šiame etape vertinta laisvųjų aminorūgščių sudėtis KKGŠP baltymų hidrolizatuose (kuriuose buvo nustatytos didžiausios SHB koncentracijos, žr. 3.3.1 skyrelį, 3.4 pav.), gautuose tradicinės fermentinės hidrolizės būdu bei taikant fermentinę hidrolizę kartu su pirminiu KKGŠP apdorojimu žemojo dažnio (37 kHz, 5,1 W/cm²) ir aukštojo dažnio (850 kHz, 2,0 W/cm² intensyvumas) ultragarsu (3.5 lentelė). Apdoroti mėginiai lyginti su KKGŠP kontrole – be apdorojimo.

3.5 lentelė. Fermentinės hidrolizės, taikant kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu ultragarsu, įtaka KKGŠP laisvųjų aminorūgščių susidarymui

Laisvosios aminorūgštys, g/100 mL	KKGŠP kontrolinis mėginys	Tradicinė fermentinė hidrolizė	KKGŠP + 37 kHz UG + hidrolizė	KKGŠP + 850 kHz UG + hidrolizė
Asparto rūgštis	0,04 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,04 ^a	0,12 ± 0,06 ^a	0,11 ± 0,06 ^a
Glutamo rūgštis	0,11 ± 0,11 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,04 ^a	0,17 ± 0,03 ^a
Serinas	0,28 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,05 ^a	0,59 ± 0,12 ^b	0,55 ± 0,05 ^b
Histidinas	0,04 ± 0,05 ^a	0,03 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,07 ^a	0,04 ± 0,07 ^a
Glicinas	0,19 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,06 ^c	0,31 ± 0,01 ^b
Treoninas	0,25 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,05 ^a	0,51 ± 0,11 ^c	0,52 ± 0,05 ^b
Argininas	0,01 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,06 ^a	0,09 ± 0,09 ^a	0,09 ± 0,08 ^a
Alaninas	1,39 ± 0,02 ^a	1,84 ± 0,32 ^a	2,58 ± 0,60 ^c	2,41 ± 0,37 ^b
Tirozinas	0,02 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,05 ^a	0,09 ± 0,07 ^a	0,09 ± 0,07 ^a
Cisteinas	0,21 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,03 ^b	0,49 ± 0,04 ^c	0,50 ± 0,04 ^c
Valinas	0,34 ± 0,11 ^a	0,62 ± 0,02 ^b	0,89 ± 0,12 ^c	0,83 ± 0,04 ^c
Metioninas	0,32 ± 0,08 ^a	0,45 ± 0,05 ^a	0,62 ± 0,20 ^a	0,61 ± 0,14 ^a
Triptofanas	0,39 ± 0,06 ^a	0,68 ± 0,09 ^b	0,98 ± 0,17 ^c	0,95 ± 0,04 ^c
Fenilalaninas	0,27 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,20 ^a	0,67 ± 0,16 ^b	0,63 ± 0,10 ^b
Izoleucinas	0,91 ± 0,16 ^a	1,36 ± 0,20 ^a	1,96 ± 0,42 ^b	1,89 ± 0,22 ^b
Leucinas	0,03 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,06 ^a	0,10 ± 0,06 ^a
Lizinas	0,06 ± 0,08 ^a	0,12 ± 0,14 ^a	0,15 ± 0,22 ^a	0,15 ± 0,21 ^a
Prolinas	0,82 ± 0,60 ^a	1,99 ± 0,60 ^b	2,46 ± 0,63 ^c	2,23 ± 1,03 ^b
Iš viso:	5,67 ± 0,19 ^a	9,34 ± 1,21 ^a	12,87 ± 1,40 ^b	12,18 ± 2,32 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN*; *StN* – standartinis nuokrypis; *a-c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis vienoje eilutėje, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05), KKGŠP – kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto mėginys; UG – ultragarsinis apdorojimas

KKGŠP žaliavoje (be apdorojimo) dominuoja nepolinės laisvosios aminorūgštys: alaninas (1,39 g/100 ml), izoleucinas (0,91 g/100 ml), prolinas (0,82 g/100 ml), triptofanas (0,40 g/100 ml) ir fenilalaninas (0,27 g/100 ml). Taip pat rasta sieros turinčių laisvųjų aminorūgščių: metionino (0,32 g/100 ml) ir cisteino (0,21 g/100 ml). Gauti KKGŠP laisvųjų aminorūgščių sudėtis sutampa su literatūroje pateikta informacija [166, 185].

Taikant efektyviają skysčių chromatografiją (ESCh), gauti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$) analizuojant bendrą laisvųjų aminorūgščių kiekį, taip pat vertinant atskirų laisvųjų aminorūgščių kiekius. KKGŠP ultragarsinis apdorojimas padidino bendrą laisvųjų aminorūgščių kiekį ir, atlikus statistinę analizę, rasta stipri priklausomybė tarp bendro laisvųjų aminorūgščių kiekio ir suhidrolizuotų baltymų koncentracijos ($r = 0,943$). KKGŠP baltymų hidrolizate, gautame veikiant 37 kHz ultragarsu, nustatytas 2,3 karto didesnis bendras laisvųjų aminorūgščių kiekis nei kontroliniame mėginyje (KKGŠP), o štai baltymų hidrolizate, gautame veikiant 850 kHz ultragarsu, gautas 2,15 karto didesnis laisvųjų aminorūgščių kiekis. Mažiausias pokytis nustatytas baltymų hidrolizate, gautame tradicinės fermentinės hidrolizės būdu, t. y. be ultragarsinio apdorojimo, kuriame nustatytas 1,6 karto didesnis bendras laisvųjų aminorūgščių kiekis nei kontroliniame mėginyje (KKGŠP).

Lyginant apdorojimo (fermentinio ir ultragarsinio) įtaką atskirų laisvųjų aminorūgščių pokyčiams, pastebėtos tokios tendencijos. Taikant tradicinį fermentinį apdorojimą, nustatytas teigiamas poveikis Asp, Ser, Gly, Thr, Ala, Tyr, Cys, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu, Lys ir Pro koncentracijų padidėjimui. O štai ultragarsinis pradinės žaliavos apdorojimas (abiem atvejais) lėmė visų laisvųjų aminorūgščių kiekio padidėjimą. Veikiant žaliavą žemojo dažnio ultragarsu gauti Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr ir Val aminorūgščių kiekių reikšmingi padidėjimai, o vertinant aukštojo dažnio ultragarso apdorojimo įtaką nustatyti Cys ir Lys aminorūgščių kiekių reikšmingi padidėjimai. Šio eksperimento metu gauti rezultatai leidžia teigti, kad kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto (KKGŠP) apdorojimas ultragarsu kartu su fermentiniu apdorojimu sudaro palankias sąlygas laisvųjų aminorūgščių gamybai.

El-Saied su bendraautoriais [185] tyrinėjo aminorūgštis įvairių gamintojų (iš Rusijos, Prancūzijos, Didžiosios Britanijos, Italijos, Vokietijos ir Egipto) kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte. Remiantis jų pateiktais duomenimis nustatyta, kad KKGŠP baltymų sudėtyje dominuojanti laisvoji aminorūgštis yra Ala, taip pat rasti dideli kiekiai tokių aminorūgščių kaip Glu, Asp, Ser, Gly, Leu, Lys ir Val. Tik itališki ir vokiški KKGŠP mėginiai pasižymėjo mažesniais Phe, Met, Tyr, Pro ir Cys laisvųjų aminorūgščių kiekiais [185]. Kiti mokslininkai [186] patvirtino, kad ultragarsinis apdorojimas yra efektyvi priemonė norint padidinti laisvųjų aminorūgščių kiekį. Tačiau tyrimai atlikti su gyvūninės kilmės mėginiais, konstatuojant, kad žemojo dažnio (37 kHz, 160 W) ultragarsinis apdorojimas reikšmingai padidino Val, Leu, Ile, Thr ir Met laisvųjų aminorūgščių kiekius.

Papildomai buvo įvertinta ir sojų išspaudų hidrolizato, gauto taikant fermentinę hidrolizę kartu su išankstiniu mėginio apdorojimu 37 kHz ultragarsu (3.6 lentelė).

3.6 lentelė. Fermentinės hidrolizės, taikant kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu ultragarsu, įtaka SI laisvųjų aminorūgščių susidarymui

Laisvosios aminorūgštys, mg/100 g	Kontrolinis mėginys	Sojų išspaudų baltymų hidrolizatas
Asparto rūgštis	0,000 ^a	0,328 ± 0,016 ^b
Glutamo rūgštis	0,000 ^a	0,499 ± 0,025 ^b
Serinas	0,060 ± 0,003 ^a	0,558 ± 0,028 ^b
Histidinas	0,121 ± 0,006 ^a	0,000 ^a
Glicinas	0,079 ± 0,001 ^a	1,670 ± 0,084 ^b
Treoninas	0,000 ^a	0,033 ± 0,002 ^b
Argininas	0,232 ± 0,012 ^a	1,315 ± 0,066 ^b
Alaninas	0,046 ± 0,002 ^a	0,090 ± 0,005 ^b
Tirozinas	0,032 ± 0,002 ^a	0,082 ± 0,004 ^b
Valinas	0,027 ± 0,001 ^a	0,131 ± 0,007 ^b
Metioninas	0,000 ^a	0,114 ± 0,006 ^b
Fenilalaninas	0,031 ± 0,002 ^a	0,000 ^a
Leucinas	0,013 ± 0,001 ^a	0,000 ^a
Lizinas	0,049 ± 0,002 ^a	0,173 ± 0,009 ^b
Prolinas	0,363 ± 0,018 ^a	0,283 ± 0,014 ^a
Iš viso:	1,053 ± 0,011 ^a	5,276 ± 0,264 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$; StN – standartinis nuokrypis; $a-b$ – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis vienoje eilutėje, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

Gauti rezultatai rodo, kad žemojo dažnio (37 kHz) ultragarsu apdorotame SI mėginyje nustatytas 5 kartus didesnis laisvų aminorūgščių kiekis nei kontroliniame mėginyje.

3.4. Antimikrobinių bioproduktų gamyba taikant PRB fermentaciją kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu ultragarsu

Plečiant šalutinių produktų pritaikymo galimybes biostimuliatorių gamybai, o taip pat biostimuliatorių funkcionalumą, ieškoma sprendimų šalutinių produktų perdirbimui į antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius bioproduktus. Vienas iš aplinkai draugiškų metodų yra pienarūgštė fermentacija, plačiai taikoma maisto pramonėje.

3.4.1. Ultragarso taikymas sojų produktų PRB fermentacijos su *Lactobacillus paracasei* (LUHS 244) proceso efektyvumo didinimui¹¹

Ultragarsinio apdorojimo įtaka sojų produktų fermentacijos procesui

Šiame etape analizuota sojų produktų (maltų sojų pupelių ir sojų išspaudų) ultragarsinio apdorojimo (18) įtaka PRB (*Lactobacillus paracasei*) fermentacijos procesui, vertintam pagal PRB dauginimosi kreivę (matuojant optinį tankį), pH ir BTR pokyčius (3.7 lentelė). PRB dauginimuisi statistiškai reikšmingą ($p > 0,05$) įtaką turėjo fermentacijos terpė, t. y. naudotos maltos sojų pupelės ar sojų išspaudos. Didžiausias PRB prieaugis fiksuotas jau pradiniam etape (po pirmųjų 6 val. fermentacijos) maltų sojų pupelių mėginyje (69,3 %), lyginant su sojų išspaudų mėginiais (atitinkamai SI – 25,7 % ir SI UG – 38,5 %). Fermentacijos pabaigoje (po 30 val.) didžiausias PRB biomasės prieaugis (51,7 %) išliko fermentuotuose maltų sojų pupelių mėginiuose. Vertinant ultragarso įtaką fermentacijos procesui, užfiksuoti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$). Ultragarsinis sojų išspaudų apdorojimas (prieš fermentaciją) padidino 10,5 % PRB prieaugį fermentacijos pabaigoje sudarant palankesnes sąlygas metabolizmo produktų susidarymui.

Fermentacijos metu taip pat buvo tirti organinių rūgščių susidarymą charakterizuojantys parametrai (pH ir BTR). Rezultatai rodo, kad didžiausias pH vertės sumažėjimas (pH nuo 6,5 iki 4,4) po 30 valandų fermentacijos buvo gautas maltų sojų pupelių mėginiuose. Taikant ultragarsinį apdorojimą sojų išspaudų apdorojimui, pH vertė po 30 val. buvo gauta mažesnė (pH = 5,37) nei kontrolinio sojų išspaudų mėginio be ultragarsinio poveikio (pH = 5,47).

BTR tyrimų rezultatai patvirtina, kad intensyviausiai vyko maltų sojų pupelių PRB fermentacija lyginant su sojų išspaudomis. Didžiausias BTR pokytis buvo pastebėtas maltų sojų pupelių fermentacijos metu (nuo 1,3 °N iki 6,3 °N), o štai SI šio parametro pokytis buvo nuo 0,5 °N iki 1,3 °N. Vertinant ultragarso įtaką sojų išspaudų fermentacijai, proceso pabaigoje nustatytas beveik 2 kartus didesnis BTR (2,5 °N), lyginant su kontroliniu mėginiu.

PRB fermentacijos sojų produktų terpėse analizė patvirtino, kad fermentacijos terpės ir pradinis fermentacijos terpės apdorojimas ultragarsu turi reikšmingos įtakos PRB gyvybingumui. Mažesnis sojų išspaudų, lyginant su maltomis sojų pupelėmis, fermentacijos efektyvumas gali būti paaiškinamas jose esančiu didesniu netirpiųjų medžiagų kiekiu. Be to, ultragarsinio apdorojimo metu galima augalinės žaliavos debakterizacija ir reikšmingi pokyčiai baltyminėse albuminų ir globulinų medžiagose [187]. Tuo galima būtų paaiškinti teigiamą ultragarsinio sojų išspaudų apdorojimo poveikį *Lactobacillus paracasei* (LUHS 244) dauginimuisi ir organinių rūgščių susidarymui.

¹¹ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsiene, K., Navickaitė, B., Zadeikė, D., Bendoraitienė, J., Bartkienė, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

Šio eksperimento rezultatai rodo sojų išspaudų apdorojimo ultragarsu prieš PRB fermentaciją tikslingumą, jis taikytinas kuriant naujus fermentuotus produktus ir tobulinant bioproduktų gamybos technologiją. Gauti rezultatai patvirtina, kad PRB yra reiklios ir jų dauginimuisi reikalingos maistinės medžiagos, o sojų išspaudų apdorojimas ultragarsu gali padidinti tirpiųjų maistinių medžiagų kiekį fermentacijos terpėje. Šis tyrimas įrodė, kad taikant išankstinę žaliavos, šiuo atveju sojų išspaudų, apdorojimą ultragarsu galima intensyvuoti fermentacijos procesą ir organinių rūgščių susidarymą.

3.4.2. Augalinių gėrimų gamybos šalutinių produktų (permeatų) konversija į antimikrobinius bioproductus¹²

Biocheminiai pokyčiai permeatų PRB fermentacijos metu

Šiame skyriuje pateikti permeatų (gautų pagal 2.1.1 skyrelyje pateiktą aprašymą) PRB fermentacijos proceso vertinimo rezultatai, nustatant PRB augimo kinetiką, pH, BTR ir pieno rūgšties bei jos izomerų susidarymą (3.8 ir 3.9 lentelės). Pieno rūgšties bakterijų kinetikos permeatų fermentacijos metu rezultatai rodo, jog proceso intensyvumas priklauso nuo permeato rūšies, PRB padermės ir fermentacijos trukmės.

Fermentacijos metu (0–48 val.) visais atvejais buvo stebimas pH mažėjimas (3.8 lentelė). BTR tyrimų rezultatai patvirtina, kad intensyviausias organinių rūgščių susidarymas daugeliu atvejų vyksta nuo 12 iki 48 val. PRB fermentacijos. Didžiausias BTR pokytis buvo pastebėtas naudojant *P. acidilactici* (LUHS206). Fermentacijos metu (48 val.) naudojant šią padermę BTR padidėjimas nustatytas: ryžių permeate 4 kartus, o avižų – 2,9 karto.

Analizuojant pieno rūgšties (PR) susidarymo iš augalinių gėrimų išspaudų permeatų savitumus, stebima, kad PR kiekis fermentuotuose permeatuose taip pat priklausė tiek nuo permeato rūšies ir fermentacijos trukmės, tiek nuo naudojamos PRB padermės (3.9 lentelė). PR gamybai pageidautini mikroorganizmai, atsparūs rūgštinei terpei ir gebantys greitai fermentuoti pigias žaliavas bei sudaryti galimai didesnes reikiamo PR izomero koncentracijas?. Vykdyto eksperimento metu didžiausi PR kiekiai (2,48–3,24 g/l) nustatytas fermentacijos 24–36 valandą fermentacijai naudojant LUHS 236 (*P. acidilactici*) padermę. Pastebėta, kad pradinėje žaliavoje vyrauja D (–) pieno rūgšties izomeras, o fermentacijos metu ilgėjant trukmei stebimas L (–) pieno rūgšties koncentracijos didėjimas ir D (–) pieno rūgšties koncentracijos mažėjimas.

Literatūroje nurodyta, kad taikant PRB fermentaciją būtina atkreipti dėmesį į fermentacijos sąlygas, nes PRB padermės yra reiklios mitybinei terpei [188, 189]. Atlikti tyrimai ir gauti rezultatai leidžia teigti, kad PRB dauginimui ir pieno rūgšties susidarymui avižų ir ryžių permeatai, turintys didžiausią redukuojančiųjų sacharidų kiekį, yra tinkama terpė, fermentacijai naudojant PRB padermes, tokias kaip LUHS 173 ir LUHS 236.

¹² Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass in vivo. Food Bioscience. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

3.8 lentelė. PRB kiekio, pH ir BTR pokyčiai permeatų fermentacijos metu

Mėginiai	Fermentacijos trukmė								
	0 val.		24 val.		48 val.				
	pH	BTR, °N	PRB logKSV/ml	pH	BTR, °N	PRB, logKSV/ml	pH	BTR, °N	PRB logKSV/mL
RP _{LUHS 173}	4,15±0,06 ^{a,d}	0,3±0,01 ^{a,d}	7,91±0,11 ^{a,d}	3,60±0,06 ^{b,B}	0,45±0,01 ^{a,B}	8,47±0,22 ^{b,B}	3,28±0,01 ^{b,C}	0,60±0,0 ^{b,C}	8,58±0,25 ^{c,B}
RP _{LUHS 236}	3,89±0,02 ^{b,A}	0,3±0,01 ^{b,A}	7,71±0,23 ^{a,d}	3,59±0,02 ^{b,B}	0,50±0,01 ^{c,B}	8,44±0,19 ^{b,B}	3,35±0,01 ^{b,C}	0,50±0,01 ^{a,B}	8,27±0,20 ^{b,B}
RP _{LUHS 206}	3,90±0,08 ^{b,A}	0,3±0,01 ^{b,A}	7,91±0,29 ^{a,d}	3,28±0,08 ^{c,B}	0,95±0,07 ^{d,B}	8,30±0,20 ^{a,d}	2,92±0,01 ^{c,C}	1,20±0,01 ^{c,C}	8,05±0,10 ^{a,d}
AP _{LUHS 173}	4,20±0,01 ^{a,d}	0,4±0,01 ^{b,A}	7,91±0,18 ^{a,d}	3,63±0,01 ^{b,B}	0,50±0,01 ^{c,B}	8,41±0,22 ^{b,d,B}	3,34±0,02 ^{b,C}	0,60±0,01 ^{b,C}	8,53±0,24 ^{c,B}
AP _{LUHS 236}	3,90±0,01 ^{b,A}	0,4±0,02 ^{b,A}	8,10±0,20 ^{a,d}	3,59±0,01 ^{b,B}	0,40±0,01 ^{a,d}	8,21±0,19 ^{a,d}	3,34±0,01 ^{b,C}	0,55±0,01 ^{b,B}	7,97±0,20 ^{a,d}
AP _{LUHS 206}	4,01±0,03 ^{a,d}	0,4±0,01 ^{b,A}	8,10±0,21 ^{a,d}	3,25±0,03 ^{c,B}	0,90±0,01 ^{d,d,B}	8,15±0,14 ^{a,d}	2,94±0,04 ^{c,C}	1,15±0,3 ^{c,C}	8,28±0,22 ^{b,d}

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm S/N$ ($N = 3$); S/N – standartinis nuokrypis; RP – ryžių permeatas; AP – avižų permeatas. *a–d* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$), tiriant skirtingų LAB bakterijų padermių įtaką fermentacijos procesui; *A–D* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$), tiriant trukmės įtaką fermentacijos procesui. BTR – bendras titruojamasis rūgštingumas; PRB – pieno rūgšties bakterija; KSV – kolonijas sudarantys vienetai; RP_{LUHS 173}, ir AP_{LUHS 173} – su *L. brevis* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai; RP_{LUHS 236} ir AP_{LUHS 236} – su *P. acidilactici* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai; RP_{LUHS 206} ir AP_{LUHS 206} – su *L. farraginis* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai.

3.9 lentelė. Pieno rūgšties susidarymas permatų fermentacijos metu

Mėginiai	Pieno rūgšties koncentracija, g/l	Fermentacijos trukmė, val.				
		0	16	24	36	48
RP _{LUHS 173}	Bendras kiekis	0,36 ± 0,14 ^a	2,70 ± 0,06 ^c	2,99 ± 0,06 ^d	2,90 ± 0,08 ^d	2,27 ± 0,06 ^b
	L(+)	0,02 ± 0,006 ^a	0,82 ± 0,03 ^b	1,25 ± 0,11 ^c	1,77 ± 0,03 ^d	1,24 ± 0,01 ^c
	D(-)	0,34 ± 0,08 ^a	1,88 ± 0,01 ^c	1,74 ± 0,10 ^c	1,13 ± 0,06 ^b	1,03 ± 0,01 ^b
RP _{LUHS 236}	Bendras kiekis	0,36 ± 0,14 ^a	1,77 ± 0,06 ^b	2,00 ± 0,06 ^c	2,16 ± 0,13 ^d	1,66 ± 0,06 ^b
	L(+)	0,02 ± 0,006 ^a	0,80 ± 0,04 ^b	1,33 ± 0,12 ^c	1,31 ± 0,06 ^c	0,81 ± 0,03 ^b
	D(-)	0,32 ± 0,08 ^a	0,97 ± 0,03 ^b	0,65 ± 0,02 ^{ab}	0,85 ± 0,06 ^b	0,85 ± 0,02 ^b
RP _{LUHS 206}	Bendras kiekis	0,36 ± 0,14 ^a	1,61 ± 0,04 ^b	2,47 ± 0,06 ^d	1,92 ± 0,06 ^c	1,60 ± 0,02 ^b
	L(+)	0,02 ± 0,006 ^a	0,94 ± 0,02 ^b	1,52 ± 0,03 ^e	1,33 ± 0,06 ^d	1,22 ± 0,02 ^c
	D(-)	0,32 ± 0,08 ^a	0,67 ± 0,02 ^b	0,95 ± 0,02 ^c	0,59 ± 0,04 ^b	0,38 ± 0,01 ^a
AP _{LUHS 173}	Bendras kiekis	0,70 ± 0,04 ^a	1,92 ± 0,06 ^c	1,45 ± 0,03 ^b	2,48 ± 0,01 ^d	2,75 ± 0,06 ^e
	L(+)	0,06 ± 0,01 ^a	1,42 ± 0,04 ^{bc}	1,33 ± 0,04 ^b	1,49 ± 0,04 ^c	1,31 ± 0,07 ^b
	D(-)	0,64 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,05 ^b	0,12 ± 0,05 ^a	0,99 ± 0,11 ^c	1,44 ± 0,08 ^d
AP _{LUHS236}	Bendras kiekis	0,70 ± 0,04 ^a	1,39 ± 0,04 ^b	1,63 ± 0,02 ^c	3,24 ± 0,02 ^e	2,00 ± 0,14 ^d
	L(+)	0,06 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^b	0,92 ± 0,02 ^c	1,31 ± 0,01 ^e	1,24 ± 0,03 ^d
	D(-)	0,64 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,02 ^{ab}	0,71 ± 0,06 ^{ab}	1,93 ± 0,01 ^c	0,76 ± 0,05 ^b
AP _{LUHS 206}	Bendras kiekis	0,70 ± 0,04 ^a	1,24 ± 0,03 ^b	1,77 ± 0,16 ^c	1,84 ± 0,06 ^c	1,45 ± 0,11 ^b
	L(+)	0,06 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,04 ^c	0,96 ± 0,06 ^d	1,14 ± 0,06 ^c	0,57 ± 0,02 ^b
	D(-)	0,64 ± 0,02 ^b	0,43 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,04 ^c	0,70 ± 0,05 ^b	0,88 ± 0,03 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$ ($N = 3$); StN – standartinis nuokrypis; $a-e$ – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$), tiriant laiko trukmės įtaką pieno rūgšties gamybos procesui; RP_{LUHS 173} ir AP_{LUHS 173} – su *L. brevis* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai; RP_{LUHS 236} ir AP_{LUHS 236} – su *P. acidilactici* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai; RP_{LUHS 206} ir AP_{LUHS 206} – su *L. farraginis* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai.

Antigrybinio aktyvumo pokyčiai fermentuotuose permeatuose

Toliau buvo įvertintas atrinktų fermentuotų (24 val. ir 48 val.) permatų mėginių (RP_{LUHS 173}, AP_{LUHS 173} ir AP_{LUHS 206}) antigrybinis aktyvumas prieš indikatorinius *Fusarium* spp.: *F. graminearum* F ($5,5 \cdot 10^5$ sporų/ml), *F. graminearum* ($5,7 \cdot 10^5$ sporų/ml) ir *F. culmorum* ($2,95 \cdot 10^5$ sporų/ml) mikroskopinius grybus. Gauti PRB fermentuotų permatų antigrybinio aktyvumo rezultatai pateikti 3.10 lentelėje.

3.10 lentelė. PRB fermentuotų permatų antigrybinis aktyvumas prieš *Fusarium* spp.

Mėginiai	Inhibicijos zonos skersmuo, mm					
	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F</i>		<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
	24 val.	48 val.	24 val.	48 val.	24 val.	48 val.
RP _{LUHS 173}	12,50 ± 0,6 ^a	19,25 ± 1,5 ^e	12,00 ± 0,8 ^a	15,25 ± 1,3 ^c	12,50 ± 1,0 ^a	15,00 ± 0,8 ^c
AP _{LUHS 173}	13,75 ± 0,5 ^b	13,50 ± 0,6 ^b	13,75 ± 2,4 ^b	14,67 ± 0,6 ^b	13,50 ± 1,9 ^b	14,75 ± 0,5 ^b
AP _{LUHS 206}	17,00 ± 1,2 ^d	17,75 ± 0,5 ^d	16,00 ± 0,5 ^d	17,50 ± 0,6 ^d	16,75 ± 0,5 ^d	18,75 ± 0,5 ^e

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$ ($N = 3$); StN – standartinis nuokrypis; $a-e$ – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); RP_{LUHS 173} ir AP_{LUHS 173} – su *L. brevis* fermentuoti ryžių ir avižų permeatai; AP_{LUHS 206} – su *L. farraginis* fermentuotas avižų permeatas.

Fermentuotų permatų naudojant įvairias PRB (LUHS 173, LUHS 236 ir LUHS 206) mikrobiologinė analizė parodė, kad inhibavimo zonos skersmuo vidutiniškai kito atitinkamai nuo 12,00 mm iki 19,25 mm. Nustatyta, kad fermentacijos

terpė ir laikas turi reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) antigrybiniam fermentuotų mėginių aktyvumui. Avižų ir ryžių permeatų, fermentuotų 24 val., inhibavimo zonos skersmuo buvo 12,00–17,00 mm ribose. Prailginus fermentaciją iki 48 val., tiriamųjų mėginių antigrybinis aktyvumas padidėja vidutiniškai 14,6 %. Gauti rezultatai sutampa su literatūroje paskelbtais rezultatais, kad PRB pasižymi plačiu antimikrobinio spektru [138, 190]. Juodeikienė ir kt. [190] teigė, kad fermentuotų mėginių antigrybinis aktyvumas gali būti siejamas su PRB metabolizmo produktais, tokiais kaip pieno rūgštis, acto ir benzokarboksirūgštis, fenoliniais junginiais ir bakteriociniais.

Norint įvertinti galimų fermentacijos metabolitų įtaką mėginių antigrybiniam aktyvumui, tirtas ryšys tarp fermentuotų mėginių antigrybinio aktyvumo ir fermentacijos proceso pH, *BTR* ir bendro pieno rūgšties kiekio bei jos izomerų (L(+)) ir D(–)). Stipriausias ryšys aptiktas tarp antigrybinio aktyvumo ir pH bei *BTR* verčių (atitinkamai, $r = -0,85$ ir $r = 0,83$), o pieno rūgšties įtaka antigrybiniam aktyvumui buvo mažesnė ($r = -0,44$). Vertinant skirtingų pieno rūgšties izomerų įtaką antigrybiniam aktyvumui, nustatyta neigiama vidutinė koreliacija su L(+) izomeru ($r = -0,52$), o su D(–) izomeru reikšmingos koreliacijos nenustatyta.

Skirtingos izomerinės PRB formos (L(+) ir D(–)) suteikia skirtingas antigrybines savybes galutiniam fermentuotam produktui. Antigrybinis aktyvumas yra susijęs su rūgštingumo faktoriumi, taip pat su vyraujančiu L(+) izomeru fermentuotuose mėginiuose [188, 189]. Gauti rezultatai patvirtina PRB padermės parinkimo fermentacijai svarbą. Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad *L. brevis* ir *L. farraiginis* fermentuoti avižų ir ryžių permeatai, pasižymintys didžiausiu antigrybiniu aktyvumu, galėtų sulaukti praktinio pritaikymo. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad augalinių gėrimų permeatai, gaunami kaip atlieka augalinių gėrimų gamybos metu, galėtų būti pritaikyti bioproduktų, pasižyminčių antimikrobinio aktyvumu, gamybai pramoniniu būdu.

3.4.3. PRB fermentacijos ir jos metu susidariusių metabolitų įtaka *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų augimui kviečių biomasėje¹³

Pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas pieno rūgšties bakterijų, pasižyminčių antimikrobinio aktyvumu, taikymui *Fusarium* spp. užterštiems grūdams apdoroti ir saugai didinti. Siekiant įvertinti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių bioproduktų efektyvumą kaip alternatyvą fungicidams, šiame etape tirta PRB fermentacijos ir jos metu susidariusių metabolitų poveikis *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų augimui bei jų produkuojamų mikotoksinų pokyčiams parinktoje užterštoje kviečių biomasėje.

¹³ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikienė, G., Hajnal, E. J., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaitė, D., Cernauskas, D., Lele, V., Zadeike, D., Bartkienė, E. Challenges of *Lactobacillus* fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat - based products. *Food Control*. 2022, 134(108699). ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108699>

DON ir DON konjugatų pokyčiai *Fusarium* spp. užterštų kviečių biomasėje pienarūgštės fermentacijos metu

Kviečių mėginių kolekcijoje, gautoje iš Serbijos (2.1.1 skyrelis), efektyviosios skysčių chromatografijos, sujungtos su didelės skiriamosios gebos masių spektrometrija (ESCh) metodu nustatyti *Fusarium* spp. produkuojami mikotoksinai, t. y. deoksinivalenolis (DON) ir trys jo konjugatai (D3G, 3-ADON ir 15-ADON) (3.11 lentelė). Santykinai dideli skirtumai tiriamuosiuose mėginiuose buvo gauti tarp DON ir jo konjugatų koncentracijų. Kviečių mėginyje W6 su didžiausiu DON kiekiu (1330 µg/kg), D3G ir 15-ADON aptikta 6 kartus mažiau nei DON, o 3-ADON nustatyta mažiausia koncentracija (34 µg/kg). Daugumoje kviečių mėginių su mažesniu DON užterštumu DON konjugatų kiekiai taip pat buvo reikšmingai mažesni nei jų laisvosios DON formos.

3.11 lentelė. Mikotoksinų kiekiai, aptikti tiriamuosiuose kviečių mėginiuose (W1–W6) taikant ESCh.

Mėginiai	DON, µg/kg	D3G, µg/kg	3-ADON, µg/kg	15-ADON, µg/kg
W1	68,8 ± 3,4 ^a	20,4 ± 1,0 ^a	18,0 ± 0,9 ^c	189,0 ± 9,5 ^d
W2	504,0 ± 25,2 ^c	151,0 ± 7,6 ^c	14,9 ± 0,8 ^b	89,5 ± 4,5 ^{ab}
W3	314,0 ± 15,7 ^b	58,1 ± 2,9 ^b	11,0 ± 0,6 ^a	108,0 ± 5,4 ^b
W4	786,0 ± 39,3 ^d	159,0 ± 8,0 ^c	23,8 ± 1,2 ^d	81,6 ± 4,1 ^a
W5	453,0 ± 22,7 ^c	72,3 ± 3,6 ^b	21,0 ± 1,1 ^d	148,0 ± 7,4 ^c
W6	1330,0 ± 66,5 ^e	222,0 ± 11,1 ^d	34,0 ± 1,7 ^e	178,0 ± 8,9 ^d

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; W1–W6 – kviečių mėginiai; DON – deoksinivalenolis; D3G – deoksinivalenol-3-glukozidas; 3-ADON – 3-acetildeoksinivalenolis ir 15-ADON – 15-acetildeoksinivalenolis. Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± *StN* (*N* = 3); *a-e* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05). Mikotoksinų aptikimo limitai: DON (LOD 4 µg/kg, LOQ 12 µg/kg), D3G (LOD 4,5 µg/kg, LOQ 13 µg/kg), 3-ADON (LOD 3,6 µg/kg, LOQ 11 µg/kg) ir 15-ADON (LOD 14 µg/kg, LOQ 42 µg/kg).

Kviečių grūduose mikotoksinų kaupimuisi didelę įtaką daro aplinkos veiksniai, atsirandantys lauke, ir galimas jų poveikis nuo derliaus nuėmimo iki grūdų perdirbimo [191, 192], todėl turėtų būti svarstomi ne tik sėklų apdorojimo mikrobinėmis priemonėmis būdai, bet ir prevencijos priemonės DON ir jo konjugatų formų aptikimui galimai ankstyvesnėse grūdų perdirbimo stadijose [62, 193].

Gauti eksperimento rezultatai patvirtina, kad kviečių grūduose DON konjugatai yra aptinkami kartu su jo laisvąja forma. DON yra pirminis mikotoksinas, susidarantis augaluose, užkrėstuose *Fusarium* spp. grybais, o maskuoti toksinai yra DON metabolitai [59]. Labiausiai ištirtas DON maskuotasis toksinas yra D3G – kuris yra II fazės DON metabolitas ir mažiau toksiškas nei pirminė DON forma. Tačiau patekęs į žmogaus virškinamąjį traktą, paveiktas storosios žarnos mikrobiotos, šis maskuotasis mikotoksinas gali būti konvertuotas į pirminį toksiną DON [194]. Todėl reikia atsižvelgti į D3G/DON santykį, nes D3G gali būti konvertuotas atgal į DON ir taip padidintas jo toksiškumas [64]. Mūsų analizuotuose mėginiuose D3G/DON santykis kito nuo 17 % iki 30 %. Gauti rezultatai sutampa su kitų autorių darbais, kurie parodė,

kad kviečiuose randami D3G kiekiai sudaro 20–70 % laisvojo DON kiekio [49]. Keletas kitų tyrėjų parodė, kad grūduose ir grūdų produktuose rasti D3G kiekiai sudarė pusę aptinkamo DON kiekio. Maskuotasis toksinas D3G dažnai yra randamas kartu su pirminiu toksinu DON pasėliuose, grūdų produktuose, kurių koncentracija kinta nuo 2 iki 1700 µg/kg [62–65, 194–201]. Kiti autoriai nustatė, kad D3G/DON santykis grūduose siekė 20 % ir net viršijo po apdorojimo 100 % [62, 195, 202].

Tiriamuosiuose kviečių mėginiuose (W1–W6) D3G/DON santykis kito pagal DON užterštumo lygį. Rezultatai rodo, kad kviečių mėginiuose (W1–W5), kurių DON užterštumo lygis mažesnis (68,8–786 µg/kg), D3G/DON santykis buvo didesnis (vidutiniškai 22,7 %), o mėginys su didžiausiu DON kiekiu (1330 µg/kg) pasižymėjo mažesniu D3G/DON santykiu (vidutiniškai 16,7 %). Gauti rezultatai sutampa su Lemmens ir kt. [203], kur nustatyta, kad mikotoksino D3G kiekis yra susijęs su mėginių užterštumu pirminiu mikotoksiniu DON, o mėginiuose su mažiausiu DON kiekiu randami didžiausi D3G kiekiai. Kadangi minėtas maskuotasis toksinas yra pavojingas tiek žmonių, tiek gyvūnų sveikatai, būtina atsižvelgti į mėginių užterštumo D3G mikotoksiniu lygį, nes nenustačius jo gali kilti pavojus maisto ir pašarų saugai. Tai ypač susiję su produktais, kurie užteršti mažesniais DON kiekiais, arba esant DON kiekiams, artimiems maksimaliai leistinai normai, kurią nustatė Europos Komisija (200–1750 µg/kg) [50]. Visi tirti mėginiai (W1–W6) atitiko nurodytas normas.

Atskirose šalyse, taip pat ir pasauliniu mastu, yra sukauptas ribotas kiekis duomenų apie maskuotuosius mikotoksinus, todėl rizikos įvertinimas iki šiol neįmanomas, o DON konjugatų tyrimai išlieka aktualūs.

PRB fermentacijos įtaka DON ir DON konjugatų pokyčiams

Mikrobinės taršos grūduose poveikis PRB augimui ir pH pokyčiai, esant skirtingiems fermentacijos terpės užterštumo lygiams, yra esminiai bioapdorojimo mechanizmo aspektai.

Šiame etape vertintas skirtingų PRB padermių gyvybingų ląstelių skaičius ir pH pokyčiai *Fusarium* spp. mikotoksinais užkrėstų kviečių grūdų terpėje (3.12 lentelė). Mikrobiologinė fermentuotų mėginių analizė parodė, kad žaliavos užterštumo DON ir maskuotaisiais toksinais lygis turi įtakos PRB fermentacijos procesui. Didelis PRB skaičiaus sumažėjimas nuo 8,50 iki 7,61 log KSV/g buvo fiksuojamas *L. casei* fermentuotuose mėginiuose keičiantis terpės užterštumui nuo mažo DON kiekio (DON > 69 µg/kg) iki didelio DON užterštumo (1330 µg/kg). *L. plantarum* ir *L. paracasei* fermentacijos metu neparodė reikšmingo atsako į terpės užterštumą. Mažiausias jautrumas terpės užterštumui buvo nustatytas *L. uvarum* fermentuotuose mėginiuose, kuriuose PRB bakterijos dauginosi nepriklausomai nuo terpės užterštumo ir po 24 val. fermentacijos buvo fiksuotas PRB skaičius padidėjimas nuo 8,77 (68,8 µg/kg DON) iki 9,99 (1330 µg/kg DON).

3.12 lentelė. pH ir PRB gyvybingų ląstelių skaičiaus pokyčiai po 24 val. fermentacijos skirtingo užterštumo (DON 68,8–1330 µg/kg) kviečių mėginiuose

Mėginiai		pH	PRB, log KSV/g	MMG, log KSV/g
Kontroliniai	W1	5,99 ± 0,08 ^a	6,50 ± 0,20 ^a	2,48 ± 0,03 ^a
	W2	6,04 ± 0,06 ^a	6,02 ± 0,15 ^a	2,70 ± 0,12 ^a
	W3	5,93 ± 0,10 ^a	6,77 ± 0,10 ^a	2,30 ± 0,09 ^a
	W4	6,00 ± 0,09 ^a	6,64 ± 0,15 ^a	2,00 ± 0,10 ^a
	W5	6,02 ± 0,07 ^a	5,37 ± 0,09 ^b	2,00 ± 0,10 ^a
	W6	6,01 ± 0,08 ^a	5,36 ± 0,10 ^b	3,08 ± 0,15 ^b
<i>L. casei</i>	W1	3,47 ± 0,13 ^c	8,50 ± 0,05 ^b	4,69 ± 0,08 ^c
	W2	4,01 ± 0,09 ^b	8,05 ± 0,03 ^b	5,89 ± 0,05 ^d
	W3	3,71 ± 0,10 ^b	8,02 ± 0,09 ^b	5,36 ± 0,10 ^d
	W4	3,91 ± 0,11 ^b	7,68 ± 0,07 ^a	6,02 ± 0,11 ^e
	W5	3,57 ± 0,04 ^c	7,73 ± 0,10 ^a	5,65 ± 0,09 ^d
	W6	3,63 ± 0,10 ^b	7,61 ± 0,08 ^a	6,34 ± 0,07 ^e
<i>L. plantarum</i>	W1	3,41 ± 0,16 ^c	8,75 ± 0,15 ^c	4,39 ± 0,10 ^c
	W2	3,38 ± 0,01 ^c	9,02 ± 0,12 ^c	4,12 ± 0,11 ^c
	W3	3,37 ± 0,13 ^c	8,92 ± 0,09 ^c	4,63 ± 0,09 ^c
	W4	3,48 ± 0,12 ^c	8,83 ± 0,11 ^c	4,48 ± 0,10 ^c
	W5	3,50 ± 0,07 ^c	8,24 ± 0,13 ^b	5,16 ± 0,11 ^d
	W6	3,49 ± 0,09 ^c	9,17 ± 0,10 ^c	4,23 ± 0,10 ^c
<i>L. paracasei</i>	W1	3,44 ± 0,12 ^c	8,40 ± 0,15 ^b	4,46 ± 0,12 ^c
	W2	3,46 ± 0,09 ^c	8,65 ± 0,09 ^b	5,38 ± 0,10 ^d
	W3	3,43 ± 0,11 ^c	8,34 ± 0,10 ^b	5,34 ± 0,09 ^d
	W4	3,57 ± 0,04 ^c	8,77 ± 0,19 ^c	5,98 ± 0,10 ^d
	W5	3,38 ± 0,08 ^c	8,50 ± 0,20 ^b	4,87 ± 0,07 ^c
	W6	3,50 ± 0,10 ^c	8,80 ± 0,11 ^c	5,12 ± 0,11 ^d
<i>L. uvarum</i>	W1	3,38 ± 0,15 ^c	8,77 ± 0,03 ^c	4,16 ± 0,09 ^c
	W2	3,24 ± 0,09 ^c	9,70 ± 0,10 ^d	3,99 ± 0,05 ^b
	W3	3,25 ± 0,08 ^c	9,97 ± 0,09 ^d	4,06 ± 0,07 ^c
	W4	3,41 ± 0,10 ^c	9,32 ± 0,11 ^c	3,97 ± 0,08 ^b
	W5	3,27 ± 0,12 ^c	8,75 ± 0,13 ^c	4,57 ± 0,10 ^c
	W6	3,45 ± 0,06 ^c	9,99 ± 0,08 ^d	3,23 ± 0,08 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; *a–e* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05). Kontroliniai mėginiai – pradiniai kviečių mėginiai (prieš fermentaciją); PRB – pieno rūgšties bakterijų skaičius; MMG – mielių ir mikroskopinių grybų skaičius; KSV – kolonijas sudarantys vienetai.

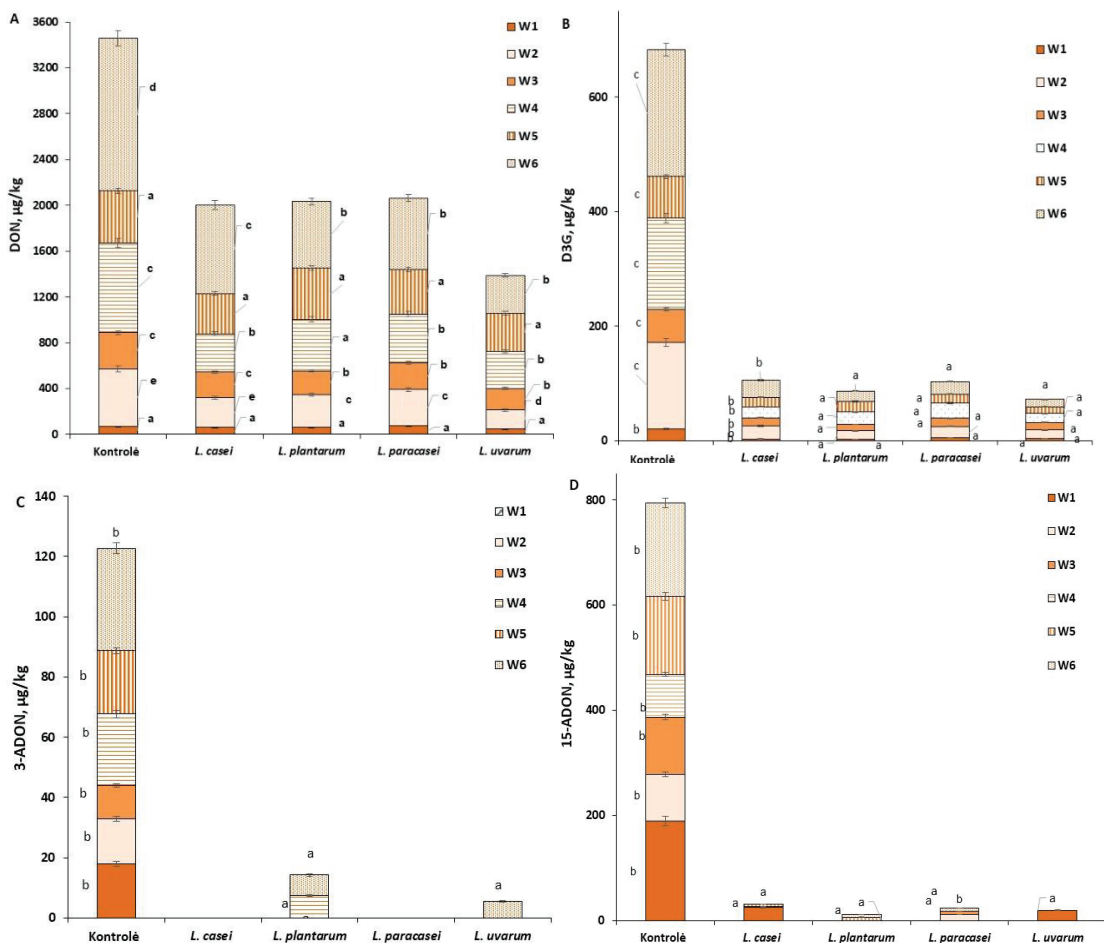
Šiame tyrime nustatyti PRB kiekiai fermentuotuose mėginiuose sutampa su kitų autorių publikuotais duomenimis [204, 205]. Lėtesnis PRB augimas mikotoksinais užterštoje terpėje gali turėti neigiamą įtaką metabolizmo produktų, įskaitant organines rūgštis, susidarymui. Tačiau dauguma *Lactobacillus* bakterijų, tokios kaip *L. uvarum*, *L. plantarum* ir *L. paracasei*, nebuvo jautrios terpės užterštumui ir išliko gyvybingos net didelio užterštumo mėginiuose, o fermentacijos metu pagrindiniai metabolizmo produktai – organinės rūgštys – sumažino terpės pH iki 3,5, nors pradinėje fermentacijos stadijoje pH neviršijo vidutinių 6,0 verčių (3.12 lentelė).

Antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios PRB, kaip pradinės kultūros ir kaip dalis natūralios mikroorganizmų populiacijos, naudojamos fermentacijos procesuose maisto / pašarų pramonėje. Viena iš labiausiai pageidaujamų PRB savybių yra greita

organinių rūgščių gamyba [206, 207]. PRB antimikrobinis aktyvumas yra siejamas su žemu pH ir organinių rūgščių (tokių kaip pieno, acto) susidarymu. PRB gaminami metabolitai priklauso nuo terpės pH [204].

Pastarųjų dešimtmečių tyrimai parodė, kad organinės rūgštys arba organinių rūgščių dariniai turi sinergistinį poveikį su baltyminiais junginiais [208]. Anot Li ir kt. [209], *Lactobacillus casei* AST18 antigrybinis aktyvumas siejamas su pieno rūgšties ir ciklopeptidų sinergistiniu poveikiu, paaiškinantis šios PRB padermės platų antimikrobinio aktyvumo spektrą prieš grybus ir mieles, būdingas maiste ir pašaruose.

Vykdyto eksperimento metu tirta PRB fermentacijos proceso įtaka DON ir jo konjugatų (D3G, 3-ADON ir 15-ADON) pokyčiams, naudojant įvairias antimikrobinio aktyvumu pasižyminčias PRB padermes ir skirtingo užterštumo kviečių grūdų mėginius (3.8 paveikslas).



3.8 pav. Fermentacijos, naudojant skirtingas PRB padermes (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ir *L. uvarum*), įtaka mikotoksinų pokyčiams skirtingo užterštumo kviečių mėginiuose (W1–W6)

Kiekybinės mikotoksinų analizės rezultatai rodo, kad biotransformacijos laipsnis (apibūdinamas kaip vidutinis DON kiekis) fermentuotuose mėginiuose gali pasiekti 50 % lyginant su kontroliniais mėginiais (3.8 pav. A). Taikant pienarūgštę fermentaciją, DON koncentracija didžiausio užterštumo kviečių grūduose (1330 µg/kg) sumažėjo vidutiniškai 56,7 % lyginant su biologiškai apdorotais mažiau užterštais kviečių mėginiais (DON < 800 µg/kg). Gauti rezultatai rodo, kad naudojant fermentacijai *L. uvarum* galima pasiekti reikšmingą DON sumažėjimą ($p < 0,05$), atitinkamai 4,0; 2,4; 3,0 ir 1,65 karto skirtingo užterštumo kviečių mėginiuose (DON = 1330; 786; 504 ir 314 µg/kg). Didžiausio užterštumo kviečių mėginių (DON = 1330 µg/kg) *L. casei*, *L. plantarum* ir *L. paracasei* fermentacija leidžia sumažinti DON kiekį fermentuotuose mėginiuose atitinkami 42,0; 56,6 ir 53,1 %, lyginant su kontroliniais neapdorotais kviečių mėginiais.

Kiekybinė maskuotų trichotecenų analizė parodė reikšmingą D3G, 3-ADON ir 15-ADON sumažėjimą fermentuotuose kviečių mėginiuose ($p < 0,05$). DON konjugato D3G kiekis fermentuotuose mėginiuose, lyginant su kontroliniais mėginiais, sumažėjo vidutiniškai 84,1 % (3.8 pav. B). Pažymėtina, kad kiti DON konjugatai, tokie kaip 3-ADON ir 15-ADON po *L. uvarum*, *L. casei* ir *L. paracasei* fermentacijos nebuvo aptikti tirtuose kviečių mėginiuose (3.8 pav. C ir D).

Taigi, daugumos PRB padermių fermentacija sumažino kelių maskuotų toksinų kiekius užterštuose kviečių mėginiuose. Tačiau lyginant tarpusavyje skirtingas PRB padermes pagal nustatytą mikotoksinų kiekio sumažėjimą, matomi reikšmingi skirtumai. Pasak Muhialdin ir kt. [69], PRB detoksifikacijos lygis priklauso nuo PRB ląstelių gyvybingumo užterštoje terpėje, taip pat nuo terpės pH. Šiame tyrime naudotos PRB pasižymėjo savitomis biocheminėmis savybėmis įskaitant skirtingu atsaku į fermentacijos terpės užterštumą.

Gauti mikotoksinų tyrimų rezultatai PRB fermentacijos metu sutampa su kitų tyrėjų paskelbtais duomenimis, pagal kuriuos konstatuotas dvidešimt devynių PRB padermių, įskaitant *L. rhamnosus* GG, savybę mažinti mikotoksinų kiekį (pvz., DON ir fumonizinus B1 ir B2) rūgščioje terpėje. DON kiekio sumažėjimas (iki 55 %) buvo pasiektas naudojant *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ir *L. rhamnosus* GG (~ 54 %) [210]. Trichotecenų, tokių kaip DON, 3-ADON, nivalenolis (NIV), diacetoksicirpenolis (DAS), fuzarenonas (FX), T-2 toksinas ir HT-2 toksinas, mažinimo galimybes analizavo El-Nezami ir kt. [211]. Gauti rezultatai patvirtino, kad *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC-705 ir *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* JS skystojoje terpėje gebėjo surišti septynis trichotecenus. Pasak autorių, PRB efektyvumas mažinti trichotecenus (20 µg/kg) reikšmingai skyrėsi pagal detoksifikacijai naudojamą PRB padermę, taip pat ir pagal toksinų tipą. Veiksmingiausia PRB padermė parodė gebėjimą surišti keturis iš septynių tirtų mikotoksinų, o detoksifikacijos metu skilimo produktai nebuvo aptikti. Surištų toksinų kiekiai kito nuo 18 % iki 93 %, tačiau nė viena iš tirtų PRB padermių nesugebėjo surišti 3-ADON (DON konjugato) [211]. Šio tyrimo metu patvirtintas pieno rūgšties bakterijos *L. uvarum* gebėjimas reikšmingai ($p < 0,05$) sumažinti DON ir maskuotų toksinų kiekius skirtingo užterštumo kviečių mėginiuose.

Literatūroje aprašomi keli mechanizmai, kuriais gali būti paaiškinamas biologinis mikotoksinų kiekio sumažėjimas fermentacijos terpėje taikant pienarūgštę fermentaciją. Pagal vieną iš jų terpėje esančios gyvybingos PRB ląstelės gali absorbuoti mikotoksinus arba gali vykti mikotoksinų skaidymas, sąlygotas fermentų, kiti virsmai siejami su fermentacijos metu vykstančiu metabolitų susidarymu [69, 212].

PRB fermentacijos metu vykstantis mikotoksinų detoksikacijos mechanizmas siejamas su daugiausiai ištirta ir literatūroje aprašyta mikroorganizmų absorbcija. Nagrinėjant sąveikas, galimas tarp mikotoksinų ir PRB, tikėtina, kad šiame procese dalyvauja bakterijų membranų komponentai angliavandeniai [213] ir specifiniai baltymai (S-sluoksniu) baltymai [214]. O štai fermentų, dalyvaujančių mikotoksinų degradacijos mechanizmuose, veikla yra ištirta mažiau. Todėl šiame eksperimente keliami hipotezė, kad *Fusarium* spp. fermentai užterštų kviečių mėginiuose gali suaktyvėti keičiantis PRB fermentacijos sąlygoms ir galimas jų dalyvavimas mikotoksinų detoksikacijos procese.

Biocheminiai pokyčiai PRB fermentacijos metu ir jų ryšys su DON bei DON konjugatais

Šiame eksperimento etape vertinti fermentinių aktyvumų profiliai *Fusarium* spp. užterštuose kviečių mėginiuose (3.13 lentelė) ir analizuojamas jų ryšys su mikotoksinų koncentracijomis.

3.13 lentelė. Fermentinių aktyvumų profiliai pradinuose *Fusarium* spp. užterštuose kviečių mėginiuose

Mėginiai	Amilolitinis aktyvumas, AV/g	Ksilanolitinis aktyvumas, AV/g	Proteolitinis aktyvumas, AV/g
W1	203,25 ± 4 ^a	98,30 ± 3 ^a	142,14 ± 11 ^a
W2	408,40 ± 11 ^b	135,53 ± 4 ^a	179,67 ± 6 ^b
W3	315,87 ± 6 ^a	109,81 ± 6 ^a	187,95 ± 5 ^b
W4	411,14 ± 12 ^b	141,65 ± 3 ^a	183,87 ± 6 ^b
W5	333,95 ± 16 ^a	110,53 ± 6 ^a	189,08 ± 3 ^b
W6	478,84 ± 11 ^c	157,34 ± 1 ^b	186,34 ± 2 ^b

W1–W6 kviečių mėginiai; nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; *a–c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05).

Gauti rezultatai rodo, kad didėjant DON ir D3G koncentracijoms kviečių mėginiuose taip pat didėja amilazių aktyvumas, rodantis labai stiprų ryšį¹⁴ tarp šių mikotoksinų ir amilazinio kviečių mėginių aktyvumo (atitinkamai *r* = 0,91, *r* = 0,97). Amilazių aktyvumas padidėjo vidutiniškai 20 % didėjant 3-ADON koncentracijoms tiriamuosiuose kviečių mėginiuose ir buvo gauta stipri koreliacija tarp analizuojamų parametrų (*r* = 0,60). Statistiškai reikšmingų pokyčių nebuvo pastebėta tarp 15-ADON koncentracijų ir amilazinio tiriamųjų mėginių aktyvumo (*r* = 0,34).

¹⁴Korelacių stiprumas vertintas pagal Evans ir kt. (1996) rekomenduojamą skalę.

Evans, J. D. (1996). Straightforward statistics for the behavioural sciences. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing.

Analizuojant ksilanolitinio fermentinio aktyvumo pokyčius buvo nustatyta ta pati tendencija: didėjant mikotoksinų koncentracijoms tiriamuosiuose mėginiuose, didėja ksilanolitinis fermentinis aktyvumas. Buvo nustatytas labai stiprus teigiamas ryšys tarp DON ir D3G mikotoksinų koncentracijų kviečių mėginiuose ir ksilanolitinio fermentinio aktyvumo (atitinkamai $r = 0,93$; $r = 0,997$). Taip pat gautas stiprus ryšys tarp maskuoto toksino 3-ADON ir ksilanolitinio fermentinio aktyvumo ($r = 0,70$). Tarp 15-ADON maskuoto toksino ir ksilanazinio fermentinio aktyvumo reikšmingo ryšio nebuvo rasta ($r = 0,22$).

Proteolitinio aktyvumo padidėjimas taip pat buvo stebimas didėjant mikotoksinų koncentracijoms tiriamuosiuose kviečių mėginiuose. Mėginiai su didžiausiu DON ir D3G kiekiu pasižymėjo didžiausiu proteolitiniu aktyvumu ir nustatytas stiprus ryšys tarp šių mikotoksinų (DON bei D3G) ir proteolitinio aktyvumo (atitinkamai $r = 0,63$; $r = 0,66$).

Visais atvejais mėginiai su didžiausiomis DON ir D3G koncentracijomis pasižymėjo didžiausiais fermentiniais aktyvumais. Atlikto eksperimento rezultatai rodo, kad *Fusarium* spp. užkrėsta žaliava pasižymi įvairiais fermentiniais aktyvumais (amilaziniu, proteaziniu ir ksilanaziniu), kurie priklauso nuo *Fusarium* spp. taršos grūdinėje žaliavoje lygio.

Taigi, mikroskopiniai grybai, produkuojantys DON ir D3G, išsiskiria didžiausiu amilaziniu ir ksilanaziniu aktyvumu. Tarp tirtų mikotoksinų ir proteolitinio aktyvumo nustatytas silpnesnis ryšys nei tarp kitų fermentinių aktyvumų (amilazių ir ksilanazių). Sprendžiant iš gautų tyrimų rezultatų, galima daryti prielaidą, jog kai kurie aktyvūs grybų fermentai gali būti siejami su mikotoksinų degradacijos mechanizmu ir jie gali būti atsakingi už DON bei jo konjugatų skaidymą. Remiantis literatūroje pateiktais duomenimis, mikroskopiniai grybai yra vienas iš fermentų šaltinių, kurie gali konvertuoti mikotoksinius į mažiau toksiškus arba visai netoksiškus junginius ir gali būti pritaikyti žemės ūkio sektoriuje ar pašarų gamyboje, siekiant padidinti produktų saugą [215].

Šio eksperimento metu gauti rezultatai taip pat išryškino PRB padermių fermentacijos savitumus ir galimą mikroorganizmų sąsają su mikotoksinų detoksikacija. Didžiausias detoksifikacijos efektas buvo pasiektas vykdant fermentaciją su *L. uvarum*, kuri buvo mažiausiai jautri terpės užterštumui ir parodė gebėjimą efektyviausiai daugintis užterštoje terpėje (24 val.). *L. uvarum* fermentacijos metu buvo stebimi didžiausi pH pokyčiai; taip pat panaudojant šią padermę buvo stebimas efektyviausias mikotoksinų sumažėjimas užterštoje terpėje (3.8 pav.).

Literatūroje nurodyta, kad pH poveikis gali būti susijęs su daugybe veiksnių, tokių kaip substratas, mikroskopinių grybų padermės, fermentacijos proceso inkubacijos temperatūra, inkubacijos trukmė ir konkurencinės mikrofloros buvimas [216]. Eksperimento metu reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai buvo gauti tarp šio faktoriaus ir DON bei DON konjugatų koncentracijų tiriamuosiuose mėginiuose. pH vertės sumažėjimas terpėje rodo, kad *Fusarium* spp. mikotoksinų kiekio sumažėjimą užterštuosiuose kviečiuose taip pat gali sąlygoti tiek gyvybingos PRB, tiek ir fermentacijos metu susidarę metabolitai. Greičiausiai mikotoksinų kiekio mažinimo mechanizmas biologinėse sistemose gali apimti abu aspektus: pienarūgščių bakterijų

absorbcijos ir fermentinio skaidymo galimybę. Tačiau degradacijos mechanizmas ir šio proceso metu gauti produktai turėtų būti išsamiau išnagrinėti.

Šis eksperimentas patvirtino, kad biologinė mikotoksinų detoksikacija yra alternatyvi strategija tvarioje maisto grandinėje su galimybe sumažinti maisto / pašarų užterštumą, padidinti jų saugumą ir išvengti ekonominių nuostolių. Mūsų išvados rodo, kad mikroorganizmai atlieka svarbų vaidmenį mažinant mikotoksinų kiekius užterštuose kviečiuose, todėl tradicinė PRB fermentacija gali būti patobulinta panaudojant atrinktas PRB padermes, pavyzdžiui, *Lactobacillus uvarum*, kurios būtų nejautrios terpės užterštumui ir sugebėtų efektyviai daugintis, siekiant reikšmingai sumažinti kviečių ir jų pagrindu pagamintų produktų užterštumą. Šią strategiją būtų galima pritaikyti fermentuotų produktų kūrimui maisto / pašarų pramonėje [69].

3.5. Gautų produktų biostimuliacinio aktyvumo įvertinimas

3.5.1. Baltymų hidrolizatų įtaka kviečių grūdų fiziologiniams pokyčiams *in vivo*¹⁵

Kviečių želmenų augimo stimuliavimas

Šiame tyrimų etape analizuotas kuriamų biostimuliatorių – augalinės kilmės baltymų hidrolizatų, gautų taikant ultragarsinį ir fermentinį apdorojimą, poveikis žieminių kviečių daigumui. Biostimuliatorių poveikis žieminių kviečių auginimo skatinimui buvo vertinamas laboratoriniais tyrimais naudojant paruoštus preparatus grūdų apvėlimui (100 µl/g sėklų) ir lyginant juos su kontroliniu mėginiu (sėklomis, veiktomis vandeniu). Gauti kukurūzų baltymų hidrolizatų panaudojimo augalų augimo skatinimui tyrimo rezultatai pateikti 3.14 lentelėje ir 3.9 paveiksle.

3.14 lentelė. KKGŠP produktų poveikis kviečių želmenų daigumo parametrms

Mėginiai	Sudygimo procentas, (%)	Šaknų ilgis, (cm)	Daigų ilgis, (cm)	Šviežių šaknų svoris, (g)	Šviežių daigų svoris, (g)
Kontrolinis	85,3 ± 0,58 ^a	8,48 ± 0,52 ^a	5,38 ± 0,49 ^a	0,0115 ± 0,0002 ^a	0,0558 ± 0,0005 ^a
KKGŠP kontrolinis	93,3 ± 1,15 ^b	8,77 ± 0,69 ^{ab}	6,04 ± 0,74 ^a	0,0165 ± 0,0004 ^b	0,0650 ± 0,0004 ^a
KKGŠP1	90,7 ± 0,58 ^b	9,76 ± 0,54 ^{bc}	6,32 ± 0,65 ^a	0,0180 ± 0,0015 ^{bc}	0,0690 ± 0,0015 ^{ab}
KKGŠP2	95,7 ± 0,58 ^c	11,03 ± 0,47 ^c	7,20 ± 1,22 ^a	0,0195 ± 0,0005 ^c	0,0732 ± 0,0002 ^b
KKGŠP3	92,3 ± 0,58 ^b	10,14 ± 0,29 ^c	6,90 ± 0,52 ^a	0,0190 ± 0,0020 ^c	0,0705 ± 0,0003 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; *a–c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05); kontrolinis – grūdai, veikti vandeniu; KKGŠP kontrolinis – neapdorotas KKGŠP; KKGŠP1 – mėginys, gautas tradicinės hidrolizės būdu; KKGŠP2 – mėginys, veiktas 37 kHz ultragarsu (5,1 W/cm² intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze; KKGŠP3 – mėginys, veiktas 850 kHz ultragarsu (2,0 W/cm² intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze.

¹⁵ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaitė, D., Zadeikė, D., Bendoraitienė, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>



3.9 pav. KKGŠP produktų poveikis kviečių želdenų augimui. Kontrolinis – grūdai, veikti vandeniu; KKGŠP kontrolinis – neapdorotas KKGŠP; KKGŠP1 – mėginys, gautas tradicinės hidrolizės būdu; KKGŠP2 – mėginys, veiktas 37 kHz ultragarsu ($5,1 \text{ W/cm}^2$ intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze; KKGŠP3 – mėginys, veiktas 850 kHz ultragarsu ($2,0 \text{ W/cm}^2$ intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze

Kukurūzų baltymų hidrolizatų panaudojimas žieminių kviečių sėklų apvėlimui statistiškai reikšmingai padidino žieminių kviečių daigumą ir kitus parametrus, tokius kaip šaknų ir daigų ilgis bei svoris ($p < 0,05$). Gauti duomenys rodo, kad KKGŠP baltymų hidrolizatų panaudojimas (KKGŠP1–KKGŠP3) padidino žieminių kviečių sudygimo procentą, lyginant su kontroliniais mėginiais (sėklomis, veiktomis vandeniu), vidutiniškai 8,9 %. Vertinant baltymų hidrolizatų, lyginant su kontroliniais mėginiais, poveikį žieminių kviečių daigumui, buvo stebimi tokie teigiami fiziologiniai efektai: tradicinės hidrolizės būdu gautas baltymų hidrolizatas (KKGŠP1) padidino žieminių kviečių daigų ir šaknų ilgius, atitinkamai 17,5 % ir 15,1 %; baltymų hidrolizatas, gautas kombinuojant fermentinę hidrolizę su išankstiniu mėginio apdorojimu 37 kHz ultragarsu (KKGŠP2), padidino žieminių kviečių daigų ir šaknų ilgius, atitinkamai 33,8 % ir 30,1 %; baltymų hidrolizatas, gautas kombinuojant fermentinę hidrolizę su išankstiniu mėginio apdorojimu 850 kHz ultragarsu (KKGŠP3), padidino žieminių kviečių daigų ir šaknų ilgius atitinkamai 28,3 % ir 21,3 %. Teigiamas gautų hidrolizatų poveikis buvo stebimas vertinant šviežių augalų šaknų ir daigų svorį. KKGŠP baltymų hidrolizatai (KKGŠP1, KKGŠP2 ir KKGŠP3) padidino kviečių šviežių daigų ir šaknų svorį atitinkamai 27,1 % ir 21,3 %.

Vertinant skirtingų laisvųjų aminorūgščių kiekio ryšį su kviečių daigumo parametrais (šaknų ir daigų ilgiu) nustatyta, kad laisvųjų aminorūgščių poveikis daigumui skiriasi pagal sėklos būseną. Atlikus statistinę analizę, nustatytas stiprus ryšys tarp bendro laisvųjų aminorūgščių kiekio baltymų hidrolizatuose ir žieminių kviečių šaknų bei daigų ilgio (atitinkamai $r = 0,925$ ir $r = 0,977$). Stipriausias ryšys nustatytas Val (atitinkamai $r = 0,942$ ir $r = 0,983$), o štai kitoms aminorūgštims šis parametras kito tarp 0,737 ir 0,983. Dauguma aminorūgščių, tokių kaip Asp, Ser, Thr, Arg, Tyr, Cys, Val, Trp, Phe, Leu, Lys ir Pro, pasižymėjo stipriu ryšiu su šaknų ilgiu, o kitos, tokios kaip Glu, Gly, Ala ir Met, pasižymėjo stipriu ryšiu su daigų ilgiu.

Kitame etape buvo nagrinėtas sojų išspaudų baltymų hidrolizatų poveikis kviečių augimo skatinimui. Tyrimui naudoti sojų išspaudų baltymų hidrolizatai, gauti taikant pirminį SI ultragarsinį apdorojimą. Hidrolizatų įtaka grūdų daigumui lyginta su kontroliniais mėginiais – grūdais, veiktais vandeniu ir SI suspensija – be apdorojimo. Gauti tyrimų rezultatai pateikti 3.15 lentelėje.

3.15 lentelė. SI hidrolizatų poveikis kviečių želmenų daigumo parametrams

Mėginiai	Sudygimo procentas, (%)	Daigų ilgis, cm	Šaknų ilgis, cm	Šviežių daigų svoris, g	Šviežių šaknų svoris, g
Kontrolinis	71,0 ± 0,82 ^a	2,15 ± 1,06 ^a	5,65 ± 2,26 ^a	0,0233 ± 0,0006 ^a	0,0273 ± 0,0007 ^a
SIK	81,0 ± 0,78 ^c	2,29 ± 1,30 ^a	5,75 ± 2,39 ^a	0,0240 ± 0,0005 ^a	0,0270 ± 0,0006 ^a
SIH1	81,5 ± 0,90 ^c	2,30 ± 1,40 ^a	5,77 ± 2,77 ^a	0,0250 ± 0,0006 ^a	0,0279 ± 0,0010 ^a
SIH2	78,0 ± 0,73 ^b	2,49 ± 1,17 ^a	6,73 ± 2,47 ^a	0,0270 ± 0,0005 ^a	0,0380 ± 0,0006 ^b
SIH3	85,5 ± 1,11 ^d	3,52 ± 1,47 ^a	6,67 ± 1,78 ^a	0,0360 ± 0,0004 ^b	0,0370 ± 0,0005 ^b
SIH4	82,0 ± 0,92 ^c	2,64 ± 1,32 ^a	6,58 ± 2,15 ^a	0,0270 ± 0,0004 ^a	0,0410 ± 0,0009 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm StN$ ($N = 3$); StN – standartinis nuokrypis; $a-c$ – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); Kontrolinis – grūdai, veikti vandeniu; SIK – kontrolinis mėginys, nepaveiktos sojų išspaudos; SIH1 – mėginys, gautas tradicinės hidrolizės būdu; SIH2 – mėginys, veiktas 18 kHz ultragarsu ir hidrolizuotas šarmine proteaze; SIH3 – mėginys, veiktas 37 kHz ultragarsu (5,1 W/cm² intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze; SIH4 – mėginys, veiktas 850 kHz ultragarsu (2,0 W/cm² intensyvumu) ir hidrolizuotas šarmine proteaze.

Tyrimų rezultatai rodo, jog SI baltymų hidrolizatų panaudojimas žieminių kviečių sėklų apvelimui statistiškai reikšmingai padidino žieminių kviečių daigumą ir kitus parametrus, tokius kaip šaknų ir daigų biomasė ($p < 0,05$). Kviečių sėklų apdorojimas sojų išspaudų baltymų hidrolizatais (SIH1–SIH4) paskatino kviečių sudygimą, ir gautas vidutiniškai 15,1 % didesnis apdorotų sėklų sudygimo procentas, lyginant su kontroliniais mėginiais. Didžiausias sudygimo procentas (85,5 %) gautas grūdus apdorojant SI baltymų hidrolizatu (SIH3), kurio gamybai taikytas pirminis apdorojimas 37 kHz dažnio ultragarsu (5,1 W/cm²) kartu su fermentine hidrolize. Kviečių sėklų apdorojimas SI baltymų hidrolizatais taip pat padidino šaknų ir daigų ilgį. SIH3 preparato poveikis buvo efektyviausias padidinant žieminių kviečių daigų ir šaknų ilgį atitinkamai 63,7 % ir 18,1 %, o štai kiti preparatai – SIH1, SIH2 ir SIH4 – padidino žieminių kviečių daigų ir šaknų ilgius mažiau – atitinkamai 7,0; 15,8; 22,8 % ir 2,1; 19,1; 15,7 %. Panašios tendencijos gautos vertinant šviežių daigų ir šaknų svorį. Didžiausias teigiamas poveikis nustatytas apveliant grūdus SIH3 preparatu – fiksuojamas 54,5 % didesnis daigų svoris nei kontrolinių mėginių; didžiausias šaknų svoris (0,041 g) gautas mėginiuose, veiktuose SIH4 preparatu, ruoštu taikant 850 kHz UG apdorojimą kartu su šarmine hidrolize. Taigi, pagal tyrimo rezultatus galima teigti, jog kviečių sėklų daigumą ir augimą galima stimuliuoti augalinės kilmės baltymų hidrolizatais, kurių sudėtyje yra laisvųjų aminorūgščių.

Aminorūgštys atlieka svarbų vaidmenį augaluose. Literatūros apžvalgoje Amiras ir kt. [217] pateikė unikalius funkcinis vaidmenis, kuriuos augalų vystymosi metu atlieka tam tikros aminorūgštys: asparto šeimos aminorūgštys (Lys, Met ir Thre), šakotosios grandinės aminorūgštys (Val, Ile ir Leu), taip pat Pro. Pavyzdžiui, šakotosios grandinės aminorūgštys skatina sėklų vystymąsi ir daigumą [218].

Metioninas turi įtakos atsarginių komponentų lygio sėklose palaikymui [219]. Prolinas atlieka svarbų vaidmenį vystantis embrionui [220].

Remiantis atliktomis analizėmis ir jų metu gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad žieminių kviečių sėklų daigumas ir augimas gali būti skatinamas panaudojant augalinės kilmės baltymų hidrolizatus, kurie aprūpina augalą reikalingomis maistinėmis medžiagomis, tokiomis kaip laisvosios aminorūgštys ir skirtingo ilgio peptidai, kurie yra būtini augalų sėklų vystymuisi. Popko ir kt. [133] taip pat aprašė teigiamą baltymų hidrolizatų panaudojimo poveikį žieminių kviečių daigumo ir derliaus didinimui. Panašius rezultatus pateikė Colla ir kt. [221], kurie išbandė baltymų hidrolizatą, turintį savo sudėtyje aminorūgščių bei mažų peptidų, ir nustatė, kad tokių preparatų panaudojimas kukurūzų, pomidorų ir žirnių auginimui pagerina azoto įsisavinamumą augaluose, skatina augalų augimą ir aktyvumą, būdingą hormonams (auksinams ir citokininams).

Gauti duomenys rodo, kad augalinės kilmės baltymų hidrolizatai skatina žieminių kviečių augimą, o geriausi rezultatai gaunami naudojant preparatus, kurių kūrimui taikytas pirminis apdorojimas 37 kHz ir 5,1 W/cm² intensyvumo ultragarsu. Taigi, galima teigti, jog pirminis ultragarsinis antrinių produktų apdorojimas yra efektyvi priemonė kuriant ir tobulinant augalinius biostimulius.

Kviečių atsparumo šalčio streso sąlygomis įvertinimas

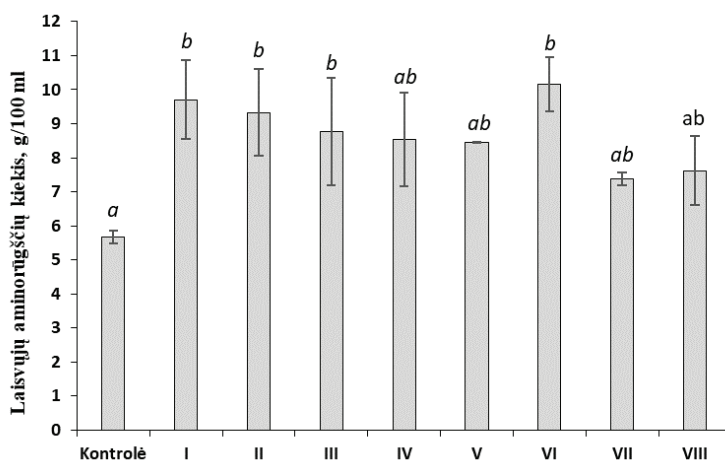
KKGŠP hidrolizė proteazėmis ir jų mišiniais. Siekiant optimizuoti baltymų hidrolizato iš kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto (KKGŠP) gamybą ir pritaikyti ją žemės ūkyje, bendradarbiaujant su UAB „Nando“, buvo atlikti fermentinės hidrolizės tyrimai naudojant endo- ir egzopeptidazes bei jų mišinius. Kitų tyrėjų gauti rezultatai rodo, jog endo- ir egzopeptidazių, tokių kaip *Alcalase*, *Neutrase* ir *Flavourzyme* (*Novozymes*) naudojimas yra efektyvus padidinant augalinės kilmės baltymų tirpumą [222, 223]. Taigi, šio darbo tikslas – atrinkti fermentus ir jų veikimo sąlygas, kurias taikant gaunamas didžiausias laisvųjų aminorūgščių kiekis.

KKGŠP hidrolizės sąlygos, veikiant skirtingais fermentais, pateiktos 2.1.3 skyrelyje, 2.6 lentelėje. Proceso eiga ir fermentų veikimo efektyvumas vertintas pagal pH pokyčius (3.16 lentelė), kuris matuotas kas 1 val., ir pagal susidariusių laisvųjų aminorūgščių kiekį galutiniame produkte (3.10 pav.).

3.16 lentelė. Tiriamųjų mėginių pH pokyčiai fermentinės hidrolizės metu (I–VIII mėginių paruošimo sąlygos nurodytos 2.1.3 skyrelyje, 2.6 lentelėje)

Mėginio nr.	pH vertė						
	0 val.	1 val.	2 val.	3 val.	4 val.	5 val.	6 val.
I	6,04 ± 0,03 ^a	6,13 ± 0,02 ^a	5,99 ± 0,03 ^{ab}	5,94 ± 0,02 ^{ab}	5,93 ± 0,01 ^b	5,93 ± 0,02 ^b	5,93 ± 0,01 ^b
II	4,06 ± 0,02 ^b	4,27 ± 0,04 ^a	3,88 ± 0,02 ^c	3,85 ± 0,03 ^c	3,85 ± 0,02 ^c	3,85 ± 0,01 ^c	3,85 ± 0,02 ^c
III	4,07 ± 0,02 ^b	4,36 ± 0,02 ^a	3,76 ± 0,02 ^c	3,82 ± 0,01 ^c	3,82 ± 0,03 ^c	3,82 ± 0,02 ^c	3,82 ± 0,03 ^c
IV	7,00 ± 0,01 ^a	6,82 ± 0,02 ^b	6,72 ± 0,01 ^c	6,61 ± 0,01 ^d	6,58 ± 0,01 ^d	6,58 ± 0,01 ^d	6,54 ± 0,02 ^e
V	6,99 ± 0,01 ^a	6,75 ± 0,03 ^b	6,72 ± 0,02 ^b	6,65 ± 0,02 ^c	6,60 ± 0,02 ^{cd}	6,60 ± 0,02 ^{cd}	6,58 ± 0,01 ^d
VI	7,06 ± 0,03 ^a	6,77 ± 0,01 ^b	6,78 ± 0,01 ^b	6,67 ± 0,01 ^c	6,63 ± 0,01 ^{cd}	6,63 ± 0,02 ^{cd}	6,60 ± 0,02 ^d
VII	8,60 ± 0,05 ^a	8,03 ± 0,02 ^b	8,05 ± 0,03 ^b	8,02 ± 0,02 ^b	8,00 ± 0,01 ^b	8,00 ± 0,01 ^b	8,00 ± 0,01 ^b
VIII	8,50 ± 0,03 ^a	8,13 ± 0,03 ^b	8,13 ± 0,02 ^b	7,35 ± 0,03 ^c	7,34 ± 0,01 ^c	5,71 ± 0,02 ^d	5,70 ± 0,01 ^d

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN*; *StN* – standartinis nuokrypis



3.10 pav. Augalinės kilmės baltymų hidrolizatų, gautų panaudojant skirtingas endo- ir egzo-peptidazes, laisvųjų aminorūgščių kiekio pokyčiai; *a*, *ab*, *b* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); I–VIII mėginių paruošimo sąlygos nurodytos 2.1.3 skyrelyje, 2.6 lentelėje

Iš pH tyrimo rezultatų matyti, kad hidrolizuojant KKGŠP likusius baltymus dideli pH pokyčiai nefiksuoti. Mažiausias pH pokytis nustatytas vertinant I mėginį, kai per pirmas 4 val. pH sumažėjo 1,8 % (3.16 lentelė). II ir III mėginių pH vertės sumažėjo greičiau, po 3 val. hidrolizės šiuose mėginiuose fiksuotas ~5,5 % pH vertės sumažėjimas. Toliau tęsiant hidrolizę mėginių pH nekito. Likusių mėginių (IV–VIII) pH vertės kitimas buvo lėtesnis, per 6 val. hidrolizės periodą pH sumažėjo apytiksliai 6,5 %. Tam, kad būtų galima tiksliau įvertinti fermentinių preparatų veikimo efektyvumą KKGŠP baltymų skaidymui, gautuose baltymų hidrolizatuose buvo nustatytas laisvųjų aminorūgščių kiekis (3.10 pav.).

Augalinės kilmės baltymų hidrolizatuose, gautuose naudojant skirtingus fermentinius preparatus, nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) laisvųjų aminorūgščių (LAR) kiekio padidėjimas. Mažiausi LAR pokyčiai, lyginant su nehidrolizuotu KKGŠP, gauti VII ir VIII mėginiuose, kuriuose laisvųjų aminorūgščių padidėjo atitinkamai 30,0 % ir 34,4 %. Mėginiuose I bei II ir III bei IV laisvųjų aminorūgščių kiekis padidėjo atitinkamai 68,0 % ir 51,4 %, o didžiausias laisvųjų aminorūgščių kiekio prieaugis (79,2 %) gautas VI mėginyje. Norint įvertinti gauto augalinės kilmės baltymų hidrolizato kokybę, buvo nustatyta laisvųjų aminorūgščių sudėtis, kuri pateikta 3.17 lentelėje.

3.17 lentelė. KKGŠP baltymų hidrolizato (VI mėginio) laisvųjų aminorūgščių sudėtis

Laisvosios aminorūgštys, g/100 ml	Kontrolinis mėginys	Baltymų hidrolizatas (VI mėginys)
Asparto rūgštis	0,04 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^a
Glutamo rūgštis	0,11 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,02 ^{ab}
Serinas	0,28 ± 0,03 ^a	0,55 ± 0,04 ^{ab}
Histidinas	0,04 ± 0,05 ^a	0,18 ± 0,05 ^a
Glicinas	0,19 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^{ab}
Treoninas	0,25 ± 0,01 ^a	0,67 ± 0,15 ^b
Argininas	0,01 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,02 ^a
Alaninas	1,39 ± 0,02 ^a	1,79 ± 0,14 ^b
Tirozinas	0,02 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,10 ^a
Cisteinas	0,21 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,02 ^{ab}
Valinas	0,34 ± 0,11 ^a	0,66 ± 0,05 ^b
Metioninas	0,32 ± 0,08 ^a	0,38 ± 0,10 ^{ab}
Triptofanas	0,39 ± 0,06 ^a	0,64 ± 0,05 ^b
Fenilalaninas	0,27 ± 0,02 ^a	0,57 ± 0,06 ^{ab}
Izoleucinas	0,91 ± 0,16 ^a	1,19 ± 0,10 ^b
Leucinas	0,03 ± 0,05 ^a	0,15 ± 0,04 ^a
Lizinas	0,06 ± 0,08 ^a	0,13 ± 0,02 ^{ab}
Prolinas	0,82 ± 0,19 ^a	1,94 ± 0,45 ^b
Iš viso:	5,67 ± 0,19 ^a	10,16 ± 0,87 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN*; *StN* – standartinis nuokrypis; *a–b* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis vienoje eilutėje, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

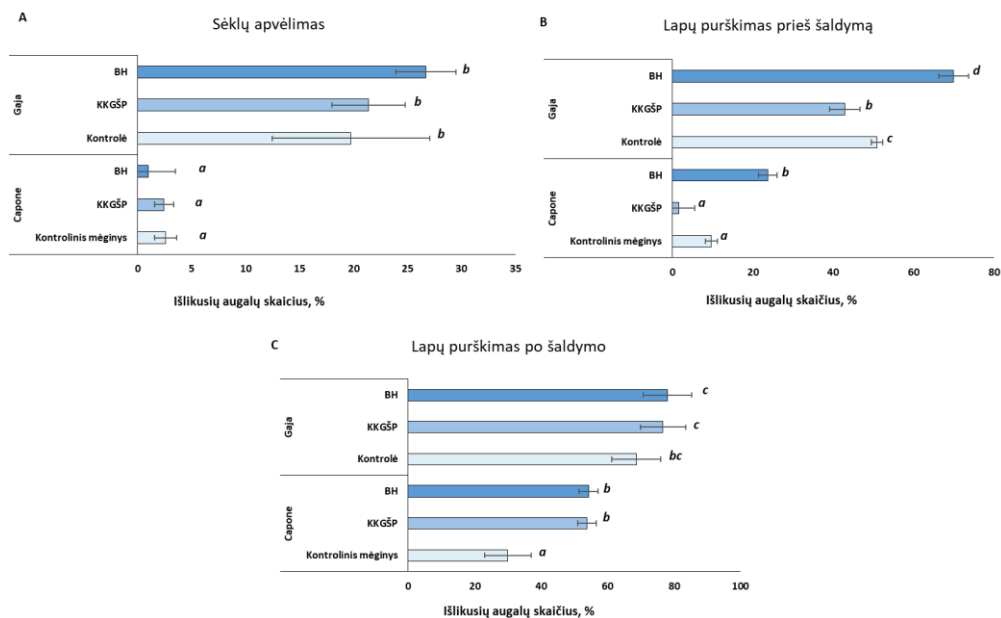
Taikant fermentinę hidrolizę endopeptidazėmis *Novozyme 37071* ir *Formea Prime* kartu su egzopeptidaze *Flavourzyme* KKGŠP apdorojimui, nustatytas reikšmingas tam tikrų laisvųjų aminorūgščių kiekio padidėjimas ($p < 0,05$). Nustatyta,

kad alifatinių aminorūgščių, tokių kaip prolinas ir valinas, kiekis po hidrolizės padidėjo, lyginant su kontroliniais mėginiais, vidutiniškai 2,2 karto, o kitų šiai grupei priskiriamų aminorūgščių (Ala, Ile, Leu ir Gly) kiekiai padidėjo vidutiniškai 1,4 karto. Vertinant fermentinio apdorojimo įtaką hidroksiaminorūgščių (Ser ir Thr), sieros turinčių aminorūgščių (Cys ir Met), taip pat aromatinių aminorūgščių (Phe, Trp ir Tyr) kiekio pokyčiams, nustatytas vidutinis atitinkamai 2,3, 1,4 ir 1,9 karto padidėjimas. O štai rūgštinių (Asp ir Glu rūgščių) ir bazinių (His, Arg ir Lys) aminorūgščių kiekybinių pokyčių po hidrolizės nefiksuota.

Kviečių genotipų atsakas į šalčio stresą. Šiame eksperimento etape tirtos baltymų hidrolizato (VI mėginio) panaudojimo galimybės didinti kviečių augalų atsparumą šalčio stresui. Galutiniam produkte nustatytas 10,16 g/100 mL laisvųjų aminorūgščių skaičius. Kontrolei naudotas KKGŠP be fermentinės hidrolizės. Parinkti du žieminių kviečių genotipai, kurie skiriasi atsparumu šalčiui: „Capone“ – mažiau atsparus genotipas ir „Gaja“ – labiau atsparus šalčiui genotipas.

Eksperimento metu tirti 3 galimi preparato panaudojimo būdai: sėklų apvėlimas; lapų purškimas grūdinimo metu, t. y. prieš šaltį ir lapų purškimas greitam augalų atgaivinimui po šalčio streso. Biostimuliatorių poveikio efektyvumas vertinamas pagal išlikusių augalų skaičių ir LT_{50} kriterijų.

Išlikusių streso sąlygomis augalų kiekio vertinimas. Gauti rezultatai pateikti 3.11 paveiksle.



3.11 pav. Augalinės kilmės biostimuliatorių įtaka kviečių atsparumui šalčiui ($-16,00\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra) didinti. A – sėklų apvėlimas; B – kviečių daigų purškimas grūdinimo metu; C – kviečių daigų purškimas po šalčio

Gauti rezultatai rodo, jog biostimuliatorių panaudojimo būdas turėjo skirtingą poveikį tirtiems kviečių genotipams. Sėklų apvėlimas (3.11 pav. A) buvo efektyvesnis tiriant „Gaja“ genotipą, BH panaudojimas 35,2 % padidino išlikusių augalų kiekį, o štai KKGŠP panaudojimas 8,4 % padidino „Gaja“ genotipo išlikusių augalų kiekį. „Capone“ genotipo kviečių sėklų apdorojimas tiek KKGŠP, tiek BH atveju nedavė pastebimų rezultatų, tai galėjo apspręsti per žema šaldymo temperatūra.

Vertinant biostimuliatorių įtaką kviečių daigų purškimui grūdinimo metu, t. y. prieš šalčio stresą, rezultatai (3.11 pav. B) rodo, jog KKGŠP panaudojimas turėjo neigiamą poveikį išlikusių augalų skaičiui, o baltymų hidrolizato panaudojimas (prieš šaltį) padidino išlikusių augalų skaičių tiriant tiek „Capone“, tiek „Gaja“ genotipus (atitinkamai 2,5 karto ir 1,4 karto). Biostimuliatorių panaudojimo staigiam augalų atgaivinimui po šalčio streso rezultatai (3.11 pav. C) rodo, jog tiek KKGŠP, tiek BH gali padidinti išlikusių augalų skaičių. Vertinant šalčiui jautresnio genotipo „Capone“ rezultatus, nustatyta, kad biostimuliatorių panaudojimas padidino išlikusių augalų kiekį vidutiniškai 80,4 %. Tiriant šalčiui atsparesnio genotipo apdorojimą biostimulioriais, taip pat matomas teigiamas efektas, leidžiantis padidinti išlikusių augalų skaičių vidutiniškai 12,7 %.

Ši tendencija matoma ir kitų mokslininkų darbuose [224]; jie lauko tyrimuose įvertino baltymų hidrolizatų panaudojimo galimybes augalų grūdinimo stadijoje, ir jų gauti rezultatai rodo, jog biostimulioriai reikšmingai padidino ne tik žieminių kviečių atsparumą šalčio stresui, bet ir turėjo teigiamą poveikį Lietuvoje auginamų žieminių rapsų atsparumui šalčio stresui. Laisvosios aminorūgštys yra mažos molekulinės masės junginiai, todėl augalai jas lengvai absorbuoja per lapus ir mažesniais kiekiais – per šaknis. Taigi, papildomai gautos aminorūgštys skatina augalų fotosintezės ir kvėpavimo procesus. Taip pat aminorūgštys, tokios kaip laisvasis prolinas, yra svarbios augalų auginimui ir dalyvauja augalo atsako į šalčio stresą mechanizme.

LT50 tyrimų rezultatai. Įvertinus anksčiau pateiktus tyrimo rezultatus, eksperimentas tęstas nustatant augalų LT₅₀ temperatūrą, t. y. temperatūrą, kurioje žūsta 50 % augalų. Pagal šį kriterijų vertinamas baltymų hidrolizato efektas žieminių kviečių atsparumui šalčio stresui. Eksperimentui atlikti parinkti tie patys žieminių kviečių genotipai „Capone“ ir „Gaja“. Papildomai tirtas žieminių kviečių genotipas „Galerista“, kuris pasižymi labai dideliu atsparumu šalčiui. Kviečių daigai buvo paveikti baltymų hidrolizatu juos grūdinant, t. y. prieš šalčio stresą. Gauti LT₅₀ tyrimo rezultatai pateikti 3.18 lentelėje.

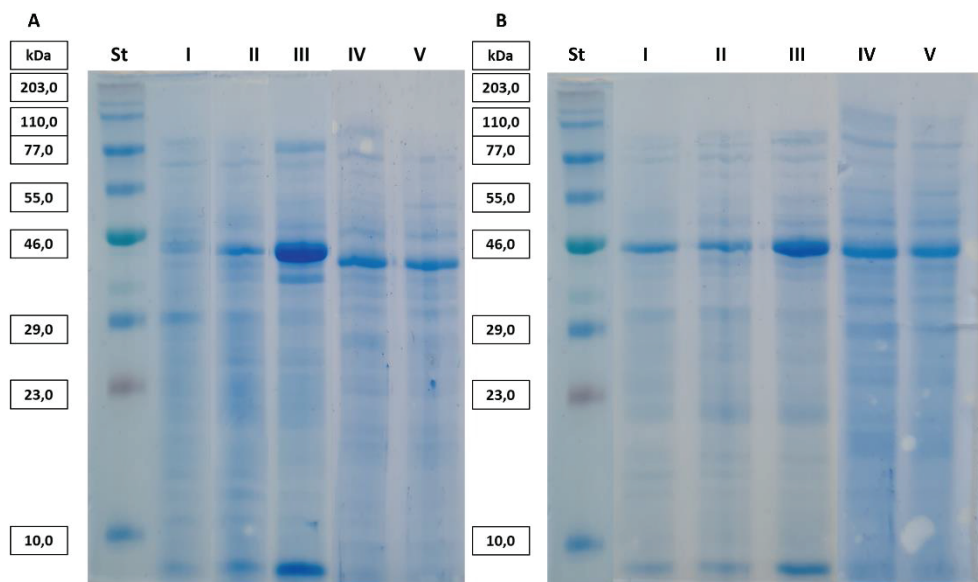
3.18 lentelė. Skirtingų žieminių kviečių genotipų, paveiktų baltymų hidrolizatu, LT₅₀ rezultatai

Mėginiai	LT ₅₀ , °C
„Gaja“ kontrolinis mėginys	–12,26 ^a
„Gaja“ BH	–12,67 ^{ab}
„Capone“ kontrolinis mėginys	–12,87 ^{ab}
„Capone“ BH	–13,26 ^b
„Galerista“ kontrolinis mėginys	–14,92 ^c
„Galerista“ BH	–15,16 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės; *a-c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); BH – mėginiai, purkšti kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto baltymų hidrolizatu.

Iš gautų eksperimento rezultatų matyti, kad biostimuliatorių panaudojimas padidina žieminių kviečių atsparumą šalčiui ir turi statistiškai reikšmingos įtakos ($p < 0,05$) žieminių kviečių LT₅₀ temperatūrai. Vertinant tirtų genotipų LT₅₀ temperatūrą, rezultatai rodo, jog mažiau šalčiui atsparių genotipų („Capone“ ir „Gaja“) LT₅₀ temperatūra gali būti sumažinta vidutiniškai 0,40 °C; „Capone“ genotipo LT₅₀ temperatūra sumažėjo nuo –12,26 °C iki –12,67 °C temperatūros, o štai „Gaja“ genotipo LT₅₀ temperatūra sumažėjo nuo –12,87 °C iki –13,26 °C. Baltymų hidrolizato panaudojimas labai atsparios šalčiui žieminių kviečių veislės genotipo apdorojimui gali sumažinti LT₅₀ temperatūrą vidutiniškai 0,24 °C.

Molekulinių žymenų kviečių baltyminėse medžiagose identifikavimas formuojantis atsakui į sėklų grūdinimą ir į apdorojimą KKGŠP baltymų hidrolizatais. Žieminių kviečių mėginiai, surinkti grūdinimo metu, buvo analizuoti išsamiau, norint identifikuoti juose vykstančius baltyminių medžiagų pokyčius ir įvertinti minėtų biostimuliatorių panaudojimo įtaką šių baltymų formavimuisi. Atlikta baltymų elektroforezė, kurios rezultatai pateikti 3.12 paveiksle.



3.12 pav. Biostimuliatorių panaudojimo įtaka baltymų formavimuisi žieminių kviečių grūdinimo metu. A – „Gaja“; B – „Capone“; I – kontroliniai mėginiai (grūdinimo pradžia); II, III – kviečių mėginiai be apdorojimo baltymų hidrolizatu, atitinkamai grūdinimo viduryje ir pabaigoje; IV, V – mėginiai, paveikti KKGŠP baltymų hidrolizatu, atitinkamai grūdinimo viduryje ir pabaigoje

Gauti rezultatai rodo, kad abiejų genotipų („Gaja“ ir „Capone“) žieminių kviečių mėginiuose vyrauja 46 kDa molekulinės masės baltymų komponentai ir labai mažos molekulinės masės (<10 kDa) peptidai. Analizuojant baltymų pokyčius kviečių grūdinimo metu, matoma, kad didžiausias kiekis minėtų baltymų komponentų mėginiuose, be apdorojimo baltymų hidrolizatu, susidaro grūdinimo pabaigoje (3.12 pav. A ir B, III mėginiai). Vertinant baltymų pokyčius kviečių grūdinimo metu, mėginiuose, apdorotuose baltymų hidrolizatu, matoma, kad didesni kiekiai minėtų komponentų susidaro grūdinimo viduryje (3.12 pav. A, B IV mėginiai), o biostimuliatoriumi paveiktuose mėginiuose grūdinimo pabaigoje taip pat matomas intensyvus minėtų baltymų komponentų formavimasis (3.12 pav. A, B, V mėginiai). Literatūroje pateikiamai identifikuoti šalčiui jautrūs kviečių genai, tokie kaip dehidrinai (angl. *dehydrins* (DHN)), vėlyvosios embregionezės (angl. *late embryogenesis abundance* (LEA)), reaguojantys į šaltį (angl. *cold responsive* (COR)) ir reaguojantys į abscizo rūgštį (angl. *responsive to abscisic acid* (RBA)), kurie yra mažos molekulinės masės (<40 kDa) [225].

3.5.2. Antimikrobinių bioproduktų biostimuliacinio poveikio tyrimai¹⁶

Permeatų (be bioapdoravimo) pritaikymas kviečių želmenų augimo stimuliavimui *in vivo*

Siekiant įvertinti augalinių gėrimų gamybos metu susidarančių atliekų – permeatų panaudojimo galimybes kviečių sėklų augimo biostimuliavimui, tirtas kviečių sėklų apvėlimo permeatais poveikis kviečių želmenų augimo parametrams. Po 7 dienų buvo įvertinta naudotų preparatų įtaka kviečių želmenų daigų bei šaknų ilgiui ir augalų biomasei, gauti rezultatai pateikti 3.19 lentelėje.

3.19 lentelė. Permeatų (be bioapdoravimo) poveikis kviečių želmenų daigumo parametrams

Mėginiai	Sudygimo procentas, (%)	Šaknų ilgis, (cm)	Daigų ilgis, (cm)	Šviežių šaknų svoris, (g)	Šviežių daigų svoris, (g)
Kontrolinis	86,0 ± 2,5 ^a	8,13 ± 0,88 ^a	4,89 ± 1,10 ^a	0,0276 ± 0,003 ^a	0,0360 ± 0,001 ^a
KP	93,3 ± 1,0 ^c	8,95 ± 0,13 ^b	5,74 ± 0,46 ^b	0,0610 ± 0,004 ^c	0,0630 ± 0,007 ^c
RP	88,5 ± 0,5 ^b	6,94 ± 0,93 ^a	4,10 ± 0,22 ^a	0,0390 ± 0,003 ^b	0,0490 ± 0,002 ^b
SP	92,5 ± 1,5 ^c	7,88 ± 0,64 ^a	5,45 ± 0,65 ^b	0,0660 ± 0,010 ^c	0,0640 ± 0,007 ^c
MP	93,0 ± 1,0 ^c	8,80 ± 0,34 ^b	5,80 ± 0,13 ^b	0,0560 ± 0,005 ^c	0,0630 ± 0,006 ^c
AP	88,5 ± 1,1 ^b	6,53 ± 0,14 ^a	4,58 ± 0,11 ^a	0,0340 ± 0,006 ^b	0,0480 ± 0,004 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; *a–c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05); Kontrolinis – grūdai, veikti vandeniu; KP – kokosų permeatas; RP – ryžių permeatas; SP – sojų permeatas; MP – migdolų permeatas; AP – avižų permeatas.

Gauti rezultatai rodo, kad daigumo parametrų pokyčiai priklauso nuo sėkloms apvėlti naudojamo permeato tipo, t. y. nuo permeatų išgavimui naudotos augalinės žaliavos rūšies, lyginant su kontroliniu mėginiu (kuris apdorotas vandeniu). Kviečių želmenų sudygimo procentas reikšmingai padidėjo pagal naudotą permeatą: sojų permeato panaudojimas padidino sudygimo procentą 7,6 %, naudojant kokosų ir migdolų permeatus sudygimo procentas vidutiniškai padidėjo 8,3 %. Kviečių sėklų apdorojimas ryžių ir avižų permeatais sudygimo procentą padidino vidutiniškai ~3 %, nuo 86 % iki 88,5 %.

Kviečių sėklų apdorojimas augalinių gėrimų išspaudų permeatais turėjo teigiamą poveikį kviečių želmenų augimo savybėms, tirtoms po 7 dienų augimo (3.19 lentelė). Efektyviausiu poveikiu pasižymėjo kviečių sėklų apdorojimas sojų permeatu – nustatytas kviečių želmenų daigų ir šaknų svoris vidutiniškai padidėjo atitinkamai 1,8 ir 2,4 karto, lyginant su kontroliniu mėginiu. Analogiškos tendencijos stebimos ir naudojant kokosų bei migdolų permeatus sėklų apvėlimui, želmenų daigų

¹⁶ Šiame skyriuje naudojamos kai kurios disertacijos tema paskelbto straipsnio dalys. Trakselyte-Rupsienė, K., Juodeikiene, G., Alzbergaite, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass *in vivo*. Food Bioscience. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

ir šaknų svoris vidutiniškai padidėjo atitinkamai 1,8 ir 2,1 karto. Sėklų apdorojimas avižų ir ryžių permeatais neturėjo reikšmingos įtakos daigų ir šaknų svoriui.

Kviečių sėklų apdorojimas permeatais taip pat turėjo įtakos ir kviečių želmenų daigų bei šaknų ilgiui. Naudojant kokosų, migdolų ir sojų permeatus, nustatytas atitinkamai 17,3 %, 18,5 % ir 11,4 % didesnis daigų ilgis. Šaknų ilgio padidėjimas nustatytas tik mėginiuose, apdorotuose kokosų ir migdolų permeatais (atitinkamai 10 % ir 8,3 %). Avižų ir ryžių permeatų panaudojimas neturėjo reikšmingos įtakos kviečių želmenų daigų ir šaknų ilgiui.

Taigi, kviečių sėklų apdorojimas permeatais yra efektyvesnis biomasės prieaugiui nei daigų ar šaknų ilgio pokyčiams, tai reiškia, kad permeatų naudojimas sąlygoja didesnę skaičių susiformavusių daigų ir šaknų. Kviečių želmenų daigumui didžiausią įtaką turėjo permeatai, kurių sudėtyje yra didesnis tirpiųjų baltymų kiekis, todėl biostimuliatorių gamybai tikslinga būtų naudoti sojų, kokosų ir migdolų permeatus. Pagal literatūrą [10, 30], baltymų pagrindu pagaminti preparatai įvairiais mechanizmais teigiamai veikia augalų metabolizmą ir gerina tiek daigų, tiek šaknų vystymąsi bei didina augalų biomasę.

Fermentuotų permeatų pritaikymas *Fusarium* spp. užkrėstų kviečių sėklų daigumo stimuliavimui *in vivo*

Remiantis antigrybinio aktyvumo nustatymo rezultatais, *Fusarium* spp. užkrėstų kviečių sėklų daigumo skatinimui buvo pasirinkti 48 val. RP_{LUHS 173} ir AP_{LUHS 206} fermentuoti mėginiai. Gauti rezultatai pateikti 3.20 lentelėje.

3.20 lentelė. Fermentuotų permeatų poveikis *Fusarium* spp. pažeistų kviečių želmenų daigumo parametrams.

Mėginiai	Sudygimo procentas, (%)	Šaknų ilgis, (cm)	Daigų ilgis, (cm)	Šviežių šaknų svoris, (g)	Šviežių daigų svoris, (g)
Kontrolinis	64,0 ± 1,4 ^a	5,95 ± 0,08 ^a	4,85 ± 0,01 ^a	0,039 ± 0,03 ^a	0,049 ± 0,002 ^a
RP _{LUHS 173}	66,0 ± 2,4 ^a	6,48 ± 0,02 ^a	4,74 ± 0,16 ^a	0,032 ± 0,04 ^a	0,052 ± 0,004 ^a
AP _{LUHS 206}	72,0 ± 3,1 ^a	6,80 ± 0,52 ^a	5,09 ± 0,39 ^a	0,041 ± 0,06 ^a	0,050 ± 0,002 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±*StN* (*N* = 3); *StN* – standartinis nuokrypis; *a*–*c* – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai reikšmingai skiriasi (*p* < 0,05); Kontrolinis – grūdai, veikti vandeniu; RP_{LUHS 173} – ryžių permeatas, 48 val. fermentuotas su *L. brevis*; AP_{LUHS 206} – avižų permeatas, 48 val. fermentuotas su *L. farraginis*.

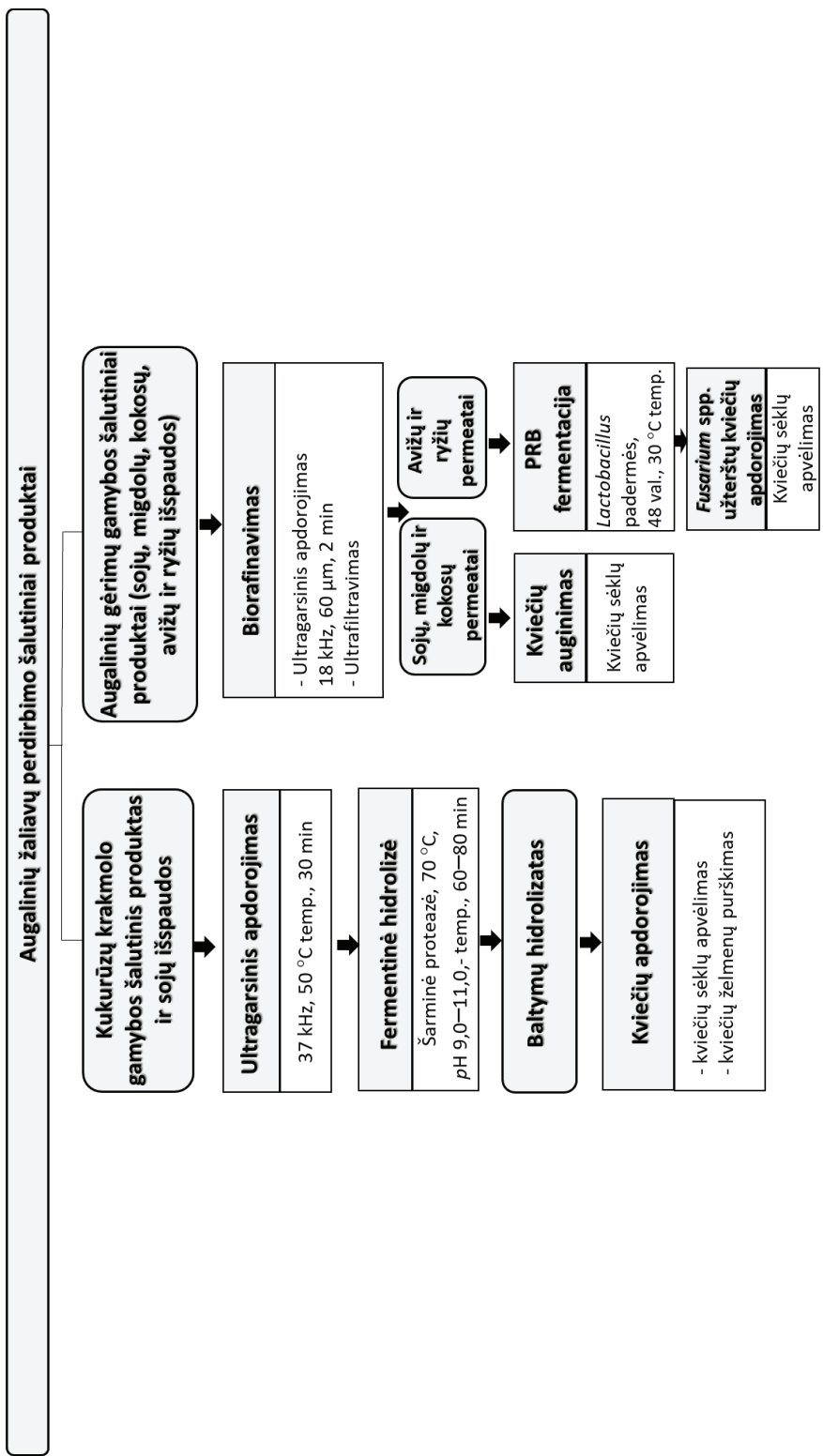
Tyrimų rezultatai rodo, kad PRB fermentuotų permeatų panaudojimas mikotoksinais užkrėstų kviečių sėklų apdorojimui reikšmingai paveikė daigumo parametrus: sudygimo procentą ir daigų bei šaknų ilgį (*p* < 0,05). Didžiausias sudygimo procento padidėjimas, lyginant su kontroliniu mėginiu (kuris apdorotas vandeniu), buvo gautas naudojant AP_{LUHS 206} permeatą (vidutiniškai 12,5 %). O štai užkrėstų kviečių sėklų, apdorotų su RP_{LUHS 173}, daigumas padidėjo vidutiniškai 3,1 %. Vertinant kviečių želmenų daigų ir šaknų ilgį, nustatyta, kad mikotoksinais užkrėstų sėklų apdorojimas fermentuotu avižų permeatu, padidino šaknų ir daigų ilgį atitinkamai 14,1 % ir 5,0 %, lyginant su kontroliniu mėginiu.

Fermentuotų permeatų, pasižyminčių antigrybiniu aktyvumu, panaudojimas sėklų apvėlimui galėtų būti veiksminga strategija, skirta padidinti mikotoksinais užterštų kviečių sėklų daigumą, o šio apdorojimo specifiniu biostimulatoriumi efektyvumas priklauso tiek nuo permeato gamybai naudotos augalinės žaliavos rūšies, tiek ir nuo PRB padermės, naudotos permeatų fermentavimui. Gauti rezultatai sutampa su literatūroje pateikta informacija, kad sūrio išrūgų permeatai po PRB fermentacijos pasižymėjo dideliu antigrybiniu aktyvumu ir taip pat žymiai padidino užterštų grūdų daigumą [190].

Apibendrinimas ir rekomendacijos

Remiantis rezultatais, gautais atlikus kompleksinius tyrimus, apimančius biostimuliatorių gamybą iš augalinių žaliavų perdirbimo šalutinių produktų, rekomenduojama šalutinius produktus apdoroti pagal 3.13 pav. pateiktą technologinę schemą ir šias rekomendacijas:

1. Augalinės kilmės šalutiniuose produktuose, t. y. kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte, sojų išspaudose ir augalinių gėrimų biorafinavimo metu gautuose permeatuose lieka daug vertingų komponentų, ir jie turi potencialą atsinaujinančių išteklių plėtojimui bei perdirbimui į biostimulacinius.
2. Baltyminių biostimuliatorių gamybai rekomenduojama rinktis kukurūzų krakmolo gamybos šalutinį produktą ir sojų išspaudas, o išankstinis žaliavų apdorojimas žemojo dažnio (37 kHz, 5,1 W/cm²) ultragarsu galėtų būti pritaikytas tradicinės fermentinės hidrolizės efektyvumo didinimui, leidžiantis pasiekti didžiausią hidrolizės laipsnį su mažesnėmis fermentų sąnaudomis, tokiu būdu paverčiant hidrolizės procesą našesniu ir ekonomiškesniu.
3. Augalinių gėrimų gamybos metu susidariusių išspaudų biorafinavimui rekomenduojama taikyti ultragarsinį apdorojimą, mechaninį atskyrimą bei ultrafiltravimą ir gautas atliekas (permeatus) naudoti bioproduktų, pasižyminčių antigrybiniu aktyvumu, gamybai taikant fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis.
4. Baltymų pagrindu pagaminti biostimuliaciniai, baltymų hidrolizatai, kurių sudėtyje yra laisvųjų aminorūgščių, gali būti naudojami ne tik augalų produktyvumo didinimui, bet ir siekiant padidinti jų atsparumą abiotiniam stresui. Antigrybiniu aktyvumu pasižyminčius fermentuotus permeatus rekomenduojama naudoti sėklų apdorojimui siekiant prevencijos nuo pelėsių.



3.13 pav. Augalinės kilmės šalutinių produktų perdirbimo į biostimulinius technologinė schema

IŠVADOS

1. Atrinkti ir ištirti augalinių žaliavų perdirbimo šalutiniai produktai, tinkami biostimuliatorių, t. y. baltymų hidrolizatų ir antimikrobinių bioproduktų gamybai. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinis produktas ir sojų išspaudos, turinčios didelius kiekius baltymų (atitinkamai 44,40 % s. m. ir 28,2 %), tinkamos baltymų hidrolizatų gamybai, o avižų ir ryžių permeatai – augalinių gėrimų gamybos atliekos – tinkami antimikrobinių komponentų gamybai. Šalutinių produktų funkcionalumui didinti taikytas apdorojimas skirtingo dažnio ultragarsu turėjo statistiškai reikšmingą įtaką tirpiųjų baltymų koncentracijai ($p < 0,05$). Žemojo (37 kHz) ir aukštojo (850 kHz) dažnio ultragarsas padidino tirpiųjų baltymų kiekį kukurūzų krakmolo gamybos šalutiniame produkte, atitinkamai 79,7 % ir 63,4 %, sojų išspaudų mėginiuose vidutiniškai 2 kartus.
2. Parinktos optimalios fermentinės hidrolizės sąlygos baltyminių biostimuliatorių gamybai ir nustatyta, kad ultragarsinis apdorojimas turėjo statistiškai reikšmingą įtaką kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentinės hidrolizės procesui ($p < 0,05$). Lyginant su tradicine kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų fermentine hidrolize, žemojo dažnio (37 kHz, 5,1 W/cm²) ultragarsinis apdorojimas buvo efektyviausias ir didžiausios suhidrolizuotų baltymų koncentracijos (atitinkamai 17,5 g/l ir 14,7 g/l), buvo gautos naudojant mažesnę fermento kiekį bei trumpesnę hidrolizės laiką (atitinkamai 60 min ir 80 min). Taip pat 37 kHz ultragarsinis žaliavos apdorojimas padidino laisvųjų aminorūgščių kiekį tiriamuosiuose baltymų hidrolizatuose.
3. Užfiksuoti statistiškai reikšmingi skirtumai vertinant ultragarso poveikį sojų išspaudų fermentacijos procesui ($p < 0,05$) ir nustatyta, kad 18 kHz ultragarsinis apdorojimas padidino pieno rūgšties bakterijų prieaugį 10,5 % fermentacijos pabaigoje, lyginant su kontroliniu mėginiu. Atrinktos pieno rūgšties bakterijų padermės augalinių gėrimų gamybos atliekų (permeatų) konversijai į antimikrobinius bioproduktus. Nustatyta, kad ryžių ir avižų permeatų fermentacijos metu didžiausi pieno rūgšties kiekiai (2,48–3,24 g/l) susidaro fermentacijos 24–36 val., o 48 val. fermentuotų tiriamųjų mėginių antigrybinis aktyvumas padidėja vidutiniškai 14,6 %, lyginant su 24 val. fermentuotais mėginiais. Taip pat nustatyta, kad PRB fermentacija yra efektyvus bioapdorojimo būdas, leidžiantis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažinti *Fusarium* spp. produkuojamų mikotoksinų, deoksinivalenolio ir jo konjugatų kiekius užterštoje kviečių biomasėje, o mikotoksinų detoksifikacijos mechanizmas užterštuose kviečiuose gali būti susijęs ne tik su mikrobų konjugacija, bet ir su mikotoksinų fermentiniu skaidymu.
4. Gauti statistiškai reikšmingi skirtumai vertinant pagamintų produktų biostimuliacinį aktyvumą ($p < 0,05$). Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto ir sojų išspaudų baltymų hidrolizatai, gauti fermentinės hidrolizės būdu kartu su išankstiniu mėginio apdorojimu ultragarsu ir naudoti kviečių sėklų apvėlimui, reikšmingai padidino sėklų sudygimo procentą (atitinkamai 8,9 % ir

15,1 %), daigų ilgį (atitinkamai 31,1 % ir 34,1 %) ir šaknų ilgį (atitinkamai 25,7 % ir 17,9 %), taip pat daigų ir šaknų svorį. Kukurūzų krakmolo gamybos šalutinio produkto baltymų hidrolizato panaudojimas kviečių želmenų lapų purškimui padidino kviečių atsparumą šalčio stresui: baltymų hidrolizato purškimas kviečių grūdinimo metu padidino išlikusių augalų skaičių apie 2 kartus, o baltymų hidrolizato panaudojimas augalų atgaivinimui po šalčio streso padidino išlikusių augalų skaičių vidutiniškai 46,6 %. Neapdoroti permeatai žymiai padidino kviečių daigumo parametrus, o permeatai, fermentuoti pieno rūgšties bakterijomis, reikšmingai pagerino *Fusarium* spp. užterštų kviečių daigumo parametrus.

ABBREVIATIONS

3-ADON – 3-acetyl-deoxynivalenol
15-ADON – 15-acetyldeoxynivalenol
AACC – American Association of Cereal Chemists
Ala – alanine
AP – almond permeate
CP – coconut permeate
CFU – colony forming units
CSL – corn steep liquor
D3G – deoxynivalenol-3- β -D-glucoside
DH – Degree of hydrolysis
DON – deoxynivalenol
FAA – free amino acids
GP – germination percentage
GRAS – Generally Recognized as Safe
GSB – ground soya bean
HP – hydrolyzed protein
HPLC-TOF-HRMS – High-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight high resolution mass spectrometry
LA – lactic acid
LAB – lactic acid bacteria
LOD – Limit of Detection
LOQ – Limit of Quantitation
LT₅₀ – temperature at which 50% of plants die
OP – oat permeate
PC – press cake
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SP – soya permeate
SPC – soya press cake
PDA – Potato Dextrose Agar
PH – protein hydrolysate
RP – rice permeate
MRS – de Man, Rogosa and Sharpe
TBC – total bacteria count
TTA – total titratable acidity
UFLC – ultrafast liquid chromatography
US – ultrasound treatment

INTRODUCTION

Motivation for the research. The changing agricultural approach to the sustainable production of crop products is encouraging an increasing focus on reducing the use of chemical fertilizers through the use of environmentally friendly biostimulants. Biostimulants are various substances and microorganisms of natural origin that promote physiological processes in plants, improve the efficiency of nutrient uptake, enhance plant development and have a positive impact on crop yields as well as increase plant resistance to abiotic and biotic stress. Usually, biostimulants contain humic substances, organic substances enriched with biologically active components, inorganic salts (including phosphite), seaweed extracts, chitin and chitosan derivatives, free amino acids and hydrolysed protein products.

During the development of agriculture in the conditions of climate change, attention must be paid to the ability of biostimulants of protein origin to stimulate the growth of plants, increase crop yield and increase the resistance to abiotic and biotic stress of crops. Food processing by-products and wastes generated in food industry contain a lot of valuable components, such as proteins, and usually they are used irrationally, discarded, used for compost or for the production of feed. These by-products are generated in large quantities and pose a serious environmental problem. The selection and application of biotechnological solutions for the conversion of by-products into value-added products, including biostimulants, is directly linked to the implementation of the circular economy action plan: increasing raw material resources and organizing sustainable production.

Plant-based protein hydrolysates are obtained by enzymatic hydrolysis to form a mixture of amino acids and peptides of different size. One of the most important factors in selecting a protein source for the production of biostimulants is the composition of amino acids, which affects the solubility of proteins, degree of hydrolysis and bioavailability of obtained hydrolysates. On the other hand, it is important to select an appropriate protease preparation, its ratio with substrate and to evaluate the efficiency of hydrolysis process by kinetic analysis. Literature draws attention to the influence of ultrasonic treatment on the changes in the composition of protein substances and the possibilities to use ultrasound pre-treatment to increase the efficiency of enzymatic hydrolysis. Ultrasound in combination with membrane technologies has been tested for the treatment of by-products (press cakes) obtained from the production of plant drinks and for the extraction of protein substances; waste products (permeates) generated during this treatment could find an application in the production of waste-derived biostimulants.

The selection of biomass for the production of biostimulants requires to pay attention to their safety: chemical and microbiological contamination. In order to avoid additional chemical or biological contamination of crops, new protocols were approved for the extraction of biologically active substances by using sustainable methods without the use of aggressive solvents. Plant-based and waste-derived protein hydrolysates are superior to those of animal origin as they require lower energy consumption and are less likely to involve biological contamination with pathogens of crops. While using plant-based biomass to produce biostimulants, attention should

be paid to the contamination of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. and the formation of secondary metabolites, DON and its conjugates. Crop contamination with *Fusarium* spp. can cause a spring rot and fungicide treatment of seeds is used in traditional agriculture to prevent it.

Fermentation is an important process in the food industry using starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) with the exclusive advantage - GRAS (Generally Recognized as Safe) status. Depending on the strain of LAB and its cultivation conditions, desirable technological properties of the final product can be obtained. Recently, the interest in LAB with antimicrobial activity and its application to increase the safety of cereal raw material has grown rapidly. According to literature, mycotoxin reduction can be obtained during LAB fermentation. This opens up new perspectives for the production of biostimulants and the development of their functional spectrum. In the view of that, biological tools for the prevention of contamination are gaining more and more attention than traditional ones, as they are more environmentally and consumer-friendly. Further enhancement of the efficiency of LAB fermentation could be related with ultrasonic equipment application to pre-treat the fermentation medium to improve its chemical composition.

In order to accelerate the production and selection of novel biostimulants, it is necessary to expand the scientific knowledge about the effects of biostimulant application on plant physiology. It should be noted that biostimulants, regardless of their constituent components, have different mechanisms of action comparing to chemical fertilizers. Testing the potential biostimulatory activity of obtained products, such as protein hydrolysates, under laboratory conditions includes complex analysis, such as seed germination study, changes in microbiological contamination, and the improvement of resistance of plants to cold stress due to protein-based biostimulant application.

The aim of the thesis is to evaluate the possibilities of ultrasound treatment in combination with the application of biotools – enzymatic hydrolysis and microbial fermentation – for the valorisation of plant-based by-products from food industry into protein hydrolysates and antimicrobial bioproducts to improve the growth and safety of winter wheat (*Triticum aestivum*).

The following tasks were set in order to achieve the aim of the thesis:

1. To select and investigate food processing by-products/waste of plant origin suitable for the development of protein hydrolysates and antimicrobial bioproducts, and to evaluate the impact of low and high frequency ultrasound treatment to increase the functionality of various plant-based by-products;
2. To evaluate the influence of ultrasound treatment of the hydrolysis of corn steep liquor and soya press cake using proteolytic enzymes and to select optimal conditions for the production of protein hydrolysates;
3. To evaluate the possibilities of producing antimicrobial bioproducts from the wastes generated in plant drink industry (permeates), using ultrasound treatment and fermentation with lactic acid bacteria and to determine the influence of

fermentation and the metabolites formed during it on the safety of wheat and its products;

4. To evaluate the biostimulatory effect of obtained products on the germination characteristics of winter wheat (*Triticum aestivum*) and the resistance to abiotic stress.

Novelty of the study. The application of selected proteases together with low (37 kHz) and high (850 kHz) frequency ultrasound pre-treatment of raw material increased the degree of hydrolysis and the amount of free amino acids in CSL and soya protein hydrolysates. CSL protein hydrolysate significantly increased the resistance to cold stress of winter wheat (*Triticum aestivum*) and significantly higher number of survived plants was obtained. The effect of antimicrobial bioproducts, made from plant-based permeates, for the inhibition of growth of *Fusarium* spp. and for the stimulation of growth of contaminated wheat was proved. Fermentation with lactic acid bacteria allows to significantly reduce the concentrations of DON and its conjugates in contaminated wheat (*Triticum aestivum*) samples and strong correlation between the degradation of mycotoxins and the enzymatic profiles of initial wheat samples was obtained.

The practical value of the work. The food industry produces large amounts of by-products and waste products, which are usually used irrationally – discarded. By applying complex biotechnological solutions, by-products/wastes of food industry can be valorised into protein hydrolysates and antimicrobial bioproducts. Enzyme preparations, proteases, were selected for the efficient production of protein hydrolysates of food processing by-products (CSL and soya) and the formation of free amino acids. The application of enzymatic hydrolysis with pre-treatment of raw materials with low (37 kHz) and high (850 kHz) frequency ultrasound resulted in a higher concentration of active components – the yield of free amino acids in the final products. Protein hydrolysates, produced from by-products (CSL and soya) using enzymatic hydrolysis in combination with ultrasound treatment, were tested for the stimulation of wheat cultivation. Moreover, the application of CSL protein hydrolysate improved the resistance of winter wheat to cold stress. The production of antimicrobial bioproducts from substrates of different origins (wastes from plant drink production) using LAB fermentation was determined. Fermented permeates inhibited the growth of *Fusarium* spp. and improved the growth of winter wheat (*Triticum aestivum*) damaged by *Fusarium* spp. microscopic fungi. For the reduction of *Fusarium* spp. contamination in wheat samples, LAB strains were selected which resulted in the greatest reduction of DON and its conjugates during wheat biomass fermentation.

Defended statements of the dissertation:

1. The efficiency of protein hydrolysates production from CSL and soy press cake can be improved by using enzymatic treatment with alkaline protease in combination with low (37 kHz) and high (850 kHz) ultrasound pre-treatment of the raw material.

2. Plant drink production by-products (oat and rice permeates) is a suitable medium for the growth of lactic acid bacteria and the production of antimicrobial bioproducts that inhibit *Fusarium* spp. microscopic fungi growth and improves the growth parameters of contaminated wheat;
3. The growth of winter wheat grains is significantly improved by seed priming with obtained bioproducts: CSL and okara protein hydrolysates and permeates and the resistance to cold stress of winter wheat is significantly increased with foliar application of CSL protein hydrolysates.

Structure and content of dissertation. The thesis is written in Lithuanian language. It consists of a list of abbreviations, an introduction, a literature review, a description of materials and methods, a presentation and discussion of the results, conclusions, a list of references, and a list of publications relevant to the subject of the dissertation. The dissertation consists of 152 pages, including 27 tables, and 18 figures. The list of references includes 225 bibliographic sources.

Publications of the research results. The results of the research have been published in 4 scientific articles in the journals indexed by Clarivate Analytics Web of Science database and were presented in three international conferences as well as during one international course.

2. RESEARCH OBJECTS AND METHODS

2.1 Research scheme

The overall structure of the research is presented in Figure 2.1.

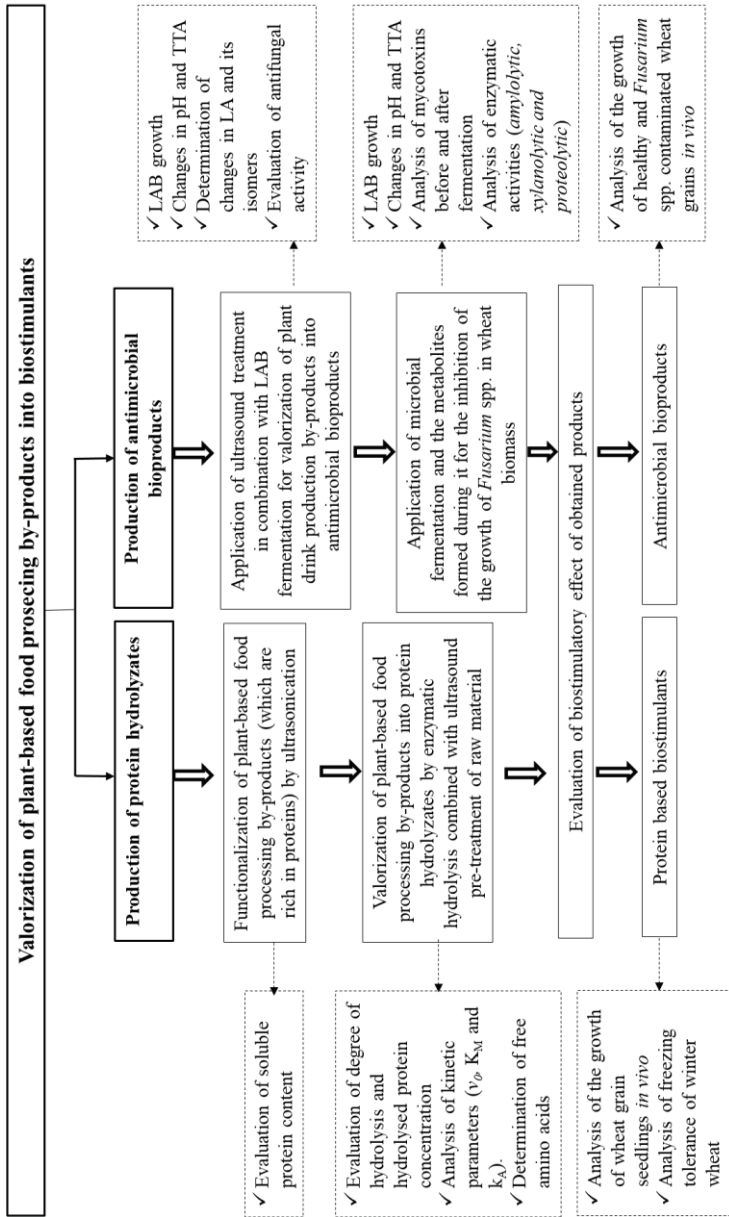


Figure 2.1 Research scheme

2.2 Research objects

Corn steep liquor (CSL), extracted from corn during the steeping process was provided by Nando (Lithuania). Soya products and permeates were provided by a food processing company (Germany). Enzymes were obtained from AB Baltic Enzymes (Vilnius, Lithuania). LAB strains were obtained from the Lithuanian University of Health Science and were stored at KTU Department of Food Science and Technology. The fungi isolates were obtained from Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. Wheat samples, infected by *Fusarium* spp., with different levels of DON were collected in the 2019 wheat harvest season from Northern Serbia, the Autonomous Province of Vojvodina. Healthy and contaminated wheat grains (*Triticum aestivum*) were obtained from JSC, KG Group (Kaunas, Lithuania). Different winter wheat genotypes used for freezing tolerance test (Gaja, Capone and Galerista) were obtained from Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

Preparation of ultrasound-treated samples. Ultrasound of different frequencies was used for the processing of by-products: 18 kHz US, 4.5 kW; 37 kHz US, 1.7, 3.0, 4.3 and 5.1 W/cm² intensity; 850 kHz, 0.9; 1.3 and 2.0 W/cm² intensity.

Preparation of CSL and okara protein hydrolysates. Enzymatic hydrolysis experiment of was carried out at various substrate and enzyme concentrations and at different pH values.

Preparation of fermented samples. Fermentation of wheat grain samples, soya products, and permeates was performed using different LAB strains under anaerobic conditions.

Preparation of different wheat genotypes for freezing tolerance test. Plants of each genotype were cold-acclimated (4°C, 14 days) and frozen in a programmable freezing chamber (-16°C, 24 h).

2.3 Research Methods

Determination of chemical composition. *Moisture and the total nitrogen content* were determined according to AACC-approved Methods 44–15.02 and 46–12.01, respectively. *Soluble proteins* were determined by using the Bradford assay. *Dietary fibre content* was determined using a Megazyme assay Kit (K-TDFR-100A/K-TDFR-200A04/17). *Reducing sugars* were determined using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method. *The fat content* was determined with the Soxhlet apparatus and extraction according to CHP-S-SVP 5.4–58: 2015. *Ash content* was determined as described by Ismail (2017). *Total bacteria count* was determined according to the Lithuanian standard method (LST EN ISO 4833, 2003)

SDS-PAGE 2-D electrophoresis system was used for wheat protein analysis (Cleaver Scientific, Rugby, UK). Proteins were qualified by comparing their molecular mass to protein markers (220–8 kDa; ColourBurst protein marker; Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA).

Evaluation of efficiency of hydrolysis process was performed using pH-stat method. Th degree of hydrolysis (DH), hydrolysed protein (HP) concentration, initial reaction rate (V_0) as well as the kinetic parameters K_M and k_A were determined.

Extraction and Determination of free amino acids. FAA were determined by ultrafast liquid chromatography (UFLC) with automated o-phthalaldehyde (OPA)/9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC).

Analysis of fermentation process. The determination of total LAB counts in by-products were performed according to (Bartkiene et al., 2019). pH values and TTA were monitored during fermentation. Total LA and its isomers were determined using the Megazyme assay kit. Determination of antifungal activity of fermented permeates was performed using an agar well diffusion method.

Mycotoxin analysis (DON and its conjugates). The samples were prepared using a modified QuEChERS method (Reinholds et al. 2016) and mycotoxin analysis was performed using HPLC-TOF-HRMS, Bruker.

Analysis of enzymatic profiles of wheat grain samples. *Amylolytic activity* was determined according to ICC Standard Method 108 (ICC, 1998). *Xylanolytic activity* was determined using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method (Bailey et al., 1992). *Proteolytic activity* was carried out as described by (Cupp-Enyard, 2008).

Wheat seed germination study was carried out using the roll method according to Dapkevicius et al.

Different wheat genotypes freezing tolerance experiment. In order to evaluate the resistance to cold stress of winter wheat the number of survived plants was counted (%), R package 'MASS' was used to calculate LT₅₀ (temperature, at which 50% of plants die) (Venables and Ripley, 2002), and SDS-PAGE 2-D electrophoresis was performed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical characteristics of potential by-products from food industry for the production of biostimulants¹⁷

Major by-products from food industry, such as by-product from corn wet milling – corn steep liquor (CSL), and by-product from plant drink production – soya press cake (SPC) could be optimal for the development of new biostimulants – protein hydrolysates. Obtained results show that CSL and SPC are rich in proteins (44.4% d. m. and 28.2%, respectively) and these by-products are an inexpensive potential source of nitrogen for the production of protein hydrolysates by biochemical industries.

By moving towards the ultimate goal of a zero-waste circular economy, a biorefinery concept combining biomass degradation, mechanical separation, and ultrafiltration, developed in Fraunhofer Umsicht (Germany) during DISCOVERY

¹⁷ This section was prepared with reference to:

Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaite, D., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>.

Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass in vivo. *Food Bioscience*. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

project, was applied for press cakes from plant drink production (soya, rice, almond, oats, and coconut) treatment and by-products (permeates) were obtained. As the analysed permeates had different chemical compositions, they could be applied in the use for protein-based formulations and antimicrobial compounds. Soya and almond permeates had the highest soluble protein content (0.037 and 0.038 mg/mL, respectively) compared to oats, rice, and coconut (~0.023 mg/L). Also, the okara liquid fraction had the highest content of mineral substances (0.1%). Permeates of rice and oat had the highest contents of reducing saccharides (12.04 and 9.62 mg/mL, respectively), this allows to apply them in fermentation processes, such as the production of antimicrobials, e.g., lactic acid, in case of the production of biopesticides.

3.2. Improvement of protein functional properties by the application of ultrasound treatment

In this study, the application of low- and high-frequency US to by-products from food industry was taken into consideration.¹⁸

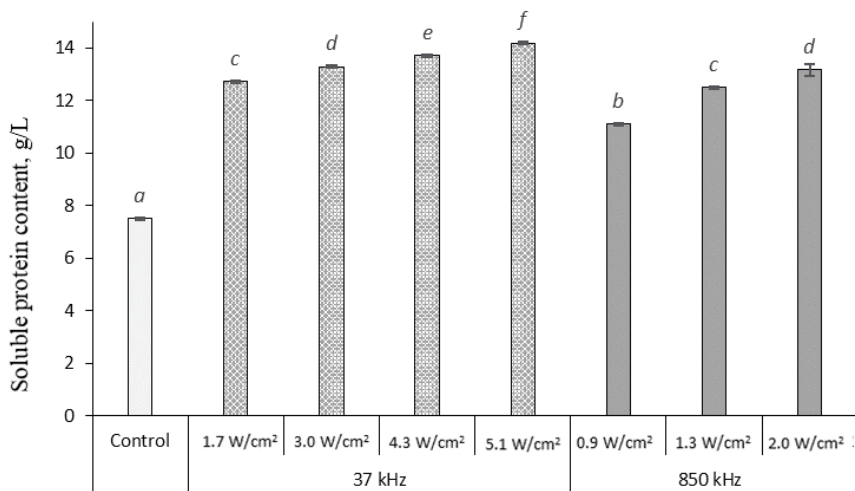


Figure 3.1. Changes in soluble protein content in corn steep liquor (CSL) samples after low- (37 kHz) and high-frequency (850 kHz) ultrasound treatment at different intensities (1.7, 3.0, 4.3, and 5.1 W/cm² – 37 kHz and 0.9, 1.3, and 2.0 W/cm² – 850 kHz) for 30 min at 50 °C, pH 9.0. Data expressed as a mean value (n = 3) ± SD; SD – standard deviation; ^{a–f} Means with different letters are significantly different (p < 0.05).

¹⁸ This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaite, D., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>.

The results show that US power at low as well as at high frequency significantly affected soluble protein content in CSL samples (Fig. 3.1). US treatment at 37 and 850 kHz increased the soluble protein content by 79.7% and 63.4%, respectively, compared to the control sample (7.5 g/L). The highest CSL soluble protein concentration (14.2 g/L) was obtained using low-frequency US (37 kHz) at highest intensity (5.1 W/cm²) (increased by 89.3% compared to the untreated sample). Using high-frequency US highest soluble protein content in CSL (13.2 g/L) was detected after exposure to 2.0 W/cm² intensity.

Evaluating US treatment for soya press cake solubilization in all cases (Fig. 3.2) a statistically significant ($p < 0.05$) increase was obtained.¹⁹

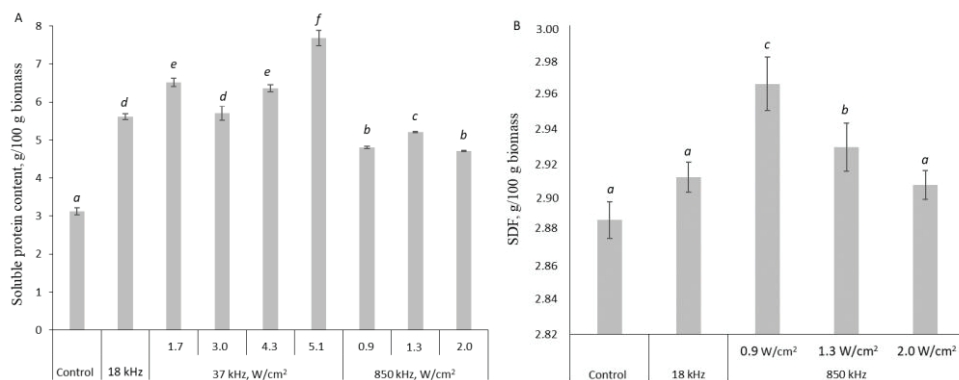


Figure 3.2. Soluble protein (A) and soluble dietary fibre (B) contents in soya press cake (SPC) samples sonicated with low-frequency (18 kHz) and high-frequency (850 kHz) ultrasound at different intensities (0.9, 1.3, and 2 W/cm²). Data expressed as a mean value ($n = 3$) $\pm$ SD; SD – standard deviation. Different superscript letters mark significant differences between mean values. ($p < 0.05$);

The highest content of soluble proteins (2.5-fold higher than in the control sample) was found in okara sample treated with low-frequency (37 kHz) and high intensity (5.1 W/cm²) ultrasound. Meanwhile, in the samples treated with 18 kHz ultrasound, the content of soluble proteins increased on average 2-fold. Treatment of okara with high-frequency ultrasound increased the amount of soluble proteins by an average of 1.6-fold. Soluble and insoluble fibrous materials were analysed in parallel in sonicated soya samples as well as in control samples (Fig. 3.2 B). Ultrasonication of soya press cake increased the soluble fraction in the tested samples and the highest content of soluble fibre (2.963 g/100 g) was found in the SPC sonicated at high frequency and low intensity (0.9 W/cm²). This indicates that part of the material in the SPC changes from an insoluble form to a soluble one upon exposure to ultrasound.

¹⁹ This section was prepared with reference to Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsiene, K., Navickaite, B., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Bartkiene, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

3.3. Development of protein-based biostimulants from CSL and soya press cake by enzymatic hydrolysis in combination with ultrasound treatment²⁰

3.3.1. Effect of ultrasonication on the enzymatic treatment

To determine the optimal conditions for enzymatic treatment analysis at different substrate (Fig. 3.3) and different enzyme concentrations (Fig. 3.4) were performed. A Kruskal–Wallis H test showed that there was a statistically significant difference in hydrolysed protein content between the different samples at certain time intervals ($p < 0.05$).

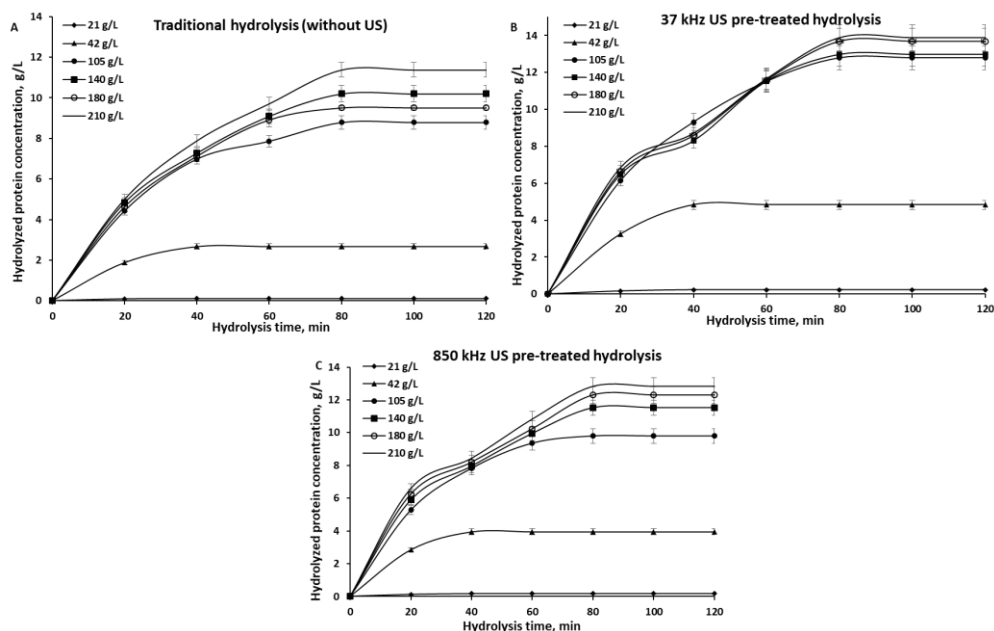


Figure 3.3. Hydrolysed protein concentrations obtained by traditional hydrolysis (a), 37 kHz US pre-treated hydrolysis (b) and 850 kHz pre-treated hydrolysis (c) at different substrate concentrations ($E_0 = 1,05$ g/L, $pH = 9.0$, $T = 70$ °C). US – ultrasound treatment.

The study showed (Fig. 3.3) that US pre-treatment enhanced the hydrolysis rate, especially at higher substrate concentrations (105, 140, 180, and 210 g/L). At the highest substrate concentration (210 g/L), the application of low frequency (37 kHz) US was more efficient than high frequency (850 kHz) US treatment and resulted in an increase in HP concentration after the first 20 min (36.8% and 31.6%, respectively) compared to traditional hydrolysis (5.01 g/L). Furthermore, the duration of enzymatic exposure to CSL was taken into consideration, and the highest HP content (13.9 and

²⁰ This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaite, D., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>.

12.82 g/L, respectively) was obtained after 80 min compared to the control sample (11.37 g/L). In the perspective to determine the optimal conditions for enzymatic treatment, different enzyme concentrations were tested, and an increase in HP content was noted in all tested samples (Fig. 3.4).

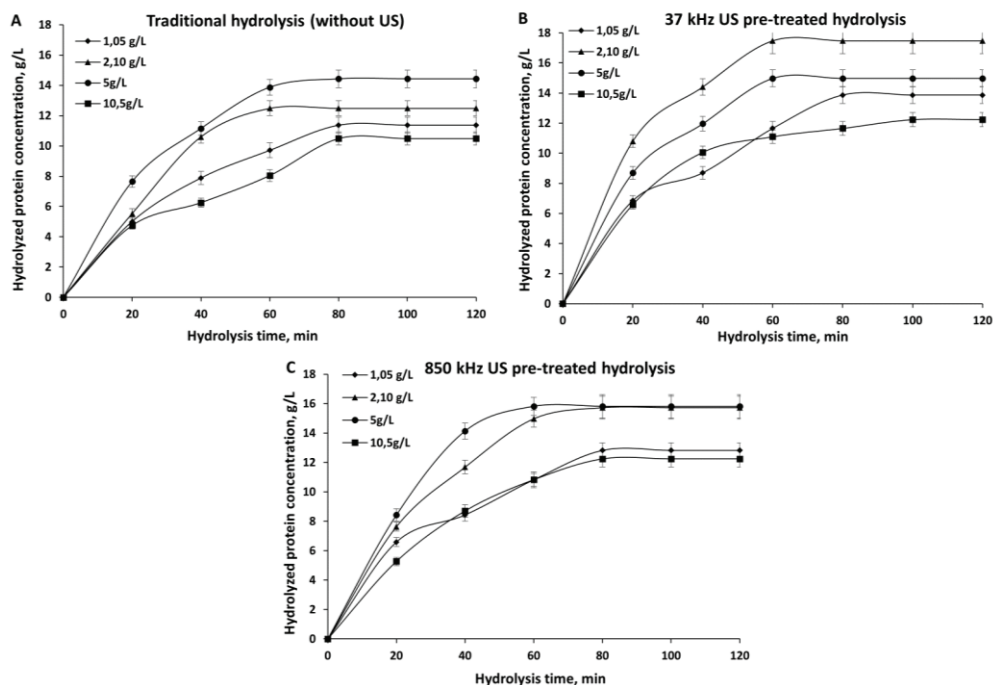


Figure 3.4. Hydrolysed protein concentrations obtained by traditional hydrolysis (a), 37 kHz US pre-treated hydrolysis (b) and 850 kHz pre-treated hydrolysis (c) at different enzyme concentrations ($C_0 = 210$ g/L, pH = 9.0, $T = 70$ °C). US – ultrasound treatment.

Using traditional hydrolysis, the maximum HP concentration (14.4 g/L) was obtained after 80 min using 5 g/L of enzyme. High-frequency (850 kHz) US pre-treatment accelerated hydrolysis and the maximum HP content (15.8 g/L) was achieved after 60 min using 5 g/L of the enzyme. The results indicate that 37 kHz US pre-treatment remarkably improves the enzymatic hydrolysis process. The application of low-frequency US before enzymatic hydrolysis resulted in the highest HP concentration (17.5 g/L) using the lowest enzyme concentration (2.1 g/L) and shortest hydrolysis time (60 min) (Fig. 3.4).

The same tendencies were obtained with soya press cake investigation. When enzymatic hydrolysis is applied in combination with ultrasound treatment, a higher amount of hydrolysed protein concentration is obtained in all cases but the most effective impact was noted in the treatment with 37 kHz ultrasound (5.1 W/cm² intensity) and the highest HP concentrations was obtained after 80 min using four times less of the enzyme (40 μ L/100 g) comparing to the traditional hydrolysis.

The results for kinetic parameters confirm that ultrasonic pre-treatment can accelerate enzymatic hydrolysis: the initial hydrolysis rate (v_0 , g/L) increased on average by 36.2% with ultrasonic treatment. The Michaelis–Menten constant (K_M) indicates the affinity of an enzyme for a given substrate: the lower the K_M value, the higher the affinity of the enzyme for the substrate. A major decrease of K_M , on average by 33.5%, was noted for the enzymatic hydrolysis of CSL with 37 kHz US pre-treatment. The decrease in K_M reveals that US pre-treatment improves the affinity between enzyme and substrate. Additionally, a 30% increase of k_A value was observed comparing low-frequency US-assisted CSL hydrolysis with the traditional process.

3.3.2. Influence of ultrasonic pre-treatment for enzymatic hydrolysis of CSL and okara on FAA profile

At this stage, the composition of FAA after hydrolysis of CSL and SPC with alkaline protease in combination with US pre-treatment at different frequencies was determined. The results show that positive changes in the total amount of FAA were obtained as well as changes in separate FAA. The application of US for the treatment of CSL resulted in a higher FAA yield, which has a relationship with HP content ($r = 0.943$). The following tendencies for the production of FAA upon applying US and enzymatic hydrolysis can be stated: (i) 37 kHz US pre-treatment of CSL increased the total FAA content up to 2.3 times, while an increase of up to 2.15 times was measured in the samples treated with 850 kHz as compared to the reference samples; (ii) traditional enzymatic hydrolysis of CSL was found to have a slight difference in FAA yield (an increase of up to 1.6 times was measured).

Additionally, okara protein hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis in combination with 37 kHz (5.1 W/cm^2) ultrasonic treatment was evaluated to determine the free amino acid composition. The obtained results confirm that low-frequency (37 kHz) ultrasonic treatment is a potential technology for the production of biostimulants in combination with enzymatic hydrolysis, as the bioproduct obtained in this way has a 5-fold higher content of free amino acids than the control sample.

3.4 Development of bioproducts with antimicrobial activity using LAB fermentation

3.4.1. Influence of ultrasonic treatment on the fermentation with *Lactobacillus paracasei* (LUHS 244) of soya products ²¹

The effect of sonicated fermentation media on the growth of LAB using different treatment conditions is an essential point regarding the development of novel fermented products. Different adaptation of LAB in different fermentation media was noted. The development of LAB biomass in the soya beans after 30h of fermentation was found to be 51.7% greater as compared to the SPC samples. The application of

²¹ This section was prepared with reference to Juodeikiene, G., Trakselyte-Rupsiene, K., Navickaite, B., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Bartkiene, E., Lele, V., Rueller, L., Robert, J., Arnoldi, A., Aiello, G., Glasner, C. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 152(112337). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112337>

sonication to SPC (before fermentation) resulted in both a greater change in LAB concentration and a 10.54% higher content of LAB biomass after fermentation.

3.4.2. Bioconversion of by-products from the food industry into bioproducts with antimicrobial activity²²

The fermentation process of permeates was established using different LAB strains and the kinetic results of LAB growth shows that the efficiency of permeates fermentation process depends on the type of permeate, LAB strain, and the duration of fermentation.

Decreases in pH were observed in all fermentation cases. According to TTA results, the most intensive formation of organic acids in most cases occurred from 12 to 48 h of fermentation. From an industrial point of view, desirable are those microorganisms which are capable of rapidly fermenting cheap raw materials and which ensure the high formation of the required stereo-specific lactic acid at low pH conditions. In the case of our study, the highest contents of LA were produced in the rice, oat, and soya permeates (2.48–3.24 g/L) during 24–36 h of fermentation with *Lactobacillus* spp.

The microbiological analysis of fermented permeate samples revealed that inhibition zone ranged on average from 12.00 to 19.25 mm. (Table 3.1). The increase of antifungal activities on average by 14.6% with the extension of fermentation time (48 h) in fermented permeates was obtained, comparing to 24 h fermented permeate samples.

Table 3.1. Antifungal activity of fermented permeates against *Fusarium* spp. strains

Samples	Inhibition zone on agar plate against fungi, mm					
	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F</i>		<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
RP _{LUHS173}	12.50±0.6 ^a	19.25±1.5 ^c	12.00±0.8 ^a	15.25±1.3 ^c	12.50±1.0 ^a	15.00±0.8 ^c
OP _{LUHS173}	13.75±0.5 ^b	13.50±0.6 ^b	13.75±2.4 ^b	14.67±0.6 ^b	13.50±1.9 ^b	14.75±0.5 ^b
OP _{LUHS206}	17.00±1.2 ^d	17.75±0.5 ^d	16.00±0.5 ^d	17.50±0.6 ^d	16.75±0.5 ^d	18.75±0.5 ^e

Data expressed as a mean value (n = 3) ± SD; SD – standard deviation. ^{a-c} Means within a column with different superscript letters are significantly different (p < 0.05); RP_{LUHS173} and OP_{LUHS173} – rice and oat permeates fermented with *L. brevis*, respectively; OP_{LUHS206} – oat permeate fermented with *L. farraginis*.

²² This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass *in vivo*. *Food Bioscience*. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

3.4.3. The influence of *Lactobacillus* fermentation and the metabolites formed during it on the growth of *Fusarium* spp. in wheat biomass²³

3.4.3.1. Analysis of DON and its conjugates in *Fusarium* spp. contaminated wheat samples by HPLC-TOF-HRMS

In the analysed wheat samples using HPLC-TOF-HRMS, DON and three DON conjugates were obtained: D3G, 15-ADON, and 3-ADON (Table 3.2).

Table 3.2. The levels (µg/kg) of mycotoxins detected by HPLC-TOF-HRMS in wheat samples

Wheat Samples	DON, µg/kg	D3G, µg/kg	3-ADON, µg/kg	15-ADON, µg/kg
W1	68.8 ± 3.4 ^a	20.4 ± 1.0 ^a	18.0 ± 0.9 ^c	189.0 ± 9.5 ^d
W2	504.0 ± 25.2 ^c	151.0 ± 7.6 ^c	14.9 ± 0.8 ^b	89.5 ± 4.5 ^{ab}
W3	314.0 ± 15.7 ^b	58.1 ± 2.9 ^b	11.0 ± 0.6 ^a	108.0 ± 5.4 ^b
W4	786.0 ± 39.3 ^d	159.0 ± 8.0 ^c	23.8 ± 1.2 ^d	81.6 ± 4.1 ^a
W5	453.0 ± 22.7 ^c	72.3 ± 3.6 ^b	21.0 ± 1.1 ^d	148.0 ± 7.4 ^c
W6	1330.0 ± 66.5 ^e	222.0 ± 11.1 ^d	34.0 ± 1.7 ^e	178.0 ± 8.9 ^d

W1–W6 – wheat samples; DON – deoxynivalenol; D3G – deoxynivalenol-3-glucoside; 3-ADON – 3-acetyldeoxynivalenol and 15-ADON – 15-acetyldeoxynivalenol; Mycotoxin detection limits were as follows: DON (LOD 4 µg/kg, LOQ 12 µg/kg), D3G (LOD 4,5 µg/kg, LOQ 13 µg/kg), 3-ADON (LOD 3,6 µg/kg, LOQ 11 µg/kg), and 15-ADON (LOD 14 µg/kg, LOQ 42 µg/kg).

This study confirmed that DON conjugates co-occur with its free forms in wheat grains and a relatively large difference in the levels of mycotoxins were noticed. In the sample of wheat 6 (W6) with highest DON amount (1,330 µg/kg), D3G content was six times lower in than DON, followed by 15-ADON (178 µg/kg), while 3-ADON contained the least (34 µg/kg). The majority of the less contaminated wheat samples contained significantly lower amounts of DON conjugates compared with their free form.

3.4.3.2. The influence of *Lactobacillus* fermentation on the detoxification of *Fusarium* spp. contaminated wheat

The effect of biological treatment on the growth of LAB under different contamination levels in the media is an essential point for the mechanism of mycotoxin degradation. A great reduction in LAB count from 8.50 to 7.61 log₁₀ CFU/g was measured with *L. casei* in samples with low contamination (DON >69 µg/kg), respectively, compared to the sample with high DON content (<1,330 µg/kg). *L. plantarum* and *L. paracasei* have not shown significant response to medium

²³ This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Hajnal, E. J., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaite, D., Cernauskas, D., Lele, V., Zadeike, D., Bartkiene, E. Challenges of *Lactobacillus* fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat - based products. *Food Control*. 2022, 134(108699). ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108699>

contamination. The lowest sensitivity for contamination was observed with *L. uvarum*, showing an increase in multiplication from 8.77 (68.8 µg/kg DON) to 9.99 (1330 µg/kg DON).

The results obtained in quantitative DON analysis confirmed the biotransformation degree (qualified as the average amount of DON) of the fermented material to be lower by 50% compared to the control sample (Fig. 3.5 A). According to the obtained results, a significant reduction in DON by 4, 2.4, 3, and 1.65 times, respectively, using fermentation can be achieved with the application of *L. uvarum* at different cereal contamination levels (1,330, 786, 504, and 314 µg/kg of DON). With the application of *L. casei*, *L. plantarum*, and *L. paracasei*, the amount of DON in the highly contaminated (1,330 µg/kg) fermented samples decreased by 42%, 56.6%, and 53.1% compared to the control samples with wheat without bio-treatment.

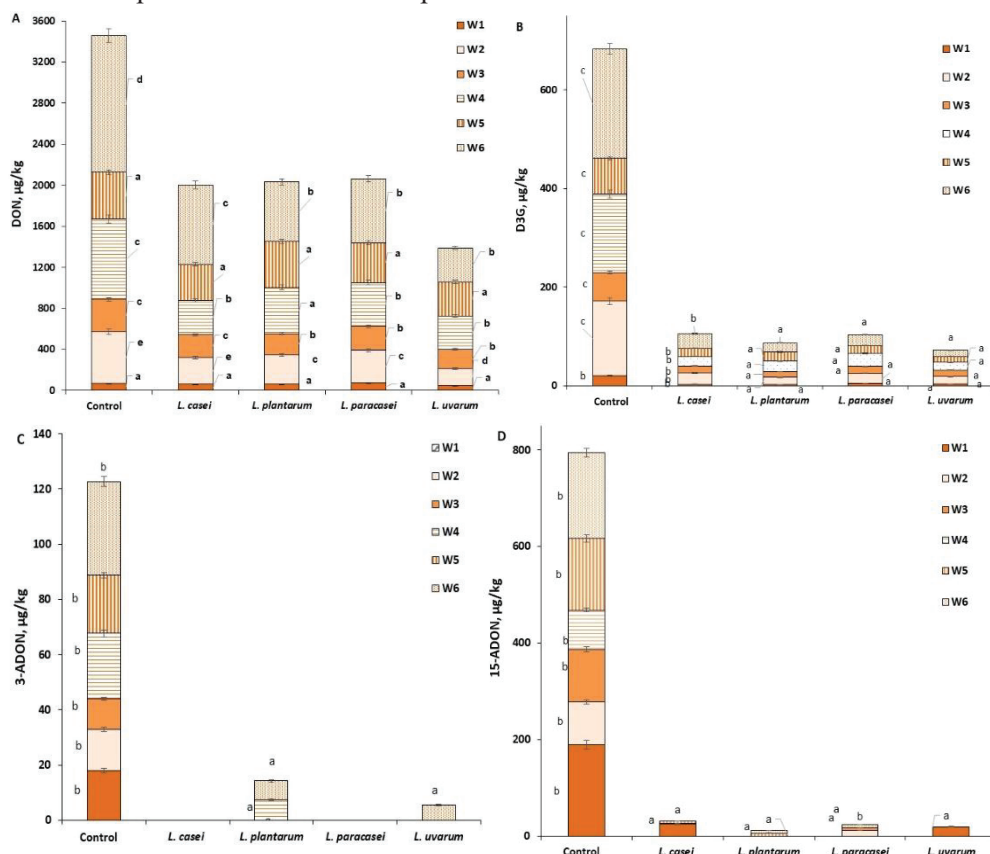


Figure 3.5. The effect of fermentation using different LAB strains (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, and *L. uvarum*) on DON (A), D3G (B), 3-ADON (C), and 15-ADON (D) content in different *Fusarium* spp.-contaminated wheat samples (W1–W6).

Quantitative analysis of masked trichothecene revealed a significant reduction of D3G, 3-ADON, and 15-ADON in the LAB-fermented wheat samples. The amount of D3G in the fermented samples decreased, on average, by 84.1% (Figure 3.5 B)

compared to the control samples without bio-treatment. Furthermore, other DON conjugates, such as 15-ADON and 3-ADON, were not detected, respectively, in the *L. uvarum* and *L. brevis* and *L. casei* and *L. paracasei* fermented samples (Figure 3.5 C, D). The novelty of this research is that fermentation with *L. uvarum* strain proofed a very positive effect on reducing the level of DON as well as its masked toxins from the wheat-based products.

3.4.3.3. Biochemical changes during LAB fermentation and its relationship with DON and its conjugates

The obtained results demonstrate that with the increase of DON and D3G in wheat grains the activity of amylases also increases, showing a very strong positive relationship between these mycotoxins and amylolytic activities ($r = 0.91$, $r = 0.97$, respectively). A very strong positive correlation was found between DON and D3G mycotoxin content in wheat and xylanase activity ($r = 0.93$; $r = 0.97$, respectively). An increase in proteolytic activity was also observed with increasing mycotoxin levels in the samples. Samples with the highest DON and D3G levels indicated the highest proteolytic activity. Strong relationship was found between these mycotoxins (DON and D3G) and proteolytic activity ($r = 0.63$; $r = 0.66$, respectively).

Most probably, mycotoxin reduction includes a combination of microbial conjugation and enzymatic degradation, both of which can be achieved by biological systems. However, the mechanism and products of degradation or conjugation have yet to be evaluated.

3.5. Evaluation of biostimulatory activity of bioproducts for wheat grain cultivation

3.5.1. Influence of protein-based biostimulants on physiological changes of winter wheat *in vivo*²⁴

In the present study, we examined the effect of new products – protein hydrolysates on the germination process of winter wheat and statistically significant effect ($p < 0.05$) of application of bioproducts on the germination characteristics was observed. The application of CSL protein hydrolysates increased the germination percentage (GP) as well as the length of root and stem on average by 9.4, 21.6 and 25.6%, respectively, compared to control samples. Similar tendencies were observed on root and stem biomass: CSL protein hydrolysates increased the fresh weight of wheat grain roots and stems on average by 21.3% and 27.1%, respectively.

Evaluating the results of okara products application for the treatment of winter wheat, it was found that okara protein hydrolysates improved the germination

²⁴ This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., Bartkiene, E., Klupsaite, D., Zadeike, D., Bendoraitiene, J., Damasius, J., Ignatavicius, J., Sikorskaite-Gudziuniene, S. Integration of Ultrasound into the Development of Plant-Based Protein Hydrolysate and Its Bio-Stimulatory Effect for Growth of Wheat Grain Seedlings In Vivo. *Plants*. 2021, 10, 1319. <https://doi.org/10.3390/plants10071319>.

percentage on average by 15.1%, compared to the control sample. Biostimulant application also resulted in the higher root (on average by 13.8%) and stem length (on average by 27.3%) of the plants. The same tendencies were observed evaluating the biomass of the plants. The results of this study confirms that the germination and growth of winter wheat seedlings can be stimulated by CSL and okara protein hydrolysates.

3.5.2. Evaluation of resistance to cold stress of winter wheat

In order to determine the influence of protein hydrolysate application to improve the resistance to cold stress of winter wheat, three different ways of bioproduct application (seed priming, foliar application during acclimation, and foliar application after freezing) and two different genotypes of winter wheat (Gaja and Capone) were analysed.

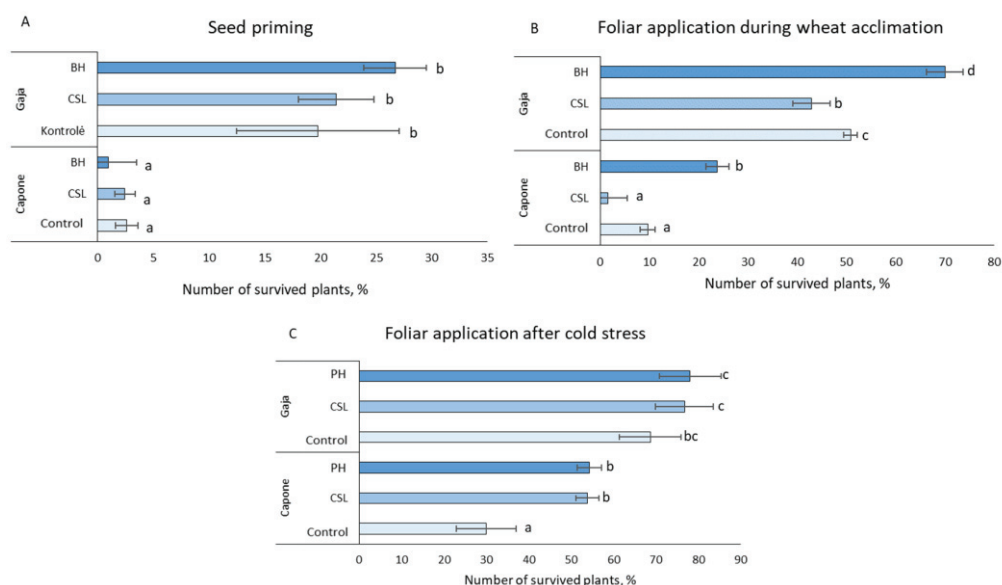


Figure 3.6. Influence of plant-based protein hydrolysate application on the resistance to cold stress of winter wheat (-16.0°C temperature). A – seed priming; B – foliar application during wheat acclimation; C – foliar application after freezing. Control – samples treated with water; CSL – untreated corn steep liquor; PH – corn protein hydrolysate. Capone – winter wheat genotype less resistant to cold; Gaja – winter wheat genotype more resistant to cold.

It was found that seed priming (Fig. 3.6 A) was more effective for Gaja genotype treatment and the use protein hydrolysate increased the number of survived plants (NSP) by 35.2%. Foliar application of protein hydrolysate during wheat acclimation (Fig. 3.6 B) resulted in the increase of NSP of Capone and Gaja genotypes by 2.5 and 1.4 times, respectively. The application of bioproduct for fast recovery after cold stress (Fig. 3.6 C) increased NSP plants by 80.4% for Capone and 12.7% for Gaja

genotypes. Evaluating the changes of LT₅₀ value, it was noted that the application of protein hydrolysate had a statistically significant effect ($p < 0.05$) on the resistance to cold of different genotypes. The obtained results show that LT₅₀ value of Gaja and Capone genotypes can be reduced by an average of 0.40°C by protein hydrolysate application, while the use of PH for the treatment of Galerista genotype, which is highly resistance to cold, can reduce LT₅₀ value by an average of 0.24°C. The effect of biotreatment on the molecular markers of different winter wheat genotypes (Gaja and Capone) were analysed.

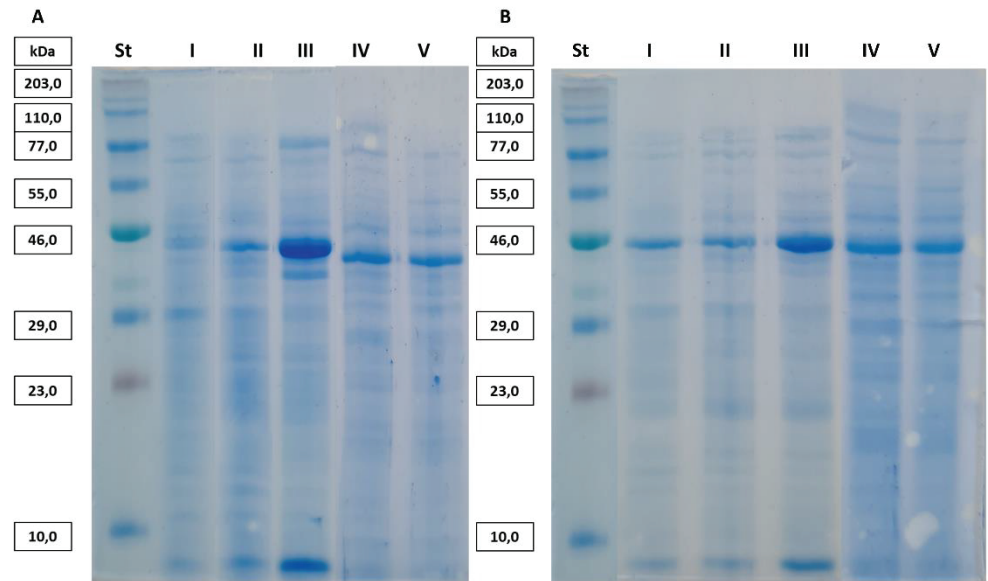


Figure 3.7. Molecular markers of wheat genotypes during cold acclimation. I – control samples at the beginning of acclimation process; II, III – wheat samples without treatment with PH in the middle and at the end of acclimation, respectively. IV, V – wheat samples, treated with PH, in the middle and at the end of acclimation, respectively. A – Gaja; B – Capone;

Gel electrophoresis of winter wheat samples of both genotypes (Gaja and Capone) indicate that dominant proteins in wheat are 46 kDa and very low molecular weight (< 10 kDa) peptides (Fig. 3.7). Analysis of protein changes in wheat samples during wheat acclimation shows that the highest levels of these protein components are formed at the end of hardening in the samples without treatment with PH (Fig. 3.7 A, B sample III). When evaluating the changes of proteins during wheat acclimation in wheat samples treated with PH, it can be seen that the higher content of the mentioned protein components is formed in the middle of acclimation (Fig. 3.7 A, B sample IV) and at the beginning of acclimation in the treated samples (Fig. 3.7 A, B sample V).

3.5.3. Evaluation of biostimulatory activity of bioproducts with antimicrobial properties²⁵

The effect of applying permeates (without additional treatment) to improve the growth of wheatgrass during 7 days was investigated. Obtained results show that germination percentage (GP) of wheatgrass was significantly increased by application soya, coconut, and almond permeates on average by 7.6%, 8.4% and 8.1%, respectively. Meanwhile, the germination of wheatgrass after coating the seeds with RP and OP increased GP on average by ~3%. Mostly, permeates affected the growth of wheatgrass biomass and the greatest increase of wheatgrass stem and root biomass on average by 1.78 times and 2.38 times, respectively, was observed with SP application, compared to control sample. Similar tendencies were observed for the effect of CP and AP application, which resulted in the increase of wheatgrass stem and root biomass on average by 1.77 times and 2.13 times, respectively. Seed coating with OP and RP did not have such a significant effect: stem and root biomass increased on average by 1.3 times. Wheatgrass seed coating with permeates also affected the length of stem and root. The highest increase in stem length on average by 17.3, 18.5 and 11.4% has been obtained with CP, AP and SP, respectively. Root length was increased only by CP and AP application (10 and 8.3%, respectively). OP and RP application did not have any positive effect on the length of wheatgrass stem and root.

3.5.4. Fermented permeate application for the stimulation of wheat seed, affected by *Fusarium* spp. microscopic fungi, germination *in vivo*²⁵

Additional study was performed in order to evaluate biostimulatory effect of fermented permeates. For this analysis wheat seeds, naturally affected by *Fusarium* spp. microscopic fungi were selected. The seeds used in this experiment were provided by JCS Kauno grūdai.

Based on the results of antifungal activity (Table 3.1), the following 48h fermented permeates were selected for the stimulation of *Fusarium* spp. affected wheat seeds germination. The study showed that application of fermented permeates on contaminated wheat seeds significantly affected the germination percentage and the length of stem and root. The greatest increase in GP (on average by 12.5%) was obtained with OP_{LUHS206} application, while RP_{LUHS173} was found to increase GP on average by 3.1%, compared to the control sample. The greatest increase in root length was found by primming the grains with oat permeate, the root length increased by 14.1%, compared to the control. Seed treatment with fermented oat permeate had the greatest influence on seedling length which increased on average by 5.0%.

²⁵ This section was prepared with reference to Trakselyte-Rupsiene, K., Juodeikiene, G., Alzbergaitė, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Ozogul, F., Rueller, L., Robert, J., Rocha, J. M. F. Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass *in vivo*. *Food Bioscience*. 2022, 46(101427). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>

The use of fermented permeates with antifungal activity is an effective strategy to increase the germination of contaminated wheat seeds and the efficiency of this treatment with a specific biostimulator depends on the type of permeate used for primary seed coating and on the LAB strain used for bio-treatment of raw material.

CONCLUSIONS

1. Plant based by-products from the food industry suitable for the production of biostimulants were selected: corn steep liquor and soya press cake with high protein content (44.4% d. m. and 28.2%, respectively) suitable for the production of protein hydrolysates and permeates – suitable for the production of bioproducts with antimicrobial activity. The ultrasound treatment of different frequencies had a statistically significant effect on the functionalization of by-products: low-frequency (37 kHz) and high-frequency (850 kHz) ultrasound increased the soluble protein content in corn steep liquor by 79.7 and 63.4%, respectively, as well as in soya samples by 2-fold.
2. Optimal conditions of enzymatic hydrolysis for the production of protein hydrolysates were selected and it was found that low-frequency (37 kHz) and highest intensity (5.1 W/cm²) sonication was the most efficient and the highest concentrations of hydrolysed proteins (17.5 and 14.7 g/L, respectively) were obtained with lower enzyme content and shortest hydrolysis time (60 and 80 min., respectively), compared to traditional enzymatic hydrolysis. Also, 37 kHz ultrasonic treatment increased the amount of free amino acids in the final protein hydrolysates.
3. The sonication of the SPC positively affected LAB fermentation process and 10.54% higher content of LAB biomass was obtained. LAB strains were selected for bioconversion of permeates into antimicrobial bioproducts. It was found that during the fermentation of rice and oat permeates, the highest amounts of lactic acid (2.48–3.24 g/L) were formed at the end of fermentation (24–36 hours), and the antifungal activity of 48 h fermented samples increased on average by 14.6% compared to 24 h fermented samples. Additionally, it was determined that LAB fermentation is an effective biotreatment which leads to statistically significant reduction of DON and D3G as well as conjugates such as 3-ADON and 15-ADON, levels in wheat biomass, moreover, our study demonstrates that the mechanism of mycotoxin degradation in wheat samples could be related not only with microbial conjugation but also with enzymatic degradation of mycotoxins.
4. Statistically significant differences in the evaluation of biostimulatory activity of bioproducts were obtained ($p < 0.05$). CSL and SPC protein hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis in combination with ultrasound treatment significantly increased the germination parameters of winter wheat (germination percentage increased on average by 8.9 and 15.1%, respectively; stem length increased on average by 31.1 and 34.1 %, respectively; root length increased on average by 25.7 and 17.9%, respectively). Foliar application of CSL protein hydrolysate during wheat hardening increased their resistance to cold stress (foliar application of PH during wheat acclimation increased the number of survived plant on average by 2-fold; foliar application of protein hydrolysate after cold stress increased the number of survived plant on average by 46.6%). Permeates without bio-treatment significantly ($p < 0.05$) increased the germination parameters of wheat, while fermented permeates improved the germination of *Fusarium* spp. contaminated wheat.

LITERATŪRA

1. XU, L., and D. GEELLEN. Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9(1567). doi: 10.3389/fpls.2018.01567
2. ROUPHAEL, Y., and G. COLLA. Editorial: biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11(40). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
3. DOMINGUEZ, J., and C., A. EDWARDS. *Relationships between composting and vermicomposting. Vermiculture technology earthworms, organic wastes, and environmental management* [interaktyvus]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, chapter 2, pp. 11–26. [žiūrėta 2023 02 18]. ISBN-13:978-1-4398-0988-4 Prieiga per <https://books.google.lt/>
4. JOLAYEMI, O. L., et al. Protein-based biostimulants to enhance plant growth—state-of-the-art and future direction with sugar beet as an example. *Agronomy*. 2022, 12(3211). <https://doi.org/10.3390/agronomy12123211>
5. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) 2019/1009 Europos Komisija, 2019 birželio 5d. [interaktyvus] [žiūrėta 2023 02 14] Prieiga per: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&from=EN>
6. GARCÍA-SÁNCHEZ, F. et al. Scientific advances in biostimulation reported in the 5th biostimulant world congress. *Horticulturae*. 2022, 8(665). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070665>
7. YASEEN, A. A., and M. TAKACS-HAJOS. The effect of plant biostimulants on the macronutrient content and ion ratio of several lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars grown in a plastic house. *South African Journal of Botany*. 2022, 147, 223-230. ISSN 6254-6299. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.001>
8. DE DIEGO, N., and L. SPÍCHAL. Presence and future of plant phenotyping approaches in biostimulant research and development. *Journal of Experimental Botany*. 2022, 73(150), 5199–5212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac275>
9. Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro įsakymas „dėl lietuvių respublikos rinkai pateikiamų ir tiekiamų trešiamųjų produktų įtraukimo į identifikavimo sąrašą ir išbraukimo iš šio sąrašo tvarkos aprašo Lietuvos Respublikos rinkai pateikiamų ir tiekiamų trešiamųjų produktų identifikavimo sąrašo patvirtinimo“, 2019 m. gegužės 10 d., Nr. 3D-292, Vilnius, Lietuva.
10. DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 2015, 196, 3–14. ISSN 0304-4238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
11. European Commission. (2016a). Circular economy package – proposal for a regulation of the european parliament and of the council: In: 2016/0084. Brussels: European Commission. [interaktyvus] [žiūrėta 2022 02 26] Prieiga per: <https://eurlex.europa.eu/>
12. European Commission (2016b). Circular economy: new regulation to boost the use of organic and waste-based fertilisers. Brussels: European Commission. [interaktyvus] [žiūrėta 2022 02 26] Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>
13. ONG, V. Z., and T. Y. WU. An application of ultrasonication in lignocellulosic biomass valorisation into bio-energy and bio-based products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020, 132(109924). ISSN 1364-0321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109924>
14. DE CORATO, U., et al. Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value

- added products associated to some emerging markets: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018, 88, 326-346. ISSN 1364-0321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.041>
15. FUELL, K., et al. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry Reviews*. 2010, 48(7), 513-520. ISSN 0981-9428. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.008>
 16. YAKHIN, O., et al. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*. 2017, 7(2049). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
 17. SHARMA, H. S. S., et al. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*. 2014, 26, 465–490. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0101-9>
 18. FRITSCH, C., et al. Processing, Valorization and Application of Bio-Waste Derived Compounds from Potato, Tomato, Olive and Cereals: A Review. *Sustainability*. 2017, 9(8), 1492. <https://doi.org/10.3390/su9081492>
 19. European Commission (2017). Circular economy research and innovation – connecting economic & environmental gains. Brussels: European Commission. [interaktyvus] [žiūrėta 2022 02 26] Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>
 20. HAUSLER, R. E., F. LUDEWIG and S. KRUEGER. Amino acids - a life between metabolism and signaling. *Plant Science*. 2014, 229, 225-237. ISSN 0168-9452. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.011>
 21. MURALIDHARAN, N., et al. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*. 2013, 50, 1106-1113. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0440-y>
 22. LAFARGA, T., et al. Generation of bioactive hydrolysates and peptides from bovine hemoglobin with in vitro renin, angiotensin-I-converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities. *Journal of Food Biochemistry*. 2016, 40, 673-685. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12259>
 23. WILSON, H. T., M. AMIRKHANI and A.G. TAYLOR. Evaluation of gelatin as a biostimulant seed treatment to improve plant performance. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9(1006). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01006>
 24. CERDÁN, M., et al. Effect of foliar and root applications of amino acids on iron uptake by tomato plants. *Acta Horticulturae*. 2009, 830, 481-488. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.830.68
 25. POLO, J., et al. Porcine hemoglobin hydrolysate as a biostimulant for lettuce plants subjected to conditions of thermal stress. *Hort Technology*. 2006, 16, 483-487. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.16.3.0483>
 26. MARFA, O., et al. Animal protein hydrolysate as a biostimulant for transplanted strawberry plants subjected to cold stress. *Acta Horticulturae*, 2009, 842, 315-318. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.842.57
 27. MORENO-HERNANDEZ, J. M., et al. Strategies for production, characterization and application of protein-based biostimulants in agriculture: A review. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2020, 80(2), 274–289. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000200274>
 28. COLLA, G., et al. Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant Science*. 2017, 8(2202). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>

29. JAIN, B. M., and M. P. A BADVE. Novel process for synthesis of soybean protein hydrolysates and study of its effectiveness as a biostimulant and emulsifier. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. 2022, 174(108880). ISSN 0255-2701. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.108880>
30. POVERO, G., et al. A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. *Frontiers in Plant Science*. 2016, 7(435). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00435>
31. CALVO, P., L. NELSON and J. W. KLOEPPER. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*. 2014, 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
32. COLLA, G., et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticultura*. 2015, 196(30), 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
33. SESTILI, F., et al. Protein hydrolysate stimulates growth in tomato coupled with n-dependent gene expression involved in N assimilation. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9(1233). DOI: 10.3389/fpls.2018.01233
34. MORENO-HERNÁNDEZ, J. M., et al. *Biostimulant: exploring source and application. Protein hydrolysates as biostimulants of plant growth and development* [interaktyvus]. 1th ed., 2022, pp. 141-175. [žiūrėta 2023 02 16] Prieiga per: <https://link.springer.com/book>
35. TEIXEIRA, W. F., et al. Seed and foliar application of amino acids improve variables of nitrogen metabolism and productivity in soybean crop. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9(396). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00396>
36. FATHI, P., et al. Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*. 2021, 42(101110). ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101110>
37. MAZORRA-MANZANO, M. A., J. C. RAMÍREZ-SUAREZ, and R. Y. YADA. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018, 58, 2147-2163. DOI: 10.1080/10408398.2017.1308312
38. MAZORRA-MANZANO, M. A., et al. Evaluation of citrus aurantium flower as a new source of proteases for fish hydrolysate production. *Research & Reviews: Journal of Food and Dairy Technology*. 2015, 3(4), 1-4. e-ISSN:2321-6204.
39. FAULDS, C. B., et al. Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers spent grain. *Journal of Cereal Science*. 2009, 50(3), 332-336. ISSN 0733-5210. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.004>
40. Food and Agriculture Organization of the United States (FAO). Antimicrobial resistance and food of plant origin. Summary Report an FAO Meeting of Experts, 2018. [interaktyvus] [žiūrėta 2022 02 26]. Prieiga per: <https://www.fao.org/>
41. LIDDELL, C. M. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. 2003, pp. 35-43. ISBN : 089054302X
42. MCMULLEN, M., et al. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease*. 2012, 96(12), 1712-1728. e-ISSN:1943-7692. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>
43. ARSENIUK, E., et al. Transmission of *Stagonospora nodorum* and *Fusarium* spp. on triticale and wheat seed and the effect of seedborne *Stagonospora nodorum* on disease severity under field conditions. *Journal of Phytopathology*. 2008, 146(7), 339-345. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04702.x>

44. GILBERT, J., and A. TEKAUZ. Recent developments in research on *Fusarium* Head Blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2009, 22(1), 1-8. <https://doi.org/10.1080/07060660009501155>
45. GILBERT, J., and S. HABER. Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2013, 35(2), 149-174. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.772921>
46. XUE, A. G., et al. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. *Crop Protection*. 2017, 96, 97-102. ISSN 0261-2194. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.003>
47. AGRIOPOULOU, S., E. STAMATELOPOULOU, and T. VARZAKAS. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. *Foods*. 2020, 9(2), 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
48. STANCIU, O., et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat from Europe – a review. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*. 2015, 19(1), 35–60. DOI: 10.1515/auft-2015-0005
49. GUO, H., et al. Deoxynivalenol: masked forms, fate during food processing, and potential biological remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, 19(2), 895–926. DOI: 10.1111/1541-4337.12545
50. European Commission. European Commission Regulation No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 2006, L364, 5–24.
51. KHANEGHAH, A. M., et al. Deoxynivalenol and its masked forms: characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, 71, 13–24. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.012>
52. GRATZ, S. W. Do plant-bound masked mycotoxins contribute to toxicity?. *Toxins*. 2017, 9(3), 85. DOI: 10.3390/toxins9030085
53. MICHELMAYR, H., et al. Synthesis of Mono- and di-glucosides of zearalenone and alpha -/beta-zearalenol by recombinant barley glucosyltransferase HvUGT14077. *Toxins*. 2017, 9(2), 58. <https://doi.org/10.3390/toxins9020058>
54. FREIRE, L., and A. S. SANT'ANA. Modified mycotoxins: an updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 111, 189–205. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.021.
55. TERCIOLOA, C., et al. Review article: Role of satiety hormones in anorexia induction by trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 121, 701–714. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.034
56. JUAN-GARCIA, A., et al. Effects of deoxynivalenol, 3- acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol on parameters associated with oxidative stress in HepG2 cells. *Mycotoxin Research*. 2019, 35(2), 197–205. DOI: 10.1007/s12550-019-00344-0
57. JUAN-GARCIA, A., et al. Micronucleus induction and cell cycle alterations produced by deoxynivalenol and its acetylated derivatives in individual and combined exposure on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 118, 719–725. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.024
58. PINTON, P., et al. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogenactivated protein kinases. *Toxicological Sciences*. 2012, 130(1), 180–190. doi: 10.1093/toxsci/kfs239

59. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on contaminants in the food chain). Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal*, 2014, 12(12), 3916.
60. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) et al. EFSA's activities on emerging risks in 2017, Technical report. *EFSA Supporting Publications*, 2019, 16(1).
61. SEWALD N. et al. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-deoxynivalenol. *Tetrahedron*. 1992, 3(7), 953–960. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)82193-X](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)82193-X)
62. BERTHILLER, F., et al. Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013, 57(1), 165–186. doi: 10.1002/mnfr.201100764
63. DE BOEVRE, M., et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 2012, 29(5), 819–835. doi: 10.1080/19440049.2012.656707
64. SIMSEK, S., et al. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in hard red spring wheat grown in the USA. *Toxins*. 2013, 5(12), 2656–2670. doi: 10.3390/toxins5122656
65. VENDL, O., et al. Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal based food. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 2010, 27(8), 1148–1152. doi: 10.1080/19440041003801166
66. PIOTROWSKA, M. Microbiological decontamination of mycotoxins: opportunities and limitations. *Toxins*. 2021, 13(11), 819. doi: 10.3390/toxins13110819
67. EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 2006, vol. 364, pp. 324–365. [interaktyvus][žiūrėta 2022 02 26]. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>
68. EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 17 august 2006 on the prevention and reduction of *Fusarium* toxins in cereals and cereal products. *Off. J. Eur. Union*, 2006, vol. 49, pp. 35–40. [interaktyvus][žiūrėta 2022 02 26]. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>
69. MUHIALDIN, B. J., N. SAARI, and A. S. MEOR HUSSIN. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. *Molecules*. 2020, 25(11), 2655. <https://doi.org/10.3390/molecules25112655>
70. HATHOUT, A. S., and S. E. ALY. Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*. 2014, 64, 905–919. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0899-7>
71. RAGOUBI, C., et al. Mycotoxin removal by *Lactobacillus* spp. and their application in animal liquid feed. *Toxins*. 2021, 13, 185. DOI: 10.3390/toxins13030185
72. SADIQ, F. A., et al. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, 18(5), 1403–1436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
73. YAO, Y., and M. LONG. The biological detoxification of deoxynivalenol: a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, 145(11649). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.11164>
74. PAPP, L. A., et al. Insight into yeast–mycotoxin relations. *Agriculture*. 2021, 11(12), 1291. <https://doi.org/10.3390/agriculture11121291>

75. JI, C., Y. FAN, and L. ZHAO. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*. 2016, 2(3), 127–133. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.07.003
76. SMAOUI, S., et al. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* spp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162, 1132–1146. DOI: 10.1007/s12010-009-8821-7
77. DALIÉ, D. K. D., A. M. DESCHAMPS, and F. RICHARD-FORGET. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food control*. 2010, 21(4), 370–380. ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
78. SCHILLINGER, U., and J. V. VILLARREAL. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*. 2010, 21(2), 107–111. ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.010>
79. PREMA, P., et al. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*. 2010, 3, 379–386. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0127-1>
80. MAGNUSSON, J., et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 219(1), 129–135. doi: 10.1016/S0378-1097(02)01207-7
81. DIGAITIENE, A., et al. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 112(4), 732–742. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05249.x.
82. NARBUTAITE, V., et al. Influence of baking enzymes on antimicrobial activity of five bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated from Lithuanian sourdoughs. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, 47(6), 555–560. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02466.x>
83. SUPRONIENE, S., et al. Seed treatment with lactic acid bacteria against seed-borne pathogens of spring wheat. *Biocontrol Science and Technology*. 2014, 25(2), 144–154. DOI: 10.1080/09583157.2014.964661
84. HIGUERA-BARRAZA, O. A., et al. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 31(7), 558–562. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.02.007
85. JIN, J., et al. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: Kinetics and thermodynamics study. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015, 27, 46–53. ISSN 1350-4177. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.031>
86. O’SULLIVAN, J. J., et al. Applications of ultrasound for the functional modification of proteins and nanoemulsion formation: a review. *Food Hydrocolloids*. 2017, 71(8), 299–310. ISSN 0268-005X. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.037>
87. JIANG, L., et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*. 2014, 62(9), 595–601. ISSN 0963-9969. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022>
88. KARKI, B., et al. Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*. 2009, 86, 1021–1028. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1433-0>
89. JAMBRAK, A. R., et al. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*. 2008, 86(2), 281–287. ISSN 0260-8774. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004>

90. JAMBRAK, A. R., et al. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*. 2009, 93(4), 386–393. ISSN 0260-8774. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.001>
91. KHAN, A., M. R. BEG, and P. WAGHMARE. Intensification of biokinetics of enzymes using ultrasound-assisted methods: a critical review. *Biophysical Reviews*. 2021, 13(3), 417–423. DOI: 10.1007/s12551-021-00806-9
92. MASON T. J., L. PANIWNKY and J. P. LORIMER. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1996, 3(3), S253-S260. ISSN 1350-4177. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)
93. PAWAR, S. V., and V. K. RATHOD. Role of ultrasound in assisted fermentation technologies for process enhancements. *Prep Biochem Biotechnol*. 2020, 50(6), 627-634. DOI: 10.1080/10826068.2020.1725773
94. LI, S., et al. Enzymolysis kinetics and structural characteristics of rice protein with energy-gathered ultrasound and ultrasound assisted alkali pretreatments. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 31, 85-92. ISSN 1350-4177. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.12.005>
95. GARCIA-VAQUERO, M., et al. Exploring ultrasound, microwave and ultrasound–microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Mar Drugs*. 2020, 18(3), 172. doi: 10.3390/md18030172
96. QU, W., et al. Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2012, 19(5), 1021–1026. ISSN 1350-4177. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.02.006>
97. UMEGO, E. C., et al. Ultrasonic-assisted enzymolysis: principle and applications. *Process Biochemistry*. 2021, 100, 59-68. ISSN 1359-5113. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.033>
98. ABADIA-GARCIA, L. et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2016, 37(Part A), 84-90. ISSN 1466-8564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
99. ULUKO, H., et al. Pilot-scale membrane fractionation of ACE inhibitory and antioxidative peptides from ultrasound pretreated milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 2014, 7, 350-361. ISSN 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.025>
100. JIA, J., et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*. 2010, 119(1), 336-342. ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.036>
101. LIANG, Q., et al. Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*. 2017, 4,1-10. Article ID 2784146. <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>
102. RESENDIZ-VAZQUEZ, J. A., et al. Effect of ultrasound-assisted enzymolysis on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed proteins: structural characteristics, technofunctional properties and the correlation to enzymolysis. *Journal of Food Processing & Technology*. 2019,10(5). ISSN: 2157-7110. DOI:10.4172/2157-7110.1000796

103. CHEN, L., et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(6), 2600–2609. doi: 10.1021/jf103771x.
104. MOLINA, E., A. PAPADOPOULOU, and D. A. LEDWARD. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*. 2001, 15(3), 263–269. ISSN 0268-005X. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00023-6)
105. ROESCH, R. R., and M. CORREDIG. Characterization of oil-in-water emulsions prepared with commercial soy protein concentrate. *Journal of Food Science*. 2002, 67(8), 2837–2842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08825.x>
106. LEE, K. H., H. S. RYU and K. C. RHEE. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003, 80, 85–90. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0656-6>
107. LI, S., et al. Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 31, 20–28. ISSN 1350-4177. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.019>
108. SULAIMAN, A. Z., et al. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. *Biochemical Engineering Journal*. 2011, 54(3), 141–150. ISSN 1369-703X. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.006>
109. SHOKRI, A., et al. Ultrasound-assisted fermentation for enhancing metabolic and probiotic activities of *Lactobacillus brevis*. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. 2021, 166(108470). ISSN 0255-2701. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108470>
110. ROUPHAEL, Y., et al. Foliar applications of a legume derived protein hydrolysate elicit dose-dependent increases of growth, leaf mineral composition, yield and fruit quality in two greenhouse tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2017, 226, 353–36. ISSN 0304-4238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.007>
111. LUZIATELLI, F., et al. Foliar application of vegetal-derived bioactive compounds stimulates the growth of beneficial bacteria and enhances microbiome biodiversity in lettuce. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10(60), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00060>
112. MARFA, O., et al. Protein hydrolysate as a biostimulant for transplanted strawberry plants subjected to cold stress. *Acta Horticulturae*. 2009, 842, 315–318. DOI:10.17660/ActaHortic.2009.842.57
113. GURAV, R. G., and J. P. JADHAV. A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, 20, 4532–4539. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1405-z>
114. ERTANI, A., et al. *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 5(375). doi: 10.3389/fpls.2014.00375
115. KONDO, T., et al. A plant peptide encoded by CLV3 identified by *in situ* MALDI-TOF MS analysis. *Science*. 2006, 313(5788), 845–848. doi: 10.1126/science.1128439
116. ZHOU, Z., et al. Early signalling mechanisms underlying receptor kinase-mediated immunity in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2019, 374(20180310). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0310>
117. MARTÍNEZ-ESTESO, M. J., et al. A DIGE proteomic analysis of wheat flag leaf treated with TERRA-SORB® foliar, a free amino acid high content biostimulant. *Journal of Integrated Omics*. 2016, 6(1), 9–17. DOI: 10.5584/jiomics.v6i1.188

118. ROUPHAEL, Y., et al. High-throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or from field to lab? *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9(1197). doi: 10.3389/fpls.2018.01197
119. PAUL, K., et al. Understanding the biostimulant action of vegetal-derived protein hydrolysates by high-throughput plant phenotyping and metabolomics: A case study on tomato. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10(47). doi: 10.3389/fpls.2019.00047
120. KISHOR, P. B. K., et al. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*. 2015, 6(544). doi: 10.3389/fpls.2015.00544
121. AMBREEN, S., et al. Seed priming with proline improved photosystem II efficiency and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*. 2021, 21(502). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03273-2>
122. NOROOZLO, Y. A., K. S. MOHAMMAD and M. DELSHAD. Stimulation effects of foliar applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth. *Open agriculture*. 2019, 4, 164-172. <https://doi.org/10.1515/opag-2019-0016>
123. MAINI, P. The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum*. 2006, 1, 29–43. http://fertilitasagrorum.ciec-italia.it/index_file/volumi.htm
124. MARTÍN, M. H. J., et al. Protein hydrolysates as biostimulants of plant growth and development. In: Ramawat, N., Bhardwaj, V. (eds) *Biostimulants: Exploring Sources and Applications. Plant Life and Environment Dynamics*. Springer, Singapore, 2022.
125. IQBAL, M., et al. Impacts of heat stress on wheat: a critical review. *Advances in Crop Science and Technology*. 2017, 5(251). DOI: 10.4172/2329-8863.1000251
126. PEQUENO, D. N. L., et al. Climate impact and adaptation to heat and drought stress of regional and global wheat production. *Environmental Research Letters*. 2021, 16(5). DOI 10.1088/1748-9326/abd970
127. ERTANI, A., et al. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*. 2013, 364, 145-158. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>
128. GARCÍA-GARCÍA, A. L., et al. Pure organic active compounds against abiotic stress: a biostimulant overview. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11(575829). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575829>
129. HAYAT, S., et al. A. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*. 2012, 7(11), 1456-1466. doi: 10.4161/psb.21949
130. GARCÍA-GARCÍA, A. L., et al. Pure organic active compounds against abiotic stress: a biostimulant overview. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11(575829). doi:10.3389/fpls.2020.575829
131. JIA, Y., et al. Effects of γ -aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2017, 36(1), 240-253. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9634-x>
132. MATYSIAK, K., et al. Effect of exogenous application of amino acids L-arginine and glycine on maize under temperature stress. *Agronomy*. 2020, 10(6), 769. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060769>
133. POPKO, M., et al. Effect of the new plant growth biostimulants based on amino acids on yield and grain quality of winter wheat. *Molecules*. 2018, 23(2), 470. doi: 10.3390/molecules23020470.

134. BULGARI, R., G. FRANZONI and A. FERRANTE. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*. 2019, 9(6), 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
135. MARTINEZ, V.; et al. Tolerance to stress combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. *Molecules*. 2018, 23(3), 535. doi: 10.3390/molecules23030535
136. CAO, K.; et al. Exposure to lower red to far-red light ratios improve tomato tolerance to salt stress. *BMC Plant Biology*. 2018, 18(1), 10–15. doi: 10.1186/s12870-018-1310-9
137. ASHRAF, M. A., et al. *Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: an overview*. In *advances in seed priming*; Rakshit, A., Singh, H.B., Eds.; Springer: Singapore. 2018, pp. 51–79. ISBN 978-981-13-0032-5.
138. BARTKIENE, E., et al. Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation. *Microorganisms*. 2019, 8(1), 64. doi: 10.3390/microorganisms8010064
139. GORASH, A., et al. The relationship among freezing tolerance, vernalization requirement, Ppd alleles and winter hardiness in European wheat cultivars. *The Journal of Agricultural Science*. 2017, 155(9), 1-18. DOI: 10.1017/S0021859617000521
140. VAITKEVICIUTE, G., et al. The effect of cold acclimation, deacclimation and reacclimation on metabolite profiles and freezing tolerance in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2022, 13(959118). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.959118>
141. AACC method 44-15.02. Moisture. Approved methods of the American association of cereal chemists (11th ed.), 2010. St. Paul, MN: AACC International.
142. AACC method 46-12.01. Crude protein – Kjeldahl method. Approved methods of the American association of cereal chemists (11th ed.), 2010. St. Paul, MN: AACC International.
143. WORLD HEALTH ORGANIZATION and FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis*. World Health Organization. 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331206>.
144. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
145. ISO10520:2019. Native starch. Determination of starch content. Ewers polarimetric method.
146. AOAC method 991.43 (2000). Total, soluble, and insoluble. Dietary fiber in foods.
147. AACC method 32-07.01. Soluble, insoluble, and total dietary fiber in foods and food products. Approved methods of the American association of cereal chemists (11th ed.), 2010. St. Paul, MN: AACC International.
148. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, 31(426). <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
149. AACC method 30-25.01. Crude fat. Approved methods of the American association of cereal chemists (11th ed.), 2010. St. Paul, MN: AACC International.
150. AACC method 08-01.01. Total ash. Approved methods of the American association of cereal chemists (11th ed.), 2010. St. Paul, MN: AACC International.

151. LST EN ISO 4833:1:2013 en. Maisto grandinės mikrobiologija. Bendrasis mikroorganizmų skaičiavimo metodas.
152. BARTKIENE, E. et al. Lactic acid bacteria combinations for wheat sourdough preparation and their influence on wheat bread quality and acrylamide formation. *Journal of Food Science*. 2017, 82(10), 2371-2378. doi: 10.1111/1750-3841.13858.
153. WIDDEL F. Theory and measurement of bacterial growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie, Sem.* 2010, 4, (B.Sc.) Universität Bremen.
154. LST 1553:1998. Miltiniai kepiniai ir konditerijos gaminiai. Rūgštingumo ir šarmingumo nustatymo metodai.
155. ANTANAS, Š. Mokomoji knyga „Bendrosios mikrobiologijos laboratoriniai darbai“, 2011. ISBN 978-9955-25-212-2.
156. REINHOLDS, I., et al. Evaluation of ozonation as a method for mycotoxins degradation in malting wheat grains. *World Mycotoxin Journal*. 2016, 9(3), 409-417. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.2011>
157. ISO 3983:1977. Cereals and cereal products. Determination of alpha-amylase activity. Colorimetric method
158. BAILEY, M. J., P. BIELY and K. POUTANEN. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992, 23(3), 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-)
159. CUPP-ENYARD, C. Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 2008, 19(899). doi: 10.3791/899.
160. DABKEVIČIUS, Z., I. GAURILČIENĖ and R. SEMAŠKIENĖ. Varpinių javų ligos. *Žemės Ūkio Augalų Kenkėjai, Ligos ir Jų Apskaita*. Arx-Baltica: Akademija, Lithuania, 2002; pp. 80–134; ISBN 9986-527-88-0.
161. VENABLES, W. N., and B. D. RIPLEY. Modern applied statistics with S. Fourth. New York: Springer, 2002. Prieiga per: <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.
162. VIDMANTIENĖ, D., and G. JUODEIKIENĖ. Kai kurie biologiniai grūdinės žaliavos fermentacijos procesų inhibitoriai ir jų vertinimo aspektai. ISBN 978-609-02-0742-0.
163. REN, X., et al. Bioconversion of corn steep liquor to biofertilizer by symbiotic fermentation. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2021, 17, (4), 478-489. DOI: 10.3844/ajbbsp.2021.478.489
164. SHUKLA, R., and M. CHERYAN. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*. 2001, 13(3), 171–192. ISSN 0926-6690. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9)
165. WU, Y., and J. MESSING. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 30(240). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00240>
166. XIAO, X., et al. Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOFMS and HPLC. *Talanta*. 2013, 107, 344–348. ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.044>
167. KAMBLE, D. B., and S. RANI. Bioactive components, in vitro digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): A review. *Legume Science*. 2020, 2(1). <https://doi.org/10.1002/leg3.32>
168. LI, B., M. QIAO and F. LU. Composition, nutrition, and utilization of okara (soybean residue). *Food Reviews International*. 2011, 28(3), 231–252. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595023>

169. COLLETTI, A., et al. Valorisation of by-products from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) processing. *Molecules*. 2020, 25(9), 2129. <https://doi.org/10.3390/molecules25092129>
170. MATEOS-APARICIO, I., et al. Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT- Food Science and Technology*. 2010, 43(9), 1467-1470. ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.008>
171. FERMOSO, F. G., et al. Valuable compound extraction, anaerobic digestion, and composting: a leading biorefinery approach for agricultural wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, 66(32). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02667>
172. TRIGO, J. P., et al. Study of viability of high pressure extract from pomegranate peel to improve carrot juice characteristics. *Food & Function*. 2020, 11(4), 3410-3419. <https://doi.org/10.1039/C9FO02922B>
173. VONG, W. C., and S-Q. LIU. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 52, 139-147. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.011>
174. SPOTTI, M. J., and O. H. CAMPANELLA. Functional modifications by physical treatments of dietary fibers used in food formulations. *Current Opinion in Food Science*. 2017, 15, 70-78. ISSN 2214-7993. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.003>
175. GALANAKIS, C. M., et al. Recovery of high-added-value compounds from food waste by membrane technology. *Membrane Technologies for Biorefining*. 2016, 189-215. DOI: 10.1016/B978-0-08-100451-7.00008-6
176. VISHWANATHAN, K. H., et al. Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology. *Journal of Food Science*. 2011, 76(1), 158-164. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01917.x
177. BEVILACQUA, A., et al. Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: Overview and advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, 17(1), 2-62. doi: 10.1111/1541-4337.12299
178. LI, Y., et al. Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment: Ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2020, 69(05240). ISSN 1350-4177. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105240>
179. HUANG, L., et al. Enzymolysis kinetics of garlic powder with single frequency countercurrent ultrasound pretreatment. *Food and Bioprocess Processing*. 2015, 95, 292-297. ISSN 0960-3085. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.015>
180. TEJADA-ORTIGOZA, V., et al. Advances in the functional characterization and extraction processes of dietary fiber. *Food Engineering Reviews*. 2016, 8(3), 251-271. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9134-y>
181. LIU, X., et al. Preparation of enzymatic pretreated corn gluten meal hydrolysate and *in vivo* evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015, 18(Part B), 1147-1157. ISSN 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.013>
182. O'SULLIVAN, J., et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*. 2016, 53, 141-154. ISSN 0268-005X. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.009>
183. MA, H., et al. Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, 18(1), 419-424. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.07.014

184. YING, Z., X. HAN and J. LI. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*. 2011, 127(3), 1273-1279. ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083>
185. EL-SAIED, H. M., S. M. HEGAZI and M. K. EL-MARSAFY. Amino acid patterns of different brands of corn steep liquor. *Starch - Stärke*. 1975, 27(12), 413-416. <https://doi.org/10.1002/star.19750271205>
186. BARTKIENE, E., et al. The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *International Journal of Dairy Science*. 2018, 101(8), 6787-6798. doi: 10.3168/jds.2018-14692
187. BARTKIENE, E., et al. Challenges associated with byproducts valorization—comparison study of safety parameters of ultrasonicated and fermented plant-based byproducts. *Foods*. 2020, 9(5), 614. doi: 10.3390/foods9050614
188. OLIVEIRA, R. A., et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—from economic to production aspects. *Biomechanical Engineering Journal*. 2018, 133, 219–239. ISSN 1369-703X. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>
189. MARTINEZ, F. A. C., et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, 30(1), 70–83. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
190. JUODEIKIENE, G., et al. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT – Food Science and Technology*. 2018, 89, 307–314. ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.061>
191. AWAD, W. A., et al. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives & Contaminants Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010, 27(4), 510–520. doi: 10.1080/19440040903571747
192. PITT, J. I., M. H. TANIWAKI and M. B. COLE. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*. 2013, 32(1), 205-215. ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>
193. BRODEHL, A., et al. Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus*. *FEMS Microbiology Letters*. 2014, 359(1), 124-130. doi: 10.1111/1574-6968.12586
194. JIN, Z., et al. Production of deoxynivalenol (DON) and DON-3-glucoside during the malting of *Fusarium* infected hard red spring wheat. *Food Control*. 2018, 85, 6-10. ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.002>
195. BERTHILLER, F., et al. Determination of DON-3-glucoside in artificially and naturally contaminated wheat with LC-MS/MS. *Mycotoxin Research*. 2005, 21(3), 205-208. <https://doi.org/10.1007/BF02959264>
196. DESMARCHELIER, A., and SEEFELDER, W. Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal*. 2011, 4(1), 29-35. DOI: 10.3920/WMJ2010.1236
197. HAJŠLOVA, J., et al. Transfer of mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 2008, 25(6), 732-744. doi: 10.1080/02652030701779625

- 198.KOSTELANSKA, M., et al. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC–TOFMS method. *Food Chemistry*. 2011, 126(4), 1870-1876. ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.008>
- 199.LI, F., et al. Natural occurrence of masked deoxynivalenol and multi-mycotoxins in cereals from China harvested in 2007 and 2008. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi*. 2011, 45(1), 57-63. PMID: 21418821
- 200.MALACHOVA, A., et al. Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins: The major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(24), 12990-12997. doi: 10.1021/jf203391x
- 201.SASANYA, J. J., C. HALL and C. WOLF-HALL. Analysis of deoxynivalenol, masked deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* pigment in wheat samples, using liquid chromatography-UV-mass spectrometry. *Journal of Food Protection*. 2008, 71(6), 1205-1213. doi: 10.4315/0362-028x-71.6.1205
- 202.VARGA, E., et al. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 2013, 30(1), 137-146. doi: 10.1080/19440049.2012.726745
- 203.LEMMENS, M., et al. Masked mycotoxins: Does breeding enhance *Fusarium* head blight resistance result in more deoxynivalenol-3-glucoside in new wheat varieties? *World Mycotoxin Journal*. 2016, 9(5), 741-754. ISSN 1875-0796. DOI 10.3920/WMJ2015.2029
- 204.RIZZELLO, C. G., et al. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*. 2011, 127(3), 952-959. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.063
- 205.XU, D., et al. Effect of mixed cultures of yeast and *Lactobacilli* on the quality of wheat sourdough bread. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10(2113). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02113>
- 206.CLARKE, C. I., T. SCHÖBER and E. K. ARENDT. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. *Cereal Chemistry*. 2002, 79(5), 640-647. DOI: 10.1094/CCHEM.2002.79.5.640
- 207.SIMSEK, O., A. H. ÇON and S. TULUMOĞLU. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*. 2006, 17(4), 263-270. ISSN 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.011>
- 208.CORSETTI, A., et al. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory scale fermentations. *Food Microbiology*. 2007, 24(6), 592-600. doi: 10.1016/j.fm.2007.01.002
- 209.LI, H., et al. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*. 2012, 65(2), 156-161. doi: 10.1007/s00284-012-0135-2
- 210.NIDERKORN, V., H. BOUDRA and D. P. MORGAVI. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, 101(4), 849-856. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x
- 211.EL-NEZAMI, H., et al. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives & Contaminants*. 2002, 19(7), 680-686. doi: 10.1080/02652030210134236

- 212.ZADEIKE, D., et al. The expedient application of microbial fermentation after whole-wheat milling and fractionation to mitigate mycotoxins in wheat-based products. *LWT – Food Science and Technology*. 2021, 137(110440). ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110440>
- 213.EL-NEZAMI, H. et al., Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(14), 4577-4581. DOI: 10.1021/jf049924m
- 214.ZOGHI, A., K. KHOSRAVI-DARANI and S. SOHRABVANDI. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*. 2014, 14, 84-98. doi: 10.2174/1389557513666131211105554
- 215.LI, P., et al. Detoxification of mycotoxins through biotransformation. *Toxins*. 2020, 12(2), 121. doi: 10.3390/toxins12020121
- 216.GOURAMA, H., and L. B. BULLERMAN. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*. 1995, 58(12), 1395-1404. doi: 10.4315/0362-028X-58.12.1395
- 217.AMIR, R., G. GALILI and H. COHEN. The metabolic roles of free amino acids during seed development. *Plant Science*. 2018, 275, 11-18. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.06.011
- 218.PENG, C., et al. The impact of the branched-chain ketoaciddehydrogenase complex on amino acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2015, 169, 1807-1820. doi: 10.1104/pp.15.00461
- 219.COHEN, H., et al. Seed-specific expression of a feedbackinsensitive form of cystathionine-gammasynthase in *Arabidopsis* stimulates metabolic and transcriptomic responses associated with desiccation stress. *Plant Physiology*. 2014, 166, 1575-1592. doi: 10.1104/pp.114.246058
- 220.FUNCK, D., et al. Requirement of proline synthesis during *Arabidopsis* reproductive development. *BMC Plant Biology*. 2012, 12(1), 191. DOI: 10.1186/1471-2229-12-191
- 221.COLLA, G., et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 5(448). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00448>
- 222.PEREIRA, D. G., et al. Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. *Journal of Food Processing Preservation*. 2019, 43(23), 14134. DOI: 10.1111/jfpp.14134
- 223.HUANG, S., et al. Ultrasound-assisted multi-enzymatic system for the preparation of ACE inhibitory peptides with low bitterness from corn gluten meal. *Processes*. 2021, 9(12), 2170. <https://doi.org/10.3390/pr9122170>
- 224.GAVELIENĖ, V., et al. Effect of biostimulants on cold resistance and productivity formation in winter rapeseed and winter wheat. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2018, 57(1), 71-83. DOI: 10.1515/ijaf-2018-0008
- 225.HASSAN, M. A., et al. Cold stress in wheat: plant acclimation responses and management strategies. *Frontiers in Plant Science*. 2021, 12(676884). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.676884>

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics Web of Science (WOS)“ sąrašo leidiniuose

1. Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Juodeikiene, Grazina; Hajnal, Elizabet Janić; Bartkevics, Vadims; Pugajeva, Iveta; Klupsaite, Dovile; Cernauskas, Darius; Lele, Vita; Žadeikė, Daiva; Bartkiene, Elena. Challenges of Lactobacillus fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat - based products // Food control. Oxford: Elsevier. ISSN 0956-7135. eISSN 1873-7129. 2022, vol. 134, art. no. 108699, p. 1-8. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108699. [Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus] [IF: 5,548; AIF: 4,309; IF/AIF: 1,287; Q1 (2020, InCites JCR SCIE);
2. Karolina Trakselyte Rupsiene, Grazina Juodeikiene, Gabriele Alzbergaite, Daiva Zadeike, Elena Bartkiene, Fatih Ozogul, Lukas Ruller, Josef Robert, João Miguel F. Rocha, Bio-refinery of plant drinks press cake permeate using ultrafiltration and lactobacillus fermentation into antimicrobials and its effect on the growth of wheatgrass in vivo, Food Bioscience, 2021, 101427, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101427>
3. Juodeikiene, Grazina; Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Navickaite, Bernadeta; Zadeike, Daiva; Bendoraitiene, Joana; Bartkiene, Elena; Lele, Vita; Rueller, Lukas; Robert, Josef; Arnoldi, Anna; Aiello, Gilda; Glasner, Christoph. Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with Lactobacillus paracasei LUHS244 for wheat bread production // LWT - Food science and technology. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0023-6438. eISSN 1096-1127. 2021, vol. 152, art. no. 112337, p. 1-8. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112337. [Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus] [IF: 4,952; AIF: 4,309; IF/AIF: 1,149; Q1 (2020, InCites JCR SCIE);
4. Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Juodeikiene, Grazina; Cernauskas, Darius; Bartkiene, Elena; Klupsaite, Dovile; Zadeike, Daiva; Bendoraitiene, Joana; Damašius, Jonas; Ignatavicius, Jonas; Sikorskaite-Gudziuniene, Simona. Integration of ultrasound into the development of plant-based protein hydrolysate and its bio-stimulatory effect for growth of wheat grain seedlings In vivo // Plants. Basel: MDPI. ISSN 2223-7747. 2021, vol. 10, iss. 7, art. no. 1319, p. 1-15. DOI: 10.3390/plants10071319. [Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus; DOAJ] [IF: 3,935; AIF: 3,736; IF/AIF: 1,053; Q1 (2020, InCites JCR SCIE);

**Kitos mokslinės publikacijos ne disertacijos tema, paskelbtos mokslinės
informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics Web of Science (WOS)“
sąrašo leidiniuose**

1. Juodeikiene, Grazina; Zadeike, Daiva; Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Gasauskaite, Kotryna; Bartkiene, Elena; Lele, Vita; Viskelis, Pranas; Bernatoniene, Jurga; Ivanauskas, Liudas; Jakstas, Valdas. Functionalisation of flaxseed proteins assisted by ultrasonication to produce coatings enriched with raspberries phytochemicals // LWT - Food science and technology. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0023-6438. eISSN 1096-1127. 2020, vol. 124, art. no. 109180, p. 1-10. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109180. [Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus] [IF: 4,952; AIF: 4,309; IF/AIF: 1,149; Q1 (2020, InCites JCR SCIE)] [M.kr.: A 003, T 005] [Indėlis: 0,100];
2. Juodeikiene, Grazina; Cernauskas, Darius; Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Bartkiene, Elena; Zadeike, Daiva; Banyte, Greta; Santini, Antonello. Acoustic-based screening method for the detection of total aflatoxin in corn and biological detoxification in bioethanol production // Frontiers in microbiology. Lausanne: Frontiers MediaSA. ISSN 1664-302X. 2020, vol. 11, art. no. 543, p. 1-8. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00543. [Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus; DOAJ] [IF: 5,640; AIF: 5,079; IF/AIF: 1,110; Q1 (2020, InCites JCR SCIE)].

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Pranešimai disertacijos tema, išspausdinti užsienio konferencijų pranešimų medžiagoje

1. Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Juodeikienė, Gražina; Armonienė, Rita. The effect of plant – based biostimulant application on the resistance to cold stress of winter wheat // FoodBalt – 2022: 15th Baltic conference on food science and technology “Food R&D in the Baltics and beyond“, September 26-27, 2022 Kaunas, Lithuania: abstract book. Kaunas : Kauno technologijos universitetas, 2022. eISBN 9786090218051. p.51..
2. Traskelyte-Rupsiene, Karolina; Juodeikiene, Grazina; Cernauskas, Darius; Bartkiene, Elena; Zadeike, Daiva; Bendoraitiene, Joana; Ignatavicius, Jonas; Gudziuniene, Sidona. Application of ultrasound for corn starch processing by-products pretreatment and enzymatic hydrolysis intensification // Proceedings of international e-conference on plant science and biology, May 05, 2021, webinar. United research forum. 2021, p. 9.
3. Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Juodeikiene, Grazina; Cernauskas, Darius; Bartkiene, Elena; Zadeike, Daiva; Bendoraitiene, Joana; Gaudziuniene, Sidona; Ignatavicius, Jonas. Ultrasound treatment affect corn steep liquor protein hydrolysis and bio-stimulatory properties for wheat seeds germination // FoodBalt 2021: 14th Baltic conference on food science and technology “Sustainable food for conscious consumer”: abstract book / editor: Mari-Liis Kutti. Tallinn : Center of Food and Fermentation Technologies. 2021, p. 155.

Kitos konferencijos ir tezės disertacijos tema

1. Trakšelytė-Rupšienė, Karolina; Juodeikienė, Gražina, Armonienė, Rita. Intensification of okara protein solubilization by enzymatic hydrolysis in combination with ultrasound treatment. // International Course Applied Enzymology held in Wageningen, the Netherlands, from 21-25 February 2022 and organized by the Graduate School VLAG, Wageningen, The Netherlands, in cooperation with research institutes ENTEG & GBB, Groningen University, The Netherlands, 2022 vasario 21-25 d.; stendinis pranešimas / Vageningeno universitetas, Olandija.

Kitos konferencijos ir tezės

1. Reikertaitė, Karolina; Trakšelytė-Rupšienė, Karolina; Juodeikienė, Gražina; Hajnal, Elizabet Janić; Bartkevics, Vadims; Pugajeva, Iveta; Žadeikė, Daiva; Bartkienė, Elena. Pienarūgštės fermentacijos įtaka Fusarium mikotoksinų deoksinivalenolio ir jo konjugatų miežių grūduose mažinimui // Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos: 14-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija, 2021 m. lapkričio 25 d.: pranešimų santraukos / leidinį sudarė J. Olechnovičienė, V. Kučinskas. Vilnius : Lietuvos mokslų akademija, 2021. ISBN 9789986080855. eISBN 9789986080862. p. 16.
2. Trakšelytė-Rupšienė, K.; Arūnaite, J.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Jakštas, V.; Bernatoniene, J.; Ivanauskas, L.; Bartkienė, E.; Lėlė, V.; Viškelis, P. Integration of ultrasound treatment into valorization of flaxseed press cake to produce functionalized hydrogels // 15th international scientific conference "The vital nature sign", May 20-21, 2021, Kaunas, Lithuania: abstract book / editors: A. Maruška, N. Tiso, V. Kaškonienė, M. Stankevičius. Kaunas : Vytauto Didžiojo universitetas. ISSN 2335-8653. eISSN 2335-8718. 2021, p. 34.
3. Ilginiene, Jurgita; Juodeikiene, Grazina; Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Zadeike, Daiva; Jakstas, Valdas; Bernatoniene, Jurga; Marksa, Mindaugas; Ivanauskas, Liudas; Bartkiene, Elena; Lele, Vita; Viskelis, Pranas. Immobilization possibilities of antimicrobial components for the development of apple pomace hydrogel type nutraceuticals // FoodBalt 2021: 14th Baltic conference on food science and technology "Sustainable food for conscious consumer": abstract book / editor: Mari-Liis Kutti. Tallinn : Center of food and fermentation technologies. 2021, p. 119.
4. Kazlauskaite, Jurga Andrėja; Juodeikiene, Grazina; Trakselyte-Rupsiene, Karolina; Zadeike, Daiva; Jakstas, Valdas; Bernatoniene, Jurga; Marksa, Mindaugas; Ivanauskas, Liudas; Bartkiene, Elena; Lele, Vita; Viskelis, Pranas. Ultrasonication effect on the protein changes in coconut press cakes used for antimicrobial nutraceuticals // FoodBalt 2021: 14th Baltic conference on food science and technology "Sustainable food for conscious consumer": abstract book / editor: Mari-Liis Kutti. Tallinn : Center of food and fermentation technologies. 2021, p. 120.

INFORMACIJA APIE AUTORE

Karolina Trakšelytė-Rupšienė

karolina.trakselyte-rupsiene@ktu.lt

Išsilavinimas:

2010 m. baigta Kauno „Santaros“ gimnazija, vidurinis išsilavinimas su pagyrimu

2010–2014 m. Kauno technologijos universitetas, maisto mokslo ir technologijų bakalauras

2014–2017 m. Kauno technologijos universitetas, maisto produktų technologijų magistras

2019–2023 m. Kauno technologijos universitetas, chemijos inžinerijos (T 005) doktorantūros studijos

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. habil. dr. Gražinai Juodeikienei už disertacijos idėją, vadovavimą moksliniams tyrimams, mokslines konsultacijas rengiant publikacijas bei disertaciją, paskatinimą bei motyvaciją tobulėti ir visokeriopą paramą doktorantūros studijų metu. Taip pat norėčiau padėkoti Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms, pagelbėjusiems dirbant ir padėjusiems atsakyti į iškilusius klausimus. Norėčiau padėkoti UAB „Nando“ atstovams už malonų bendradarbiavimą, ypač esu dėkinga dr. Sidonai Gūdžiūnienei už mokslines konsultacijas ir draugišką darbo atmosferą. Esu dėkinga Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC), Genetikos ir fiziologijos laboratorijos vedėjai dr. Ritai Armonienei už šiltą priėmimą, vertingas konsultacijas ir draugišką darbo atmosferą. Esu dėkinga Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą.

Šilčiausius padėkos žodžius skiriu savo šeimai – vyrui ir vaikams už meilę, kantrybę, rūpestį, nuolatinį palaikymą ir supratimą. Nuoširdžiai dėkoju savo ir vyro tėvams, sesei, draugams ir artimiesiems, kurie buvo šalia ir palaikė doktorantūros studijų metu.

UDK 606:632+631.811.98+577.152.3+664.76] (043.3)

SL 344. 2023-04-21, 19 leidyb. apsk. l. Tiražas 14 egz. Užsakymas 68.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas

