



D A R I U S Č E R N A U S K A S

FUSARIUM SPP.
PAŽEISTŲ JAVŲ
GRŪDŲ SALYKLO
GAMYBOJE APTIKIMAS
IR DETOKSIKACIJA
ANTIMIKROBINĖMIS
BIOPRIEMONĖMIS

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 1 7

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DARIUS ČERNAUSKAS

***FUSARIUM* SPP. PAŽEISTŲ JAVŲ GRŪDŲ
SALYKLO GAMYBOJE APTIKIMAS IR
DETOKSIKACIJA ANTIMIKROBINĖMIS
BIOPRIEMONĖMIS**

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

2017, Kaunas

UDK 663.43 (043.3)

Disertacija rengta 2012–2016 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Dalis tyrimų atlikta Fraunhoferio molekulinės biologijos ir taikomosios ekologijos institute IME (*The Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology* IME) Vokietijoje, kurie remti Lietuvos mokslo tarybos (doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose, 2014) lėšomis.

Mokslinė vadovė:

Prof. habil. dr. Gražina JUODEIKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T).

Interneto svetainės, kurioje skelbiama disertacija, adresas:

<http://ktu.edu>

Kalbos redaktorė:

Inga Nanartonytė
Leidykla „Technologija“

© D. ČERNAUSKAS, 2017

ISBN 978-609-02-1297-4

Leidinio bibliografinė informacija pateikiama Lietuvos nacionalinės Martyno Mažvydo bibliotekos Nacionalinės bibliografijos duomenų banke (NBDB)

TURINYS

ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Salyklinių grūdų užterštumas <i>Fusarium</i> spp. mikroskopiniais grybais, jų įtaka grūdinės žaliavos saugos ir kokybės rodikliams	11
1.1.1. <i>Fusarium</i> spp. bei kitų mikroskopinių grybų ir jų gaminamų antrinių metabolitų charakteristika	11
1.1.2. Mikotoksinų koncentracijos pokyčiai slyklo gamybos metu	14
1.2. Greiti metodai <i>Fusarium</i> spp. mikotoksinams grūduose aptikti	16
1.2.1. Grūdų taršos įvertinimas akustiniu metodu	18
1.2.2. Grūdų taršos įvertinimas fiksuojant anglies dioksido koncentracijos pokytį grūdų laikymo metu	21
1.3. Grūdų detoksikacijos galimybės	23
1.3.1. Biopriemonių naudojimas salyklinių grūdų saugai didinti	24
1.3.2. Ozonavimo taikymas grūdinei žaliavai detoksikuoti	29
1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas	33
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI	35
2.1. Tyrimų objektai	35
2.1.1. <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų grūdų kolekcijos ir modelinės sistemos	35
2.1.2. Mikroorganizmai ir jų kultivavimo sąlygos	37
2.1.3. Gyvūninių produktų terpės bioproduktų gamybai sąlygos	38
2.2. Tyrimo metodai	38
2.2.1. Grūdų cheminės sudėties ir mikrostruktūros įvertinimas	38
2.2.2. Fermentų aktyvumo nustatymas	39
2.2.3. Akustinio metodo taikymas deoksinivalenoliui kviečių grūduose aptikti ..	39
2.2.4. Deoksinivalenolio nustatymas imunofermentiniu ELISA metodu	40
2.2.5. Anglies dioksido koncentracijos laikomuose grūduose kitimo pobūdžio įvertinimas	41
2.2.6. Organinių rūgščių kiekio pieno rūgšties bakterijų bioproduktuose įvertinimas	41
2.2.7. Grūdų apdoravimo pieno rūgšties bakterijų bioproduktais sąlygos	42
2.2.8. Grūdų apdoravimo ozonu sąlygos	42
2.2.9. Grūdų daigumo įvertinimas	43
2.2.10. Grūdų baltymų fracionavimas elektroforezės metodu	43
2.2.11. Bioetanolio gamybos sąlygos	44
2.2.12. Fermentacijos proceso įvertinimas	45
2.2.13. Mikotoksinų nustatymas UESCh-MS/MS metodais	45
2.2.14. Statistinė duomenų analizė	48
3. TYRIMŲ REZULTATAI	49
3.1. <i>Fusarium</i> spp. taršos įtaka grūdų cheminei sudėčiai ir mikrostruktūrai	49
3.1.1. <i>Fusarium</i> spp. taršos įtaka miežių ir kviečių cheminei sudėčiai	49
3.1.2. <i>Fusarium</i> spp. taršos įtaka miežių ir kviečių mikrostruktūrai	51
3.1.3. <i>Fusarium</i> spp. taršos įtaka miežių ir kviečių fermentų aktyvumui ir grūdų daigumui	52

3.2. Naujos elektroakustinės technikos taikymo deoksinivalenoliui kviečių grūduose aptikti tyrimai.....	55
3.2.1. Optimalių akustinio metodo sąlygų kviečių grūdų saugos analizei nustatymas.....	56
3.2.2. Priklausomybės tarp akustinio ir ELISA metodų nustatymas deoksinivalenolio analizei kviečių grūduose	57
3.2.3. Akustinio metodo tikslumo ir patikimumo įvertinimas.....	58
3.3. Technologinių veiksnių ir <i>Fusarium</i> spp. taršos grūduose įtaka anglies dioksido dujų susidarymo kinetikai grūdų laikymo metu.....	60
3.3.1. Technologinių veiksnių įtaka anglies dioksido susidarymui skirtingo stambumo laikomuose kviečių grūduose	60
3.3.2. Technologinių veiksnių įtaka anglies dioksido susidarymui <i>Fusarium</i> spp. užterštuose laikomuose kviečių grūduose.....	62
3.4. Ozono panaudojimas <i>Fusarium</i> spp. užterštiems kviečių grūdams detoksikuoti	63
3.4.1. Ozono panaudojimas <i>Fusarium</i> spp. mikotoksinų koncentracijai kviečių grūduose sumažinti	64
3.5. Biopriemonių panaudojimas grūdų mikrobiologinei taršai mažinti ir fermentacijos procesui užtikrinti	67
3.5.1. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų panaudojimas deoksinivalenolio koncentracijai kviečių grūduose sumažinti	67
3.5.2. Pieno rūgšties bakterijų metabolitų antigrybelinis poveikis	68
3.5.3. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų įtaka kviečių grūdų daigumui.....	71
3.5.4. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų įtaka salyklinių grūdų baltyminių medžiagų kiekybinei sudėčiai grūdų dygimo metu.....	72
3.5.5. <i>Fusarium</i> spp. mikotoksinų įtaka miežių grūdų fermentacijos procesui	76
3.5.6. Fermentinių preparatų įtaka <i>Fusarium</i> spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos procesui	78
3.5.7. Pieno rūgšties bakterijų ir mielių rūšies įtaka <i>Fusarium</i> spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos procesui	80
3.5.8. Biopriemonių įtaka <i>Fusarium</i> spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos metu susidariusių žlaugtų deoksinivalenolio sumažinimui.....	83
3.6. Grūdų paruošimo salyklo gamybai rekomendacijos.....	84
IŠVADOS	88
LITERATŪRA	90
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	110
INFORMACIJA APIE DISERTACIJOS AUTORIŲ	112
PADEKA	113

SANTRUMPOS

AFB1 – aflatoksinas B1
AFG1 – aflatoksinas G1
APS – amonio peroksodisulfatas
CE – fragmentavimo įtampa
CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonatas
DCh – dujų chromatografija
DON – deoksinivalenolis
DTT – ditionitritolis
ELISA – imunofermentinė analizė
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
FPIA – fluorescencinės poliarizacijos imuninė analizė
kDa – kilodaltonas
Lb – *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
LFD – šoninio srauto imunologinė analizė
LoD – aptikimo riba (angl. *limit of detection*)
LoQ – nustatymo riba (angl. *limit of quantitation*)
Ls – *Lactobacillus sakei*
m/z – masės ir krūvio santykis
MIP – molekulinį įspaudų polimerų analizė
mol% – molio procentai
MRS – *de Man*, *Rogosa* ir *Sharpe* mitybinė terpė
MRM – daugialypių reakcijų stebėjimas
MS – masių spektrometrija
MS/MS – tandeminė masių spektrometrija
NDS – natrio docecilulfatas
OTA – ochratoksinas A
Pa7 – *Pediococcus acidilactici*
PAGE – poliakrilamido gelio elektroforezė
Pp8 – *Pediococcus pentosaceus*
Pp9 – *Pediococcus pentosaceus*
Pp10 – *Pediococcus acidilactici*
PRB – pieno rūgšties bakterijos
R² – determinacijos koeficientas
R% – vidutinis regeneravimas
SC/MS – skysčių chromatografija su masių spektrometrija
SN – standartinis nuokrypis
SSN – santykinis standartinis nuokrypis
T2/HT2 – mikotoksinai T2/HT2
TEMED – tetrametiletildiaminas
TRIS – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis
UESCh – ultraefektyvioji skysčių chromatografija
ZEN – zearalenonas
w/w – masės dalis

Mikroorganizmų genčių sąrašas

A. – Aspergillus

C. – Claviceps

F. – Fusarium

K. – Kluyveromyces

L. – Lactobacillus

N. – Neotyphodium

P. – Pediococcus

Penic. – Penicillium

Pith. – Pithomyces

S. – Saccharomyces

IVADAS

Temos aktualumas

Gyventojų skaičius Žemėje nuolat didėja. Tai lemia maisto produktų ir pašarų paklausos augimą. Grūdinė žaliava maisto produktų gamyboje užima svarbią vietą ir sudaro didelę žmogaus mitybinio raciono dalį, todėl labai svarbu užtikrinti, kad ji atitiktų griežtus kokybės ir saugos reikalavimus.

Viena iš didžiausių grūdinės žaliavos panaudojimo sričių yra salyklo gamyba, kuri yra svarbi maisto pramonės šaka. Pastaruoju metu ypač aktualus salyklo gamybos efektyvumo didinimas. Šios problemos sprendimas susijęs su salyklinių grūdų daigumo didinimu įvertinant ir laiku iš grūdų perdirbimo grandinės pašalinant mikroskopinių grybų pažeistus salyklineus grūdus. Nepalankios klimatinės salyklinių grūdų auginimo bei netinkamos jų laikymo sąlygos ir grūdų morfologiniai ypatumai sudaro palankias sąlygas daugintis mikroorganizmams. Todėl ypatingas dėmesys turi būti skiriamas antrinių mikroskopinių grybų metabolizmo produktų – mikotoksinų – prevencijai. Dėl grūdų užteršimo mikotoksinais patiriami didžiuliai ekonominiai nuostoliai, nes užkrėsta žaliava negali būti parduodama ar perdirbama. Taip pat pažymėtina, kad Lietuvoje sparčiai plečiama ir biodegalų gamyba. Žinoma, kad užkrėsta grūdinė žaliava turi neigiamos įtakos fermentacijos procesui, o kaip bioetanolio gamybos atliekos lieka žlaughtai, kurie gali būti sėkmingai naudojami kombinuotųjų pašarų gamyboje. Svarbu, kad šios bioetanolio gamybos metu gautos atliekos būtų saugios pašarų gamybai. Taigi, tiriant fuzariozės pažeistų salyklinių grūdų panaudojimo bioetanolio gamyboje galimybes, tikslinga iširti skirtingų biotechnologinių priemonių – grūdinės žaliavos fermentinės hidrolizės ir alkoholinės fermentacijos – įtaką bioetanolio gamybos efektyvumo didinimui ir mikotoksinų kiekio gamybos atliekose (žlaughtuose) mažinimui.

Vienintelis patikimas būdas užkirsti kelią salyklinių grūdų užteršimui mikotoksinais yra užtikrinti, kad grūduose nesidaugintų mikroskopiniai grybai. Todėl vartotojams nuo mikotoksinų apsaugoti būtina turėti gerą jų nustatymo ir kontrolės grūduose sistemą. Pasaulinėje praktikoje mikotoksinais nustatyti dažniausiai taikomi daug darbo ir laiko reikalaujantys pamatiniai cheminiai, imunofermentiniai ir fizikiniai mikotoksinų analizės metodai. Kita vertus, iki šiol neišspręsta mėginių paėmimo mikotoksinų analizei problema. Įvertinus tai, kad mikotoksinų nustatymo metodai yra sudėtingi ir brangūs, salyklinių grūdų perdirbimo procese išskirtinis dėmesys turi būti skiriamas inovatyviems metodologiniams sprendimams, kurie leistų greitai ir pigiai aptikti mikotoksinus žaliavoje neimant mėginių.

Kita vertus, mikrobiologinės taršos kontrolė salyklinių grūdų perdirbimo grandinėje siejama su kompleksinių technologinių sprendimų taikymu ne tik vystant naujus mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų aptikimo metodus, bet ir kuriant natūralias salyklinių grūdų apdorojimo (detoksikacijos) biopriemones.

Pirmoji tyrimų kryptis siejama su šiuo metu šalyje vystomu akustiniu metodu ir technika jam realizuoti. EUREKA ITEA2 projektą ACOUSTICS vertinę ekspertai pabrėžė, kad akustika pirmą kartą taikoma grūdų saugos monitoringui, ir pažymėjo idėjos novatoriškumą ir svarbą vartotojo sveikatingumo užtikrinimui. Tačiau iki šiol

nėra tirta *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų ir jų metabolitų įtaka salyklinių grūdų cheminei sudėčiai ir technologinėms savybėms. Be to, stokojama informacijos apie *Fusarium* spp. užterštų grūdų mikrostruktūros pokyčių ryšį su vystomo akustinio metodo vertinimo parametrais. Kita vertus, labai svarbu užtikrinti tinkamas salyklinių grūdų laikymo sąlygas. Laikomų grūdų gedimas siejamas su tam tikrais išskirtiniais požymiais: puvimo kvapu, padidėjusia grūdų masės temperatūra, išsiskiriančio anglies dioksido (CO₂) koncentracijos padidėjimu. Tolydinės CO₂ kontrolės technika pagrįsta šio parametro fiksavimu laikomų grūdų masėje. Ji leidžia grūdų gedimą nustatyti tiksliai ir daug anksčiau nei vykdant temperatūros ir drėgmės monitoringą. Toks techninis sprendimas efektyviausias talpyklose, turinčiose aktyviosios ventiliacijos sistemą. Grūdų saugyklose nesant ventiliacijos sistemų, toks CO₂ monitoringas grūdų laikymo metu yra problemiškas dėl skirtingų dujų migracijos laikomuose grūduose ypatumų. Siekiant padidinti šio metodo tikslumą ir pritaikomumą skirtingų technologinių parametrų grūdų laikymo kontrolei, pvz., neventiliuojamose talpyklose, aktualu vystyti techninius sprendimus, leidžiančius stebėti CO₂ koncentracijos pokyčius laikomų grūdų masėje.

Antra vertus, tarptautinėje praktikoje didelio susidomėjimo kaip grūdinės žaliavos detoksikacijos priemonė sulaukė biotechnologiniai preparatai, pagaminti naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius mikroorganizmus. Šalyje tokie bakteriocinus gaminantys mikroorganizmai buvo išskirti iš ruginių raugų ir sėkmingai pritaikyti maisto pramonėje (FERMFOOD projektas). Antimikrobinį poveikį *Fusarium* spp. mikroskopiniams grybams pademonstravo su bakteriocinus gaminančiomis pieno rūgšties bakterijomis (PRB) pagaminti bioproduktai, kuriais buvo apdorotos kviečių, miežių ir kukurūzų javų sėklos (BIOEKOTECH projektas). Manoma, kad naujų antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių bioproduktų gamybos technologijų kūrimas ir pritaikymas galėtų padidinti salyklo gamybos efektyvumą ir sumažinti *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų ir jų gaminamų mikotoksinų kiekį perdirbamoje salyklinėje žaliavoje. Taip pat labai svarbu įvertinti sėklos dygimo metu vykstančius biopreparatais apdorotų salyklinių grūdų baltymų pokyčius, atliekant baltymų fracionavimą pagal molekulinę masę. Tai leistų geriau suprasti salyklinių grūdų dygimo metu vykstančius biocheminius procesus ir parinkti optimalius technologinius salyklo gamybos parametrus.

Sparčiai plečiasi ir kitų ekologinių priemonių, pvz., ozono, kaip alternatyvos biotechnologinėms grūdų užterštumo mažinimo priemonėms, panaudojimo grūdinėje žaliavoje esančių mikotoksinų koncentracijai sumažinti galimybės. Ozonas yra gana palankus aplinkai, jį naudojant nesusidaro toksinių liekanų. Vis dėlto ozono antimikrobinis efektyvumas priklauso nuo kelių veiksnių: panaudoto kiekio, mikotoksinų rūšies ir koncentracijos, įvairių aplinkos veiksnių, pvz., grūdų masės temperatūros, drėgmės ir paviršiaus savybių, todėl ozono panaudojimo grūdinės žaliavos saugai užtikrinti galimybių tyrimą būtina plėtoti.

Darbo tikslas

Sukurti greitus ir efektyvius metodus *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų pažeistiems grūdams aptikti, o šių grybų gaminamiems mikotoksinams detoksikuoti ir fermentacijos proceso efektyvumui didinti panaudoti natūralias ir ekologiškas priemones – pieno rūgšties bakterijų bioproduktus ir ozoną.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti ryšį tarp *Fusarium* spp. gaminamo mikotoksino deoksinivalenolio (DON) koncentracijos ir pažeistų salyklinių grūdų cheminės sudėties bei mikrostruktūros pokyčių.
2. Nustatyti ryšį tarp salyklinių kviečių grūdų užterštumo *Fusarium* spp. gaminamu mikotoksinu deoksinivalenoliu lygio ir akustinio signalo parametro verčių.
3. Įvertinti naujus techninius sprendimus, leidžiančius stebėti CO₂ koncentracijos pokyčius laikomoje *Fusarium* spp. pažeistoje kviečių grūdų masėje.
4. Nustatyti ozonavimo įtaką mikotoksinų koncentracijos perdirbamoje salyklinėje žaliavoje mažinimui.
5. Įvertinti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų bioproduktų, kultivuotų sūrių išrūgų permeato mitybinėje terpėje, įtaką susidariusių metabolizmo produktų kiekiui, salyklo gamybos efektyvumo didinimui ir mikotoksinų koncentracijos perdirbamoje salyklinėje žaliavoje mažinimui.
6. Nustatyti pieno rūgšties bakterijų bioproduktų poveikį *Fusarium* spp. pažeistų salyklinių kviečių grūdų baltyminių medžiagų kiekybinei sudėčiai grūdų dygimo metu, atliekant baltymų frakcionavimą pagal molekulinę masę.
7. Įvertinti skirtingų biotechnologinių priemonių – pieno rūgšties bakterijų ir grūdinės žaliavos fermentinės hidrolizės – panaudojimą fuzariozės pažeistų miežių grūdų alkoholinei fermentacijai efektyvinti ir mikotoksinų kiekiui gamybos atliekose (žlaugtuose) sumažinti.

Mokslinio darbo naujumas

Išbandytas ir pritaikytas pagal EUREKA ITEA2 projektą ACOUSTICS sukurtas akustinis spektrometras, skirtas greitai ir bekontakčiu būdu kviečių grūdų užterštumo *Fusarium* spp. gaminamu mikotoksinu DON lygiui nustatyti.

Salyklinių kviečių grūdų biologinei taršai – *Fusarium* spp. gaminamų mikotoksinų koncentracijai – sumažinti panaudoti PRB bioproduktai ir ozonas.

Ištirtos pieno perdirbimo atliekų (sūrių išrūgų permeato) panaudojimo antimikrobiniais PRB bioproduktams gaminti ir *Fusarium* spp. pažeistų salyklinių grūdų sveikumui ir daigumui didinti galimybės.

Ištirtas PRB bioproduktų poveikis *Fusarium* spp. pažeistų salyklinių kviečių grūdų baltyminių medžiagų kiekybinei sudėčiai grūdų dygimo metu.

Teorinė ir praktinė darbo vertė

Pritaikyta akustinė technika, leidžianti greitai ir efektyviai aptikti *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų užterštumą.

Įrodyta, kad pieno perdirbimo šalutinis produktas – sūrių išrūgų permeatas – yra tinkama terpė gaminti PRB bioproduktams, kurie pasižymi antimikrobinio poveikiu *Fusarium* spp. bei jų gaminamam mikotoksiniui DON ir padidina salyklo gamybos efektyvumą.

Nustatyta, kad ozonavimas sumažina *Fusarium* spp. gaminamų mikotoksinų kiekį salykliniuose kviečių grūduose.

PRB, fermentiniai preparatai ir mielės, naudotos *Fusarium* spp. pažeistos miežių grūdinės žaliavos fermentacijos metu, padidina bioetanolio išėigą ir sumažina *Fusarium* spp. gaminamo mikotoksino DON koncentraciją žlaugtuose.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Kviečių grūdų pažeidimui įvertinti galima naudoti akustinę techniką, gebančią greitai ir tiksliai aptikti kviečių grūdų pažeidimą, kuris stipriai koreliuoja su kviečių grūduose aptinkamo *Fusarium* spp. gaminamo mikotoksino DON koncentracija.
2. PRB bioproduktai, kultivuoti sūrių išrūgų permeato terpėje, mažina mikroskopinių grybų infekciją kviečių grūdų paviršiuje ir pasižymi detoksikuojamuoju poveikiu *Fusarium* spp. gaminamiems mikotoksiniams.
3. PRB, fermentiniai preparatai ir mielės, naudotos *Fusarium* spp. pažeistos miežių grūdinės žaliavos fermentacijos metu, padidina bioetanolio išėigą ir sumažina *Fusarium* spp. gaminamo mikotoksino DON koncentraciją žlaugtuose.
4. Ozonas pasižymi detoksikuojamuoju poveikiu *Fusarium* spp. gaminamiems mikotoksiniams.

Disertacijos struktūra

Disertacija parašyta lietuvių kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, trys skyriai (literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, tyrimų rezultatai), išvados, literatūros sąrašas (253 literatūros šaltiniai), disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas. Darbe pateiktos 24 lentelės ir 40 paveikslų. Disertacijos apimtis – 114 puslapių.

Darbo rezultatų publikavimas

Keturi moksliniai straipsniai disertacijos tema paskelbti į *Thomson Reuters Web of Knowledge* (WOS) leidinių sąrašą įrašytuose žurnaluose. Devynios tezės išspausdintos konferencijų medžiagoje. Pagrindiniai rezultatai pristatyti penkiose tarptautinėse ir dvejose nacionalinėse konferencijose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Salyklinių grūdų užterštumas *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais, jų įtaka grūdinės žaliavos saugos ir kokybės rodikliams

Neatsiejama salyklinių grūdų produktų gamybos dalis yra grūdinės žaliavos sauga. Blogos klimatinės salyklinių grūdų auginimo bei laikymo sąlygos ir grūdų morfologiniai ypatumai sudaro palankias sąlygas daugintis pašalinei mikroflorai. Mikotoksinai (graikiškai *mycos* – pelėsiai) yra natūralios mikroskopinių grybų metabolizmo medžiagos, kenksmingos žmonėms ir gyvūnams. Mikotoksinai, kaip antriniai pelėsinių grybų metabolizmo produktai, gali susiformuoti įvairiuose augalinės žaliavos auginimo ir laikymo etapuose. Tai gana stabilūs junginiai, pasižymintys dideliu atsparumu temperatūrai, taip pat išliekantys žaliavoje net po juos pagaminusių mikroskopinių grybų žūties [1]. Dėl savo plataus toksinio poveikio spektro jie sukelia ne tik rimtą pavojų žmonių ir gyvulių sveikatai, bet ir didelius ekonominius nuostolius, susijusius su sumažėjusia išgaunamų grūdinių kultūrų verte ir grūdinės žaliavos analizės sąnaudomis, gyvulių produktyvumo sumažėjimu, žmonių sveikatos sistemos priežiūra [2, 3]. Mikroskopiniai grybai bei jų gaminami mikotoksinai ne tik užteršia salyklinę žaliavą, bet ir turi neigiamos įtakos salyklinių grūdų technologinėms savybėms: pakinta grūdų spalva ir forma, sumažėja jų maistinė vertė, įvyksta grūdų mikrostruktūros ir daigumo pokyčiai [4], suprastėja jų kokybė [5].

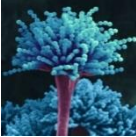


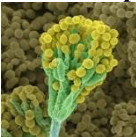
1.1.1. *Fusarium* spp. bei kitų mikroskopinių grybų ir jų gaminamų antrinių metabolitų charakteristika

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 400 mikroskopinių grybų gaminamų mikotoksinų. Tai įvairūs aflatoksinai, trichotecenai, fumonizinai, zearalenonas, ochratoksinai ir skalsių alkaloidai [6]. Juos gaminančios mikroskopinių grybų rūšys gali gaminti daugiau nei vieną toksišką junginį. Mikroskopiniai grybai pagal savo gaminamus mikotoksinius skirstomi į šešias pagrindines klases, kurios pateiktos 1.1 lentelėje [7].

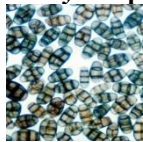
Toksinų gali būti aptinkama grūdiniuose pašaruose, maiste ir grūdų saugojimo patalpų dulkėse. Mikotoksinai, esantys maisto produktuose ir pašaruose, sukelia įvairius žmonių ir gyvulių susirgimus. Mikotoksinai gali sukelti tiek ūmias, tiek lėtines intoksikacijas, kurios gali lemti mirtį arba vidaus organų pažeidimus (centrinės nervų sistemos, širdies ir kraujagyslių sistemos, kvėpavimo sistemos ir virškinamojo trakto). Jie taip pat gali pasižymėti karcinogeniniu, mutageniniu, teratogeniniu ir imunosupresiniu poveikiu [8].

Mikroskopiniai grybai mikotoksinius gamina esant 22–30 °C temperatūrai, nors patys grybai gali augti ir esant mažesnei temperatūrai. Taip pat pelėsinių grybų gaminami mikotoksinai pasižymi termostabilumu – suyra tik labai aukštoje temperatūroje [9].

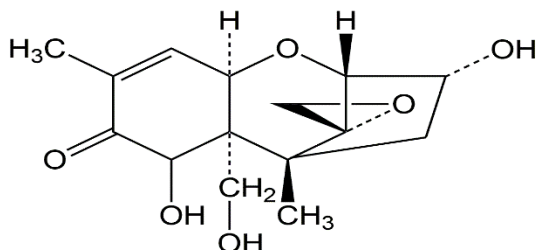
1.1 lentelė. Mikotoksinus gaminantys mikroskopiniai grybai [7]

Pagrindinės mikotoksinus gaminančių pelėsių grybų klasės	Pelėsiniai grybai	Mikotoksinai
<p><i>Aspergillus</i> spp.</p> 	<p><i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. pseudotamarii</i></p>	<p>Aflatoksinai (B₁, B₂, G₁, G₂)</p>
	<p><i>A. ochraceus</i></p>	<p>Ochratoksinai (ochratoksinas A)</p>
	<p><i>A. clavatus</i> <i>A. terreus</i></p>	<p>Patulinas</p>
	<p><i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i></p>	<p>Ciklopiazono rūgštis (CPR)</p>
<p><i>Claviceps</i> spp.</p> 	<p><i>C. purpurea</i> <i>C. fusiformis</i> <i>C. paspali</i> <i>C. africana</i></p>	<p>Penitremas A Skalsių alkaloidai: klavinas, lizergo rūgštis, lizergo rūgšties amidas (erginas), ergopeptinai, (ergotaminas, ergovalinas)</p>
<p><i>Fusarium</i> spp.</p> 	<p><i>F. verticillioides</i> (<i>F. moniliforme</i>) <i>F. proliferatum</i></p>	<p>Fumonizinas (B₁, B₂, B₃) Fuzarinė rūgštis</p>
	<p><i>F. graminearum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i></p>	<p>A grupės trichotecenai: T-2 toksinas, HT-2 toksinas, diacetoksiscirpenolis</p>
	<p><i>F. poae</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. crookwellense</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. sporotrichioides</i></p>	<p>B grupės trichotecenai: nivalenolis, deoksinivalenolis, fuzarenonas-X</p>
	<p><i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. sporotrichioides</i></p>	<p>Zearalenonas</p>
	<p><i>Penicillium</i> spp.</p> 	<p><i>Penic. verrucosum</i> <i>Penic. viridicatum</i></p>
<p><i>Penic. citrinum</i> <i>Penic. verrucosum</i></p>		<p>Citrininas</p>
<p><i>Penic. roqueforti</i></p>		<p>Rokforo PR toksinas Penitremas A</p>
<p><i>Penic. cyclopium</i> <i>Penic. camemberti</i></p>		<p>Ciklopiazono rūgštis (CPR) Penitremas A</p>
<p><i>Penic. expansum</i> <i>Penic. claviforme</i> <i>Penic. roquefortii</i></p>		<p>Patulinas</p>

1.1 lentelė (tęsinys). Mikotoksinus gaminantys mikroskopiniai grybai [7]

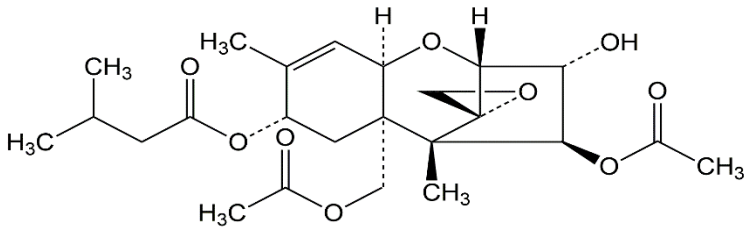
Pagrindinės mikotoksinus gaminančių pelėsinių grybų klasės	Pelėsiniai grybai	Mikotoksinai
<i>Neotyphodium spp.</i> 	<i>N. coenophialum</i>	Skalsių alkaloidai, lolinas, peraminas
	<i>N. lolii</i>	Lolitreimas, peraminas, skalsių alkaloidai (ergovalinas)
<i>Pithomyces spp.</i> 	<i>Pith. chartarum</i>	Sporidesminas

Vienas iš mūsų klimato zonoje, o kartu ir pasaulyje, dažniausiai aptinkamų trichotecenų grupės mikotoksinų, kurį gamina *F. culmorum*, *F. graminearum* ir kt. mikroskopiniai grybai, yra deoksinivalenolis (DON) (1.1 pav.). Šis mikotoksinas dar vadinamas vomitoksinu dėl vėmimo efekto, kurį sukelia kiaulėms. Trichotecenų toksikozėms būdingas viduriavimas, vėmimas, svorio netekimas. Dėl didelio citotoksiškumo ir imunosupresinių savybių jis kelia didelį pavojų žmonių ir gyvulių sveikatai. Toksiškumas taip pat pasireiškia įvairių organų pažeidimais, imuninės sistemos susilpnėjimu, mažėja gyvūnų produktyvumas. DON dar vadinamas mikotoksinų žymeniu, nes nustatyta, kad 90 % javų grūdų mėginių, kuriuose aptinkamas DON, randama ir kitų trichotecenų [10].



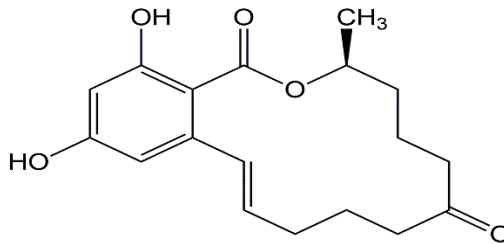
1.1 pav. Deoksinivalenolio (DON) struktūrinė formulė [11]

T-2 toksinas (1.2 pav.) priskiriamas prie A grupės trichotecenų A. Jį gamina *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* ir kt. mikroskopiniai grybai. Tirpus poliniuose tirpikliuose (etanolyje), šiek tiek tirpus vandenyje. Šis toksinas pavojingas žmonėms, gyvuliams ir paukščiams. T-2 toksinas sukelia sunkią (anksčiau ir mirtiną) ligą – maistinę toksinę aleukiją, hemoragijas [12].



1.2 pav. T-2 toksino struktūrinė formulė [13]

Zearalenonas (ZEN) yra estrogeninis mikotoksinas, kurį dažniausiai gamina *F. culmorum*, *F. graminearum* ir kt. *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai (1.3 pav.). Šis toksinas – tai žinomas natūralus estrogenas, kuris pasižymi mutageniniu veikimu ir pažeidžia ne tik paveldėjimo, bet ir dauginimosi funkcijas. Šio mikotoksino problema aktualiausia rūpinantis pašarų sauga. Jis ypač pavojingas kiaulėms ir kalakutams, jų reprodukcijai [14]. ZEN poveikis žmonėms dar labai mažai ištirtas.



1.3 pav. Zearalenono (ZEN) struktūrinė formulė [13]

Pastaruoju metu Lietuvoje pastebimai padidėjo mikroskopinių grybų rūšių įvairovė, nes padažnėjo žmonių migracija, pagausėjo maisto, pašarų ir žemės ūkio produktų bei prekių importas. Mikroskopinių grybų, kurie gamina mikotoksinus, plėtra padaro daug nuostolių žemdirbystės ir gyvulininkystės pramonei, taip pat turi didelę įtaką tiek žmonių, tiek ir gyvūnų sveikatai [2, 3].

Mokslinių šaltinių duomenimis, žemės ūkio produkcijos nuostoliai dėl toksiškų mikroskopinių grybų ir mikotoksinų kasmet siekia milijardus dolerių [15]. Mikroskopinių grybų produkuojamų toksinų sukeltos mikotoksikozės yra viena iš aktualiausių šių dienų problemų. Todėl ypatingas dėmesys turi būti skiriamas mikotoksinų prevencijai.

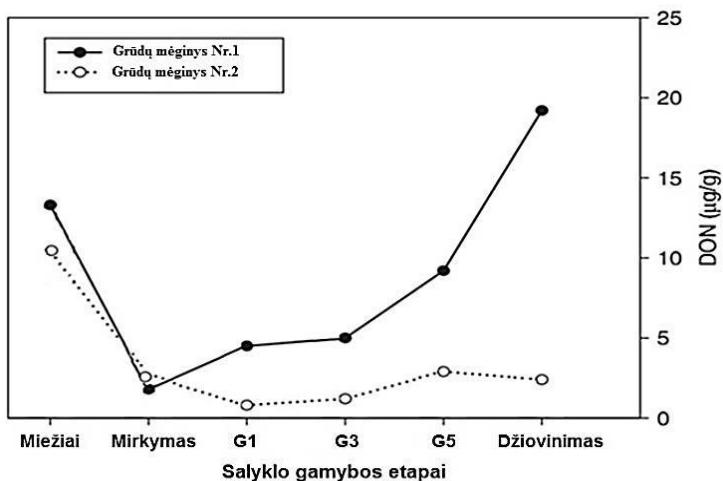
1.1.2. Mikotoksinų koncentracijos pokyčiai salyklo gamybos metu

Salyklo gamybos metu susidaro palankios sąlygos daugintis mikroorganizmams, kurie produkuoja žmonių sveikatai žalingus metabolitus – mikotoksinus. Pagrindinė mikroflora, aptinkama salyklo gamybos procese, yra *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai, kurie gamina DON, ZEN ir kt. mikotoksinus. *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai į salyklo gamybos procesą gali patekti iš lauko su pažeista grūdine žaliava, taip pat salyklo mirkymo metu per užterštą vandenį arba nuo technologinės įrangos. Salyklo mirkymo ir dauginimo metu dėl žemos temperatūros ir didelio vandens aktyvumo susidaro palankios sąlygos šiems mikroorganizmams daugintis [16].

Fusarium genties grybai bei jų produkuojami mikotoksinai turi neigiamos įtakos salyklo daigumui [4, 17], grūdinės masės sumažėjimui [18], α -amilazės aktyvumo sumažėjimui [19], taip pat sintetina šarminės proteazės, kurios hidrolizuoja miežių baltymus [20].

Moksliniuose šaltiniuose galima rasti informacijos apie mikotoksinų koncentracijos pokyčius salyklo gamybos metu. Tačiau mokslinių tyrimų rezultatai yra gana priešaringi. Sunčica ir kt. mokslininkai [21] tyrinėjo ZEN pokyčius salyklo gamybos metu. Buvo tiriami du miežių mėginiai, kuriuose ZEN koncentracija buvo atitinkamai 9,7 ir 9,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Salyklinių grūdų mirkymo metu ZEN koncentracija abiejuose mėginiuose padidėjo atitinkamai nuo 9,7 iki 86,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ir nuo 9,2 iki 37,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sausosiose medžiagose. Grūdų daiginimo metu ZEN kiekis abiejuose mėginiuose sumažėjo atitinkamai nuo 86,5 iki 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ir nuo 37,4 iki 26,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sausosiose medžiagose. Šį sumažėjimą, manoma, lėmė daiginamų miežių struktūrinių komponentų sąveika su miežių fermentais ar kitais jų komponentais. Salyklo džiovinimo metu mėginiuose pastebėtas ZEN kiekio padidėjimas – atitinkamai nuo 12,5 iki 62,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ir nuo 26,8 iki 71,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sausosiose medžiagose. Po džiovinimo, pašalinus grūdų daigus, ZEN kiekis salyklo mėginiuose sumažėjo atitinkamai iki 35,7 ir 17,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sausosiose medžiagose. Tai siejama su tuo, kad nemažas mikotoksino kiekis buvo pašalintuose daigeliuose.

Šie rezultatai sutampa su Schwarz ir kt. mokslininkų [22] gautais rezultatais, rodančiais, kad *Fusarium* spp. mikotoksinų kiekis grūdų daiginimo metu turėtų sumažėti (1.4 pav.).



1.4 pav. Mikotoksino DON koncentracijos pokytis salyklo gamybos metu [22]

Schwarz ir kt. [22] DON mikotoksino padidėjimą po džiovinimo operacijos aiškina tuo, kad džiovinimo metu susidaro mikroskopinių grybų augimui nepalankios sąlygos. Esant nepalankioms augimo sąlygoms, *Fusarium* spp. rūšys linkusios sintetinti mikotoksinius [23].

Taigi įvairių mokslininkų tyrimai parodė, kad nors ir skiriasi mikotoksinų koncentracijos pokyčiai skirtingose salyklo gamybos technologinėse operacijose,

tačiau yra akivaizdi bendra tendencija, kad salyklo gamybos metu dėl mikroskopiniams grybams labai palankių sąlygų daugintis didėja jų produkuojamų mikotoksinų kiekis salyklinėje žaliavoje. Todėl būtina ieškoti sprendimų, kurie leistų sumažinti tiek mikroskopinių grybų dauginimąsi, tiek jų metabolitų – mikotoksinų – susidarymą.

1.2. Greiti metodai *Fusarium* spp. mikotoksinams grūduose aptikti

Pasaulinėje praktikoje mikotoksinams aptikti iki šiol dažniausiai buvo taikomi daug darbo ir laiko reikalaujantys cheminiai pamatiniai mikotoksinų analizės metodai: plonasluoksnė chromatografija, skysčių arba dujų chromatografija su įvairiais detektoriais, įskaitant ir masių spektrometriją. Pastaraisiais metais vis plačiau pradedami naudoti keletas greitų analizinių metodų ir priemonių – imunofermentinė analizė, infraraudonoji spektroskopija ar biojutikliai [24]. Tačiau kiekvienas mikotoksinų nustatymo metodas turi savo privalumų ir trūkumų (1.2 lent.).

1.2 lentelė. Mikotoksinų aptikimo metodų privalumai ir trūkumai [24]

Metodas	Metodo privalumai	Metodo trūkumai
Dujų chromatografija (DCh)	Sinchroninė analizė; didelis tikslumas; gali būti automatizuotas (automatinis dozavimas); MS analizė leidžia patvirtinti metodo tikslumą	Brangi įranga; sudėtinga duomenų analizė; reikalinga mėginio derivatizacija; galimi rezultatų trukdžiai dėl mėginio matricos; nelinijinė kalibravimo kreivė; netikslus atsakas; ankstesnių mėginių įtaka naujų mėginių detekcijai; kintamas rezultatų atsikartojamumas
Efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh)	Didelis tikslumas, geras selektyvumas; geras rezultatų atsikartojamumas; gali būti automatizuotas (automatinis dozavimas); sąlygiškai trumpa analizė; arbitražinis metodas mikotoksinų detekcijai	Brangi įranga; sudėtinga duomenų analizė; reikalinga mėginio derivatizacija
Skysčių chromatografija su masių spektrometrija (SC/MS)	Sinchroninė analizė; didelis tikslumas (SC-MS/MS); patvirtintas metodo tikslumas; nereikalinga mėginio derivatizacija	Labai brangus; sudėtinga duomenų analizė; tikslumas priklauso nuo naudojamos jonizacijos technikos; analizuojamų junginių standartų trūkumas
Imunofermentinė analizė (ELISA)	Lengvas ir greitas mėginio paruošimas; nebrangi analizės įranga; geras tikslumas; sinchroninė analizė; ribotas naudojamas organinių tirpiklių kiekis	Kryžminis reaktyvumas su tiriamuoju mikotoksinu; galimi rezultatų trukdžiai dėl mėginio matricos; galimi klaidingi rezultatai, todėl jiems patvirtinti reikia GCh analizės

1.2 lentelė (tęsinys). Mikotoksinų aptikimo metodų privalumai ir trūkumai [24]

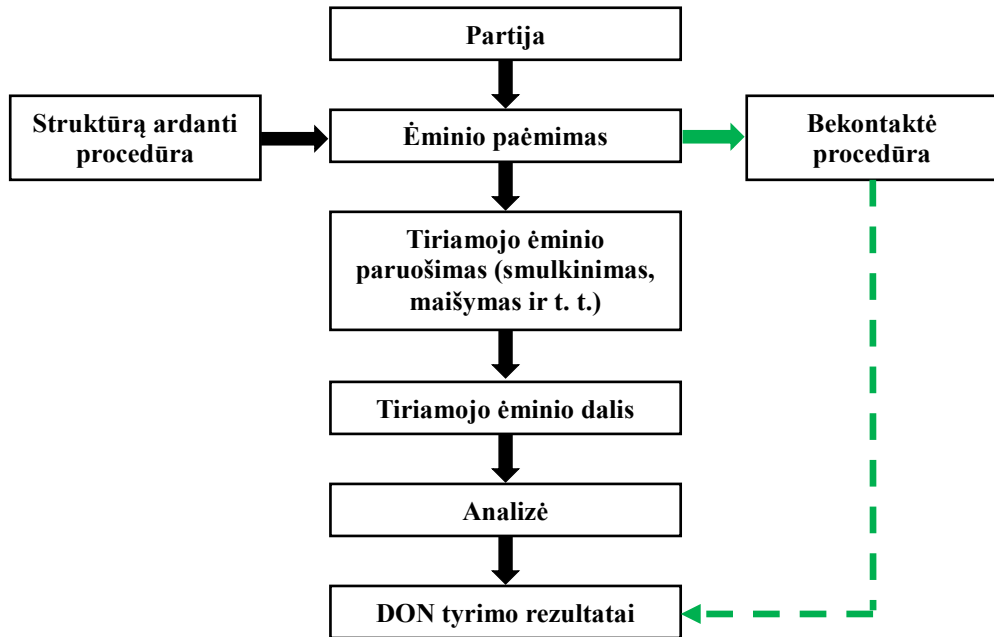
Metodas	Metodo privalumai	Metodo trūkumai
Soninio srauto imunologinė analizė (LFD)	Greitas; nebrangi analizės įranga; lengva naudotis; nereikia papildomų mokymų	Pusiau kiekybinis (vertinant vizualiai); kryžminis reaktyvumas su tiriamuoju mikotoksinu; reikia rezultatų patvirtinimo atskirai kiekvienai tiriamojo junginio matricai
Fluorescencinės poliarizacijos imuninė analizė (FPIA)	Greitas; lengva naudotis; patvirtintas metodas DON kviečių grūduose aptikti	Nesuderinamas su ELISA ir ESCh analizėmis (išskyrus DON nustatyti); prastas tikslumas; kryžminis reaktyvumas su tiriamuoju mikotoksinu; galimi rezultatų trikdžiai dėl mėginio matricos
Infraraudonoji spinduliuotė (IR)	Greitas, nesudėtingas, neinvazinis	Brangi analitinė įranga; metodą reikia kalibruoti arbitražiniais mikotoksinų nustatymo metodais; prastas tikslumas
Biojutikliai	Greitas, nesudėtingas	Kryžminis reaktyvumas su tiriamuoju mikotoksinu; reikia pagerinti analizės procedūrą; problemos dėl rezultatų atsikartojimo ir patikimumo
Molekulinių įspaudų polimerų analizė (MIP)	Nebrangus, pakankamai tikslus, daugkartinio naudojimo	Prastas mikotoksinų aptikimo selektyvumas

Įvertinant 1.2 lentelėje pateiktų metodų privalumus ir trūkumus, būtina kurti ir vystyti greitus ir efektyvius mikotoksinų nustatymo ir kontrolės grūduose metodus. Daugelis naujausių metodų, tokių kaip fluorescencinės poliarizacijos imunotestai, įvairūs biojutikliai ar bekontakčiai metodai, naudojant infraraudonosios spinduliuotės ar akustinę techniką, įgauna didelį potencialą mikotoksinų analizėje.

Viena iš greitų metodų vystymo krypčių galėtų būti pažeistų grūdų struktūrinių pokyčių analizė. *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai ardo grūdus, keičia jų struktūrą, o susidarę toksinai užkrečia maistą bei gyvulių pašarus. Tokių pokyčių pavyzdžiu galėtų būti kviečių, rugių ir miežių raukšlėjimasis (*šašų liga*), kurį sukelia *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai, dar vadinami dirvos pelėsiais [25]. Vizuali apžiūra, leidžianti atskirti potencialiai užkrėstas kviečių partijas, turėtų būti viena iš standartinių procedūrų ir prevencinių veiksnių pažeistų grūdų kontrolei. Tuo tikslu *Acurum* firma, remiama Kanados grūdų komisijos (CGC), išvystė vaizdo analizės principu veikiančią prietaisą su kompiuterinio duomenų apdorojimo sistema defektuotiems grūdams įvertinti ir apibūdinti. Tačiau ši technika iki šiol neįvertinta DON kiekybiškai. Be to, ji yra brangi ir naudoja mažą mėginio kiekį, o tai neatitinka ES nustatytų reprezentatyvaus mėginio sudarymo reikalavimų [26].

Įvertinant tai, kad mikotoksinų tyrimo metodai sudėtingi ir brangūs, grūdų

produktų gamybos procesuose itin didelis dėmesys turi būti skiriamas technologinėms priemonėms, padedančioms sumažinti mikotoksinų kiekį, ir kartu rizikos veiksnių analizės ir svarbių valdymo taškų (RVASVT) sistemos taikymui gamybos procesuose [27]. Norint nustatyti mikotoksinų kiekį grūduose, būtina tiksliai paimti ėminį pagal standartą. Nuo ėminio paėmimo priklauso ir analizės rezultatai [28]. Įvertinant tai, aktualu sukurti analizės metodus, kuriems nereikėtų taikyti sudėtingos mėginių ėmimo ir paruošimo procedūros (1.5 pav.).



1.5 pav. Mikotoksinų analizės procedūra

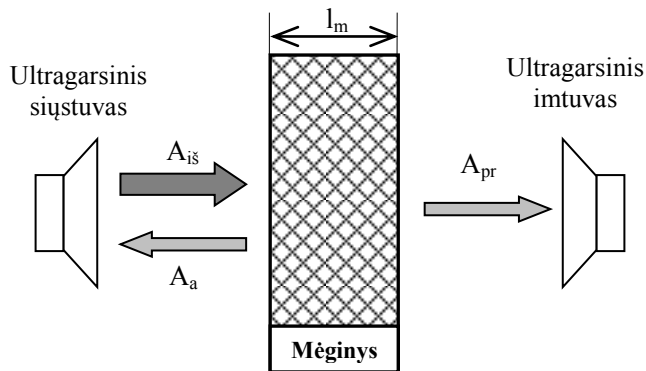
Kauno technologijos universitete kuriamas greitas bekontaktis akustinis metodas mikotoksinams (DON, aflatoksinui ir kt.) grūduose aptikti ir jiems įvertinti kiekybiškai. Šis metodas paremtas priklausomybių tarp akustinio signalo parametrų ir fuzariozės pažeistų grūdų struktūrinių savybių pokyčių nustatymu. Vertinant DON kiekį kviečiuose, nustatytą akustiniu metodu, ir šio mikotoksino kiekį, nustatytą tradiciniu ELISA metodu, buvo gauta teigiama priklausomybė ($R^2 \approx 0,9$ ir daugiau) [29]. Be to, taikant šį metodą išsprendžiama sudėtingos tiriamojo mėginio ėmimo procedūros problema. Pažymėtina, kad ši akustinė sistema iki šiol nebuvo taikoma mikotoksinams salykliniuose grūduose aptikti.

1.2.1. Grūdų taršos įvertinimas akustiniu metodu

Dažniausiai maisto pramonėje yra susiduriama su poringomis medžiagomis. Šių medžiagų analizei taikomi įvairūs matavimo metodai: mechaniniai, optiniai, elektriniai, fotografiniai, radioizotopiniai, infraraudonųjų bei rentgeno spindulių metodai [30]. Šiuo metu labai didelis dėmesys skiriamas spektrometriniams matavimo metodams [31], kuriuos taikant kaip informacijos nešėjos naudojamos elektromagnetinės bei akustinės bangos. Šie metodai pasižymi dideliu tikslumu ir

yra dažnai taikomi praktikoje [31]. Tačiau juos sunku taikyti gamybos procese, jei aplinkoje yra daug trikdžių. Tinkamiausias metodas matavimams tokioje aplinkoje atlikti yra laiko intervalų tarp signalų matavimas, t. y. ultragarso, sklindančio medžiagoje, greičio matavimas. Taip pat galima matuoti ir ultragarsinio signalo amplitudės pokytį. Akustinių bangų greitis daugelyje poringų medžiagų yra apie 1000–2000 m/s. Toks palyginti nedidelis greitis gali būti išmatuojamas dideliu tikslumu. Dėl akustinės bangos sklidimo savybių jų taikymas poringoms medžiagoms tirti yra perspektyvus. Parinkus optimalų ultragarsinių bangų dažnį, galima tirti medžiagas, sudarytas iš įvairaus dydžio dalelių. Tiriant poringas medžiagas, geriausi rezultatai gaunami tuomet, kai naudojamos žemo dažnio ultragarsinės bangos. Metodai, taikomi automatizuotose gamybos sistemose, yra ultragarso, sklindančio per medžiagas, greičio matavimas ir ultragarso slopimo medžiagose įvertinimas. Šie metodai yra labai greiti, nereikalauja specialaus gaminio paruošimo ir jo nesuardo [32, 33]. Jie gali būti taikomi gamybos parametrų kontroliuoti nepertraukiamame gamybos procese, dėl to tampa dar patrauklesni [34].

Dažnai taikomas tiesioginis akustinio matavimo metodas, kai ultragarso signalo parametrai yra matuojami prieš jam patenkant į mėginį ir jau perėjus mėginį (1.6 pav.). Tuomet poringumas yra nustatomas tiriant šių signalų santykį. Lyginant medžiagų bandinius, reikia, kad jų storis būtų kiek įmanoma panašesnis.



1.6 pav. Mikotoksinų analizės procedūra. Čia $A_{i\grave{s}}$, A_{pr} ir A_{at} – atitinkamai išsiųsto, priimto ir atsispindėjusio signalo amplitudės; l_m – medžiagos mėginio storis

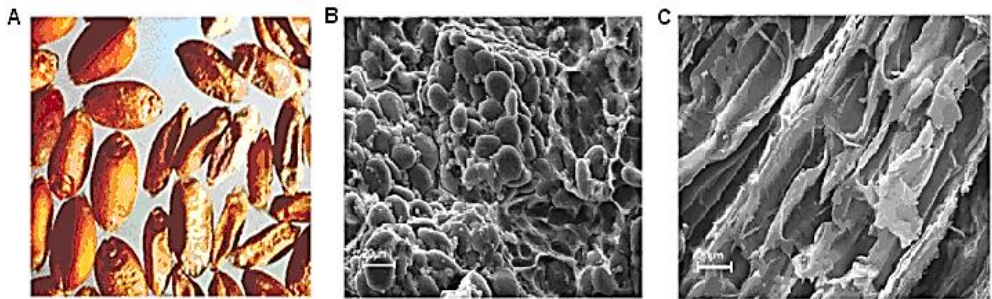
Tiesioginis matavimo metodas gali būti kombinuojamas kartu su akustiniu aidolokaciniu metodu. Šiuo atveju matuojamas perėjusio ir atsispindėjusio akustinio signalo parametrų santykis. Įrodyta, kad garso sklaida per poringas struktūras silpnėja ir garso greitis priklauso nuo poros dydžio ir poringumo koeficiento [35]. Esant žemiems garso dažniams, papildomai galima įvertinti kitas tiriamo objekto savybes, pvz., kliūtis, kurių sutinka akustinė banga, paviršiaus formą, kada garsinė banga sklinda per ją arba aplink ją ar atsispindi nuo kitų medžiagų. Akustinei bangai sklindant ar atsispindint nuo medžiagos, bet kurie sklidimo kelio charakteristikos pokyčiai turi įtakos greičiui ir (ar) bangos amplitudei [36, 37], kurie gali būti išmatuojami. Sparčioji Furjė transformacija (FFT) paverčia laiko domeno rezultatus

į dažnio domeną, ir rezultatai tampa palyginami su spektriniais matavimais.

Akustiniai matavimai taikomi 0–125 kHz dažnių diapazone ir palyginti sausoms poringoms maisto matricoms, tokioms kaip duona, sausainiai, ekstruduoti produktai, vertinant jų kokybę (struktūrą / tekstūrą) ir (ar) jų pokyčius laikymo metu. Prie tokių poringų struktūrų priskiriama ir kviečių grūdų masė. Be to, akustiniai matavimai gali būti taikomi putoms charakterizuoti (plaktinių konditerinių masių, alaus putų stabilumui tirti ir kt. aeruotiems produktams, pvz., tankiui įvertinti) ir kai kuriems specifiniams maisto kokybės parametrams, pvz., ekstrakcijos greičiui vertinant arbatos kokybę, nustatyti.

Žemo dažnio akustinės bangos gali sklisti per poringas medžiagas (pvz., javų grūdų sluoksni) arba nuo jų atsispindėti (iš dalies) [29]. Granuliuotos poringos medžiagos, tokios kaip grūdai, labai gerai absorbuoja akustinę terpę. Akustinė energija poringoje aplinkoje (pvz., javų grūduose) gali būti perduodama per struktūrą / tekstūrą ir orą. Remiantis Hicklingo ir kt. [38] tyrimais, grūdų analizės atveju akustinės bangos daugiausia perduodamos per orą ir per tarpgrūdines oro erdves.

Fizikinių metodų taikymas mikotoksinams aptikti ir stebėti pagrįstas *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų struktūriniais pokyčiais. Kai grūdai yra užkrėsti mikroskopiniais grybais ir susiraukšlėję (serga vadinamąja *šasų* liga), dėl padidėjusio pašalinės mikrofloros fermentinio aktyvumo hidrolizės metu suardoma grūdo krakmolo granulių struktūra (1.7 pav.), dėl fermentinių procesų susidarę užkrėstų grūdų struktūros pokyčiai siejami su oro tuštumų atsiradimu ir tarpgrūdinės erdvės padidėjimu [29].



1.7 pav. *A* – sveiki kviečių grūdai (kairėje) ir susiraukšlėję grūdai, užteršti mikotoksinais (dešinėje), *B* – sveikuose grūduose matomi nepažeisti krakmolo grūduliai, *C* – užterštiems grūdams būdinga pažeista grūdo krakmolo struktūra [29]

Garso sklidimas per sveikus neužkrėstus grūdus ir per užkrėstus susiraukšlėjusius grūdus, kurių krakmolo granulių struktūra pažeista, bus skirtingas [29]. Kai oru sklindančios garso bangos susiliečia su nesuardytomis grūdų dalelėmis, dalis energijos atsispindi, o kita dalis perduodama per terpę ir jos likutis išsisklaido. Tai rodo, kad garso dinamiką poringoje medžiagoje iš esmės nulemia terpės, kuria sklinda garsas, fizinės savybės. Nustatyta, kad akustikos dinamikai poringoje granuliuotoje terpėje įtakos turi poringumas, paviršiaus forma ir oro srauto varža [38]. Be to, nustatyta [39], kad grūdų masėje garso absorbcijai įtakos turi dalelių dydis ir forma. Todėl manoma, kad sukurta akustinė įranga galėtų būti

naudojama nuėmus derlių, t. y. grūdų perdirbimo grandinės pradžioje (prieš grūdų laikymą, malimą, salyklo gamybą), kai dominuoja vienas grūdų genotipas; taip būtų eliminuojami matavimo tikslumui įtakos galintys turėti veiksniai (grūdų dydis ir forma). Šiame darbe tiriamos galimybės akustinį metodą panaudoti kuriant greitą, bekontaktį, efektyvų ir pigų metodą mikotoksinui DON salykliniuose kviečiuose aptikti.

1.2.2. Grūdų taršos įvertinimas fiksuojant anglies dioksido koncentracijos pokytį grūdų laikymo metu

Nuimto grūdų derliaus laikymo sąlygos yra vienas iš svarbiausių technologinių grūdų kokybę lemiančių veiksnių [40]. Po derliaus nuėmimo, esant nepalankioms grūdų laikymo sąlygoms, mikroorganizmai gali toliau daugintis [5]. Nepakankamai užtikrintas grūdų valymas prieš jų laikymą taip pat gali būti vienas iš veiksnių, lemiančių mikroskopinių grybų dauginimąsi grūduose. Nesilaikant tinkamų laikymo sąlygų, grūduose pradeda intensyviai daugintis pelėsiniai grybai, kurie suaktyvina grūdų kvėpavimą, išskirdami anglies dioksidą, todėl grūdai pradeda kaisti. Manoma, kad laikomų grūdų masėje susidaręs didelis CO₂ kiekis gali būti rizikos veiksnys, rodantis laikomų grūdų mikrobiologinės taršos pradžią [5, 41]. Dažnai grūdų kvėpavimo suintensyvėjimą lemia padidėjęs grūdų drėgnis [42]. Nustatyta, kad normą viršijanti (14 %) laikomų grūdų drėgmė sudaro puikias sąlygas daugintis mikroskopiniams grybams, kurie užteršia laikomus grūdus ir sukelia grūdų masės nuostolius [43].

Ankstyvas grūdinės žaliavos taršos nustatymas grūdų laikymo metu padeda gerokai sumažinti kokybinius ir kiekybinius nuostolius, slopinti mikotoksinų susidarymą salykliedėse ir išvengti finansinių nuostolių. Tipinis metodas grūdų taršos laipsniui nustatyti – termokabelių, kurie matuoja grūdų temperatūrą realiuoju laiku, naudojimas grūdų saugyklose [44]. Grūduose ir aplink grūdą esanti mikroflora išskiria šiluminę energiją, todėl iš grūdų masės temperatūros pokyčių gali būti nustatomi taršos židiniai [45]. Tačiau temperatūros matavimas nėra pakankamai jautrus metodas dėl mažo grūdų masės šilumos laidumo. Gautus rezultatus sunku interpretuoti dėl aplinkos temperatūros svyravimų, pvz., 35 °C temperatūra gali reikšti, kad grūduose yra aktyvus taršos židinis arba kad grūdų temperatūra pakilo dėl pasikeitusios aplinkos temperatūros. Todėl talpykloje, kurioje saugomi grūdai, CO₂ koncentracijos padidėjimas taip pat galėtų būti tinkamas kintamasis grūdų kokybei įvertinti [46]. Grūdų biologinio aktyvumo pagrindinis rodiklis yra kvėpavimo intensyvumas. Kuo jis didesnis, tuo didesnis šilumos srautas, išskiriamas iš laikomos produkcijos, tuo didesni laikymo nuostoliai. Grūdų užkrėstumas mikroskopiniais grybais, esant palankioms sąlygoms, gali padidinti kvėpavimo intensyvumą, nes dauguma mikrogybų yra obligatiniai aerobai – įsisavina substratą jį oksiduodami [47].

Anglies dioksido koncentracija atmosferoje išreiškiama procentinėmis dalimis (%). Išmatuota CO₂ koncentracija lyginama su aplinkos CO₂ koncentracija, kuri yra apie 0,04 % [48]. CO₂ koncentracijos svyravimo monitoringo efektyvumas patvirtintas tyrimais. Tirtose talpyklose su javų grūdais, kuriuose CO₂ koncentracija fiksuota didesnė nei aplinkos, buvo patvirtintas grūdų užterštumas [49].

Neaukšto lygio (silpną) grūdų sugedimą, kurį sukelia mikroskopiniai grybai ir įvairūs kenkėjai, galima aptikti matuojant CO₂ koncentraciją tarpgrūdinėje erdvėje. Šie mikroorganizmai kvėpuodami išskiria CO₂, todėl matuojant CO₂ koncentraciją jų buvimą galima nustatyti pradinėse grūdų gedimo stadijose. Grūdų laikymas yra saugus grūdų masėje vyraujant 0,04–0,05 % CO₂ koncentracijai; kai CO₂ koncentracija buvo 0,05–0,12 %, fiksuotas mažas mikroorganizmų aktyvumas; esant didesniai sugedimo lygiui, fiksuota 0,15–0,4 % CO₂ koncentracija, o labai pažeistuose grūduose CO₂ koncentracija dažniausiai būdavo 0,4 % ir didesnė. CO₂ koncentracijai laikomų grūdų masėje svyruojant nuo 0,05 iki 0,12 %, 30 % visų laikomų grūdų buvo pažeista mikroskopinių grybų, o, esant didesnei nei 0,9 % koncentracijai, pažeistumas buvo didesnis nei 90 % [49].

CO₂ koncentracijos monitoringas grūdų saugojimo metu, palyginti su temperatūros monitoringu, padeda nustatyti grūdų užterštumą mikroorganizmais ankstyvesnėje stadijoje. CO₂ koncentracijos monitoringas talpyklose ar maišuose (didmaišiuose) yra svarbesnis indikatorius, nes išlaikomos hermetiškos sąlygos ir eliminuojamas aplinkos poveikis [41].



1.8 pav. CO₂ daviklių sistema grūdų talpykloje [50]

CO₂ koncentracija gali būti stebima periodiniu ir tolydiniu būdu. CO₂ koncentracijai laikomuose grūduose nustatyti periodiniu būdu sukurtas paprastas laboratorinis prietaisas, kurį sudaro 50 ml plastikinis švirkštas, guminis vamzdelis, CO₂ vamzdelinis analizatorius, polietileninis vamzdelis. CO₂ koncentracijai nustatyti polietileninis vamzdelis įleidžiamas į grūdus ir oras plastikiniu švirkštu įtraukiamas į CO₂ analizatorių. Apie CO₂ koncentraciją sprendžiama pagal prietaise sugraduotą spalvos intensyvumo skalę. CO₂ nustatyti gamintojai siūlo išgyti analizatoriaus vamzdelius su skalėmis: 0,01–0,3, 0,1–1,2, 0,5–6,0, 0,5–10,0, 1,0–20,0 ir 5–60 % [51].

Technika tolydinei CO₂ kontrolei pagrįsta šio parametro fiksavimu viršerdvėje [52]. Ji leidžia tiksliai ir daug anksčiau nustatyti grūdų gedimą ir užterštumą vabzdžiais nei vykdant temperatūros ir drėgmės monitoringą. Tai ypač naudinga didelėse talpyklose. Talpyklose atliekant CO₂ monitoringą tolydiniu būdu, atsižvelgiant į talpyklos dydį ir stogo konstrukciją, maždaug 1 m virš grūdų sampilo įmontuojami CO₂ davikliai, kurie realiuoju laiku fiksuoja CO₂ koncentraciją. Labai

svarbu išvengti CO₂ nutekėjimo, todėl vieta, kurioje įmontuojami davikliai, turi būti hermetizuota. Daviklių energijos blokas taip pat dažnai yra montuojamas ant stogo ir kombinuojamas su saulės energijos moduliu. Valdymo pultas statomas talpyklos išorėje, 1,5 m virš žemės. Surinkti CO₂ matavimo duomenys apdorojami pagrindiniame valdymo bloke ir bevieliu ryšiu siunčiami į pagrindinį serverį. Pasiiekus tam tikrą nustatytą CO₂ koncentracijos ribą arba esant staigiems CO₂ koncentracijos pokyčiams, pasirinktu būdu (telefonu, žinute, elektroniniu paštu ar kt.) gali būti siunčiamas pavojaus signalas [50].

Toks techninis sprendimas efektyviausias talpyklose, turinčiose aktyviosios ventiliacijos sistemą. Jeigu grūdų saugyklose nėra ventiliacijos sistemų, toks CO₂ monitoringas grūdų laikymo metu yra probleminis dėl skirtingos dujų migracijos laikomuose grūduose. Metodo tikslumui padidinti, pvz., mažose neventiliuojamose talpyklose, aktualu rasti naują techninį sprendimą, leidžiantį stebėti CO₂ koncentracijos pokyčius grūdų masėje. Todėl būtina padidinti CO₂ monitoringo laikomuose grūduose efektyvumą, sukuriant CO₂ koncentraciją nuolat fiksuojančių matavimo modulių tinklą ir jų galimo išdėstymo plokščiadugnėse bearuodėse saugyklose, kurios būdingos mažiems ūkiams, schemą.

1.3. Grūdų detoksikacijos galimybės

Grūdų taršai sumažinti šiuo metu yra pasiūlyti ir taikomi trejopi metodai: fizikiniai, cheminiai ir biologiniai [53].

Įrodyta, kad DON kiekį grūduose terminio apdorojimo (virimo) metu galima sumažinti 25 % [54, 55]. Moksliniuose šaltiniuose aprašoma daugybė fizikinių pašarų detoksikavimo būdų ir priemonių, pvz., grūdų valymas, ekstrakcija organiniuose tirpikliuose, infraraudonoji spinduliuotė, ultragarsas [56]. Vienas iš efektyvių mikotoksinų kiekio mažinimo galutiniame produkte būdų yra grūdų valymas [57]. Pirmiausia iš grūdų pašarui reikia išvalyti piktžolių sėklas, pažeistus grūdus, įvairias priemaišas, grūdų paviršių valyti specialiais siurbliais, sijoti, sterilizuoti ir kt. Nustatyta, kad valant grūdus DON koncentraciją galima sumažinti 7–23 % [57]. Dauguma mikotoksinų yra termostabilūs, todėl aukšta temperatūra retai naudojama grūdų detoksikacijai [56]. Trichotecenai 120–180 °C temperatūroje yra labai stabilūs ir suyra tik 210 °C temperatūrai veikiant 30–40 minučių [58]. Įrodyta, kad, atliekant grūdų detoksikaciją autoklave su natrio bisulfitu (Na₂S₂O₅), DON koncentracija sumažėja [53, 59]. Danicke ir kt. [60] taip pat nustatė, kad hidroterminis DON užterštų kviečių apdorojimas natrio bisulfitu yra veiksminga priemonė DON kiekiui sumažinti. Yra tirta įvairaus bangos ilgio spinduliuotės įtaka grūdų detoksikacijai. Pastebėta, kad, kviečius apdorojant gama spinduliuote, DON koncentracija sėkmingai sumažėja [61]. Deja, infraraudonosios spinduliuotės paveiktuose grūduose taip pat vyksta įvairūs šalutiniai metabolitiniai procesai, kurių metu susidaro dar daugiau toksinių medžiagų [62]. Reikia pažymėti, kad spinduliuavimas yra veiksmingas grūdų nukenksminimo būdas tik tada, kai jis taikomas plonam grūdų sluoksniui [56].

Tyrinėjant įvairių cheminių medžiagų įtaką grūdų detoksikacijai, pastebėtas teigiamas detoksikacinis poveikis [63]. Dažniausiai cheminės grūdų detoksikacijos metu naudojami šie junginiai: kalcio hidroksidas su monometilaminu, natrio

bisulfitas, chloro dujos, vandenilio peroksidas, askorbo rūgštis, druskos rūgštis, sieros dioksido dujos (sudrėkintos), formaldehidai, amoniakas ir amonio hidroksidas [64, 65]. Cheminė detoksikacija neatitinka Jungtinių Tautų Maisto ir žemės ūkio organizacijos reikalavimų, nes pastebėta, kad chemikalai, kurie naudojami grūdams detoksikuoti, po detoksikacijos palieka tam tikrus toksinius junginius, taip pat sumažina žaliavos maistinę vertę. Natrio bisulfitas yra vienas iš maisto priedų, kurie gali gerokai sumažinti DON koncentraciją kukurūzų pašaruose [66]. Tam tikrais atvejais fizinio ir cheminio detoksikacijos metodų kombinacijų panaudojimas buvo kur kas veiksmingesnis nei jų taikymas atskirai. Visi fizikiniai ir cheminiai grūdų detoksikacijos metodai reikalauja specialios įrangos ir jų atlikimas užima nemažai laiko, dėl to išauga ir metodų sąnaudos. Šių metodų efektyvumas labai priklauso nuo grūdų užterštumo mikotoksinais lygio ir nuo mikotoksinų pasiskirstymo grūdinėje žaliavoje. Vėlesni šių metodų tyrimai parodė, kad juos taikant gerokai sumažėja grūdinėje žaliavoje esančių maistinių medžiagų kiekis [67]. Be to, kai kurios detoksikacijai naudojamos cheminės medžiagos kelia grėsmę su jomis dirbančių darbuotojų sveikatai. Taip pat verta paminėti, kad fizikiniai ir cheminiai mikotoksinų pašalinimo metodai ne tik sumažina grūdinės žaliavos maistinę vertę, bet ir kartu keičia jos juslines savybes. Įvertinus šiuos detoksikacijos metodus, išaiškėja ribotos jų praktinio pritaikymo galimybės [56].

Norint pritaikyti kurį nors būdą pramonėje, reikia, kad jis būtų veiksmingas, nesudarytų naujų toksinių ar kenksmingų junginių, taip pat nesumažintų grūdinės žaliavos maistinės vertės. Jis turi būti saugus žmonėms ir gyvuliams, tikslus, paprastas ir nebrangus [59].

1.3.1. Biopriemonių naudojimas salyklinių grūdų saugai didinti

Antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys mikroorganizmai

Pastaruosiu metu mikotoksinams iš maisto produktų ir pašarų pašalinti vis plačiau taikoma biologinė detoksikacija [68, 69]. Šios detoksikacijos esmė yra mikroorganizmų panaudojimas mikotoksinų kiekiui sumažinti, biologiškai izoliuoti (*surišti*) ar transformuoti į netoksiškus ar ne tokius toksiškus junginius [70, 71]. Vieni pagrindinių antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys mikroorganizmų maisto pramonėje – pieno rūgšties bakterijos (PRB) [72, 73].

Prie pieno rūgšties bakterijų (PRB) priskiriami įvairių genčių atstovai – tai *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ir *Pediococcus* bakterijos, kurios yra gramteigiamos ir sporų neformuojančios. Šie mikroorganizmai naudojami kaip konservantai, saugantys nuo mikroskopinių grybų [74, 75]. Daugelis šių PRB yra tradiciškai naudojamos pramoninėje fermentuotų maisto produktų, gėrimų ir pašarų gamyboje [76]. Jos yra taikomos sūrių, jogurtų, dešrų, raugintų kopūstų, sojų padažo ir siloso gamyboje [77, 78]. Taip pat PRB yra naudojamos gaminti *kvapiams* fermentams, antimikrobinėmis savybėmis pasižymintiems peptidams, kurie prisideda prie maisto skonio ir tekstūros pagerinimo [79, 80, 81]. Keletas PRB, ypač *Lactobacillus* spp., šiuo metu yra aktyviai naudojamos kaip probiotinės kultūros funkciniams maisto produktams gaminti ir sveikatingumui skatinti [82, 83].

Mielės taip pat pasižymi antimikrobinėmis savybėmis [84, 85]. Jos,

dalyvaudamos fermentacijos reakcijose, sintetina antimikrobinu aktyvumu pasižyminčius metabolizmo produktus, kurie turi probiotinių savybių [86, 87]. Fermentacijos metu pastebėtas dominuojantis mielių, ypač *Saccharomyces cerevisiae* ir *Candida krusei*, antimikrobinis poveikis [88, 89].

Nemažai mokslinių tyrimų parodė antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių mikroorganizmų galimybes detoksikuoti. Pavyzdžiui, vieno tyrimo metu buvo nustatytas didelis mikotoksinių (aflatoksino B1 ir ochratoksino) sumažėjimas alaus gamybos metu [90]. Govarisui ir kt. tyrėjams [91] fermentuojant karvių pieną jogurto gamybai, aflatoksino M1 koncentracija sumažėjo nuo 13 iki 22 %, o, jogurto laikymo metu pH vertėms esant tarp 4,6 ir 4, mikotoksinių koncentracija sumažėjo dar atitinkamai nuo 16 iki 34 %.

Tyrimu nustatyta, kad *Lactobacillus* padermės *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* geba iš mitybinės terpės pašalinti iki 94 %, 72 % ir 46 % ochratoksino A [92], o *L. plantarum*, *L. brevis* ir *L. sanfranciscensis* – atitinkamai iki 54 %, 50 % ir 37 % ochratoksino A po 24 val. inkubacijos [93]. Piotrowska ir kt. [94] patvirtino, kad *L. acidophilus* ir *L. rhamnosus* gali sumažinti ochratoksino A kiekį atitinkamai 70 % ir 87 % po penkių dienų inkubacijos 37 °C temperatūroje. Kitos PRB (*L. brevis*, *L. plantarum* ir *L. sanfranciscensis*) taip pat sumažino ochratoksino A kiekį iki 50 %. Del Prete ir kt. [95] išbandė 15 vynininkystėje naudojamų PRB padermių siekdami nustatyti *in vitro* gebėjimą pašalinti ochratoksiną A ir nustatė, kad *Oenococcus oeni* geba efektyviausiai (iki 28 %) sumažinti ochratoksino A kiekį.

Mielės ir PRB turi didžiulį potencialą kaip biologinės kovos su mikroskopiniais grybais ir jų gaminamais mikotoksinais priemonės. Pažymėtina, kad naudojant šias biopriemones taip pat galima padidinti bioetanolio gamybos iš pažeistos grūdinės žaliavos efektyvumą [96, 97]. Iš mokslinių šaltinių yra žinoma, kad, augalinei žaliavai fermentuoti panaudojant įvairias mielių ir kitų mikroorganizmų padermes, galima padidinti bioetanolio išeią [98], sutrumpinti fermentacijos trukmę ir sumažinti viso fermentacijos proceso išlaidas [99, 100]. Todėl mielių ir kitų mikroorganizmų kombinacijų panaudojimas užkrėstos augalinės žaliavos perdirbimo procese galėtų būti gera alternatyva bioetanolio gamybos procese, taip pat fermentacijos metu susidariusių šalutinių produktų, žlaugtų, detoksikacijai ir panaudojimui pašarų gamyboje [101, 102].

Mikotoksinių biosintezės inaktyvinimas pieno rūgšties bakterijomis

Pastarąjį dešimtmetį pradėta aktyviau domėtis PRB, kaip detoksikacinės priemonės, panaudojimu mikroskopinių grybų ir grūdinėje žaliavoje jų gaminamų mikotoksinių susidarymui slopinti [103, 104].

Mokslininkų tyrimai parodė, kad skirtingų rūšių PRB mikotoksinių biosintezę slopina nevienodai [105, 106].

Pasak Magnussono ir kt. [107], yra trys būdai paaiškinti PRB antimikrobinį efektyvumą: organinių rūgščių poveikis, konkurencija dėl maisto medžiagų ir antimikrobinų baltymų poveikis. Keletas PRB rūšių – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus curvatus* – sugeba sintetinti

peptidus arba antimikrobinius baltymus – bakteriocinus, kurių veikla yra nukreipta prieš glaudžiai taksonomiškai susijusias bakterijas. Tačiau pagrindinės žinomos PRB rūšys, kurios sugeba slopinti mikroskopinių grybų augimą ir užkirsti jam kelią, yra *Lactococcus* ir *Lactobacillus*, taip pat *Pediococcus* ir *Leuconostoc* [73].

Moksliniai tyrimai parodė, kad *Lactobacillus casei* [108, 109, 110] geba slopinti mikroskopinių grybų augimą. Be to, patvirtintas ir PRB *Pediococcus* genties gebėjimas slopinti mikroskopinių grybų augimą [111, 112, 113].

Gourama [114], atlikdamas antigrybelinius tyrimus, nustatė, kad *Lactobacillus* metabolitas slopina aflatoksino kaupimąsi ir šalutinių junginių atsiradimą. Nustatyta, kad aflatoksino biosintezės slopinimas susijęs ne su vandenilio peroksido ar terpės pH mažėjimu [115]. Todėl manoma, kad aflatoksino biosintezės slopinimas *Lactobacillus* ląstelėmis įvyko dėl specifinių *Lactobacillus* bakterijų gaminamų metabolitų [112].

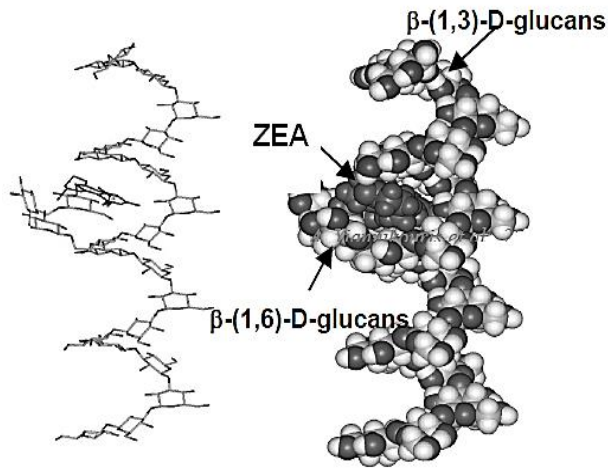
Mikroorganizmų panaudojimas mikotoksinų biologinei detoksikacijai

Nustatyta daugiau kaip 20 bakterijų ir mielių rūšių, pasižyminčių detoksikuojamosiomis savybėmis [116, 117].

Nustatytas detoksikuojamasis ryšys tarp įvairių pieno rūgšties bakterijų rūšių ir *Fusarium* spp. gaminamų toksinų, pvz., ZEN ir jo darinio α -zearalenono. Nemaža dalis (38–48 %) abiejų toksinų buvo įterpta bakterijų ląstelėse ir jokių ZEN ir jo darinių skilimo produktų nenustatyta, todėl buvo padaryta išvada, kad toksinai iš terpės buvo pašalinti PRB juos sujungus, o ne vykstant metabolizmo reakcijai tarp mikotoksinų ir PRB [118]. Panašūs rezultatai gauti ir tiriant kitus mikotoksinius, tarp jų ochratoksiną A [119] ir fumonizinus B1 ir B2 [120]. Todėl du specifiniai procesai – sujungimas ir jų biosintezės slopinimas – gali būti susiję su galimomis sąveikomis tarp PRB ir mikotoksinų.

Apie mielių sąveiką su mikotoksinais jau žinoma daugiau nei tris dešimtmečius [121, 122]. Kai devintojo dešimtmečio pradžioje buvo atliekami fermentacijos tyrimai ir gaminamas etanolis iš ZEN užterštų kukurūzų, po fermentacijos mikotoksino aptikta nebuvo [123]. Atlikta daug tyrimų siekiant išsiaiškinti, ar mikotoksinų išlieka po fermentacijos alaus ir vyno gamyboje [124, 125]. Tačiau nėra daug informacijos apie įvairių mikotoksinų kiekį po miežių grūdų fermentacijos ir mikroskopinių grybų ar mikotoksinų poveikį fermentacijos procesui.

G. Devegowda ir kt. [126] nustatė, kad modifikuoti mielių ląstelių mananoligosacharidai turi savybę efektyviai prisijungti aflatoksinus, o kiek silpniau – ochratoksinus ir *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų gaminamus mikotoksinius. Manoma, kad gliukomananai, išskirti iš išorinės *S. cerevisiae* mielių ląstelių sienelės, gali absorbuoti mikotoksinius [127, 128, 129] (1.9 pav.).



1.9 pav. ZEN prisijungimas prie šakotos *S. cerevisiae* mielių ląstelės sienelės β -D-gliukano grandinės [130]

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad 40 % w/w sterilizuotų mielių alaus fermentacijos metu gerai sumažina ochratoksinų koncentraciją [131]. Sumažėjimo laipsnis priklauso nuo terpės pH ir geriausiai pasireiškia, kai pH – 3. Moksliniai tyrimai rodo, kad vynininkystėje naudojamos *Saccharomyces* genties mielės gali būti tinkamos ochratoksino A detoksikacijai, gaminant tiek dirbtines, tiek ir natūralias vynuogių sultis [132]. Termiškai apdorotos mielių ląstelės mikotoksinus adsorbavo geriau (90 % w/w), palyginti su gyvybingomis ląstelėmis (35 % w/w). Todėl daroma išvada, kad terminis poveikis turi įtakos mielių adsorbcijos efektyvumui. Negyvos mielių ląstelės potencialiai gali būti naudojamos šalinant ochratoksinus iš vynuogių sulčių, nes mirusios mielės nekelia jokių produkto kokybės ar saugos problemų [132].

Haskardas ir kt. [133] tyrinėjo fermentacijos metu vykstantį aflatoksinų biologinį sujungimą naudojant PRB *L. rhamnosus* ir nustatė, kad dažniausiai aflatoksinai nekovalentiniu ryšiu [134, 135] jungiasi prie ląstelės sienelėse esančių angliavandenių ir baltymų komponentų.

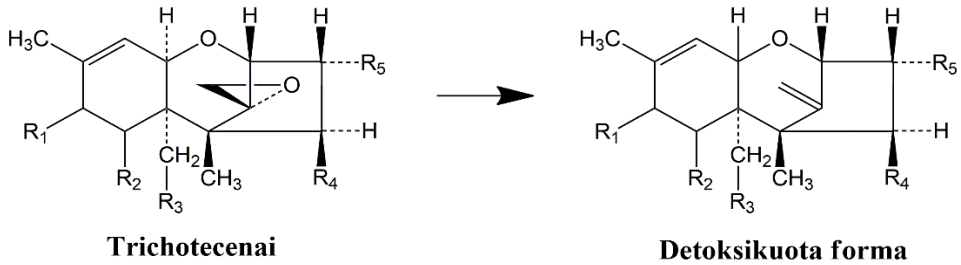
Mikroorganizmų panaudojimo mikotoksinams suardyti ar biologiškai transformuoti galimybės

Egzistuoja ir dar vienas mikotoksinų nukenksminimo būdas – biotransformacija [136, 137]. Tai yra mikotoksinų virsmas į netoksiškus ar mažiau toksiškus junginius.

Pirmieji tyrimai šioje srityje buvo atlikti prieš 40 metų. Įrodyta, kad kai kurie mikroorganizmai gamina fermentus, gebančius pakeisti mikotoksinų ir jų baltymų struktūrą, taip padarydami juos mažiau toksiškus [138]. Tačiau moksliniai tyrimai atskleidė, kad tik keletas mikroorganizmų rūšių geba veiksmingai sumažinti toksiškų junginių kiekį.

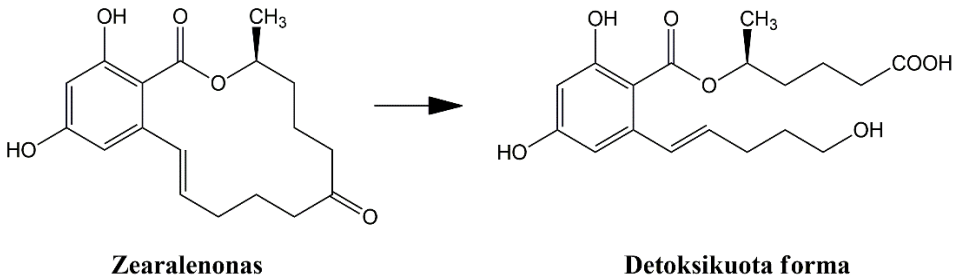
Karlovsky ir kt. [139] tyrimai parodė, kad trichotecenų klasės mikotoksinų (DON, T-2) 12,13-epoksido žiedas lemia jų toksiškumą, todėl *Eubacterium* BBSH

bakterijų produkuojami specifiniai fermentai (epoksidazės) atlieka svarbų vaidmenį suardant toksišką poveikį lemiantį epoksido žiedą (deepoksidacija) (1.10 pav.) [140, 141].



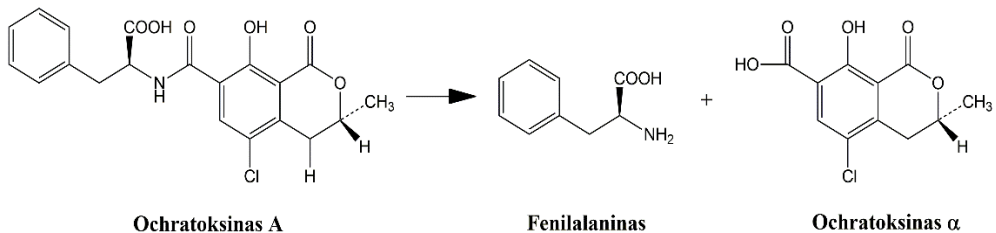
1.10 pav. Trichotecenų biotransformacija į detoksikuotą formą [142]

Mokslinėje literatūroje yra nedaug informacijos apie mielių ir grybų padermių ardomąjį poveikį ZEN. Analizuotas *S. cerevisiae* mielių gebėjimas skaidyti ZEN *Sabūro* sultinyje. Tirtos mielių padermės, kurios ZEN koncentraciją, palyginti su pradiniu užterštumu, sumažino iki 75 %. Vėliau buvo išskirti nepatogeniškų mielių *T. mycotoxinivorans* MTV izoliatai. Jie buvo aprašyti ir užpatentuotas jų gebėjimas suardyti ZEN ir ochratoksiną A. Nustatyta, jog, norint išvengti ZEN toksiško poveikio, būtina, kad jo molekulės laktono žiedas būtų suardytas. Šią reakciją katalizuoja fermentai, pvz., esterazės (1.11 pav.) [143].



1.11 pav. ZEN biotransformacija į detoksikuotą formą [143]

Atlikus mokslinius tyrimus išskirti du ochratoksino A (OTA) biologinės detoksikacijos būdai [144]. Pirmuoju atveju OTA biologiškai gali būti suardytas mikotoksino molekulėje hidrolizuojant amidinę peptidų jungtį. Vykstant reakcijai susidaro du netoksiški junginiai: fenilalaninas ir alfa ochratoksinas (1.12 pav.).



1.12 pav. Ochratoksino A biotransformacija į detoksikuotą formą [143]

Antruoju atveju, kuris yra daugiau teorinis, OTA galima suardyti hidrolizuojant mikotoksino molekulės laktono žiedą. Šiuo atveju galutinis skilimo produktas yra atvira OTA laktono forma, kuri toksišku poveikiu, atliekant tyrimus su žiurkėmis, pasirodė esanti labai panaši į pradinę OTA. Tačiau ši forma buvo ne tokia toksiška pelėms ir *Bacillus brevis* bakterijoms [145].

Kiti tyrėjai taip pat patvirtino fermentacijos metu vykstančios toksinų biotransformacijos įtaką jų kiekiui mažėjimui. Gardai ir grupei tyrėjų, atliekant 120 val. trunkančią salyklo alkoholinę fermentaciją 14 °C temperatūroje, pavyko DON kiekį misoje sumažinti 53 % [146]. Scottui ir kt. [147] *S. cerevisiae* mielėmis fermentuojant salyklą, užkrėstą DON ir ZEN, DON išliko stabilus po 7–9 dienų fermentacijos. Bennetui ir kt. [148] atliekant tyrimus, DON nebuvo visiškai suskaidytas alkoholinės fermentacijos metu. Gana didelė DON koncentracija buvo nustatyta tiek fermentuotos masės filtrate, tiek jos sausajame likutyje.

Taigi alkoholinė fermentacija nėra pakankamai efektyvus visiškos DON detoksikacijos būdas, todėl aktuali ir kitų detoksikacijos būdų paieška.

1.3.2. Ozonavimo taikymas grūdinei žaliavai detoksikuoti

Mikotoksinų kiekiui grūdinėje žaliavoje sumažinti yra pasiūlyta ir dar viena inovatyvi priemonė – grūdų ozonavimas [149, 150]. Dėl gerų oksidacinių savybių ozono panaudojimas turi pranašumų prieš kitus grūdų detoksikacijos metodus. Ozonas dujiniu arba skystu pavidalu dažnai naudojamas maisto pramonėje, perdirbant vaisius ir daržoves, patogeniniams mikroorganizmams inaktyvinti [151, 152].

Šiuo metu dažniausiai grūdų sandėliuose naudojami pesticidai – aliuminio fosfidas, metilbromidas ir fosfanas [153]. Iš jų metilbromidas beveik nebenaudojamas, nes draudžiama Monrealio protokolu [154]. Nuolatinis pesticidų naudojimas sutrikdo natūralią biologinės kontrolės gamtinius veiksniais sistemą, o tai turi įtakos kenkėjų protrūkiams, nepageidaujama nekenksmingų organizmų poveikiui, aplinkos ir žmonių sveikatai. Augantis susirūpinimas dėl neigiamo pesticidų poveikio, Monrealio protokolas dėl ozono sluoksnį ardančių medžiagų gamybos sumažinimo ir kontrolės, išaugęs grūdų kenkėjų atsparumas ir grūdų (be chemikalų) poreikis lėmė būtinybę vystyti mikroorganizmų kontrolės grūduose alternatyvas [155, 156].

Galimas ozono panaudojimas grūdų apsaugai ir detoksikacijai būtų atsakas į augantį susirūpinimą dėl toksiškų pesticidų naudojimo grūdų saugai užtikrinti. Ozono naudojimas grūdų apsaugai perspektyvus tiek aplinkosauginiu, tiek ir ekonominiu aspektu. Tyrimai parodė, kad ekonomiškai naudinga naudoti ozoną sandėliuojamų grūdų apsaugai [157, 158]. Yra žinoma, kad ozonas naikina daugumą sandėliuojamų grūdų kenkėjų vabzdžių ir graužikų [159]. Taip pat nustatyta, kad ozonavimas neturi įtakos sėklinių grūdų daigumui [160, 161], todėl ozonavimo procedūra galėtų pakeisti grūdų beicavimą. Tai itin svarbu ekologiniuose ūkiuose, kur chemikalų naudoti negalima. Skirtingai nuo kitų medžiagų, naudojamų grūdų sandėliams dezinfekuoti, ozono dujos nepalieka jokių cheminių junginių ir nemalonių kvapų.

Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2009/128/EB, nustatanti Bendrijos

veiksmus dėl tausiojo pesticidų naudojimo, leistų naudojamą pesticidų kiekį ateityje drastiškai sumažinti [162]. Daug įvairių mokslinių tyrimų [163, 164, 165] apie ozono panaudojimą grūdų mikologinei taršai mažinti leidžia patvirtinti, kad ozonas nedaro žalos nei aplinkai, nei grūdams. Atvirkščiai, itin efektyviai išnaikinami kenkėjai ir, svarbiausia, pelėsiniai grybai. Dėl savo plataus antigrybelinio poveikio ozonas gali būti naudojamas sandėlių kenkėjams naikinti, tačiau informacijos apie jo gebėjimą sumažinti skirtingų mikotoksinų kiekį stokojama. Vienas iš ozono privalumų yra savaiminis perteklinio ozono skilimas į deguonį – nelieka jokių jo likučių. Nustatyta, kad jį naudojant galima sumažinti įvairių mikroorganizmų – bakterijų, mikroskopinių grybų, virusų, pirmuonių bei bakterijų ir grybų sporų – kiekį [166, 167]. Šie ozono privalumai atveria jo panaudojimo maisto pramonėje [168] ir pritaikymo grūduose atsiradusiems mikotoksiniams detoksikuoti perspektyvas.

Ozono pritaikymas grūdams apdoroti

Grūdai ozonu dažniausiai apdorojami grūdų laikymo talpyklose. Prieš grūdus apdorojant ozonu, būtina žinoti ozono judėjimo per įvairių rūšių grūdus dinamiką, kad būtų galima optimizuoti ozono generatorius dideliems pramoniniams aruodams. Ozonas per grūdus juda lėtai, nes reaguoja su cheminiais junginiais, esančiais paviršiniame grūdų sluoksnyje (sėklų luobelėse). Ozono adsorbcija ir išiskverbimas į grūdus priklauso nuo kelių vidinių ir išorinių veiksnių – grūdų paviršiaus savybių, mikrobinio užterštumo, vabzdžių buvimo, drėgnumo ir kt. [169]. Ozono adsorbcija grūdų sluoksnyje priklauso nuo ozono koncentracijos tiekiamose dujose, veikimo trukmės, dujų tekėjimo greičio, temperatūros, grūdų savybių ir kitų organinių medžiagų (vabzdžių, paviršinių mikrobus) buvimo [170]. Raila ir kt. [171] nustatė, kad ozonas per grūdų sluoksnius skverbiasi lėčiau, kai grūdai labiau mikologiškai užteršti.

Ozonavimo poveikis mikotoksinų detoksikacijai

Žinoma, jog ozonas pažeistuose grūduose efektyviai suardo įvairius mikotoksinius: aflatoksinus, patuliną, ciklopiazoninę rūgštį, sekaloninę rūgštį D, ochratoksiną A, DON ir ZEN (1.3 lent.). Panašiai, kaip žudant vabzdžius, grybų inaktyvacija ir toliau vykstanti detoksikacija priklauso nuo šių veiksnių: ozono koncentracijos, poveikio trukmės, pH ir grūdų masės drėgmės [149]. Raila ir kt. [171] nustatė, kad grybai kviečiuose sunaikinami 2,2 karto efektyviau, kai grūdų drėgnis – 15,2 %, ir 3 kartus efektyviau, kai grūdų drėgnis – 22 %, palyginti su sausais grūdais. Manoma, kad taip gali būti, nes ozonas veiksmingesnis vandeninėje terpėje nei dujinėje fazėje, taip pat dėl intensyvesnio grybų augimo drėgnoje aplinkoje ir lėtesnio ozono judėjimo per grūdų sluoksnius, dėl kurio ilgėja poveikio trukmė. Taigi drėgmė yra svarbus veiksnys ozono veiksmingumui. Nustatyta, kad sausų ozono dujų panaudojimas ne toks veiksmingas kaip drėgnomis sąlygomis. Youngas ir kt. [172] nustatė, kad taikant drėgną grūdų ozonavimą (1,1 mol%, 1 val.) DON kiekis pažeistuose kukurūzuose (DON – 1000 µg/kg) sumažėjo vidutiniškai 90 %, o, taikant sausą ozonavimą, mikotoksino sumažėjo 70 %. Nustatyta, jog ozonavimo veiksmingumui įtakos turi ir terpės pH. Youngas ir kt. [173] nustatė, kad,

esant mažesnei (4–6) pH vertei, trichotecenų mikotoksinų irimas vyksta greičiau nei esant didesnei (7–8) pH vertei.

1.3 lentelė. Apdorojimo ozonu poveikis mikotoksinams

Grūdinė žaliava	Mikotoksinai	Apdorojimo sąlygos	Mikotoksinų detoksikacija	Šaltinis
Miežiai	Fuzariotoksinai	Dujinis ozonas 11–26 mg/g 15 min.	Fuzariotoksinų sumažėjimas 24–36 %	[174]
Kukurūzai	Aflatoksinai	Ozonavimas (10–12 masės%)	Aflatoksinų sumažėjimas 92 %	[175]
Kviečiai	DON	Drėgnas ozonas (1,1 mol%) 1 val.	DON sumažėjimas 90 %	[172]
Kviečiai	DON	Sausas ozonas (1,1 mol%) 1 val.	DON sumažėjimas 70 %	[172]
Kukurūzai	Aflatoksinai	Ozonas, 200 mg/min, 92 val.	AFB1 sumažėjimas 95 %	[149]
Žemės riešutai	Aflatoksinai	Ozonas, 25 mg/min	AFB1 ir G1 sumažėjimas 100 %, AFB2 78 %	[176]

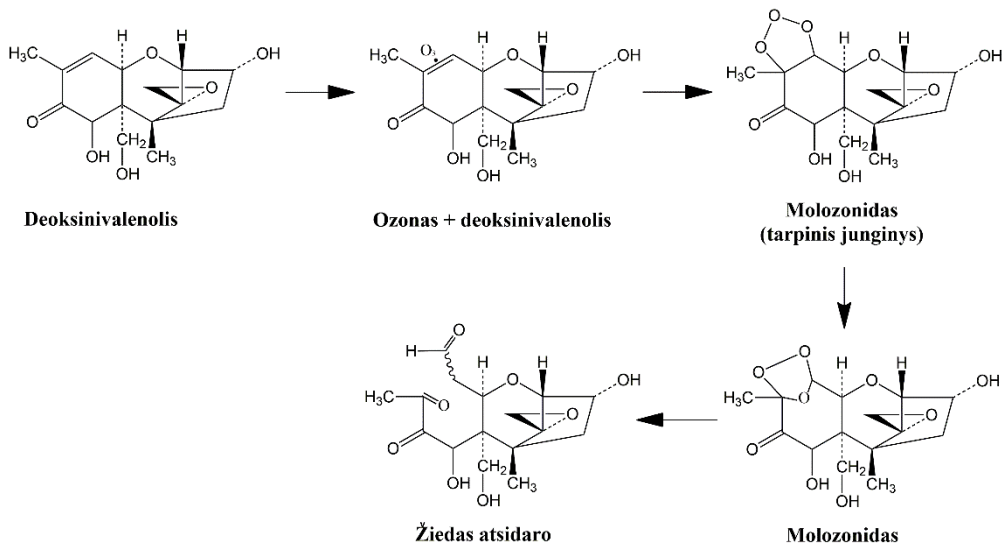
Grūdų temperatūra taip pat turi įtakos ozono poveikiui suardant mikotoksinius. Proctor ir kt. [177] nustatė, kad aflatoksinai žemės riešutų branduoliuose greičiau yra aukštesnėje temperatūroje. Jie nustatė, kad, padidinus temperatūrą nuo 25 iki 75 °C, apdorojimas sutrumpėja nuo 15 iki 10 minučių; abiem atvejais AFB1 ir AFG1 kiekis sumažėja 77 % ir 80 %. Taip pat pastebėta, kad sėkmingesnė mikotoksinų detoksikacija vyksta apdorojant grūdus, o ne miltus. Greičiausiai dėl to, kad mikologinė tarša dažniausiai aptinkama grūdų paviršiuje. Taip pat nustatyta, kad mažesnė ozono koncentracija (5 ppm atmosferoje) lėtina *A. flavus* ir *F. moniliforme* paviršinių augimą, sporuliaciją ir mikotoksinų gamybą. Allenas ir kt. [178] nustatė, kad pakankama ozono dozė inaktyvinti 96 % grybų sporų, esančių miežių grūdų paviršiuje, yra 0,16 mg/g/min.

Įrodyta, kad ozonas veiksmingai skaido ir detoksikuoja įprastinius mikotoksinius (aflatoksinus B1, B2, G1 ir G2, ciklopiazoninę rūgštį, fumoniziną B1, ochratoksiną A, patuliną, sekaloninę rūgštį ir ZEN) vandeniniuose tirpaluose [179, 180]. Ozonas arba visiškai suardo mikotoksinius, arba sukelia cheminius kitimus, sumažinančius jų biologinį aktyvumą.

Vis dėlto mikotoksinų detoksikacija ir cheminiai virsmas priklauso nuo tiriamų mikotoksinų struktūros. McKenzie ir kt. [149] pastebėjo didesnę aflatoksinų B2 ir G2 atsparumą, palyginti su B1 ir G1. Dvigubi ryšiai, esantys mikotoksinų B1 ir G1

C8-C9 pozicijose, ir ozono polinkis reaguoti su nesočiosiomis jungtimis turi įtakos didesniai ozono detoksikuojamajam poveikiui. Pagal Criegee [181] skilimo mechanizmą ozono molekulė prisijungia prie dvigubo ryšio sudarydama 1-3 dvipolį ciklą. Taip iš alkenų ir ozono susidaro ozonidai (1,2,4-trioksolanai) arba ketonai – trumpai egzistuojantys tarpiniai junginiai. Ozonidai po oksidacijos suyra sudarydami karboksirūgštis ir ketonus [151]. Be dvigubų ryšių alifatiniuose ar policikliniuose aromatinuose angliavandeniniuose ardymo, ozonas taip pat daro įtaką mikotoksinuose pasitaikančioms chlorintoms žiedinėms struktūroms (pvz., ochratoksine) ir heterociklams su azotu (pvz., fumonizine), susidarant laisvam chlorui arba aminorūgštims [182].

Tyrimai rodo, kad biologinis mikotoksinų toksiškumas, paveikus juos ozonu, gerokai sumažėja dėl naujų produktų susidarymo. McKenzie ir kt. [149] nustatė, kad dėl ozono poveikio susidaro įvairūs fumonizino B1 dariniai. Tyrimai rodo, kad tai vyksta dėl ozono reakcijos su pirminio amino grupe ($-NH_2$), susidarant azoto oksidui ($-NO_2$ arba $-N_2O$) ir ketonui pagal Criegee [181] mechanizmą (1.13 pav.). Deja, autoriai užfiksavo fumonizino B1 darinių toksiškumą, tikriausiai dėl išlikusių nepaveiktų pirminio amino grupių. Įrodyta, kad pirminio amino grupė būtina biologiniam į fumoniziną panašių junginių aktyvumui [183, 184, 185].



1.13 pav. Deoksinivalenolio suardymas ozonu [150]

Panašų tyrimą atliko Youngas ir kt. [173], ozono prisotintu vandeniu ardydamas trichoteceno mikotoksinus 3-acetildeoksinivalenolį, 15-acetildeoksinivalenolį, diacetoksiskirpenolį, 4-deoksinivalenolį, fuzarenoną X, HT-2 toksiną, 15-monoacetoksiskirpenolį, neosolaniolį, T-2 triolį ir verukarolį. Jie nustatė visišką mikotoksinų suardymą į paprastus produktus, kai ozono koncentracija >25 ppm, ir tarpinius produktus dėl dalinės degradacijos ar cheminių pokyčių, kai koncentracija <25 ppm. Šių mikotoksinų suardymas taip pat paaiškinamas Criegee mechanizmu (1.13 pav.). Tarpiniai junginiai (ketotrichotecenai ar depoksitrichotecenai), susidarantys trichotecenus apdorojus ozonu, yra ne tokie

toksiški kaip jų pirmtakai [186, 187]. Buvo įrodyta galimybė plėtoti ozonavimo technologijas užterštiems pašarams [182, 188] ir maistiniams grūdams valyti, kad būtų užtikrintas vartotojų saugumas.

1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas

Fusarium genties mikroskopiniai grybai pažeisdami javų grūdus gamina įvairius toksiškus junginius – mikotoksinus, kurie ne tik kenkia grūdų kokybei, bet ir turi įtakos grūdinės žaliavos saugai. Todėl grūdinės žaliavos saugos prevencijai yra būtina ieškoti naujų greitų ir inovatyvių metodų, kurie leistų aptikti grūdinės žaliavos taršą ir laiku ją pašalinti iš grūdų perdirbimo grandinės. Vienas tokių metodų yra greitas ir pigus akustinis metodas [189], padedantis įvertinti grūdinės žaliavos užterštumą *Fusarium* spp. gaminamais mikotoksinais. KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje jau anksčiau buvo vykdomi grūdinės žaliavos tyrimai akustiniu metodu [29, 189]. Ištirtas akustinio metodo panaudojimas DON, ZEN, T-2 mikotoksinais aptikti žieminiuose kviečių grūduose. Pirminiai akustinio metodo tyrimų rezultatai parodė vykdomų darbų perspektyvumą ir tikslingumą didinti akustinio metodo patikimumą ir efektyvumą DON kviečių grūduose aptikti, taip pat pritaikyti ir panaudoti praktikoje [190]. Tuo tikslu, vystant KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje sukurtą akustinį metodą, pagal EUREKA projektą ACOUSTICS sukurtas visiškai naujas akustinis spektrometras [190], kuris tikslesnis, greitesnis nei senasis akustinis spektrometras ir, svarbiausia, komercinis, t. y. naudotinas praktikoje [29, 189].

Grūdų perdirbimo pramonėje vis didesnis dėmesys skiriamas ir saugiam grūdinių kultūrų sandėliavimui siekiant kiek įmanoma sumažinti kiekybinius ir kokybinius nuostolius, susidarancius grūdų laikymo metu. Todėl būtina vystyti įvairius laikomų grūdų monitoringo metodus. Vienas perspektyviausių grūdų saugos ir kokybės stebėsenos metodų yra laikomų grūdų CO₂ koncentracijos matavimo tyrimai. Šis metodas leistų tiksliai ir daug anksčiau nei tradiciniai – temperatūros ir drėgmės stebėsenos – metodai nustatyti laikomuose grūduose prasidedančius gedimo procesus. Tokio metodo vystymas ypač svarbus grūdų laikymo talpyklose, kuriose nėra aktyviosios ventiliacijos sistemos. Vertinant problemos aktualumą svarbu ištirti skirtingų technologinių grūdų savybių (grūdų drėgnio, užterštumo, grūdų stambumo) įtaką CO₂ koncentracijos pokyčiams kviečių grūdų laikymo metu talpyklose, kuriose nėra aktyviosios ventiliacijos sistemos.

Nors ir taikomi įvairūs mikroskopinių grybų pažeistos grūdinės žaliavos aptikimo ir monitoringo metodai, tai visiškai neapsaugo nuo grūdų perdirbimo ir laikymo metu susidarancius grūdinės žaliavos nuostolių. Pažeista grūdinė žaliava yra netinkama tolesniam perdirbimui į maisto produktus, todėl tikslinga ieškoti pigių ir naujų biopriemonių pažeistos grūdinės žaliavos užterštumui sumažinti ir efektyviai perdirbti į biokurą ir pašarus [26, 65]. Viena tokių priemonių yra antimikrobiniai PRB bioproduktai. Fermentacijos metu PRB gamina įvairius organinius junginius, kurie pasižymi antimikrobinio ir detoksikuojamuoju poveikiu įvairiems grūdų gedimą sukeliantiems mikroskopiniams grybams ir jų metabolitams – mikotoksinais.

KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje jau anksčiau buvo ištirtos [191]

PRB (*L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*) ir įvertintas jų antimikrobinis poveikis įvairiems mikroskopiniams grybams [74]. PRB antimikrobinų savybių tyrimai parodė vykdomų darbų perspektyvumą ir tikslingumą plėsti PRB antimikrobinų bioproduktų taikymą ne tik duonos pramonėje, ekologinėje žemdirbystėje, bet ir salyklinių grūdų biologinei taršai (mikotoksinams) mažinti bei pažeistų grūdų daigumui gerinti. Plečiant PRB pritaikymo sritį svarbu išsiaiškinti jų detoksikuojamąjį poveikį vienam iš pagrindinių *Fusarium* spp. gaminamų mikotoksinų – deoksinivalenoliui (DON). Pažeistiems grūdams salyklo gamyboje apdoroti skirti PRB bioproduktai turėtų būti ne tik efektyvūs, bet ir pigūs. Iškelus tokį uždavinį, aktuali naujų terpių, skirtų PRB kultivuoti, paieška, atkreipiant dėmesį į pieno pramonės šalutinius gamybos produktus (pvz., sūrių išrūgų permeatą), galinčius gerokai atpiginti bioproduktų gamybą [192]. Todėl, vertinant problemos aktualumą, svarbu sukurti antimikrobiškai aktyvius PRB bioproduktus, kurie ne tik užtikrintų efektyvią grūdų saugą ir pagerintų kokybinius grūdų perdirbimo rodiklius (daigumą, bioetanolio išeią), bet ir būtų pigūs.

Kaip dar viena alternatyvi ir perspektyvi ekologinė priemonė mikotoksinų kiekiui grūdinėje žaliavoje sumažinti pasiūlytas ozonavimas. Moksliniuose šaltiniuose yra nemažai informacijos apie dezinfekcinį ozono poveikį įvairiems kenkėjams ir mikroskopiniams grybams [193, 194]. Tačiau jo detoksikuojamasis poveikis įvairiais mikotoksinais pažeistai grūdinei žaliavai dar nėra gerai ištirtas. Ozono panaudojimo efektyvumas priklauso nuo kelių veiksnių: panaudoto ozono kiekio, poveikio trukmės, įvairių aplinkos veiksnių, pvz., grūdų masės temperatūros, drėgmės ir paviršiaus savybių [149]. Šiuo metu nėra tiksliai žinoma ozonavimo trukmės įtaka skirtingų mikotoksinų kiekio sumažėjimui ozonuotuose salykliniuose kviečių grūduose, todėl būtina nuodugniau tai ištirti.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

2.1.1. *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų kolekcijos ir modelinės sistemos

Moksliniams tyrimams naudoti *Fusarium* spp. užkrėsti kviečių grūdai nurodyti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. *Fusarium* spp. užkrėsti kviečių grūdai

Eilės Nr.	Grūdai	Panaudojimo sritis
1	Kviečių grūdai, užauginti 2012–2013 m. (AB <i>Kauno grūdai</i> , Kaunas, Lietuva)	Grūdų cheminės sudėties ir kokybinių savybių pokyčių tyrimai Akustinis metodas DON kviečių grūduose aptikti CO ₂ išsiskyrimo laikomuose grūduose intensyvumo nustatymas
2	Kviečių grūdai, užauginti 2011 m. (<i>Florimond Desprez</i> , Cappelle-en-Pévèle, Prancūzija)	Grūdų cheminės sudėties ir kokybinių savybių pokyčių tyrimai Akustinis metodas DON kviečių grūduose aptikti CO ₂ išsiskyrimo laikomuose grūduose intensyvumo nustatymas PRB bioproduktų įtaka DON detoksikacijai Kviečių grūdų proteomikos tyrimai
3	Kviečių grūdai, užauginti 2013 m. (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras, Žemdirbystės institutas, Kėdainiai, Lietuva)	Akustinis metodas DON kviečių grūduose aptikti Kviečių grūdų proteomikos tyrimai
4	Vasarinių kviečių grūdai 'Arktis' (LEU 60210), 2012 m. (Plungės regionas, Lietuva)	PRB bioproduktų įtaka grūdų antigrybelinio aktyvumo ir daigumo tyrimams Ozonavimo įtaka mikotoksinų detoksikacijai

Koreliaciniam ryšiui tarp mikotoksinų kiekio grūduose ir akustinio signalo parametrų (amplitudės) nustatyti ir metodo tinkamumui patikrinti sudarytos ir analizuotos grūdų modelinės sistemos. Kviečių grūdų modelinės sistemos sudarytos iš sveikų (2012 m. užaugintų kviečių grūdų (drėgmės kiekis 13,5 %), gautų iš AB *Kauno grūdai* (Kaunas)) ir *Fusarium* genties mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų su dideliu – 4000 µg/kg – DON kiekiu (*Florimond Desprez*, Cappelle-en-Pévèle, Prancūzija): į kiekvieną sveikų grūdų mėginį pridėta atitinkamai 10 %, 20 %, ... 100 % fuzariozės pažeistų grūdų (mėginio masė matavimo kiuvetėje – apie 200 g). Metodui išbandyti praktikoje naudoti 34 natūraliai pažeistų kviečių grūdų mėginiai (drėgmės kiekis 13–14 %, DON koncentracija 254–1600 µg/kg).

Įvertinant kviečių grūdų stambumo, drėgnio ir užterštumo įtaką laikomuose grūduose išsiskiriančių CO₂ dujų koncentracijai sudarytos modelinės kviečių grūdų sistemos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Kviečių grūdų modelinės sistemos laikomų kviečių grūdų CO₂ tyrimams

Eilės Nr.	Tyrimas	1000 grūdų masė, g	DON koncentracija, µg/kg	Drėgnis, %
1	Kviečių grūdų stambumo ir drėgnio įtaka CO ₂ koncentracijai	43,32	0 (500 g)	14,5 18,5 24,5
		56,72	0 (500 g)	14,5 18,5 24,5
2	DON įtaka CO ₂ koncentracijai	43,32	0 (500 g)	14,5 24,5
		40,76	800 (500 g)	14,5 24,5
3	Užteršto grūdų židinio (10 g pažeistų grūdų) įtaka smulkių ir stambių kviečių CO ₂ koncentracijai	43,32	0 (500 g)	14,5
		40,76	800 (10 g)	24,5
		56,72	0 (500 g)	14,5
		40,76	800 (10 g)	24,5

PRB bioproductų įtakos DON detoksikacijai tyrimams naudoti sveiki (DON – 0 µg/kg) ir pažeisti (DON – 1246, 3534 ir 4371 µg/kg) kviečių grūdai.

Ozonavimo įtakos mikotoksinų detoksikacijai tyrimams atrinkti penki (po 200 g) skirtingo užterštumo kviečių grūdų mėginiai (baltymų kiekis – 11–11,5 %). Jie pateikti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Kviečių grūdų užterštumas *Fusarium* spp. mikotoksinais

Kviečių mėginiai	DON koncentracija, µg/kg	ZEA koncentracija, µg/kg	T-2 koncentracija, µg/kg	HT-2 koncentracija, µg/kg
1	≤10	≤5	≤5	≤5
2	≤10	≤5	19,5±2,6	819±93
3	3370±223	19,5±2,5	≤5	≤5
2	4620±298	81,8±13,2	32,8±1,7	474±64
3	5450±440	223±41,0	≤5	≤5
4	6930±910	459±89,0	35,4±2,3	258±43

Moksliniams tyrimams naudoti *Fusarium* spp. užkrėsti miežių grūdai nurodyti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. *Fusarium* spp. užkrėsti miežių grūdai

Eilės Nr.	Grūdai	Panaudojimo sritis
1	Miežių grūdai, užauginti 2010 m. (įvairios Lietuvos ūkio bendrovės, Lietuva)	Grūdų cheminės sudėties ir kokybinių savybių pokyčių tyrimai Biopriemonių fermentacijos efektyvumo didinimo tyrimai
2	Miežių grūdai ('Propino'), 2012 m. (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras, Žemdirbystės institutas, Kėdainiai, Lietuva)	Grūdų proteomikos tyrimai

Biopriemonių fermentacijos efektyvumo didinimo tyrimams atrinkti šeši skirtingo užterštumo DON miežių grūdų mėginiai pateikti 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. Miežių grūdų cheminė sudėtis

Miežių mėginiai	Baltymų kiekis, %	Krakmolo kiekis, %	Drėgmės kiekis, %	Hektolitro masė, g	DON koncentracija, µg/kg
B-0	11,0±0,1	64,3±0,2	14,7±0,1	790±4	0±5
B-120	11,0±0,2	64,7±0,3	14,2±0,1	780±1	120±7
B-140	12,7±0,4	62,8±0,1	15,0±0,3	765±1	140±8
B-280	13,1±0,1	60,6±0,4	14,6±0,1	775±2	280±13
B-340	12,2±0,1	64,0±0,2	15,0±0,2	755±3	340±22
B-1225	11,7±0,0	62,0±0,3	14,2±0,2	750±2	1225±35

Visi grūdų mėginiai iki eksperimento laikyti vakuuminėje pakuotėje –40 °C temperatūroje. Priemaišoms pašalinti grūdų mėginiai sijoti per dviejų sietų komplektą (viršuje – su 3,5 mm, apačioje – su 1 mm skersmens akutėmis).

2.1.2. Mikroorganizmai ir jų kultivavimo sąlygos

Mielės. Miežių alkoholinei fermentacijai naudotos tradicinės *Saccharomyces cerevisiae* mielės (*Lesaffre Polska* S. A., Lenkija). Dvi mielių rūšys – *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ir *Kluyveromyces marxianus* – gautos iš Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių tyrimų laboratorijos.

Fermentai. Miežių grūdų fermentacijos procese biomasei skystinti ir sucukrinti naudoti tradiciniai amilolitiniai fermentai: grybinė α -amilazė iš *Trichoderma reesei* *Stargen*TM 002 (*DuPont Industrial Biosciences*, Danija) ir β -ksilanazė *Ecopulp*®TX-200A (*AB Enzymes*, Suomija).

Pieno rūgšties bakterijos. Bioproduktams ruošti naudotos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje saugomos bakteriocinus gaminančios pieno rūgšties bakterijos (PRB): *Lactobacillus sakei* (Ls), *Pediococcus acidilactici* (Pa7), *Pediococcus pentosaceus* (Pp8), (Pp9) ir (Pp10) padermės, kurios buvo išskirtos iš lietuviškų spontaninių ruginių duonos raugų [191] ir daugintos optimalioje jų augimo temperatūroje, bei *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (Lb), gautos iš

KTU Maisto instituto (Kaunas, Lietuva). PRB ruošimo bioproduktų gamybai sąlygos pateiktos 2.6 lentelėje.

2.6 lentelė. PBR ruošimo bioproduktų gamybai sąlygos

PRB	Kultivavimo temp., °C	Kultivavimo trukmė, val.	Terpė *	pH	Koncentracija, KSV/ml
<i>L. d. bulgaricus</i> (Lb)	42±2	18±1	MRS	3,74	2,29±0,25×10 ⁹
<i>L. sakei</i> (Ls)	30±2	18±1	MRS	3,92	2,47±0,05×10 ⁹
<i>P. acidilactici</i> (Pa7)	35±2	18±1	MRS	3,95	1,77±0,11×10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> (Pp8)	25±2	18±1	MRS	3,95	1,89±0,10×10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> (Pp9)	25±2	18±1	MRS	3,93	1,60±0,20×10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> (Pp10)	35±2	18±1	MRS	3,90	2,04±0,15×10 ⁹

*De Man, Rogosa ir Sharpe terpė

2.1.3. Gyvūninių produktų terpės bioproduktų gamybai sąlygos

Sūrių gamybos šalutinis produktas – sūrių išrūgų filtratas (permeatas), gautas iš UAB *Rokiškio pienas* (Rokiškis, Lietuva) su šiais rodikliais (g/100 g): sausosios medžiagos 6,3±0,1, baltymų kiekis 0,17±0,05, laktozės ir galaktozės kiekis 5,67±0,12. Permeatas kaitintas 20 min. 90 °C temperatūroje baltymams nusodinti. Vėliau terpė sterilizuota 121 °C temperatūroje (15 min.). Į sterilizuotą ir atvėsintą terpę inokuliuota MRS terpėje padaugintų PRB ląstelių (2 % bendros masės) ir optimaliomis fermentacijos sąlygomis fermentuota 72 val. Po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos nustatyta bioproduktų pH, acto rūgšties bei pieno rūgšties ir jos izomerų kiekiai. Bioproduktai (fermentuoti 24 val.) išbandyti kviečių grūdų taršos mažinimo ir daigumo vertinimo tyrimuose.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Grūdų cheminės sudėties ir mikrostruktūros įvertinimas

Drėgnis nustatytas džiovinimo metodu pagal grūdų masės nuostolius, džiovinant 130±3 °C temperatūroje iki pastovios masės (AACC metodas 44–15A) [195].

Masės tankis nustatytas sveriant žinomo tūrio ir svorio indą, pripildytą grūdų ėminio, ir pagal 1000 grūdų masę.

Bendras baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu (ICC standartinis metodas Nr. 105/2:1994) [196].

Krakmolo kiekis nustatytas fermentinės analizės metodu, naudojant *Megazyme* K-TSTA 05/06 reagentų (α-amilazė ir amilogliukozidazė) rinkinį (*Megazyme International Ireland Ltd.*, Airija).

Bendras cukrų (laktozės ir galaktozės) kiekis nustatytas fermentinės analizės metodu, naudojant *Megazyme* K-LACGAR 03/14 reagentų rinkinį (*Megazyme International Ireland Ltd.*, Airija), kuris paremtas laktozės hidroliziniu (pH 5) į D-galaktozę ir D-gliukozę, naudojant β-galaktozidazes, išskirtas iš *Aspergillus niger*.

Grūdų mikrostruktūra įvertinta analizuojant užkrėstų ir sveikų grūdų skersinį pjūvį elektroniniu skenuojančiu mikroskopu (SEM) EVO 50 (*LEO Electron Microscopy Ltd.*, Kembridžas, Jungtinė Karalystė), naudojant LFD SE (antrinių

elektrodų žemo vakuumo) detektorių, veikiantį 80 Pa slėgio vakuume, ir elektronus greitinančiai įtampai esant 20 kV.

2.2.2. Fermentų aktyvumo nustatymas

Siekiant įvertinti *Fusarium* genties mikroskopinių grybų gaminamų mikotoksinų įtaką grūdų fermentų aktyvumui, prieš analizę grūdų mėginiai sumalti, o fermentų aktyvumas išreikštas gramui grūdų.

***β*-ksilanazės** aktyvumas nustatytas modifikuotu Millerio [197] kolorimetriniu metodu, naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentą (DNS reagentas).

Metodo esmė: veikiant *β*-ksilanazei, vyksta ksilano hidrolizė iki redukuojančių sacharidų, daugiausia ksilozės, kurie su 3,5-dinitrosalicilo rūgštimi stipriai šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius. Jų kiekis nustatytas kolorimetriniu metodu, išmatavus 540 nm monochromatinio spindulio sugertį susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale.

***α*-amilazės** aktyvumas nustatytas modifikuotu krakmolo / jodo metodu Nguyeno ir kt. [198].

Metodo esmė: veikiant *α*-amilazei, tirpus krakmolas hidrolizuotas iki įvairios molekulinės masės dekstrinų. Likusio nehidrolizuoto krakmolo kiekis nustatytas kolorimetriniu metodu, išmatavus 670 nm monochromatinio spindulio sugertį susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale reaguojant krakmolui su jodo tirpalu.

Proteazės aktyvumui nustatyti taikytas *Sigma-Aldrich* SSCASE01.001 protokolas [199].

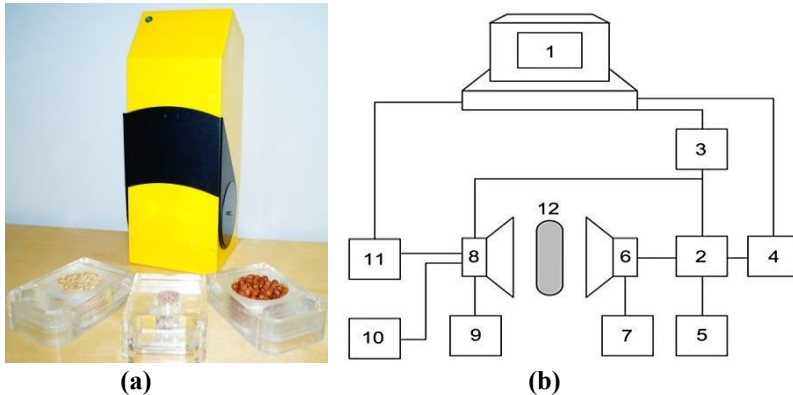
Metodo esmė: veikiant proteazei, kazeinas suskaldytas iki aminorūgščių ir jų kiekis nustatytas kolorimetriniu metodu, išmatavus 660 nm monochromatinio spindulio sugertį susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale joms reaguojant su *Folin-Ciocalteu* fenoliniu reagentu.

2.2.3. Akustinio metodo taikymas deoksinivalenoliui kviečių grūduose aptikti

Atliekant pažeistų salyklinių kviečių grūdų tyrimą DON kiekiui kviečių grūdų masėje įvertinti taikytas KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje tiriamas akustinis metodas, kuriuo įvertinamas ryšys tarp salyklinių kviečių grūdų užterštumo *Fusarium* spp. gaminamu mikotoksinu DON lygio ir akustinio signalo parametro verčių (A_p). Tyrimams naudotas KTU Ultragarso instituto vykdamas projektą (EUREKA ITEA2 projektas ACOUSTICS) sukurtas naujas elektroakustinio prietaiso prototipas, kuris veikia žemų dažnių (10–80 kHz) diapazone, padalytame į 63 matavimų taškus, analizės trukmė ~10 sek. Prietaiso schema pateikta 2.1 pav.

Prietaisui optimizuoti ir akustinių matavimų tikslumui didinti įvertinta kviečių grūdų stambumo, drėgnio ir mėginio dydžio įtaka matavimų tikslumui. Pirminiais tyrimais nustatyta, kad grūdų mėginio paruošimas ir analizė turi statistiškai reikšmingą įtaką akustinio signalo parametrų vertėms. Todėl, prieš akustine technika analizuojant grūdų mėginius, atlikta prietaiso laboratorinė validacija. Tiriamasis mėginys (apie 200 g) atsitiktiniu būdu paimtas iš bendros grūdų mėginio masės ir supiltas į matavimo kiuvetę (indą). Tiriamojo mėginio dydis optimizuotas atlikus matavimus naudojant skirtingo skersmens (mažo (40 mm), vidutinio (80 mm) ir didelio (100 mm)) matavimo kiuvetes (grūdų sluoksnio storis – 50 mm) ir nustačius

mažiausias matavimo paklaidos ir variacijos koeficiento vertes.



2.1 pav. Elektroakustinio prietaiso prototipo bendras vaizdas (a) ir principinė schema (b): 1 – personalinis kompiuteris, 2 – sinusinių signalų generatorius, 3 – videoimpulsų generatorius, 4 – dažnio keitimo šaltinis, 5 – dažnomatis, 6, 8 – siuntimo ir priėmimo akustinės antenos, 7, 9 – maitinimo šaltiniai, 10 – oscilografas, 11 – skaitmeninis voltmetras, 12 – tiriamasis mėginys

Akustinio metodo patikimumui įvertinti nustatyti šie kriterijai [200, 201]:

1) regresinė analizė ir tiesiškumas (akustinio signalo parametrai – mikroskopinių grybų pažeistų grūdų kiekis (%), akustinio signalo parametrai – mikotoksino koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$));

2) SSN – santykinis standartinis nuokrypis, apskaičiuotas pagal rezultatus, gautus pakartojamumo sąlygomis (dviejų skirtingų tyrimo rezultatų, gautų vieno analitiko tuo pačiu metodu ir ta pačia įranga tiriant tą patį mėginį).

2.2.4. Deoksinivalenolio nustatymas imunofermentiniu ELISA metodu

DON koncentracija miežių, kviečių grūduose ir žlaugtuose nustatyta ELISA metodu. Metodas pagrįstas specifinių antikūnų, žymėtų fermentais, absorbcija tam tikrų polimerų (imunosorbentų) paviršiuose.

Mėginio paruošimas:

Tiriamasis javų grūdų mėginys smulkiai sumaltas ir 5 g sumalto mėginio purtant sumaišyta su 100 ml distiliuotu vandeniu. Gautas mėginio ekstraktas filtruotas per popierinį filtrinį popierių.

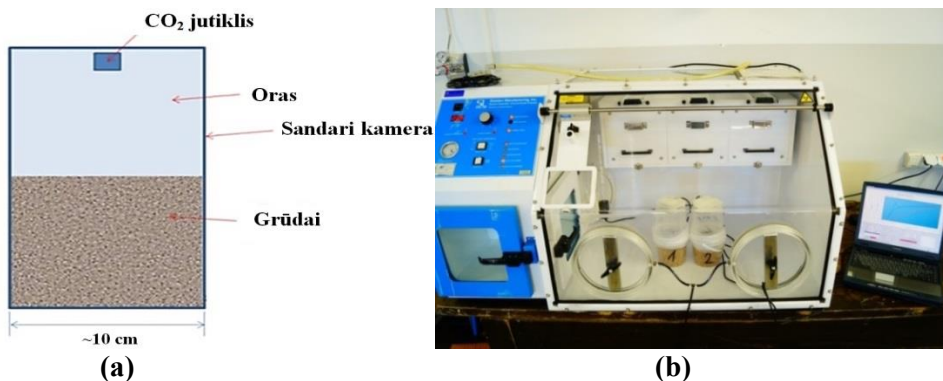
Analizės eiga:

DON nustatytas naudojant RIDASCREEN®FAST DON (*R-Biopharm AG*, Vokietija) analizės rinkinį pagal gamintojo nurodytą protokolą [202]. Į kiekvieną analizės rinkinio akutę įpilta po 50 μl standartinių ir tiriamųjų mėginių ekstraktų tirpalų, tada – po 50 μl fermento konjugato. Į kiekvieną analizės rinkinio akutę taip pat įpilta 50 μl mikotoksinų antikūnų, ir akutės 10 min. inkubuotos kambario temperatūroje. Reakcijos mišinys išpiltas iš akučių, ir jos praplautos distiliuotu vandeniu (250 μl į kiekvieną akutę). Į kiekvieną akutę įlašinta po 100 μl substrato / chromogeno tirpalo ir inkubuota 5 min. kambario temperatūroje tamsoje. Į kiekvieną akutę įlašinta po 100 μl Stop reagento. Gautas reakcijos mišinys sumaišytas, ir spektrofotometru, esant 450 nm bangos ilgiui, išmatuotas tirpalų spalvos

intensyvumas (per 10 min. nuo *Stop* reagento įlašinimo). Metodo DON aptikimo riba yra <200 µg/kg, kiekybinio nustatymo riba 200 µg/kg. Duomenims apdoroti naudota programinė įranga *RIDA®SOFT Win* (*R-Biopharm AG*, Vokietija).

2.2.5. Anglies dioksido koncentracijos laikomuose grūduose kitimo pobūdžio įvertinimas

Anglies dioksido koncentracijos kitimo pobūdis nustatytas saugant skirtingo stambumo, drėgnio ir užterštumo kviečių grūdus plastikiniuose hermetiniuose indeliuose, patalpintuose pastovaus klimato kameroje (*Sheldon Manufacturing, JAV*) (2.2 pav.) esant 25 ± 1 °C temperatūrai ir santykiniam 60–65 % oro drėgniui. Grūdų išskiriamas CO₂ kiekis (%) matuotas 48 val. viršerdvėje virš laikomų kviečių grūdų sampilo.



2.2 pav. Eksperimento schema (a) ir pastovaus klimato kamera (b)

CO₂ koncentracija viršerdvėje fiksuota kas 1 val. davikliu *Engine K30 FR* (*SenseAir, Švedija*). Daviklio veikimas pagrįstas infraraudonųjų spindulių sugėrimo principu. Nustatyta CO₂ koncentracija išreikšta procentinėmis dalimis (%). Daviklių matavimo ribos – nuo 0 iki 1 %, matavimo tikslumas pagal tūrį – $\pm 0,003$ %. Analizuojami duomenys fiksuoti programine įranga *GasLab* (CO₂ Meter, JAV).

2.2.6. Organinių rūgščių kiekio pieno rūgšties bakterijų bioproduktuose įvertinimas

D(-)- ir *L(+)*-pieno rūgšties izomerų kiekiai nustatyti spektrofotometriškai, naudojant fermentinį testą *K-DLATE 12/12* (*Megazyme International, Airija*), įvertinant UV sugerties spindulius veikiant fermentams. Pirmoji reakcija katalizuota *D*-laktato dehidrogenazės (*D-LDH*), kurios metu *D(-)* izomeras oksidavosi iki piruvato, susidarius nikotinamido-adenino dinukleotidui (NAD⁺). Antroji reakcija buvo piruvato konversija į *D*-alaniną ir 2-oksoglutaratą, ji vyko veikiant fermentui *D*-glutamato-piruvato transaminazei (*D-GPT*). NADH kiekis, susidaręs šių reakcijų metu, koreliavo su *D(-)*-pieno rūgšties izomerų kiekiu. NADH kiekis įvertintas spektrofotometru išmatavus 340 nm bangos ilgio UV spindulių sugertį susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale. *L(+)*-pieno rūgšties izomero kiekis nustatytas vykdant oksidaciją iki piruvato su *L*-laktato dehidrogenaze (*L-LDH*), kurios metu susidarė nikotinamido-adenino dinukleotidas (NAD⁺). Toliau veikiant

D-GPT išmatuota 340 nm bangos ilgio UV spindulių sugertis susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale.

Acto rūgščiai bioproduktuose nustatyti įvertintas lakusis rūgštingumas, susidarantis dėl lakiųjų rūgščių. Lakiųjų rūgštingumą daugiausia lemia acto rūgštis, kuri išreiškiama 1 M NaOH, sunaudoto 100 g (arba 100 cm³) produkte esančioms lakiosioms rūgštims neutralizuoti, kiekiu (ml arba cm³) arba perskaičiuojama į acto rūgšties %. Acto rūgščiai bioproduktuose nustatyti tiriamasis bandinys prieš neutralizavimą ruoštas taip: 25 ml bandinio sumaišyta su 50 ml H₂O, 3 ml 5 % H₂SO₄ ir 10 min. distiliuota distiliatoriumi. Acto rūgšties kiekis % apskaičiuotas pagal (2.1) ir (2.2) formules:

$$Z = \frac{a}{V \cdot M} \text{ (g);} \quad (2.1)$$

čia V – 0,1 mol/l NaOH tirpalo kiekis, sunaudotas distiliate esančioms rūgštims neutralizuoti, ml; M – NaOH tirpalo moliarumas (0,1 mol/l); a – acto rūgšties molinė masė (60,02 g/mol).

$$Y = \frac{Z \cdot 100}{X} \text{ (%);} \quad (2.2)$$

čia Z – nutitruotas acto rūgšties kiekis (g); X – produkto kiekis 25 ml ištraukos (g); Y – acto rūgšties kiekis (%).

2.2.7. Grūdų apdorojimo pieno rūgšties bakterijų bioproduktais sąlygos

PRB bioproduktų antigrybelinio aktyvumo nustatymas: 60 kviečių grūdų sėklų apvelta 10 ml PRB bioprodukto. Apvelti grūdai 30 min. laikyti kambario temperatūroje, nusausinti ir sudėti po 10 grūdų ant Petri lėkštelių ($n = 4$) su bulvių dekstrozės agaru mitybine terpe (*Liofilchem*®, Italija). Lėkštelės laikytos termostate 27 °C temperatūroje 7 dienas. Po to vertinta PRB bioprodukto įtaka kviečių grūdų užterštumo *Fusarium* genties mikroskopiniais grybais lygiui.

Kviečių grūdų detoksikacijos įvertinimas: 20 g kviečių grūdų sėklų ($n = 2$) apvelta 10 ml PRB bioprodukto. Apvelti grūdai 30 min. laikyti kambario temperatūroje, nusausinti, išdžiovinti ir sumalti. PRB bioprodukto įtaka *Fusarium* spp. mikotoksino DON pažeistuose kviečių grūduose sumažinimui vertinta imunofermentiniu ELISA metodu.

Grūdų daigumo nustatymas: 100 kviečių grūdų sėklų ($n = 3$) apvelta 10 ml PRB bioprodukto. Apvelti grūdai 30 min. laikyti kambario temperatūroje ir nusausinti. Vertinta PRB bioprodukto įtaka *Fusarium* spp. užterštų kviečių grūdų daigumo pokyčiams.

2.2.8. Grūdų apdorojimo ozonu sąlygos

200 g natūraliai *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų pažeistų kviečių grūdų mėginio tolygiai paskleista 40 l ozonavimo kameroje (plastikinėje dėžėje). Per kameroje esančią žarnelę į dėžę tiekta OZ-3G generatoriumi (Guangdžou, Kinija) gaminamas ozonas (O₃), esant ne mažesnei kaip 20 mg/l ozono koncentracijai. Apdorojimas ozonu truko 40, 80 ir 130 min., po ozonavimo iš dėžės paimta po 50 g

ozonuoto grūdų mėginio, sudėta į sandarius polietileningus maišelius ir saugota iki mikotoksinų analizės. Viso eksperimento metu laboratorijoje buvo palaikomas 65–75 % santykinis oro drėgnis. Atlikti trys lygiagretūs tyrimai.

2.2.9. Grūdų daigumo įvertinimas

Grūdų daigumui įvertinti taikytas ritinių metodas (naudojant drėgnus filtrinio popieriaus ritinius); jis išreikštas grūdų sudygimu (procentais) [203, 204]. Nustatymo eiga: sukarpyta 15 cm pločio ir 100 cm ilgio filtrinio popieriaus juosta, sudrėkinta H₂O, ir ant jos išdėstyta 100 grūdų sėklų. Juosta su išdėstytais sėklomis susukta į nestandų ritinį, šis pamerktas į vandenį taip, kad vanduo nesemtų sėklų. Sėklos daigintos 3 paras kambario temperatūroje (18–22 °C). Po to ritinys išvyniotas ir suskaičiuotos sudygusios sėklos. Daigumas apskaičiuotas pagal (2.3) formulę:

$$P = \frac{n}{N} \cdot 100 (\%); \quad (2.3)$$

čia n – sudygusių grūdų skaičius, N – daigintų grūdų skaičius.

2.2.10. Grūdų baltymų frakcionavimas elektroforezės metodu

Visos pagrindinės analizuotų grūdų baltymų frakcijos išskirtos taikant įvairius baltymų išskyrimo metodus (2.7 lent.).

2.7 lentelė. Grūdų baltymų ekstrakcijos metodai

Nr.	Baltymų ekstrakcijos metodas	Literatūra
1	IPG buferis (viršutinis IPG buferio centrifugato sluoksnis): 7 M karbamido, 2 M tiokarbamido, 2 % CHAPS, 0,2 M DTT	[205]
2	IPG buferis (apatinis IPG buferio centrifugato sluoksnis): 7 M karbamido, 2 M tiokarbamido, 2 % CHAPS, 0,2 M DTT	
3	Nusodinimas acetonu (3,5 µl β-merkaptoetanolio/5 ml acetono) + IPG buferis (7 M karbamido, 2 M tiokarbamido, 2 % CHAPS, 0,2 M DTT)	[205]
4	Triso buferis (5 mM triso, pH 7,5; 1 mM CaCl ₂ , 20 mM DTT)	[206]
5	Karbamido buferis: 2 M karbamido, 10 % glicerolio, 65 mM DTT, 20 mM triso, pH 8,0	[207]
6	Nusodinimas acetonu (3,5 µl β-merkaptoetanolio/5 ml acetono) + karbamido buferis (7 M karbamido, 2 M tiokarbamido, 2 % CHAPS, 0,2 M DTT)	[207]

Tiriamasis grūdų ėminys (2 g) sutrintas trintuvėje su skystu azotu. Gautas mėginys (0,2 mg) supiltas į 1,5 ml centrifugavimo mėgintuvėlį. Mėginys užpiltas buferiniu tirpalu pagal tiriamąją metodiką. Baltymų koncentracija mėginiuose įvertinta Bradfordo metodu [208] naudojant *2-D Quant Kit* reagentų rinkinį (*GE Healthcare*, Jungtinė Karalystė). Metodas pagrįstas specifine baltymo sąveika su

dažu Kumasi brilliantiniu mėliu ir spektrofotometriškai išmatavus 595 nm monochromatinio spindulio sugertį susidariusiame spalvotame reakcijos tirpale. Baltymų elektroforezė atlikta pagal Laemmli metodiką [209]. Darbe naudoti 12 % frakcionuojantieji ir 4 % koncentruojantieji geliai (2.8 lent.).

Mėginiai elektroforezei ruošti sumaišant 16 µl tiriamojo mėginio baltymo su 4 µl 5x pavyzdžio buferinio tirpalo (0,1 M DTT, 10 % NDS, 20 % glicerolio, 0,2 M triso pH 6,8, 0,05 % bromfenolio mėlio) ir 5 min. kaitinant kaitinimo bloke (100 °C). Frakcionuojantis gelis supiltas tarp elektroforezės stiklelių ir užpiltas propanoliu. Geliui sustingus, ant jo užpiltas koncentruojantis gelis ir įstatytos elektroforezės šukos. Sustingus viršutiniam geliui, stikleliai su geliu įstatyti į elektroforezės aparatą *Protean Mini* (BioRad Ltd., Jungtinė Karalystė).

2.8 lentelė. Elektroforezės gelių paruošimo sąlygos

Cheminės medžiagos	Frakcionuojantis 12 % gelis	Koncentruojantis 4 % gelis
H ₂ O	2,115 ml	3,64 ml
1 M Tris HCl, pH 8,8	3,750 ml	–
1 M Tris HCl, pH 6,8	–	625 µl
10 % NDS	100 µl	50 µl
30 % akrilamidas	4 ml	830 µl
TEMED	10 µl	5 µl
20 % APS	30 µl	15 µl

Elektroforezės aparato blokas užpiltas 1x NDS elektroforezės buferiu ir išimtos šukos. Į susidariusius gelio takelius įleisti baltymų mėginiai, o molekulinei masei nustatyti naudotas genetinis baltymų molekulinės masės standartas (UAB *Fermentas*, Lietuva). Elektroforezė tęsta, kol bromfenolio mėlio frontas pasiekė skiriamąjį gelio apačią, proceso metu palaikyta 25–30 mA srovė (stengiantis neviršyti 180 V įtampos). Išimtas gelis dažytas Kumasi brilliantinio mėlio G-250 dažikliu ir skenuotas *Canon* skaitytuvu. Gauto spektro kompozicija vertinta vaizdiškai.

2.2.11. Bioetanolio gamybos sąlygos

Grūdinei žaliavai (apdorotos arba neapdorotos PRB) fermentuoti naudota žemos temperatūros etanolio gamybos technologinė schema (2.1 pav.). Polisacharidams suskaidyti ir mikrobiniam aktyvumui sumažinti susmulkinta biomasė (300 g) sumaišyta su 90 °C temperatūros vandenių santykiu 1:6 ir palaikyta 90 °C temperatūros vandens vonioje 30 min. Grūdinės žaliavos fermentinė hidrolizė vykdyta dviem etapais: masė suskystinta ir sucukrinta. Masei suskystinti ir sucukrinti naudota grybinė α -amilazė iš *Trichoderma reesei* Stargen™ 002 (DuPont Industrial Biosciences, Danija), aktyvumas 0,456 AV/kg grūdinės masės, ir atitinkami kiekiai (1150, 2300, 3450, 4600 ir 5750 AV 100 g grūdinės masės) β -ksilanazės *Ecopulp®TX-200A* (AB Enzymes, Suomija). Hidrolizė vykdyta 56–57 °C temperatūroje 90 min. (terpės pH 5). Hidrolizuota masė atvėsinta ir fermentuota 32 °C temperatūroje 48 val., naudojant *S. cerevisiae*, *K. marxianus* var. *bulgaricus* ir *K. marxianus* mieles (10 g/l).

2.2.12. Fermentacijos proceso įvertinimas

Alkoholinės fermentacijos efektyvumas įvertintas nustatant rūgštingumą ir tirpių sausųjų medžiagų kiekį sucukrintoje masėje bei fermentuotame mėginyje. Taikyti standartiniai tarptautinėje praktikoje įprasti metodai: tirpių sausųjų medžiagų kiekiui nustatyti – refraktometriniu [210], alkoholio kiekiui nustatyti – tiesioginės distiliacijos ir aerometrijos [211]. Rūgštingumas nustatytas titrimetrinės analizės metodu, kur vienas rūgštingumo laipsnis (1°) atitinka 1 ml 1 M NaOH, reikalingą 20 ml filtrato esančioms laisvosioms rūgštims neutralizuoti.

Fermentuotoje distiliuotoje masėje esančio etilo alkoholio ir aukštesnės eilės alkoholių kiekiai nustatyti dujų chromatografijos metodu (DCh) naudojant *Hewlett Packard 5890 GC* sistemą su liepsnos jonizacijos detektoriumi FID (*Agilent Technologies*, JAV) ir kolonėlę *Zebron ZB-WAX* (30 m×0,25×0,25 μm; 100 % polietilenglikolis, *Phenomenex*, JAV). Informacija apie chromatografinių junginių išskyrimo sąlygas pateikta 2.9 lentelėje.

2.9 lentelė. Chromatografinių junginių išskyrimo sąlygos

Parametrai	Vertė
Garintuvo temperatūra, °C	200
Nešančiųjų dujų (helio) srauto greitis, ml/min	1,2 (chemiškai grynos, AGA, Lietuva)
Vandenilio srauto greitis, ml/min	1,8 (chemiškai grynos, AGA, Lietuva)
Bandinio tūris, μl	1
Skirstančioji kolonėlė (<i>Zebron ZB-WAX</i>)	30 m×0,25×0,25 μm (100 % polietilenglikolis, <i>Phenomenex</i> , JAV)
Temperatūros režimas:	
Pradinė temperatūra, °C	40 (išlaikymas 5 min.)
Galinė temperatūra, °C	100 (išlaikymas 2 min.)
Temperatūros kilimo greitis, °C/min	4
Detektoriaus temperatūra, °C	250

Tiriamųjų junginių koncentracija (mg/l) apskaičiuota palyginus gautų smailių plotus su žinomos koncentracijos etaloninių medžiagų – metilo ($\geq 99,9\%$, *Sigma Aldrich*, Vokietija), propilo ($\geq 99,9\%$, *Sigma Aldrich*, Vokietija), izobutilo ($> 99,8\%$, *Sigma Aldrich*, Vokietija) ir izoamilo ($> 98,0\%$, *Sigma Aldrich*, Vokietija) alkoholių – smailių plotais ir įvertinus teorinį fermentacijos efektyvumą, kur 1 g redukuojančių sacharidų pagamina 0,461 g etilo alkoholio [212].

Fermentuota masė po filtravimo ir džiovinimo analizuota ELISA metodu DON kiekiui sausajame likutyje (žlaugtuose) įvertinti.

2.2.13. Mikotoksinų nustatymas UESCh-MS/MS metodais

Naudoti reagentai. Acetonitrilas ir metanolis, gradientinio švarumo (*Millipore Ltd.*, Vokietija). Skruzdžių rūgštis, gradientinio švarumo ($\geq 96,0\%$), ir amonio formiatas (99 %, *Panreac Química S. A. U.*, Ispanija). Vanduo išgrynintas, dejonizuotas *Milli-QTM* vandens gryninimo sistema (Bilerika, JAV). Buferinis druskos mišinys (*Phenomenex*, JAV). Vienkartiniai *Ultrafree®PVDF* membraniniai filtrai (0,22 μm) (*Millipore Ltd.*, Vokietija). Etaloniniai tiriamųjų medžiagų tirpalai

ruošti jų standartus (10 mg) – DON, HT-2, T-2 ir ZEN (*Romer Labs Biopure*, Austrija) – tirpinant acetonitrile (10 ml). Iš standartinių tirpalų ruošti 10, 40, 100, 250 ir 500 mg/kg koncentracijos HT-2, T-2 ir ZEN analitiniai tirpalai, o DON analizei ruošti 50, 1000, 2000, 3000 ir 4000 µg/kg koncentracijos analitiniai tirpalai [213].

Bandinio paruošimas analizei. Mikotoksinų ekstrakcijai iš kviečių grūdų taikytas buferinės QuEChERS ekstrakcijos metodas [214]. Analizei pasverta 5 g tiriamojo mėginio, atsitiktine tvarka paimto iš 50 g ozonuoto grūdų ėminio, ir patalpinta į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlį. Į tą patį mėgintuvėlį buvo įpilti atitinkami kiekiai mikotoksinų standartų tirpalų. Po to į mėgintuvėlį įpilta 10 ml dejonizuoto vandens ir 10 ml acetonitrilo ir subertas buferinės druskos mišinys. Turinys 1 min. maišytas maišyklėje (*MaxiMix™*, *Thermo Fisher Scientific*, JAV) ir 10 min. purtytas automatine purtykle (*Multi RS-60*, *Biosan*, Latvija). Po to mišinys 5 min. centrifuguotas kambario temperatūroje 4500 aps./min. greičiu *Heraeus Multifuge 3L-R* centrifuga (*Thermo Fisher Scientific*, JAV). Po centrifugavimo iš mėgintuvėlio paimta 6 ml ekstrakto ir įpilta į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlį, šis 30 min. šaldytas –80 °C temperatūroje *Heto Ultra* šaldiklyje (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) tam, kad būtų nusodinti šalutiniai ekstrakcijos produktai bei lipidai. Atšildytas centrifugatas vėl 5 min. centrifuguotas kambario temperatūroje 4500 aps./min. greičiu siekiant išgauti organinių junginių centrifugatą. 3 ml gauto centrifugato išgarinta vakuuminiam rotaciniame garintuve *TurboVap LV* (*Biotage*, Švedija), gautos nuosėdos ištirpintos 500 µl vandens ir metanolio (50:50, v/v) mišinyje. Gautas ekstraktas filtruotas per 0,22 µm vienkartinį *Ultrafree®PVDF* membraninį filtrą ir perkeltas į automatinio dozavimo buteliukus tolesnei analizei.

Naudota aparatūra. Mikotoksinų kiekybinis tyrimas atliktas ultraaukšto našumo skysčių chromatografijos ir viengubosios bei dvigubosios masių spektrometrijos (*UESCh Orbitrap-HRMS* ir *UESCh-QqQ-MS/MS*) metodais. Abiejų chromatografijos metodų taikymo sąlygos optimizuotos ir eksperimento metu išlaikytos pastovios. Tiksliniams junginiams atskirti naudota 100 mm×2,1 mm, 2,6 µm *Kinetex C18* atvirkštinių fazių analizinė kolonėlė (*Phenomenex*, JAV). Optimizuotos chromatografinės metodikos judrioji fazė sudaryta iš eliuentų A (0,01 % skruzdžių rūgšties tirpalas vandenyje) ir B (100 % metanolis). Eliuento tekėjimo greitis – 300 µl/min. Eliucijos gradientas: eliuentas B – 6 min. 5 %, 6–10 min. 5–95 %, 11 min. 95 %, 0,1 min. 95–5 %, 15 min. 5 %. Injekcijos tūris – 10 µl. Kolonėlės termostato temperatūra – 40 °C, mėginio termostato temperatūra – 10 °C.

UESCh-Orbitrap-HRMS analitinė sistema

UESCh-Orbitrap-HRMS analizė atlikta naudojant *Acela 1250* ultraaukšto našumo skysčių chromatografijos sistemą (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), sujungtą su *Q-Exactive Orbitrap-HRMS* junginių aptikimo sistema (Brėmenas, Vokietija). Jonizacija pasiekta veikiant šildomu elektropurkštuviniu jonizacijos šaltiniu (H-ESI II) su teigiamų ir neigiamų jonų režimais.

Prietaiso veikimo ir duomenų apdorojimo kontrolę valdė *Thermo Fisher Xcalibur™* ir *TraceFinder™* programinė įranga (JAV). Optimizuotos metodo instrumentinės sąlygos apibendrintos 2.10 lentelėje, o išsami informacija apie

analizuotų mikotoksinų chromatografijos parametrus pateikta 2.11 lentelėje.

2.10 lentelė. Optimizuotos mikotoksinų nustatymo kviečių grūduose metodų sąlygos

	<i>Orbitrap-HRMS</i>	<i>QqQ-MS/MS</i>
Apvaskalo dujų srautas / slėgis	50 sąlyginiai vienetai	60 psi
Pagalbinių dujų srautas / slėgis	10 sąlyginiai vienetai	30 psi
Kapiliaro temperatūra	250 °C	–
Dujų temperatūra	350 °C	500 °C
Elektropurkštuvinė įtampa	3,50 kV / –3,50 kV	3,50 kV / –3,50 kV
Kapiliaro įtampa	–	5,0 kV
Maksimali suleidimo trukmė	200 ms	–
Skenavimo sparta	1 sken./sek.	1 sken./sek.
Automatinė stiprinimo kontrolė (<i>AGC target</i>)	5×10^6	–
Skenavimo režimas	<i>m/z</i> 100 iki 1000	MRM
MS rezoliucija	70,000 FWHM	Vnt.
Nustatymo režimas	SIM	MRM

UESCh-QqQ-MS/MS analitinė sistema

UESCh-QqQ-MS/MS analizė atlikta naudojant *AB Sciex QTrap 5500* masių spektrometrą (*AB Sciex*, JAV) su šildoma elektropurkštuvine jonizacijos sąsaja ir *Waters Acquity* ultraaukšto našumo skysčių chromatografijos sistema (*Waters*, Milfordas, Masačusetas, JAV). Kiekvienam analizuotam mikotoksinui nustatyti parinkti reikiami analitiniai analizės režimai, užtikrinantys pakankamą mikotoksinų junginių detekcijos skaičių junginiams atpažinti. Įrenginio duomenims valdyti, kaupti ir apdoroti naudota *Analyst® 1.6* programinė įranga (*Sciex*, JAV). Optimizuotos metodo instrumentinės sąlygos apibendrintos 2.11 lentelėje, kurioje pateikta informacija apie junginių sulaikymo trukmę ir gausiausių molekulinis jonus.

2.11 lentelė. Mikotoksinų kviečių grūduose aptikimo ir kiekybinio nustatymo *Orbitrap-HRMS* ir *QqQ-MS/MS* metodais sąlygos

	<i>Orbitrap-HRMS</i>		<i>QqQ-MS/MS</i>					
	Sulaikymo laikas (min.)	Molekulinė masė (Da)	Sulaikymo laikas (min.)	Karuselės įtampa (V)	MRM 1 (<i>m/z</i>)	CE1 (V)	MRM 2 (<i>m/z</i>)	CE2 (V)
DON	3,6	297,1333	3,3	30,0	297>249	20	297>231	22
HT-2	8,7	442,2435	8,2	30,0	447>345	30	447>285	34
T-2	9,2	484,2541	8,7	30,0	489>327	37	489>245	43
ZEN	9,6	317,1395	9,1	30,0	317>175	34	317>131	40

Analitinių metodų tikslumo ir patikimumo įvertinimas analizuojant Fusarium spp. gaminamus mikotoksinius

Metodų *UESCh-QqQ-MS/MS* ir *UESCh-Orbitrap-HRMS* tikslumas ir tinkamumas mikotoksinams nustatyti vertintas pagal šiuos pasirinktus validacijos parametrus: determinacijos koeficientą (R^2), vidutinį regeneravimą ($R\%$), santykinį

standartinę nuokrypį (SSN), aptikimo ribą (LoD) ir nustatymo ribą (LoQ). Tyrimais gautų duomenų statistinė analizė apibendrinta 2.12 lentelėje.

2.12 lentelė. Analitinių chromatografijos metodų tikslumo ir patikimumo įvertinimas analizuojant *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų kviečių grūduose gaminamus mikotoksinus

Analitės	<i>Orbitrap-HRMS (n = 5)</i>					<i>QqQ-MS/MS (n = 5)</i>				
	R ²	R (%)	SSN (%)	LoD (µg/kg)	LoQ (µg/kg)	R ²	R (%)	SSN (%)	LoD (µg/kg)	LoQ (µg/kg)
DON	0,996	104	9,5	1,8	5,9	0,995	102	6,5	1,5	5,0
HT-2	0,992	99	9,2	2,0	6,6	0,991	97	7,4	3,0	9,9
T-2	0,985	102	17,5	1,6	5,3	0,984	89	13,2	1,9	6,3
ZEN	0,996	98	7,5	0,8	3,3	0,994	94	6,2	0,7	2,3

Analizuojamų mikotoksinų standartų koncentracijos ribose (10–500 µg/kg) nustatyti determinacijos koeficientai buvo didesni nei 0,98. Taip pat nustatyti vidutiniai atkuriamumo nuokrypiai (94–104 %) bei santykiniai standartiniai nuokrypiai (6,2–17,5 %) atitiko Europos Komisijos (EK) reglamentuotas (EK nutarimas Nr. 401/2006) analitinių mikotoksinų analizės metodų tikslumo ir patikimumo sąlygas (RSD < 20 %) [215]. Gauti tiriamų metodų patikimumo ir tikslumo statistiniai rezultatai leidžia teigti, kad šiais metodais galima pakankamai tiksliai nustatyti DON, HT-2, T-2 ir ZEN koncentraciją kviečių grūduose. Tačiau *UESCh-QqQ-MS/MS* metodas buvo šiek tiek tikslesnis dėl aukštesnės tiesinės priklausomybės tarp mikotoksinų koncentracijos ir mažesnių santykinų standartinių nuokrypių (SSN < 20 %).

2.2.14. Statistinė duomenų analizė

Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta naudojant programų SPSS ir *Microsoft Excel* analizės paketus. Pagrindinės tendencijos ir analizuojamų duomenų vėrečių išsidėstymas vertintas taikant aprašomosios statistikos metodą. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti taikyta dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška. Matuojamų parametrų vidurkiams tarp duomenų grupių įvertinti taikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (ANOVA). Faktoriaus reikšmingumo lygis nustatytas pagal Fišerio (*F*) kriterijų, esant 95 % patikimumui.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. *Fusarium* spp. taršos įtaka grūdų cheminei sudėčiai ir mikrostruktūrai

Nustatyta, kad *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų cheminė sudėtis ir technologinės savybės keičiasi [216, 217]; pakinta jų kvapas, skonis, taip pat struktūra. Dėl šių priežasčių susidaro grūdinės žaliavos nuostoliai. Technologinio proceso stabilumui užtikrinti svarbu greičiau aptikti nekokybiškus grūdus ir juos pašalinti iš grūdų perdirbimo grandinės. Be to, svarbu išsiaiškinti mikroskopinių grybų sukeliama pokyčių priežastį. Tiriant *Fusarium* spp. užkrėstus miežių ir kviečių grūdus, struktūriniai pokyčiai buvo siejami su mikroskopinių grybų gaminamo mikotoksino DON koncentracijos pokyčiais ir su padidėjusiu javų grūdų fermentų aktyvumu.

3.1.1. *Fusarium* spp. taršos įtaka miežių ir kviečių cheminei sudėčiai

Fusarium mikroskopinių grybų gaminamo mikotoksino DON įtaka miežių ir kviečių grūdų cheminei sudėčiai įvertinta nustatant grūdų bendrą baltymų kiekį, krakmolo kiekį ir hektolitro masę miežiams, o 1000 grūdų masę kviečiams. Grūdų cheminės sudėties pokyčių tyrimų rezultatai pateikti 3.1 ir 3.2 lentelėse.

Miežių grūduose didėjant DON koncentracijai (0–425 µg/kg) bendras baltymų kiekis reikšmingai nekito. Panaši tendencija pastebėta ir kviečių grūduose. Šie tyrimų rezultatai sutampa su kitų tyrėjų išvadomis [55, 218]: nustatyta, kad grūdinės žaliavos užterštumas *F. graminearum* ar *F. culmorum* mikroskopiniais grybais neturėjo įtakos bendram kviečių baltymų kiekio pokyčiui, nors buvo pastebėtas sumažėjęs kviečių glitimo stiprumas dėl sumažėjusios gliuteninų koncentracijos.

3.1 lentelė. *Fusarium* spp. taršos įtaka laikomų miežių cheminei sudėčiai ir sausųjų medžiagų nuostoliams

Mėginio Nr.	Baltymai, %	Krakmolas, %	Drėgnis, %	Hektolitro masė, g	DON koncentracija, µg/kg
1	11,0±0,1	64,3±0,2	14,7±0,1	790±4	0±5
2	12,6±0,2	62,4±0,3	16,7±0,3	810±2	10±5
3	11,7±0,1	64,1±0,2	14,7±0,2	815±4	19±8
4	11,0±0,1	64,7±0,4	14,2±0,1	790±4	20±5
5	11,7±0,3	64,2±0,1	15,0±0,3	770±2	28±6
6	12,0±0,1	62,9±0,3	14,0±0,2	790±3	30±4
7	11,2±0,2	63,6±0,3	15,2±0,3	770±2	40±7
8	12,2±0,1	64,0±0,2	15,0±0,2	755±2	55±5
9	14,3±0,1	62,5±0,2	14,3±0,0	670±4	60±8
10	11,1±0,0	64,4±0,2	14,6±0,2	830±3	75±6
11	13,1±0,2	60,6±0,3	14,6±0,1	775±3	90±8
12	12,7±0,4	62,8±0,1	15,0±0,3	765±1	140±8
13	11,2±0,1	62,6±0,2	15,2±0,1	770±2	170±15
14	13,1±0,1	62,6±0,4	16,3±0,4	740±4	425±10

Atliekant tyrimą grūduose nustatytas sumažėjęs krakmolo kiekis ir sumažėjusi miežių grūdų hektolitro masė. Esant $r = -0,310$ ir $r = -0,328$ vertėms, kai $p \leq 0,05$,

nustatyta DON kiekio didėjimo įtaka miežių grūdų krakmolo ir hektolitro masės kitimui. Panaši tendencija nustatyta ir kviečių grūduose. Esant $r = -0,737$ ir $r = -0,637$ vertėms, kai $p \leq 0,01$, nustatyta DON kiekio didėjimo įtaka miežių grūdų krakmolo ir 1000 kviečių grūdų masės kitimui.

Rezultatai leidžia manyti, kad krakmolo kiekio sumažėjimas grūduose susijęs su *Fusarium* genties mikroskopinių grybų sukeltu grūdų susiraukšlėjimu [18]. Tokie grūdai plonesni ir juose yra mažiau endospermo, kurio pagrindinė sudėtinė dalis – krakmolas [219]. Ši tendencija, manoma, yra susijusi su grūdo angliavandenių (daugiausia krakmolo) hidrolize, kurią sukelia grūdus pažeidę mikroskopiniai grybai, pasižymintys padidėjusiu fermentų aktyvumu. Šie rezultatai atitinka kitų mokslininkų tyrimų rezultatus [218] ir leidžia patvirtinti, kad *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai lemia grūdo mikrostruktūros pokyčius, keičia grūdo formą ir cheminę sudėtį.

3.2 lentelė. *Fusarium* spp. taršos įtaka laikomų kviečių cheminei sudėčiai ir sausųjų medžiagų nuostoliams

Mėginio Nr.	Baltymai, %	Krakmolas, %	Drėgnis, %	1000 grūdų masė, g	DON koncentracija, µg/kg
1	11,2±0,1	66,2±0,2	13,9±0,2	48,5±0,1	254±42
2	11,8±0,1	65,1±0,1	13,2±0,1	46,5±0,1	300±20
3	12,3±0,1	64,5±0,1	14,1±0,1	43,6±0,1	300±33
4	12,2±0,1	65,5±0,2	12,9±0,1	41,2±0,1	320±15
5	12,0±0,0	66,7±0,3	13,8±0,2	44,9±0,1	330±23
6	12,0±0,1	65,0±0,3	13,1±0,2	45,5±0,2	360±20
7	12,1±0,1	66,3±0,3	14,0±0,1	45,2±0,0	400±52
8	13,5±0,2	65,7±0,2	13,6±0,1	42,3±0,1	400±39
9	12,5±0,1	64,0±0,2	12,5±0,0	46,9±0,0	420±70
10	12,9±0,2	64,8±0,3	13,5±0,1	40,1±0,1	470±48
11	12,4±0,1	64,3±0,1	13,0±0,1	42,2±0,0	480±12
12	12,3±0,0	65,1±0,2	13,7±0,1	42,8±0,0	500±147
13	12,6±0,1	63,9±0,0	13,9±0,0	46,7±0,0	500±31
14	12,7±0,0	63,4±0,1	13,4±0,1	44,5±0,1	530±46
15	11,7±0,1	65,1±0,3	13,4±0,2	43,0±0,1	560±82
16	11,8±0,1	66,1±0,2	13,4±0,2	41,2±0,0	600±34
17	13,5±0,3	63,7±0,1	14,1±0,1	47,2±0,1	600±18
18	13,8±0,2	64,4±0,2	12,9±0,0	43,1±0,1	670±79
19	13,3±0,3	63,5±0,2	13,6±0,2	46,5±0,2	700±45
20	13,0±0,2	64,8±0,1	13,6±0,2	44,9±0,1	700±49
21	13,1±0,2	63,2±0,3	13,8±0,2	44,5±0,1	740±56
22	14,2±0,4	62,9±0,2	13,7±0,1	47,3±0,2	800±99
23	12,8±0,2	63,4±0,2	14,1±0,2	41,3±0,1	800±74
24	12,7±0,1	64,2±0,1	13,0±0,1	42,7±0,1	860±93
25	13,1±0,2	62,2±0,0	13,8±0,1	46,9±0,2	900±38
26	12,7±0,1	63,7±0,1	13,6±0,2	40,7±0,0	980±103
27	13,4±0,0	64,1±0,2	12,7±0,0	41,1±0,0	1000±55

3.2 lentelė (tęsinys). *Fusarium* spp. taršos įtaka laikomų kviečių cheminei sudėčiai ir sausųjų medžiagų nuostoliams

Mėginio Nr.	Baltymai, %	Krakmolas, %	Drėgnis, %	1000 grūdų masė, g	DON koncentracija, µg/kg
28	12,0±0,1	62,1±0,1	13,8±0,2	44,2±0,1	1000±86
29	12,4±0,2	63,8±0,2	12,8±0,1	39,4±0,0	1100±61
30	12,8±0,2	62,5±0,2	13,2±0,1	40,0±0,1	1200±132
31	12,3±0,2	62,4±0,1	12,9±0,1	39,2±0,0	1250±124
32	12,0±0,1	63,9±0,2	12,8±0,2	40,4±0,0	1300±86
33	13,9±0,3	61,6±0,0	13,6±0,3	38,2±0,0	1500±107
34	11,7±0,0	62,9±0,3	13,3±0,1	37,7±0,0	1600±145

Pažeistos grūdinės žaliavos cheminės sudėties tyrimai parodė, kad *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai daro neigiamą įtaką grūdų cheminei sudėčiai, sukeldami grūdų sausųjų medžiagų nuostolius, taip pat padidindami grūduose esančio mikotoksino (DON) koncentraciją. Šių pokyčių priežastingumas iki šiol yra tyrimų ir diskusijų objektas, todėl norint juos geriau paaiškinti būtina kompleksinė javų grūdų analizė įvertinant ir kitus cheminės sudėties (fermentų aktyvumo), grūdo mikrostruktūros bei technologinių savybių (daigumo) pokyčius.

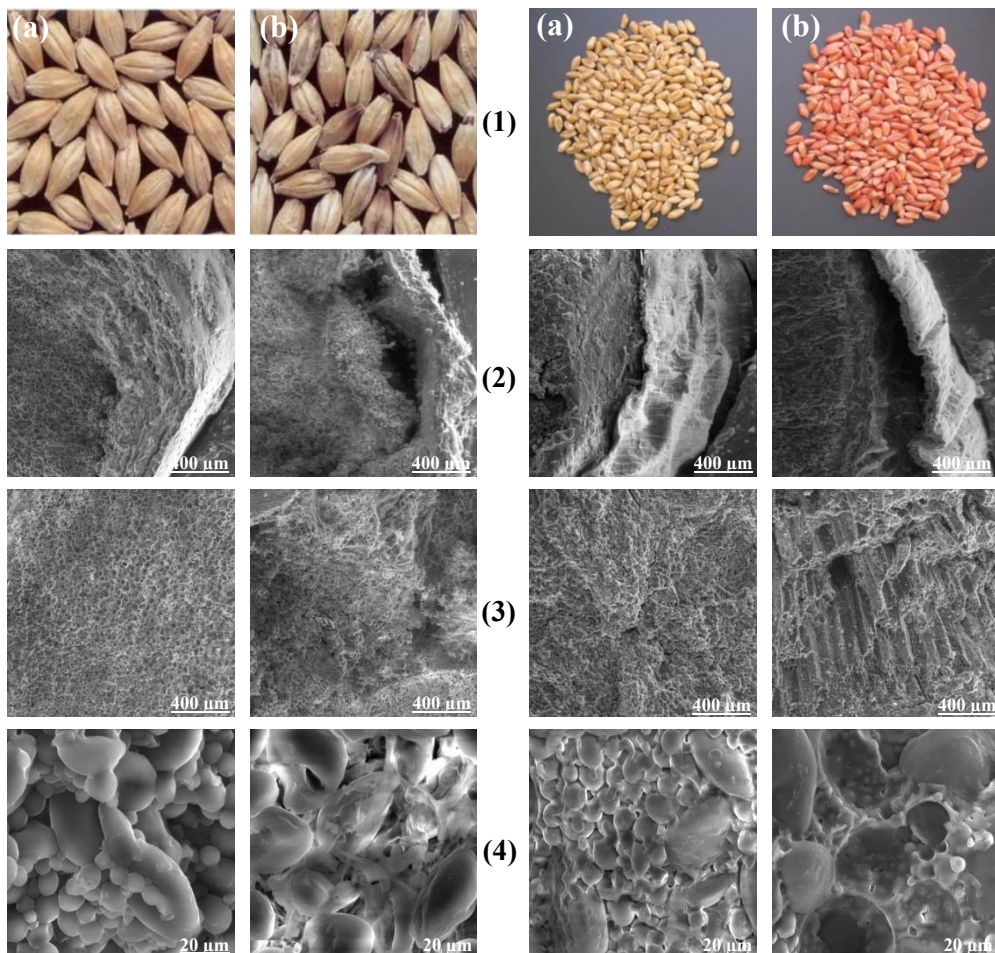
3.1.2. *Fusarium* spp. taršos įtaka miežių ir kviečių mikrostruktūrai

Skenuojančiuoju elektroniniu mikroskopu (SEM) buvo atlikta sveikų ir *Fusarium* spp. pažeistų miežių bei kviečių grūdų mikrostruktūros analizė. Grūdų mikrostruktūros nuotraukos pateiktos 3.1 paveiksle. Jose matomi sveikų (3.1 pav., *a*) ir *Fusarium* spp. pažeistų (3.1 pav., *b*) miežių bei kviečių grūdų bendro išorinio vaizdo (3.1 pav., *1*), grūdo sienelės mikrostruktūros vaizdo (3.1 pav., *2*), grūdo endospermo mikrostruktūros (3.1 pav., *3*) ir krakmolo grūdelių mikrostruktūros pokyčiai (3.1 pav., *4*).

Lyginant miežių ir kviečių, sveikų ir pažeistų, grūdų bendrą išorinį vaizdą (3.1 pav., *1*), pastebėti šie pokyčiai: *Fusarium* spp. pažeisti grūdai yra susiraukšlėję, praradę savo morfologines savybes, įgavę *Fusarium culmorum* pažeistiems grūdams būdingą rožinę paviršiaus spalvą. Grūdų sienelės mikrostruktūros nuotraukose (3.1 pav., *2a*) matyti, kad sveikų grūdų sienelės yra storos ir nepažeistos, nėra tarpų tarp sienelės ir endospermo. Priešingai atrodo mikroskopinių grybų pažeistų grūdų sienelės mikrostruktūra: sienelė yra plona, susiraukšlėjusi, matomi dideli tarpgrūdinės erdvės tarpai (3.1 pav., *2b*). Neužterštų grūdų (3.1 pav., *3a*) endospermo mikrostruktūra yra nepakitusi ir vientisa, nematyti pažeidimo požymių. Savitas vaizdas matomas pažeistų grūdų endospermo mikrostruktūros nuotraukose (3.1 pav., *3b*): endospermas yra pažeistas, matomi krakmolo hidrolizės požymiai. Lyginant krakmolo grūdelių mikrostruktūros nuotraukas (3.1 pav., *4*), matyti, kad sveikų grūdų krakmolo grūdeliai yra taisyklingos formos, pasiskirstę nesuardytoje baltymų matricoje (3.1 pav., *4a*), o pažeistų grūdų krakmolo grūdeliai yra destrukūrizuoti, praradę formą, suardytomis sienelėmis, sudarantys pavienius aglomeratus (3.1 pav., *4b*).

Miežių grūdai

Kviečių grūdai



3.1 pav. Miežių grūdų (kairėje) ir kviečių grūdų (dešinėje), sveikų (a) ir susiraukšlėjusių, užterštų mikotoksinais (b), SEM nuotraukos: 1 – bendras grūdų vaizdas; 2 – grūdo sienelės mikrostruktūra (400 μm); 3 – grūdo endospermo mikrostruktūra (400 μm); 4 – krakmolo grūdelių mikrostruktūra (20 μm)

Panašūs grūdų endospermo vaizdai skenuojančiuoju elektroniniu mikroskopu (SEM) buvo gauti ir kitų mokslininkų [18, 220, 221]. Jų teigimu, visi mikrostruktūros pokyčiai susiję su padidėjusia cheminių grūdo dalių (endospermo, grūdo sienelių, baltymų) hidrolize, kurią sukelia grūdus pažeidžianti mikroskopinių grybų veikla [222]. Manoma, kad tokie pažeistų grūdų mikrostruktūros pokyčiai daro didelę įtaką sausųjų medžiagų nuostoliams grūdų masėje, todėl užkrėstuose grūduose vykstantys saviti struktūriniai pokyčiai gali būti panaudoti nustatant ryšį tarp grūdų masėje esančio pažeistų grūdų kiekio ir DON koncentracijos.

3.1.3. *Fusarium* spp. taršos įtaka miežių ir kviečių fermentų aktyvumui ir grūdų daigumui

Norint patvirtinti, kad *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai sukelia cheminius grūdų dalių pokyčius ir keičia grūdų mikrostruktūrą, atlikta *Fusarium* spp. pažeistų grūdų fermentų (amilolitinių, ksilanolitinių ir proteolitinių) aktyvumo tyrimai. Jų rezultatai pateikti 3.3 ir 3.4 lentelėse.

Tyrimai parodė, kad *Fusarium* spp. užkrėstų miežių ir kviečių grūdų pažeidimas susijęs su nustatytu padidėjusiu fermentų aktyvumu. Amilolitinių, ksilanolitinių ir proteolitinių fermentų aktyvumas buvo padidėjęs miežių grūdų mėginiuose, kuriuose nustatyta didesnė DON koncentracija. Kai DON koncentracija buvo iki 140 µg/kg, miežių grūdų fermentų aktyvumas nustatytas toks: amilolitinių fermentų – nuo 528 iki 727 AV/g, ksilanolitinių – nuo 0,172 iki 0,180 KV/g, proteolitinių – nuo 86 iki 133 PV/g. DON koncentracijai didėjant nuo 140 iki 425 µg/kg, miežių grūdų fermentų aktyvumas padidėjo taip: amilolitinių fermentų – nuo 605 iki 913 AV/g, ksilanolitinių – nuo 0,177 iki 0,186 KV/g, proteolitinių – nuo 129 iki 189 PV/g.

Nustatytos teigiamos tiesinės priklausomybės tarp *Fusarium* spp. taršos lygio (pagal DON kiekį) ir fermentų aktyvumo padidėjimo: amilolitinių ($r = 0,868$, $p \leq 0,01$), ksilanolitinių ($r = 0,482$, $p \leq 0,01$) ir proteolitinių ($r = 0,914$, $p \leq 0,01$) (3.3 lent.).

3.3 lentelė. *Fusarium* spp. taršos įtaka laikomų miežių fermentų aktyvumui

Mėginio Nr.	DON koncentracija (µg/kg)	Amilolitinių fermentų aktyvumas (AV/g)	Ksilanolitinių fermentų aktyvumas (KV/g)	Proteolitinių fermentų aktyvumas (PV/g)
1	0±5	542±1	0,173±0,00	86±4
2	10±5	560±4	0,172±0,01	89±6
3	19±8	608±3	0,173±0,01	92±7
4	20±5	579±4	0,175±0,01	99±9
5	28±6	568±5	0,173±0,01	90±2
6	30±4	528±9	0,173±0,00	88±2
7	40±7	570±9	0,173±0,01	92±11
8	55±5	586±3	0,178±0,01	97±1
9	60±8	557±4	0,173±0,01	87±4
10	75±6	727±2	0,175±0,01	107±10
11	90±8	721±6	0,180±0,00	133±8
12	140±8	605±4	0,177±0,00	129±9
13	170±15	807±4	0,179±0,01	159±4
14	425±10	913±2	0,186±0,01	189±7

Vertinant DON įtaką amilolitinių, ksilanolitinių ir proteolitinių fermentų aktyvumo kviečių grūduose pokyčiams, nustatytos panašios priklausomybės (3.4 lent.). DON koncentracijai esant iki 1246 µg/kg (ES maksimali leidžiama DON riba javų grūduose – 1250 µg/kg), kviečių grūdų fermentų aktyvumas buvo: amilolitinių – nuo 229 iki 296 AV/g, ksilanolitinių – nuo 0,153 iki 0,167 KV/g, proteolitinių – nuo 21 iki 213 PV/g. DON koncentracijai didėjant nuo 1246 iki 4371 µg/kg, kviečių grūdų fermentų aktyvumas padidėjo taip: amilolitinių – nuo 306 iki 464 AV/g, ksilanolitinių – nuo 0,163 iki 0,189 AU/g, proteolitinių – nuo 137 iki 397 PV/g (3.4 lent.). Visais atvejais buvo nustatytos teigiamos tiesinės priklausomybės

tarp DON koncentracijos ir fermentų aktyvumo padidėjimo (amilolitinių ($r = 0,741$, $p \leq 0,01$), ksilanolitinių ($r = 0,602$, $p \leq 0,01$), proteolitinių ($r = 0,800$, $p \leq 0,01$)).

Moksliniuose šaltiniuose paskelbti tyrimų rezultatai rodo, kad *Fusarium* genties grybai geba gaminti ekstraląstelines hidrolazes [223, 224]. Urbanekas ir kt. (1984) [225] nustatė, kad *F. culmorum* gali gaminti rūgštines proteazes užkrėstuose javų grūduose. Nightingale ir kt. [226] taip pat patvirtino, kad *Fusarium* proteolitinių fermentų buvo manų kruopose ir miltuose, išgautuose iš *F. graminearum* ir *F. avenaceum* pažeistų paprastųjų ir kietųjų kviečių grūdų. Pekkarinen ir kt. [227] nustatė, kad kultivuojami *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai (*F. graminearum*, *F. culmorum* ir *F. poae*) kviečių grūdų terpėje išskirdavo proteazes ir jos buvo aktyvios tik esant pH vertei, kuri būdinga kviečių tešlai. Kango ir kt. [228] tyrimai parodė, kad *F. culmorum* ir *F. graminearum* mikroskopiniai grybai geba gaminti javų grūdų ląstelių sienelės ardančius fermentus, pvz., celiuliazes, ksilanazes ir pektinazes. Pawelzik ir kt. [229] tyrimai taip pat įrodė, kad *F. culmorum* pažeistų kviečių grūduose būna padidėjęs fermentų (celiulazių, ksilanazių ir gliukanazių) aktyvumas.

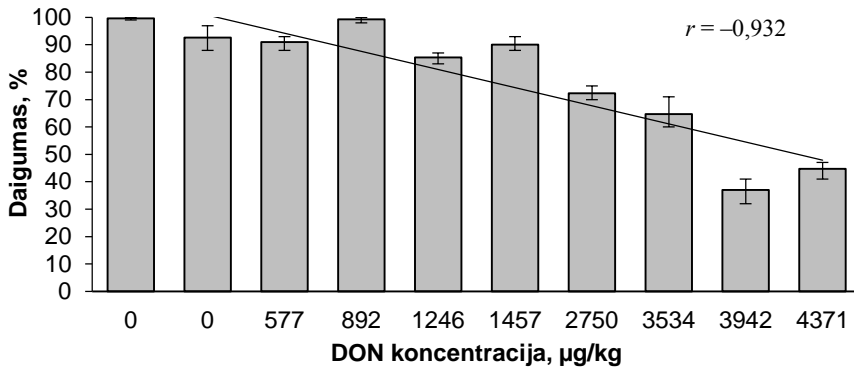
3.4 lentelė. *Fusarium* spp. taršos įtaka laikomų kviečių fermentų aktyvumui

Mėginio Nr.	DON koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Amilolitinių fermentų aktyvumas (AV/g)	Ksilanolitinių fermentų aktyvumas (KV/g)	Proteolitinių fermentų aktyvumas (PV/g)
1	0 \pm 0	229 \pm 8	0,157 \pm 0,00	22 \pm 4
2	0 \pm 0	283 \pm 9	0,167 \pm 0,00	21 \pm 5
3	577 \pm 82	335 \pm 6	0,157 \pm 0,01	152 \pm 10
4	892 \pm 64	296 \pm 9	0,153 \pm 0,00	87 \pm 8
5	1246 \pm 145	255 \pm 4	0,160 \pm 0,01	213 \pm 25
6	1457 \pm 106	306 \pm 19	0,189 \pm 0,01	137 \pm 19
7	2750 \pm 173	321 \pm 12	0,163 \pm 0,01	239 \pm 17
9	3534 \pm 190	328 \pm 9	0,179 \pm 0,00	173 \pm 8
9	3942 \pm 278	464 \pm 13	0,185 \pm 0,01	397 \pm 20
10	4371 \pm 223	365 \pm 6	0,179 \pm 0,01	234 \pm 17

Aptikus *Fusarium* genties mikroskopinių grybų pažeistuose grūduose vykstančius cheminės sudėties ir mikrostruktūros pokyčius, tikslinga nustatyti jų poveikį vienam iš svarbiausių salyklinių grūdų kokybės kriterijų – grūdų daigumui. Kviečių grūdų daigumas vertintas po trijų daiginimo dienų. Pastebėta grūdų daigumo priklausomybė nuo DON koncentracijos (3.2 pav.). Kai DON koncentracija buvo iki 1246 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kviečių grūdų daigumas buvo nuo 99,67 iki 91 %. DON koncentracijai kviečių grūduose didėjant nuo 1246 iki 4371 $\mu\text{g}/\text{kg}$, grūdų daigumas sumažėjo nuo 85,33 iki 37 %. Nustatyta atvirkštinė teigiama priklausomybė tarp DON koncentracijos didėjimo ir grūdų daigumo sumažėjimo ($r = -0,932$, $p \leq 0,01$) (3.2 pav.).

Daigumo sumažėjimas siejamas su grūdų cheminės sudėties pokyčiais. Mikroskopinių grybų pažeisti grūdai netenka gemalo ir vieno iš pagrindinių savo maistinių medžiagų šaltinių – krakmolo endospermo. Manytina, kad fermentiniu poveikiu pasižymintys mikroskopiniai grybai hidrolizuoja anatomines grūdo dalis,

pvz., gemalą, o tai lemia grūdų daigumo sumažėjimą.



3.2 pav. DON koncentracijos įtaka kviečių grūdų daigumui

Browne ir kt. [230] nustatė, kad *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai turėjo didelę įtaką grūdų daigumo mažėjimui. DeWolf ir kt. [231] taip pat teigia, kad *Fusarium* spp. pažeistų grūdų daigumo sumažėjimas yra pagrįstas mikroskopinių grybų poveikiu. Caruso ir kt. [232] nustatė, kad *F. culmorum* mikroskopinių grybų pažeistų kviečių grūdų daigumas sumažėjo vidutiniškai 15 %. Fen Yang ir kt. [233] patvirtino, kad *Fusarium* spp. pažeistų miežių daigumas po 3 dienų daiginimo sumažėjo.

Taigi, vadovaujantis gautais tyrimų rezultatais, galima teigti, kad *Fusarium* mikroskopinių grybų veikla turi įtakos javų grūdų cheminės sudėties, mikrostruktūros ir kokybės pokyčiams, kurie lemia grūdinės žaliavos kokybės ir saugos blogėjimą.

3.2. Naujos elektroakustinės technikos taikymo deoksinivalenoliui kviečių grūduose aptikti tyrimai

Kai grūdai yra užkrėsti mikroskopiniais grybais ir susiraukšlėję, dėl padidėjusio pašalinės mikrofloros fermentų aktyvumo hidrolizės metu suardoma grūdų krakmolo granuliu struktūra. Dėl fermentinių procesų vykstantys pažeistų grūdų struktūros pokyčiai, nustatyti 3.1 poskyryje, siejami su oro tuštumų atsiradimu ir tarpgrūdinės erdvės padidėjimu. Galima teigti, kad pokyčiai, vykstantys pažeistuose grūduose, susiję su jų taršos (DON) didėjimu. DON kiekiui įvertinti tikslinga taikyti akustinį metodą. Dėl akustinės bangos sklidimo savybių akustinio metodo taikymas poringoms grūdų matricoms tirti yra perspektyvus. Šis metodas yra labai greitas, nereikalauja specialaus gaminių paruošimo ir jo nesuardo. Galima teigti, kad taikant tiesioginį akustinio matavimo metodą stebimi per mėginį perėjusio ultragarsinio signalo parametrų pokyčiai, matuoti per sveikų ir pažeistų grūdų matricas, turi ryšį su DON kiekiu kitimu analizuojamuose skirtingo pažeistumo grūdų mėginiuose.

Tuo tikslu, vystant KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje sukurtą akustinį metodą, pagal EUREKA projektą ACOUSTICS sukurtas visiškai naujas akustinis spektrometras [190], kuris tikslesnis, greitesnis nei senasis akustinis spektrometras ir, svarbiausia, komercinis, t. y. naudotinas praktikoje [29, 189]. Šio

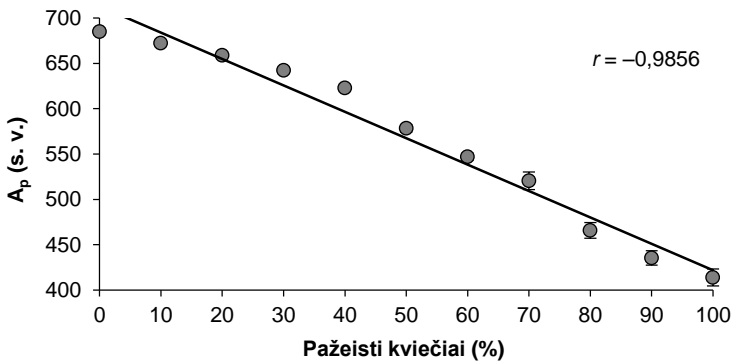
eksperimento tikslas buvo pritaikyti sukurta naują patobulintą akustinį spektrometrą kviečių grūdų užterštumui tirti, nes to dar niekas nebuvo daręs.

3.2.1. Optimalių akustinio metodo sąlygų kviečių grūdų saugos analizei nustatymas

Siekiant įvertinti akustinio spektrometro patikimumą ir tikslumą aptinkant DON kviečių grūduose, atlikta prietaiso validacija vienos laboratorijos sąlygomis. Didelę įtaką galutiniams akustinio metodo tyrimo rezultatams turi akustinio signalo dažnis, kuriam esant vykdomi matavimai. Eksperimentui naudojant akustinį spektrometrą, per mėginį perėjusio akustinio signalo vertės (A_p) matuotos 10–80 kHz dažnių diapazone, analizės trukmė ~10 sek. Su kiekvienu grūdų mėginiu buvo atlikta po 10 matavimų.

Įvertinant tai, kad, esant labai žemam (10–15 kHz) akustinių bangų dažniui, prietaisas fiksuoja įvairų triukšmą, o, esant didesniems nei 50 kHz dažniams, signalo sklidimui įtakos turi oro sūkuriai, optimalaus dažnio ieškota 10–40 kHz intervale. Nustatant dažnį įvertintos (analizuojant tą patį mėginį) minimalios tirtu parametru (A_p) standartinio nuokrypio ir variacijos koeficientų reikšmės. Po DON užterštų kviečių modelinių sistemų analizės ir statistinio duomenų apdorojimo buvo nustatytas optimalus 32,2 kHz (standartinis nuokrypis – 3,88, variacijos koeficientas – 0,71 %) akustinio metodo darbinis dažnis kviečių grūdams. Visi tolesni tyrimai buvo atlikti naudojant šį dažnį.

Tyrimai su kviečių grūdų modelinėmis sistemomis (3.3 pav.) parodė patikimą atvirkštinę tiesinę priklausomybę tarp užterštų (DON) kviečių grūdų kiekio modelinės sistemos mėginiuose ir akustinio signalo amplitudės (A_p) ($r = -0,9856$). Akustiniai matavimai atlikti naudojant 100 mm skersmens matavimo kiuvetę.

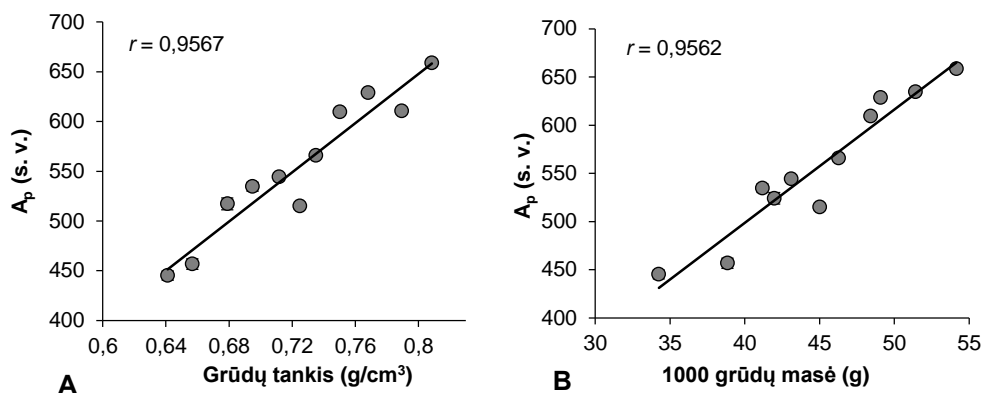


3.3 pav. Akustinio signalo amplitudės (A_p) verčių priklausomybė nuo *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų kiekio modelinėse sistemose (%), kai dažnis 32,2 kHz ($n = 10$), naudojant 100 mm skersmens matavimo kiuvetę; čia r – koreliacijos koeficientas

Nustatyta patikima atvirkštinė tiesinė priklausomybė tarp DON koncentracijos kviečių grūdų modelinėse sistemose ir akustinio signalo amplitudės sutampa su ankstesniais mokslininkų tyrimų rezultatais [189, 234, 235].

Tolesni *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų modelinės sistemos tyrimai parodė tiesinės priklausomybės ryšį tarp akustinio signalo amplitudės ir kviečių

grūdų tankio (3.4 pav., A) bei 1000 grūdų masės (3.4 pav., B).



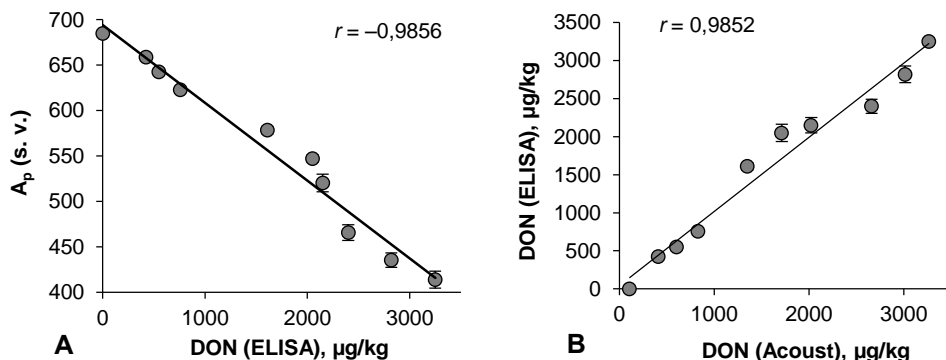
3.4 pav. Akustinio signalo amplitudės (A_p) verčių priklausomybė nuo kviečių grūdų tankio (A) ir 1000 grūdų masės (B) grūdų modelinėje sistemoje, kai dažnis 32,2 kHz ($n = 3$), naudojant 100 mm skersmens matavimo kiuvetę; čia r – koreliacijos koeficientas

Šie tyrimų rezultatai leidžia patvirtinti, kad akustinio signalo sklidimas grūdų mėginyje labai priklauso nuo grūdų dydžio ir formos, todėl būtina užtikrinti, kad analizuojamas grūdų mėginys būtų kuo homogeniškesnės morfologinės struktūros.

3.2.2. Priklausomybės tarp akustinio ir ELISA metodų nustatymas deoksinivalenolio analizei kviečių grūduose

Norint palyginti akustinį ir imunofermentinį (ELISA) metodus, buvo sudaryta kviečių grūdų modelinė sistema iš skirtingų *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų mėginių. Mikotoksino DON kiekis modelinėje sistemoje buvo nustatytas tradiciniu imunofermentiniu ELISA metodu.

Reikia paminėti, kad DON koncentracija modelinės sistemos mėginyje su 10 % užterštų grūdų kiekiu buvo nustatyta mažesnė (212 $\mu\text{g}/\text{kg}$), nei yra minimali ELISA metodo kiekybinio nustatymo riba (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), todėl šis mėginys buvo neįtrauktas sudarant kalibravimo kreivę (3.5 pav., A). Kviečių grūdų modelinių sistemų tyrimai akustiniu ir ELISA metodu parodė, kad tarp akustinio signalo amplitudės (A_p) verčių ir ELISA metodu nustatytos DON koncentracijos kviečių mėginiuose yra atvirkštinis tiesinis ryšys ($r = -0,9856$, $p \leq 0,05$). Tyrimai taip pat parodė, kad kuo didesnis *Fusarium* mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų kiekis grūdų masėje (%), tuo didesnė ir DON koncentracija, kuriai didėjant akustinio signalo amplitudės vertės (A_p) mažėja (3.5 pav., A). Pagal gautą priklausomybę ($y = -0,086x + 694,08$) tarp DON (ELISA) ir akustinio signalo amplitudės (A_p) verčių buvo apskaičiuotos netiesioginės, akustiniu metodu nustatytos DON vertės (DON (Acoust)) kviečių grūdų modelinėje sistemoje. Gauta, kad tarp akustiniu metodu nustatytos DON vertės (DON (Acoust)) ir DON vertės, nustatytos ELISA metodu, kviečių grūdų modelinėje sistemoje yra tiesinė priklausomybė ($r = 0,9852$). Tai leidžia patvirtinti akustinio metodo tinkamumą DON aptikti kviečių grūduose (3.5 pav., B).



3.5 pav. Akustinio signalo amplitudės (A_p) verčių priklausomybė nuo deoksinivalenolio (DON) koncentracijos kviečių grūdų modelinėje sistemoje (A), nustatytos ELISA (DON (ELISA)) ir akustiniu (DON (Acoust)) metodais ($n = 10$) (B); čia r – koreliacijos koeficientas

3.2.3. Akustinio metodo tikslumo ir patikimumo įvertinimas

Akustinio metodo patikimumui nustatant DON kiekį grūduose įvertinti pasirinktas metodas, kai vienos laboratorijos sąlygomis atliekant gautų duomenų koreliacinę regresinę analizę apskaičiuojami metodo tikslumą leidžiantys įvertinti rodikliai [200, 201]. Metodo patikimumo įvertinimo charakteristikos pateiktos 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė. Akustinio metodo patikimumo įvertinimo charakteristikos

	Kviečių grūdų modelinės sistemos mėginiai									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Susiraukšlėję kviečiai, %	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DON (ELISA), $\mu\text{g}/\text{kg}^*$	<100	424	550	758	1610	2050	2150	2400	2820	3250
Amplitudė A_p , s. v.:										
I tyrimas	686	661	642	624	582	550	526	476	438	425
II tyrimas	685	659	644	621	581	549	515	466	434	414
III tyrimas	684	658	640	622	574	541	530	464	424	402
IV tyrimas	684	657	643	624	575	547	509	455	443	412
Vidurkis	685	659	642	623	578	547	520	496	435	413
SD	1,0	1,0	1,7	1,5	4,0	4,0	9,7	8,6	8,0	9,4
DON (Acoust), $\mu\text{g}/\text{kg}^{**}$										
I tyrimas	93,9	396	605	814	1303	1675	1954	2536	2978	3129
II tyrimas	105,6	408	582	850	1314	1687	2082	2652	3024	3257
III tyrimas	111,4	419	629	838	1396	1780	1908	2675	3140	3396
IV tyrimas	117,2	420	594	815	1385	1710	2152	2780	2920	3280
Vidurkis	107,0	411	602	829	1350	1713	2024	2661	3015	3265
SN	9,9	11,1	19,9	17,4	47,5	46,9	112,7	100,2	93,7	109,6
SSN, %	9,3	2,7	3,3	2,1	3,5	2,7	5,6	3,8	3,1	3,4

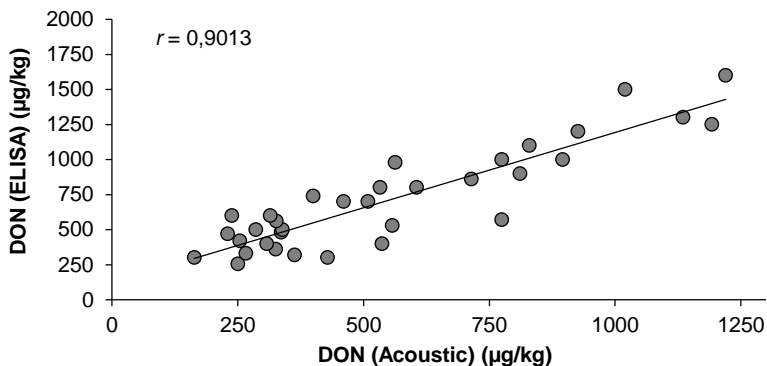
*DON koncentracija, nustatyta ELISA metodu (dvių matavimų vidurkis)

**DON koncentracija, apskaičiuota iš kalibravimo kreivės (3.5 pav., A)

Nustatytas pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis (SSN) skirtingam

DON koncentracijos lygiui sudarė: DON koncentracijai ≤ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 9,3 %, koncentracijai 200–600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 2,7–3,3 %, koncentracijai 600–1700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 2,1–3,5 %, koncentracijai >1700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 2,7–5,6 %. Visais atvejais pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis pateko į mažiau nei 20 % gero atsikartojamumo intervalo ribas, nustatytas pagal CEN/TR 16059:2010 [236]. Regresinės analizės rezultatai ir nustatyti metodo patikimumą leidžiantys įvertinti parametrai rodo, kad akustiniu metodu galima atlikti kiekybinę šio mikotoksino analizę. Taigi akustinis metodas yra pakankamai tikslus ir tinkamas tiek *Fusarium* spp. pažeistų grūdų kiekiui grūdų masėje įvertinti, tiek ir DON grūdinėje žaliavoje aptikti.

Atliekant akustinius pažeistų kviečių grūdų tyrimus, svarbu iširti ne tik sudarytas modelines sistemas, bet ir natūraliai pažeistus kviečių grūdų mėginius. Analizuojant natūraliai pažeistų grūdų mėginių akustinių tyrimų rezultatus, fiksuota patikima tiesinė priklausomybė ($r = 0,9013$, $p \leq 0,05$) tarp DON koncentracijos, nustatytos akustiniu metodu (DON (Acoust)), ir koncentracijos, nustatytos ELISA metodu (DON (ELISA)) (3.6 pav.). Tutelyanas [234], 10 metų tyrinėdamas grūdus iš įvairių Rusijos regionų, nustatė panašią koreliaciją ($r = 0,8–0,96$) tarp natūraliai *Fusarium* genties mikroskopinių grybų užkrėstų grūdų kiekio ir DON koncentracijos (ELISA) analizuotuose kviečių grūdų mėginiuose.



3.6 pav. Priklausomybė tarp DON koncentracijos natūraliai pažeistuose kviečių grūduose, nustatytos ELISA (DON (ELISA)) ir akustiniu (DON (Acoust)) metodais ($n = 34$); čia r – koreliacijos koeficientas

Kviečių grūdų modelinių sistemų tyrimai akustiniu spektrometru parodė, kad įrenginys yra tikslesnis ir patikimesnis nei anksčiau sukurtas akustinio spektrometro prototipas [189]. Lyginant natūraliai užterštų kviečių mėginių analizės rezultatus su kviečių grūdų modelinės sistemos rezultatais, gautas mažesnis koreliacijos koeficientas. Tai galima paaiškinti kviečių grūdų modelinės sistemos grūdų masės morfologiniais struktūros skirtumais lyginant juos su natūraliai pažeistais kviečių grūdais. Akustinių tyrimų rezultatai, gauti akustinės spektrometrijos ir ELISA metodais, dar kartą įrodė, kad akustinis metodas gali būti taikomas DON koncentracijai kviečių grūduose aptikti ES reglamento EC1881/2006 [237] nustatytoje maksimalioje DON aptikimo kviečių grūduose ribose. Kviečių mėginių analizėje apskaičiuotos SSN reikšmės intervale iki 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kito nuo 2,1 iki 9,3 % ir buvo vidutiniškai 54 % mažesnės nei pasiektos senuoju akustiniu spektrometru

SSN = 5,7–16,5 % intervale 400–800 µg/kg. Tai leidžia patvirtinti akustinio metodo pritaikomumą kviečių grūdų saugos monitoringui.

3.3. Technologinių veiksnių ir *Fusarium* spp. taršos grūduose įtaka anglies dioksido dujų susidarymo kinetikai grūdų laikymo metu

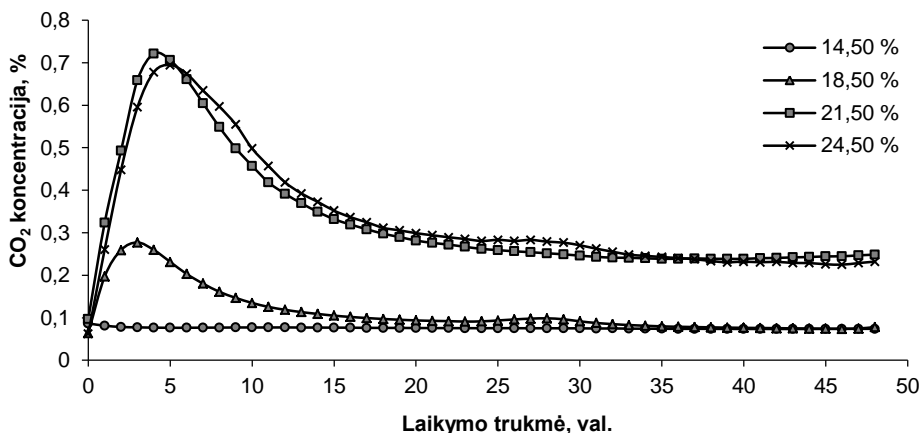
Didelę įtaką mikrobiotos įvairovei ir gausumui turi biotiniai bei abiotiniai veiksniai. Per didelę drėgmę kartu su aukšta temperatūra sudaro palankias sąlygas pelėsiniams mikroorganizmams daugintis laikomuose grūduose (daugumai mikromicetų optimali temperatūra 20–32 °C). Supiltuose grūduose mikroorganizmų veikla suintensyvėja jau per pirmąsias 24 valandas ir gali pakenkti jų kokybei, jei grūdų drėgnis viršija 14 %. Dėl savo morfologinių savybių ir pašalinės mikrofloros laikomi grūdai pradeda kvėpuoti. Pagrindinis grūdų kvėpavimo metabolitas yra anglies dioksidas (CO₂). Stebint laikomų grūdų masėje vykstančius kvėpavimo procesus, galima geriau suprasti grūdų kvėpavimą ir jam įtaką darančių technologinių veiksnių poveikį. Todėl, žinant laikomų grūdų kvėpavimo priežastis, galima laiku sulėtinti mikromicetų augimą bei vystymąsi ir apsaugoti laikomus grūdus nuo užterštumo ir galimų nuostolių, užtikrinant grūdų masės ventiliacijos ir džiovavimo režimą.

3.3.1. Technologinių veiksnių įtaka anglies dioksido susidarymui skirtingo stambumo laikomuose kviečių grūduose

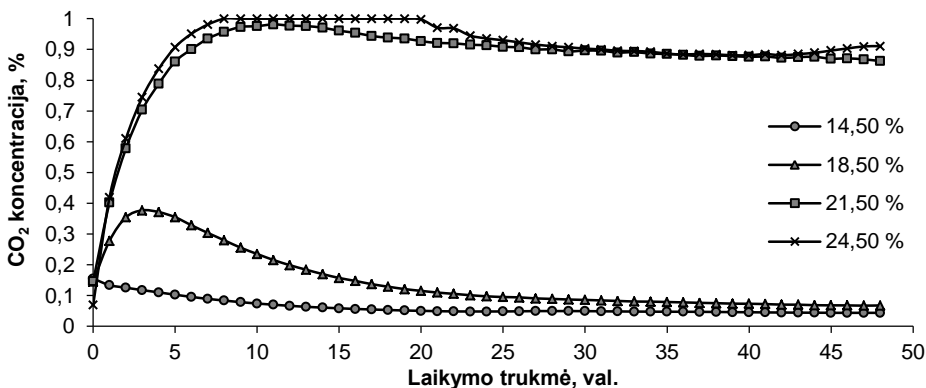
CO₂ susidarymas laikomuose grūduose priklauso nuo daugybės veiksnių: grūdų drėgnio, temperatūros, grūdinės žaliavos pažeistumo, morfologinių savybių [238]. Vieni iš jų – grūdų stambumas ir drėgnis. Laikomi grūdai, priklausomai nuo jų rūšies, dažnai būna skirtingų technologinių parametrų. Skirtingo stambumo ir drėgnio grūdų masėje vyksta skirtingi kvėpavimo procesai. Tam įvertinti tirta, kokią įtaką CO₂ difuzijai per grūdų masę turi grūdų stambumas ir drėgnis.

Tam įvertinti sudarytos skirtingo stambumo (1000 grūdų masė – 43,32 g ir 56,72 g) sveikų (DON – 0 µg/kg) kviečių grūdų modelinės sistemos, keičiant grūdų drėgnį (14,5 %, 18,5 % ir 24,5 %). Gauti rezultatai pateikti 3.7 ir 3.8 paveiksluose.

Nustatyta, kad laikomuose smulkiuose (1000 grūdų masė – 43,32 g) kviečiuose susidarantis CO₂ kiekis, didėjant drėgniui, didėja (3.7 pav.). Panaši tendencija būdinga ir stambiems (1000 grūdų masė – 56,72 g) kviečių grūdams. Drėgniui padidėjus 10 % (nuo 14,5 iki 24,5 %), laikomuose smulkiuose kviečių grūduose susidaręs CO₂ kiekis per pirmąsias 5 laikymo valandas padidėjo apie 9,4 karto. Stambių kviečių grūdų drėgniui kintant nuo 14,5 iki 24,5 %, susidariusi CO₂ koncentracija per pirmąsias 5 laikymo valandas padidėjo panašiai, kaip ir smulkiuose grūduose, – apie 8,8 karto (3.8 pav.).



3.7 pav. Smulkių grūdų (1000 grūdų masė – 43,32 g) saugojimo trukmės įtaka CO₂ koncentracijai, kai grūdai skirtingo drėgnio



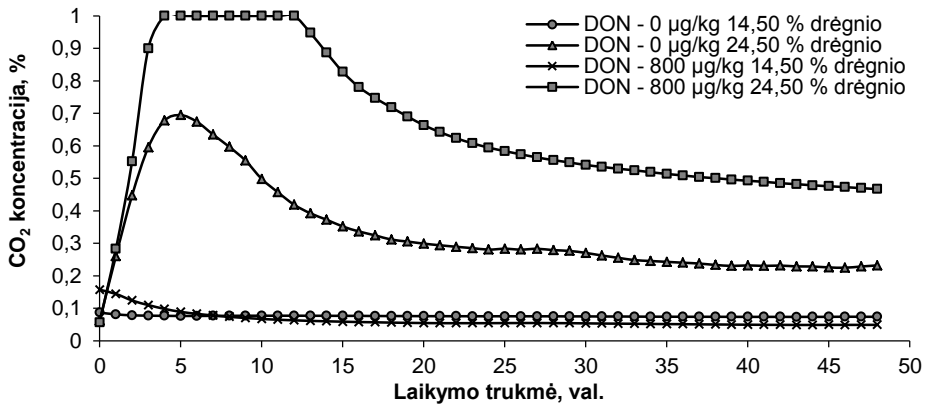
3.8 pav. Stambių grūdų (1000 grūdų masė – 56,72 g) saugojimo trukmės įtaka CO₂ koncentracijai, kai grūdai skirtingo drėgnio

CO₂ matavimai skirtingo stambumo ir drėgnio grūduose rodo skirtingą dujų išsiskyrimo dinamiką. Ji buvo intensyvesnė stambiuose kviečių grūduose. Tai aiškinama tuo, kad per smulkių grūdų masę CO₂ difunduoja lėčiau nei per stambius grūdus. Paveikluose taip pat matyti, kad CO₂ koncentracija pirmosiomis laikymo valandomis pasiekia maksimalias vertes ir vėliau mažėja. Toks kreivių pobūdis, manoma, gali būti susijęs su CO₂ absorbcijos procesu. Be to, neatmestina hipotezė, kad CO₂, būdamas sunkesnis už orą, leidžiasi į talpyklos apačią ir todėl daviklis fiksuoja tiriamo parametro koncentracijos mažėjimą. Tai rodo, kad, grūdus laikant neventiliuojamose talpyklose, svarbu sekti CO₂ pokyčius ne tik grūdų masės viršerdvėje (talpyklos viršutinėje dalyje), bet ir skirtinguose grūdų masės sluoksniuose (vidutiniuose ir apatiniuose). Tai leidžia patvirtinti neventiliuojamų talpyklų CO₂ monitoringo išdėstant daviklius įvairiose talpyklos vietose koncepcijos teisingumą.

3.3.2. Technologinių veiksnių įtaka anglies dioksido susidarymui *Fusarium spp.* užterštuose laikomuose kviečių grūduose

Šiame eksperimento etape vertinta CO₂ išsiskyrimo dinamika sveikų (DON – 0 µg/kg) ir pažeistų (DON – 800 µg/kg) smulkių kviečių grūdų (1000 grūdų masė – 43,32 g ir 40,76 g) modelinėse sistemose, esant skirtingam grūdų drėgnumui (14,5 % ir 24,5 %) (3.9 pav.).

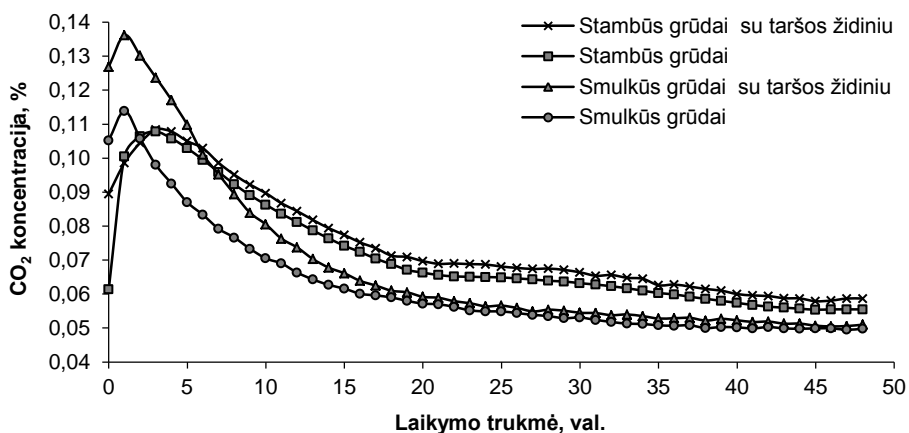
Nustatyta, kad laikomuose kviečiuose susidarantis CO₂ kiekis, didėjant drėgnumui, didėja. Ši tendencija būdinga tiek DON užterštiems, tiek ir neužterštiems grūdams. Drėgnumui padidėjus 10 % (nuo 14,5 iki 24,5 %), neužterštuose grūduose susidaręs CO₂ kiekis per pirmąsias 5 laikymo valandas padidėjo apie 7,8 karto. Užterštų grūdų drėgnumui kintant nuo 14,5 iki 24,5 %, susidaręs CO₂ kiekis per pirmąsias 5 valandas padidėjo daugiau nei 10 kartų. CO₂ matavimai skirtingo užterštumo grūduose (3.9 pav.) rodo skirtingą dujų išsiskyrimo dinamiką – užterštuose grūduose (DON – 800 µg/kg) ji didesnė nei sveikuose (DON – 0 µg/kg).



3.9 pav. Skirtingo užterštumo ir drėgno kviečių grūdų laikymo trukmės įtaka susidariusiai CO₂ koncentracijai

Taip pat pažymėtina, kad CO₂ kiekio skirtumai tarp sveikų ir užterštų grūdų matomi tik esant padidėjusiam šių grūdų drėgnumui, o esant standartiniam grūdų drėgnumui (14,5 %) reikšmingo CO₂ koncentracijos skirtumo tarp šių grūdų nepastebėta (3.9 pav.). Tai rodo, kad grūdų užterštumas, esant padidėjusiam grūdų drėgnumui, turi įtakos grūdų kvėpavimo procesams, o kartu ir grūdų saugai [239].

Tolesniais eksperimentais nustatyta, kokią įtaką taršos židiniai stambiuose ir smulkiuose grūduose turi CO₂ koncentracijai (3.10 pav.). Per pirmąsias 5 grūdų laikymo valandas visuose tirtuose kviečių grūduose susidaręs CO₂ kiekis padidėjo labai panašiai, kaip ir anksčiau analizuotuose mėginiuose (3.7, 3.8 ir 3.9 pav.), po to CO₂ koncentracija mažėjo. Mažėjant CO₂ koncentracijai, pastebėta tokia tendencija: stambiuose užterštuose ir sveikuose grūduose CO₂ koncentracija buvo didesnė nei atitinkamai smulkiuose grūduose. Grūduose su taršos židiniu buvo fiksuoti didesni CO₂ kiekiai.



3.10 pav. Taršos židinio ir skirtingo stambumo kviečių grūdų laikymo trukmės įtaka susidariusiai CO₂ koncentracijai

Eksperimentų rezultatai leidžia patvirtinti, kad grūdų stambumas ir užterštumas turi įtakos CO₂ išsiskyrimui, kuris vyksta ne tik pradiniais, bet ir tolesniais (po 48 val.) grūdų laikymo etapais.

CO₂ dujų susidarymo grūdų laikymo metu kinetikos tyrimai, atlikti modeliuojant įvairias technologines grūdų laikymo sąlygas, leido patvirtinti, kad fiksuojant CO₂ koncentraciją galima gauti objektyvią informaciją apie žaliavos užterštumą. Pažymėtina, kad CO₂ matavimai suteikia dvejopą informaciją apie grūdus: leidžia įvertinti pradinę grūdų būklę ir mikrobiologinio užterštumo pokyčius laikymo metu.

Tyrimai parodė, kad, esant didesniai laikomų grūdų stambumui ir drėgniui, išsiskiria daugiau CO₂ dujų (3.8 pav.). Taip pat nustatyta, kad grūdų pažeidimas, didėjant laikomų grūdų drėgniui, turėjo įtakos grūduose susidariusiam CO₂ kiekiui padidėjimui, o tai leidžia patvirtinti prielaidą, jog mikroskopinių grybų pažeistuose grūduose suintensyvėja mikroorganizmų veikla ir galima spręsti apie prasidedantį grūdinės žaliavos gedimą (3.9 pav.). Žinant šias tendencijas, galima teikti rekomendacijų ir imtis technologinių veiksnių grūdų saugai užtikrinti, pvz., papildomai džiovinti grūdų masę ar iš jų valyti priemaišas.

Tarptautinėje praktikoje taikomas CO₂ daviklių išdėstymas talpyklos viršuje yra efektyvus tik grūdus laikant sandėliuose su aktyviosios ventiliacijos sistema. Tačiau neventiliuojamose talpyklose dėl CO₂ migracijos grūduose ypatumų sudėtinga tiksliai nustatyti CO₂ koncentraciją laikomoje grūdų masėje. Tiksliesni rezultatai galėtų būti gauti montuojant CO₂ daviklius įvairiuose grūdų sluoksniuose (viduriniuose ir apatiniuose). Kreivių pobūdis viršutiniuose taškuose (3.8 pav., 8–20 val. ir 3.9 pav. 4–12 val.) rodo, kad tyrimams reikia turėti platesnio diapazono daviklius (didesnius nei 1 %), nes eksperimentui naudoti davikliai neleido išmatuoti didžiausio išsiskyrusio CO₂ kiekio didesnio užterštumo ir drėgnio grūduose.

3.4. Ozono panaudojimas *Fusarium* spp. užterštiems kviečių grūdams detoksikuoti

Jau seniai žinoma, kad ozono panaudojimas grūdinės žaliavos saugai užtikrinti

yra labai perspektyvus norint apsaugoti grūdus nuo ligų ir kenkėjų. Ozonas (O₃), kaip labai stiprus oksidatorius, efektyviai žudo vabzdžius, sumažina mikotoksinų kiekį grūdiniėje žaliavoje ir naikina įvairius mikroorganizmus beveik nedarydamas jokio neigiamo poveikio grūdų kokybei. Tyrimai parodė, kad ozonas turi pranašumą apdorojant grūdus, nes, skirtingai nuo kitų medžiagų (pesticidų), naudojamų grūdams apdoroti, nepalieka jokių cheminių junginių ir nemalonių kvapų.

Vis dėlto ozonavimas yra neišbaigta technologija kviečių grūdų saugai užtikrinti. Nėra tiksliai žinoma, koks ozono detoksikuojamasis poveikis įvairiems *Fusarium* spp. grybų gaminamiems mikotoksinams. Norint sudaryti grūdinės žaliavos apdorojimo ozonu technologiją, reikia atlikti išsamesnius tyrimus ir sužinoti optimalias grūdų ozonavimo sąlygas (ozono koncentracija, poveikio trukmė), kurios leistų maksimaliai sumažinti mikotoksinų koncentraciją kviečių grūduose.

3.4.1. Ozono panaudojimas *Fusarium* spp. mikotoksinų koncentracijai kviečių grūduose sumažinti

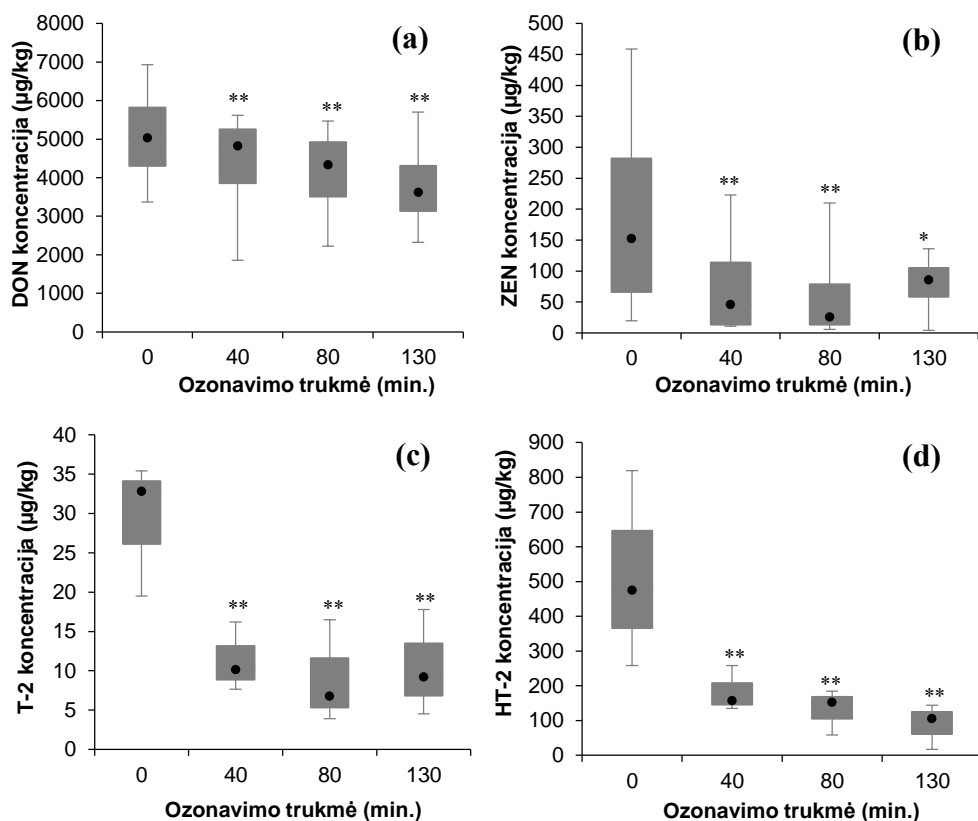
Tiriant ozono panaudojimo *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų detoksikacijai galimybes, grūduose nustatyta mikotoksinų DON, ZEN, T-2 ir HT-2 koncentracija. Tyrimo rezultatai apdoroti aprašomosios statistikos metodu ir pateikti stačiakampių diagramų (*boxplot*) tarpkvartilinio metodo pavidalu (3.11 pav.). Iš jų galima spręsti apie bendrą matuojamo mikotoksino imties centro, išsibarstymo ir maksimaliosios bei minimaliosios verčių vaizdą. Pažymėtina, kad, taikant tarpkvartilinį duomenų analizės metodą, nėra aktualūs viršutiniai ir apatiniai 25 % duomenų kvartiliai, dėmesys kreipiamas tik į centrinius 50 % duomenų kvartilius (medianą) siekiant sumažinti ekstremalių verčių įtaką tyrimų rezultatams.

Atliekant tyrimus fuzariozės pažeistų kviečių grūdų ozonavimo trukmės pailginimas nuo 0 iki 130 min. leido DON koncentraciją kviečių grūduose, palyginti su pradine žaliava, sumažinti atitinkamai 15,9 %, 19,6 % ir 25,0 % ($p \leq 0,01$) (3.11 pav., a). Galima teigti, kad ilgėjanti ozonavimo trukmė turėjo teigiamos įtakos DON koncentracijos sumažėjimui.

Ozonavimo trukmės pailginimas sumažino ir ZEN koncentraciją apdorojamuose grūduose – atitinkamai 58,7 %, 55,9 % ($p \leq 0,01$) ir 48,7 % ($p \leq 0,05$) (3.11 pav., b). Tačiau iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausias ZEN koncentracijos sumažėjimas, palyginti su kontroliniu variantu, gaunamas ozonuojuant grūdus 40 min., vėliau ozonavimo poveikis silpnėja.

Analizuojant mikotoksino T-2 koncentracijos pokyčius grūdų ozonavimo metu, pastebėta panaši tendencija. Apdorojimo trukmei didėjant nuo 40 iki 80 min., mikotoksino T-2 koncentracija, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo atitinkamai nuo 62,07 ($p \leq 0,01$) iki 68,9 % ($p \leq 0,01$), tačiau, paveikus grūdus 130 min., teigiamas poveikis sumažėjo 65 % ($p \leq 0,01$) (3.11 pav., c).

HT-2 mikotoksino koncentracijos pokyčiai grūdų ozonavimo metu buvo panašūs į mikotoksino DON kiekio pokyčius, t. y. kviečių grūdų apdorojimo ozonu trukmei ilgėjant nuo 40 min. iki 130 min. HT-2 koncentracija grūduose, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo nuo 64,6 iki 82,8 % ($p \leq 0,01$).

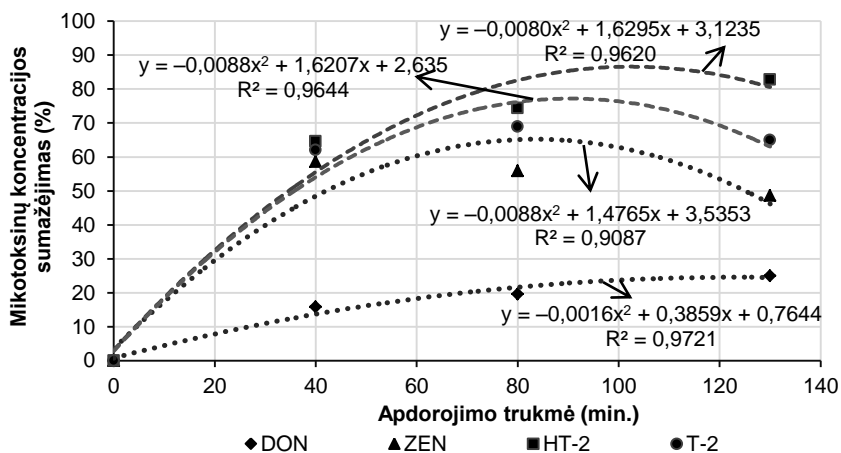


3.11 pav. Ozonavimo trukmės įtaka DON (a), ZEN (b), T-2 (c) ir HT-2 (d) mikotoksinių sumažėjimui silykliniuose kviečių grūduose (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Teigiami ozono poveikio mikotoksinių detoksikacijai tyrimo rezultatai sutampa su kitų tyrėjų rezultatais. Li ir kt. [240] nustatė, kad mikotoksino DON kiekis kviečiuose sumažėja vidutiniškai 24–26 %, kai pažeisti kviečių grūdai 12 val. veikiami 60 mg/l koncentracijos ozonu. Chao Sun (2016) [194] tyrimais taip pat nustatė, kad, pažeistus kviečius 10 min. veikiant 80 mg/l ozonu, DON koncentracija sumažėja iki 74,86 %.

Įvertinus visus gautus rezultatus, galima teigti, kad vidutiniškai geriausiu detoksikuojamuoju poveikiu pasižymėjo 130 min. trukmės pažeistų kviečių apdorojimas ozonu. Mikotoksinių DON, ZEN, T-2 ir HT-2 koncentracija, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo atitinkamai 25 %, 48,7 %, 65 % ir 82,8 % ($p \leq 0,01$).

Norint geriau įvertinti ozonavimo trukmės įtaką mikotoksinių detoksikacijai kviečių grūduose, sudarytas polinominis grafikas (3.12 pav.), vaizduojantis mikotoksinių mažėjimo keičiantis kviečių grūdų apdorojimo ozonu trukmei dėsningumus. Nustatytos tvirtos priklausomybės ($R^2 = 0,972; 0,909; 0,964; 0,962$) tarp grūdų ozonavimo trukmės ir detoksikuojamojo ozono poveikio grūduose esantiems mikotoksiniams (DON, ZEN, T-2 ir HT-2).



3.12 pav. Mikotoksinių kiekio (%) *Fusarium* spp. pažeistuose kviečių grūduose sumažėjimo priklausomumas nuo apdoravimo trukmės. Ozono koncentracija 20 mg/l

Tyrimo duomenimis, visų *Fusarium* genties mikroskopinių grybų gaminamų mikotoksinių koncentracija ozonavimo metu sumažėjo, tačiau nevienodai. Didžiausias grūdinės žaliavos detoksikavimo efektas, priklausomai nuo mikotoksino ir jo koncentracijos, pasiektas po skirtingos ozonavimo trukmės (3.12 pav.). Iš paveikslėlio matyti, kad didžiausias mikotoksino DON koncentracijos mažėjimas stebimas viso ozonavimo metu ir maksimalią reikšmę pasiekia po 130 min. O kitų mikotoksinių didžiausias koncentracijos mažėjimas stebimas iki 80 min.

Ozonavimas ne tik sumažina *Fusarium* spp. mikotoksinių koncentraciją grūduose, bet ir padeda išvengti jų sukėlėjų – mikroskopinių grybų [171]. Ozonavimo poveikis grūdų cheminėms ir biocheminėms savybėms buvo tirtas kitų mokslininkų. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad naudojant mikotoksiniams nukenksminti pakankamą ozono kiekį galima paveikti įvairias kokybines grūdų savybes. Panaudojus didelę ozono koncentraciją, gali pakisti grūdų spalva ar atsirasti nepageidaujamas kvapas. Mendezas ir kt. [241] pastebėjo, kad ozonuotų (50 ppm, 30 d.) ryžių lukštai pakeitė spalvą ir įgavo kontroliniams bandiniams nebūdingą acto kvapą. Tačiau tiek rūgštus kvapas, tiek parudavimas buvo pašalinti ryžius malant. Teigiama, kad ozonas keičia aminorūgščių ir riebalų rūgščių struktūrą vandeniniuose tirpaluose [242] oksiduodamas sulfhidrilines grupes (–SH) aminorūgštyse ir polinesočiąsias riebalų rūgštis į peroksidus [243], taip mažindamas grūdų maistinę vertę. Tačiau Mendezas ir kt. [241] neaptiko jokių reikšmingų pokyčių ozonuotų kviečių, sojų ar kukurūzų aminorūgščių ir riebalų rūgščių struktūroje. Tai rodo, kad ozono prasiskverbimas į grūdą mažai tikėtinas. Visa tai leidžia manyti, kad ozonavimas yra veiksminga priemonė mikotoksinių kiekiui *Fusarium* spp. pažeistuose kviečių grūduose sumažinti, kuri leistų užtikrinti saugomų kviečių grūdų saugą.

3.5. Biopriemonių panaudojimas grūdų mikrobiologinei taršai mažinti ir fermentacijos procesui užtikrinti

Norint užtikrinti laikomų grūdų kokybę ir saugą, būtina kontroliuoti visą grūdų gamybos ir perdirbimo grandinę. Ypač daug dėmesio skiriama teršalams – mikotoksinams, susidarantiems grūdų auginimo ir laikymo metu. Jiems iš grūdinės žaliavos pašalinti yra pasiūlyta daug įvairių metodų, tačiau pastaruoju metu vis plačiau taikoma biologinė detoksikacija. Šios detoksikacijos esmė yra bakteriocinus gaminančių antimikrobinių mikroorganizmų (PRB), išskirtų iš ruginių raugų [191], panaudojimas mikotoksinams biologiškai izoliuoti (surišti), slopinti ar transformuoti į netoksiškus arba ne tokius toksiškus junginius [244].

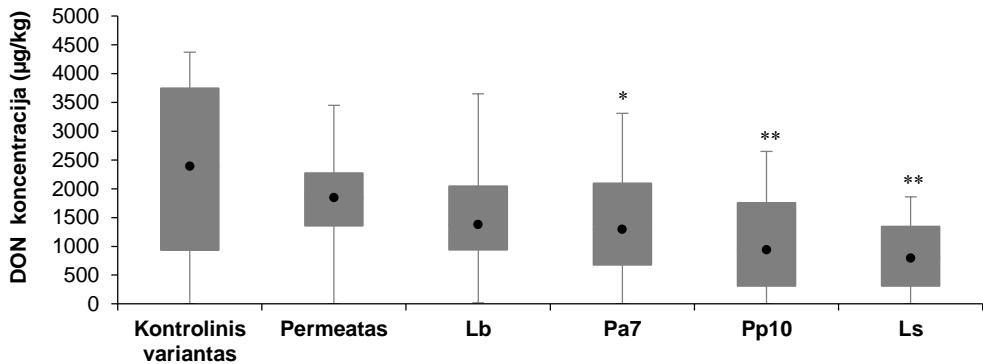
Fermentacijos proceso efektyvumą galima padidinti parenkant specifinius PRB ir mielių rūšių derinius [245], ne tik lemiančius etanolio išėigos padidėjimą, bet ir turinčius įtakos žlaugtų detoksikacijai [246].

Norint, jog PRB bioproduktai būtų panaudoti pramonėje, labai svarbu, kad jų gamyba būtų ekonomiška. Tam užtikrinti būtina ieškoti naujų PRB kultivavimo terpių. Vienas iš galimų variantų galėtų būti sūrių išrūgų permeatas, išgaunamas kaip šalutinis produktas sūrių gamybos metu [192]. Ši terpė, manoma, leistų gerokai sumažinti PRB bioprodukto gamybos savikainą, taip pat užtikrintų, kad PRB metabolitai, susidarę kultivuojant jas šioje mitybinėje terpėje, turėtų teigiamos įtakos slyklo gamybos efektyvinimui ir mikotoksinų koncentracijos perdirbamoje slyklinėje žaliavoje sumažinimui. Todėl, norint PRB bioproduktus naudoti praktikoje, aktualu žinoti PRB detoksikacijos mechanizmą ir jo valdymo slyklo gamybos ir alkoholinės fermentacijos procese galimybes.

3.5.1. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų panaudojimas deoksinivalenolio koncentracijai kviečių grūduose sumažinti

Tiriant PRB bioproduktų panaudojimo *Fusarium* spp. pažeistų kviečių grūdų detoksikacijai galimybes, buvo įvertinti DON koncentracijos apdorotuose grūduose pokyčiai. Tyrimas parodė, kad fuzariozės pažeistų kviečių grūdų apdorėjimas įvairiais PRB bioproduktais, fermentuotais sūrių išrūgų permeato terpėje, DON koncentraciją grūduose, palyginti su pradine žaliava, leido sumažinti nuo 16,59 iki 66,86 % (3.13 pav.). Didžiausias detoksikuojamasis poveikis DON nustatytas *Fusarium* spp. pažeistą grūdinę žaliavą apdorojus bioproduktais, fermentuotais Ls (57,47–66,86 %, $p \leq 0,01$) ir Pp10 (39,46–66,21 %, $p \leq 0,01$). Kitų tirtų PRB rūšių – Pa7 (24,30–52,35 %, $p \leq 0,05$) ir Lb (16,59–64,74 %) – įtaka DON koncentracijai kviečių grūduose buvo mažesnė. Kviečių grūdus apdorojus nefermentuotu permeatu, taip pat pastebėtas DON koncentracijos sumažėjimas nuo 21,14 iki 46,94 %.

Tyrimas parodė teigiamą PRB bioproduktų, fermentuotų sūrių išrūgų permeato mitybinėje terpėje, įtaką pažeistų kviečių grūdų DON detoksikacijai. Šie rezultatai sutampa su kitų tyrėjų darbuose pateikiamais tyrimų rezultatais [143]. Šio poveikio priežastingumas moksliniuose šaltiniuose aiškinamas įvairiai. Manoma, kad PRB geba sujungti mikotoksinus ir (ar) slopinti jų biosintezės procesus sumažindamos jų koncentraciją [94, 119].



3.13 pav. Apdorojimo PRB bioproduktais įtaka DON koncentracijai salykliniuose kviečių grūduose (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Tyrimas parodė skirtingą PRB padermių įtaką DON koncentracijos grūduose mažinimui. Šie rezultatai sutampa su kitų mokslininkų išvadomis [247]. Tyrimas taip pat parodė, kad PRB įtaka mikotoksinų (DON) detoksikacijai labai priklauso ir nuo mikotoksinų koncentracijos lygio grūdininėje žaliavoje.

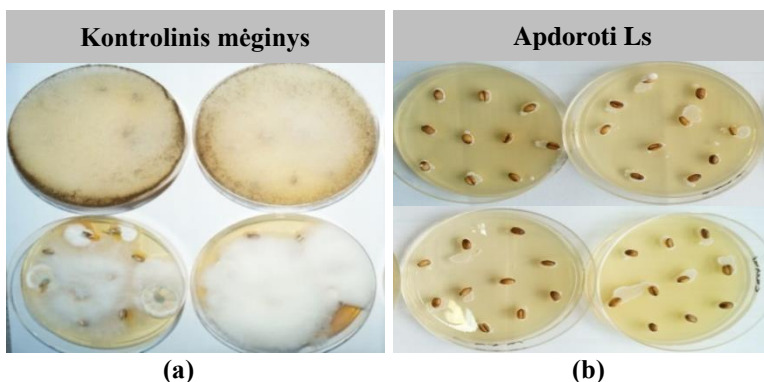
Teigiami pažeistų kviečių grūdų apdorojimo PRB bioproduktais tyrimo rezultatai suteikia daugiau žinių apie potencialių biotechnologinių priemonių panaudojimą mikotoksinų kiekiui salykliniuose grūduose sumažinti.

3.5.2. Pieno rūgšties bakterijų metabolitų antigrybelinis poveikis

Tolesniame darbo etape vertinta PRB bioproduktų, fermentuotų (24 val.) permeato fermentacijos terpėje, antigrybelinis poveikis kviečių grūdams, užterštiems *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais. Apie PRB bioproduktų antigrybelinį aktyvumą buvo sprendžiama pagal sveikų grūdų kiekį PRB bioproduktais neapdorotuose grūduose ir po apdorojimo jais (išreiškiant procentais).

Kviečių grūdus apdorojus PRB bioproduktais (3.14 pav., su Ls), visais atvejais padidėjo grūdų atsparumas mikroskopinių grybų augimui. Nustatyta, kad PRB bioproduktai pasižymėjo skirtingu antigrybeliniu poveikiu (3.6 lent.). Didžiausiu antigrybeliniu poveikiu pasižymėjo bioproduktai, fermentuoti su Lb (95 %), Ls (93,3 %) ir Pa7 (91,5 %), o mažiausiu – *P. pentosaceus* (Pp8, Pp9 ir Pp10) padermių bioproduktai (87,5; 88 ir 88,3 %). Kviečių grūdus apdorojus tik pastერიzuota permeato terpe, antigrybelinis poveikis siekė 45 % ir buvo 23 % didesnis, palyginti su kontroliniu variantu (grūdais, apdorotais distiliuotu vandeniu).

Manoma, kad antigrybeliniu poveikiu pasižymi bioproduktų fermentacijos metu susidarę įvairūs PRB metabolizmo produktai: organinės rūgštys (pieno ir acto), anglies dioksidas (CO₂), vandenilio peroksidas ir diacetilas, fenoliniai junginiai, benzenkarboksirūgštis. Taip pat atkreiptinas dėmesys į mažos molekulinės masės baltyminius junginius – bakteriocinus ir į bakteriocinus panašias medžiagas (BLIS), kurios pasižymi antimikrobinu aktyvumu [73, 78]. Be to, pastaruojų metu didėja susidomėjimas pieno rūgštimi (natūraliu fungicidu) ir jos izomerų susidarymu, ypač L(+) izomeru, kuris yra nekenksmingas žmogaus organizmui.



3.14 pav. Ls bioproduktu apdorotų (b) ir neapdorotų (a) *Fusarium* spp. užterštų kviečių grūdų vaizdas Petri lėkštelėse inkubuojant 20 °C temperatūroje 7 paras

3.6 lentelė. Grūdų apdorojimo bioproduktais poveikis *Fusarium* spp. mikroskopiniams grybams

Grūdų mėginiai	Sveiki grūdai, %
Kontrolinis mėginys ¹	21,7±1,2
Permeatas	45,0±1,6**
Permeatas + Lb	95,0±1,4**
Permeatas + Ls	93,3±1,7**
Permeatas + Pa7	91,5±2,1**
Permeatas + Pp8	87,5±2,3**
Permeatas + Pp9	88,0±2,0**
Permeatas + Pp10	88,3±1,5**

¹Kontrolinis mėginys – grūdai, apdoroti distiliuotu vandeniu (H₂O)

** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 99 % tikimybės lygiui

Toliau įvertinta PRB padermės įtaka pieno rūgšties ir jos izomerų susidarymui. Bendras pieno rūgšties kiekis, taip pat L(+)- ir D(–)-pieno rūgšties izomerų kiekis bioprodukte iš permeato terpės pateikti 3.7 lentelėje.

Bioproduktų gamybai naudojant permeato terpę, daugiausia pieno rūgšties susidaro su Pa7 fermentuotame (48 val.) permeate (4,87 g/l) ir permeate, fermentuotame (24 val.) su Pp9 (2,343 g/l). Bendras susidariusios pieno rūgšties kiekis priklausė nuo bioproduktų gamybai naudojamos PRB padermės ir fermentacijos trukmės. Atliekant tyrimą pastebėta, kad didesni pieno rūgšties kiekiai beveik visais atvejais susidarė bioproduktuose, fermentuotuose 48 val. (3.7 lent.).

3.7 lentelė. L(+)- ir D(–)-pieno rūgšties kiekis bioproduktuose

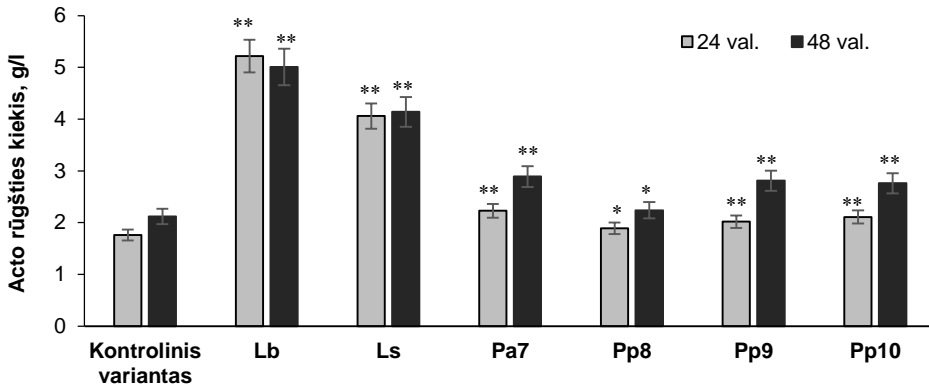
Fermentavimo trukmė, val.	PRB	L(+)-pieno rūgštis, g/l	D(–)-pieno rūgštis, g/l	Bendras pieno rūgšties kiekis, g/l
24	Lb	0,356±0,04	0,417±0,05	0,773±0,12
	Ls	0,505±0,06	0,417±0,05	0,922±0,14
	Pa7	0,646±0,08	0,449±0,05	1,095±0,16
	Pp8	0,388±0,05	0,384±0,05	0,772±0,12
	Pp9	0,517±0,06	1,826±0,22	2,343±0,35
	Pp10	1,648±0,20	0,545±0,07	2,193±0,33

3.7 lentelė (tęsinys). L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties kiekis bioproduktuose

Fermentavimo trukmė, val.	PRB	L(+)-pieno rūgštis, g/l	D(-)-pieno rūgštis, g/l	Bendras pieno rūgšties kiekis, g/l
48	Lb	0,000±0,00	1,697±0,20	1,697±0,20
	Ls	1,134±0,12	1,021±0,11	2,155±0,28
	Pa7	0,000±0,00	4,870±0,54	4,870±0,54
	Pp8	0,632±0,07	0,456±0,05	1,088±0,14
	Pp9	0,527±0,06	0,249±0,03	0,776±0,10
	Pp10	1,034±0,11	0,481±0,05	1,515±0,20
72	Lb	0,000±0,00	1,371±0,19	1,371±0,19
	Ls	0,924±0,13	0,633±0,09	1,557±0,23
	Pa7	0,646±0,09	0,000±0,00	0,646±0,09
	Pp8	0,737±0,10	0,233±0,03	0,970±0,15
	Pp9	0,420±0,06	0,000±0,00	0,420±0,06
	Pp10	0,485±0,07	0,449±0,06	0,934±0,14

L(+)-pieno rūgšties susidarymas labai priklausė nuo bioprodukto gamybai naudojamos PRB padermės ir fermentacijos trukmės. Fermentuojant bioproduktus 48 val., L(+)-pieno rūgšties susidarė nuo 52,6 iki 68,3 % bendro susidariusio pieno rūgšties kiekio, o, pailginus fermentacijos trukmę iki 72 val., L(+)-pieno rūgšties nustatyta nuo 51,9 iki 100 % bendro susidariusio pieno rūgšties kiekio. Nors fermentacijos trukmės ilginimas ir didino L(+)-pieno rūgšties izomero gamybą, tačiau absoliučiai didžiausi L(+)-pieno rūgšties izomero kiekiai susidarė 24 val. fermentuojant permeatą su Pp10 (1,648 g/l).

Acto rūgšties tyrimai. Be pagrindinio metabolizmo produkto (pieno rūgšties), PRB taip pat gamina acto rūgštį. Tolesniame darbo etape įvertinta PRB padermės įtaka acto rūgšties susidarymui bioproduktų gamybos metu po 24 ir 48 valandų. Bioproduktuose susidariusios acto rūgšties kiekiai pateikti 3.15 paveiksle.



3.15 pav. Acto rūgšties susidarymas skirtingomis PRB (Ls, Pa7, Pp8, Pp9, Pp10) ir Lb padermėmis 24 ir 48 val. fermentuotuose bioproduktuose, ruoštuose sūrių išrūgų permeate (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

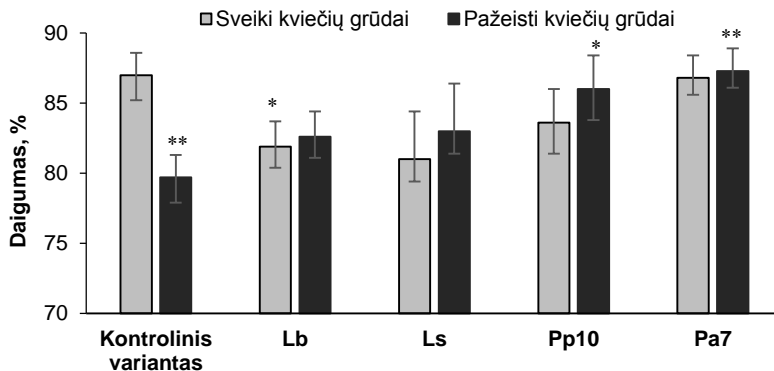
Permeato fermentacijos metu (iki 24 val.) daugiausia acto rūgšties susidarė naudojant Lb (5,22 g/l) ir Ls (4,06 g/l). Didėjant fermentacijos trukmei, acto rūgšties

susidarymas statistiškai reikšmingai ($p \geq 0,05$) nepakito ir daugiausia jos susidarė permeatą fermentuojant Lb (4,14 g/l) ir Ls (5,01 g/L) padermėmis. Pažymėtina, kad fermentacijos trukmės ilginimas statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,01$) didino acto rūgšties kiekį ir kituose bioproduktuose, fermentuotuose kitomis analizuotomis PRB padermėmis (Pa7, Pp8, Pp9, Pp10), kai naudojant Lb ir Ls susidaręs acto rūgšties kiekis išliko beveik nepakitęs.

Atlikus statistinę duomenų analizę, rasta tiesinė priklausomybė ($r = 0,832$, $p \leq 0,05$) tarp bioproduktuose susidariusio acto rūgšties kiekio ir jo antigrybelinio aktyvumo. Bendras susidariusio pieno rūgšties kiekio antigrybelinis aktyvumas nustatytas mažesnis ($r = 0,488$, $p \leq 0,05$), ryšio tarp atskirų pieno rūgšties izomerų (L(+) ir D(-)) ir antigrybelinio aktyvumo nenustatyta. Nors PRB bioproduktų gaminamų metabolitų veikimo pobūdis dar nėra gerai žinomas, tačiau manoma, kad organinės rūgštys geba lengvai įsiskverbti į patogeninius mikroorganizmus per išorines jų membranas ir jas destabilizuoti [73].

3.5.3. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų įtaka kviečių grūdų daigumui

PRB padermės įtaka sveikų (DON – $<101,8 \mu\text{g/kg}$) ir *Fusarium* spp. pažeistų (DON – $1800 \mu\text{g/kg}$) kviečių grūdų daigumui 30 min. grūdus apdorojus bioproduktais, 24 val. fermentuotais permeato mitybinėje terpėje. Kviečių grūdų daigumo tyrimo rezultatai pateikti 3.16 paveiksle.



3.16 pav. Sveikų (DON – $<101,8 \mu\text{g/kg}$) ir pažeistų (DON – $1800 \mu\text{g/kg}$) salyklinių kviečių grūdų, apdorotų PRB bioproduktais, daigumas po 3 dienų daiginimo (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Atliekant tyrimą nustatyta, kad užterštų kviečių grūdų daigumas, palyginti su sveikais grūdais, sumažėjo vidutiniškai 9 % ($p \leq 0,01$). Taip pat nustatyta, kad sveikų kviečių grūdų apdorojimas bioproduktais, fermentuotais su Ls, Pp10 ir Pa7 padermėmis, neturėjo statistiškai reikšmingos ($p \geq 0,05$) neigiamos įtakos grūdų daigumui, nors sveikų grūdų daigumas, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo atitinkamai 6,9 %, 3,9 % ir 0,2 %. Sveikus kviečių grūdus apdorojus bioproduktu, fermentuotu su Lb paderme, nustatyta statistiškai reikšminga neigiama įtaka grūdų daigumui: sveikų grūdų daigumas, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo 5,9 % ($p \leq 0,05$).

Pažeistų kviečių grūdų apdorojimas bioproduktais turėjo teigiamą įtaką grūdų daigumui: daigumas visais apdorojimo su Lb, Ls, Pp10, Pa7 padermėmis atvejais, palyginti su kontroliniu variantu, padidėjo atitinkamai 3,6 %, 4,1 %, 7,9 % ($p \leq 0,05$) ir 9,5 % ($p \leq 0,05$). Verta pažymėti, kad PRB bioproduktuose, fermentuotuose (24 val.) su Pa7 ir Pp10, nustatyti didžiausi susidarę pieno rūgšties kiekiai (3.7 lent.) ir mažiausi susidarę acto rūgšties kiekiai (3.15 pav.), kurie neturėjo reikšmingos įtakos sveikų grūdų daigumo sumažėjimui, tačiau pažeistų grūdų daigumas, palyginti su kontroliniu variantu, po apdorojimo bioproduktais padidėjo vidutiniškai 7,5 %.

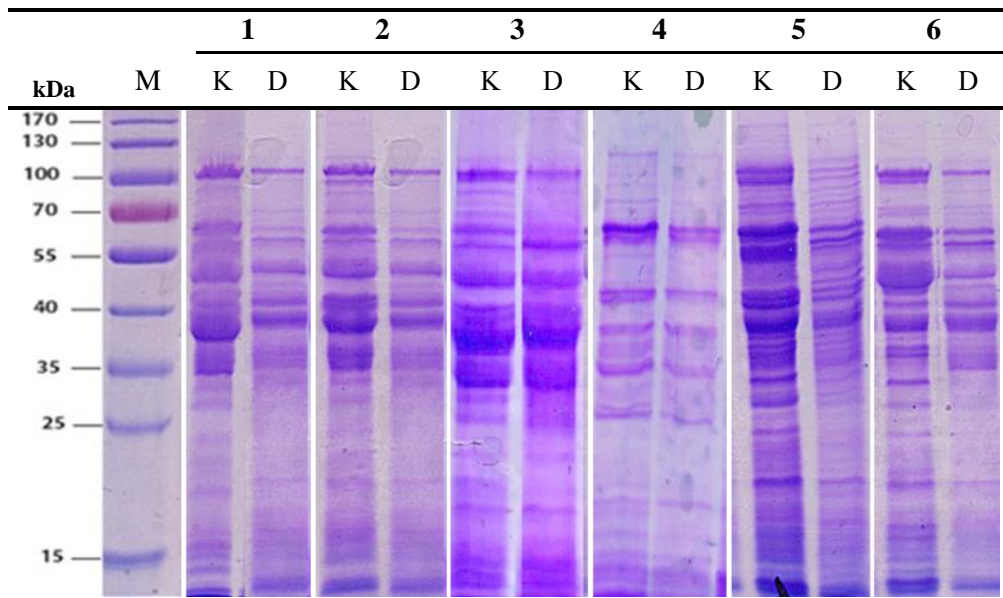
3.5.4. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų įtaka salyklinių grūdų baltyminių medžiagų kiekybinei sudėčiai grūdų dygimo metu

Pasaulyje molekuliniai žymenys plačiai naudojami sprendžiant įvairias augalų selekcijos ir dauginimo problemas. Dauguma augalų yra nuolatos veikiami tam tikrų abiotinį stresą sukeliančių veiksnių (pvz., druskingumo, sausros, temperatūros pokyčių, vandens trūkumo). Šie veiksniai sukelia genų raiškos pakitimus, kurie lemia specifinių baltymų kaupimąsi ląstelėje [248]. Šie baltymų kiekybiniai skirtumai leidžia nustatyti aplinkos poveikiui atsparias augalų rūšis.

Tai ypač aktualu nagrinėjant apdorojimo bioproduktais poveikį *Fusarium* spp. pažeistai salyklinei grūdinei žaliavai. Javų grūdų baltymų kiekybinės analizės tikslas – nustatyti ir atrinkti geriausius baltymų ekstrakcijos iš salyklinės grūdinės žaliavos metodus ir įvertinti PRB bioproduktų įtaką baltyminių medžiagų pokyčiams salyklinių grūdų dygimo metu.

Baltymų ekstrakcijos metodai. Šiame tyrimo etape ieškota geriausios baltymų išskyrimo iš salyklinių grūdų (miežių) metodikos. Žinoma, kad salykliniai grūdai neturi daug baltymų, o baltymų ekstrakciją labai apsunkina kiti grūdo struktūros komponentai, pvz., krakmolai ar lipidai. Todėl baltymų ekstrakcija yra kritinis veiksnys, nuo kurio priklauso baltymų kiekybinių pokyčių įvertinimas. Tyrimo metu susidurta su baltymų išskyrimo iš grūdinės žaliavos problemomis (pvz., vienos grūdų baltymų frakcijos geriau tirpsta vienuose ekstrakcijos tirpikliuose, kitos – kituose). Todėl buvo bandoma rasti tokį baltymų išskyrimo metodą, kuris būtų greitas, nereikalautų didelių pakeitimų (ekstrakto gryninimo), būtų priimtinas kituose eksperimento etapuose, t. y. ekstrakcijos tirpiklio komponentai neturėtų įtakos kitiems eksperimento etapams: baltymų koncentracijos nustatymui, 1D PAGE, 2D DIGE elektroforezei poliakrilamidiniame gelyje (SDS-PAGE); taip pat baltymų ekstraktas turėtų turėti priimtinas fizikines savybes (mažą klampą) ir būti gausus baltymų bei įvairių jų frakcijų.

Pradiniame šio eksperimento etape atlikta baltymų ekstrakcija standartinėmis baltymų išskyrimo iš augalinės žaliavos (tabako augalų) metodikomis (2.5 lent., Nr. 1–3). Tačiau taikant jau esamas metodikas susidurta su nepageidaujama baltymų ekstrakto fizikine savybe – didele baltymų ekstrakto klampa, dėl kurios buvo sunku analizuoti tiriamuosius mėginius (3.17 pav. Nr. 1–3).

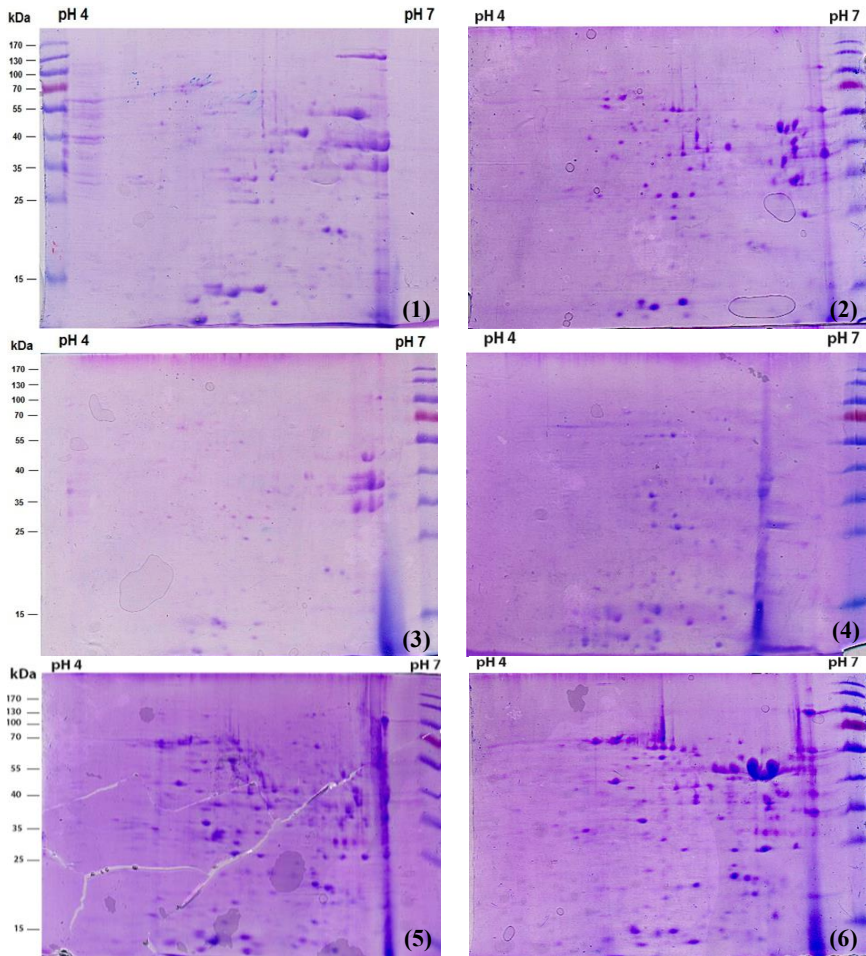


3.17 pav. Sveikų salyklinių vasarinių miežių grūdų ('Propino') baltymų frakcijų sudėties pokyčiai (1D-PAGE vienkryptėje elektroforezėje) prieš grūdų daiginimą (*K*) ir po grūdų daiginimo (*D*) taikant skirtingus baltymų ekstrakcijos metodus: *M* – molekulinės masės žymuo; *1* – IPG buferis (viršutinis grūdų baltymų centrifugato sluoksnis); *2* – IPG buferis (apatinis grūdų baltymų centrifugato sluoksnis); *3* – baltymų nusodinimas acetonu + IPG buferis; *4* – triso buferis; *5* – karbamido buferis; *6* – baltymų nusodinimas acetonu + karbamido buferis

Siekiant išspręsti šią problemą, teko ieškoti naujų baltymų ekstrakcijos metodų. Išbandytos įvairios baltymų ekstrakto gryninimo metodikos su pakeitimais (dializė, fermentų deoksiribonukleazių (DNR-azių) panaudojimas, baltymų nusodinimas acetonu), tačiau visiškai išspręsti klamos problemos nepavyko. Todėl išbandytos kitos grūdų baltymų ekstrakcijos metodikos su pakeitimais (2.5 lent., Nr. 4–6). Išbandyti metodai padėjo pašalinti baltymų ekstrakto klampą, tačiau taip pat sumažėjo išskiriamų baltymų koncentracija bei jų frakcijos (3.17 pav., Nr. 4).

Atlikus tyrimus, rastas greitas, didelių pakeitimų nereikalaujantis baltymų išskyrimo metodas, leidžiantis gauti pageidaujama fizikinių savybių ir daug baltymų bei įvairių jų frakcijų turintį baltymų ekstraktą (2.5 lent., Nr. 5). 1D PAGE elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje nuotraukoje (3.17 pav. Nr. 5) matyti, kad iš miežių grūdų išskirti baltymai pasižymėjo įvairiomis jų frakcijomis, tai leido šį baltymų ekstrakcijos metodą su pakeitimais (sumažintu DTT kiekiu, dėl įtakos fluorescencinio žymėjimo metodui 2D DIGE) taikyti kituose eksperimento etapuose.

Skirtingais baltymų išskyrimo metodais (2.5 lent.) gautų baltymų ekstraktų palyginamosios analizės 2D PAGE elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje (3.18 pav.) rezultatai atitiko 1D PAGE vienkryptės elektroforezės rezultatus (3.17 pav.).



3.18 pav. Sveikų salyklinių vasarinių miežių grūdų („Propino“) baltymų frakcijų sudėties pokyčiai (2D-PAGE dvikryptėje elektroforezėje, pH 4–7) taikant skirtingus baltymų ekstrahavimo metodus: *M* – molekulinės masės žymuo; *I* – IPG buferis (viršutinis grūdų baltymų centrifugato sluoksnis); 2 – IPG buferis (apatinis grūdų baltymų centrifugato sluoksnis); 3 – baltymų nusodinimas acetonu + IPG buferis; 4 – triso buferis; 5 – karbamido buferis; 6 – baltymų nusodinimas acetonu + karbamido buferis

Iš 2D-PAGE elektroforezės nuotraukų (3.18 pav.) matyti, kad taikant baltymų išskyrimo metodiką (2.5 lent., Nr. 5) išskirti baltymai turėjo daugiausia įvairių jų frakcijų, palyginti su kitais metodais išskirtais baltymais. Tai leido šį baltymų ekstrahavimo metodą taikyti kituose eksperimento etapuose.

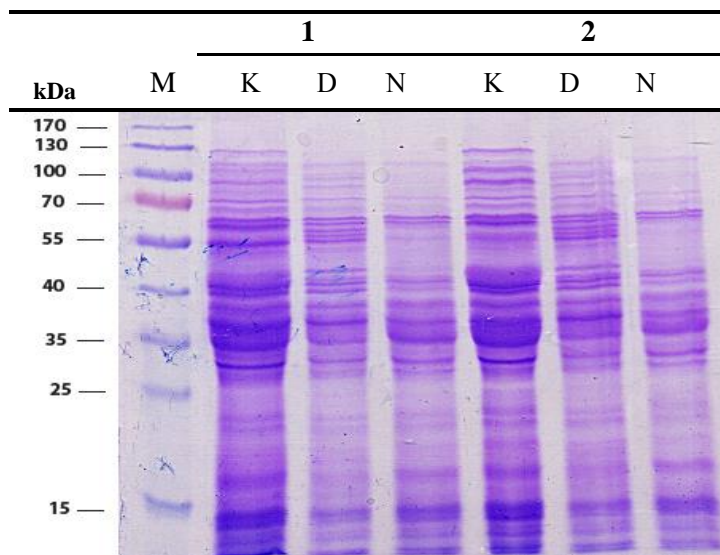
Kviečių grūdų apdoravimo PRB įtaka baltymų frakcijų pokyčiams sėklos dygimo metu. Atliekant pirminius salyklinių grūdų apdoravimo PRB bioproduktais tyrimus, pastebėta, kad toks apdoravimas turi neigiamos įtakos salyklinių miežių grūdų daigumui, nes miežių grūdai jautresni apdoravimui PRB bioproduktais nei kviečių grūdai. Tolesniuose tyrimų etapuose nuspręsta vykdyti apdoravimo PRB bioproduktais tyrimus tik su kviečių grūdais, nes jie atsparesni PRB bioproduktų poveikiui (3.16 pav.). Pagrindiniams proteomikos tyrimams nuspręsta pasirinkti

vieną užterštą (mikotoksinu DON – 1600 µg/kg; Europos Tarybos nustatyta maksimali leidžiama mikotoksino DON koncentracija grūduose – 1250 µg/kg) kviečių genotipą ir vertinti, kokią įtaką apdorojimas PRB bioproduktais turi grūdo baltymų frakcijų pokyčiams grūdų daiginimo metu. PRB bioproduktas ruoštas fermentuojant permeatą su *Ls* paderme. Tyrimo metu įvertinti kviečių, apdorotų PRB bioproduktu, baltymų frakcijų pokyčiai grūdų dygimo metu. Taip pat įvertinti po kviečių grūdų daiginimo proceso susidariusių nesudygusių grūdų (apie 10 %) baltymų frakcijų pokyčiai. Pasirenkant šiuos tyrimo objektus, užterštus kviečius ir apdorojimą *Ls* fermentuotu bioproduktu, buvo tikimasi, kad grūdų apdorojimas PRB bioproduktais galėtų sumažinti kviečių užterštumą mikotoksinais. Taip pat tikėtasi, kad šis apdorojimas turėtų teigiamos įtakos savyklų kokybinėms savybėms (daigumui) ir sumažintų mikotoksinų (pvz., DON) koncentraciją pažeistoje grūdinėje žaliavoje.

Prieš pagrindinį pažeistų kviečių grūdų proteomikos (2D DIGE) tyrimą buvo atliktas paruošiamasis tyrimas siekiant išsiaiškinti, ar visa baltymų proteomikos pokyčių nustatymo sistema (2D DIGE) veikia: ar atsikartoja mėginių biologinės kopijos, ar yra pastebimų baltymų skirtumų tarp sudygusių ir nesudygusių grūdų, ar yra skirtumų tarp sudygusių ir po apdoravimo PRB bioproduktu sudygusių grūdų baltymų frakcijų. Gauti nevienareikšmiai rezultatai, rodantys, kad biologinės kopijos (2D DIGE) paruošiamojo tyrimo metu atsikartojo, tačiau, atliekant pagrindinius proteomikos tyrimus, biologinės kopijos neatsikartojo. Įvertinus tai, buvo nuspręsta atlikti tik pirminį grūdų apdoravimo PRB bioproduktais įvertinimą 1D PAGE vienkryptėje elektroforezėje.

Tyrimai parodė, kad reikšmingų skirtumų tarp neapdorotų (3.19 pav., 1 – *K*, *D*, *N*) salyklinių kviečių ir PRB bioproduktu apdorotų (3.19 pav., 2 – *K*, *D*, *N*) grūdų baltymų frakcijų pokyčių nėra. Tai aiškinama tuo, kad PRB bioproduktai, nors ir gamina įvairias organines rūgštis ir kitus metabolizmo produktus, kurie turėtų sužadinti įvairius grūdo apsauginius baltymines frakcijas pokyčius, tačiau kviečiuose po apdoravimo PRB bioproduktu pokyčių nenustatyta dėl galbūt tyrimams pasirinkto atsparaus kviečių grūdų genotipo. Kadangi kviečių grūdų apdorojimas PRB bioproduktu neturėjo neigiamos įtakos kviečių baltymų frakcijų pokyčiams, todėl apdoroti kviečių grūdus PRB bioproduktu tikslinga jų sveikumui didinti.

Vertinant kviečių grūdų daiginimo metu vykstančius baltymų frakcijų pokyčius, nustatyta, kad grūdų daiginimo metu baltymų frakcijų sumažėja. Iš 3.19 (1 – *K* ir *D*) paveikslo matyti, kad sudygusiuose kviečiuose (*D*), palyginti su kontroliniu variantu (*K*), sumažėjo 130 kD baltymų, taip pat 15–25 kD baltymų frakcijų. Tačiau taip pat pastebėta, kad po daiginimo sudygusių grūdų 55–60 kD ir 40–55 kD baltymų frakcijose baltymų padaugėjo. Šie pokyčiai aiškinami tuo, kad daiginimo metu grūduose suaktyvėja grūdų biocheminiai procesai. Manoma, kad daiginimo metu atsiradusius baltymų frakcijų pokyčius gali lemti įvairios grūdų proteazių rūšys (endopeptidazės, karboksipeptidazės), kurių aktyvumas daiginimo metu padidėja apie 20 kartų [249]. Proteazės suardo vienas peptidines baltymų grandines sudarydamos naujas baltymų frakcijas.



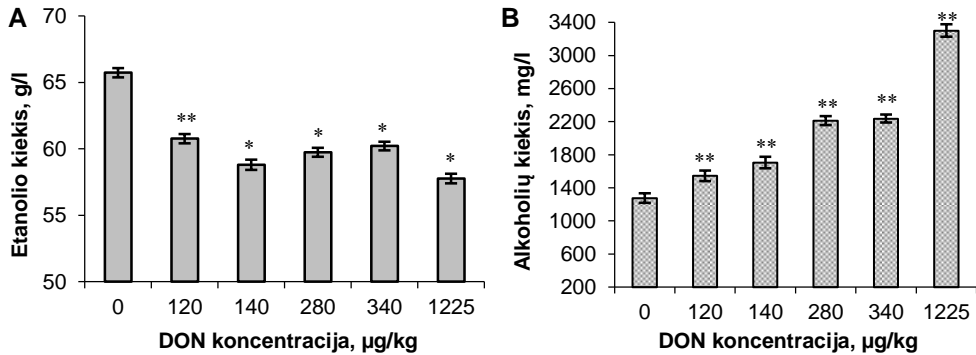
3.19 pav. Pažeistų salyklinių vasarinių kviečių grūdų (DON – 1600 µg/kg) prieš daiginimą (K), po daiginimo (3 d.) sudygusių grūdų (D) ir po daiginimo nesudygusių grūdų (N) baltymų frakcijų sudėtis (1D-PAGE vienkryptėje elektroforezėje): M – molekulinės masės žymuo; 1 – neapdoroti PRB bioproductu; 2 – apdoroti PRB bioproductu

Lyginant po daiginimo sudygusių (D) ir nesudygusių (N) grūdų baltymų frakcijų pokyčius (3.19 pav.), matyti, kad 40–130 kD baltymų frakcijų labai sumažėjo nesudygusių (N) grūdų baltymų frakcijose. Tai aiškinama tuo, kad šie nesudygę grūdai yra labiau pažeisti mikroskopinių grybų, todėl daiginimo metu buvo veikiami ne tik jau minėtų aktyvių proteazių, bet ir mikroskopinių grybų proteazių. Taip pat pastebėta, kad nesudygusiuose grūduose (N), palyginti su sudygusiais (D), padidėja 15–20 kD baltymų frakcija, kurios atsiradimas aiškinamas aktyvia peptidazių veikla.

Javų grūdų daiginimas yra sudėtingas biologinis procesas, apimantis įvairias biochemines ir fiziologines grūdo metabolizmo sistemas, kurios atsakingos už įvairių fermentų veiklą, lemiančias grūdų daigumą. Ankstesni moksliniai tyrimai parodė, kad padidėjusi tarša (DON) turėjo įtakos pažeistų grūdų fermentų aktyvumo padidėjimui [143]. Tai rodo, kad įvairių mikroskopinių grybų veikla sumažina pažeistų salyklinių grūdų daigumą. Tyrimais taip pat įrodyta, kad sūrių išrūgų permeato mitybinė terpė yra tinkama PRB bioproductų gamybai. Tyrimų metu susidarę antimikrobiniai aktyvumu pasižymintys fermentacijos metabolizmo junginiai (pieno, acto rūgštys ir kt.) stabdė patogeninių grybų vystymąsi ir taip padidino grūdų sveikumą ir daigumą.

3.5.5. *Fusarium* spp. mikotoksinų įtaka miežių grūdų fermentacijos procesui

Fusarium mikroskopinių grybų gaminamo DON įtaka miežių grūdų alkoholiniam fermentacijos procesui (bioetanolio koncentracijai, fuzelių susidarymui) įvertinta atliekant susidariusių pagrindinių produktų chromatografinę analizę. Tyrimų rezultatai pateikti 3.20 paveiksle.



3.20 pav. DON koncentracijos įtaka bioetanolio (A) ir aukštesnės eilės alkoholių (B), susidariusių fermentuojant *Fusarium* spp. užkrėstus miežius, kiekiui distilate (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Atliekant tyrimą nustatyta, kad *Fusarium* spp. pažeistų miežių fermentacija amilolitiniais fermentais (*Stargen*TM 002; 0,456 AV/kg) turėjo įtakos susidariusių fermentacijos produktų kiekiui. Iš 3.20 paveikslu matyti, kad analizuojant DON užterštus miežių grūdus gauta neigiama priklausomybė ($r = -0,575$, $p \leq 0,05$) tarp etanolio kiekio ir didėjančios DON koncentracijos (3.20 pav., a). DON koncentracijai fermentuojamuose miežių grūduose didėjant nuo 120 iki 1225 µg/kg, susidariusio bioetanolio kiekis sumažėjo atitinkamai nuo 7,5 iki 12,2 %, palyginti su nepažeistais grūdais (DON – 0 µg/kg). Taip pat pastebėta priklausomybė tarp DON koncentracijos tirtose grūdinėje žaliavoje ir susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekio (3.20 pav., b).

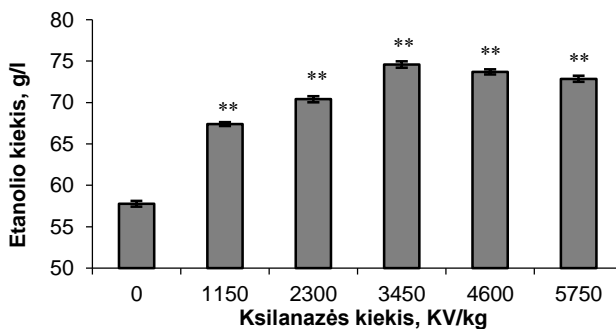
DON koncentracijai didėjant nuo 120 iki 1225 µg/kg, susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekis didėjo nuo 21 iki 158,43 %, palyginti su nepažeistų grūdų (DON – 0 µg/kg). Tyrimas parodė, kad, didėjant DON kiekiui mikotoksinais užterštoje biomasėje, reikšmingai didėja ($r = 0,958$, $p \leq 0,01$) fermentacijos metu susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekiai. Tačiau bioetanolio koncentracijos mažėjimas didesnio užkrėstumo miežių grūduose buvo neįrešmus. Fermentuojant sveiką (DON – 0 µg/kg) ir pažeistą (DON – 1225 µg/kg) miežių grūdinę biomasę, fermentacijos metu susidariusio bioetanolio išeiga siekė atitinkamai 79 % ir 71 % teoriškai nustatytos biomasės išeigos (0,461 g/g). Sumažėjusi bioetanolio išeiga aiškinama *Fusarium* spp. ir (ar) jų metabolitų įtaka mielių (*S. cerevisiae*) fermentacijos gebai. Šie rezultatai aiškinami įvairiai. Whiteheadas ir kt. [250] padarė prielaidą, kad trichotecenai slopina mielių mitochondrijų veiklos funkcijas, taip sukeldami deguonies pasisavinimo sutrikimus, dėl kurių sulėtėja jų augimo tempas. Taip pat manoma, kad *Fusarium* spp. pažeistoje grūdinėje žaliavoje vyksta įvairūs cheminiai pokyčiai, pvz., sacharidų ar kitų cheminių komponentų hidrolizė, kuri turi įtakos etanolio išeigos pokyčiams [218]. Tai, kad pažeistos grūdinės biomasės fermentacijos metu padidėja aukštesnės eilės alkoholių kiekis, dažniausiai aiškinama tuo, jog mikotoksinais veikia patį fermentacijos procesą, suintensyvindami šalutinių produktų susidarymą. Manoma, kad mikotoksinais geba paveikti dehidrogenazes, kurios dalyvauja šių produktų susidarymo procese. Gauti tyrimų duomenys atitinka Dziubos ir kt. [251] tyrimų rezultatus. Pasak tyrėjų, mikotoksinais turi įtakos mielių

fermentacijos gebai ir, priklausomai nuo pasirinktos ir naudojamos mielių rūšies, galima kontroliuoti fermentacijos procesą ir šalutinių fermentacijos produktų kiekį.

3.5.6. Fermentinių preparatų įtaka *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos procesui

Siekiant nustatyti fermentinių preparatų mišinio (amilolitinio ir ksilanolitinio) įtaką *Fusarium* spp. pažeistų miežių grūdų (DON – 1225 µg/kg) fermentacijos proceso efektyvumui, fermentacijos procese naudotas skirtingas ksilanazės, išskirtos iš *T. reesei* (*Ecopulp*), kiekis.

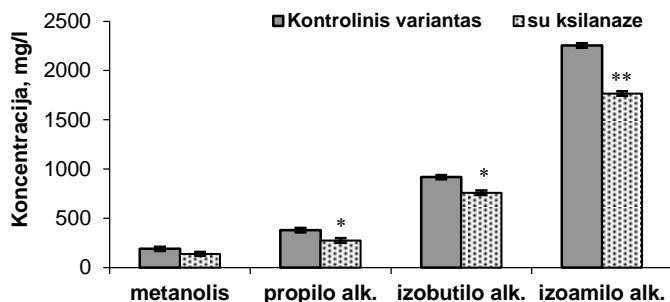
Iš 3.21 paveikslo matyti, kad fermentacijos metu (su *S. cerevisiae* mielėmis), ksilanazės kiekį didinant nuo 1150 iki 5750 KV/kg, vidutiniškai nuo 16,7 iki 29,2 % padidėjo susidariusio etanolio kiekis, palyginti su kontroliniu mėginiu (57,7 g/l), ruoštu be ksilanazės priedo (3.21 pav.).



3.21 pav. Skirtingo ksilanazės (*Ecopulp TX-200A*) kiekio įtaka *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų (DON koncentracija – 1225 µg/kg) fermentacijos *S. cerevisiae* mielėmis metu susidariusio etanolio kiekiui (** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 99 % tikimybės lygiui)

Tyrimo metu didžiausia etanolio koncentracija (74,6 g/l) gauta, kai miežių grūdų biomasė fermentuota su 3450 KV/kg ksilanazės. Tyrimas parodė, kad *Fusarium* spp. pažeistų miežių grūdų fermentacijos procesas labai priklauso nuo fermentacijos metu naudojamo ksilanazės kiekio. Manoma, kad fermentacijos terpėje esantys didesni ksilanazės kiekiai padidina joje tirpių medžiagų kiekį, kuris stabdo substrato hidrolizės procesus, kartu sumažindamas ir susidariusio etanolio koncentraciją. Ksilanazių selektyvų poveikį fermentacijos procesui nustatė ir kiti tyrėjai [252].

Atliekant tyrimą taip pat įvertinta fermentinių preparatų įtaka aukštesnės eilės alkoholių susidarymui (3.22 pav.). Nustatyta, kad ksilanazės priedas (3450 KV/kg) taip pat pagerino pažeistų miežių grūdų fermentacijos metu susidariusio bioetanolio kokybę, mažindamas susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekį distiliate vidutiniškai iki 23,9 %. Taip pat iki 26,3 % sumažėjo susidariusio metanolio koncentracija, palyginti su fermentacija be ksilanazės.



3.22 pav. Fermentinių preparatų įtaka *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų (DON koncentracija – 1225 µg/kg) fermentacijos *S. cerevisiae* mielėmis metu susidariusio metanolio ir aukštesnės eilės alkoholių kiekiui; čia kontrolinis variantas (tik amilazė (*Stargen*TM 002) ir su ksilanaze (amilazė (*Stargen*TM 002) + ksilanazė (*Ecopulp TX-200A*) 3450 KV/kg); (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Mokslininkų [253] tyrimai leido patvirtinti, kad vykdant alkoholinę pažeistos grūdinės žaliavos fermentaciją susidaro metanolis ir aukštesnės eilės alkoholinės fermentacijos produktai, kurių kiekis priklauso nuo fermentuojamos biomasės pažeistumo. Apibendrinant galima teigti, kad ksilanazė turėjo teigiamos įtakos fermentaciniam *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų hidrolizės procesams. Metanolio, izoamilo ir izobutilo alkoholių kiekio sumažėjimas fermentacijos, kuriai naudota ksilanazė iš *T. reesei*, metu įrodė, kad yra tikslinga *Fusarium* spp. pažeistos grūdinės biomasės fermentacijos procese naudoti fermentinius preparatus su ksilanazėmis.

Atskirų fermentacijos proceso etapų tyrimai leido patvirtinti, kad grūdinės žaliavos pažeistumas ir fermentacijai naudojami fermentiniai preparatai turi įtakos fermentacijos procesui (3.8 lent.).

3.8 lentelė. Fermentinių preparatų įtaka redukuojančių cukrų (g/100g), etanolio kiekiui ir išeigoms pažeistų miežių grūdų fermentacijos metu

Miežių mėg.	Sucukrinta masė			Raugalas			Etanolio išeiga ¹	
	Redukuojantys cukrūs			Redukuojantys cukrūs				
	Amilazės	Amilazės, ksilanazės	pH	Amilazės	Amilazės, ksilanazės	pH	Amilazės	Amilazės, ksilanazės
B-0	18,1±0,2 ^a	20,3±0,2 ^c	6,07	3,5±0,02 ^a	2,2±0,02 ^c	5,12	0,363 ^a	0,403 ^c
B-1225	16,4±0,1 ^b	19,6±0,2 ^d	7,01	4,2±0,02 ^b	2,6±0,02 ^d	3,88	0,328 ^b	0,381 ^d

¹Etanolio išeiga, g alkoholio/g cukrų

a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis, vieni nuo kitų statistiškai reikšmingai skiriasi esant 99 % tikimybės lygiui

Lyginant sveikos ir pažeistos miežių grūdų biomasės fermentaciją tradiciniais amilolitiniais fermentais (0,456 AV/kg) ir fermentaciją kombinuotu fermentiniu preparatu (amilazės su ksilanazėmis), nustatyta, kad, fermentacijai naudojant tik amilolitinius fermentus, redukuojančių cukrų misoje susidarė vidutiniškai 10,8 % ir 16,3 % mažiau nei naudojant kombinuotą fermentinį preparatą. Taip pat, papildomai

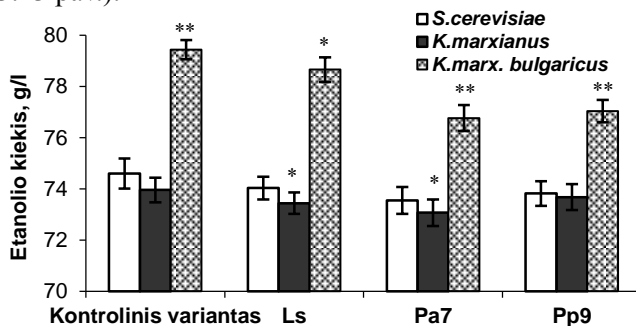
nustačius fermentuotos masės (raugalo) pH, pastebėta, kad daugiau organinių rūgščių susidarė fermentuojant labiau mikroskopinių grybų pažeistą grūdinę žaliavą.

Vertinant fermentuotos sveikos ir užterštos grūdinės žaliavos raugalo fermentacijos terpės pH pokyčius, nustatyta, kad pažeistų miežių grūdų fermentuoto raugalo pH (3,88) sumažėjo, palygti su sveikų grūdų raugalo pH (5,12) (3.8 lent.). Taip pat nustatyta, kad fermentuojant sveiką (DON – 0 µg/kg) ir užterštą (DON – 1225 µg/kg) grūdinę biomasę kombinuotais fermentiniais preparatais susidariusios bioetanolio išeigos siekė atitinkamai 87 % ir 83 % teoriškai nustatytos biomasės išeigos (0,461 g/g) (3.8 lent.).

Tyrimas parodė, kad ksilanazės iš *T. reesei* turi teigiamos įtakos fermentacijos metu vykstančiam mielių augimui. Ksilanazės katalizuoja arabinoksilanų, pagrindinių grūdų nekrakmolinių polisacharidų, hidrolizę iki pentozijų, kurios nėra fermentuojamos *S. cerevisiae* mielių, tačiau jos gali padidinti mielių biomasės susidarymą, o tai turi teigiamos įtakos etanolio kiekio padidėjimui. Etanolio kiekio padidėjimas gali būti susijęs su įvairių glikozido hidrolazių, kurios skaido nekrakmolinius polisacharidus iki monomerinių sacharidų, veikla.

3.5.7. Pieno rūgšties bakterijų ir mielių rūšies įtaka *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos procesui

Ištirta *Fusarium* spp. užkrėstų miežių (DON – 1225 µg/kg) apdorojimo įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis (PRB) ir mielių rūšies įtaka susidariusiam etanolio kiekiui (3.23 pav.).



3.23 pav. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų (DON – 1225 µg/kg) apdorojimo skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis (PRB) fermentacijai naudojant skirtingas mielių rūšis įtaka susidariusiam etanolio kiekiui (g/l), (* ir ** – esminiai skirtumai, palygti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui)

Iš 3.23 paveiksle pateikto grafiko matyti, kad pažeistų miežių apdorojimas PRB (esant tai pačiai mielių rūšiai – *S. cerevisiae*), palygti su kontroliniu variantu (neapdorotais grūdais), neturėjo reikšmingos įtakos ($p \geq 0,05$) etanolio koncentracijos kitimui. Visais apdorojimo PRB (esant tai pačiai mielių rūšiai – *S. cerevisiae*) atvejais (Ls, Pa7 ir Pp9) nustatyta vidutinė susidariusio etanolio koncentracija buvo 73,7 g/l.

Vis dėlto tirtų grūdų apdorojimas PRB turėjo neigiamos įtakos *Fusarium* spp. užkrėstų miežių biomasės fermentacijos metu susidariusių aukštesnės eilės alkoholių

kiekiui (3.9 lent.). Iš 3.9 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad, pažeistus miežių grūdus apdorojus PRB preparatais, visais nagrinėjamaais atvejais su Ls, Pa7 ir Pp9 metanolio kiekis po fermentacijos sumažėjo atitinkamai vidutiniškai 19,8 %, 35,2 % ir 40,8 %, palyginti su kontroliniu variantu, tačiau bendras aukštesnės eilės alkoholių kiekis padidėjo atitinkamai vidutiniškai 26,7 %, 26,4 % ir 43,7 %. Pažeistų miežių grūdų apdorojimas Ls (esant *S. cerevisiae* mielių rūšiai) turėjo mažiausią įtaką aukštesnės eilės alkoholių susidarymo padidėjimui (4,3 %).

Eksperimento metu taip pat tirta skirtingų mielių rūšių (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ir *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*) įtaka fermentuojant užkrėstus miežius (DON – 1225 µg/kg) susidariusiam etanolio ir aukštesnės eilės alkoholių kiekiui. Iš 3.23 paveiksle pavaizduoto grafiko matyti, kad didžiausi etanolio kiekiai susidarė užkrėstų miežių fermentacijai naudojant *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* mieles. Fermentacijos metu susidaręs etanolio kiekis padidėjo, palyginti su *S. cerevisiae* ir *K. marxianus* mielėmis, atitinkamai 6,5 % ($p \leq 0,01$) ir 7,4 % ($p \leq 0,01$) (3.23 pav., kontrolė). Nustatyta, kad, apdorojus pažeistą (DON – 1225 µg/kg) miežių biomasę įvairiomis PRB bei skirtingomis mielėmis, fermentacijos metu susidariusio bioetanolio išeigos buvo 81–87 % teoriškai galimos biomasės išeigos (0,461 g/g) (3.9 lent.). Naudojant Ls kartu su *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielėmis, nustatyta didžiausia susidariusio bioetanolio išeiga tarp visų tirtų PRB ir mielių derinių – ji buvo 87 % teoriškai nustatytos biomasės išeigos (3.9 lentelė).

Taip pat vertinta skirtingų PRB ir mielių kombinacijų įtaka *Fusarium* spp. užkrėstų miežių (DON – 1225 µg/kg) fermentacijos metu susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekiams. Iš 3.9 lentelės matyti, kad didžiausi aukštesnės eilės alkoholių kiekiai susidarė apdorojus užkrėstus miežius skirtingomis PRB padermėmis (Ls, Pa7 ir Pp9) ir fermentacijos metu naudojant *K. marxianus* mieles (4413, 3635 ir 4296 mg/l). Mažesni aukštesnės eilės alkoholių kiekiai susidarė fermentacijai naudojant *S. cerevisiae* ir *K. marxianus* var. *bulgaricus* mieles. Taip pat nustatyta, kad skirtingų mielių panaudojimas alkoholinės fermentacijos metu turi teigiamos įtakos, palyginti su kontroliniu variantu (140 mg/l), susidariusio metanolio kiekio mažėjimui. Visais nagrinėjamaais atvejais su *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ir *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielėmis metanolio kiekis po fermentacijos sumažėjo atitinkamai vidutiniškai 44 %, 22,6 % ir 29,3 %, palyginti su kontroliniu variantu, tačiau bendras susidaręs aukštesnės eilės alkoholių kiekis padidėjo atitinkamai vidutiniškai 23,5 %, 46,8 % ir 26,6 % (3.9 lent.). Pažeistų miežių grūdų fermentacijai naudojant *S. cerevisiae* mieles (apdorojus grūdus Ls), nustatyta mažiausia įtaka aukštesnės eilės alkoholių susidarymo padidėjimui (4,3 %).

3.9 lentelė. *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų (DON – 1225 µg/kg) apdorojimo skirtingomis PRB naudojant įvairias mieles įtaka susidariusiai metanolio ir aukštesnės eilės alkoholių koncentracijai (mg/l)

PRB	Mielės	Metanolis	Propilo alkoholis	Izobutilo alkoholis	Izoamilo alkoholis	Bendras alkoholių kiekis	Etanolio išeiga ¹
Kontrolinis variantas su amilazėmis ir ksilanazėmis	<i>S. cerevisiae</i>	140±23	275±21	760±42	1768±174	2803	0,381±0,008
	<i>S. cerevisiae</i>	98±4	267±21**	699±16	1957±51	2923	0,378±0,008
	<i>K. marxianus</i>	120±12	330±23**	1132±57**	2951±48**	4413	0,375±0,009
Ls	<i>K. marxianus bulgaricus</i>	118±8	415±18**	680±22*	2223±28*	3318	0,401±0,012
	<i>S. cerevisiae</i>	69±3*	319±32*	727±24	2500±36*	3546	0,375±0,005
Pa7	<i>K. marxianus</i>	112±6	220±22**	932±14**	2483±43*	3635	0,373±0,005
	<i>K. marxianus bulgaricus</i>	90±4*	382±24**	822±11	2245±66*	3449	0,392±0,010
Pp9	<i>S. cerevisiae</i>	68±5*	451±26**	1080±48**	2381±38*	3912	0,377±0,016
	<i>K. marxianus</i>	92±0	330±16**	926±36**	3040±42**	4296	0,376±0,003
	<i>K. marxianus bulgaricus</i>	88±0	540±26**	618±12*	2717±21**	3875	0,393±0,012

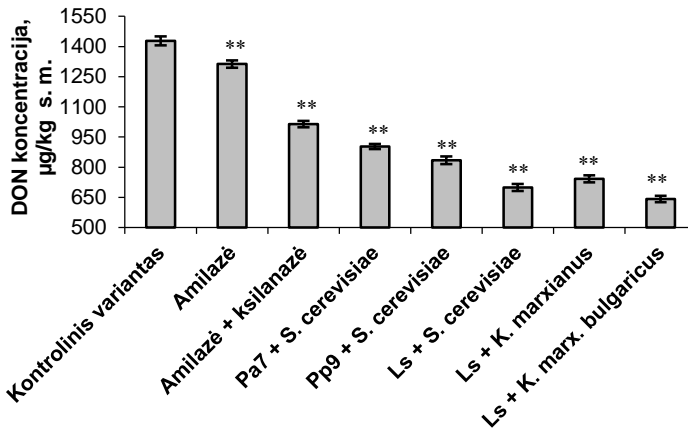
¹ Etanolio išeiga, g alkoholio/g redukuojančių sacharidų

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 % ir 99 % tikimybės lygiui

Apibendrinant tyrimo rezultatus, galima teigti, kad skirtingos mielės ir PRB padermės turi įtakos *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų fermentacijos procesui. Todėl, pasirinkus optimalias mielių ir PRB kombinacijas, galima padidinti fermentacijos proceso efektyvumą.

3.5.8. Biopriemonių įtaka *Fusarium* spp. užterštų miežių grūdų fermentacijos metu susidariusių žlaugtų deoksinivalenolio sumažinimui

Apie mielių sąveiką su mikotoksinais žinoma jau seniai. Pastaruoju metu mikotoksinais pašalinti iš maisto produktų ir pašarų vis dažniau taikoma ir PRB biologinė detoksikacija. Šiame etape tirtas PRB ir mielių derinių panaudojimas fermentuotų *Fusarium* spp. pažeistų (DON – 1225 µg/kg) miežių grūdų DON kiekiui fermentacijos atliekose – žlaugtuose – sumažinti (3.24 pav.).



3.24 pav. DON koncentracija miežių grūdų fermentacijos metu susidariusiuose žlaugtuose, kai fermentacijai naudoti įvairūs PRB ir mielių rūšių deriniai (** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 99 % tikimybės lygiui)

Fusarium spp. užkrėstų miežių fermentacijai naudojant amilolitinius fermentus (0,456 AV/kg), DON kiekis žlaugtuose, palyginti su pradine žaliava, sumažėjo 8 %. Pažeistą grūdinę žaliavą apdorojus fermentiniais preparatais (amilazėmis (0,456 AV/kg) ir ksilanazėmis (3450 KV/kg)), DON kiekis žlaugtuose, palyginti su pradine grūdine žaliava, sumažėjo 29 %. Nors fermentiniai preparatai sumažino DON koncentraciją žlaugtuose, bet ji vis dar buvo per didelė tam, kad žlaugtai galėtų būti panaudoti gyvulių pašarams [237]. Todėl fuzarioze užkrėstiems miežiams apdoroti panaudoti PRB (Pa7, Pp9 ir Ls) ir *S. cerevisiae* mielių deriniai. Šie leido DON koncentraciją žlaugtuose, palyginti su pradine žaliava, sumažinti atitinkamai 36,7 %, 41,6 % ir 51 %. Vertinant ir kitų mielių rūšių (*K. marxianus* ir *K. marxianus bulgaricus*) įtaką žlaugtų detoksikacijai, miežių grūdų biomasei apdoroti panaudoti jų ir Ls deriniai. *L. sakei* ir *K. marxianus* bei *K. marxianus bulgaricus* mielių derinys leido DON koncentraciją žlaugtuose, palyginti su pradine žaliava, sumažinti daugiausia – atitinkamai 48 % ir 55 % (3.24 pav.).

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad kai kurios mielės sujungia nemažus mikotoksinų kiekius. Atlikti tyrimai leido patvirtinti, kad mielių rūšis yra reikšminga

tiek fermentacijos proceso efektyvumo didinimui, tiek žlaugtų detoksikacijai. Atliekant tyrimus miežių grūdų apdorojimas atrinktomis PRB nepadidino etilo alkoholio išeigos, tačiau pastebėtas reikšmingas šio biotechnologinio sprendimo poveikis žlaugtų detoksikacijai, lemiantis DON kiekio šioje pašarams gaminti naudojamoje žaliavoje sumažėjimą. Naudojant PRB praktikoje, aktualu žinoti PRB detoksikacijos mechanizmą ir jo valdymo galimybes. Žinoma, kad, sąveikaujant PRB ir mikotoksinams, galimi du specifiniai mikotoksinų detoksikacijos procesai: mikotoksinų inkorporavimas į PRB ir (ar) mikotoksinų biosintezės slopinimas [119]. Miežių grūdams apdoroti parenkant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčią PRB padermę (*L. sakei*) ir derinant ją su mielėmis (*S. cerevisiae* ir *K. marxianus bulgaricus*), galima padidinti *Fusarium* spp. užkrėstos grūdinės žaliavos perdirbimo efektyvumą: biomasę panaudoti bioetanolio gamybai, o susidariusius žlaugtus – pašarams.

3.6. Grūdų paruošimo salyko gamybai rekomendacijos

Aplinkai nekenksmingų technologijų kūrimas ir tobulinimas tampa vienu didžiausių kiekvienos šalies ekonomikos uždavinių. Jų sprendimas turėtų būti kompleksinis, susijęs su specialių augalų apsaugos priemonių kūrimu. Darbo tikslas buvo sukurti ir pritaikyti mokslines inovacijas *Fusarium* spp. pažeistai grūdinei žaliavai aptikti ir efektyviau bei tvariai panaudoti, kuriant ir taikant naujas biopriemones pažeistai grūdinei žaliavai perdirbti ir jos sveikumui didinti. Tyrimuose ypatingas dėmesys buvo skiriamas:

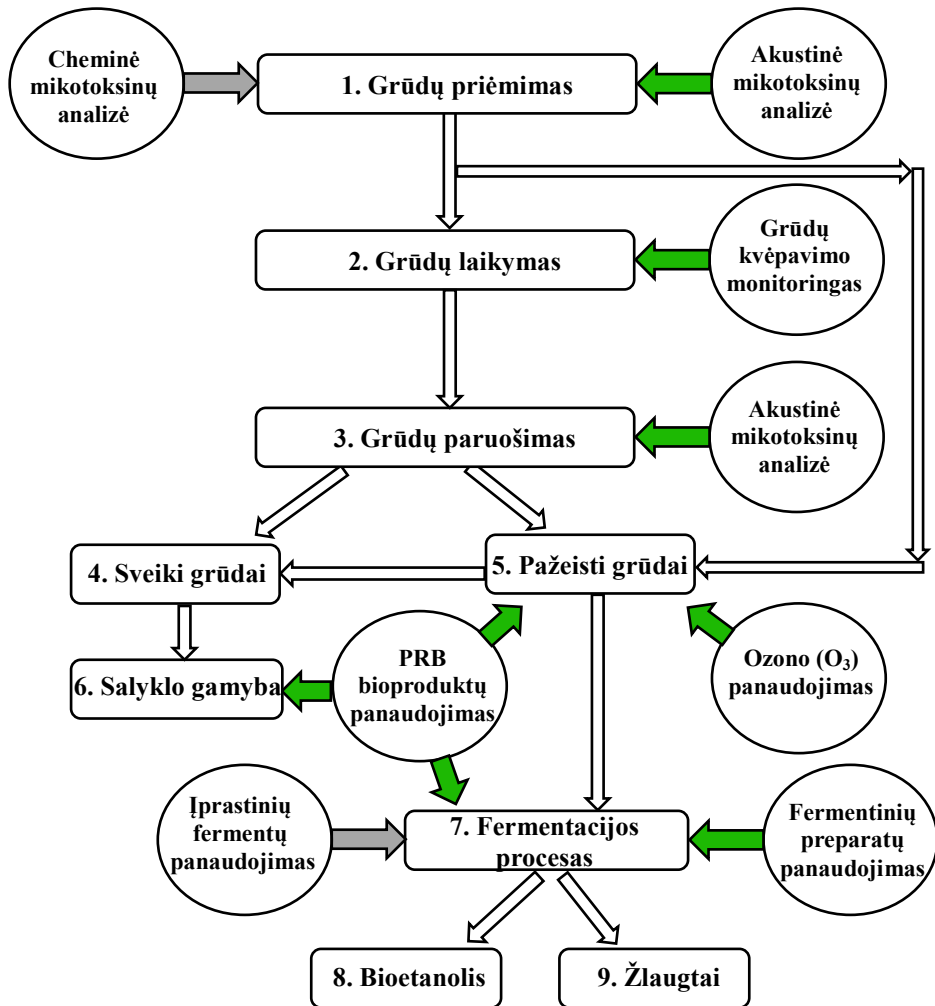
1) greitų metodų, skirtų *Fusarium* spp. pažeistai grūdinei žaliavai aptikti (akustinis metodas) ir stebėti laikymo metu (CO₂ koncentracijos matavimas), kūrimui;

2) naujų biopriemonių (PRB bioproduktai, fermentiniai preparatai ir ozonavimas), kurios užtikrintų grūdinės žaliavos sveikumą (mikotoksinų detoksikaciją, salyklinių grūdų daigumo didinimą) ir padėtų perdirbti pažeistą grūdinę žaliavą į biokurą ir pašarus, kūrimui.

Remiantis darbo metu atliktų eksperimentų rezultatais, inovatyviais salyko gamybos efektyvumo didinimo sprendimais sudaryta technologinė grūdų paruošimo salyko gamybai modernizavimo schema pateikta 3.25 paveiksle.

1. Grūdų priėmimas. Pasaulinėje praktikoje mikotoksinams nustatyti iki šiol dažniausiai buvo taikomi daug darbo jėgos ir laiko reikalaujantys cheminiai pamatiniai mikotoksinų analizės metodai. Nors cheminiai metodai yra labai tikslūs, tačiau reikalauja daug darbo ir yra gana brangūs – mėginio analizės (DON) išlaidos svyruoja nuo 5 iki 30 eurų. Norint nustatyti mikotoksinų kiekį grūduose, būtina tiksliai paimti ėminį pagal standartą [237], nes nuo ėminio paėmimo priklauso analizės rezultatai. Šiuo metu daug diskutuojama apie arbitražinio mėginio mikotoksinų analizei grūduose paėmimą. Manoma, jog šiuo metu galiojantis arbitražinis mėginio kiekis mikotoksinų analizei yra per mažas, kad būtų tiksliai įvertintas visos analizuojamos grūdų partijos užterštumas mikotoksinais, todėl siūloma mėginio kiekį analizei didinti. Tai galimai padidins ir analizės kainą, todėl būtina ieškoti naujų perspektyvių ir bekontaktių mikotoksinų grūdinėje žaliavoje analizės metodų. Šiuo atveju akustinė technika įgauna didelį potencialą mikotoksinų

analizėje.



3.25 pav. Grūdų paruošimo salyklo gamybai technologinė schema su inovatyviais sprendimais (žalia rodyklė)

Disertacijos tyrimų metu buvo nustatyta, kad Kauno technologijos universitete pagal ITEA2 projektą ACOUSTICS sukurtas naujas, greitas ir bekontaktis akustinis spektrometras yra pakankamai tikslus mikotoksinui DON kviečių grūduose aptikti ir įvertinti kiekybiškai. Šis metodas paremtas priklausomybių tarp akustinio signalo parametru ir fuzariozės pažeistų grūdų struktūrinių savybių pokyčių nustatymu. Vertinant DON kiekį kviečiuose akustiniu metodu, buvo nustatyta stipri priklausomybė ($R^2 \approx 0,9$ ir daugiau) su šio mikotoksino kiekiu, nustatytu tradiciniu ELISA metodu. Akustinis metodas nereikalauja daug darbo ir yra labai greitas (analizės trukmė iki 10 sek.). Analizės atlikimo sąnaudų nėra, išskyrus prietaiso kainą ir amortizaciją. Taip pat verta pažymėti, kad vienos analizės metu galima ištirti iki 200 g tiriamojo mėginio ir analizės pakartojimų skaičius nėra ribojamas.

2. Grūdų laikymas. Mikotoksinų kaupimuisi grūduose didelę įtaką turi sandėliavimo sąlygos, ypač tuomet, kai nukuliami drėgni grūdai. Toksiškais grybais ir mikotoksinais užterštą produkciją netinkamai laikant sandėliuose, toksinų gali neprognozuojamai padaugėti, todėl pažeistoje grūdinėje žaliavoje suintensyvėja grūdų kvėpavimo procesai, kurie lemia CO₂ dujų grūdų masėje padidėjimą. Šiuo metu daugelyje grūdų laikymo talpyklų nėra užtikrintos grūdų monitoringo (CO₂ matavimo) sąlygos, o tai lemia nekontroliuojamą laikomų grūdų gedimą. Tuo tikslu tyrimo metu įvertinti nauji techniniai sprendimai, leidžiantys stebėti CO₂ koncentracijos pokyčius laikomoje *Fusarium* spp. pažeistoje kviečių grūdų masėje. Tyrimai parodė, kad neventiliuojamose grūdų talpyklose tikslinga įrengti CO₂ matavimo daviklius, leisiančius sekti grūdų sampile vykstančius grūdų kvėpavimo procesus ir iš jų spręsti apie laikomoje žaliavoje vykstančius kokybinius pokyčius, kurių būtų galima išvengti laiku pritaikius prevencines priemones (pvz., ventiliaciją ar džiovinimą).

3. Grūdų paruošimas. Manoma, kad, užtikrinant geras laikymo sąlygas, grūdai negenda ir išlieka sveiki. Todėl tradicinėje praktikoje yra priimta, kad po laikymo grūdai iškart patenka į grūdų perdirbimo grandinę. Tačiau ne visada laikomi grūdai būna sveiki. Dėl grūduose vykstančių biologinių procesų ir galimų netinkamų jų laikymo sąlygų grūdams būdingas padidėjęs kvėpavimas, kurio metu susidaro tinkamos sąlygos pašalinei mikroflorai daugintis. Siekiant to išvengti, manoma, būtų tikslinga grūdų tiekimo perdirbti technologinėje linijoje taikyti akustinį metodą. Šis metodas leistų realiuoju laiku analizuoti judantį grūdų srautą, įvertinti ir laiku iš grūdų perdirbimo grandinės pašalinti pažeistą grūdinę žaliavą.

4-5. Sveiki ir pažeisti grūdai. Akustiniu metodu įvertinus laikomos grūdinės žaliavos užterštumą mikotoksinais, sveika žaliava būtų nukreipiama į salyklo gamybos technologinę operaciją, o pažeista žaliava būtų perdirbama. Siūloma sutelkti dėmesį į šias biožaliavos perdirbimo sritis: (I) antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių PRB biopreparatų panaudojimą grūdinės žaliavos detoksikacijai; (II) ozono panaudojimą pažeistos grūdinės žaliavos detoksikacijai. Tyrimais nustatyta, kad, pažeistą grūdinę žaliavą (kviečius) apdorojus PRB bioproduktais, juose esančio mikotoksino DON koncentraciją galima sumažinti iki 66,9 %, o, detoksikacijai panaudojus ozoną, DON koncentraciją kviečių grūduose galima sumažinti iki 25 %.

6. Salyklo gamyba. Tyrimais nustatyta, kad, naudojant antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius PRB bioproduktus, vidutiniškai 6,3 % galima padidinti kviečių grūdų daigumą. Manoma, kad toks grūdų apdorojimas (prieš daiginimą) galėtų padidinti kvietinio salyklo gamybos efektyvumą.

7. Fermentacijos procesas. Pažymėtina, kad Lietuvoje sparčiai plečiasi biodegalų (bioetanolio, biodyzelino) gamyba. Kaip bioetanolio gamybos atliekos lieka žlaugtai, kurie gali būti sėkmingai naudojami kombinuotųjų pašarų gamyboje. Svarbu, kad bioetanolio gamyba būtų kiek galima optimesnė ir jo gamybos atliekos būtų saugios pašarams gaminti. Todėl, tiriant fuzariozės pažeistų miežių grūdų panaudojimo bioetanolio gamyboje galimybes, aktualus naujų biotechnologinių priemonių – pieno rūgšties bakterijų (*Ls*, *Pp7*, *Pp9*), fermentinių preparatų (amilazė (*Stargen*TM 002) + ksilanazė (*Ecopulp TX-200A*) 3450 KV/kg) ir mielių (*S. cerevisiae*, *K. marxianus* ir *K. marxianus* var. *bulgaricus*) – panaudojimas

bioetanolio išeigai padidinti ir DON kiekiui gamybos atliekose (žlaugtuose) sumažinti.

8. Bioetanolis. Didžiausias etanolio kiekis (79,44 g/l) susidarė užkrėstų miežių (DON – 1225 µg/kg) fermentacijai naudojant *K. marxianus* var. *bulgaricus* mieles.

9. Žlaugtai. Pažeistų (DON – 1225 µg/kg) miežių fermentacijai panaudojus Ls ir *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielių derinį, DON koncentracija žlaugtuose, palyginti su pradine žaliava, sumažėjo 55 %.

IŠVADOS

1. Ištirta *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų cheminė sudėtis, mikrostruktūra ir technologinės savybės:
 - 1.1. Miežių ir kviečių grūduose, didėjant DON koncentracijai, krakmolo kiekis mažėjo, o fermentų (amilolitinių, ksilanolitinių ir proteolitinių) aktyvumas didėjo.
 - 1.2. Užkrėstuose grūduose nustatyti šie mikrostruktūros pokyčiai: plonesnės ir susiraukšlėjusios grūdų sienelės, destrukūrizuoti ir formą praradę krakmolo grūdėliai, sudarę pavienius aglomeratus, rodantys galimos hidrolizės požymius, ir padidėję tarpai tarp krakmolo granulių.
 - 1.3. *Fusarium* spp. tarša turėjo neigiamos įtakos kviečių grūdų technologinėms savybėms. Sumažėjo 1000 grūdų masė ir nuo 93,6 % iki 37 % sumažėjo jų daigumas.
2. Sukurtas ir pritaikytas akustinis spektrometras mikotoksinams kviečių grūduose aptikti:
 - 2.1. Nustatyta patikima tiesinė priklausomybė ($r = 0,9013$, $p \leq 0,05$) tarp DON koncentracijos, nustatytos akustiniu metodu (DON (Acoust)), ir DON koncentracijos, nustatytos ELISA metodu (DON (ELISA)).
 - 2.2. Nustatytas akustinio metodo pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis (SSN) skirtingam DON koncentracijos lygiui pateko į mažiau nei 20 % gero atsikartojamumo intervalo ribas, nustatytas pagal CEN/TR 16059:2010. Metodo patikimumo įvertinimo parametrai rodo, kad akustiniu metodu galima nustatyti DON kiekį kviečių grūduose.
3. Nustatytas ryšys tarp laikomuose grūduose susidariusios CO₂ koncentracijos ir grūdinės žaliavos užkrėstumo (DON) laipsnio, grūdų drėgnio bei grūdų stambumo:
 - 3.1. Užkrėstuose kviečių grūduose (DON – 800 µg/kg), palyginti su sveikais grūdais (DON – 0 µg/kg), nustatytas padidėjęs CO₂ kiekis esant padidėjusiam grūdų drėgniui (18,5 % ir 24,5 %), o esant standartiniam grūdų drėgnumui (14,5 %) reikšmingo CO₂ koncentracijos skirtumo tarp šių grūdų nenustatyta.
 - 3.2. Nustatyta, kad CO₂ stambiuose grūduose išsiskiria intensyviau nei smulkiuose.
 - 3.3. Laikomoje grūdų masėje su *Fusarium* spp. taršos židiniu fiksuota didesnė CO₂ koncentracija.
4. Didžiausias detoksikuojamasis *Fusarium* spp. grybais užkrėstų salyklinių kviečių grūdų ozonavimo efektas priklausė nuo poveikio trukmės: vidutiniškai didžiausiu detoksikuojamuoju poveikiu pasižymėjo 130 min. trukmės pažeistų kviečių apdorojimas ozonu; mikotoksinų DON, ZEN, T-2 ir HT-2 koncentracija, palyginti su kontroliniu variantu, sumažėjo atitinkamai 25 %, 48,7 %, 65 % ir 82,8 %.
5. Ištirtas PRB bioproduktų panaudojimas salykliniams grūdams apdoroti. Nustatyta:
 - 5.1. Sūrių išrūgų permeatas yra tinkama fermentacinė terpė PRB bioproduktams gaminti; joje gerai dauginasi PRB ir kaupiasi antimikrobiniai metabolizmo

- produktai (pieno ir acto rūgštis).
- 5.2. PRB bioproduktais apdorotuose *Fusarium* spp. užkrėstuose kviečių grūduose DON koncentracija sumažėjo nuo 16,59 iki 66,86 %. Didžiausiu antigrybeliniu poveikiu pasižymėjo bioproduktai, fermentuoti su *L. bulgaricus* (Lb) (95 %), *L. sakei* (Ls) (93,3 %) ir *P. acidilactici* (Pa7) (91,5 %).
 - 5.3. *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų daigumas po apdoravimo Pa7 ir Pp10 padermėmis, palyginti su kontroliniu variantu, padidėjo vidutiniškai 7,5 %.
 6. Tyrimais įrodyta, kad apdorojimas PRB bioproduktu neturi įtakos *Fusarium* spp. pažeistų salyklinių grūdų baltyminių medžiagų kiekybinei sudėčiai grūdų dygimo metu.
 7. Ištirtas biopriemonių panaudojimas *Fusarium* spp. užkrėstų miežių grūdų fermentacijos efektyvumui didinti. Nustatyta:
 - 7.1. DON koncentracijai fermentuojamuose miežių grūduose didėjant nuo 120 iki 1225 µg/kg, susidariusio etanolio kiekis sumažėjo atitinkamai nuo 7,5 iki 12,2 %, o susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekis padidėjo nuo 21 iki 158,43 %, palyginti su nepažeistais grūdais (DON – 0 µg/kg).
 - 7.2. Didžiausia etanolio koncentracija (74,6 g/l) gauta, kai miežių grūdų biomasė fermentuota su 3450 KV/kg ksilanazės. Taip pat ksilanazė susidariusių aukštesnės eilės alkoholių kiekį distiliate sumažino vidutiniškai iki 23,9 %.
 - 7.3. Naudojant Ls ir *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielių derinį, nustatyta didžiausia susidariusio bioetanolio išeiga tarp visų tirtų PRB ir mielių derinių – ji buvo 87 % teoriškai nustatytos biomasės išeigos.
 - 7.4. Pažeistų miežių fermentacijai panaudojus Ls ir *K. marxianus* var. *bulgaricus* mielių derinį, DON koncentracija žlaugtuose, palyginti su pradine žaliava, sumažėjo 55 %.

LITERATŪRA

1. STEYN, P. S. Proceedings of the International Congress of Toxicology – VII Mycotoxins, General View, Chemistry and Structure. *Toxicology Letters*, December 1995, 1995, vol. 82. pp. 843–851. ISSN 0378-4274.
2. ROBENS, J. and CARDWELL, K. The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 01/01, 2003, vol. 22, no. 2–3. pp. 139–152. ISSN 0731-3837.
3. WU, F. Measuring the Economic Impacts of Fusarium Toxins in Animal Feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 10/1, 2007, vol. 137, no. 3–4. pp. 363–374 ISSN 0377-8401.
4. WAKULINSKI, W. Phytotoxicity of the Secondary Metabolites of Fungi Causing Wheat Head Fusariosis (Head Blight). *Acta Physiol. Plant* 1989, no. 11, pp. 301–306.
5. MAGAN, N. and ALDRED, D. Post-Harvest Control Strategies: Minimizing Mycotoxins in the Food Chain. *International Journal of Food Microbiology*, 10/20, 2007, vol. 119, no. 1–2. pp. 131–139. ISSN 0168-1605.
6. RICHARD, J. L. and PAYNE, G. A. *CAST Report. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report no. 139*, Ames, Iowa, USA, 2003.
7. WEIDENBORNER, M. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
8. BRYDEN, W.L. Food and Feed, Mycotoxins and the Perpetual Pentagon in a Changing Animal Production Environment. *Animal Production Science*, 52(7), 383–397, 2012.
9. PIOTROWSKA, M., ŚLIŻEWSKA, K. and BIERNASIAK, J. Mycotoxins in Cereal and Soybean-Based Food and Feed, Soybean – Pest Resistance, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), *InTech*, DOI: 10.5772/54470, 2013.
10. SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., et al. Deoxynivalenol and Its Toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), pp. 94–99. Retrieved 14 Jun. 2016, from Doi:10.2478/v10102-010-0019-X, 2016.
11. SEBAEI, A. S., GOMAA, A. M., MOHAMED, G. G. and EL-DIEN, F. N. Simple Validated Method for Determination of Deoxynivalenol and Zearalenone in some Cereals using High Performance Liquid Chromatography. *The American Journal of Food Technology*, 2012, vol. 7. pp. 668–678.
12. JOFFE, A. Z. Algal, S. KADIS, A. CIEGLER and S. J. AJL eds., Academic Press, 1971 *CHAPTER 5 – Alimentary Toxic Aleukia*, pp. 139–189. ISBN 9780120465071.
13. AL-FAKIH, A. A. Overview on the Fungal Metabolites Involved in Mycopathology. *Open Journal of Medical Microbiology*, 2014, vol. 2014.

14. RAINEY, M. R., TUBBS, R. C., BENNET, L. W., COX, N. M. Prepubertal Exposure to Dietary Zearalenone Alters Hypothalamo Hypophyseal Function Does Not Impair Postpubertal Reproductive Functions in Gilts. *J. Anim. Sci.*, 68 (1990), pp. 2015–2022.
15. SCHMALE, D. G. and MUNKVOLD, G. P. Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health. *The Plant Health Instructor*, 2009, vol. 3. pp. 340–353.
16. NOOTS, I., DELCOUR, A. J., MICHIELS, W. C. From Field Barley to Malt: Detection and Specification of Microbial Activity for Quality Aspects, *Critic. Rev. in Microb.*, 25, 2, 121–153, 1998.
17. RABIE, C. J., LÜBBEN, A., MARAIS, G. J. and JANSEN VAN VUUREN, H. Enumeration of Fungi in Barley. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 117–127, 1997.
18. SCHWARZ, P., et al. Effect of *Fusarium Graminearum* and *F. Poae* Infection on Barley and Malt Quality. *Monatsschrift Für Brauwissenschaft*, 2001, vol. 54, no. 3–4. pp. 55–63.
19. KLEEMOLA, T., NAKARI-SETÄLÄ, T., LINDER, M., PENTTILÄ, M., KOTAVIITA, E., OLKKU, J. and HAIKIRA, A. Characterisation and Detection of the Gushing Factors Produced by Fungi. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Budapest, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, CD ROM 2001, Contribution 12, 2001.
20. PEKKARINEN, I. A., SARLIN, H. T., LAITILA, T. A., HAIKARA, I. A. and JONES, L. B. *Fusarium* Species Synthesize Alkaline Proteinases in Infested Barley, *J. Cereal Sci.* 37: 349–356, 2003.
21. KOCIĆ-TANACKOV, S. D., ŠKRINJAR, M. M., GRUJIĆ, O. S., PEJIN, J. D. Zearalenone Production during Micro-Malting of Barley. Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia, 2007.
22. SCHWARZ, P. B., CASPER, H. H. and BEATTIE, S. Fate and Development of Naturally Occurring *Fusarium* Mycotoxins during Malting and Brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53: 121–125, 1995.
23. SMITH, J. E. and MOSS, M. O. Mycotoxins – Formation, Analysis and Significance. 148 S., 54 Abb., 52 Tab. Chichester–New York–Brisbane–Toronto–Singapore 1985. John Wiley & Sons. ISBN 0–471–90671–9. *Journal of Basic Microbiology*, 1986, vol. 26, no. 5. pp. 312–312. ISSN 1521-4028.
24. PASCALE, M. N. Detection Methods for Mycotoxins in Cereal Grains and Cereal Products. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 2009, no. 117. pp. 15–25.
25. BARTKIENĖ, E., et al. Ksilanolitinių fermentų įtaka bioetanolio gamybos iš fuzariozės pažeistų grūdų efektyvumui. *Veterinarija ir zootechnika*, 2010, T. 49, Nr. 71.

26. JUODEIKIENE, G., BASINSKIENE, L., BARTKIENE, E. and MATUSEVICIUS, P. Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes, 2012.
27. BARTKIENĖ, E., JUODEIKIENĖ, G. and VIDMANTIENĖ, D. Deoksinivalenolio įvertinimas kviečiuose akustiniu metodu ir raugų įtaka jo koncentracijai kvietinės duonos gamybos procese. *Maisto chemija ir technologija*, 2008, vol. 42, no. 1. pp. 5–12.
28. LEBEDEVAITĖ, E., et al. *Mikotoksinų kaupimosi koncentruotuose pašaruose tyrimų analizė*. Magistro baigiamasis darbas, 2005.
29. JUODEIKIENE, G., et al. Acoustic Sensing of Deoxynivalenol in Co-Occurrence with Zearalenone and T-2/HT-2 Toxin in Winter Wheat Cultivar Sirvinta from Lithuania. *World Mycotoxin Journal*, 2011, vol. 4, no. 4. pp. 395–404.
30. GUEVEN, A. and HICSASMAZ, Z. *Pore Structure in Food: Simulation, Measurement and Applications*. Springer, 2013.
31. WHAN, A. P., et al. GrainScan: A Low Cost, Fast Method for Grain Size and Colour Measurements. *Plant Methods*, 2014, vol. 10, no. 1. pp. 1.
32. MEXAS, S. and BRUSEWITZ, G. Acoustic Grain Moisture Meter. *Transactions of the ASAE*, 1987, vol. 30, no. 3. pp. 853–857.
33. AMOODEH, M. T., KHOSHTAGHAZA, M. H. and MINAEI, S. Acoustic on-Line Grain Moisture Meter. *Computers and Electronics in Agriculture*, 6, 2006, vol. 52, no. 1–2. pp. 71–78. ISSN 0168-1699.
34. PEARSON, T. C., CETIN, A. E., TEWFIK, A. H. and HAFF, R. P. Feasibility of Impact-Acoustic Emissions for Detection of Damaged Wheat Kernels. *Digital Signal Processing*, 2007, vol. 17, no. 3. pp. 617–633.
35. TURO, D. and UMNOVA, O. Acoustic Pulse Attenuation and Transmission in Rigid Porous Media: Experimental Investigation and Numerical Simulations. *Journal of the Acoustical Society of America*, 2008, vol. 123, no. 5. pp. 3141–3141.
36. KULMYRZAEV, A., CANCELLIERE, C. and MCCLEMENTS, D. J. Characterization of Aerated Foods Using Ultrasonic Reflectance Spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 12, 2000, vol. 46, no. 4. pp. 235–241. ISSN 0260-8774.
37. KUNIGELIS, V. and SENULIS, M. Acoustic Investigation of Air-Filled Porous Materials. *Acta Acustica United with Acustica*, 2002, vol. 88, no. 1. pp. 14–18.
38. HICKLING, R. and WEI, W. Sound Transmission in Stored Grain. *Applied Acoustics*, 1995, 1995, vol. 45, no. 1. pp. 1–8.
39. GUO, Y. B. and AMMULA, S. C. Real-Time Acoustic Emission Monitoring for Surface Damage in Hard Machining. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 11, 2005, vol. 45, no. 14. pp. 1622–1627. ISSN 0890-6955.

40. CHRISTENSEN, C. M. and KAUFMANN, H. H. *Grain Storage: The Role of Fungi in Quality Loss*. U of Minnesota Press, 1969.
41. BARTOSIK, R., CARDOSO, L. and RODRÍGUEZ, J. *Early Detection of Spoiled Grain Stored in Hermetic Plastic Bags (Silo-Bags) using CO₂ Monitoring*, 2008.
42. FRIDAY, D., TUIITE, J. and STROSHINE, R. Effect of Hybrid and Physical Damage on Mold Development and Carbon Dioxide Production during Storage of High-Moisture Shelled Corn. *Cereal Chem*, 1989, vol. 66, no. 5. pp. 422–426.
43. KIMBALL, B., et al. Elevated CO₂, Drought and Soil Nitrogen Effects on Wheat Grain Quality. *New Phytologist*, 2001, vol. 150, no. 2. pp. 295–303.
44. NEETHIRAJAN, S. and JAYAS, D. *Sensors for Grain Storage*, 2007.
45. MANICKAVASAGAN, A., JAYAS, D., WHITE, N. and JIAN, F. Thermal Imaging of a Stored Grain Silo to Detect a Hot Spot. *Applied Engineering in Agriculture*, 2006, vol. 22, no. 6. pp. 891–897.
46. WHITE, N., SINHA, R. and MUIR, W. Intergranular Carbon Dioxide as an Indicator of Biological Activity Associated with the Spoilage of Stored. *Canadian Agricultural Engineering*, 1982, vol. 24, no. 1.
47. TAPARAUSKIENĖ, L. *Saugaus grūdų ir rapsų laikymo trukmė įvairių tipų sandėliuose bei grūdų ir grūdų produktų užkrėtimo vabzdžiais ir kenkėjais mažinimo priemonės ekologinių ūkių sandėliuose ir ekologinio perdirbimo objektuose*. 2011–2012 m.
48. TEAM, E. W. ESRL Global Monitoring Division-Global Greenhouse Gas Reference Network, 2005.
49. MAIER, D., et al. Monitoring Carbon Dioxide Concentration for Early Detection of Spoilage in Stored Grain. *Julius-Kühn-Archiv*, 2010, no. 425. pp. 505.
50. CO₂ daviklių sistema grūdų talpyklose. [Interaktyvus]. 2012 [žiūrėta 2015-11-09]. Prieiga per: <http://supertechagroline.com>.
51. MILLS, J. T. *Spoilage and Heating of Stored Agricultural Products. Prevention, Detection and Control*. Minister of Supply and Services, 1989.
52. BAILEY, S. and BANKS, H. A Review of Recent Studies of the Effect of Controlled Atmospheres on Stored Product Pests. *Controlled Atmosphere Storage of Grains*, 2012. pp. 101.
53. HE, J., et al. Chemical and Biological Transformations for Detoxification of Trichothecene Mycotoxins in Human and Animal Food Chains: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, vol. 21, no. 2. pp. 67–76.
54. VISCONTI, A., HAIDUKOWSKI, E. M., PASCALE, M. and SILVESTRI, M. Reduction of Deoxynivalenol during Durum Wheat Processing and Spaghetti Cooking. *Toxicology Letters*, 2004, vol. 153, no. 1. pp. 181–189.

55. DEXTER, J., MARCHYLO, B., CLEAR, R. and CLARKE, J. Effect of Fusarium Head Blight on Semolina Milling and Pasta-Making Quality of Durum Wheat 1. *Cereal Chemistry*, 1997, vol. 74, no. 5. pp. 519–525.
56. AWAD, W. A., GHAREEB, K., BÖHM, J. and ZENTEK, J. Decontamination and Detoxification Strategies for the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol in Animal Feed and the Effectiveness of Microbial Biodegradation. *Food Additives and Contaminants*, 2010, vol. 27, no. 4. pp. 510–520.
57. LEE, U., LEE, M., PARK, W. and UENO, Y. Decontamination of Fusarium Mycotoxins, Nivalenol, Deoxynivalenol, and Zearalenone, in Barley by the Polishing Process. *Mycotoxin Research*, 1992, vol. 8, no. 1. pp. 31–36.
58. LEBEDEVAITĖ, E., et al. *Mikotoksinų kaupimosi koncentruotuose pašaruose tyrimų analizė*, 2005.
59. YOUNG, J. C. Formation of Sodium Bisulfite Addition Products with Trichothecenes and Alkaline Hydrolysis of Deoxynivalenol and its Sulfonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1986, vol. 34, no. 5. pp. 919–923.
60. DÄNICKE, S., et al. On the Effects of a Hydrothermal Treatment of Deoxynivalenol (DON)-Contaminated Wheat in the Presence of Sodium Metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) on DON Reduction and on Piglet Performance. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, vol. 118, no. 1. pp. 93–108.
61. AZIZ, N., ATTIA, E. and FARAG, S. Effect of Gamma-irradiation on the Natural Occurrence of Fusarium Mycotoxins in Wheat, Flour and Bread. *Food/Nahrung*, 1997, vol. 41, no. 1. pp. 34–37.
62. BOZOĞLU, F. Different Mycotoxin Inactivation Applications and Their Inactivation Mechanisms. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 2009, no. 117. pp. 27–35.
63. EDLAYNE, G., SIMONE, A. and FELICIO, J.D. Chemical and Biological Approaches for Mycotoxin Control: A Review. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2009, vol. 1, no. 2. pp. 155–161.
64. VARGA, J., et al. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 7. pp. 1718–1750.
65. KOLOSOVA, A. and STROKA, J. Substances for Reduction of the Contamination of Feed by Mycotoxins: A Review. *World Mycotoxin Journal*, 2011, vol. 4, no. 3. pp. 225–256.
66. HAGLER, W. and WHITAKER, T. One Step Solid Phase Extraction Cleanup of Peanuts and Corn Extracts for LC Quantification of Aflatoxin. *Proc. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1991. pp. 141.
67. ZAKI, M. M., EL-MIDANY, S., SHAHEEN, H. and RIZZI, L. Mycotoxins in Animals: Occurrence, Effects, Prevention and Management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2012, vol. 4, no. 1. pp. 13–28.

68. HATHOUT, A. S. and ALY, S. E. Biological Detoxification of Mycotoxins: A Review. *Annals of Microbiology*, 2014, vol. 64, no. 3. pp. 905–919.
69. MCCORMICK, S. P. Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, vol. 39, no. 7. pp. 907–918.
70. ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. and VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 5. pp. 1078–1099.
71. HARTINGER, D. and MOLL, W. Fumonisin Elimination and Prospects for Detoxification by Enzymatic Transformation. *World Mycotoxin Journal*, 2011, vol. 4, no. 3. pp. 271–283.
72. ŠUŠKOVIĆ, J., et al. Antimicrobial Activity—the most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 2010, vol. 48, no. 3. pp. 296–307.
73. DALÍÉ, D., DESCHAMPS, A. and RICHARD-FORGET, F. Lactic Acid Bacteria – Potential for Control of Mould Growth and Mycotoxins: A Review. *Food Control*, 2010, vol. 21, no. 4. pp. 370–380.
74. CIZEIKIENE, D., JUODEIKIENE, G., PASKEVICIUS, A. and BARTKIENE, E. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against Pathogenic and Spoilage Microorganism Isolated from Food and their Control in Wheat Bread. *Food Control*, 2013, vol. 31, no. 2. pp. 539–545.
75. YANG, E., et al. Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheeses and Yogurts. *AMB Express*, 2012, vol. 2, no. 1. pp. 1–12.
76. DAVIDSON, P. M., TAYLOR, T. M. and SCHMIDT, S. E. *Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds*, 2013.
77. FRANÇOISE, L. Occurrence and Role of Lactic Acid Bacteria in Seafood Products. *Food Microbiology*, 2010, vol. 27, no. 6. pp. 698–709.
78. SETTANNI, L. and MOSCHETTI, G. Non-Starter Lactic Acid Bacteria Used to Improve Cheese Quality and Provide Health Benefits. *Food Microbiology*, 2010, vol. 27, no. 6. pp. 691–697.
79. PANESAR, P. S. Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. *Food and Nutrition Sciences*, 2011, vol. 2, no. 01. pp. 47.
80. FADDA, S., LÓPEZ, C. and VIGNOLO, G. Role of Lactic Acid Bacteria during Meat Conditioning and Fermentation: Peptides Generated as Sensorial and Hygienic Biomarkers. *Meat Science*, 2010, vol. 86, no. 1. pp. 66–79.
81. CODA, R., RIZZELLO, C. G., PINTO, D. and GOBBETTI, M. Selected Lactic Acid Bacteria Synthesize Antioxidant Peptides during Sourdough Fermentation of Cereal Flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 20111209, Feb, 2012, vol. 78, no. 4. pp. 1087–1096. ISSN 1098-5336; 0099-2240.

82. GOBBETTI, M., CAGNO, R. D. and DE ANGELIS, M. Functional Microorganisms for Functional Food Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, vol. 50, no. 8. pp. 716–727.
83. GRANATO, D., et al. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, vol. 9, no. 3. pp. 292–302.
84. TEKWU, E. M., PIEME, A. C. and BENG, V. P. Investigations of Antimicrobial Activity of some Cameroonian Medicinal Plant Extracts Against Bacteria and Yeast with Gastrointestinal Relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, vol. 142, no. 1. pp. 265–273.
85. DICK, K., MOLAN, P. and ESCHENBRUCH, R. The Isolation from *Saccharomyces Cerevisiae* of Two Antibacterial Cationic Proteins that Inhibit Malolactic Bacteria. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 2015, vol. 31, no. 2. pp. 105.
86. CZERUCKA, D., PICHE, T. and RAMPAL, P. Review Article: Yeast as probiotics–*Saccharomyces Boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2007, vol. 26, no. 6. pp. 767–778.
87. GOTCHEVA, V., et al. Assessment of Potential Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria and Yeast Strains. *Food Biotechnology*, 2002, vol. 16, no. 3. pp. 211–225.
88. HALM, M., et al. Lactic Acid Tolerance Determined by Measurement of Intracellular pH of Single Cells of *Candida Krusei* and *Saccharomyces Cerevisiae* Isolated from Fermented Maize Dough. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 94, no. 1. pp. 97–103.
89. SHETTY, P. H. and JESPERSEN, L. *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria as Potential Mycotoxin Decontaminating Agents. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol. 17, no. 2. pp. 48–55.
90. CHU, F. S., CHANG, C. C., ASHOOR, S. H. and PRENTICE, N. Stability of Aflatoxin B-1 and Ochratoxin A in Brewing. *Applied Microbiology*, Mar, 1975, vol. 29, no. 3. pp. 313–316. ISSN 0003-6919; 0003-6919.
91. GOVARIS, A., ROUSSI, V., KOIDIS, P. and BOTSOGLOU, N. Distribution and Stability of Aflatoxin M1 during Production and Storage of Yoghurt. *Food Additives & Contaminants*, 2002, vol. 19, no. 11. pp. 1043–1050.
92. BÖHM, J., et al. Study on Biodegradation of some A- and B-Trichothecenes and Ochratoxin A by Use of Probiotic Microorganisms. *Mycotoxin Research*, 2000, vol. 16, no. 1. pp. 70–74.
93. BIELECKI, S., TRAMPER, J. and POLAK, J. The Biodegradation of Ochratoxin A in Food Products by Lactic Acid Bacteria and Baker's Yeast. *Food Biotechnology*, 2000, vol. 17. pp. 307.

94. PIOTROWSKA, M. and ZAKOWSKA, Z. The Elimination of Ochratoxin A by Lactic Acid Bacteria Strains. *Polish Journal of Microbiology*, 2005, vol. 54, no. 4. pp. 279–286.
95. DEL PRETE, V., et al. In Vitro Removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*, 2007, vol. 70, no. 9. pp. 2155–2160.
96. KLINKE, H. B., THOMSEN, A. and AHRING, B. K. Inhibition of Ethanol-Producing Yeast and Bacteria by Degradation Products Produced during Pre-Treatment of Biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 66, no. 1. pp. 10–26.
97. SUN, Y. and CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, 2002, vol. 83, no. 1. pp. 1–11.
98. LAMED, R. and ZEIKUS, J. G. Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Relationship between Fermentation Product Yields of and Catabolic Enzyme Activities in *Clostridium Thermocellum* and *Thermoanaerobium Brockii*. *Journal of Bacteriology*, Nov, 1980, vol. 144, no. 2. pp. 569–578. ISSN 0021-9193; 0021-9193.
99. LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology*, 1997, vol. 56, no. 1. pp. 1–24.
100. MUTHAIYAN, A., LIMAYEM, A. and RICKE, S. C. Antimicrobial Strategies for Limiting Bacterial Contaminants in Fuel Bioethanol Fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, vol. 37, no. 3. pp. 351–370.
101. BALAT, M. Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials Via the Biochemical Pathway: A Review. *Energy Conversion and Management*, 2011, vol. 52, no. 2. pp. 858–875.
102. SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S. and AIKAT, K. Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview. *Renewable Energy*, 2012, vol. 37, no. 1. pp. 19–27.
103. OLIVEIRA, P. M., ZANNINI, E. and ARENDT, E. K. Cereal Fungal Infection, Mycotoxins, and Lactic Acid Bacteria Mediated Bioprotection: From Crop Farming to Cereal Products. *Food Microbiology*, 2014, vol. 37. pp. 78–95.
104. PAWLOWSKA, A. M., ZANNINI, E., COFFEY, A. and ARENDT, E. K. "5" Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2012, vol. 66. pp. 217.
105. BLAGOJEV, N., ŠKRINJAR, M., VESKOVIĆ-MORAČANIN, S. and ŠOŠO, V. Control of Mould Growth and Mycotoxin Production by Lactic Acid Bacteria Metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*, 2012, vol. 17, no. 3. pp. 7219.
106. THYAGARAJA, N. and HOSONO, A. Binding Properties of Lactic Acid Bacteria from 'Idly' towards Food-Borne Mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, 1994, vol. 32, no. 9. pp. 805–809.

107. MAGNUSSON, J., et al. Broad and Complex Antifungal Activity among Environmental Isolates of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Feb 14, 2003, vol. 219, no. 1. pp. 129–135. ISSN 0378-1097; 0378-1097.
108. FLORIANOWICZ, T. Antifungal Activity of some Microorganisms Against *Penicillium Expansum*. *European Food Research and Technology*, 2001, vol. 212, no. 3. pp. 282–286.
109. GOURAMA, H. and BULLERMAN, L. Anti-Aflatoxigenic Activity of *Lactobacillus Casei Pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, vol. 34, no. 2. pp. 131–143.
110. SINGH, T. and CHITTENDEN, C. In-Vitro Antifungal Activity of Chili Extracts in Combination with *Lactobacillus Casei* Against Common Sapstain Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, vol. 62, no. 4. pp. 364–367.
111. ROUSE, S., HARNETT, D., VAUGHAN, A. and SINDEREN, D. V. Lactic Acid Bacteria with Potential to Eliminate Fungal Spoilage in Foods. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, vol. 104, no. 3. pp. 915–923.
112. DALIÉ, D., DESCHAMPS, A., ATANASOVA-PENICHON, V. and RICHARD-FORGET, F. Potential of *Pediococcus Pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf to Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth. *Journal of Food Protection®*, 2010, vol. 73, no. 6. pp. 1129–1137.
113. MUHIALDIN, B. J., HASSAN, Z. and SADON, S. K. Antifungal Activity of *Lactobacillus Fermentum* Te007, *Pediococcus Pentosaceus* Te010, *Lactobacillus Pentosus* G004, and *L. Paracasi* D5 on Selected Foods. *Journal of Food Science*, 2011, vol. 76, no. 7. pp. M493–M499.
114. GOURAMA, H. Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus Flavus* in the Presence of *Lactobacillus* Species, *ETD Collection for University of Nebraska – Lincoln*. Paper AAI9208107. 1991.
115. KARUNARATNE, A., WEZENBERG, E. and BULLERMAN, L. B. Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* Spp. *Journal of Food Protection®*, 1990, vol. 53, no. 3. pp. 230–236.
116. SCHATZMAYR, G., et al. Detoxification of Mycotoxins by Biotransformation. *The Mycotoxin Factbook*, 2006. pp. 363–375.
117. KARLOVSKY, P. Biological Detoxification of the Mycotoxin Deoxynivalenol and Its Use in Genetically Engineered Crops and Feed Additives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 91, no. 3. pp. 491–504.
118. EL-NEZAMI, H., POLYCHRONAKI, N., SALMINEN, S. and MYKKANEN, H. Binding rather than Metabolism may Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and its Derivative (')Alpha-Earalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, Jul, 2002, vol. 68, no. 7. pp. 3545–3549. ISSN 0099-2240; 0099-2240.

119. FUCHS, S., et al. Detoxification of Patulin and Ochratoxin A, Two Abundant Mycotoxins, by Lactic Acid Bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 4. pp. 1398–1407.
120. NIDERKORN, V., BOUDRA, H. and MORGAVI, D. Binding of Fusarium Mycotoxins by Fermentative Bacteria in Vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, vol. 101, no. 4. pp. 849–856.
121. CIEGLER, A., LILLEHOJ, E. B., PETERSON, R. E. and HALL, H. H. Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Applied Microbiology*, Nov, 1966, vol. 14, no. 6. pp. 934–939. ISSN 0003-6919; 0003-6919.
122. ŠTYRIAK, I., et al. The use of Yeast for Microbial Degradation of some Selected Mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 2001, vol. 17, no. 1. pp. 24–27.
123. BENNETT, G., LAGODA, A., SHOTWELL, O. and HESSELTINE, C. Utilization of Zearalenone-Contaminated Corn for Ethanol Production. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981, vol. 58, no. 11. pp. 974–976.
124. SCOTT, P., et al. Fermentation of Wort Containing Added Ochratoxin A and Fumonisin B1 and B2. *Food Additives & Contaminants*, 1995, vol. 12, no. 1. pp. 31–40.
125. TORRES, P., GUZMÁN-ORTIZ, M. and RAMÍREZ-WONG, B. Revising the Role of pH and Thermal Treatments in Aflatoxin Content Reduction during the Tortilla and Deep Frying Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no. 6. pp. 2825–2829.
126. GIRISH, C. and DEVEGOWDA, G. Efficacy of Glucomannan-Containing Yeast Product (Mycosorb®) and Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate in Preventing the Individual and Combined Toxicity of Aflatoxin and T-2 Toxin in Commercial Broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2006, vol. 19, no. 6. pp. 877.
127. YIANNIKOURIS, A. and JOUANY, J. Mycotoxins in Feeds and their Fate in Animals: A Review. *Animal Research*, 2002, vol. 51, no. 2. pp. 81–99.
128. KOGAN, G. and KOCHER, A. Role of Yeast Cell Wall Polysaccharides in Pig Nutrition and Health Protection. *Livestock Science*, 2007, vol. 109, no. 1. pp. 161–165.
129. KABAK, B. and DOBSON, A.D. Biological Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins. *Journal of Food Protection®*, 2009, vol. 72, no. 9. pp. 2006–2016.
130. JOUANY, J., YIANNIKOURIS, A. and BERTIN, G. The Chemical Bonds between Mycotoxins and Cell Wall Components of *Saccharomyces Cerevisiae* Have Been Identified. *Archiva Zootechnica*, 2005, vol. 8. pp. 26–50.
131. GRÜNKEMEIER, A. *Untersuchungen Zur Beeinflussung Der Rückstandsbildung Von Ochratoxin A Beim Schwein Durch Den Diätetischen Einsatz Von Adsorbentien*. na, 1990.

132. BEJAOU, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. Ochratoxin A Removal in Synthetic and Natural Grape Juices by Selected Oenological *Saccharomyces* Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, vol. 97, no. 5. pp. 1038–1044.
133. HASKARD, C., BINNION, C. and AHOKAS, J. Factors Affecting the Sequestration of Aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, vol. 128, no. 1. pp. 39–49.
134. EL-NEZAMI, H., KANKAANPÄÄ, P., SALMINEN, S. and AHOKAS, J. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *Journal of Food Protection*®, 1998, vol. 61, no. 4. pp. 466–468.
135. EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S. and AHOKAS, J. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind a Common Food Carcinogen, Aflatoxin B 1. *Food and Chemical Toxicology*, 1998, vol. 36, no. 4. pp. 321–326.
136. UPADHAYA, S. D., PARK, M. and HA, J. Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, vol. 23, no. 9. pp. 1250–1260.
137. GALTIER, P. Biotransformation and Fate of Mycotoxins. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 1999, vol. 18, no. 3–4. pp. 295–312.
138. WESTBY, A., REILLY, A. and BAINBRIDGE, Z. Review of the Effect of Fermentation on Naturally Occurring Toxins. *Food Control*, 1997, vol. 8, no. 5. pp. 329–339.
139. KARLOVSKY, P. Biological Detoxification of Fungal Toxins and Its Use in Plant Breeding, Feed and Food Production. *Natural Toxins*, 1999, vol. 7, no. 1. pp. 1–23.
140. SWEENEY, M.J. and DOBSON, A. D. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 43, no. 3. pp. 141–158.
141. MOSS, M. O. and THRANE, U. *Fusarium* Taxonomy with Relation to Trichothecene Formation. *Toxicology Letters*, 2004, vol. 153, no. 1. pp. 23–28.
142. STARKL, V. *Biotransformación, Adsorción, Bioprotección-Tres Estrategias Combinadas Garantizan el Éxito en el Control de Micotoxinas*, 2008.
143. JUODEIKIENE, G., BARTKIENE, E., BASINSKIENE, L. and MATUSEVICIUS, P. *Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
144. ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. and VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 5. pp. 1078–1099.

145. MADHYASTHA, M., et al. Comparison of Toxicity of Different Mycotoxins to Several Species of Bacteria and Yeasts: Use of *Bacillus Brevis* in a Disc Diffusion Assay. *Journal of Food Protection*®, 1994, vol. 57, no. 1. pp. 48–53.
146. GARDA, J., et al. Alcoholic Fermentation Effects on Malt Spiked with Trichothecenes. *Food Control*, 2005, vol. 16, no. 5. pp. 423–428.
147. SCOTT, P., KANHERE, S., DALEY, E. and FARBER, J. Fermentation of Wort Containing Deoxynivalenol and Zearalenone. *Mycotoxin Research*, 1992, vol. 8, no. 2. pp. 58–66.
148. BENNETT, G. and RICHARD, J. Influence of Processing on Fusarium Mycotoxins in Contaminated Grains. *Food Technology (Chicago)*, 1996, vol. 50, no. 5. pp. 235–238.
149. MCKENZIE, K., et al. Oxidative Degradation and Detoxification of Mycotoxins Using a Novel Source of Ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 1997, vol. 35, no. 8. pp. 807–820.
150. TIWARI, B., et al. Application of Ozone in Grain Processing. *Journal of Cereal Science*, 2010, vol. 51, no. 3. pp. 248–255.
151. CULLEN, P., TIWARI, B., O'DONNELL, C. and MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling Approaches to Ozone Processing of Liquid Foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, vol. 20, no. 3. pp. 125–136.
152. O'DONNELL, C., TIWARI, B. K., CULLEN, P. and RICE, R.G. *Ozone in Food Processing*. John Wiley & Sons, 2012.
153. FIELDS, P. G. and WHITE, N. D. Alternatives to Methyl Bromide Treatments for Stored-Product and Quarantine Insects 1. *Annual Review of Entomology*, 2002, vol. 47, no. 1. pp. 331–359.
154. MURDOCH, J. C. and SANDLER, T. The Voluntary Provision of a Pure Public Good: The Case of Reduced CFC Emissions and the Montreal Protocol. *Journal of Public Economics*, 1997, vol. 63, no. 3. pp. 331–349.
155. CHAMP, B. and DYTE, C. FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests. *FAO Plant Protection Bulletin*, 1977, vol. 25, no. 2. pp. 49–67.
156. RAJENDRAN, S. and SRIRANJINI, V. Plant Products as Fumigants for Stored-Product Insect Control. *Journal of Stored Products Research*, 2008, vol. 44, no. 2. pp. 126–135.
157. KELLS, S. A., MASON, L. J., MAIER, D. E. and WOLOSHUK, C. P. Efficacy and Fumigation Characteristics of Ozone in Stored Maize. *Journal of Stored Products Research*, 2001, vol. 37, no. 4. pp. 371–382.
158. MASON, L. J., STRAIT, C. A., WOLOSHUK, C. P. and MAIER, D. E. *Controlling Stored Grain Insects with Ozone Fumigation*, 1998.

159. BALAJE, M., ANTOS, P. and SADLO, S. Potential of Ozone Utilization for Reduction of Pesticide Residue in Food of Plant Origin. A Review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 2013, vol. 64, no. 1.
160. SAVI, G. D., PIACENTINI, K. C., BITTENCOURT, K. O. and SCUSSEL, V. M. Ozone Treatment Efficiency on Fusarium Graminearum and Deoxynivalenol Degradation and its Effects on Whole Wheat Grains (*Triticum Aestivum* L.) Quality and Germination. *Journal of Stored Products Research*, 2014, vol. 59. pp. 245–253.
161. WU, J., DOAN, H. and CUENCA, M. A. Investigation of Gaseous Ozone as an Anti-fungal Fumigant for Stored Wheat. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, vol. 81, no. 7. pp. 1288–1293.
162. EUROPEAN PARLIAMENT. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 Establishing a Framework for Community Action to Achieve the Sustainable use of Pesticides. *Off. J. Eur. Union*, 2009, vol. 309. pp. 71–86.
163. MCDONOUGH, M. X., et al. Ozone Application in a Modified Screw Conveyor to Treat Grain for Insect Pests, Fungal Contaminants, and Mycotoxins. *Journal of Stored Products Research*, 2011, vol. 47, no. 3. pp. 249–254.
164. SAVI, G. D., PIACENTINI, K. C., BITTENCOURT, K. O. and SCUSSEL, V. M. Ozone Treatment Efficiency on Fusarium Graminearum and Deoxynivalenol Degradation and Its Effects on Whole Wheat Grains (*Triticum Aestivum* L.) Quality and Germination. *Journal of Stored Products Research*, 2014, vol. 59. pp. 245–253.
165. BONJOUR, E. L., et al. Efficacy of Ozone Fumigation Against the Major Grain Pests in Stored Wheat. *Journal of Economic Entomology*, Feb, 2011, vol. 104, no. 1. pp. 308–316. ISSN 0022-0493; 0022-0493.
166. KHADRE, M. and YOUSEF, A. Sporicidal Action of Ozone and Hydrogen Peroxide: A Comparative Study. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, vol. 71, no. 2. pp. 131–138.
167. MULCHI, C. L., LEE, E., TUTHILL, K. and OLINICK, E. Influence of Ozone Stress on Growth Processes, Yields and Grain Quality Characteristics among Soybean Cultivars. *Environmental Pollution*, 1988, vol. 53, no. 1. pp. 151–169.
168. GRAHAM, D.M. Use of Ozone for Food Processing. *Food Technology*, 1997, vol. 51, no. 6. pp. 72–75.
169. MCCLURKIN, J. and MAIER, D. Half-Life Time of Ozone as a Function of Air Conditions and Movement. *Julius-Kühn-Archiv*, 2010, no. 425. pp. 381.
170. MAIER, D. E., et al. *Ozonation as a Non-Chemical Stored Product Protection Technology*, 2006.
171. RAILA, A., et al. Application of Ozone for Reduction of Mycological Infection in Wheat Grain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2006, vol. 13, no. 2. pp. 287–294.

172. YOUNG, J. C., et al. Reduction in Levels of Deoxynivalenol in Contaminated Wheat by Chemical and Physical Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1986, vol. 34, no. 3. pp. 461–465.
173. YOUNG, J. C., ZHU, H. and ZHOU, T. Degradation of Trichothecene Mycotoxins by Aqueous Ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, vol. 44, no. 3. pp. 417–424.
174. KOTTAPALLI, B., WOLF-HALL, C. E. and SCHWARZ, P. Evaluation of Gaseous Ozone and Hydrogen Peroxide Treatments for Reducing Fusarium Survival in Malting Barley. *Journal of Food Protection®*, 2005, vol. 68, no. 6. pp. 1236–1240.
175. KING, J. Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. *Journal of Food Science*, 2002, vol. 67, no. 8. pp. 2866–2872.
176. DWARAKANATH, C., RAYNER, E., MANN, G. and DOLLEAR, F. Reduction of Aflatoxin Levels in Cottonseed and Peanut Meals by Ozonation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1968, vol. 45, no. 2. pp. 93–95.
177. PROCTOR, A., AHMEDNA*, M., KUMAR, J. and GOKTEPE, I. Degradation of Aflatoxins in Peanut Kernels/Flour by Gaseous Ozonation and Mild Heat Treatment. *Food Additives and Contaminants*, 2004, vol. 21, no. 8. pp. 786–793.
178. ALLEN, B., WU, J. and DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2003, vol. 38, no. 5. pp. 617–630.
179. LUO, X., et al. Structure Elucidation and Toxicity Analyses of the Degradation Products of Aflatoxin B 1 by Aqueous Ozone. *Food Control*, 2013, vol. 31, no. 2. pp. 331–336.
180. ZORLUGENÇ, B., ZORLUGENÇ, F. K., ÖZTEKIN, S. and EVLIYA, I. B. The Influence of Gaseous Ozone and Ozonated Water on Microbial Flora and Degradation of Aflatoxin B 1 in Dried Figs. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 12. pp. 3593–3597.
181. CRIEGEE, R. Mechanism of Ozonolysis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1975, vol. 14, no. 11. pp. 745–752.
182. LEMKE, S. L. Assessment of the Estrogenic Effects of Zearalenone After Treatment with Ozone Utilizing the Mouse Uterine Weight Bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 1999, vol. 56, no. 4. pp. 283–295.
183. BURNS, T., SNOOK, M., RILEY, R. and VOSS, K. Fumonisin Concentrations and in Vivo Toxicity of Nixtamalized Fusarium Verticillioides Culture Material: Evidence for Fumonisin–matrix Interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 8. pp. 2841–2848.
184. GELDERBLUM, W., et al. Structure-Activity Relationships of Fumonisin in Short-Term Carcinogenesis and Cytotoxicity Assays. *Food and Chemical Toxicology*, 1993, vol. 31, no. 6. pp. 407–414.

185. STOCKMANN-JUVALA, H. and SAVOLAINEN, K. A Review of the Toxic Effects and Mechanisms of Action of Fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, Nov, 2008, vol. 27, no. 11. pp. 799–809. ISSN 0960-3271; 0960-3271.
186. BEYER, M., et al. Structural Elucidation of T-2 Toxin Thermal Degradation Products and Investigations Toward Their Occurrence in Retail Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 5. pp. 1867–1875.
187. ERIKSEN, G. S., PETTERSSON, H. and LUNDH, T. Comparative Cytotoxicity of Deoxynivalenol, Nivalenol, Their Acetylated Derivatives and De-Epoxy Metabolites. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, vol. 42, no. 4. pp. 619–624.
188. MCKENZIE, K. S., et al. Aflatoxicosis in Turkey Poults is Prevented by Treatment of Naturally Contaminated Corn with Ozone Generated by Electrolysis. *Poultry Science*, Aug, 1998, vol. 77, no. 8. pp. 1094–1102. ISSN 0032-5791; 0032-5791.
189. JUODEIKIENE, G., et al. Rapid Acoustic Screening of Deoxynivalenol (DON) in Grain. *World Mycotoxin Journal*, 2008, vol. 1, no. 3. pp. 267–274.
190. ITEA magazine. First Acoustic Equipment for Screening Mycotoxins in Cereals [interaktyvus]. 2013 [žiūrėta 2015-11-08]. Prieiga per: <https://itea3.org/publication/download/919-itea-magazine-16-web-pdf>.
191. 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, vol. 112, no. 4. pp. 732–742.
192. SUSMILK. Re-Design of the Dairy Industry for Sustainable Milk Processing [interaktyvus]. 2016 [žiūrėta 2016-01-18]. Prieiga per: <http://www.susmilk.com>.
193. TROMBETE, F., et al. Efficacy of Ozone Treatment on Mycotoxins and Fungal Reduction in Artificially Contaminated Soft Wheat Grains. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016.
194. SUN, C., et al. Saturated Aqueous Ozone Degradation of Deoxynivalenol and Its Application in Contaminated Grains. *Food Control*, 2016, vol. 69. pp. 185–190.
195. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, V. 1. (AACC Methods: 44-15A, 46-13, 30-25, 08-01), 1983.
196. INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Approved Methods of no. 105/2: Determination of Crude Protein in Cereals and Cereal Products for Food and Feed. ICC STANDARDS – Vienna, Edition., 1995.
197. MILLER, G., BLUM, R., GLENNOM, W. and BURTON, A. Measurement of Methods for Assay of Xylanase Activity. *Analytical Biochemistry*, 1959, vol. 2. pp. 127–132.

198. NGUYEN, Q. D., et al. Purification and Characterisation of Amyolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces Lanuginosus* Strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, vol. 31, no. 3. pp. 345–352.
199. SIGMA-ALDRICH. Enzymatic Assay of Protease Casein as a Substrate. Sigma Quality Control Test Procedure SS CaSE 01.001. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. [interaktyvus]. 1999 [žiūrėta 2016-01-18]. Prieiga per: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/sigma/general_information/protease_casein_substrate.par.0001.file.tmp/protease_casein_substrate.pdf
200. FAJGELJ, A. and AMBRUS, Á. *Principles and Practices of Method Validation*. Royal Society of Chemistry, 2000.
201. HORWITZ, W. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies: Revised 1994 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 1995, vol. 67, no. 2. pp. 331–343.
202. R-BIOPHARM. Ridascreen Fast DON SC a Competitive Enzyme Immunoassay for the Quantitative Analysis of Deoxynivalenol (DON) in Cereals [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2016-01-18]. Prieiga per: <https://www.gipsa.usda.gov/fgis/metheqp/instructions/r5905%20Revision%202.pdf>.
203. MATHRE, D., JOHNSTON, R. and GREY, W. Diagnosis of Common Root Rot of Wheat and Barley. *Plant Health Progress Doi*, 2003, vol. 10.
204. DABKEVIČIUS, Z. and MIKALIŪNAITĖ, R. The Effect of Fungicidal Seed Treaters on Germination of Rye Ergot (*Claviceps Purpurea* (Fr.) Tul.) Sclerotia and on Ascocarp Formation. *Crop Protection*, 2006, vol. 25, no. 7. pp. 677–683.
205. CHNAPEK, M., et al. Proteomics Analysis of Wheat and Barley Grain. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2012, vol. 1. pp. 622.
206. FINNIE, C., MELCHIOR, S., ROEPSTORFF, P. and SVENSSON, B. Proteome Analysis of Grain Filling and Seed Maturation in Barley. *Plant Physiology*, Jul, 2002, vol. 129, no. 3. pp. 1308–1319. ISSN 0032-0889; 0032-0889.
207. PAYNE, P., HOLT, L., JARVIS, M. and JACKSON, E. Two-Dimensional Fractionation of the Endosperm Proteins of Bread Wheat (*Triticum Aestivum*): Biochemical and Genetic Studies. *Cereal Chem*, 1985, vol. 62, no. 5. pp. 319–326.
208. BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2. pp. 248–254.
209. CLEVELAND, D. W., FISCHER, S. G., KIRSCHNER, M. W. and LAEMMLI, U. K. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, Feb 10, 1977, vol. 252, no. 3. pp. 1102–1106. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

210. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists: Method 68–62. AACC, St. Paul, MN, USA., 1999.
211. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. In Official Methods of Analysis, 16th Ed.; AOAC International: Arlington, VA, 1995; Sec. 982.10.
212. OKUNOWO, W. O., OKOTORE, R. O. and OSUNTOKI, A. A. The Alcoholic Fermentative Efficiency of Indigenous Yeast Strains of Different Origin on Orange Juice. *African Journal of Biotechnology*, 2005, vol. 4, no. 11.
213. KYPRIANOU, M. Commission Regulation (EC) no 1126/2007 of 28 September 2007. Amending Regulation (EC) no 1881/2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs as Regards Fusarium Toxins in Maize and Maize Products. *Official Journal of the European Union L*, 2007, vol. 255.
214. EN, B. 15662: 2008. *Foods of Plant Origin-Determination of Pesticide Residues using GC-MS And*.
215. EUROPEAN COMMISSION (2014B). Commission Regulation (EU) no. 519/2014 of 16 May 2014 Amending Regulation (EC) no. 401/2006 as Regards Methods of Sampling of Large Lots, Spices and Food Supplements, Performance Criteria for T-2, HT-2 Toxin and Citrinin and Screening Methods of Analysis. *Off J Eur Union L147*: 29–43.
216. PACKA, D., et al. Scanning Electron Microscopy of Fusarium-Infected Kernels of Winter Triticale (\times Triticosecale Wittmack). *Seed Sci Biotech*, 2008, vol. 2. pp. 27–31.
217. RICHARD, J. L. Some Major Mycotoxins and Their Mycotoxicoses—An Overview. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 119, no. 1. pp. 3–10.
218. WANG, J., PAWELZIK, E., WEINERT, J. and WOLF, G. A. Impact of Fusarium Culmorum on the Polysaccharides of Wheat Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 14. pp. 5818–5823.
219. PLACINTA, C., D'MELLO, J. and MACDONALD, A. A Review of Worldwide Contamination of Cereal Grains and Animal Feed with Fusarium Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, vol. 78, no. 1. pp. 21–37.
220. JACKOWIAK, H., PACKA, D., WIWART, M. and PERKOWSKI, J. Scanning Electron Microscopy of Fusarium Damaged Kernels of Spring Wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 98, no. 2. pp. 113–123.
221. MEYER, D., WEIPERT, D. and MIELKE, H. Effects of Fusarium Culmorum Infection on Wheat Quality. *Getreide Mehl Brot*, 1986, vol. 40. pp. 35–39.

222. BECHTEL, D., KALEIKAU, L., GAINES, R. and SEITZ, L. The Effects of Fusarium Graminearum Infection on Wheat Kernels. *Cereal Chemistry*, 1985, vol. 62, no. 3. pp. 191–197.
223. KESHRI, G. and MAGAN, N. Detection and Differentiation between Mycotoxigenic and Non-mycotoxigenic Strains of Two Fusarium spp. Using Volatile Production Profiles and Hydrolytic Enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, vol. 89, no. 5. pp. 825–833.
224. ROBERTI, R., et al. Antagonistic Fungi Producing Hydrolytic Enzymes, Active in Degrading the Cell Wall of some Foot Rot Pathogens (Fusarium spp.) of Wheat / Antagonistische Pilze, Die Hydrolytische Enzyme Erzeugen, Welche Zellwandabbauende Aktivität an Einigen Erregern Der Halmbasiskrankheiten (Fusarium spp.) Des Weizens Zeigen. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 2002. pp. 101–108.
225. URBANEK, H. and YIRDAW, G. Hydrolytic Ability of Acid Protease of Fusarium Culmorum and Its Possible Role in Phytopathogenesis. *Acta Microbiologica Polonica*, 1984, vol. 33, no. 2. pp. 131–136. ISSN 0137-1320; 0137-1320.
226. NIGHTINGALE, M., et al. Fusarium Head Blight: Effect of Fungal Proteases on Wheat Storage Proteins. *Cereal Chemistry*, 1999, vol. 76, no. 1. pp. 150–158.
227. PEKKARINEN, A., MANNONEN, L., JONES, B. and NIKU-PAAVOLA, M. Production of Proteases by Fusarium Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins. *Journal of Cereal Science*, 2000, vol. 31, no. 3. pp. 253–261.
228. KANG, Z. and BUCHENAUER, H. Ultrastructural and Cytochemical Studies on Cellulose, Xylan and Pectin Degradation in Wheat Spikes Infected by Fusarium Culmorum. *Journal of Phytopathology*, 2000, vol. 148, no. 5. pp. 263–275.
229. PAWELZIK, E., PERMADY, H., WEINERT, J. and WOLF, G. Untersuchungen Zum Einfluß Einer Fusarien-Kontamination Auf Ausgewählte Qualitätsmerkmale Von Weizen. *Getreide, Mehl Und Brot*, 1998, vol. 52, no. 5. pp. 264–266.
230. BROWNE, R., et al. Evaluation of Components of Fusarium Head Blight Resistance in Soft Red Winter Wheat Germ Plasm Using a Detached Leaf Assay. *Plant Disease*, 2005, vol. 89, no. 4. pp. 404–411.
231. DE WOLF, E., MADDEN, L. and LIPPS, P. Risk Assessment Models for Wheat Fusarium Head Blight Epidemics Based on within-Season Weather Data. *Phytopathology*, 2003, vol. 93, no. 4. pp. 428–435.
232. CARUSO, C., et al. Induction of Pathogenesis-Related Proteins in Germinating Wheat Seeds Infected with Fusarium Culmorum. *Plant Science*, 1999, vol. 140, no. 1. pp. 87–97.

233. YANG, F., SVENSSON, B. and FINNIE, C. Response of Germinating Barley Seeds to Fusarium Graminearum: The First Molecular Insight into Fusarium Seedling Blight. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, vol. 49, no. 11. pp. 1362–1368.
234. TUTELYAN, V. A. Deoxynivalenol in Cereals in Russia. *Toxicology Letters*, 2004, vol. 153, no. 1. pp. 173–179.
235. PAUL, P., LIPPS, P. and MADDEN, L. Meta-Analysis of Regression Coefficients for the Relationship between Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Content of Wheat. *Phytopathology*, 2006, vol. 96, no. 9. pp. 951–961.
236. CEN TECHNICAL REPORT. CEN/TR 16059:2010. Food Analysis – Performance Criteria for Single Laboratory Validated Methods of Analysis for the Determination of Mycotoxins., 2010.
237. COMMISSION, E. EC 1881–2006, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006, vol. 12. pp. 364–388.
238. TIPPLES, K.H. Quality and Nutritional Changes in Stored Grain. *Stored Grain Ecosystems*, 1995. pp. 325–351.
239. ATHIÉ, I., et al. Effects of Carbon Dioxide and Phosphine Mixtures on Resistant Populations of Stored-Grain Insects. *Journal of Stored Products Research*, 1998, vol. 34, no. 1. pp. 27–32.
240. LI, M., GUAN, E. and BIAN, K. Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Quality Evaluation of Ozonised Wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, vol. 32, no. 4. pp. 544–553.
241. MENDEZ, F., MAIER, D., MASON, L. and WOLOSHUK, C. Penetration of Ozone into Columns of Stored Grains and Effects on Chemical Composition and Processing Performance. *Journal of Stored Products Research*, 2003, vol. 39, no. 1. pp. 33–44.
242. RICHARD, Y. and BRENER, L. Removal of Ammonia and Other Nitrogen Derivatives from Drinking Water with Ozone. *Handbook of Ozone Technology and Applications*, 1984, vol. 2.
243. GUZEL-SEYDIM, Z. B., GREENE, A. K. and SEYDIM, A. Use of Ozone in the Food Industry. *LWT-Food Science and Technology*, 2004, vol. 37, no. 4. pp. 453–460.
244. ZOU, Z., HE, Z., LI, H. and HAN, P. Foreign Research Progress on Trichothecenes and Microbes of Detoxification [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, vol. 8. pp. 94.
245. BALLESTEROS, M., et al. Ethanol from Lignocellulosic Materials by a Simultaneous Saccharification and Fermentation Process (SFS) with *Kluyveromyces*

Marxianus CECT 10875. *Process Biochemistry*, 2004, vol. 39, no. 12. pp. 1843–1848.

246. KHATIBI, P. A., et al. Conversion of Deoxynivalenol to 3-Acetyldeoxynivalenol in Barley-Derived Fuel Ethanol Co-Products with Yeast Expressing Trichothecene 3-O-Acetyltransferases. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, vol. 4, no. 1. pp. 1.

247. TURBIC, A., AHOKAS, J. and HASKARD, C. Selective in Vitro Binding of Dietary Mutagens, Individually or in Combination, by Lactic Acid Bacteria. *Food Additives & Contaminants*, 2002, vol. 19, no. 2. pp. 144–152.

248. SCHILIRÒ, E. Stress Proteins and Identification of Interacting Partners in the Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum*. PhD Thesis. Universität Zu Köln, 2000.

249. PUKALSKAS, A. *Naujausių mokslinių pasiekimų maisto produktų biotechnologijos srityje mokslinė studija „Maisto gamybos biotechnologija“*, 2007.

250. WHITEHEAD, M. and FLANNIGAN, B. The Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol and Yeast Growth and Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 1989, vol. 95, no. 6. pp. 411–413.

251. FOSZCZYŃSKA, B. and DZIUBA, E. Physiological Status of Brewing Yeast during Fermentation of Worts Contaminated with Mycotoxins. *DAS and OTA. Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, 2007, vol. 6, no. 2. pp. 25–34.

252. MOERS, K., COURTIN, C. M., BRIJS, K. and DELCOUR, J. A. A Screening Method for Endo-B-1, 4-Xylanase Substrate Selectivity. *Analytical Biochemistry*, 2003, vol. 319, no. 1. pp. 73–77.

253. REINEHR, C. O. and FURLONG, E. B. Profile of the Alcohols Produced in Fermentations with Malt Contaminated with Trichothecenes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2003, vol. 46, no. 4. pp. 587–593.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai, susiję su disertacijos tema, Mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters Web of Knowledge) duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose

1. Reinholds, Ingars; Juodeikienė, Gražina; Bartkienė, Elena; Žadeikė, Daiva; Bartkevics, Vadims; Krunglevičiūtė, Vita; Černauskas, Darius; Čižeikienė, Dalia. Evaluation of ozonation as a method for mycotoxins degradation in malting wheat grains // World mycotoxin journal. Wageningen: Wageningen Academic Publishers. ISSN 1875-0710. 2016, vol. 9, no. 3, p. 409–417. [IF: 2,157, AIF: 2,218 (E, 2014)].
2. Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Černauskas, Darius; Bartkienė, Elena; Čižeikienė, Dalia. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis // Catalysis today. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0920-5861. 2015, vol. 239, p. 11–16. [IF: 3,893, AIF: 3,252 (E, 2014)].
3. Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Černauskas, Darius; Klupšaitė, Dovilė; Bartkienė, Elena; Petrauskas, Audrius; De Koe, Willem J. Recent advances in the rapid acoustic screening of deoxynivalenol in wheat grains // World mycotoxin journal. Wageningen: Wageningen Academic Publishers. ISSN 1875-0710. 2014, vol. 7, no. 4, p. 517–525. [IF: 2,157, AIF: 2,218 (E, 2014)].
4. Juodeikienė, Gražina; Černauskas, Darius; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta. Combined fermentation for increasing efficiency of bioethanol production from *Fusarium* sp. contaminated barley biomass // Catalysis today. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0920-5861. 2014, vol. 223, iss. 1, p. 108–114. [IF: 3,893, AIF: 3,252 (E, 2014)].

Straipsniai kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose

1. Černauskas, Darius; Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta. Pieno rūgšties bakterijų ir mielių įtaka *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais pažeistų miežių fermentacijai ir detoksikacijai // Cheminė technologija / Kauno technologijos universitetas. Kaunas: KTU. ISSN 1392-1231. 2012, nr. 2(60), p. 50–56.

Kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose paskelbti straipsniai Periodiniuose leidiniuose ir vienkartinuose straipsnių rinkiniuose ir kt. paskelbti straipsniai

1. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Vidmantienė, Daiva; Černauskas, Darius; Petrauskas, Algimantas; Bartkienė, Elena; De Koe, Willem J. Single laboratory validation of acoustic method for screening *Fusarium* mycotoxins in cereals // Науково-технічний бюлетень = Scientific and technical bulletin of Institute of Animal Biology and State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives. Львів: Інститут біології тварин. 2013, вип. 14, no. 3–4, p. 275–285.

KITOS PUBLIKACIJOS

1. Juodeikienė, Gražina; Bartkienė, Edita; Čižeikienė, Dalia; Žadeikė, Daiva; Černauskas, Darius; Krunglevičiūtė, Vita; Bartkevics, Vadims. Effect of antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria for detoxification of *Fusarium* spp

- mycotoxins in malting wheat grain // BIO-ECO 2016 : Challenges in building a sustainable biobased economy, 6–9 March, 2016, Rotterdam, The Netherlands.
2. Christoph, Glasner; Reichl, Norbert; Juodeikienė, Gražina; Dikiy, Alexander; Foncesa, Cezar; Diberardino, Santino; Bartkienė, Elena; Černauskas, Darius; Žadeikė, Daiva. Application of biotools for recycling of dairy by-products to stereospecific lactic acid and lactose free substrate // IDF World dairy summit 2015 : Closing the nutritional gap with sustainable dairy, Vilnius, Lithuania, September 20–24, 2015, p. [1].
 3. Černauskas, Darius; Juodeikienė, Gražina; Žadeikė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena. Impact of antimicrobial bio-products on the base of dairy by-product on the quality of malted grains // Foodbalt-2015 : 10th Baltic conference on food science and technology "Future food: innovations, science and technology", May 21–22, 2015, Kaunas, Lithuania : abstract book / Kaunas University of Technology. Department of Food Science and Technology. Kaunas: KTU, 2015, ISBN 9786090211380. p. 29.
 4. Juodeikienė, Gražina; Černauskas, Darius; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Edita. Antimicrobial activities of BLIS producing lactic acid bacteria in combination with acoustic screening of mycotoxins to increase malting grains safety and quality // Healthy grain for a healthy diet : 20th international scientific conference : book of abstracts / Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE), 2015, p. [1].
 5. Juodeikienė, Gražina; Černauskas, Darius. Acoustic wave application for malting wheat grains safety in relationship with their microstructure // 14th European young cereal scientists and technologists workshop, 15–17th April, 2015, University of Copenhagen, Denmark : book of abstracts, 2015, p. 23.
 6. Černauskas, Darius; Juodeikienė, Gražina. Akustinių bangų pritaikymas salyklinių kviečių grūdų kokybės ir saugos analizei // Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai [elektroninis išteklius] : 5-oji jaunųjų mokslininkų konferencija, 2015 m. vasario 10 d. : pranešimų tezės / Lietuvos mokslų akademija.
 7. Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Černauskas, Darius; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma; Mankevičienė, Audronė. Novel antifungal lactic acid bacteria bioproducts for health of cereal grains // 7th International Congress Flour - Bread'13. 9th Croatian Congress of Cereal Technologists : Brašno-Kruh'13, Opatija, Croatia, October 16–18, 2013 : book of abstracts / Faculty of Food Technology Osijek University of Osijek, ICC – International Association for Cereal Science and Technology. Osijek: University of Osijek. ISSN 1848-2554. 2013, p. 21.
 8. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Vidmantienė, Daiva; Černauskas, Darius; Petrauskas, Algimantas; Bartkienė, Elena; De Koe, Willem J. Single laboratory validation of acoustic method for screening mycotoxins in cereals // 7th International Congress Flour - Bread'13. 9th Croatian Congress of Cereal Technologists : Brašno-Kruh'13, Opatija, Croatia, October 16–18, 2013 : book of abstracts / Faculty of Food Technology Osijek University of Osijek, ICC - International Association for Cereal Science and Technology. Osijek: University of Osijek. ISSN 1848-2554. 2013, p. 44.
 9. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena; Vidmantienė, Daiva; Čižeikienė, Dalia; Černauskas, Darius. Enzymatic hidrolisis of agro-industrial wastes to C6-C5 sugars for biotechnological production of lactic acid // UBIOCHEM IV : Utilization of Biomass for Sustainable Fuels & Chemicals : 4th International Workshop of COST Action CM0903, October 14–16, 2013, Valencia,

- Spain : book of abstracts. Valencia: Institute of Chemical Technology, 2013. p. 52.
10. Juodeikienė, Gražina; Černauskas, Darius; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Edita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta. Acoustic sensing of don in malting cereal grains // Foodbalt-2013 : 8th Baltic conference on food science and technology "Food, health and well-being", May 23–24, 2013, Tallinn, Estonia : conference programm and abstracts / Tallinn University of Technology. Tallinn: Tallinn University of Technology, 2013, ISBN 9789949430635. p. 29.
 11. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Vidmantienė, Daiva; Černauskas, Darius; Bartkienė, Elena; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta. Effect of microorganisms on the conversion of *Fusarium* sp. contaminated barley biomass to bioethanol // COST Action CM0903: Utilization of biomass for sustainable fuels and chemical (UBIOCHEM) : Sustainable production of fuels /energy, materials and chemicals from biomass : UBIOCHEM-III workshop, November 1–3, 2012, Thessaloniki, Greece : book of abstracts / Chemical Process and Energy Resources Institute, Centre for Research and Technology Hellas, Aristotle University of Thessaloniki, COST Action CM0903. 2012, p. 71.
 12. Černauskas, Darius; Juodeikienė, Gražina. Biotechnologinių priemonių įtaka *Fusarium* spp. mikroskopiniams grybais pažeistų grūdų fermentacijai ir detoksikacijai // Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai : jaunųjų mokslininkų konferencijos pranešimų tezės / [Lietuvos mokslų akademijos žemės ūkio ir miškų mokslų skyrius], 2012. p. 60–61.

INFORMACIJA APIE DISERTACIJOS AUTORIŲ

Darius Černauskas, g. 1987-11-04, Kaunas, Lietuva

1994–2006 m. Kauno Petrašiūnų vidurinė mokykla, vidurinis išsilavinimas

2006–2010 m. Kauno technologijos universitetas, chemijos inžinerijos bakalauro laipsnis

2010–2012 m. Kauno technologijos universitetas, maisto technologijų magistro laipsnis su pagyrimu

2012–2016 m. Kauno technologijos universitetas, chemijos inžinerijos (05T) doktorantūros studijos

Moksliniai interesai: grūdų ir jų produktų cheminiai ir technologiniai tyrimai, biotechnologinių naujovių vystymas.

El. paštas cernauskas.darius@gmail.com

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. habil. dr. Gražinai Juodeikienei už disertacijos temos idėją, nuoširdžias ir vertingas mokslines konsultacijas rengiant publikacijas ir disertaciją, už pasitikėjimą, palaikymą ir visapusišką pagalbą atliekant mokslinį darbą, už paskatinimus, rūpinimąsi visos doktorantūros metu ir nuolatinį skatinimą tobulėti. Dėkoju visiems Maisto mokslo ir technologijos katedros ir Fraunhoferio molekulinės biologijos ir taikomosios ekologijos instituto kolegoms už kūrybišką nuotaiką, moralinį palaikymą, supratimą ir šypsenas. Esu dėkingas Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą. Šilčiausius padėkos žodžius skiriu savo šeimai už kantrybę, stiprų moralinį palaikymą, supratingumą ir meilę.

UDK 663.43 (043.3)

SL344. 2017-01-19, 14,25 leidyb. apsk. I. Tiražas 18 egz. Užsakymas 53.
Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas