



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**BIOTECHNOLOGINIŲ PRIEMONIŲ MIKOTOKSINŲ
DETOKSIKACIJAI KVIEČIŲ PRODUKTUOSE
ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Elvidas Aleksandrovas

Projekto autorius

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**BIOTECHNOLOGINIŲ PRIEMONIŲ MIKOTOKSINŲ
DETOKSIKACIJAI KVIEČIŲ PRODUKTUOSE
ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Elvidas Aleksandrovas

Projekto autorius

(parašas)
(data)

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

(parašas)
(data)

Doc., dr. Dalia Čižeikienė

Recenzentė

(parašas)
(data)

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Elvidas Aleksandrovas

Biotechnologinių priemonių mikotoksinų detoksikacijai kviečių produktuose įvertinimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Elvido Aleksandrovo, baigiamasis projektas tema „Biotechnologinių priemonių mikotoksinų detoksikacijai kviečių produktuose įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Aleksandrovas, Elvidas. Biotechnologinių priemonių mikotoksinų detoksikacijai kviečių produktuose įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Daiva Žadeikė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: kviečių miltų frakcijos, mikotoksinais, detoksikacija, fermentacija, mikroorganizmai.

Kaunas, 2019. 65 p.

Santrauka

Šiame darbe aptariami grūdų apdorojimo etapai apima pirminį apdorojimą (paruošimą ir malimą) ir antrinę perdirbimo procedūrą (pvz., raugų fermentaciją). Viena tyrimų dalis skirta skirtingų metų derliaus kviečių grūdų mėginių išorinio ir vidinio (po valymo) užkrėtimo mikroskopiniais grybais įvertinimui ir šių mikroorganizmų rūšių identifikavimui. Ypatingas dėmesys skirtas malimo proceso ir biotechnologinių veiksnių (mikrobinės fermentacijos) poveikio DON ir kitiems mikotoksiniams kviečių produktuose įvertinimui.

Išorinio ir vidinio kviečių grūdų mėginių užsikrėtimo mikroskopinių grybų gentimis tyrimo rezultatai parodė, kad daugiausia vyravo *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* ir *Verticillium* gentys, iš kurių *Fusarium* spp. ir *Alternaria* spp. buvo pagrindinės aptiktos ir vidinio užsikrėtimo atveju. Frakcionavimas po malimo statistiškai patikimai ($p < 0,05$) sumažino deoksinivalenolio (DON) koncentraciją gautose modelinėse malimo frakcijose (37,2 – 64,1 %), į smulčiausią frakciją ($< 213 \mu\text{m}$) pereinant mažiausiems DON kiekiams. Tačiau tyrimas parodė, kad to nepakanka pilnos rizikos suvaldymui, nes kiti mikotoksinais koncentruojasi smulkesnėse malimo frakcijose, o DON daugiausia lieka stambiausių dalelių frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$). Fermentacija atrinktomis pieno rūgšties bakterijų padermėmis leido visiškai pašalinti arba efektyviai sumažinti DON kiekį, lyginant su pradine DON koncentracija: po 48 h fermentacijos DON kiekis sumažėjo 80,5 – 95,2 %, fermentuojant *L. plantarum* LUHS135 ir 81,2 – 94,9 %, fermentuojant *P. acidilactici* LUHS236 didelio užkrėtimo malimo frakcijas. Taip pat nustatyta, kad fermentuojant mažo užsikrėtimo frakcijas *L. plantarum* LUHS135 ir *P. acidilactici* LUHS236, 15-AcDON, AOH, D3G ir HT-2 toksinai nustatyti žemiau aptikimo ribos ($p < 0,05$).

Apibendrinant tyrimo rezultatus, galima teigti, kad tik kompleksiskai taikant fizinius būdus (grūdų valymas, malimas ir frakcionavimas) grūdų apdorojimui ir biotechnologines priemones (fermentacija atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis), galima būtų žymiai sumažinti arba visiškai pašalinti DON ir kitų mikotoksinų kiekius kvietiniuose fermentuotuose pusgaminiuose, taip padidinant kvietinių kepinių saugą.

Aleksandrovas, Elvidas. The Evaluation of Biotechnological Solutions on Mycotoxin Detoxification in Wheat-based Foods. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Daiva Žadeikė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: wheat flour fractions, mycotoxins, detoxification, fermentation, microorganisms

Kaunas, 2019. 65 p.

Summary

In this work, the stages of grain processing as preparation for milling and fractionation and secondary process (e.g. sourdough fermentation) been evaluated. One part of the research aimed at evaluating the external and internal (post-cleaning) contamination of wheat grain samples of different years by microscopic fungi and identification of these species. Special attention paid to the bread making and assessment of the influence of milling process and biotechnological factors (microbial fermentation) on DON and other mycotoxins in wheat products.

Results of analysis of an external and internal infection of wheat grains by microscopic fungi showed that the main genus were *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. and *Verticillium* spp., of which *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. were the main contaminants found also in the case of internal infection of the grains. Fractionation after grinding statistically significantly reduced ($p < 0.05$) the deoxynivalenol (DON) concentration in the model milling fractions (37.2 – 64.1 %), as the lowest levels of DON transfer to the smallest fraction ($< 213 \mu\text{m}$). However, the study showed that this is not sufficient to control the risk, as other mycotoxins are concentrated in smaller milling fractions, while DON remains predominantly in the largest particle fraction ($> 500 \mu\text{m}$). Fermentation with selected strains of lactic acid bacteria allowed complete elimination or effective reduction of DON levels compared to initial levels: after 48 h fermentation, DON levels decreased by 80.5 – 95.2 % during fermentation of high contamination level milling fractions with *L. plantarum* LUHS135, and by 81.2 – 94, 9 % during fermentation with *P. acidilactici* LUHS236. It was been founded that after fermentation of low contamination level samples with *L. plantarum* LUHS135 and *P. acidilactici* LUHS236, the contents of 15-AcDON, AOH, D3G and HT-2 toxin were detected below the detection limit ($p < 0.05$).

Summarizing the results of the study, it can be stated that only by applying physical methods (cleaning, milling and fractionation) for grain treatment and biotechnological means (fermentation with selected lactic acid bacteria), it would be possible to significantly reduce or completely eliminate DON and other mycotoxins in wheat-based fermented products, thus increasing the safety of wheat bread.

TURINYS

Santrumpų sąrašas	8
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Grūdinės žaliavos naudojamos duonos gamyboje charakteristika.....	10
1.2. Mikroskopinių grybų išplitimas javų grūduose	11
1.3. Pagrindiniai mikotoksinai, jų struktūra ir toksiškumas.....	14
1.3.1. Deoksinivalenolis.....	14
1.3.2. Zearelenonas	16
1.3.3. Fumoniziniai	17
1.3.4. Kiti mikotoksinai.....	18
1.4. Užkrėtimo mikroskopiniais grybais poveikis technologiniams procesams	19
1.5. Fiziniai mikotoksinų kiekio sumažinimo būdai	20
1.5.1. Grūdų rūšiavimas	20
1.5.2. Grūdų malimas ir frakcionavimas.....	20
1.5.3. Grūdų mirkymas aukštoje temperatūroje.....	21
1.5.4. Kepimas	21
1.5.5. Ekstruzija	21
1.6. Biologiniai mikotoksinų kiekio sumažinimo būdai	21
1.6.1. Fermentų panaudojimas	21
1.6.2. Mikrobinė fermentacija.....	22
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	24
2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys	24
2.2. Medžiagos	26
2.3. Tyrimo metodai.....	27
2.3.1. Drėgmės nustatymas	27
2.3.2. Pelenų kiekio nustatymas.....	27
2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas	27
2.3.4. Išorinio ir vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais nustatymas	27
2.3.5. Gyvybingų mikroskopinių grybų sporų skaičiaus nustatymas	28
2.3.6. DON kiekio nustatymas ELISA metodu.....	28
2.3.7. Mikotoksinų kiekio analizė AESCh-TOF-DSGMS (Aukšto efektyvumo skysčių chromatografija-didelės skiriamosios gebos masių spektrometrija) metodu	28
2.3.8. Fermentuotų produktų ruošimas	29
2.3.9. pH ir titruojamojo rūgštingumo nustatymas	29
2.3.10. Pieno ir acto rūgščių kiekybinis įvertinimas.....	29

2.3.11. Duomenų matematinė statistinė analizė.....	30
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	31
3.1. Mikroskopinių grybų genčių nustatymas ir jų gyvybingumo įvertinimas kviečių mėginiuose	31
3.1.1. Kviečių grūdų modelinių malimo frakcijų charakterizavimas.....	31
3.2. Kviečių grūdų mėginių užsikrėtimas mikroskopiniais grybais.....	34
3.2.1. Mikroskopinių grybų gyvybingų sporų įvertinimas kviečių grūdų mėginiuose	34
3.2.2. Mikroskopinių grybų padermių kviečių mėginiuose identifikavimas ir užsikrėtimo jomis įvertinimas	37
3.3. Mikotoksinų kiekio grūdų mėginiuose ir jų pasiskirstymo grūdų modelinėse malimo frakcijose įvertinimas	40
3.4. Skirtingo užsikrėtimo kviečių malimo produktų poveikis fermentacijos procesui.....	46
3.5. Mikroorganizmų parinkimas mikotoksinų kiekio sumažinimui kviečių produktuose.....	49
IŠVADOS	55
NAUDOTA LITERATŪRA	56
PRIEDAI	64
1 Priedas. AESCh-DSGMS analizės priklausomi parametrai.....	64
2 Priedas. AESCh-DSGMS analizės metu nustatyti mikotoksinai mėginiuose.....	64
3 Priedas. Mikotoksinų kodai ir jų pavadinimai	65

Santrumpų sąrašas

15-AcDON – 15-acetil-deoksinivalenolis

AESCh (*angl.* HPLC) – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija

AFLB₁ – aflatoksinas B₁

AFLM₁ – aflatoksinas M₁

AR – acto rūgštis

AOH – alternariolas

BTR – bendras titruojamais rūgštingumas

D3G – deoksinivalenolio-3-gliukozidas

DON – deoksinivalenolis

ENNA – eniatinas A

ENNB₁ – eniatinas B₁

FB₁ – fumonizinas B₁

GLI – gliadinai

GLU – gliuteninai

KSV/g – kolonijas sudarantys vienetai grame

L135 – *Lactobacillus plantarum* LUHS135

L140 – *Lactobacillus brevis* LUHS140

L236 – *Pediococcus acidilactici* LUHS236

L29 – *Pediococcus acidilactici* LUHS29

NIV – nivalenolis

OT – ochratoksinai

OTB – ochratoksinas B

PR – pieno rūgštis

PRB – pieno rūgšties bakterijos

s.m. – sausosios medžiagos

spp. – mikroorganizmų rūšis, įeinanti į aukštesnį taksoną

UESCh (*angl.* UFLC) – ultra efektyvioji skysčių chromatografija

ZEA – zearelenonas

ĮVADAS

Grūdiniai javai, kaip ir daugelis žemės ūkio kultūrų, patiria didelius derliaus ir kokybės nuostolius, dėl mikroskopinių grybų sukeltų ligų. Grybiniai patogenai, išsiskiriantys aukštu toksiškumo laipsniu, ne tik pažeidžia įvairius produktus visuose jų gamybos, perdirbimo ir saugojimo etapuose, bet ir kelia potencialų pavojų žmonių ir gyvulių sveikatai. Svarbiausi ir labiausiai paplitę javų grūduose yra *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* genčių mikromicetai [1].

Fusarium genties pelėsiomis užkrėstuose grūduose susidarantis medžiagas galima priskirti biologiniams inhibitoriams, kurie paveikia duonos, etanolio ir kt. technologinius procesus, susidarant nepageidaujamiems fermentacijos produktams. Be to, fuzarioziniai grūdai kelia pavojų maisto produktų saugai. Dažniausiai aptinkamas grūdiniuose javuose ir jų produktuose yra deoksinivalenolis (DON). Nors DON mažiau toksiškas, jis aptinkamas grūdinėje žaliavoje kartu su kitais mikotoksinais, pasižyminčiais didesniu toksiškumu.

Iš keturių mikotoksinų, kurių kiekiai kviečių produktuose yra reglamentuojami ES, daugiausia duomenų yra pateikiama DON, o aflatoksinai rečiau tiriama kviečių perdirbimo procese. Be to, turimi duomenys apie apdoravimo poveikį yra apibrėžti mikotoksiniams, kurių nereglamentuoja ES teisės aktai, įskaitant modifikuotus ir naujus mikotoksinius, ir tuos, kurie apima DON darinius (DON-3-gliukozidą, monoacetil-DON, norDON, depoksi-DON), nivalenolį, T-2 ir HT-2 toksinus, eniatinus, moniliforminą ir fumonizinus. DON kontrolę apsunkina mėginio paėmimo procedūros sudėtingumas ir efektyvių metodų DON analizei trūkumas, todėl nėra garantijų, kad šis mikotoksinas nepateks į maisto gamybos grandinę. Todėl išlieka aktuali priemonių paieška, šio mikotoksino kiekio mažinimui, grūdų perdirbimo technologinio proceso metu.

Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas kepinių gamybai, įvertinant kviečių perdirbimo veiksnių duonos gamyboje poveikį DON ir kitiems mikotoksiniams. Kviečių malimo produktų, gautų iš endospermo ir baltos duonos atitiktis kokybę reguliuojantiems reglamentams dažniausiai pasiekama, taikant gerąją gamybos praktiką. Viso grūdo kviečių miltų, sėlenomis ar dideliu kiekiu grūdų praturtintų kvietinių kepinių atveju tai atrodo sudėtinga ir reikalinga patobulinti perdirbimo technologijas ir (arba) naudoti aukštos kokybės grūdinę žaliavą.

Darbo tikslas – ištirti mikroskopinių grybų genčių paplitimą tiriamuose kviečių grūdų mėginiuose ir jų poveikį žaliavos technologinėms savybėms, parenkant biotechnologines priemones šio poveikio sumažinimui.

Darbe sprendžiami uždaviniai:

1. mikroskopinių grybų genčių nustatymas ir jų gyvybingumo įvertinimas kviečių grūdų mėginiuose;
2. mikotoksinų kiekio grūdų mėginiuose ir jų pasiskirstymo grūdų modelinėse malimo frakcijose įvertinimas;
3. įvairaus užkrėtimo lygio kviečių malimo produktų poveikis fermentacijos procesui;
4. biotechnologinių priemonių parinkimas mikotoksinų kiekio sumažinimui kviečių produktuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Grūdinės žaliavos naudojamos duonos gamyboje charakteristika

Kviečių grūdų gamyba pasauliniu mastu, 2015 m. pagal JAV žemdirbystės departamentą, sudarė apie 725 mln. tonų. Kviečiai taip pat yra svarbus žmogaus mitybos komponentas, ypač besivystančiose šalyse. Paprastai kviečio grūdą sudaro gemalas (2 – 3 %), sėlenos (13 – 17 %) ir endospermas (80 – 85 %). Sėlenos yra daugiasluoksnė medžiaga, sudaryta iš perikarpio, luobelės, aleurono, gemalo ir dalies krakmolingos endospermo dalelių [2]. Frakcionavimo ir grūdų malimo metu, endospermas pasiskirsto smulkioje miltų frakcijoje, sėlenos ir gemalai pašalinami kaip šalutiniai produktai. Tokiu būdu pašalinama didžioji dalis fitocheminių medžiagų, nes jos susikoncentravusios ne krakmolingame endosperme, o sėlenose ir gemaluose. Sėlenos ir gemalai, kaip antriniai maisto produktai, naudojami pašarams ir laikomi žemės ūkio atliekomis. Tačiau jie turi daug vertingų komponentų, pvz: mikroelementų, fenolinių junginių, netirpus pluošto (celiuliozė, hemiceliuliozė, ligninas) ir fitocheminių medžiagų [3,4]. Taip pat sėlenos, kaip maistinė medžiaga, naudojamos storosios žarnos mikrofloros, kurios veiklos pasėkoje, išsiskiria trumpos grandinės riebalų rūgštys (acto, propiono, sviesto), kurios veikia individo sveikatą [5,6].

Krakkolas yra pagrindinis kviečių polisacharidas (~ 80 % s.m) beveik netirpus šaltame vandenyje ir susideda iš dviejų polimerų: amilozės ir amilopektino. Amilozė ir amilopektinas yra suskirstytas į kintančius amorfinius ir kristalinius karkasus, kurie sudaro granules. Kviečių krakkolas susideda iš dviejų granulių tipų: A granulių, kurios yra disko arba lęšių formos ir kurių skersmuo yra 10 μm arba didesnis, bei B tipo granulių, kurios yra sferinės arba daugiakampės, jų skersmuo mažesnis nei 10 μm. Grūdų brandimo metu taip pat gali susidaryti C tipo granulės, mažesnės nei 5 μm [7].

Skirtingas amilozės / amilopektino santykis, krakmolo granulių struktūra ir dydis apsprendžia tešlos tekstūrą, stabilumą ir elastingumą. Vienas iš svarbesnių veiksnių ruošiant tešlą yra krakmolo granulių išsidėstymas glitimo baltymų matricoje. Krakkolas, sudarydamas su baltymais vizkoelastinę struktūrą, daugiausiai apsprendžia dujų sulaikymą, tešlos kildinimo metu, taip pat stabilizuoja duonos plutos struktūrą ir mažina retrogradacijos tikimybę. Tačiau per didelis krakmolo kiekis gali sukelti nepriimtina duonos plutos kietumą [8,9].

Kviečiuose yra ~ 5 % lipidų, kurie pasiskirstę tarp krakmolo granulių [10]. Lipidų ir krakmolo kompleksas sumažina krakmolo virškinamumą. Be to, šie kompleksai sumažina granulių brinkimą, dėl padidėjusio hidrofobiškumo. Mažesnės granulės turi didesnę lipidų kiekį, dėl didesnio bendro granulių paviršiaus ploto [11].

Kviečių tešlos klampiosios savybės leidžia jas pritaikyti įvairiems fermentuotiems duonos produktams, tačiau reikia atsižvelgti į glitimo baltymus, nes jie apsprendžia kviečių kepinų kokybę. Osborn'as, pagal tirpumą [12], suklasifikavo kviečių baltymus į albuminus ir globulinius (tirpius vandenyje ir praskiestuose druskos tirpaluose), gliadinus (tirpius alkoholyje) ir gliuteninus (tirpius praskiestose rūgštyse ar šarmuose). Glitimas sudaro 80 – 85 % baltymų nuo bendros baltymų masės. Jį sudaro gliadinai ir gliuteninai bei jų vieninteliai baltymų tipai (α -, β - ir γ -) gliadinai bei didelės molekulinės masės gliutenino subvienetai (DMM-GS) ir mažos molekulinės masės gliutenino subvienetai (MMM-GS) [13].

Vertinant kepinio kokybę, ypač svarbūs gliuteninai, kurie yra kovalentiškai sujungti į didelius, elastingus, vizkoelastinius glitimo tinklus. Gliadinas prisideda prie tešlos klampumo, o gliuteninas

prisideda prie tešlos elastingumo, todėl manoma, kad gliadinas ir gliuteninas yra labai svarbūs užtikrinant glitimo savybių pusiausvyrą (klampumo ir elastingumo). Gliadinas veikia kaip plastifikatorius, kuris paveikia tešlos klampumą ir elastingumą. Klampumas ir elastingumas yra svarbios tešlos reologinės charakteristikos [14].

Raugas ruošiamas miltų ir vandens mišinį fermentuojant mielėmis ir pieno rūgšties bakterijomis (PRB). Jis naudojamas duonos tešlos rauginimui ir gamybai [15]. Raugas prailgina kepinių galiojimo laiką, pagerina produkto savybes, didina bioaktyvių junginių kiekį ir pagerina duonos skonį bei aromatą, kuris yra svarbus vartojimą lemiantis veiksnys [16,17]. Pagal technologinį procesą, raugas klasifikuojamas į keturis tipus. Pirmo tipo rauge mielių ir PRB fermentacija vyksta spontaniškai, kai tuo tarpu antro tipo fermentacija vykdoma, naudojant startines kultūras. Trečio tipo fermentacija vyksta kaip antro tipo, tik šiuo atveju, iš raugo, yra pašalinamas vanduo. Ketvirtą tipo fermentacija vykdoma, sumaišius pirmo ir antro tipo raugus (dažniausiai vykdoma laboratorinėmis sąlygomis) [18].

PRB vystantis rauge, ženkliai sumažėja raugo pH, nes vyksta krakmolo ir baltymų hidrolizė. Tuo pat metu stimuliuojamas mielių autolizės procesas. Autolizės proceso metu, mielės išskiria amino rūgštis, kurios padidina PRB augimą. Dėl šio sinergetinio proceso tarp mielių ir PRB, produktai, kurių gamybai naudojami raugai, turi elastingesnę tekstūrą, pasižymi geresniu aromatu bei turi ilgesnį galiojimo terminą nei produktai, kurių gamybai naudojamos tik mielės. Taip pat bakteriocinai ir kitos antimikrobinės medžiagos, kurias išskiria PRB, prailgina produkto galiojimo terminą [19,20].

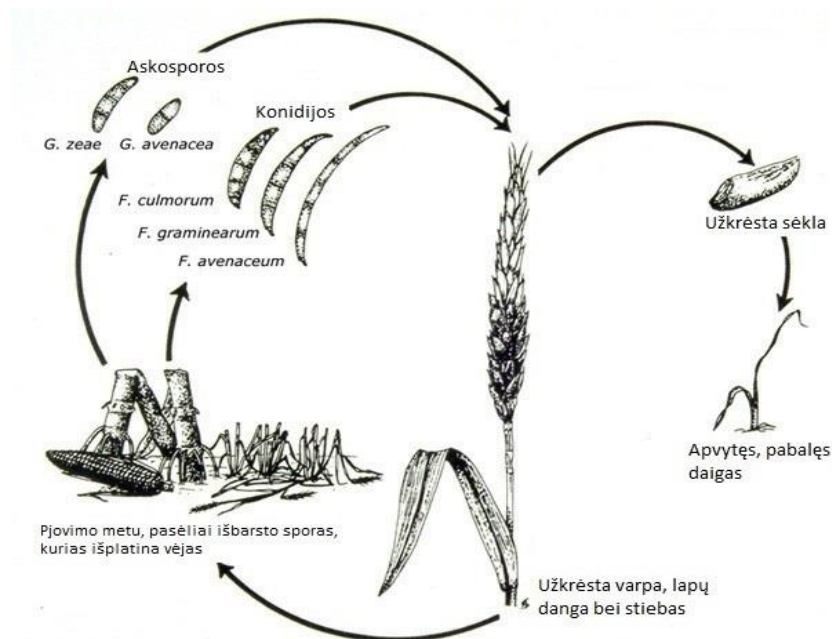
1.2. Mikroskopinių grybų išplitimas javų grūduose

Pagal Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) vertinimą, 25 % pasaulio augalininkystės produkcijos yra užteršta mikotoksinais, todėl kasmet prarandama apie 1 milijardą tonų maisto ir pašarų [21]. Bendruosius ekonominius nuostolius lemia: sumažėjęs derlius, nuvertėjusi pasėlių vertė, gyvūnų produktyvumo sumažėjimas ir žmonių ir gyvūnų sveikatos pablogėjimas bei papildomos išlaidos, susijusios su mikotoksinų prevencija, kontrole ir detoksikacija. Tokiu būdu mikotoksinais turi tvirtą ekonominį poveikį visai maisto ir pašarų pramonei. Todėl užteršimas mikotoksinais yra pasaulinė problema maisto, pašarų ir bioetanolio pramonėje. Daug metodų intensyviai vystoma, siekiant užkirsti kelią produktų užteršimui [22].

Kviečių grūduose labiausiai paplitusios mikroskopinių grybų gentys yra šios: *Aspergillus* (produkuoja AFL, OTB), *Penicillium* (produkuoja OTA), *Fusarium* (produkuoja trichotecenų tipą A: HT-2 ir T-2 toksinus, B tipą: DON, taip pat ZEA, fumonizinus B₁ ir B₂), *Claviceps* (produkuoja ergo alkaloidus) [23,24].

Sėkloms dygstant lauko sąlygomis, mikromicetais užkrečiami dygstantys javai ir sudygusios javų sėklos. Dėl didelio mikroskopinių grybų sporų paplitimo, galimybė suvalgyti mikotoksinais užkrėstą maistą žymiai išauga tada, kada sąlygos augti mikromicetams yra palankios [25,26].

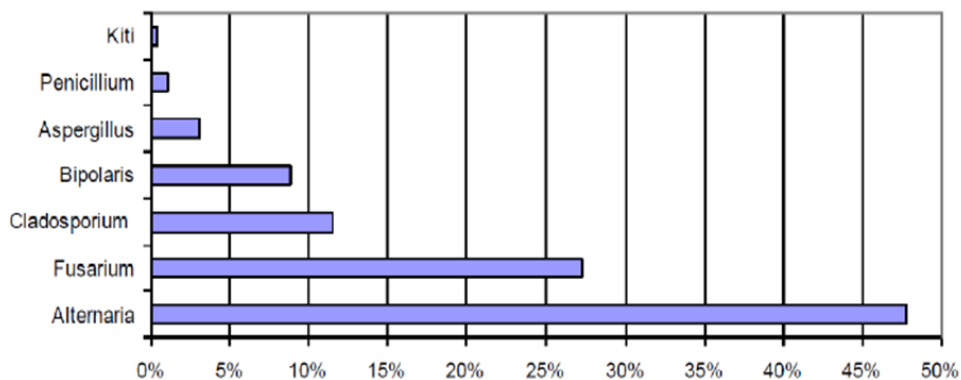
Per vienerius metus grybų sporos, kurios išplatintos vėjo, kolonizuoja augalus. Tada grybai produkuoja askosporas ir išskiria konidijas, kurios kolonizuoja kitus augalus ir apsigyvena dirvožemyje. Po derliaus nuėmimo, likę pasėlių stiebeliai yra masyviai užteršti grybais, kurie dar intensyviau teršia dirvožemį. Antraisiais metais pasėliai tampa dar labiau užteršti ir į aplinką paskleidžia dar daugiau sporų su konidijomis. (žr. 1 pav.). *Fusarium* genties rūšys yra ypatingai žalingos grūdams, nes geba prasiskverbti iki grūdo endospermo [28,29].



1 pav. Mikroskopinių grybų dauginimosi ciklas [27]

Auginimo metodai, sandėliavimo praktika ir palankios oro sąlygos (> 15 % drėgmės kiekis, 90 – 95 % santykinė drėgmė, temperatūra nuo - 8 °C iki 35 °C) nuimant derlių ir sandėliuojant grūdus, turi didelį poveikį mikroskopinių grybų sporų skaičiaus padidėjimui. Kiti faktoriai, turintys poveikį mikroskopinių grybų sporų susidarymui: mikromicetų genetika, minimalios klimatinės sąlygos (drėgmės kiekis, temperatūra), substratas, įvairių mikromicetų buvimas grūduose bei geografinė vietovės padėtis [30].

Lietuvos klimatinės sąlygos pastaraisiais metais mikroskopiniams grybams daugintis yra labai palankios. Vyrauja šios mikroskopinių grybų gentys: *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* (žr. 2 pav.) [31]. Vystymosi metu, mikroorganizmai į aplinką išskiria įvairias medžiagas: organines rūgštis, fermentus, ketonus, esterius, mikotoksinus ir kitus junginius, tačiau didžiausią susirūpinimą kelia mikotoksinai [32].



2 pav. Vyraujančios mikroskopinių grybų gentys ant Lietuvos javų laukuose subrendusių grūdų [31]

Mikotoksinai yra reikšmingas pavojus maistui ir maisto grandinei. Žmonės ilgą laiką gali būti veikiami mikotoksinų dviem būdais: tiesiogiai, vartodami augalinės kilmės maistą, ir netiesiogiai, per gyvūninės kilmės maistą [33]. Potencialūs mikotoksinai, galintys patekti į maisto produktus ar žaliavas pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Potencialūs mikotoksinai maiste ir pašaruose [34]

Žaliava	Aplinkybės	Mikotoksinai
Grūdai	Grybinė infekcija grūdams bręstant	DON, T-2, nivalenolis (NIV), ZEA, fumonizina
Kukurūzai, riešutai	Grybinė infekcija grūdams bręstant	Aflatoksinai
Kukurūzai, sorgai	Grybinė infekcija grūdams bręstant	Fumonizina
Sandėliuojami grūdai, riešutai, prieskoniai	Drėgmė, neadekvačios laikymo sąlygos	Aflatoksinai, ochratoksinai
Vaisių sultys	Vaisių pelėsis	Patulinas
Pieno produktai	Gyvūnų šėrimas pelėšiais užkrėstu pašaru	Aflatoksinas M1, citromecitinas, fumonizina
Mėsa ir kiaušiniai	Gyvūnų šėrimas pelėšiais užkrėstu pašaru	Patulinas, citrininas, ochratoksinai, citromecitinas, fumonizina
Aliejingos sėklos	Grybinė infekcija grūdams bręstant	Tenuazoinė rūgštis, alternariolas

Mikotoksinai yra nelakūs, mažos molekulinės masės junginiai, kurie dažniausiai užteršia maistą ir pašarus. Juos vartojant didelėmis koncentracijomis su maistu, pasireiškia toksinės reakcijos, kurios vadinamos mikotoksikozėmis [35]. Pagrindinės mikotoksinus produkuojančios gentys, kurios sukelia daugiausia sveikatos sutrikimų yra: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Claviceps* ir *Penicillium* (žr. 2 lent.).

Kitais atvejais, pvz., nors *Cladosporium* spp. rūšys produkuoja biologiškai aktyvius metabolitus (kladosporinas, izokladosporinas, kladospolidus A, B), tačiau šie nėra sietini su toksiškumu žmonėms ar gyvūnams [36]. Yra mikotoksinų, kurie veikia kaip antimikrobiniai agentai: penicilinas (*P. chrysogenum*), cefalosporinas ir grizeofulvinas, taip pat kaip imunosupresinėmis reakcijomis pasižymintys vaistas – ciklosporinas bei cholesterolį mažinantis vaistas – lovastatinas, priklausomai nuo mikromicetų augimo (stresinės ar įprastos) sąlygų [37].

2 lentelė. Svarbiausi mikotoksinai ir jų poveikis sveikatai [33]

Mikotoksinai	Produktas	Gentis/Rūšis	Veikimas/susirgimas
Ergo alkaloidai: ergotaminas, ergometrinas, ergozinas, ergokristinas, ergokriptinas, ergokorninas	Javai Soros	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>Cl. Fusiformis</i>	Vazokonstrikcija Gangreninis ir konvulsinis ergotizmas
Aflatoksinai: B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	Javai, riešutai, prieskoniai , figos, pienas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomenus</i> , <i>A. pseudotamarii</i>	Kancerogeninis Kepenų vėžys Imunosupresinis

2 lentelės tęsinys

Mikotoksinai	Produktas	Gentis/Rūšis	Veikimas/susirgimas
Ochratoksinai: A, B	Javai, vynas, kava, prieskoniai	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i>	Nefrotoksinis Neurotoksinis Inkstų vėžys Imunosupresinis
B tipo trichotecenai: DON, ADON, NIV, ANIV	Javai	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. crookwellence</i> , <i>F. arenaceum</i>	Imunotoksinis Stiprus toksiškumas
A tipo trichotecenai: T-2, HT-2	Smulkūs grūdai Javai	<i>Fusarium poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Imunotoksinis Nervinės sistemos ir hematologinis sutrikimas
Zearalenonas (ZEA)	Javai	<i>F. graminearium</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. equiseti</i>	Estrogeninis Reprodukcinės sistemos sutrikimai Endokrininės sistemos sutrikimai
Fumonizinais: FB ₁ , FB ₂	Kukurūzai Javai	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. moniliforme</i>	Stemplės vėžys Sfingolipidų gamybos sutrikdymas Imunosupresinis

1.3. Pagrindiniai mikotoksinai, jų struktūra ir toksiškumas

1.3.1. Deoksinivalenolis

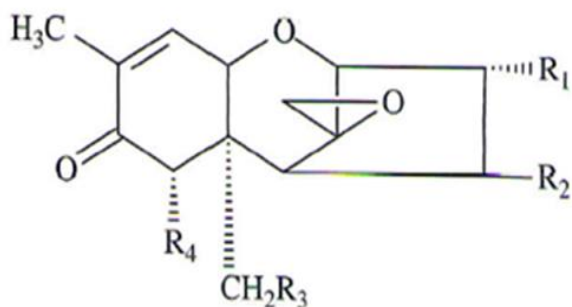
Dažniausiai aptinkamas grūdiniuose javuose ir jų produktuose deoksinivalenolis (DON) yra epoksiseskviterpenoidas – trichotecenų B klasės mikotoksinas (žr. 3 lent.), produkuojamas šių *Fusarium* rūšių: *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* [38].

3 lentelė. B tipo trichotecenų dariniai [37]

Mikotoksinas/Radikalas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoksinivalenolis	OH	H	OH	OH
Nivalenolis	OH	OH	OH	OH
Trichotecinas	H	OCOCH=CHCH ₃	H	H
Fusarenonas-X	OH	OAc	OH	OH

DON pasižymi tirpumu vandenyje ir poliniuose tirpikliuose – metanolyje ir acetonitrile. Kadangi tai chemiškai labai stabilus junginys (žr. 3 pav.), jis išsilaiko visoje maisto gamybos grandinėje, apimančioje žaliavos laikymą, paruošimą, perdirbimą ir apdorojimą. DON yra termostabilus 120 °C

temperatūroje ir dalinai atsparus, esant 210 °C; DON išlaiko stabilumą silpnai rūgščioje aplinkoje, tačiau skyla šarminėje terpėje [39].



3 pav. B tipo trichotecenų struktūra [37]

DON dažniausiai aptinkamas miežiuose ir kviečiuose ir randamas juose visame pasaulyje. DON atsiranda grūduose, kai *Fusarium* genties mikromicetai užkrečia grūdų varpas. Apie grūdų užsikrėtimą *Fusarium* genties pelėsiais galima spręsti iš sunykusios, iš žalios į baltą pasikeitusios grūdų varpos spalvos. Yra nustatyta, kad grūdams užsikrėtus šios genties mikromicetais, ženkliai sumažėja derlius [39].

DON gali pažeisti organų ląsteles, silpninti imuninę sistemą, sutrikdyti baltymų sintezę bei membranine funkciją. Taip pat sutrikdyti tarpląstelinį ryšį, sukelti ląstelių apoptozę, padidinti oksidacinį stresą bei neigiamai paveikti kalcio homeostazę organizme. Be poveikio žmonėms, net ir santykinai žemas DON kiekis grūduose turi neigiamą poveikį gyvuliams, ypač jautrios šiam toksinui kiaulės: DON dozė 30–200 µg/kg kūno masės pasireiškia vėmimu, svorio mažėjimu ir diarėja. Esant didesnėms DON dozėms, išryškėja imunotoksiškas poveikis ir įvairių audinių (virškinimo trakto, kaulų čiulpų, limfocitų) nekrozė. Nenustatytos DON karcinogeninės ir / ar genotoksinės savybės [40,41].

Europos bendrijos mokslinio bendradarbiavimo programos (SCOOP) užduoties „Duomenų apie *Fusarium* toksinų paplitimą maiste rinkimas ir jų suvartojimo su maistu visų ES valstybių narių lygiu įvertinimas“ rezultatai parodė, kad *Fusarium* toksinai plačiai paplitę maisto grandinėje. Pagrindinis su maistu suvartojamų *Fusarium* toksinų šaltinis yra iš grūdų, ypač iš kviečių ir kukurūzų, pagaminti produktai. Nepalankaus klimato metais, DON kiekis grūduose gali siekti iki 10000 µg/kg. Nors visų gyventojų ir suaugusiųjų su maistu suvartojamas *Fusarium* toksinų kiekis dažniausiai neviršija atitinkamų toksinų toleruojamos paros dozės (TPD), rizikos grupėse, pavyzdžiui kūdikių ir mažų vaikų, šis suvartojamas kiekis beveik lygus TPD, o kai kuriais atvejais netgi ją viršija. Galima rasti nemažai pranešimų apie Europoje užaugintuose grūduose randamą DON kiekį, viršijantį ES reglamente nustatytas ribas [42]

2006 m. ES priimtas naujas reglamentas, nustatantis didžiausias leistinas DON normas grūduose ir grūdų produktuose, išskyrus ryžius ir rugius bei jų produktus, kuris įsigaliojo nuo 2006 m (žr. 4 lent.). Tačiau vis labiau šiltėjant klimatui, susidaro ypač palankios sąlygos vis didesniam mikroskopinių grybų paplitimui ir vis didėja rizika grūdų, užkrėstų maksimaliai leistina norma (1250 µm/kg) patekimui į maisto gamybos grandinę, o užkrėstų daugiau, kaip maksimali leistina norma – grūdų patekimui į pašarus. Tai skatina grūdų supirkėjus būti suinteresuotais nustatyti ir pašalinti fuzarioze

užkrėstus grūdus galima ankstesnėse grūdų perdirbimo stadijose, o perdirbėjus ieškoti technologinių sprendimų užkirsti kelią DON patekimui į produktą [43].

4 lentelė. Leistinas DON kiekis grūduose ir grūdų produktuose [43]

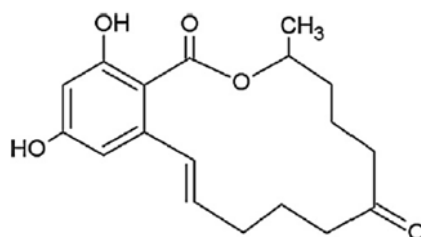
Nr.	DON grūduose ir grūdų produktuose, išskyrus ryžius ir ryžių produktus	Maksimali koncentracija ² , (µg/kg)
1.	Neperdirbti grūdai, išskyrus durum kviečius, avižas ir kukurūzus	1250
2.	Neperdirbti durum kviečiai, avižos ir kukurūzai ¹	1750
3.	Grūdų miltai, jų tarpe kukurūzų miltai, kukurūzų kruopos, kukurūzų maistas ir kiti panašūs produktai, kaip kruopmilčiai	750
4.	Duona, tortai, sausainiai, užkandžiai ir grūdų pusryčiai	500
5.	Makaronai (sausai)	750
6.	Grūdų pagrindu pagamintas kūdikių ir mažų vaikų maistas	200
1 Superkami grūdai, skirti pirmai perdirbimo stadijai.		
2 Visos maksimalios normų ribos pateiktos sausosiomis medžiagomis.		

Ekologinis ūkininkavimas neleidžia naudoti sintetinių pesticidų ir remiasi atsparių sėklų veislių naudojimu ir kai kurių žemės ūkio metodų, įskaitant sėjomainą, tręšimą mėšlu ir ženkliai mažesnę trąšų naudojimą. Priešingai šiam auginimo būdai, tradiciniai ūkiai vegetacijos laikotarpiu naudoja mineralines trąšas ir pesticidus. Pesticidų naudojimas mikrobiologiniam užteršumui mažinti grūdų gamybos ir sandėliavimo metu, taip kaip konservantų pridėjimas įvairiuose maisto produktų gamybos ir platinimo etapuose, gali lemti kenksmingų likučių buvimą galutiniuose produktuose. Priešingai, pesticidų ar konservantų nenaudojimas gali padidinti užkrėtimą mikromicetais ir dėl to galutiniuose produktuose padidinti mikotoksinų kiekį. Yra duomenų, kad ekologiškame maiste dažnai yra gana daug natūralių toksiškų junginių, kuriuos gamina grybai ar augalai, o atitinkami tradiciniai maisto produktai paprastai turi daugiau sintetinių junginių, pvz., pesticidų likučių. Be to, pesticidų ar konservantų naudojimas nepakankamu kiekiu gali lemti dar blogesnę padėtį, nes manoma, kad pelėsiiai stresinėmis sąlygomis produkuoja didesnius mikotoksinų kiekius [44,45]. Iš esmės, nors maisto produktai gauti iš įprastinės gamybos nėra laisvi nuo mikotoksinų, ekologiški maisto produktai, tam tikromis aplinkybėmis, gali kelti didesnę užteršimo riziką. Be to, kadangi yra daugiau mikroorganizmų rūšių, galinčių išsivystyti ekologinės gamybos metu (priešingai nei tradicinė žemdirbystės praktika), ekologiškuose maisto produktuose gali būti aptiktas platesnis mikotoksinų spektras nei įprastiniuose [46].

1.3.2. Zearelenonas

ZEA yra baltos spalvos, kristalinės struktūros, tirpsta 164 – 165 °C temperatūroje, netirpus vandenyje, tačiau tirpus šarme ir organiniuose tirpikliuose (žr. 6 pav.). ZEA sintezuojamas šių *Fusarium* spp. rūšių: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. ceralis*, *F. crookwellense* ir *F. Semitectum* [47]. Šios rūšys būdingos šalims, kuriose vyrauja vidutinis ir šiltas klimatas. Jos randamos beveik visose grūdinėse kultūrose visame pasaulyje. ZEA pasižymi estrogeniniu poveikiu ir yra žalingas endokrininei sistemai. ZEA priklauso *Fusarium* genties mikroskopinių grybų produkuojamiems toksinams, kurie randami maiste ir pašaruose; įtariama, kad gali sukelti ankstyvą lytinį brendimą mergaitėms [49]. Žemos temperatūros (12 – 14 °C) didina mikotoksinų išsiskyrimo lygį. Žinduoliams, ypač kiaulėms, ZEA veikia lytinį brendimą, dėl ženkliai padidėjusio ZEA estrogeninio poveikio, kas pasireiškia

gimdos, kiaušidžių atrofija, nevaisingumu, jei kiaulės su pašaru per parą gauna 1 mg/kg ZEA. Nėra jokių pranešimų apie hiperestrogenizmą žmonėms [50].



4 pav. Molekulinė zearelenono struktūra [48]

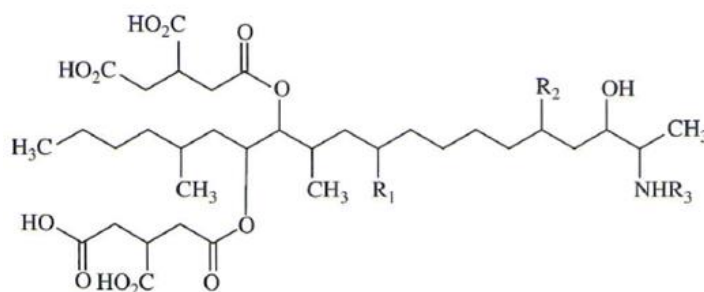
1.3.3. Fumonizinais

Fumonizinais – tai grupė mikotoksinų su labai panašia chemine struktūra į sfingozinus (pagrindiniai sfingolipidų pirmtakai) (žr. 5 lent.). Šie mikotoksinai pagrinde produkuojami *Fusarium* genties mikromicetų iš *Liseola* grupės. *Fusarium verticillioides* ir *F. proliferatum* yra pagrindinės rūšys, produkuojančios fumonizinus. Kitos rūšys produkuojančios fumonizinus: *F. napiforme*, *F. dlamini* ir *F. nygamai*. Svarbiausi iš fumonizinių yra: B₁, B₂, B₃. Labiausiai toksiškas fumonizinas yra B₁ (FB₁) [51].

5 lentelė. Fumonizinių dariniai [37]

Mikotoksinas/Radikalas	R ₁	R ₂	R ₃
Fumonizinas B ₁	OH	OH	H
Fumonizinas B ₂	H	OH	H
Fumonizinas B ₃	OH	H	H
Fumonizinas A ₁	OH	OH	COCH ₃

Cheminis FB₁ pavadinimas – 1,2,3-propantrikarboksilinė rūgštis (žr. 5 pav.). Šis mikotoksinas stipriai inhibuoja fermento ceramido, atsakingo už sfingoninų acetinimą ir sfingozinų perdirbimą, sintezę. Šių procesų sutrikdymas lemia sfingoninų kiekio padidėjimą, ko pasėkoje jie tampa citotoksiški [52].



5 pav. Fumonizinių molekulinė struktūra [37]

1.3.4. Kiti mikotoksinai

Aflatoksinai (AFL) yra priskiriami difuranokumarinų grupei, kuriuos pagrinde produkuoja dvi *Aspergillus* spp. genties rūšys: *A. flavus*, aptinkamas šiltoje, drėgnoje vietoje ir *A. parasiticus*, kuris produkuoja AFL B₁ ir G₁ [53]. Kitos *Aspergillus* spp. rūšys, kurios produkuoja aflatoksinus, yra *A. nomius*, *A. pseudotamarii* ir *A. bombycis*. Šie mikotoksinai gali atsirasti maiste dėl užsikrėtimo mikroskopiniais grybais prieš derlių bei po derliaus nuėmimo. Užsikrėtimo koeficientas ir laipsnis priklauso nuo daugelio faktorių: temperatūros, drėgmės, a_w , konkurencinės mikrobiotos ir laikymo sąlygų [54].

AFLM₁ yra pagrindinis monohidroksilintas darinys, susidarantis AFB₁ patekus į kepenis, jį paveikiant citochromo P450- susijungusiems fermentams. Žinduoliai, kurie suvartoja pašaro, kuris yra užkrėstas AFLB₁, išskiria 4-hidroksilintą metabolitą AFLM₁ tiesiogiai į pieną [55].

Optimali *Aspergillus* genties mikroskopinių grybų augimo ir mikotoksinų produkavimo temperatūra svyruoja nuo 33 °C iki 35 °C. Aukštesnės temperatūros skatina greitesnį *Aspergillus* genties mikromicetų augimą ir didesnę aflatoksinų kiekio susidarymą. Minimalios a_w vertės *A. flavus* mikromicetams produkuoti aflatoksinus yra 0,82 (drėgnis 18,4 %). *A. flavus* minimali bei maksimali AFL produkavimo temperatūra varijuoja nuo 6 iki 10 °C ir nuo 25 iki 37 °C, tačiau AFLB₁ ir B₂ optimali produkavimo temperatūra svyruoja nuo 16 iki 31 °C [56,57].

Kadangi aflatoksinas pažeidžia DNR, atsiranda didelė tikimybė susirgti onkologinėmis ligomis vartojant maistą, užterštą šiuo mikotoksinu. Aflatoksinai priskiriami prie turinčių kancerogeninį poveikį žmogaus organizmui; dažniausiai aptinkami kukurūzuose, riešutuose ir piene [58].

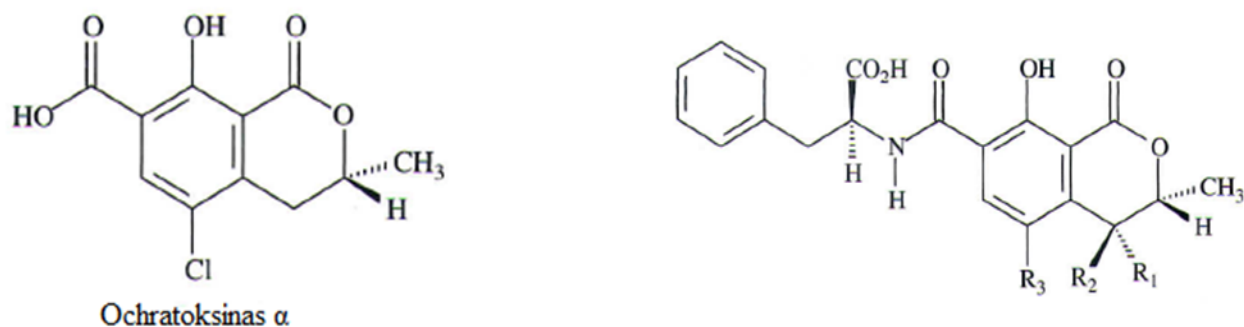


6 pav. Aflatoksinų B₁, G₂ molekulinės struktūros [37]

Ochratoksinai (OT) yra *Aspergillus*, *Penicillium* ir kai kurių *Fusarium* genčių mikromicetų apykaitos produktai. Dažniausiai aptinkami kviečiuose, riešutuose, kavos pupelėse bei razinose. Chemiškai apibūdinami kaip 3, 4-dihidroksimetilizokumarino junginiai, prisijungę prie baltymo amino grupės L-β-fenilanino (žr. 7 pav.). Šie junginiai sukelia nefrotoksinį poveikį inkstuose. Labiausiai toksiškumu pasižymi žiurkių, pelių ir vištų organizmuose, o žmonėms sukelia navikinius susirgimus, veikia kancerogeniškai. Toksiškiausias iš šios grupės yra ochratoksinas A (OTA), kuris buvo išskirtas iš *A. ochraceus*, o vėliau ir iš kai kurių *Penicillium* genties mikroskopinių grybų rūšių (*Penicillium verrucosum*, *P. nordinum*) vidutinio klimato šalyse [59-61].

Minimalus vandens aktyvumas (a_w) *A. ochraceus* produkuoti ochratoksinus yra 0,85 (drėgnis 20 %), minimali ir maksimali augimo temperatūra yra nuo 8 iki 12 °C ir nuo 24 iki 31 °C, o ochratoksinų optimali susidarymo temperatūra svyruoja tarp 25 ir 31 °C [57].

Taip pat OT yra stabilūs junginiai ir nesuskaidomi daugelio žaliavų apdorojimo procesų metu. Išlaikius 250 °C temperatūroje kelias minutes, šių mikotoksinų koncentracijas galima sumažinti [62].



7 pav. Ochratoksino α molekulinė struktūra [37]

1.4. Užkrėtimo mikroskopiniais grybais poveikis technologiniams procesams

Be ekonominės ir toksikologinės rizikos, kylančios dėl mikroskopinių grybų produkuojamų mikotoksinų kviečiuose, mikroskopiniai grybai gali sumažinti kviečių grūdų technologines savybes. Fuzariozinė infekcija gali turėti poveikį grūdų komponentams: krakmolui ir baltymams bei kepimo charakteristikoms [63,64]. Wang'as ir kt. nustatė glitimo baltymų sumažėjimą dėl fuzariozės, kas turėjo poveikį kviečių kepimo savybių blogėjimui. Užkrėtus kviečių grūdus dirbtinai mikroskopiniais grybais, buvo nustatytas sumažėjęs tiek bendras gliutenino, tiek didelės molekulinės masės gliutenino subvienetų kiekis, dėl to pablogėjo tešlos savybės ir gauta nepriimtina duonos kokybė [65].

Biocheminiai grūdų sudėties pokyčiai ir fuzariozės sukelti kviečių kokybės pokyčiai gali atsirasti dėl grybelinių fermentų ir sumažėjusios grūdų komponentų sintezės. Manoma, kad *Fusarium* spp. išskiria fermentus, tokius kaip karbohidrazės ir proteazės, kurie įsiskverbia į branduolį, tokiu būdu skaido ląstelių sienelių komponentus ir glitimo baltymus [66]. *Fusarium* spp. taip pat gali sukelti nenormalų grūdų branduolio išsivystymą, nes produkuoja micelį, kuris mechanškai blokuoja augalo rėtinus indus, ko pasėkoje grūdas nėra aprūpinamas pilnavertiškam išsivystymui reikalingomis medžiagomis [67].

Pastebimas aiškus skirtumas tarp mažai ir labai užkrėstų mikromicetais kviečių. Labai užkrėstų kviečių kepimo ir baltymų savybės ženkliai suprastėja, kai tuo tarpu mažai užkrėstų kviečių tie patys rodikliai beveik nesiskiria. *Fusarium graminearum* proteazės *in vitro* geba suskaidyti GLI ir GLU, dėl jų santykinai didesnio lizino kiekio. Nepakankama GLU subvienetų biosintezė vėlesniais branduolio vystymosi etapais ir mikotoksinų, kaip baltymų sintezės inhibitorių buvimas, taip pat gali sumažinti jo kiekį užkrėstuose kviečiuose. Dėl šių savybių gaunamas mažesnis glitimo indeksas ir gaunami prastesnės kokybės kepiniai [68].

Glitimo indeksas (GI) parodo glitimo tinklo stiprumą ir todėl yra pagrindinis parametras duonos gamybos atžvilgiu. Mikromicetais užsikrėtę mėginiai žymiai sumažina GI (glitimo indeksas) vertę, o tai rodo, kad dėl grybelinės infekcijos akivaizdžiai sumažėja glitimo tinklo stiprumas [69]. Pagal Marcus'a ir kt., nors mėginiuose su didžiausiu užkrėtimo laipsniu nustatyta mažiausia GI reikšmė, po 6 savaičių laikymo nebebuvo pastebimų skirtumų tarp 10 ir 20 % infekuotų mėginių. Didžiausias GI

sumažėjimas buvo nustatytas 10 % užsikrėtusiam mėginiui. Tai parodo, kad net ir mažas užterštumo lygis gali sukelti didelę žalą [70].

1.5. Fiziniai mikotoksinų kiekio sumažinimo būdai

1.5.1. Grūdų rūšiavimas

Saugomi grūdai, kurių branduoliai suskilę ir pažeisti, paprastai, turi didžiausią užterštumo mikotoksinais laipsnį [71]. Žemės ūkio produktų pirminis perdirbimas įprastai susideda iš rūšiavimo, mirkymo, valymo ir malimo procesų. Įprastai grūdai rūšiuojami naudojant optinius rūšiavimo įrenginius, kai grūdų srautas nukreipiamas išilgai optinių jutiklių, kur branduolys, kuris skiriasi savo spalva nuo nustatytos, pašalinamas iš srauto [72]. Grūdų užteršimas mikotoksinais yra nevienalytis, todėl pažeistų branduolių atskyrimas gali veiksmingai sumažinti užterštumą. Dažniausiai aflatoksinų kiekiams sumažinti, grūdų rūšiavimas atliekamas naudojant UV šviesą. Stebima ryškiai žalsvai geltonos spalvos fluorescencija, kuri nėra tiesiogiai nukreipiamą į aflatoksinus, bet į kojo rūgšties darinį, reakcijų metu sąveikaujantį su endogenine peroksidaze. Mikotoksinai, kurie nepasižymi matomu bruožu, riboja optinį rūšiavimą kaip galimą mikotoksinų sumažinimo strategiją. Tuo galima paaiškinti atvejus, kai mikotoksinų kiekio sumažėjimas yra nežymus [73,74].

1.5.2. Grūdų malimas ir frakcionavimas

Didžioji dalis pasaulyje išaugintų kviečių yra malami ir išskirstomi į frakcijas. Analizuojant kviečių malimo poveikį DON kiekiams malimo produktuose, nustatyta, kad šio proceso metu DON nėra visiškai pašalinamas [75–78]. Jis persiskirsto ir koncentruojasi tam tikrose malimo frakcijose. DON užterštų kviečių malimas lemia mažiau užterštų maistui skirtų frakcijų (miltų) vartojimą. Tačiau didesnė koncentracija lieka gyvūnų pašarams naudojamose frakcijose (sėlenose). Žymiai mažesni DON kiekiai miltuose gali būti siejami su sėlenų sluoksniu, kuris neleidžia DON molekulėms įsiskverbti į branduolio struktūrą [79].

DON koncentracija išorinėse dalyse kelia susirūpinimą. Nors paprastai šios dalys beveik visada naudojamos gyvūnų pašarams, kartais jos naudojamos tiesioginiam žmonių vartojimui dėl jų naudos (pagerėjusi storosios žarnos funkcija sulėtina virškinimą ir absorbuoja angliavandenius ir riebalus, taip sumažina tam tikrų ligų riziką). Atlikto tyrimo Ispanijoje su kviečiais metu buvo nustatyta, kad kviečių sėlenos gali būti DON šaltinis. Buvo nustatyta, kad 19 % kviečių sėlenų mėginių viršijo DON ES leistiną ribą (> 750 µg/kg apdorotiems kviečiams) [80].

Naujausi tyrimai, atlikti AESCh įranga, analizuojant natūraliai ir dirbtinai užkrėtus kviečius (DON kiekis nuo mažo (0,001 µg/kg) iki aukšto (3672 µg/kg)) bei skirtingus malimo metodus, parodė DON kiekio pasiskirstymą, priklausomai nuo įvairių faktorių. DON perėjimas į miltų frakciją po malimo yra labai skirtingas: nuo labai didelio (> 80 %) iki minimalaus (4 %). Šis pasiskirstymas priklauso nuo grūdų užsikrėtimo DON lygio: kuo didesnė pradinė DON koncentracija, tuo didesnis procentinis DON koncentracijos sumažėjimas, tuo mažesnis DON kiekis yra išfrakcionuotuose grūdų produktuose – miltuose, nes didesnė dalis DON lieka sėlenose [81,82]. Tačiau, esant didesniai užkrėtimui, didėja rizika, kad po malimo į miltus pereis santykinai didesnis DON kiekis. Kitas faktorius gali būti pelėsių įsiskverbimo į grūdus gylis. Nors išoriniuose grūdų sluoksniuose paprastai yra daugiau DON, pelėsiai gali įsiskverbti į grūdus, o tai baigtųsi didesne DON koncentracija vidinėje dalyje ir mažesniu DON sumažėjimu galutiniuose miltuose nei sėlenose [83-85].

1.5.3. Grūdų mirkymas aukštoje temperatūroje

Mirkymas aukštoje temperatūroje yra pirmasis etapas kukurūzų šlifavimo stadijoje ir apima kukurūzų mirkymą 36 – 50 val. 50 °C temperatūros vandenyje. Siekiant palengvinti gemalų atskyrimą ir baltymų matricos skaidymą, į vandenį pridedama nuo 0,1 iki 0,2 % SO₂ [86]. SO₂ pridėjimas taip pat skatina pieno rūgšties gamybą, kurios panaudojimas gali būti laikomas cheminiu apdorojimu. Po mirkymo pusė aflatoksinų kiekio kukurūzuose galimai pereina į skystį [86]. Fumonizinais, kurie yra labai poliniai junginiai, taip pat migruoja iš branduolių į vandenį [87]. Mirkant kukurūzų branduolius 0,2 % SO₂ tirpale (60 °C temperatūroje, 6 valandas), galima veiksmingai sumažinti FB₁. OTA vienodai pasiskirsto tarp tirpalo ir kukurūzų branduolių [88]. Sorgo grūdų mirkymas 0,2 % 60 °C NaOH tirpale sumažino aflatoksinų, fumonizinių, ZEA ir DON koncentraciją žemiau aptikimo ribos [89].

1.5.4. Kepimas

Mokslinėje literatūroje išlieka prieštaringa nuomonė dėl terminio apdorojimo poveikio mikotoksinų sumažinimui. Teigiama, kad užterštų grūdų, miltų ir sėlenų terminis apdorojimas gali sumažinti mikotoksinų kiekį juose. Tiriant OTA užterštus miltus, nustatyta, kad šis mikotoksinas yra stabilus aukštoje temperatūroje. Jo koncentracija kepimo metu nesumažėja [90,91]. Kiti tyrimai parodė, kad DON yra stabilus grūdų perdirbimo etapuose, susijusiuose su aukšta temperatūra [92,93]. Taip pat duonoje, pagamintoje iš baltų miltų, po kepimo DON koncentracija sumažėjo iki 74 %, nors Lancov ir kt. [94], Pacin'as ir kt. [95] tyrimai parodė, kad kepimo metu DON koncentracija sumažėjo labai nežymiai. DON stabilumo pokyčius kepimo proceso metu gali paveikti temperatūra, trukmė ir duonos ruošinio dydis. Didžiausia DON degradacija gali vykti duonos plutoje, kur temperatūra kepimo metu pasiekia aukščiausią tašką [91].

1.5.5. Ekstruzija

Ekstruzija yra viena iš sparčiausiai augančių maisto perdirbimo procesų, dėl savo privalumų, lyginant su tradiciniais metodais. Kukurūzų kruopų ekstruzijos metu galima pašalinti fumonizinių, aflatoksinų ir ZEA koncentracijas, atitinkamai apie 100, 95 ar 83 %, bet mažesniu lygiu pašalinama DON, ochratoksino A ir moniliformino kiekiai (atitinkamai 55, 40 ir 30 %) [96]. Accerb'as ir kt. [97] tyrimo metu pastebėtas 62 % DON kiekio sumažėjimas kviečiuose ekstruzijos metu, naudojant natrio bisulfatą, kaip tirpiklį. Nebuvo pastebėtas DON kiekio sumažėjimas, naudojant tradicinį kviečių miltų ekstruzijos būdą [98].

1.6. Biologiniai mikotoksinų kiekio sumažinimo būdai

Mikotoksinų mažinimo biologinių priemonių kūrimas apima fermentų ir/ar funkcinių bakterinių rūšių, išskirtų iš natūralių terpių, atranką, taip pat atskirų padermių, pasižyminčių mikotoksinų biotransformacijos geba išskyrimą ir identifikavimą, šių padermių fiziologinių charakteristikų įvertinimą, funkcinio poveikio mikotoksinų dezaktyvavimui pašarų / maisto gamyboje įvertinimą.

1.6.1. Fermentų panaudojimas

Kadangi trichotecenai yra stabilios molekulės, jas veikiant skirtingais būdais, tiek terminiais tiek cheminiais, pasiekiamas nežymus sumažėjimas arba nepastebimas joks koncentracijos pokytis. Kai kurie tyrimai rodo, kad mikroorganizmai, išskirti iš įvairios aplinkos, pvz: prieskrandžio, dirvožemio, gali išskirti fermentus, kurie skaido trichotecenus į deacetilintus ar epoksiduotus produktus [99].

Didžiąjai daliai (šia tema susijusių) tyrimų nepavyko identifikuoti už trichotecenų biotransformaciją atsakingų fermentų, tačiau remiantis nustatytais reakcijos produktais, manoma, kad šiame procese veikia tokie fermentai kaip: acetilazės, deacetilazės arba epoksidazės. Pastaruoju metu atlikti tyrimai parodė, kad *Sphingomonas* spp. bakterijų (EC 1.14) KSM1 štamai buvo rekonstruoti *in vitro* ir parodė gebą hidroksilinti DON, NIV ir 3-acetil-DON. Ši padermė DON katabolinį produktą 16-HDON naudoja kaip anglies šaltinį. Buvo įrodyta, kad ši sistema mažina DON fitotoksiškumą kviečiuose [100].

Vystant ZEA ir išvestinių jo formų detoksikacijos strategijas, siekta sutrikdyti jų estrogeninį aktyvumą [101]. Naudojant *Streptomyces coelicolor* lakazę kartu su fenotiazin-10 propiono rūgštimi arba metilsiringatu, kaip redokso mediatoriais, galima visiškai pašalinti ZEA 37 °C temperatūroje per 24 val. Lakazės ZEA detoksikuojantis pajėgumas buvo įvertintas, veikiant mėginius, kuriuose ZEA koncentracija buvo 6210 µg/ml, lakaze (0,4 mg/ml) 4 val. 30 °C, taip pasiekiant ZEA suskaidymą iki 81,7 % [102,103].

1.6.2. Mikrobinė fermentacija

Pramoniniu požiūriu svarbios pieno rūgšties bakterijų (PRB) rūšys yra *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ir *Lactobacillus* spp. [104]. PRB vaidina svarbų vaidmenį pasaulinėje maisto gamyboje, atlieka svarbiausias biokonversijas fermentuotuose pieno produktuose, daržovėse bei mėsoje. Jos taip pat būtinos siloso, kavos, vyno ir daugelio fermentuotų maisto produktų gamybai [105–107]. PRB pagerina maisto produktų skonį, tekstūrą ir prailgina galiojimo laiką [108].

Yra žinoma, kad naudojant atrinktas PRB, galima sumažinti toksigeninių grybų augimą. Paprastai šis antagonistinis poveikis yra susijęs su PRB pagamintais mažos molekulinės masės junginiais, tokiais kaip organinės rūgštys (acto ir pieno), vandenilio peroksidas, peptidai, reuterinas, hidroksilinės riebalų rūgštys ir fenoliniai junginiai. Organinės rūgštys gali natūraliai susidaryti maiste arba gali būti pridedamos papildomai [109-113].

Rūgštys yra angliavandenių apykaitos produktai ir yra saugios naudoti maisto konservavimui. Pieno rūgštis mažina pH, kuris slopina įvairių mikroorganizmų augimą arba netgi sunaikina jautrias bakterijas [107]. Heterofermentinio proceso metu, PRB gali gaminti acto rūgštį ir mažesniais kiekiais propiono rūgštį. PRB taip pat veikia mikromicetų membranas, tokiu būdu slopindamos aminorūgščių absorbciją. Žemas pH taip pat padidina įvairių propiono rūgšties druskų antigrybinį poveikį. Ypač didelio susidomėjimo, dėl grybų augimo slopinimo, sulaukia reuterinas – glicerolio fermentacijos produktas, kurį gamina įvairios PRB anaerobinėmis sąlygomis [114]. Reuterinas slopina *Fusarium* ir *Aspergillus* spp. rūšių augimą, slopindamas ribonukleazės fermento, dalyvaujančio DNR biosintezėje, aktyvumą [115].

PRB gali gaminti įvairių rūšių riebalų rūgštis, kurios pagerina fermentuotų produktų juslinius rodiklius. Viena iš tokių riebalų rūgščių – kaprono rūgštis, turi stiprų priešgrybinį poveikį. Ji gali veikti sinergetiniu veikimu kartu su propiono, sviesto arba valerijono rūgštimis [116].

Optimali fermentacijos trukmė, leidžianti efektyviai slopinti toksinus formuojančius grybus, yra 48 val. Kadangi optimali fermentacijos temperatūra yra 25 – 30 °C, šios sąlygos skatina organinių rūgščių gamybą, o tai savo ruožtu slopina patogeninių grybų augimą [117]. Franc'as ir kt. [118] nustatė, kad naudojant *L. plantarum*, *L. pentosus* ir *L. paracasei*, galima sumažinti DON

koncentraciją terpėje 47 – 67 %. Zou‘as ir kt nustatė, kad 48 – 72 val. fermentacijos *L. lactis*, *L. brevis*, *L. casei* ir *L. plantarum* metu, DON ir T-2 kiekiai sumažėjo nuo 100 iki 0,8 µg/ml [119].

Organinės rūgštys, tokios kaip acto, propiono, sviesto, pieno ir kt. pagal savo poveikį gali būti skirstomos į dvi grupes: pirmajai grupei priklausančios rūgštys (pieno r. ir kt.) apibūdinamos kaip pasižyminčios netiesioginiu poveikiu bakterijų populiacijoms, dėl pH sumažinimo, tuo tarpu antrajai grupei priskiriamos rūgštys (skruzdžių, acto, propiono, sorbo r.) turi tiesioginį poveikį gramneigiamų bakterijų sienelei, kai virškinamajame trakte sumažėja pH [120,121]. Aukštesnę pKa turinčioms organinėms rūgštims būdingas didesnis antimikrobinis aktyvumas. Taip pat antimikrobinis organinių rūgščių aktyvumas stiprėja, ilgėjant jų grandinei ir didėjant neprisotinimo laipsniui [122].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys

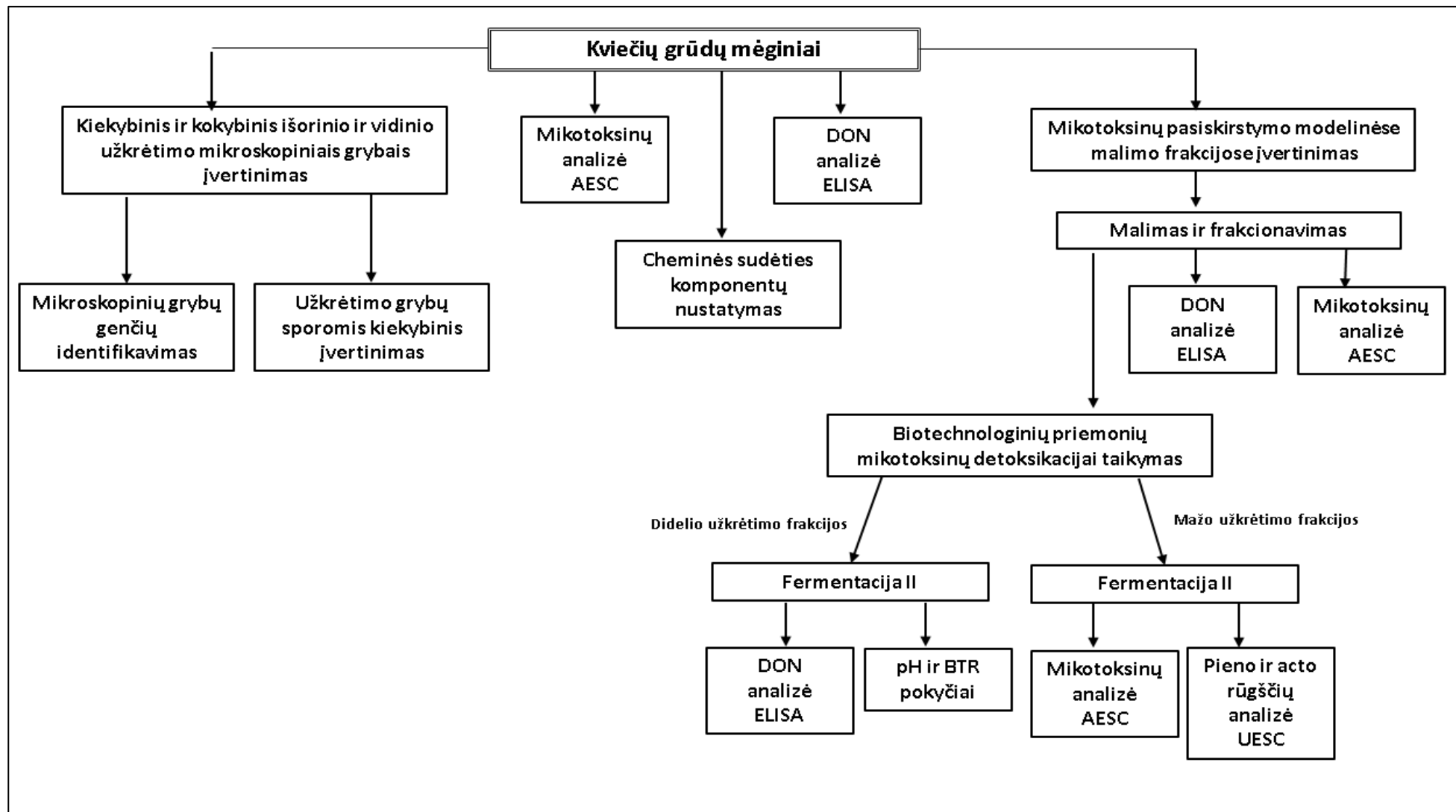
Darbas skirtas išanalizuoti DON ir kitų mikotoksinų pasiskirstymą modelinėse įvairaus užkrėtimo laipsnio kviečių grūdų malimo frakcijose bei biopremonių parinkimą šios rizikos sumažinimui.

Pirmojo etapo metu tirtuose kviečių mėginiuose (n=13) įvertintas užkrėtimas DON (ELISA) bei mikroskopinių grybų sporomis, atliktas grūdų išorinio bei vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais vertinimas ir jų genčių identifikavimas. Grūdai suskirstyti į grupes pagal užkrėtimo DON lygį ir naudoti malimo modelinių sistemų sudarymui bei PRB fermentacijos eksperimentuose.

Antrojo etapo metu analizuotas DON kiekio pasiskirstymas modelinėse grūdų malimo frakcijose (sėlenų ir miltų), įvertinant žaliavos drėgnį, baltymų bei pelenų kiekius. Atrinktos malimo frakcijos fermentacijos PRB eksperimentui atlikti.

Trečiojo etapo metu analizuotos biotechnologinės priemonės mikotoksinų detoksikacijai kviečių produktuose, naudojant PRB padermes, kurios pasižymi antigrybiniu poveikiu [123]. Eksperimento metu vertintas įvairaus užkrėtimo lygio kviečių malimo produktų poveikis fermentacijos procesui (pH, BTR ir pieno bei acto rūgščių susidarymui (UESCh metodu), optimizuotos fermentacijos sąlygos ir parinktos PRB padermės, pasižyminčios didžiausiu detoksikuojančiu poveikiu DON ir kitiems mikotoksiniams, kurių kiekiai buvo vertinti ELISA ir AESCh (*angl.* HPLC).

Pagrindinių tyrimų schema pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Pagrindinės tyrimų kryptys

2.2. Medžiagos

Grūdinė žaliava. Eksperimentui naudoti 2017 (n=10) ir 2018 (n=3) metų derliaus kviečių grūdų mėginiai, gauti iš AB „Kauno grūdai“ malūno (žr. 2.1 lent.). Mėginiai laikyti - 18 °C temperatūroje iki tyrimų atlikimo pradžios. Eksperimentui atlikti, kviečių grūdų mėginiai (200 g) sumalti laboratoriniu valciniu malūnu (Miag Braunschweig, Masch. Nr 960082, Vokietija) ir išfrakcionuoti į tris frakcijas, naudojant sietinę purtyklę (Haver EML Digital plus, Haver & Boecker, Vokietija), kur susmulkintos grūdų dalys horizontalioje plokštumoje, pusapskritimiu sukiojamos 3 minutes, vibracijos amplitudei esant 2,5. Gautos frakcijos: I frakcija – surinkta ant 500 µm diametro akučių sieto, II frakcija – praėjusi pro 500 µm ir likusi ant 213 µm diametro akučių sieto; III frakcija – praėjusi pro 213 µm diametro akučių sietą. Kiekviename mėginyje nustatyti pagrindiniai cheminės sudėties komponentai ir įvertintas deoksinivalenolio (DON) kiekis ELISA metodu. Gautos kviečių malimo frakcijos laikytos 4 °C temperatūroje plastikinėje pakuotėje.

2.1 lentelė. Gautų mėginių charakteristika

Mėg. Nr	Baltymai, %	Drėgnis, %	Glitimas, %	Sedimentacija, ml	Kraskmolai, %	Hektolitro masė, kg/hl	Kritimo skaičius, s
2017 m.							
1.	13,37	14,01	26,8	49,4	66,7	78,1	138
2.	13,7	13,2	25,5	49,5	66,6	77,8	180
3.	12,8	15,01	26,8	40,9	68,2	80,8	351
4.	13,7	13,4	27,2	48,4	65,2	75,9	439
5.	14,7	16,2	30,6	63,9	65,5	75,5	283
6.	13,7	13,4	27,2	48,8	65,2	75,9	439
7.	13,6	17,9	24,3	60,1	67,4	72,01	417
8.	13,3	14,7	21,7	44,3	65,6	74,9	319
9.	14,2	15,4	28,9	56,4	67,6	78,6	356
10.	13,2	14,1	26,1	47,8	67,2	80,9	416
2018 m.							
1.	14,1	13,8	28,4	52,4	65,7	79,2	317
2.	14,3	13,6	28,6	50,3	66,9	75,3	297
3.	13,7	12,3	28,2	55,7	65,6	81,4	411

Mikroorganizmai. Kviečių žaliavos fermentacijai naudotos pieno rūgšties bakterijų *Pediococcus acidilactici* LUHS29 ir LUHS236 (L29 ir L236), bei *Lactobacillus brevis* LUHS140 (L140), ir *Lactobacillus plantarum* LUHS135 (L135) padermės, gautos iš LSMU kolekcijos [124]. Mikroorganizmai laikyti - 80 °C temperatūroje (Microbank, PRO-LAB DIAGNOSTICS), prieš naudojimą atgaivinti, kultivuojant 24 val. MRS terpėje (CM0359, Oxoid Ltd) 35 °C temperatūroje.

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. Drėgmės nustatymas

Drėgnis nustatytas pagal LST EN ISO 712:2010 [125], džiovinant mėginį 105 °C temperatūroje iki pastovios masės. Drėgmės kiekis apskaičiuotas iš mėginio masės skirtumo po džiovinimo santykio su mėginio mase prieš džiovinimą ir išreikštas g/100 g mėginio pagal formulę:

$$\text{Drėgmės kiekis \%} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100; \quad (1)$$

čia:

m_0 – tiriamosios ėminio dalies masė prieš džiovinimą gramais; m_1 – išdžiovintos tiriamosios ėminio dalies masė gramais.

2.3.2. Pelenų kiekio nustatymas

Pelenų kiekis nustatytas pagal AOAC metodą [126]. Mėginiai (5 g) pasverti 0,001 g tikslumu ir kaitinti tigluose, mufelinėje krosnyje 550 °C temperatūroje 24 val. Gauti pelenai po atvėsinimo pasverti ir įvertintas jų kiekis mėginyje pagal formulę:

$$\text{Pelenų kiekis (\%)} = \frac{\text{Susidariusių pelenų masė}}{\text{Pasverto mėginio masė}} \times 100 \quad (2)$$

2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas

Baltymų kiekis grūduose nustatytas Kjeldalio metodu (AOAC 960.5209) [127]. Tiriamojo produkto mėginys ($1 \pm 0,01$ g) mineralizuotas 20 ml koncentruota H_2SO_4 , naudojant katalizatorių. Gautas tirpalas distiliuotas (Behr, Labor-Technik GmbH, Vokietija). Distiliatas nutitruotas 0,1N HCl tirpalu, įlašinus Taširo indikatoriaus (indikatorius titravimo metu žalia spalva pakinta į violetinę). Lygiai tomis pačiomis sąlygomis nudistiliuotas ir nutitruotas toks pat kiekis koncentruotos sieros rūgšties (tuščias mėginys). Iš tiriamojo produkto mėginio išsiskyręs azoto (N) kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = \frac{1,4 * n * k * (V_1 - V_0)}{m} (\%)$$

$$\text{Baltymų kiekis} = N \times 5,70 (\%)$$

čia: 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 N HCl; V_1 – 0,1N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml; V_0 – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml; n – HCl molinė ekvivalentų koncentracija, N; k – koeficientas, lygus 1; 5,70 – koeficientas, naudojamas azoto kiekiui perskaičiuoti į baltymų kiekį kviečiuose; m – analizei pasvertas medžiagos kiekis, g.

2.3.4. Išorinio ir vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais nustatymas

Išorinio ir vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais vertinimas atliktas tiesioginio sėjimo ant mielių-gliukozės agaru su chloramfenikoliu (*angl.* Yeast glucose chloramphenicol agar) (Liofilchem srl, Italija) [128]. Išoriniam užsikrėtimui įvertinti, iš kiekvieno grūdų mėginio, atsitiktiniu būdu atrinkta 10 grūdų ir steriliu pincetu tolygiai išdėliota Petri lėkštelėse ant terpės su chloramfenikoliu. Vidiniam užsikrėtimui įvertinti, pasvertas grūdų mėginys (10 g) sudėtas į marlinį maišelį,

dezinfekuotas 70 % etilo spiritu 3 min. Tuomet praplautas distiliuotu vandeniu ir atsitiktiniu būdu atrinkti grūdai (10 vnt.) steriliu pincetu išdėlioti ant agarų su chloramfenikoliu Petri lėkštelėse (9 grūdai aplink lėkštelę ir 1 viduryje). Lėkštelės inkubuotos 7 – 10 parų 25 ± 2 °C temperatūroje. Mikromicetų morfologiniai požymiai vertinti šviesiniu mikroskopu, identifikuojant grybų genčių kolonijas pagal Lugauskas ir kt. [129] rekomendacijas. Identifikuotų mikroskopinių grybų genčių kolonijų kiekis procentais apskaičiuotas pagal jomis užkrėstų grūdų skaičių.

2.3.5. Gyvybingų mikroskopinių grybų sporų skaičiaus nustatymas

Kviečių užterštumas gyvybingomis mikroskopinių grybų sporomis nustatytas skiedimo metodu, naudojant mielių-gliukozės agarą su chloramfenikoliu (*angl.* Yeast glucose chloramphenicol agar) (Liofilchem srl, Italija) pagal LST ISO 21527-1:2008 [128].

Tyrimui atlikti, grūdų mėginys (10 g) steriliomis sąlygomis purtomas su 90 ml steriliu, distiliuotu vandeniu, 20 min. kambario temperatūroje. Mėgintuvėliuose atliekami atitinkami grybų sporų suspensijos skiedimai. Atliekami trys lygiagretūs sėjimai į Petri lėkšteles su agaru užpylimo būdu, naudojant po 1 ml gauto tirpalo. Lėkštelės inkubuotos 10 parų 25 ± 2 °C temperatūroje. Užaugusios kolonijos skaičiuotos ir vertintos 7 – 10 mikroskopinių grybų vystymosi paromis.

2.3.6. DON kiekio nustatymas ELISA metodu

DON koncentracija grūdų malimo frakcijose nustatyta, naudojant RIDASCREEN® FAST DON ELISA testą. Tai fermentinis imunologinis tyrimo metodas, skirtas greitam DON kiekio nustatymui, kurio pagrindas yra antigeno-antikūno sąveika. Testo akutės yra padengtos fiksuojančiais antikūnais, nukreiptais prieš DON antikūnus. DON standartai supilstomi į testo akutes koncentracijos didėjimo tvarka. Paeiliui supilstomi mėginių filtratai, gauti 5 g mėginio sumaišius su 95 ml distiliuoto vandens ir maišant 5 min magnetine maišykle ir gautą skystį nufiltruojant pro Whatman No.1 filtrą. Analizei į testo akutes įpilamas konjugatas ir DON antikūnai. Po 5 minučių, skystis nupilamas ir pridedama po 250 µl praplovimo buferio, po purtymo, buferis nupilamas, o procedūra pakartojama du kartus. Pašalinus visą skystį, į testo akutes pridedama po 100 µl substrato/chromogeno tirpalo, purtoma ir inkubuojama 3 min kambario temperatūroje tamsoje. Po 3 min pridedama po 100 µl „STOP“ reagento į kiekvieną testo akutę ir purtoma. Absorbcijos vertės išmatuojamos per 10 min nuo „STOP“ reagento įdėjimo, naudojant mikroplokštelių skaitytuvą (Fluostar Omega BMG Labtech, KT 11891694), esant $\lambda = 450$ nm bangos ilgiui. Pagal sudarytą DON standartinės tiesės lygtį ($y = -0,0001x + 1,7723$; $R^2 = 0,9998$) apskaičiuojamas DON kiekis mėginiuose.

2.3.7. Mikotoksinų kiekio analizė AESCh-TOF-DSGMS (Aukšto efektyvumo skysčių chromatografija-didelės skiriamosios gebos masių spektrometrija) metodu

Mėginio paruošimas. Mėginiai buvo paruošti, naudojant modifikuotą GLPEPS (greitas, lengvas, pigus, efektyvus, patikimas, saugus), (*angl.* QuEChERS – quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) metodą [130]. Tiriamasis (5 g) mėginys sumaišomas su 10 ml acetonitrilo ir 20 µl skruzdžių rūgštimi. Mišinys maišomas 10 min. Po to pridedama: 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g tribazinio citrato dihidrato ir 0,5 g dvigubo natrio citrato seskvihidrato. Maišoma ir centrifuguojama 10 min, esant 3000 aps/min. Po to 6 ml acetonitrilo ekstrakto išskiriama į kietą fazę (d-SPE) (į vamzdelį, kuriame yra 450 mg PAS, 900 mg MgSO₄ anhidrido ir 150 mg C₁₈ sorbento). Fazė maišoma 1 min ir centrifuguojama, esant 3000 aps/min. Supernatantas (4 ml) išgarinamas azoto sraute, esant 50 °C temperatūrai. Sausas ekstraktas ištirpinamas 150 µl vandens/metanolio tirpale (6/4 v/v), turinčiame

0,1 % skruzdžių rūgštis. Mišinys maišomas 5 min. Prieš analizę mėginiai nufiltruojami per 0,20 µm PVDF filtrą ir analizuojami.

Mikotoksinų AESCh - DSGMS (HPLC-TOF-HRMS), su lėkio trukmės masių analizatoriumi (*angl.* time of flight - TOF) (Bruker, Vokietija), analizei atlikti naudota UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Vokietija) AESCh (HPLC) sistema. Chromatografinis junginių atskyrimas atliktas, naudojant atvirkštinės fazės analitinę kolonėlę (Kinetex C18, 1,7 µm, 100 Å, 50 × 3,00 mm; Phenomenex, JAV), esant 0,35 ml/min srautui. Judanti fazė sudaryta iš 0,5 mM amonio acetato ir 0,1 % vandeninio skruzdžių rūgštis tirpalo (A komponentas) ir 0,5 mM amonio acetato su 0,1 % skruzdžių rūgštimi metanolyje (B komponentas). Mikotoksinų atskyrimas buvo atliekamas C18 kolonėlėje izokratiniu režimu eliuuojant B ir A komponentų judriomis fazėmis. Automatinio mėginių ėmiklio temperatūra 14 °C, o kolonėlės temperatūra 40 °C. Injekcijos tūris 15 µL.

Analizė atlikta pilno nuskaitymo režimu, kai m/z teigiamų jonų skenavimo diapazonas nuo 50 iki 1000. Šaltinio parametrai buvo tokie: kapiliarinė įtampa 4,5 kV; desolvacijos dujų temperatūra 200 °C; azoto srautas 10 l/min; purkštuvo dujų srauto slėgis 2 bar. Nuo analizės priklausomi parametrai yra išvardyti 1 priede. Masės tikslumas, lyginant su teorinėmis vertėmis, buvo priimtinas, esant rekomenduojamam diapazonui ≤ 5 ppm m/z ≥ 200 [131].

2.3.8. Fermentuotų produktų ruošimas

Analizuojant DON poveikį raugų fermentacijos procesui, taikyta fermentacija (masės drėgnis < 65 %) *Pediococcus acidilactici* (L29 ir L236), *Lactobacillus brevis* (L140), *L. plantarum* (L135) pieno rūgštis bakterijų padermėmis, pasižyminčiomis antigrybiniu aktyvumu [132]. Analizei atrinkti 2017 m. derliaus didžiausią, vidutinį ir mažą DON kiekį turinčių kviečių malimo frakcijų mėginiai bei mėginys iš 2018 m. derliaus ($100 \pm 0,01$ g) palyginimui. Mėginiai sumaišyti su dist. vandeniu santykiu 1:2 ir, įpylus 2 % (w/v) gryną pieno rūgštis bakterijų suspensijos, fermentacija vykdyta termostate anaerobinėmis sąlygomis (Sheldon Manufacturing, Inc, Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Olandija), 35 ± 1 °C temperatūroje. Mėginiai atrinkti po 24 ir 48 val pH, bendro titruojamo rūgštingumo bei DON kiekybinei analizei, bei po 48 h fermentacijos platesnei mikotoksinų spektro analizei atlikti.

2.3.9. pH ir titruojamojo rūgštingumo nustatymas

Analizei atlikti, mėginys (5 g) sumaišytas su 50 ml dist. vandens ir filtruotas pro popierinį filtrą. pH matuotas tiesiogiai elektrodu, naudojant pH-metrą. Titruojamasis rūgštingumas nustatytas pagal LST 1553:1998 [133], titruojant 0,1 N NaOH, naudojant fenolftaleino indikatorius, ir išreikštas 1 N NaOH ml kiekiu, reikalingu nutitruoti rūgštims, esančioms 100 g mėginio.

2.3.10. Pieno ir acto rūgščių kiekybinis įvertinimas

Organinių rūgščių nustatymui 10 g mėginio ir 40 ml distiliuoto vandens homogenizuota (9500 aps/min; 2 min) ir centrifuguota (2500 aps/min; 20 min). Supernatantas atskirtas ir filtruotas per 0,22 µm porų membraninį filtrą ir naudotas chromatografiniai analizei. Etaloniniai organinių rūgščių standartų tirpalai ruošti, ištirpinus atitinkamą organinės rūgštis standartą (Sigma-Aldrich, Vokietija) distiliuotame vandenyje, skiedžiant iki 100 ml (L-pieno rūgštis koncentracija 3,307 g/L; acto rūgštis – 2,136 g/L). Organinių rūgščių kiekybinis tyrimas atliktas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) (*angl.* UFLC) metodu, naudojant Shimadzu LC-20AD chromatografinę

sistemą su diodų matricos detektoriumi ir Lab Solutions programine įranga (Shimadzu Corp., Japonija). Tiksliniams junginiams atskirti naudota atvirkščių fazių kolonėlė Hydrosphere C18 (5 μ m, 12 nm), 150 \times 4.6 I.D. (YMC Co., Ltd., Japonija). Judančioji fazė: 20 mM Na₂HPO₄ buferis, pH reguliuojamas fosforo rūgštimi iki 2.5. Eliuento tekėjimo greitis 1,0 ml/min, temperatūra 40 °C, injekcijos tūris 5 μ l, UV detekcijos bangos ilgis 210 nm.

2.3.11. Duomenų matematinė statistinė analizė

Tirtųjų rodiklių vidutinės vertės, vidutinių verčių paklaidos (\pm) ir standartinio nuokrypio vertės (σ) apskaičiuotos, naudojant MS Excel 2013 programinį paketą. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti naudota dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška, naudojant statistinės programos OriginLabPro 8 (OriginLab Co., One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, JAV). Koreliacijos stiprumas matuotas pagal Pearson'a. Matuojamų parametrų vidurkių tarp duomenų grupių įvertinimui taikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (ANOVA). Faktoriaus reikšmingumo lygmuo nustatytas pagal Fišerio (F) kriterijų, esant patikimumui 95 %. Rezultatai laikomi statistiškai patikimais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe atlikti tyrimai, siekiant įvertinti grūdų pirminio apdorojimo (paruošimą ir malimą) ir antrinio perdirbimo proceso (raugų fermentacijos) poveikį DON ir kitų mikotoksinų kiekiui kviečių produktuose bei pasirinktų biologinės kilmės priemonių panaudojimą šiai rizikai sumažinti.

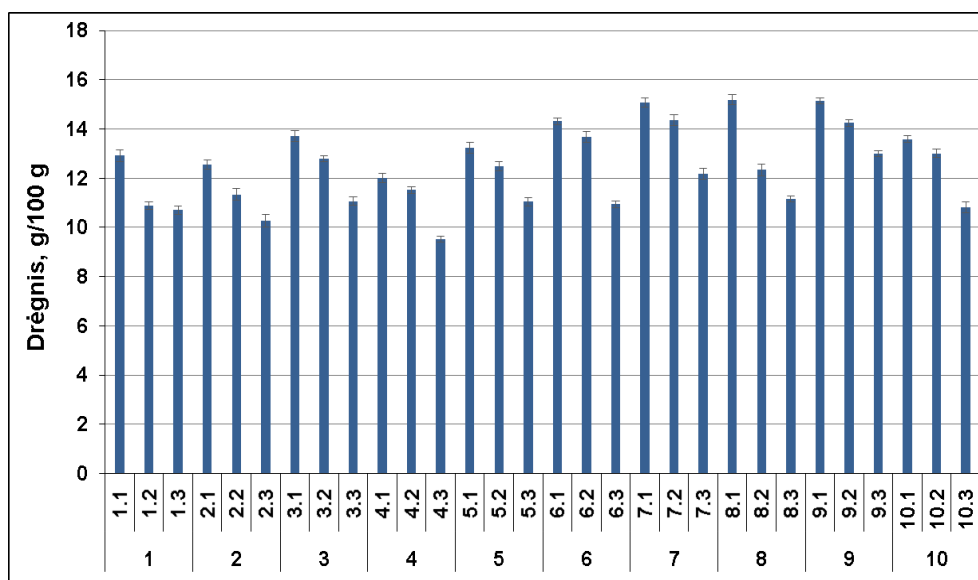
3.1. Mikroskopinių grybų genčių nustatymas ir jų gyvybingumo įvertinimas kviečių mėginiuose

3.1.1. Kviečių grūdų modelinių malimo frakcijų charakterizavimas

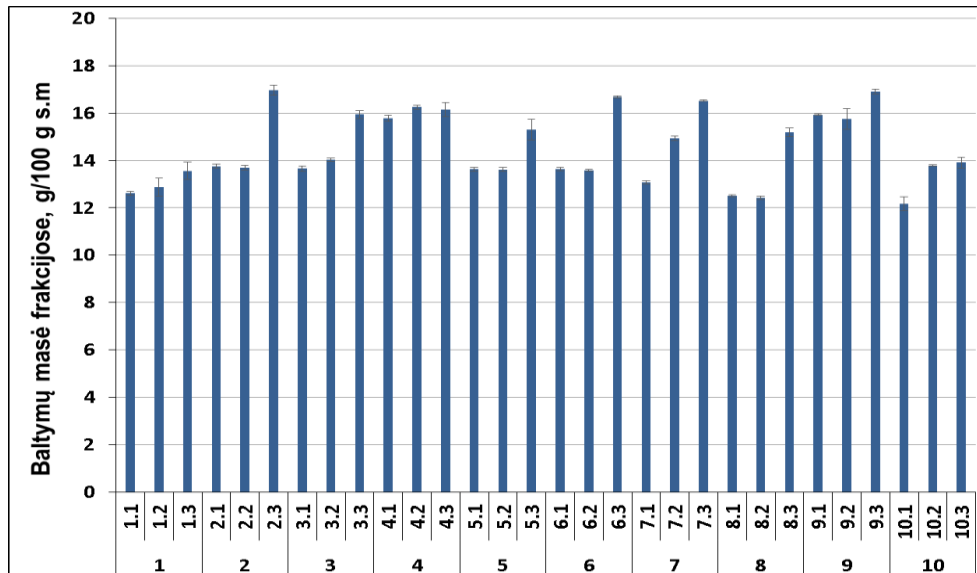
Atlikus modelinių kviečių malimo frakcijų analizę, nustatyta, kad 1-oje ($> 500 \mu\text{m}$) ir 2-oje ($213 - 500 \mu\text{m}$) frakcijose drėgmės kiekis svyravo, atitinkamai nuo $13,77 \pm 0,35 \text{ g/100 g}$ ($\sigma = 1,13$) iki $12,66 \pm 0,38 \text{ g/100 g}$ ($\sigma = 1,2$) (žr. 3.1 A). Mažiausias drėgmės kiekis nustatytas 3-oje malimo frakcijoje ($< 213 \mu\text{m}$), vidutiniškai $11,07 \pm 0,3 \text{ g/100 g}$ ($\sigma = 0,95$).

Baltymų kiekis malimo frakcijose kito ribose nuo $13,67 \pm 0,4 \text{ g/100 g}$ ($\sigma = 1,27$) iki $15,71 \pm 0,38 \text{ g/100 g}$ ($\sigma = 1,2$) (žr. 3.1 B). Mažiausiu baltymų kiekiu pasižymėjo stambiausių dalelių frakcija ($> 500 \mu\text{m}$) ($13,67 \pm 0,4 \text{ g/100 g s.m}$ ($\sigma = 1,27$)). Vertinant baltymų pasiskirstymą malimo frakcijose, nustatyta, kad 2-oje frakcijoje ($213 - 500 \mu\text{m}$) baltymų kiekis yra vidutiniškai 2,9 % ($p < 0,02$), o 3-oje frakcijoje ($< 213 \mu\text{m}$) – 14,9 % ($p < 0,04$) didesnis, lyginant su 1 frakcija ($> 500 \mu\text{m}$).

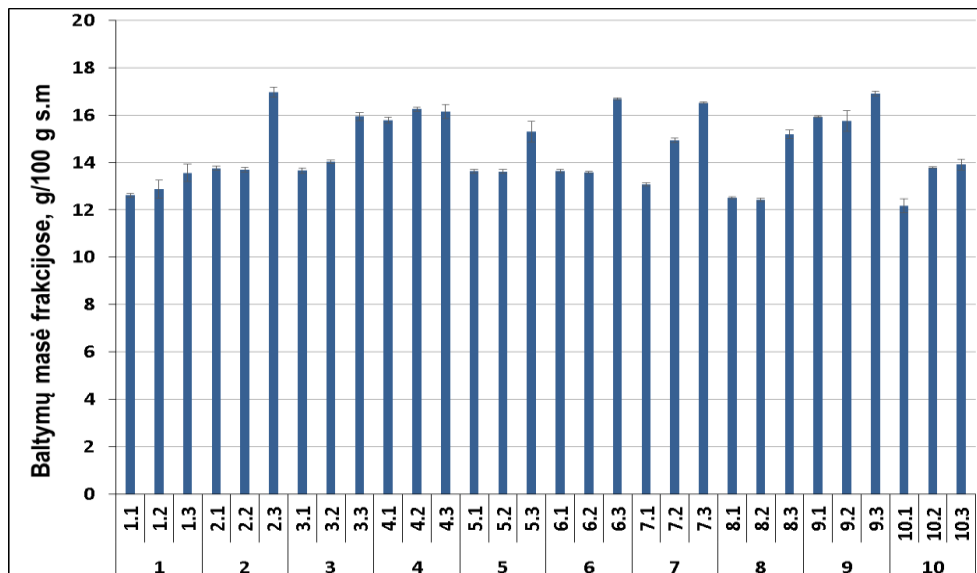
Pelenų kiekio tyrimo rezultatai (žr. 3.1 C pav.) rodo, kad vidutiniškai didžiausiu pelenų kiekiu pasižymi 1-a frakcija ($> 500 \mu\text{m}$), vidutiniškai $3,13 \pm 0,01 \text{ g/100 g s.m}$ ($\sigma = 0,31$), o 2-oje ($213 - 500 \mu\text{m}$) ir 3-oje ($< 213 \mu\text{m}$) nustatyti, atitinkamai 38,6 % ir 78,9 % mažesni kiekiai ($p < 0,05$).



A



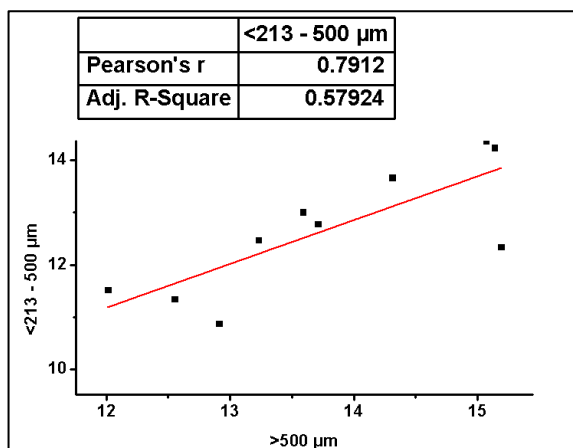
B



C

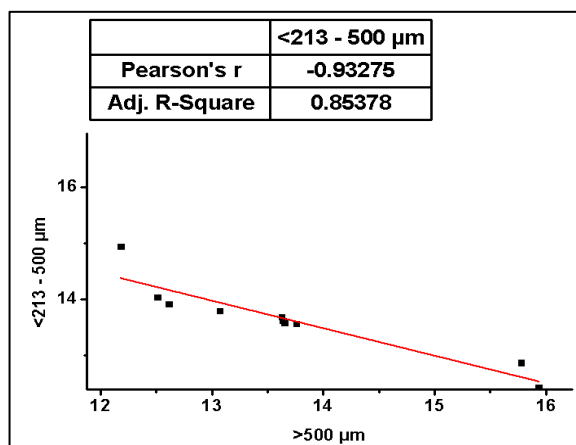
3.1 pav. Drėgmės (A), baltymų (B) ir pelenų (C) kiekio pasiskirstymas kviečių grūdų mėginių (Nr. 1 – 10) malimo frakcijose: 1 frakcija: > 500 μm; 2 frakcija: 213 – 500 μm ir 3 frakcija: < 213 μm

Duomenų koreliacinė analizė parodė, kad drėgmės kiekis reikšmingai koreliavo su dalelių dydžiu modelinėse grūdų malimo frakcijose. Gautas reikšmingas koreliacijos koeficientas ($r = 0,7912$, $p < 0,006$) rodo, kad didėjant frakcijos dalelių dydžiui, drėgmės kiekis frakcijose reikšmingai didėja (žr. 3.2 pav.).



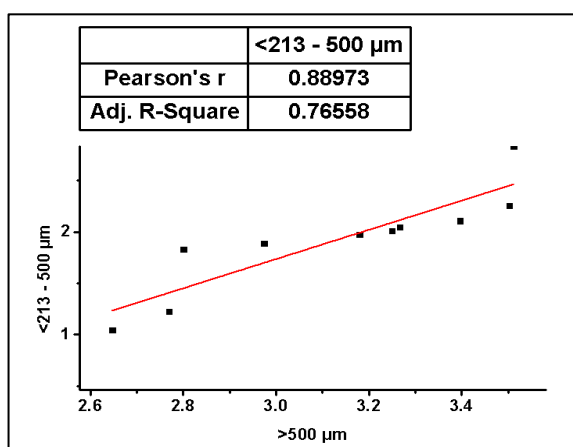
3.2 pav. Drėgmės kiekio malimo frakcijose priklausomybė nuo frakcijos dalelių dydžio

Vertinant baltymų kiekio pasiskirstymą modelinėse malimo frakcijose (žr. 3.3 pav.), nustatyta, kad baltymų kiekis reikšmingai mažėjo. Gautas reikšmingas koreliacijos koeficientas ($r = -0,9327$, $p < 0,006$), rodo, kad didėjant frakcijos dalelių dydžiui, baltymų kiekis mažėja statistiškai reikšmingai.



3.3 pav. Baltymų kiekio malimo frakcijose priklausomybė nuo frakcijos dalelių dydžio

Rezultatų koreliacinė analizė taip pat parodė, kad didėjant frakcijų dalelių dydžiui, pelenų kiekis reikšmingai didėja, $r = 0,8897$ ($p < 0,003$) (žr. 3.4 pav.).



3.4 pav. Pelenų kiekio malimo frakcijose priklausomybė nuo frakcijos dalelių dydžio

Panašias tendencijas gauna Sezer'as ir kt [134]. Mokslininkai aiškina, kad tokios tendencijos priklauso nuo kviečių auginimo sąlygų, sėlenų užterštumo sunkiaisiais metalais ir kitais neorganiniais junginiais. Kuo daugiau sunkiųjų metalų sukaupia grūdas sėlenose, tuo didesni pelėnų kiekiai juose nustatomi. Baltymų kiekiai daugiausiai grūde koncentruojasi endosperme, todėl baltymų didžiausias kiekis ir nustatytas smulkiausioje frakcijoje (< 213 μm) o didesni drėgmės kiekiai kaupiasi išoriniuose grūdo sluoksniuose.

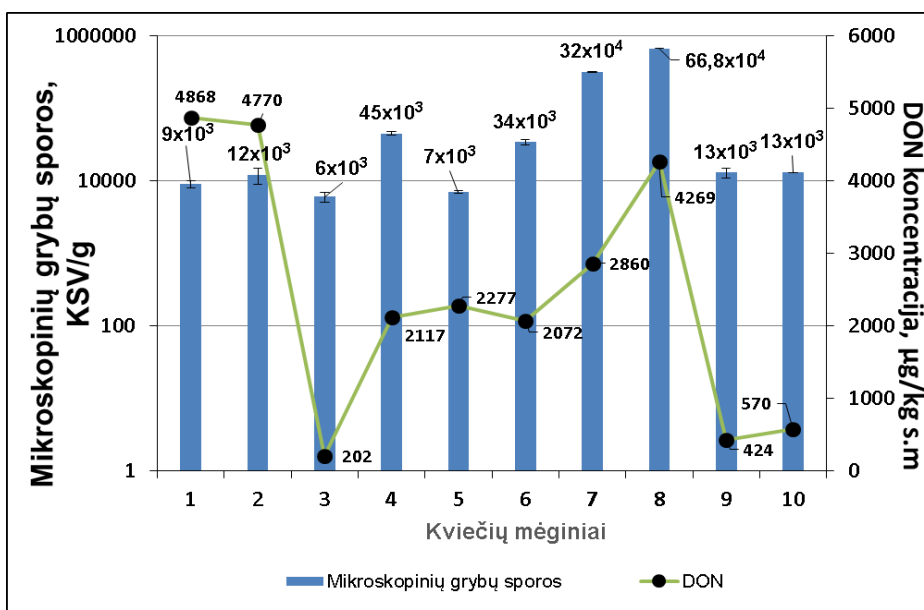
3.2. Kviečių grūdų mėginių užsikrėtimas mikroskopiniais grybais

3.2.1. Mikroskopinių grybų gyvybingų sporų įvertinimas kviečių grūdų mėginiuose

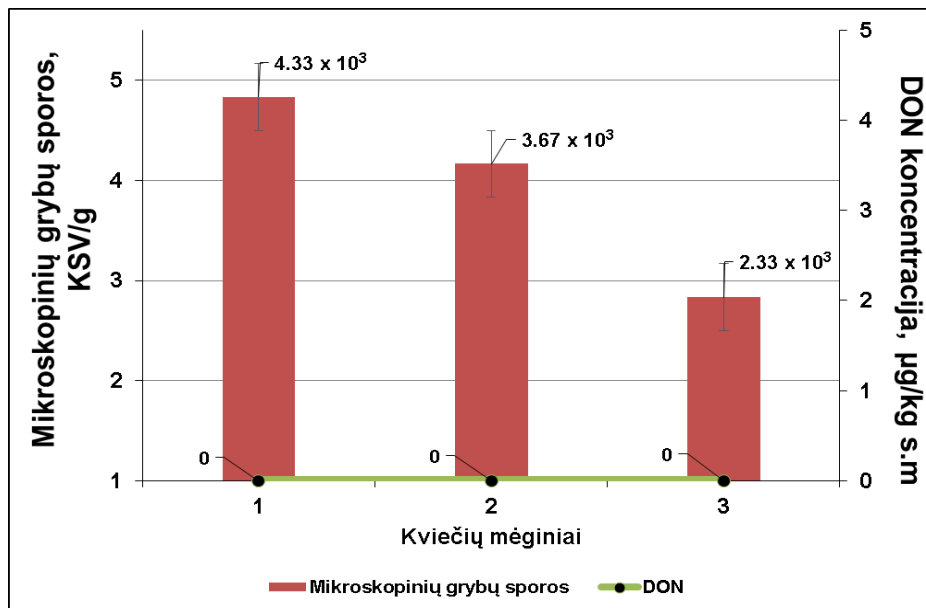
Kviečių grūdų mėginiai, gauti po 2017 m. derliaus nuėmimo, buvo auginti vyraujant šiltam ir drėgnam orui. Palyginimui tirti 2018 m. kviečių grūdų mėginiai, kurių augimo ir derliaus nuėmimo metu oro temperatūra buvo žemesnė bei mažesnis kritulių kiekis, lyginant su 2017 m. Pagal Van Der Fels'a ir kt. [135], DON ir kitų mikotoksinų koncentracijos kviečiuose gali padidėti esant aukštesnei temperatūrai, didesniai santykiniam drėgmeniui ir kritulių kiekiui javų augimo metu, todėl per pastaruosius du dešimtmečius jų nustatoma vis daugiau ir didesnėmis koncentracijomis.

Atliekant kviečių grūdų mėginių morfologinius mikroskopinių grybų tyrimus, 2017 m. kviečių grūdų mėginiai (n=10) buvo suskirstyti į III grupes pagal nustatytas deoksinivalenolio (DON) koncentracijas: I grupė – DON kiekis nuo 0 iki 600 μg/kg s.m., II grupė – DON kiekis nuo 601 iki 2300 μg/kg s.m., ir III grupė – DON kiekis nuo 2301 iki 5000 μg/kg s.m. Grūdų užsikrėtimo mikroskopinių grybų gyvybingomis sporomis tyrimo rezultatai pateikti 3.5 A paveiksle. DON 2018 m. maistinių kviečių mėginiuose nebuvo nustatytas taikant ELISA metodą (DON aptikimo riba < 200 μg/kg), todėl buvo prilygintas 0 (žr. 3.5 B pav.).

Gyvybingų mikroskopinių grybų sporų skaičius 2017 m. I grupės grūdų mėginiuose sudarė $(1,07 \pm 0,23) \times 10^4$ KSV/g ($\sigma = 0,4$), II grupės – $(2,86 \pm 1,12) \times 10^4$ KSV/g ($\sigma = 1,95$) ir III grupės mėginiuose nustatyta $(25,23 \pm 15,66) \times 10^4$ KSV/g ($\sigma = 31,32$) (žr. 3.5 A pav.)



A



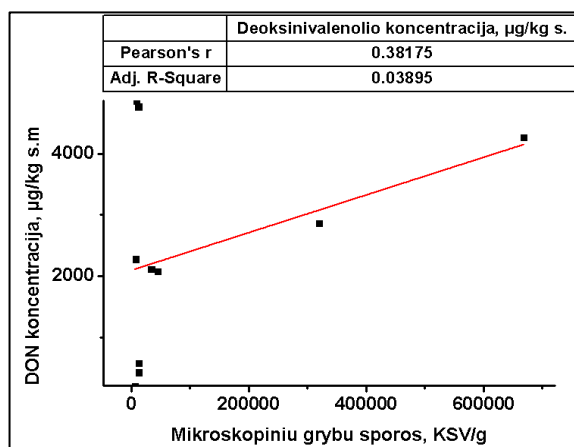
B

3.5 pav. Bendras gyvybingų mikroskopinių grybų sporų skaičius ir DON koncentracijos 2017 m. (A) ir 2018 m. (DON < 200 µg/kg) (B) kviečių grūdų mėginiuose

Mikroskopinių grybų gyvybingų sporų skaičius nustatytas 2018 m. derliaus kviečių mėginiuose sudarė nuo $(2,33 \pm 0,33) \times 10^3$ ($\sigma = 0,57$) iki $(4,33 \pm 0,33) \times 10^3$ KSV/g ($\sigma = 0,57$) (žr. 3.5 B pav.). Palyginus skirtingų metų derliaus maistingų kviečių mėginių grupes, mikroskopinių grybų sporų 2017 m. derliaus mėginiuose buvo nustatyta 32,7 kartus daugiau ($p > 0,05$) nei 2018 m. mėginiuose.

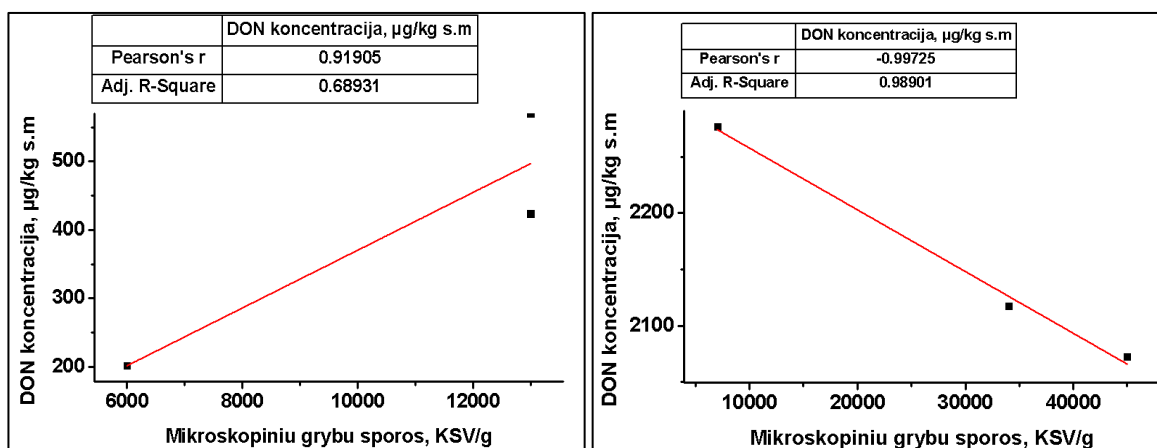
Galima teigti, kad užsikrėtimas mikroskopinių grybų sporomis reikšmingai priklauso nuo aplinkos sąlygų grūdų augimo ir derliaus nuėmimo metu ir tai gali potencialiai padidinti mikotoksinų susidarymo grūdų sandėliavimo metu riziką.

Atlikus visų grūdų mėginių tyrimo rezultatų statistinę analizę (žr. 3.6 pav.), pastebėtas galimas DON koncentracijos padidėjimas 2017 m. grūdų mėginiuose, didėjant užsikrėtimui mikroskopinių grybų sporomis, tačiau stipri koreliacinė priklausomybė nenustatyta ($r = 0,3818$, $p > 0,05$).



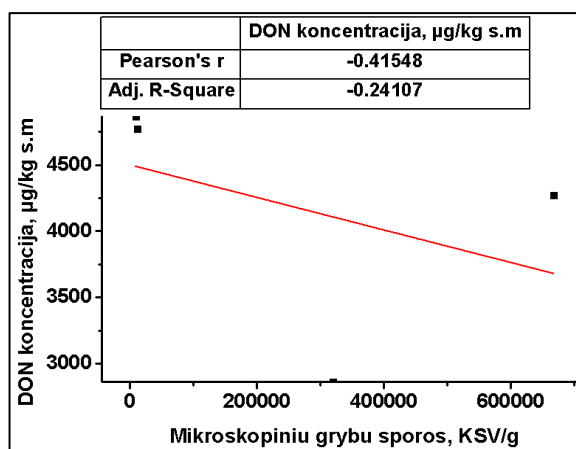
3.6 pav. Koreliacija tarp mikromicetų sporų skaičiaus ir DON koncentracijos kviečių grūdų mėginiuose (2017 m.)

Siekiant tiksliau įvertinti gautas tendencijas, atlikta duomenų regresinė analizė atskirose 2017 m. kviečių mėginių grupėse (žr. 3.7 pav.). Stipri koreliacinė priklausomybė tarp DON kiekio ir gyvybingų mikroskopinių grybų skaičiaus nustatyta I-oje grupėje (atitinkamai $r = 0,91905$, $p > 0,05$) (žr. 3.7 A pav.), tačiau II-oje grupėje nustatyta atvirkštinė priklausomybė tarp užsikrėtimo gyvybingomis sporomis ir DON kiekio ($r = -0,99725$, $p < 0,05$) (žr. 3.7 B pav.), o III-ioje grupėje nustatyta vidutinio stiprumo atvirkštinė priklausomybė ($r = -0,41548$, $p > 0,05$) (žr. 3.7 C pav.) tarp analizuojamų parametrų. Tai rodo, kad esant dideliame mikroskopinių grybų sporų skaičiui po derliaus nuėmimo, kuris yra nereglamentuojamas ir netikrinamas, pradinis DON kiekis kviečių grūduose gali būti mažas ir ženkliai padidinti mikotoksinų susidarymo tikimybę, grūdų sandėliavimo metu.



A

B



C

3.7 pav. Priklausomybės tarp DON koncentracijos ir mikroskopinių grybų gyvybingų sporų skaičiaus grūdų mėginių grupėse: I grupė – DON kiekis 0 – 600 µg/kg s.m. (A), II grupė – DON kiekis 601 – 2300 µg/kg s.m. (B) ir III grupė – DON kiekis 2301 – 5000 µg/kg s.m (C)

Kaip aiškina Fredlund ir kt. [136] tokios koreliacijos tarp DON ir mikroskopinių grybų sporų skaičiaus priklauso nuo klimato veiksnių, turinčių poveikį mikromicetų rūšių geografiniam pasiskirstymui. Net jei klimato zona yra palanki mikromicetų sporoms plisti (šilta, drėgna, vėjuota), nereiškia, kad mikroskopiniai grybai kolonizavę augalus pradės iškart produkuoti mikotoksinus. Mikotoksinus mikromicetai pradeda produkuoti tada, kada bando pažeisti sveiko augalo vaisiaus, šiuo atžvilgiu grūdo gynybinius mechanizmus ir pasiekti grūdo maistines medžiagas.

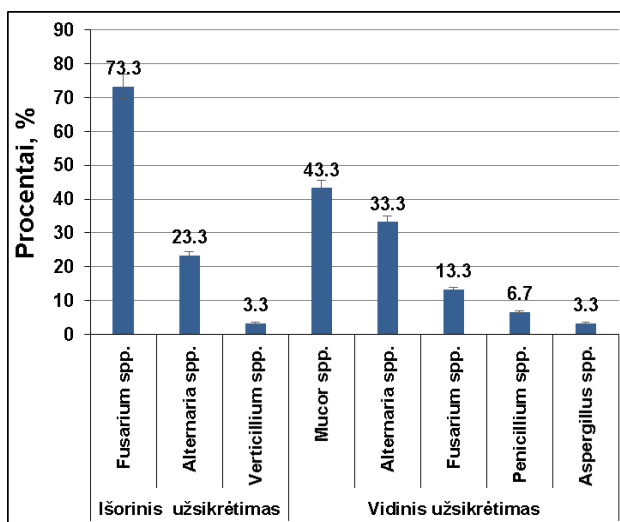
Remiantis gautais rezultatais galima būtų teigti, kad esant dideliame kviečių grūdų užsikrėtimui mikroskopinių grybų sporomis, ne visais atvejais žaliavoje bus aptiktas didesnis DON kiekis. Bet taip pat, esant drėgnam klimatui ir tinkamai temperatūrai, visais atvejais didėja rizika kviečių grūdams (skirtiems tiek maistui, tiek pašarams) užsikrėsti ne tik mikroskopiniais grybais, bet ir mikotoksinais.

3.2.2. Mikroskopinių grybų padermių kviečių mėginiuose identifikavimas ir užsikrėtimo jomis įvertinimas

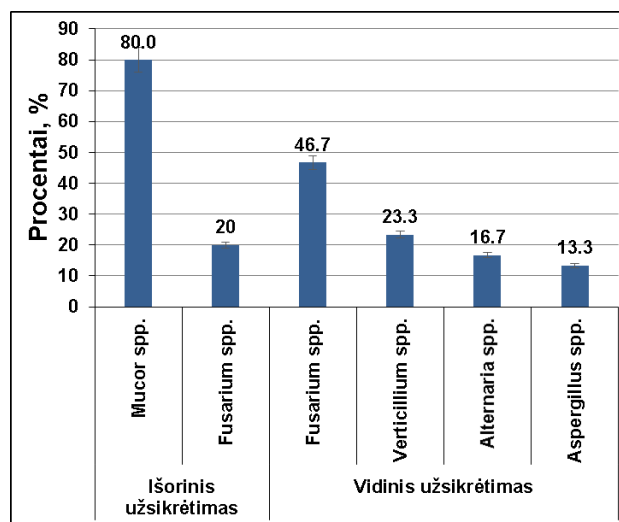
Vertinant grūdų išorinį užterštumą mikroskopiniais grybais nustatyta, kad tirti grūdų mėginiai buvo užkrėsti 7 skirtingomis mikromicetų gentimis. Taip pat nustatyta, kad visi analizuoti grūdų mėginiai buvo užsikrėtę bent viena mikroskopinių grybų gentimi. Išorinio ir vidinio kviečių grūdų mėginių užsikrėtimo mikroskopinių grybų gentimis rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.

Identifikuotos mikroskopinių grybų gentys išvardintos mažėjančia grūdų užkrėtimo tvarka: *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Verticillium* spp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp. ir *Rhizopus* spp. Labiausiai vyraujančios mikroskopinių grybų gentys, vertinant išorinį užsikrėtimą yra: *Fusarium* spp. (100 % mėginių), *Alternaria* spp. (60 % mėginių), *Penicillium* spp. bei *Verticillium* spp. (50 % mėginių).

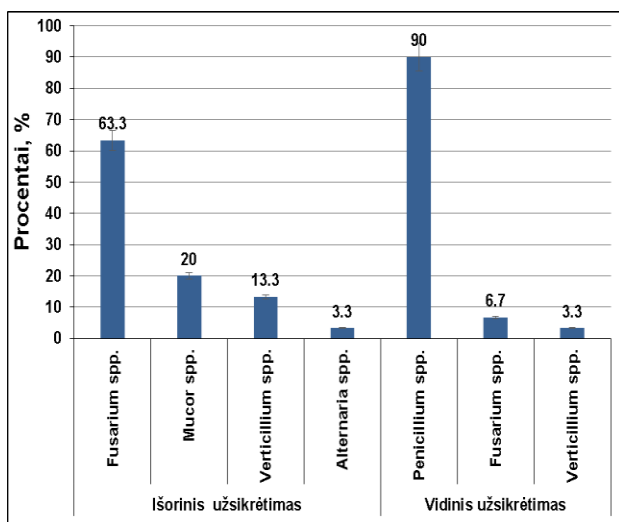
Vidinės grūdų infekcijos analizė parodė, kad grūdų mėginiai labiausiai buvo užkrėsti *Fusarium* spp. gentimi, nors grūdų paviršius prieš tyrimą buvo sterilizuotas. Identifikuotos grūdų vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais gentys išvardintos mažėjančia užkrėtimo tvarka: *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Verticillium* spp. ir *Mucor* spp. Labiausiai paplitusios mikromicetų gentys vidinio užkrėtimo mikromicetų sporomis atveju buvo: *Fusarium* spp. (100 % mėginių), *Alternaria* spp. (80 % mėginių), o kiti mikroskopiniai grybai užteršė apie 70 % grūdų mėginių.



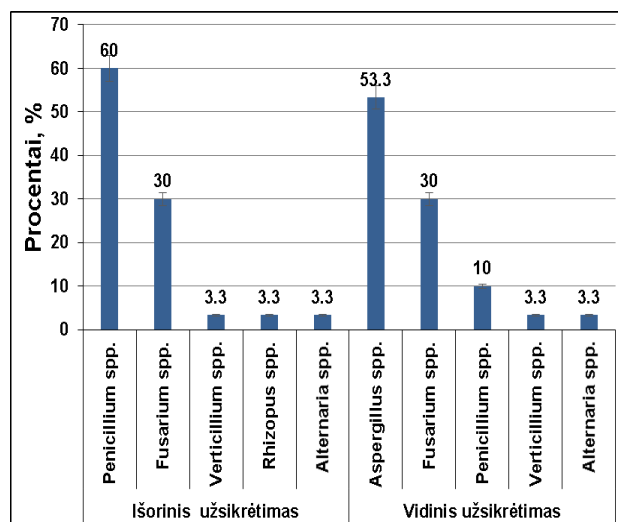
Nr. 1 (DON 4868 µg/kg s.m)



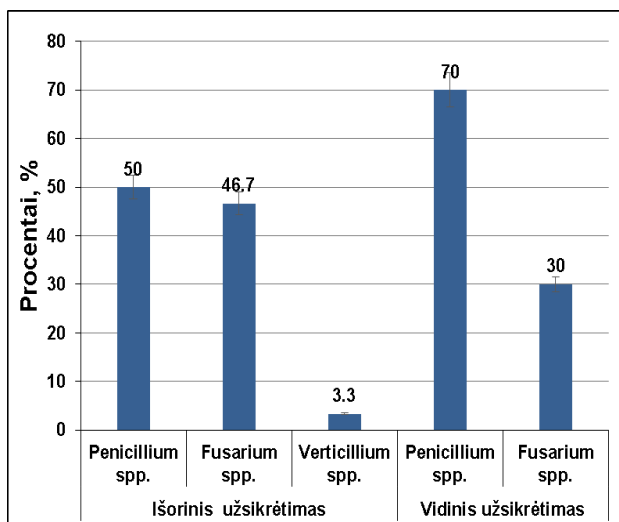
Nr. 2 (DON 4770 µg/kg s/m)



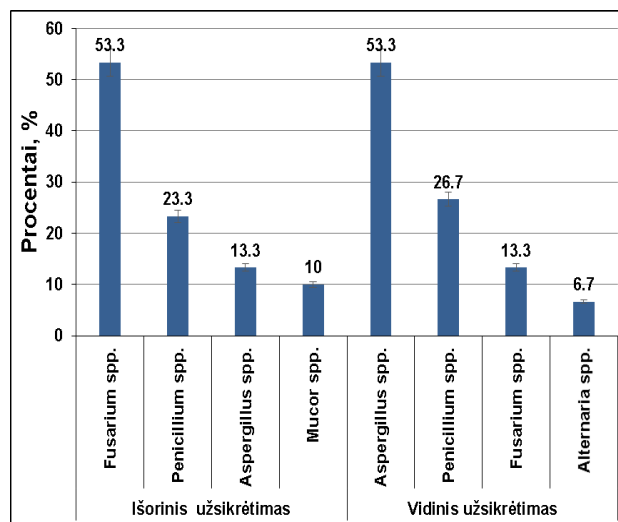
Nr. 3 (DON 202 µg/kg s.m)



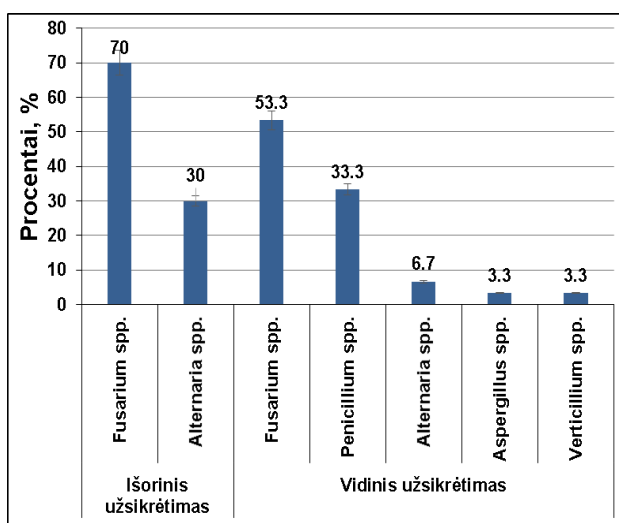
Nr. 4 (DON 2117 µg/kg s.m)



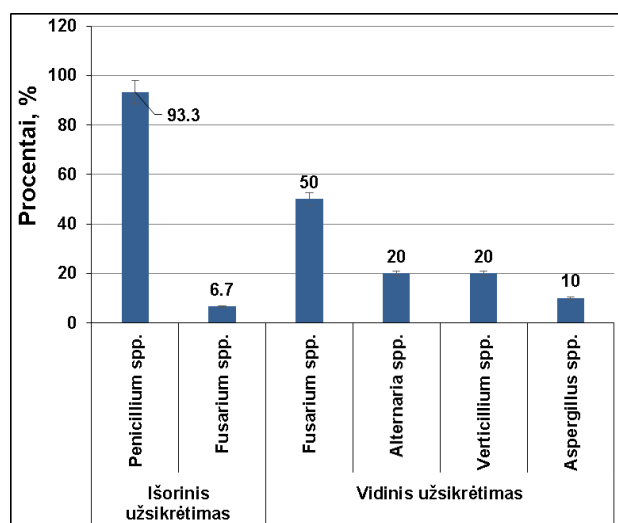
Nr. 5 (DON 2277 µg/kg s.m)



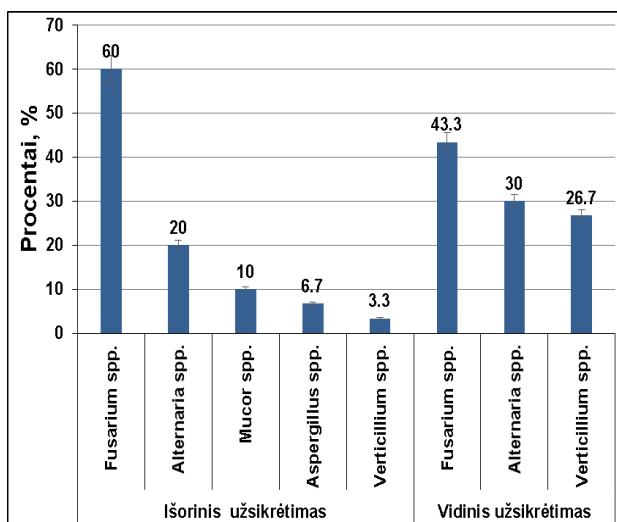
Nr. 6 (DON 2072 µg/kg s.m)



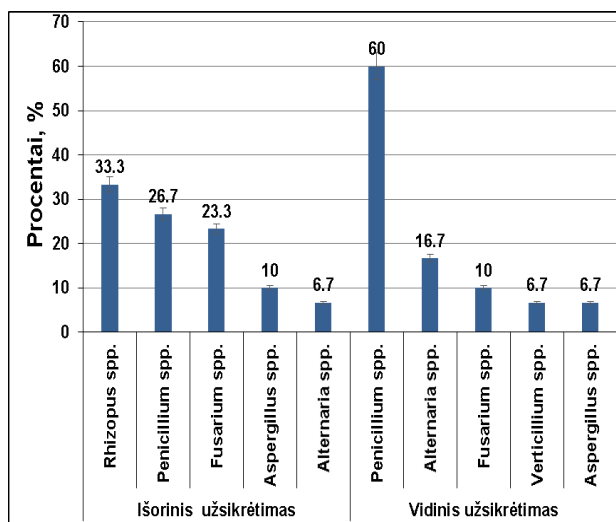
Nr. 7 (DON 2861 µg/kg s.m)



Nr. 8 (DON 4269 µg/kg s.m)



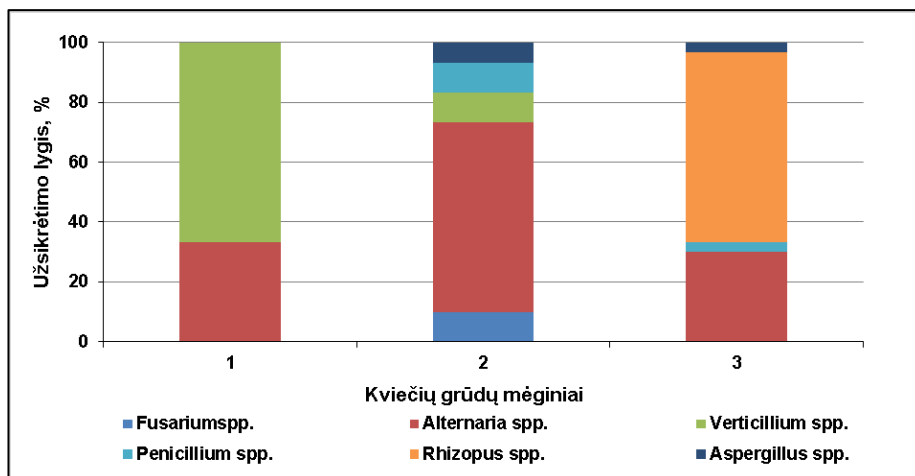
Nr. 9 (DON 424 µg/kg s.m)



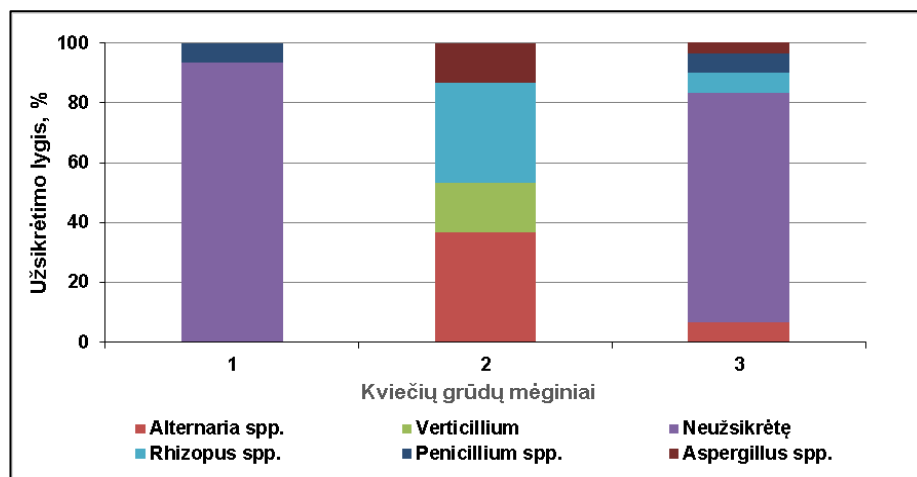
Nr. 10 (DON 570 µg/kg s.m)

3.8 pav. Kviečių grūdų mėginių nr. 1 – 10 išorinis ir vidinis užsikrėtimas mikroskopiniais grybais

Analizuojant 2018 m. grūdų mėginius, nustatyta, kad 57 % tirtų grūdų, vidinio užsikrėtimo atveju, nebuvo užsikrėtę jokia mikroskopinių grybų gentimi (žr. 3.9 B pav.). Išorinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais atveju nustatyta, kad didžiausią dalį (89 %) kviečių mėginiuose sudarė šios mikroskopinių grybų gentys: *Alternaria* spp. (42 %), *Verticillium* spp. (26 %) bei *Rhizopus* spp. (21 %) (žr. 3.9 A pav.). Vidinio užsikrėtimo mikroskopiniais grybais atveju nustatyta, kad didžiausią dalį (26 %) sudarė šios mikroskopinių grybų gentys: *Rhizopus* spp. (13%), *Aspergillus* spp. (7 %) ir *Verticillium* spp. (6 %).



A



B

3.9 pav. 2018 m. derliaus kviečių grūdų išorinis (A) ir vidinis (B) užsikrėtimas mikroskopinių grybų gentimis

Tirtų kviečių grūdų mėginių atveju šiltesnis ir drėgnesnis oras vyravo 2017 metais. Vidutinis metinis kritulių kiekis 2017 m. Lietuvoje (66,66 mm) buvo 1,72 karto didesnis, lyginant su 2018 m. (35,58 mm), o vidutinė metinė oro temperatūra (12 °C) 2018 m. buvo 3,1 °C žemesnė, nei 2017 metų vidutinė metinė oro temperatūra [137]. Tai galėjo paveikti ne tik užkrėtimo mikroskopinių grybų sporomis, bet ir mikotoksinais skirtumus.

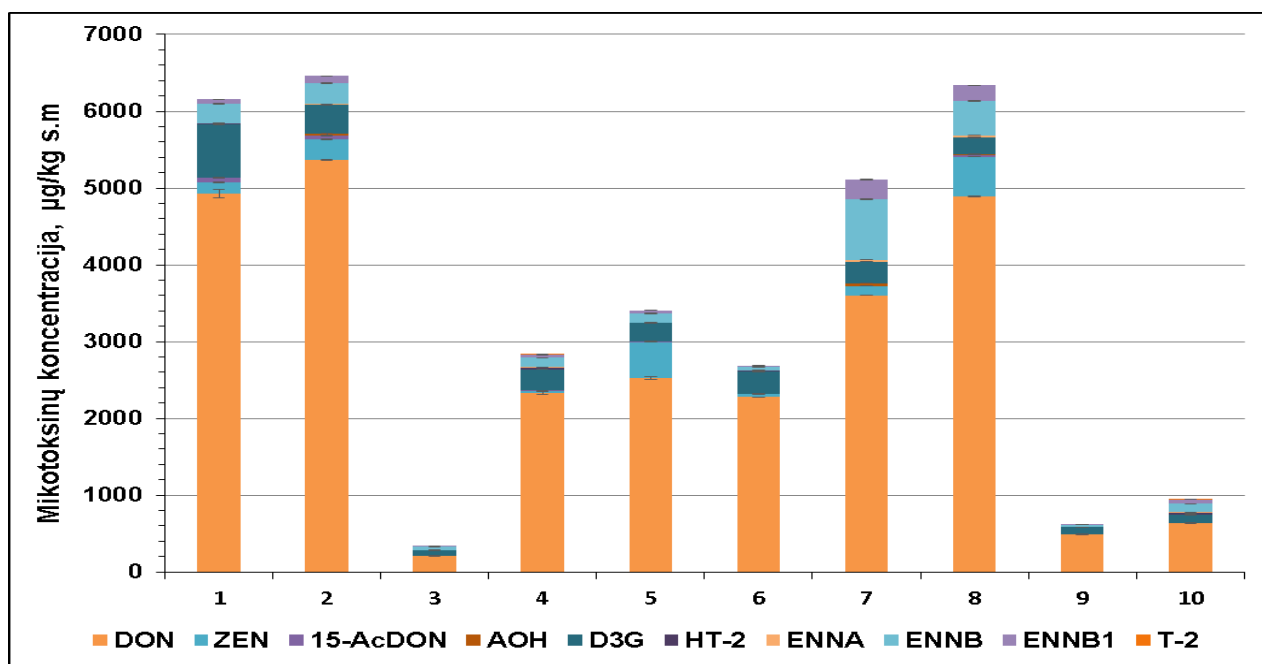
Šiuo metu renkami ir apdorojami rezultatai rodo, kad besikeičiantis klimatas gali padidinti pasaulinės svarbos augalų ligų spektrą ir sunkumą per ateinančius 20 metų. Anot Huntingford'as ir kt.[138], prieš derliaus nuėmimą, klimato kaitos poveikis mikotoksinais gali pasireikšti per grybų sporų sąveiką. Javai gali tapti dar jautresni mikroskopiniams grybams, kas pasibaigtų didesne DON koncentracija juose. Nepaisant to, tokią riziką sunku įvertinti, nes trumpalaikiai sezoniniai svyravimai, gali slėpti ilgalaikius, žmogaus sukeltų aplinkos pokyčių poveikius, augaluose esančiai mikotoksinų koncentracijai. Užslėptas mikroskopinių grybų, po grūdo luobele, skaičius prieš derliaus nuėmimą gali iš esmės situaciją pakeisti jei grūdai bus sandėliuojami ir tvarkomi mikromicetams palankiomis sąlygomis. Tokiu atveju mikotoksinų koncentracijos ženkliai padidėtų ir atsirastų pavojus vartotojų sveikatai.

3.3. Mikotoksinų kiekio grūdų mėginiuose ir jų pasiskirstymo grūdų modelinėse malimo frakcijose įvertinimas

Kviečių grūdų mėginių chromatografinė analizė (žr. 3.10 pav.) parodė, kad tirti grūdų mėginiai užkrėsti DON, ZEA ir dar 9 mikotoksinais (žr. 2 priedą). Septyniuose iš dešimties analizuotų mėginių DON kiekis viršijo didžiausią leistiną koncentraciją (1250 µg/kg) [43], kituose mėginiuose DON koncentracija nustatyta 202 – 570 µg/kg s.m. ribose. Taip pat 5-iuose iš jų viršyta leistina ZEA koncentracija (> 100 µg/kg) [43].

2017 m. kviečių grūdų mėginiuose nustatyti tokie mikotoksinais (žr. 3.10 pav.), išvardinti pagal nustatytas vidutines koncentracijas: DON (2724,8 ± 609 µg/kg s.m., n = 10), D3G (264,56 ± 57,01 µg/kg s.m., n = 10), ZEA (227,1 ± 75,32 µg/kg s.m., n = 7), ENNB (223,14 ± 74,97 µg/kg s.m., n = 10), ENNB₁ (78,54 ± 26,86 µg/kg s.m., n = 10), 15-AcDON (28,61 ± 8,96 µg/kg s.m., n = 5), AOH

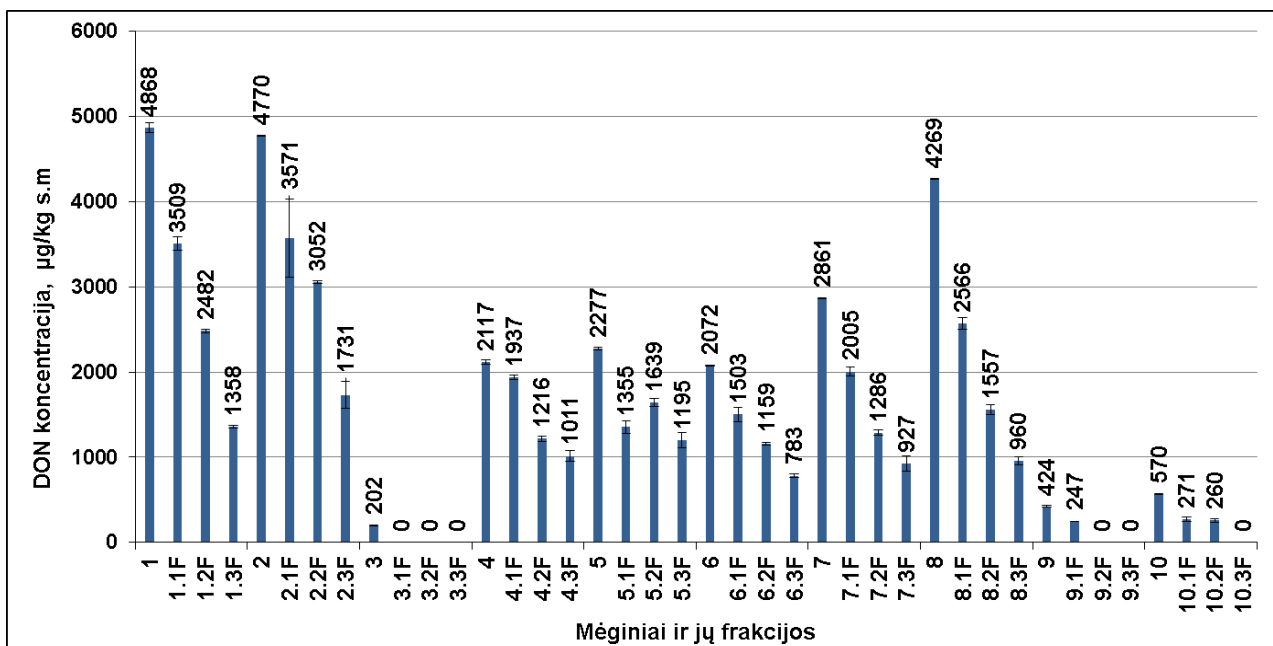
($20,65 \pm 5,79 \mu\text{g/kg s.m.}$, $n = 5$), ENNA ($11,18 \pm 2,81 \mu\text{g/kg s.m.}$, $n = 10$), HT-2 toksinas ($8,34 \pm 2,73 \mu\text{g/kg s.m.}$, $n = 7$), T-2 toksinas $1,43 \pm 0,38 \mu\text{g/kg s.m.}$, $n = 2$).



3.10 pav. Mikotoksinų koncentracijos tirtuose 2017 m. kviečių grūdų mėginiuose (AESCh)

DON pasiskirstymas kviečių grūdų modelinėse malimo frakcijose vertintas ELISA (žr. 3.11 pav.) ir chromatografiniu (AESCh) (žr. 3.12 pav.) metodais. Eksperimentai parodė, kad esant dideliame grūdų užsikrėtimui DON (nr. 1, 2, 4-8 grūdų mėginiai), po malimo į visas frakcijas perėjo dideli mikotoksino kiekiai (žr. 3.11 pav.). Taip pat pastebėta, kad esant mažam grūdų užsikrėtimui ($200 - 300 \mu\text{g/kg}$), DON lieka stambiausioje frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$) (3.1F, 9.1F ir 10.1F frakcijos) ir į smulkesnes frakcijas nepereina. Atlikti tyrimai parodė, kad kuo didesnė DON pradinė koncentracija, tuo didesnis sumažėjimas pastebimas smulkiausioje malimo frakcijoje ($< 213 \mu\text{m}$) (4.3F, 5.3F ir 6.3F frakcijos): 53,8 % mėginiuose, kuriuose DON kiekis $600 - 2300 \mu\text{g/kg s.m.}$ ir 70,3 % mėginiuose, kuriuose DON kiekis $2300 - 5000 \mu\text{g/kg s.m.}$, o didesni kiekiai lieka stambiausioje frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$), atitinkamai 70,01 %. Tai parodo, kad esant nepalankioms klimatinėms sąlygoms, mikotoksinai po derliaus nuėmimo galimai kaupiasi grūdo viršutiniuose sluoksniuose.

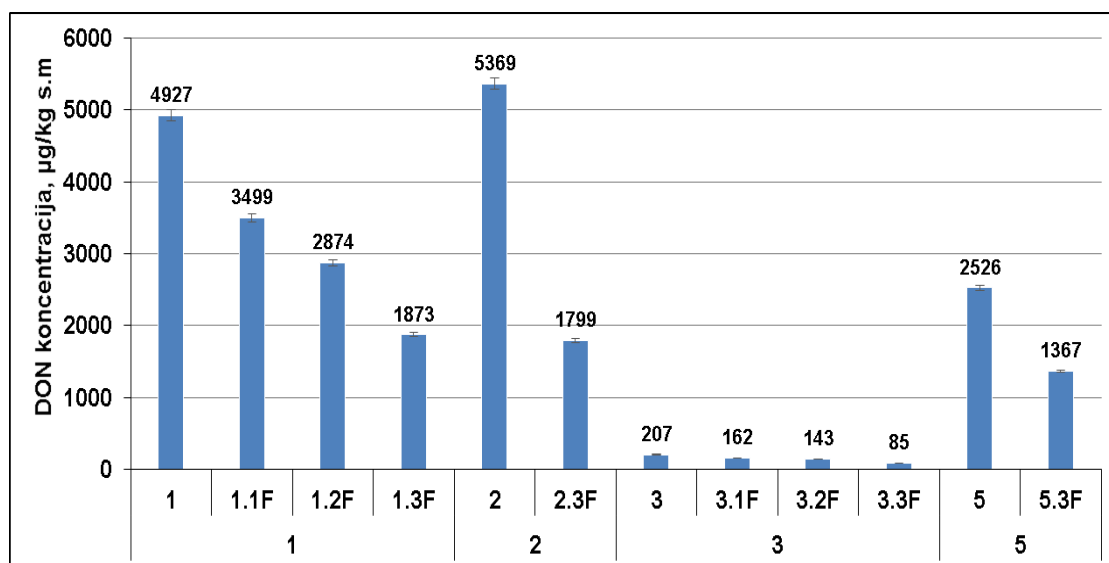
Remiantis Edwards'o ir kt. tyrėjų rezultatais [139], tendencijos panašios. Kai stebimas didesnis mėginio užsikrėtimas DON, pastebimas didesnis sumažėjimas smulkesnėse malimo frakcijose. Taip pat autoriai pabrėžia, kad labai svarbus procesas yra švarus didesnių dalelių atskyrimas nuo smulkesnių frakcijų. Tam tikrais atvejais, kai užteršiamos smulkesnės dalelės stambesnių frakcijų dalelėmis, gaunamos padidėjusios vertės miltų frakcijoje. Tyrimo metu, mokslininkams, pavyko nustatyti tarp smulkiausios frakcijos ir nefrakcionuoto mėginio ($\text{DON} > 5000 \mu\text{g/kg}$) 73 % DON koncentracijos skirtumą.



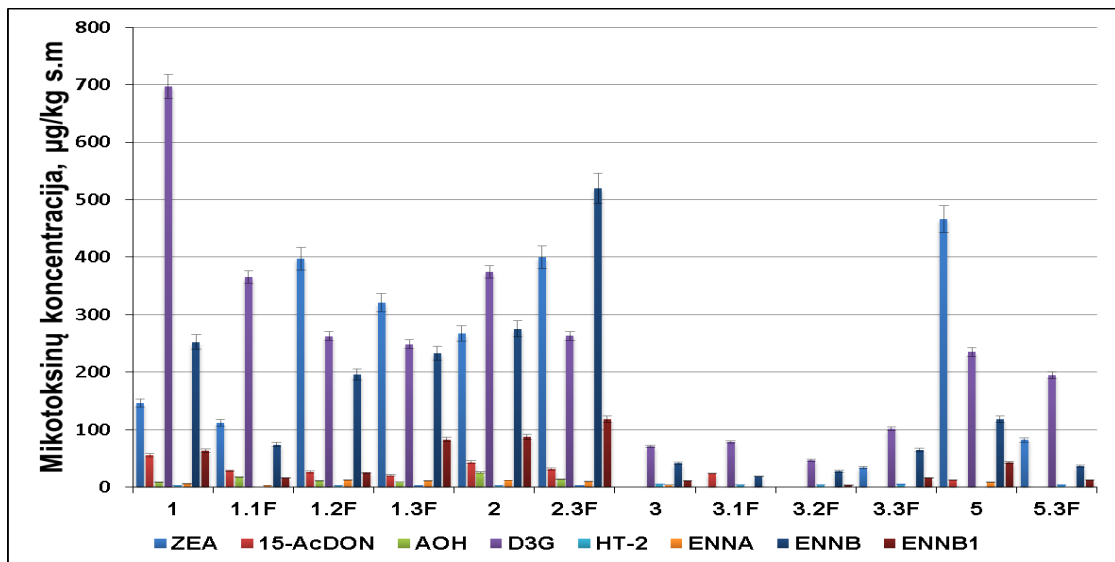
3.11 pav. DON kiekio pasiskirstymas 2017 m. kviečių mėginiuose ir jų malimo frakcijose (ELISA)

Vertinant malimo ir frakcionavimo poveikį DON pasiskirstymui modelinėse malimo frakcijose (žr. 3.11 pav.), nustatyta, kad frakcionavimas reikšmingai ($p < 0,05$) sumažino DON kiekį 1-oje ($< 230 \mu\text{m}$), 2-oje ($213 - 500 \mu\text{m}$) ir 3-oje ($> 500 \mu\text{m}$) frakcijose, atitinkamai 30,6 %, 48,2 % ir 67,4 %, lyginant su nefrakcionuotu mėginiu.

Analogiški rezultatai gauti, analizuojant mėginius AESCh metodu (žr. 3.12 A pav.). Didžiausi DON kiekiai, kaip ir pirmuoju atveju, nustatyti 1-oje malimo frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$) 97,8 % ($p < 0,05$). Po malimo ir frakcionavimo 1 ($> 500 \mu\text{m}$), 2 ($213 - 500 \mu\text{m}$) ir 3 ($< 213 \mu\text{m}$) malimo frakcijose DON koncentracija sumažėjo, atitinkamai 28,7 %, 41,2 % ir 60,7 % ($p < 0,05$).



A



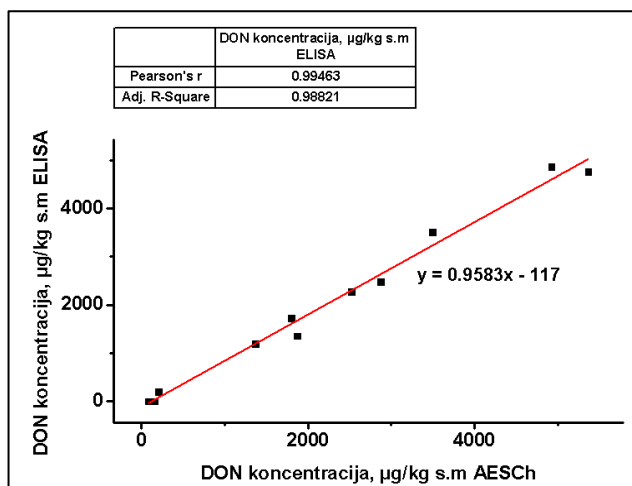
B

3.12 pav. Deoksinivalenolio (DON) (A) ir kitų mikotoksinų (B) koncentracija (AESCh metodas) 2017 m. grūdų mėginiuose ir jų malimo frakcijose

Įvertinus kitų mikotoksinų perėjimą į malimo frakcijas (žr. 3.12 B pav.) nustatyta, kad vidutiniškai daugiausia, po frakcionavimo, 1-oje frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$) lieka: 93,9 % 15-AcDON, 85,2 % HT-2, 64,4 % D3G, 15,7 % ENNB toksinų ($p > 0,05$), 2-oje frakcijoje ($213 - 500 \mu\text{m}$): 90,2 % ZEA, 67,7 % AOH, 65,1 % ENNB, o D3G ir 15-AcDON atitinkamai 44,9 % ir 47,5 % ($p > 0,05$). Po frakcionavimo mažiausia 1-oje frakcijoje aptikta šių toksinų: 25,4 % ZEA, 21,1 % ENNA, 15,4 % ENNB₁ ($p > 0,05$), o 2-oje frakcijoje mažiausia nustatyta 27,8 % ENNB₁ toksino koncentracija ($p > 0,05$). Taip pat nustatyta, kad vidutiniškai daugiau, 2-oje frakcijoje lyginant su 1-a frakcija, buvo šių toksinų: 2,4 karto ENNB, 1,79 karto ENNB₁, 3,5 karto ZEA ir 3,7 karto ENNA ($p > 0,05$). Nustatant frakcionavimo poveikį kitų mikotoksinų sumažinimui miltuose (3 frakcija, $< 213 \mu\text{m}$), nustatyta, kad vidutiniškai daugiausia sumažėjo: 2,02 karto 15-AcDON, 1,09 karto D3G ir 1,5 karto AOH ($p < 0,05$), o mažiausia ZEA – 1,05 karto. Taip pat nustatyta, kad 3-oje frakcijoje koncentruojasi ENNB, ENNB₁, HT-2 toksinai, atitinkamai 24 %, 11,5 % ir 18,5 % jų buvo nustatyta daugiau, lyginant su nefrakcionuotu mėginiu ($p > 0,05$).

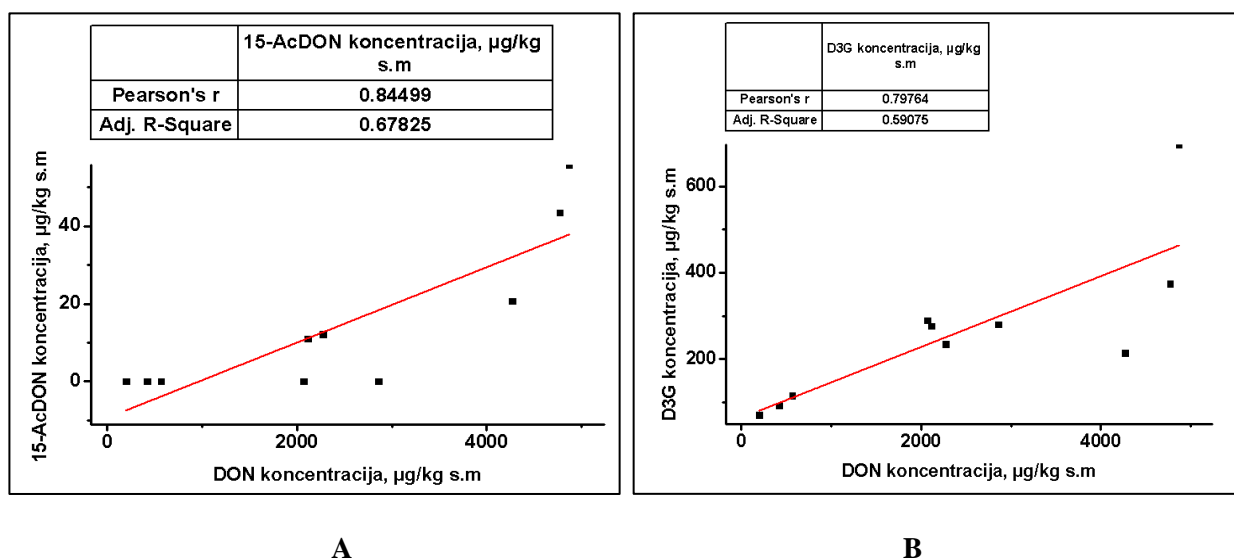
Tai parodo, kad pirminio grūdų valymo ir frakcionavimo neužtenka mikotoksinų rizikos sumažinimui, nes mikotoksinai nevienodai pasiskirsto malimo frakcijose: atvejais, kai stebimas DON koncentracijos mažėjimas, mažėjant frakcijų dalelių dydžiui, pastebimas kitų mikotoksinų koncentracijos didėjimas šiose frakcijose. Todėl esant mažesnėms mikotoksinų koncentracijoms sėlenose, atsiranda tikimybė susidaryti didesnėms jų koncentracijoms miltuose, ko pasekoje didėja rizika šių toksinų patekimui į maisto produktus

Priklausomybių įvertinimas. Atlikus abiejų metodų (ELISA ir AESCh) palyginamąjį įvertinimą, gauta stipri statistiškai reikšminga priklausomybė tarp nustatytų DON koncentracijų: gautas aukštas koreliacijos koeficientas ($r = 0,9946$, $p < 0,05$) patvirtina gautų tendencijų patikimumą (žr. 3.13 pav.).



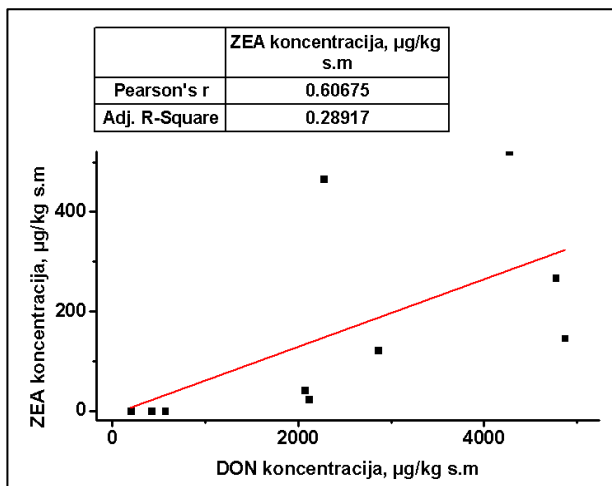
3.13 pav. Koreliacija tarp nustatytos DON koncentracijos AESCh ir ELISA metodų

Įvertinus priklausomybes tarp DON ir kitų mikotoksinų kiekių, gauti vidutinio stiprumo statistiškai patikimi ryšiai ($p < 0,05$) tarp DON ir 15-AcDON bei D3G, atitinkamai $r = 0,8449$ ir $r = 0,7976$ (žr. 3.14 pav.). Remiantis gautomis priklausomybėmis, galima teigti, kad esant dideliame DON kiekiui mėginiuose, padidėja galimybė ir kitų mikotoksinų susidarymui. Nors šie mikotoksinai šiuo metu nėra reglamentuojami, tačiau vis daugėja studijų apie jų toksikologinį efektą gyvulių ir žmonių sveikatai [140].

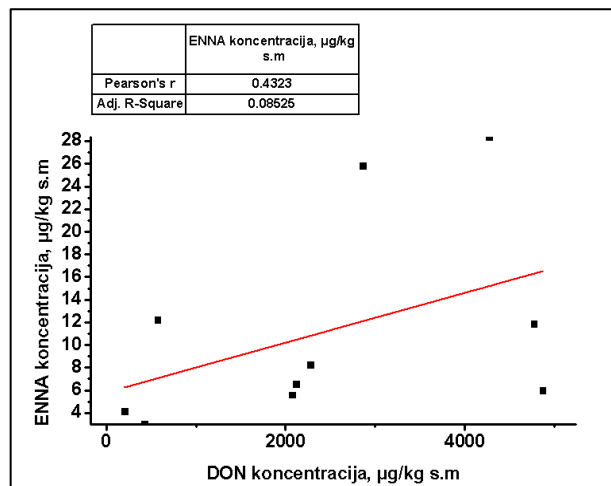


3.14 pav. Koncentracijų priklausomybės tarp DON ir 15-AcDON (A) bei DON ir D3G (B) nefrakcionuotuose mėginiuose

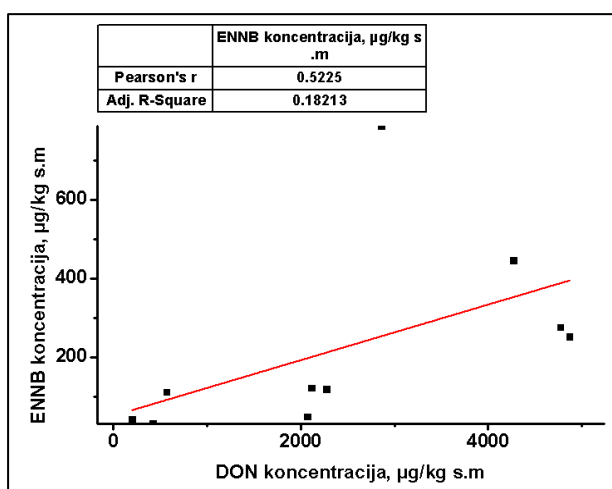
Statistiškai patikimų ($p > 0,05$) korelacijų tarp kitų mikotoksinų ir DON koncentracijos nenustatyta (žr. 3.15 pav.). Todėl galima manyti, kad esant dideliame DON kiekiui mėginiuose, kitų mikotoksinų koncentracijos gali svyruoti įvairiose ribose.



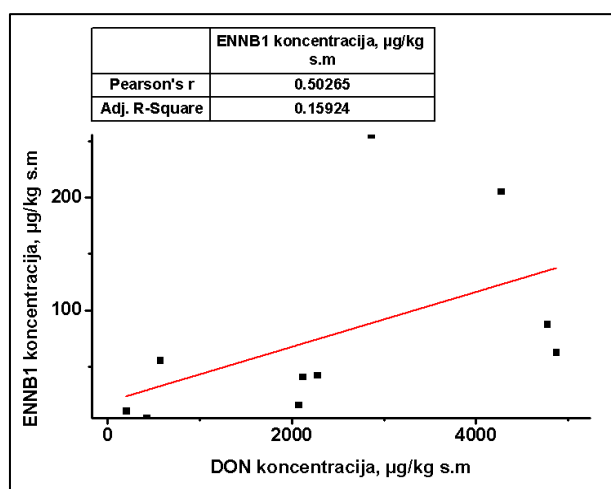
A



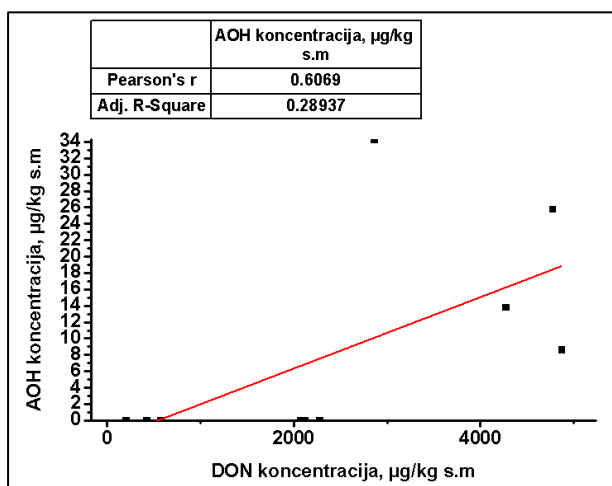
B



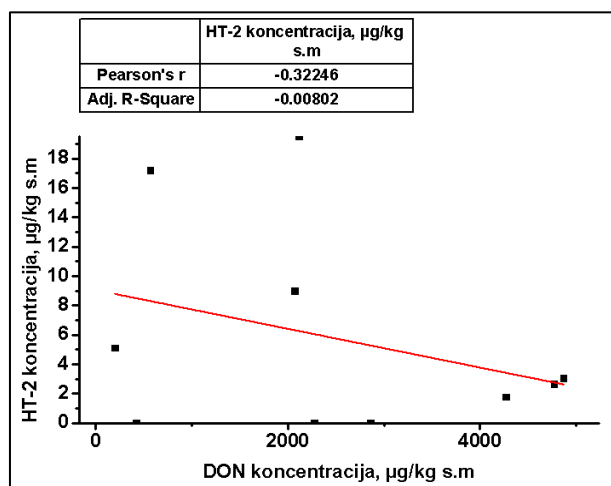
C



D



E



F

3.15 pav. Priklausomybės tarp DON ir kitų mikotoksinų: ZEA (A), ENNA (B), ENNB (C), ENNB₁ (D), AOH (E) bei HT-2 (F) koncentracijų nefrakcionuotuose kviečių mėginiuose

Gauti tyrimai parodė, kad malimo proceso metu DON nėra visiškai pašalinamas. Jis persiskirsto ir koncentruojasi tam tikrose malimo frakcijose. Maistinių kviečių, kuriuose DON koncentracija gali

būti mažesnė už reglamentuojamą, malimas lemia mažiau užterštų maistui skirtų frakcijų (miltų) gavimą. Tačiau didesnė koncentracija gali likti gyvūnų pašarams naudojamose frakcijose (sėlenose). DON gali koncentruotis išorinėse grūdo dalyse. Nors paprastai šios dalys beveik visada naudojamos gyvūnų pašarams, kartais jos naudojamos tiesioginiam žmonių vartojimui, siekiant papildyti mitybos racioną skaidulomis. DON perėjimas į miltų frakciją po malimo yra labai skirtingas: nuo > 70 % iki 53 %. Šis pasiskirstymas priklauso nuo grūdų užkrėtimo DON lygio: kuo didesnė pradinė DON koncentracija, tuo didesnis procentinis DON koncentracijos sumažėjimas, tuo mažesnis DON kiekis yra išfrakcionuotuose grūdų produktuose – miltuose, nes didesnė dalis DON lieka sėlenose [81,82]. Tačiau, esant didesniam užsikrėtimui, didėja rizika, kad po malimo į miltus pereis santykinai didesnis DON kiekis. Kitas faktorius gali būti pelėsių įsikverbimo į grūdus gyliš. Nors išoriniuose grūdų sluoksniuose paprastai yra daugiau DON, pelėsiai gali įsikverbti į grūdus, o tai baigtųsi didesne DON koncentracija vidinėje dalyje ir mažesniu DON sumažėjimu miltuose nei sėlenose [83-85]. Todėl svarbus kompleksinių priemonių taikymas mikotoksinų, tame tarpe DON, detoksikavimui maisto gamybos grandinėje.

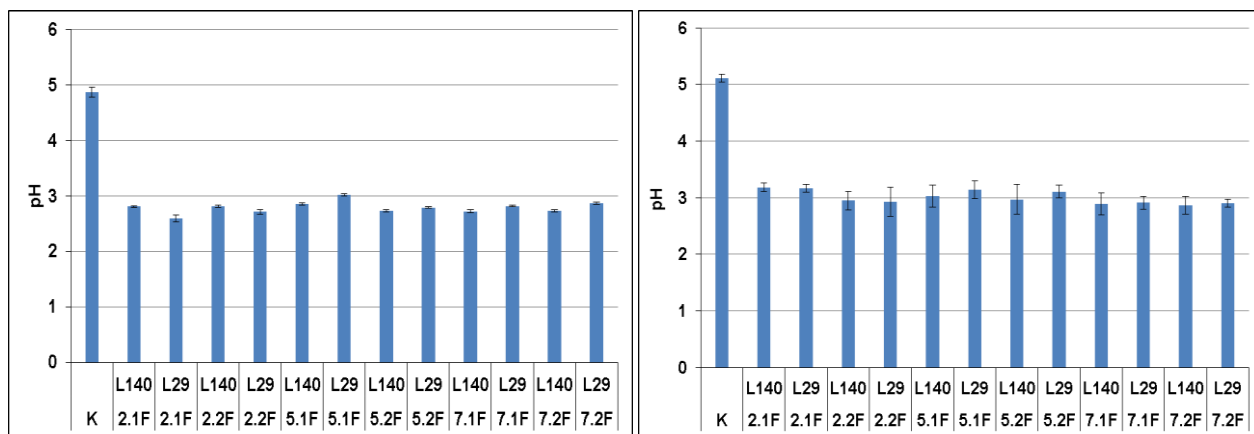
Toliau analizuotos DON detoksikacijos galimybės raugų fermentacijos duonos gamyboje metu, parenkant mikroorganizmus ir fermentacijos sąlygas efektyviam mikotoksinų kiekio sumažinimui. Eksperimentui atlikti pasirinkti aukšto užkrėtimo lygio grūdų mėginiai nr. 2 (DON 4770 µg/kg), nr. 5 (DON 2277 µg/kg) ir nr. 7 (DON 2861 µg/kg).

3.4. Skirtingo užsikrėtimo kviečių malimo produktų poveikis fermentacijos procesui

Vertinant skirtingo užsikrėtimo DON kviečių žaliavos poveikį fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis (PRB) procesui, fermentuojant nefrakcionuotus grūdų mėginius ir jų malimo 1 (> 500 µm) ir 2 (213 – 500 µm) frakcijas, nustatyta, kad tiek terpė, tiek PRB padermė turėjo poveikį rūgščių susidarymui fermentacijos metu (žr. 3.16 – 3.18 pav.).

pH ir BTR pokyčiai fermentacijos terpėje. Pirmajame etape, analizuojant skirtingų grūdų mėginių malimo frakcijų fermentacijos *P. acidilactici* LUHS29 ir *L. brevis* LUHS140 procesą (žr. 3.16 pav.), nustatyta, kad geriausiai fermentavosi 5.1 ir 5.2 bei 7.2 frakcijos, kuriuose po frakcionavimo buvo mažiausios DON koncentracijos (1355 ir 1286 µg/kg), o blogiau fermentavosi grūdų mėginio nr. 2 frakcijos, kuriose DON koncentracija buvo 3052 ir 3571 µg/kg. Rezultatai parodė, kad po 24 h *L. brevis* ir *P. acidilactici* fermentuotų visų frakcijų pH vertės sumažėjo vidutiniškai 49,8 % ($p < 0,05$), lyginant su kontrolinio mėginio vidutine verte (pH 4.87), o po 48 h fermentacijos nustatytas pH verčių padidėjimas, lyginant su 24 h fermentacijos periodu (žr. 3.16 B pav.), t.y. 3,8 – 7,9 %, fermentuojant *L. brevis*, ir 6,4 – 8,4 % ($p > 0,05$), fermentuojant *P. acidilactici*. Tai reiškia, kad užkrėstoje žaliavoje rūgščių susidarymas nebuvo intensyvus.

Taip pat nustatyta, kad pH vertės po 48 h fermentacijos priklausė nuo DON kiekio mėginyje. Frakcijų 5.1 ir 5.2 bei 7.1 ir 7.2 terpės pH vertės, fermentuojant *L. brevis* vidutiniškai padidėjo, atitinkamai 5,9 ir 8,1 % bei 5,8 ir 4,9 %, o fermentuojant *P. acidilactici*, atitinkamai 4,1 ir 10,3 % bei 3,1 ir 1,7 % (žr. 3.16 B pav.) ($p < 0,05$).

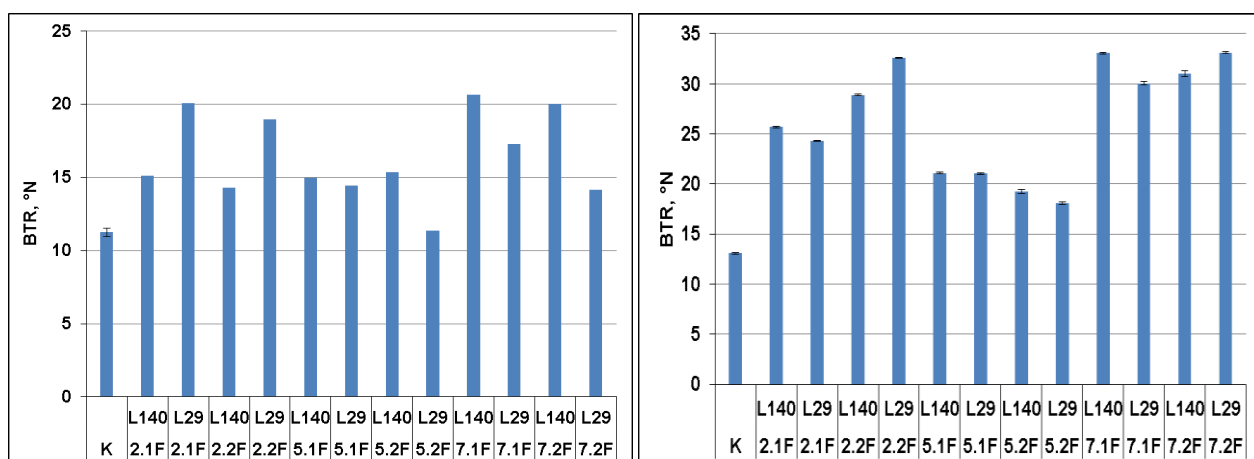


A

B

3.16 pav. pH vertės po 24 h (A) ir 48 h (B) kvietinių miltų terpėje, fermentuojant skirtingomis PRB: L29 – *Pediococcus acidilactici* LUHS29; L140 – *Lactobacillus brevis* LUHS140. K – neužkrėstų DON viso grūdo kviečių grūdų miltų terpė

Įvertinus BTR tyrimo rezultatus (žr. 3.17 pav.), nustatyta, kad fermentuojant *L. brevis* ir *P. acidilactici* 24 h, BTR vertės 2.1, 5.1 ir 7.1 mėginiuose (< 230 μm frakcija) kito vidutiniškai nuo 14,8 °N iki 20,5 °N, o mėginių 2.2F, 5.2F ir 7.2F (230 – 500 μm frakcija) BTR vertės fermentuojant *L. brevis*, padidėjo iki 11,4 – 18,9 °N, o fermentuojant *P. acidilactici*, BTR padidėjo iki 14,3 – 20 °N lyginant su kontrolinio mėginio verte (11,2 °N). 48 h fermentacija padidino BTR vertes 1,9 – 2,0 karto (2.1F, 5.1F ir 7.1F frakcijos), o fermentuojant 2.2F, 5.2F ir 7.2F frakcijas šis padidėjimas gautas 2,12 (*P. acidilactici*) ir 1,87 karto (*L. brevis*) (p < 0,05). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp kontrolinio mėginio ir fermentuotų tiek *P. acidilactici*, tiek *L. brevis* frakcijų BTR verčių po 24 h nenustatyta.



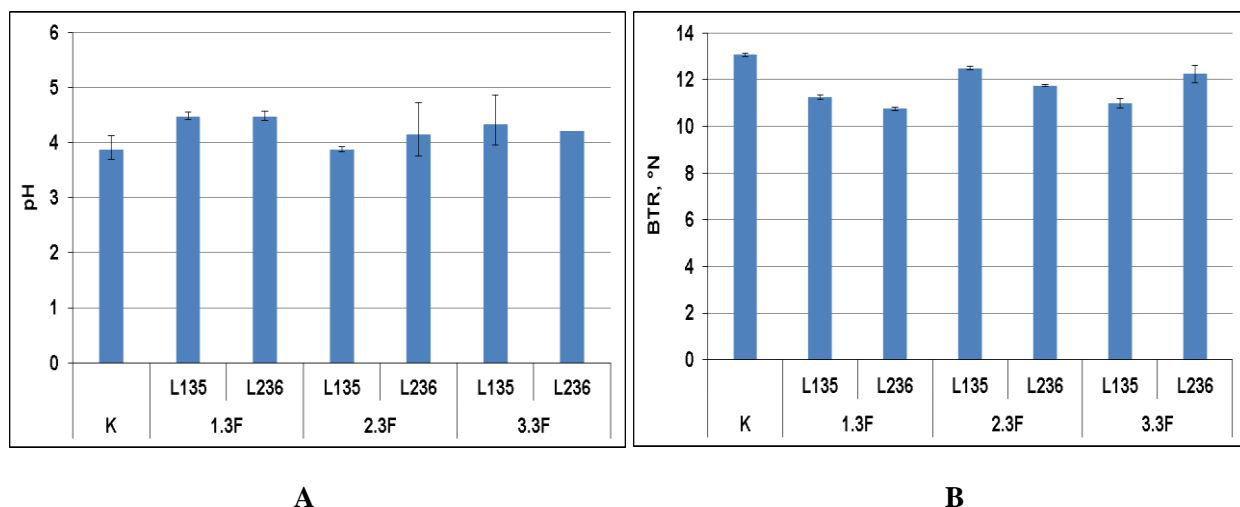
A

B

3.17 pav. BTR vertės po 24 h (A) ir 48 h (B) kvietinių miltų terpėje, fermentuojant skirtingomis PRB: L29 – *Pediococcus acidilactici* LUHS29; L140 – *Lactobacillus brevis* LUHS140. K – neužkrėstų DON viso grūdo kviečių grūdų miltų terpė

Antrojo eksperimento metu, analizuotas smulkiausių malimo frakcijų, 48 h fermentacijos *Lactobacillus plantarum* LUHS135 ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 padermėmis procesas (žr. 3.18 pav.). Šio eksperimento metu nustatyta, kad 1.3, 2.3 ir 3.3 frakcijų terpės, fermentuotoje *L. plantarum* ir *P. acidilactici* rūgštingumas buvo mažesnis, nei pirmojo eksperimento atveju (kai

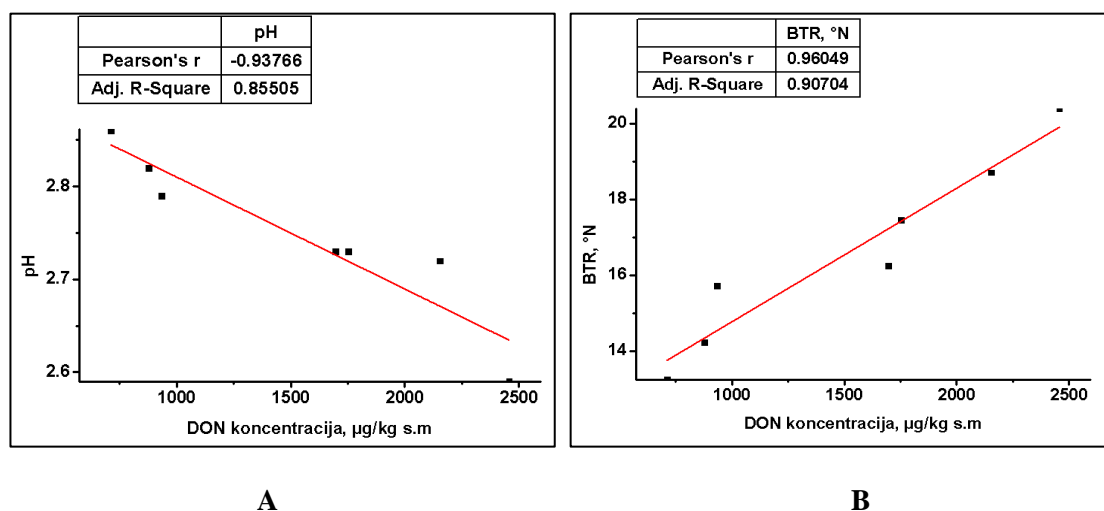
fermentuotos stambesnės frakcijos): šių mėginių pH vertės nustatytos didesnės, atitinkamai 23,5 – 31,8 % ir 28,8 – 32,2 %, o BTR mažesnės vidutiniškai 15,2 ir 36,2 % (žr. 3.18 A, B), nei fermentuojant didesnių dalelių malimo frakcijas (žr. 3.16 – 3.17 pav.). Nenustatyti reikšmingi skirtumai tarp pH ir BTR verčių, lyginant atskirų mėginių frakcijas (žr. 3.18 pav.).



3.18 pav. pH (A) ir BTR (B) vertės kvietinių miltų terpėje po 48 h fermentacijos skirtingomis PRB: L135 – *Lactobacillus plantarum* LUHS135 ir L236 – *Pediococcus acidilactici* LUHS236

Apibendrinant, pirmajame etape analizuotų kviečių grūdų mėginių frakcijose DON koncentracija sudarė 1286 – 3571 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m, o antrojo eksperimento atveju nuo 0 iki 1731 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m. Palyginus I-o ir II-o etapo fermentacijos po 48 h rezultatus tarp šių grupių, matyti, kad fermentuojant mėginius su didesne DON koncentracija, pH vertės gaunamos mažesnės vidutiniškai 1,5 karto ($p < 0,05$). Tokia pat tendencija nustatyta tarp BTR verčių šiose grupėse, atitinkamai didesnė BTR vertė nustatyta I-oje grupėje, ribose nuo 1,56 iki 1,61 karto ($p < 0,05$).

Atlikus duomenų regresinę analizę, nustatyta stipri neigiama tiesinė priklausomybė ($r = -0,9376$, $p < 0,05$) tarp DON kiekio mėginiuose ir terpės pH, kuri parodė, kad didėjant DON kiekiui mėginiuose, pH vertės mažėja (žr. 3.19 A pav.). Atitinkamai, gauta teigiama priklausomybė tarp DON kiekio ir terpės BTR verčių ($r = 0,9605$, $p < 0,05$) (žr. 3.19 B pav.).



3.19 pav. Priklausomybės tarp DON koncentracijos mėginiuose ir fermentacijos terpės pH (A) ir BTR (B) verčių

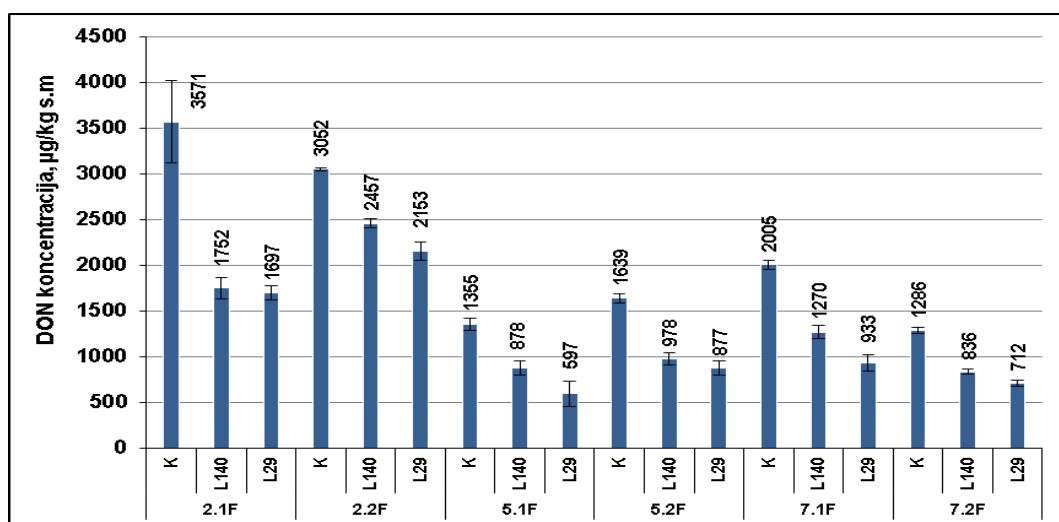
Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad pH ir BTR vertės fermentuojamuose mėginiuose daugiausia priklausė nuo DON koncentracijos, taip pat naudotos PRB padermės ir fermentacijos trukmės. Remiantis statistinės analizės rezultatais, dideliu DON kiekiu užkrėstuose mėginiuose PRB intensyviau produkuoja terpę rūgštinančius metabolitus. Kaip jau pastebėta anksčiau, lyginant skirtingo užkrėtimo DON grūdų mėginių grupes, žemesnės pH vertės nustatytos mėginiuose, kuriuose DON koncentracija didesnė. Taip pat, įvertinus fermentacijos trukmės poveikį pH ir BTR pokyčiams pastebėta, kad mažesnės pH ir didesnės BTR vertės nustatytos po 48 h fermentacijos.

Toliau atliktas eksperimentas skirtas raugų gamybos proceso poveikio grūdų malimo frakcijose esančių mikotoksinų detoksikacijai įvertinimui ir labiausiai mažinančių mikotoksinų kiekius PRB padermių parinkimui ir fermentacijos sąlygų nustatymui.

3.5. Mikroorganizmų parinkimas mikotoksinų kiekio sumažinimui kviečių produktuose

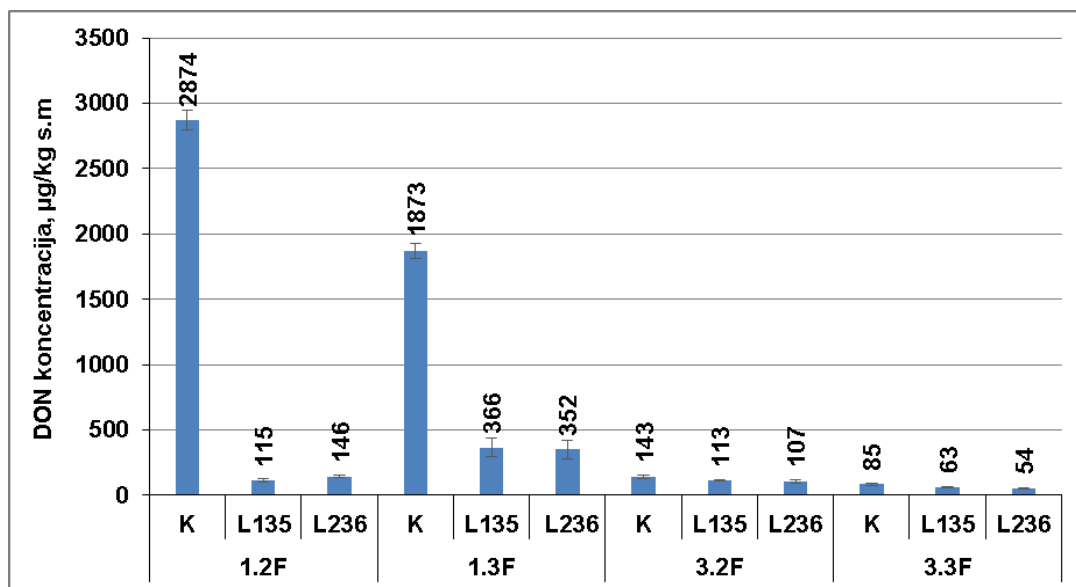
Tyrimo rezultatai rodo (žr. 3.20 pav.), kad fermentuojant PRB užkrėstų DON grūdų mėginių nr. 2, nr. 5 ir nr. 7 malimo frakcijas *L. brevis* LUHS140 paderme, DON koncentraciją 2.1F, 5.1F ir 7.1F malimo frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$) pavyko sumažinti vidutiniškai 40,9 % ($p > 0,05$), o 2.2F, 5.2F ir 7.2F ($213 - 500 \mu\text{m}$) mėginiuose – vidutiniškai 47,4 % ($p > 0,05$). Fermentuojant *P. acidilactici* LUHS29, DON kiekis 2.1F, 5.1F ir 7.1F frakcijose sumažėjo 53,9 ($p > 0,05$), o 2.2F, 5.2F ir 7.2F frakcijose – 40,2 % ($p > 0,05$).

Įvertinus gautus rezultatus, pastebėta, kad fermentuojant *L. brevis* LUHS140 ir *P. acidilactici* LUHS29 grūdų mėginius, kuriuose nustatytas didelis DON kiekis ($> 1400 \mu\text{g/kg s.m}$) nepavyko sumažinti DON iki leidžiamų, Komisijos reglamente 1881/2006 nustatytų, kiekių ($750 \mu\text{g/kg}$ apdorotiems kviečiams) [43]. Tačiau, fermentuojant atrinktomis PRB grūdų mėginius, kuriuose DON koncentracija neviršija $1400 \mu\text{g/kg}$, galima būtų sumažinti šio mikotoksino didesnių kiekių patekimo į produktą riziką. Mėginiuose, kuriuose DON koncentracija nustatyta mažesnė kaip $< 1400 \mu\text{g/kg s.m}$, fermentuojant *P. acidilactici* LUHS29, DON koncentraciją galima sumažinti 44,6 – 55,9 % (5.1 ir 7.2 mėginiai) iki, atitinkamai 597 ir 712 $\mu\text{g/kg s.m}$ ($p < 0,05$) (žr. 3.20 pav.). Įvertinus *L. brevis* LUHS140 pajėgumą sumažinti DON koncentraciją atitinkamose frakcijose, nustatytas 35,2 % ir 34,9 % DON koncentracijos sumažėjimas 5.1 ir 7.2 frakcijose.

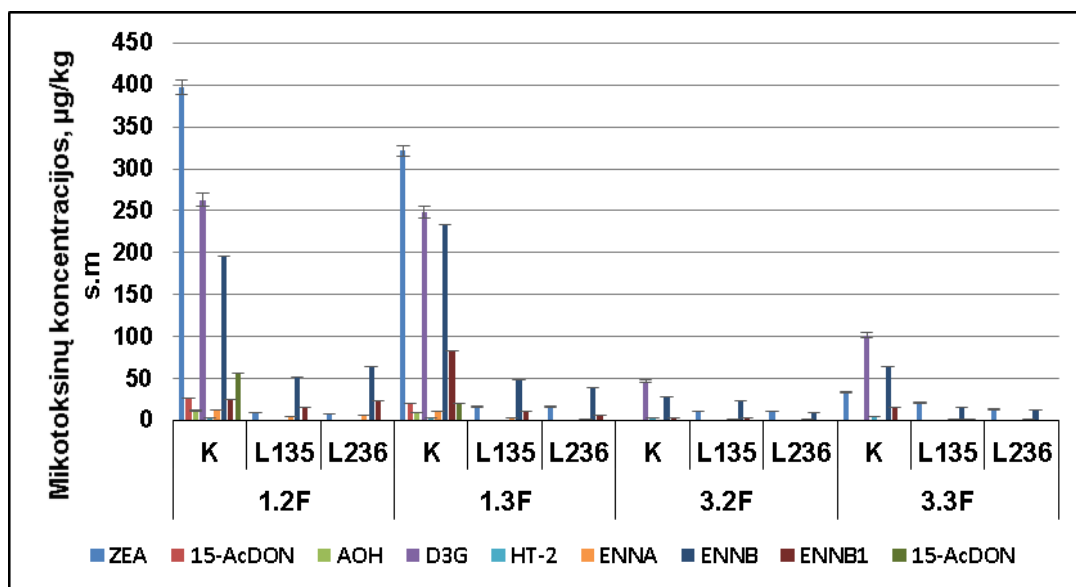


3.20 pav. Skirtingų PRB poveikis DON kiekiui (ELISA), fermentuojant 48 h grūdų mėginių malimo frakcijas (DON 1280–3600 $\mu\text{g/kg s.m}$). F – modelinės malimo frakcijos; L140 – *Lactobacillus brevis* LUHS140; L29 – *Pediococcus acidilactici* LUHS29

Įvertinus fermentacijos kitomis PRB poveikį DON kiekiui (žr. 3.21 A pav.), nustatyta, kad *L. plantarum* LUHS135 ir *P. acidilactici* LUHS236 labai efektyviai mažino DON koncentraciją didelio užsikrėtimo frakcijose (1873 – 2874 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m): 1.2F ir 1.3F po fermentacijos, minėtomis padermėmis, frakcijose DON kiekis sumažėjo vidutiniškai 95,2 % ($p < 0,05$). Įvertinant šių PRB poveikį mažesnio užsikrėtimo DON (85 – 143 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m), 3.2F ir 3.3F frakcijose, *P. acidilactici* DON kiekį vidutiniškai sumažino 29,4 % ($p > 0,05$), o *L. plantarum* sumažino DON koncentraciją 22,8 % ($p > 0,05$).



A



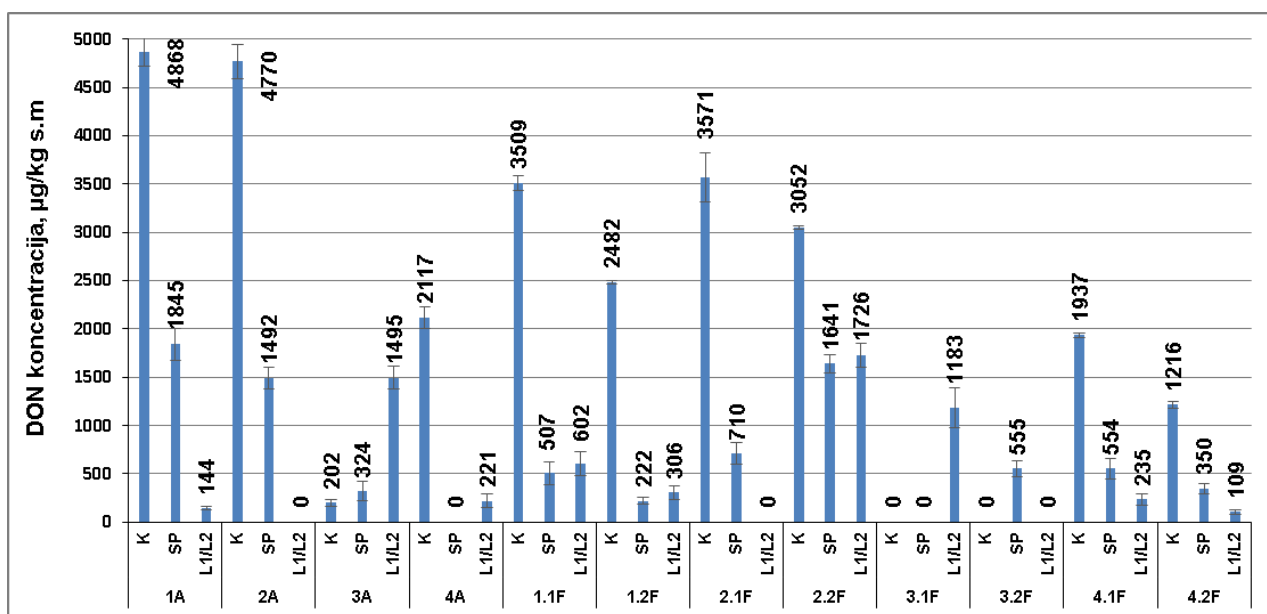
B

3.21 pav. Fermentacijos *Lactobacillus plantarum* LUHS135 (L135) ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 (L236) poveikis DON (A) bei kitiems mikotoksinams (B) atskirose kviečių grūdų malimo frakcijose (AESCh). Fermentacijos trukmė 48 h

Įvertinus 48 h fermentacijos *Lactobacillus plantarum* LUHS135 ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 poveikį kitiems mikotoksinams nustatyta (žr. 3.21 B pav.), kad po fermentacijos 1.2F ir

1.3F mėginių frakcijose, 100 % eliminuojami šie toksinai: 15-AcDON, AOH, D3G ir HT-2 ($p < 0,05$). Didžiausias vidutinis sumažėjimas ZEA atveju pastebėtas 1.2F, 1.3F ir 3.3F mėginių frakcijose, atitinkamai 97,5, 95,1 ir 37,3 %, fermentuojant *L. plantarum*, o fermentuojant *P. acidilactici* nuo 61,8 iki 97,9 % ($p < 0,05$). Toksinų ENNA, ENNB, ENNB₁ koncentracijos vertintose mėginių frakcijose (1.2F, 1.3F, 3.2F, 3.3F) vidutiniškai sumažėjo fermentuojant *L. plantarum*, atitinkamai 61,6 – 72,7 %, 14,9 – 81,33 % ir 4,7 – 91,2 %, o *P. acidilactici* 52,7 – 80,5%, 67,2 – 82,9 % bei 4,7 – 100 % ($p < 0,05$).

Naudojant *Lactobacillus plantarum* LUHS135 ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 padermių kombinaciją kviečių žaliavos fermentacijai (žr. 3.22 pav.), nustatytos nevienareikšmės DON kitimo tendencijos. Nefrakcionuotuose grūdų mėginiuose fermentacija minėtomis padermėmis, leido visiškai pašalinti DON arba efektyviai sumažinti DON koncentraciją (96,1 %, 1A ir 2A mėginiuose) ($p > 0,05$), lyginant su spontanine fermentacija. DON buvo visiškai pašalintas 2.1F, 3.1F, 3.2F frakcijų mėginiuose, o 4.1F ir 4.2F frakcijose DON kiekis po PRB fermentacijos nustatytas, atitinkamai 2,4 ir 3,2 karto mažesnis, lyginant su spontaniu būdu fermentuotomis atitinkamomis frakcijomis ($p > 0,05$) (žr. 3.22 pav.). Taip pat pastebėtas DON koncentracijos padidėjimas 3A, 3.1F mėginiuose taikant PRB kombinaciją, atitinkamai nuo 202 iki 1495 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m ir nuo 0 iki 1183 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m ($p > 0,05$). Spontaninė fermentacija paveikė didesnę DON susidarymą 3A, 3.2F mėginiuose, atitinkamai nuo 202 iki 324 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m ir nuo 0 iki 555 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m ($p > 0,05$).



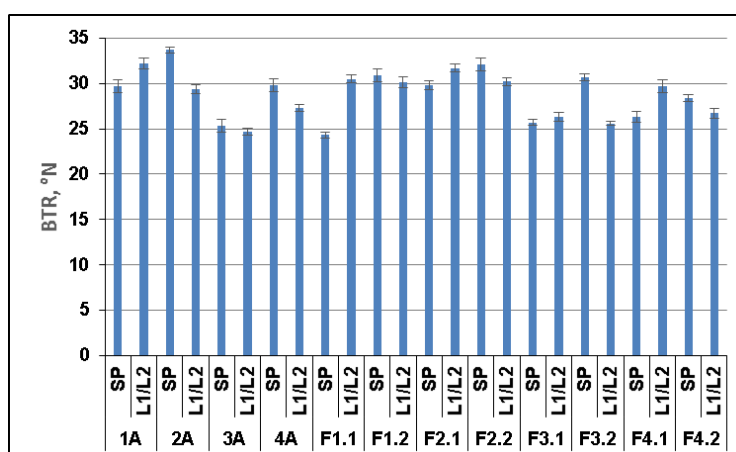
3.22 pav. Fermentacijos poveikis DON koncentracijai (ELISA), naudojant dvi PRB (L1/L2): *Lactobacillus plantarum* LUHS135 (L1) ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 (L2); K – nefermentuotas mėginys; SP – mėginiai po spontaninės fermentacijos; A – nefrakcionuoti kviečių mėginiai

Daugybė tyrimų parodė, kad daugelis PRB rūšių gali pašalinti mikotoksinius. Pašalinimo efektyvumas svyruoja nuo mažų kiekių iki beveik visiško pašalinimo [141,142]. Kiekviena rūšis veikia skirtingai, tačiau universaliosia padermė, kaip teigiama literatūroje yra *L. rhamnosus*. Didžiausias sumažinimas mikotoksinų atveju yra, kai fermentacijos terpės pH svyruoja apie 4. Žinomi keli mikotoksinų eliminavimo mechanizmai, tačiau efektyviausias juos prijungti prie PRB ląstelių. PRB ląstelių paviršiai suriša įvairias molekules: toksinus ir metalų jonus. Jų ląstelių sienelėse yra peptidoglikano matricių, neutralių polisacharidų ir baltymų sluoksnis. Tai ne PRB veiklos pasekmė mikotoksinų sumažėjimas, o mikotoksinų gebėjimas adsorbuotis PRB ląstelių paviršiuose. Retais atvejais PRB

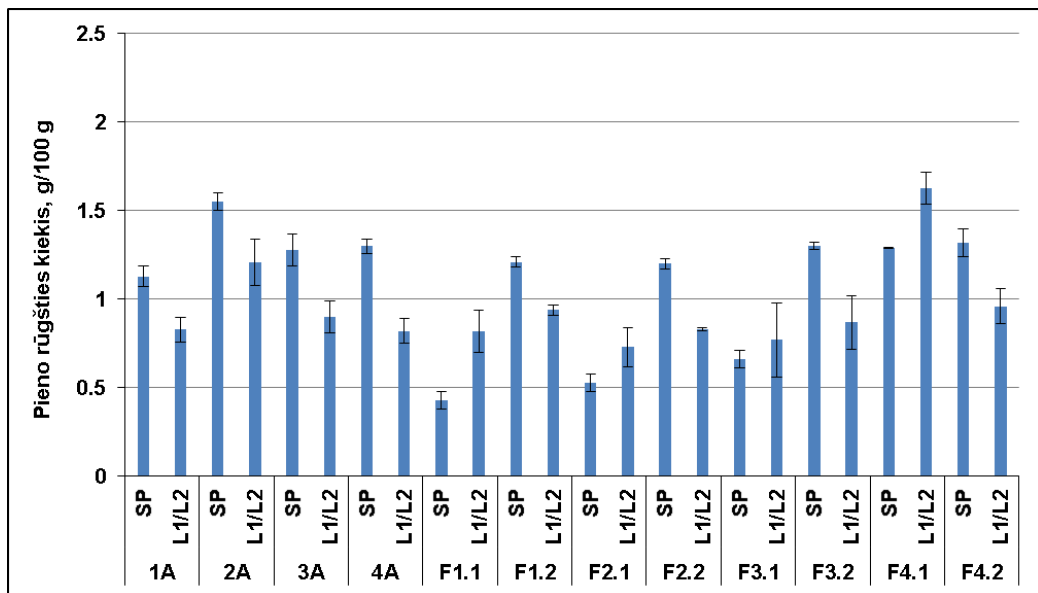
gali kaip anglies šaltinį naudoti toksinus, tokiu atveju pastebimas dar didesnis mikotoksinų sumažėjimas [143].

Pieno ir acto rūgščių susidarymas. Antrajame etape analizuotas DON užkrėstos žaliavos poveikis pieno (PR) ir acto (AR) rūgščių susidarymui fermentacijos terpėje (žr. 3.24 pav.). Analizuojant įvairaus užkrėtimo lygio kviečių malimo produktų poveikį fermentacijos procesui, nustatyta nevienareikšmė organinių rūgščių susidarymo tendencija: aukšto užkrėtimo lygio (DON 3050 – 5000 µg/kg) žaliavos fermentacijos terpės BTR nustatytas 15,18 % didesnis, nei fermentuojant mažiau užkrėstą žaliavą (200 – 2000 µg/kg) ($p < 0,05$) (žr. 2.23 pav.). PRB fermentacija paveikė vidutiniškai 42,18 % didesnę AR susidarymą aukšto užsikrėtimo DON kviečių grūdų malimo produktuose, lyginant su PR kiekiu. Spontantinė fermentacija paveikė 16,7 % ($p < 0,05$) didesnę PR bei 11,1 % AR susidarymą, nei fermentuojant PRB.

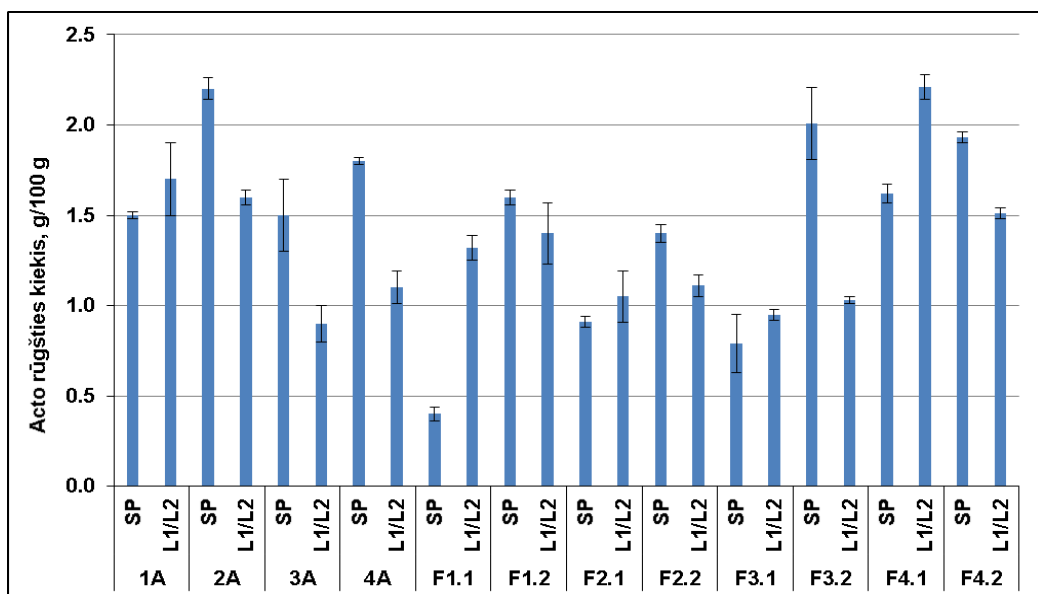
Fermentuojant užkrėstą, nefracionuotą grūdų žaliavą PRB kombinacija (*L. plantarum* LUHS135 + *P. acidilactici* LUHS236), susidarė nuo 0,82 iki 1,2 g/100 g PR, ir nuo 0,9 iki 1,7 g/100 g AR, priklausomai nuo žaliavos (malimo frakcijos). Didžiausi PR ir AR kiekiai susidarė, fermentuojant mėginį nr. 2 (atitinkamai 1,2 ir 1,6 g/100 g), kuriame DON kiekis > 4000 µg/kg, o mažesni kiekiai susidarė, fermentuojant mėginį nr. 4 (DON kiekis atitinkamai < 2200 µg/kg). Nustatyta, kad po 48 h PRB fermentacijos nefracionuotų grūdų mėginių terpėje susidarė nuo $0,37 \pm 0,08$ g/100 g iki $1,62 \pm 0,08$ g/100 g pieno rūgšties ir nuo $0,43 \pm 0,16$ g/100 g iki $2,2 \pm 0,16$ g/100 g acto rūgšties. Analizuojant malimo frakcijų fermentaciją, nustatyta nevienareikšmė PR susidarymo tendencija: spontantinė fermentacija paveikė vidutiniškai 35,8 % mažesnę PR susidarymą 1-os frakcijos (> 500 µm) mėginiuose ir 39,7 % didesnę PR susidarymą, fermentuojant 2-os frakcijos (213 – 500 µm) mėginius, lyginant su PRB fermentacija ($p < 0,05$). AR susidarymo tendencija tokia pati, 1-os frakcijos mėginiuose spontantinė fermentacija paveikė 48,4 % mažesnę AR susidarymą, o 2-os frakcijos mėginiuose 37,3 % didesnę ($p < 0,05$).



3.23 pav. BTR vertės po 48 h fermentacijos *Lactobacillus plantarum* LUHS135 (L1) ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 (L2). Mėginiai: SP – spontantinė fermentacija; F – modelinės malimo frakcijos; 1A, 2A, 3A, 4A – nefracionuoti grūdų mėginiai



A



B

3.24 pav. Pieno rūgšties (A) ir acto rūgšties (B) susidarymas po 48 h fermentacijos *Lactobacillus plantarum* LUHS135 (L1) ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236 (L2). Mėginiai: SP – spontaninė fermentacija; F – modelinės malimo frakcijos; 1A, 2A, 3A, 4A – nefrakcionuoti grūdų mėginiai

Apibendrinant gautus duomenis, nustatyta, kad *P. acidilactici* LUHS29 intensyviau mažina DON kiekį nei *L. brevis* LUHS140. Taip pat nustatyta, kad fermentuojant terpę, kurioje DON koncentracija < 1400 µg/kg, naudojant *P. acidilactici* LUHS29 galima sumažinti DON koncentraciją iki Komisijos reglamente 1881/2006 [43] nustatytų leidžiamų normų apdorotiems kviečiams (750 µg/kg). Įvertinus kitų PRB poveikį DON nustatyta, kad taikant tiek *L. plantarum* LUHS135, tiek *Pediococcus acidilactici* LUHS236, DON kiekis sumažinamas žemiau 400 µg/kg ribos. Įvertinus šių padermių poveikį kitiems mikotoksiniams nustatyta, kad 48 h fermentacijos metu, 15-AcDON, HT-2, D3G ir AOH toksinų koncentracijos sumažinamos žemiau aptikimo ribos. Taip pat nustatyta, kad ZEA, ENNA, ENNB ir ENNB₁ toksinus intensyviau mažina *P. acidilactici* LUHS236 padermė, lyginant su *L. plantarum* LUHS135. Įvertinus PRB kombinaciją (*Lactobacillus plantarum* LUHS135 +

Pediococcus acidilactici LUHS236) ir spontaninę fermentaciją DON kiekio sumažinimui, nustatyta, kad PRB efektyviau sumažina DON koncentraciją nei spontaninė fermentacija tiek nefrakcionuotuose mėginiuose, tiek jų frakcijose.

Atlikus PR ir AR analizę, nustatyta, kad taikant PRB kombinaciją (*L. plantarum* LUHS135 + *P. acidilactici* LUHS236) didesnės BTR vertės gautos fermentuojant labai užkrėstus mėginius, lyginant su mažiau užkrėstais. Taip pat nustatyta, kad PRB kombinacija nefrakcionuotuose mėginiuose produkavo didesnius AR nei PR kiekius. Spontaninės fermentacijos metu, nefrakcionuotuose mėginiuose nustatyti didesni AR ir PR kiekiai. Taip pat nustatyta, kad PR ir AR susidarymas priklausė nuo frakcijos dalelių dydžio, DON kiekio bei naudojamų PRB: 1-oje frakcijoje ($> 500 \mu\text{m}$, $\text{DON} > 3000 \mu\text{g/kg}$) spontaninės fermentacijos metu susidarė mažesni kiekiai PR, tačiau didesni fermentuojant 2-os frakcijos ($213 - 500 \mu\text{m}$, $\text{DON} < 2700 \mu\text{g/kg}$) mėginius lyginant su PRB fermentacija. Tokia pati tendencija gaunama ir AR atžvilgiu. Tai reiškia, kad PRB intensyviau produkavo PR ir AR 1-oje frakcijoje lyginant su 2-a, kurioje DON kiekis buvo mažesnis. Iš gautų rezultatų galima manyti, kad tinkamesnė terpė PRB produkuoti rūgštims yra stambiausių dalelių frakcija ($> 500 \mu\text{m}$), o spontaninės fermentacijos metu išgauti didesnius PR ir AR kiekius galima fermentuojant vidutinių dalelių frakciją ($213 - 500 \mu\text{m}$).

Apibendrinant tyrimo rezultatus, galima teigti, kad tik kompleksiskai taikant fizinius būdus (grūdų valymas, malimas ir frakcionavimas) grūdų apdorojimui ir biotechnologines priemones (fermentacija atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis), galima būtų žymiai sumažinti arba visiškai pašalinti DON ir kitų mikotoksinų kiekius kvietiniuose fermentuotuose pusgaminiuose, taip padidinant kvietinių kepinių saugą.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad tirti grūdų mėginiai buvo užkrėsti 7 skirtingomis mikromicetų gentimis. Vertinant išorinį grūdų užsikrėtimą, vyravo *Fusarium* spp. (100 % mėginių), *Alternaria* spp. (60 % mėginių), *Penicillium* spp. ir *Verticillium* spp. (50 % mėginių) mikroskopinių grybų gentys. Vertinant vidinį grūdų užsikrėtimą, nustatyta, kad vyravo *Fusarium* spp. (100 % mėginių), *Alternaria* spp. (80 % mėginių) ir kitos (70 %) mikroskopinių grybų gentys.
2. Tirtuose 2017 m. grūdų mėginiuose nustatytas užsikrėtimas mikroskopinių grybų gyvybingomis sporomis svyravo ribose nuo $1,07 \times 10^4$ iki $25,23 \times 10^4$ KSV/g. Nustatyta statistiškai patikima atvirkštinė koreliacija ($r = -0,9972$), $p < 0,05$) tarp deoksinivalenolio (DON) kiekio ir mikroskopinių grybų sporų skaičiaus didelio užsikrėtimo DON grūduose.
3. Įvertinant DON pasiskirstymą modelinėse malimo frakcijose nustatyta, kad grūdų malimas ir frakcionavimas reikšmingai ($p < 0,05$) sumažino DON kiekį 1-oje, 2-oje ir 3-oje frakcijose, vidutiniškai 37,2, 50,9 ir 64,1 %, lyginant su DON kiekiu nefrakcionuotuose mėginiuose. Esant dideliame grūdų užsikrėtimui DON, po malimo, į miltų frakcijas gali pereiti dideli mikotoksino kiekiai (sumažėjimas 57,9 %, kai DON kiekis 600 – 2300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m ir 73,6 %, kai DON kiekis $>2300 \mu\text{g}/\text{kg}$ s.m). Esant mažam grūdų užsikrėtimui (200 – 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), DON lieka (71,66 %) stambiausių dalelių (sėlenų) frakcijoje ir į smulkesnes (miltų) frakcijas nepereina.
4. Nustatyta, kad HT-2, ENNB ir ENNB₁ toksinai koncentruojasi smulkesnėse malimo frakcijose ($< 230 - 500 \mu\text{m}$). HT-2 nustatyta 18,5 % daugiau, o ENNB ir ENNB₁ toksinų – vidutiniškai 24 ir 11,5 % daugiau ($p > 0,05$) smulkiausioje malimo frakcijoje, lyginant su stambiausių dalelių frakcija. Tai parodo, kad vien tik pirminis grūdų valymas ir frakcionavimas neužtikrina mikotoksinų rizikos sumažinimo, nes mikotoksinai gali nevienodai pasiskirstyti malimo frakcijose.
5. Vertinant mikrobinės fermentacijos poveikį DON detoksikacijai, nustatyta, kad 48 h fermentacija atrinktomis PRB (*Lactobacillus plantarum* LUHS135 ir *Pediococcus acidilactici* LUHS236) padermėmis leido visiškai pašalinti arba efektyviai sumažinti DON kiekį, lyginant su pradine DON koncentracija: po 48 h fermentacijos DON kiekis sumažėjo 80,5 – 95,2 %, fermentuojant *L. plantarum* LUHS135, ir 81,2 – 94,9 %, fermentuojant *P. acidilactici* LUHS236. Taip pat nustatyta, kad fermentuojant mažo užsikrėtimo frakcijas *L. plantarum* LUHS135 ir *P. acidilactici* LUHS236, 15-AcDON, AOH, D3G ir HT-2 toksinai nustatyti žemiau aptikimo ribos ($p < 0,05$).
6. Analizuojant įvairaus užkrėtimo lygio kviečių malimo produktų poveikį fermentacijos procesui, nustatyta nevienareikšmė organinių rūgščių susidarymo tendencija: aukšto užkrėtimo lygio (DON 3050 – 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) žaliavos fermentacijos terpės BTR nustatytas 15,18 % didesnis, nei fermentuojant mažiau užkrėstą žaliavą (200 – 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). PRB fermentacija paveikė vidutiniškai 32,61 % didesnę AR susidarymą didelio užsikrėtimo kviečių grūdų malimo produktuose, lyginant su PR kiekiu.

NAUDOTA LITERATŪRA

1. ISMAIEL, A. A., PAPENBROCK, J. *Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity*. Agriculture, 2015, 5, pp. 492-537.
2. SRAMKOVA, Z., GREGOVA, E., STURDÍK, E. *Chemical composition and nutritional quality of wheat grain*. Acta Chim, Slovaca, 2009, 2, pp. 115-138.
3. HOSSAIN, K., et al. *Interdependence of cultivar and environment on fiber composition in wheat bran*. Aust J, Crop Sci, 2013, 7, pp. 525-531.
4. KHALID, K. H., OHM, J. B., SIMSEK, S. *Whole wheat bread: Effect of bran fractions on dough and end-product quality*. Journal of Cereal Science, 2017, 78, pp. 48-56.
5. FLINT, HJ., et al. *Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism*. Proc Nutr Soc, 2015, 74, pp.13-22.
6. NILSSON, AC., OSTMAN, E., PRESTON, T., BJÖRCK, I. *Effects of GI vs content of cereal fibre of the evening meal on glucose tolerance at a subsequent standardized breakfast*. EJCN, 2008, 62, pp. 712-20.
7. PARK, SH.; WILSON, JD.; SEABOURN, BW. *Starch granule size distribution of hard red winter and hard red spring wheat: Its effects on mixing and bread making quality*. Journal of Cereal Science, 2009, 49, pp. 98-105.
8. WITCZAK, M., et al. *Waxy starch as dough component and anti-staling agent in gluten-free bread*. LWT, 2019, 99, pp. 476-482.
9. MARTINEZ, M., et al. *Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust*. Food Chemistry, 2018, 239, pp. 295-303.
10. BEMILLER, J., WHISTLER, R. *Starch chemistry and technology*. Academic Press, New York, SAD, 2009, 3, pp. 441-505.
11. SVIHUS, B., UHLEN, AK., HARSTAD, OM. *Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review*. Animal Feed Science and Technology, 2005, 122, pp. 303-320.
12. HORVAT, D., et al. *Characterization of bread wheat cultivars (Triticum aestivum L.) by glutenin proteins*. Cereal Res, Commun, 2013, 4, pp.133-140.
13. HORVAT, D, et al. *The influence of albumins and globulins on breadmaking quality of wheat (Triticum aestivum L.)*. Agronomski Glasnik, 2007, 69, pp. 135-145.
14. WIESER, H., ANTES, S., SELMEIER, W. *Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reverse-phase high-performance liquid chromatography*. Cereal Chem, 1998, 75, pp. 644-650.
15. ROUSSEL, P., CHIRON, H. *Les pains français: Evolution, qualite, production*. In Mae erti, 2002, pp. 433.
16. DE VUYST, L., et al. *Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform* Food Microbiology, 2013, 37, pp. 11-29.
17. HANSEN, A., SCHIEBERLE, P. *Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects*. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16, pp. 85-94.
18. RIZZELLO, C. G., et al. *Use of sourdough made with quinoa (Chenopodium quinoa) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread*. Food Microbiology, 2016, 56, pp. 1-13.
19. AXEL, C., et al. *Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread*. International Journal of Food Microbiology, 2016, pp. 86-94.

20. AXEL, C., et al. *Antifungal activities of three different lactobacillus species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 239, pp. 111-117.
21. EDLAYNE, G., SIMONE, A., FELICIO, J.D. *Chemical and biological approaches for mycotoxin control: a review*, Recent Pat, Food Nutr, Agric, 2009, 1, pp. 155-161.
22. JARD, G., et al. *Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation*. Food Addit, Contam, Part A, Risk Assess, 2011, 28, pp. 1590-1609.
23. HEREDIA N., WESLEY I., GARCIA S. *The microbiology of cereals and cereal products*. UK, 2009, pp. 27-34.
24. BRÄSE, S., et al. *Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*. Chem Rev, 2009, pp. 90-109.
25. MARIN, S., et al. *Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment*. Food Chem Toxicol, 2013, pp. 37-60.
26. REVANKAR, SG. *Clinical implications of mycotoxins and Stachybotrys*. Am J Med Sci, 2003, pp. 262-274.
27. J, P, JOUANY. *Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds*. Research Centre of Clermont-Theix, 2007, pp. 342-362.
28. ABDEL-WAHHAB, M., KHOLIF, A. *Mycotoxins in Animal Feeds and Prevention Strategies: A Review*. Asian Journal of Animal sciences, 2008, 2, pp. 7-25.
29. NIELS, KF., THРАН, U. *Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2001, pp. 75-79.
30. European Commission (EC). *Commission recommendation on the prevention and reduction of Fusarium toxins in cereals and cereal products*. Commission Regulation (EC) No. 583/2006, Off J, Eur Union, 2006, L234, pp. 35-40.
31. LUGAUSKAS, A., KRASAUSKAS, A., REPEČKIENĖ J. *Ekologiniai veiksniai, lemiantys mikromicetų paplitimą ant javų grūdų ir sojų sėklų*. Ekologija, 2004, pp. 21-24.
32. JARD, G., et al. *Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation*. Food Additives & Contaminants, Part A, 2011, pp. 1590-1609.
33. BARTKIENE, E., et al. *Mycotoxin Decontamination: Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes, Structure and Function of Food Engineering*. InTech, 2012, pp. 172-193.
34. REDDY, K., et al. *An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health*. Toxin Rev, 2010, 29, pp. 3-26.
35. GOHARI, A.M., et al. *Mycoflora of Wheat Grains in the Main Production Area in Kerman Province, Iran*. International Journal of Agriculture & Biology, 2013, pp. 635-636.
36. LUGAUSKAS, A., et al. *Micromycetes control in storages of succulent agricultural produce by organic technological means*. Ecology, 2006, pp. 96-104.
37. BARCELOUX, G., et al. *Medical toxicology of natural substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous animals*. A Jhon Wiley & Sons, 2007, pp. 317-349.
38. LUGAUSKAS A., et al. *Contamination of cereal grain by Fusarium micromycetes and their mycotoxins under Lithuanian climatic conditions*. Ecology, 2006, pp. 71-79.
39. KOKKONEN, M., et al. *Mycotoxin production of selected Fusarium species at different culture conditions*. International Journal of Food Microbiology, 2010, pp. 17-25.

40. PESTKA, J. *Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance*. Archives of Toxicology, 2010, pp. 663-679.
41. PESTKA, J. *Mechanisms of Deoxynivalenol-Induced Gene Expression and Apoptosis*. Food Addit., Contam., Part A, 2008, 25, pp. 1128-1140.
42. EFSA. *Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products*. Statement of EFSA, EFSA Journal, Parma, Italy, 2014, 12, pp. 3699.
43. KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1881/2006 2006 m. gruodžio 19 d. *Nustatantis didžiausias leistinas tam tikrų teršalų maisto produktuose koncentracijas*. [žiūrėta 2018.03.21]. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=LT>
44. FINAMORE, A., et al. *Novel approach for food evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods*. Journal of Agriculture and Food chemistry, 2004, 52, pp. 7425-7431.
45. PUSSEMIER, L., et al. *Chemical safety of conventionally and organically produced foodstuffs: A tentative comparison under Belgian conditions. Agricultural factors affecting Fusarium communities in wheat kernels*. Food Control, 2017, 252, pp. 53-60.
46. KARLSSON, I., et al. *Agricultural factors affecting Fusarium communities in wheat kernels*. International Journal of Food Microbiology, 2017, 3, pp. 53-60.
47. MAYER, L., et al. *Lateral flow devices for the semi-quantitative detection of the mycotoxin Zearalenone in corn by using "green extraction"*. Romer Labs Division Holding GmbH, 2013, pp. 117.
48. European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in food and feed*. EFSA J, 2011, pp. 2407.
49. LISIESKA, K., et al. *Presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in the mammary gland*. Bulletin Veterinary Institute Pulawy, 2008, pp. 671-674.
50. European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food*. EFSA J, 2011, pp. 9, 2197
51. European Food Safety Authority (EFSA). *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed*. EFSA J, 2005, pp. 1-32.
52. SUPRONIENE, S., et al. *The effect of different tillage-fertilization practices on the mycoflora of wheat grains*. Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, 2011, pp. 315-326.
53. European Food Safety Authority (EFSA). *Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products*. EFSA J, 2007, pp. 446, 1-127.
54. European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of aflatoxins in food*. EFSA J, 2011, pp. 9, 2197.
55. RUSSELL, R., et al. *Coffee, mycotoxins and climate change*. Food Research International, 2014, pp. 1-15.
56. PATERSON, R. R.M., LIMA, N. *Further mycotoxin effects from climate change*. Food Research International, 2011, pp. 44, 2555-2566.
57. SILVA, C., et al. *Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (Coffea arabica L.) beans*. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, pp. 521-526.

58. SERRANO, A.B., et al. *Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area*. Food Chem, 2012, pp. 423-429.
59. LUGAUSKAS, A. *Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin*. Institute of Botany, 2005, pp. 3-16.
60. LUGAUSKAS, A., LEVINSKAITĖ, L., VALIUSAUSKAITE, A. *Potential toxin-producing micromycetes on fruit and berries of horticultural plants treated with fungicides*. Botanica Lthuanica, 2005, pp. 47-54.
61. AOYAMA K., et al. *Four year surveillance for ochratoxin A and fumonisins in retail foods in Japan*. Journal of Food Protection, 2010, pp. 344-352.
62. MARIN, S., et al. *Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment*. Food and Chemical Toxicology, 2008, pp. 218-237.
63. SIUDA, R., et al. *Influence of the degree of fusariosis on technological traits of wheat grain*. Int J, Food Sci, Technol, 2010, 45, pp. 2596-2604.
64. LANCOVA, K., et al. *Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking*. Food Addit, Contam, 2008, 25, pp. 650-659.
65. WANG, J.H., et al. *Impact of the fungal protease produced by Fusarium culmorum on the protein quality and breadmaking properties of winter wheat*. Food Res, Technol, 2005, 220, pp. 552-559.
66. EGGERT, K., et al. *In vitro degradation of wheat gluten fractions by Fusarium graminearum proteases*. Food Res, Technol, 2011, 233, pp. 697-705.
67. ERIKSEN, G.S., PETTERSSON, H. *Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed*. Animal Feed Sci, Technol, 2004, 114, pp. 205-239.
68. HORVART, D., et al. *The Influence of Fusarium Infection on Wheat (Triticum aestivum L.) Proteins Distribution and Baking Quality*. Cereal Research Communications, 2015, pp. 61-71.
69. PERTEN, G. *About Gluten*. Perten instruments, 2016. [žiūrēta 2019.04.29] Prieiga per: <http://www.perten.com/Products/Glutomatic/About-gluten/>
70. SCHMIDT, M., et al. *Impact of post-harvest degradation of wheat gluten proteins by Fusarium culmorum on the resulting bread quality*. European Food Research and Technology, 2017, 243, pp. 1609-1618.
71. JOHANSSON, AS., et al. *Predicting aflatoxin and fumonisin in shelled corn lots using poor-quality grade components*. J AOAC Int, 2006, 89, pp. 433-440.
72. KABAK, B., DOBSON, AD., VAR, I. *Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review*. Crit Rev, Food Sci, Nutr, 2006, 46, pp. 593-619.
73. MUTIGA, SK., et al. *Extent and drivers of mycotoxin contamination: inferences from a survey of Kenyan maize mills*. Phytopathology, 2014, 104, pp. 1221-1231.
74. EUROPEAN COMMISSION REGULATION 2015/786. *Defining acceptability criteria for detoxification processes applied to products intended for animal feed*. Off J Eur Union, 2015, 125, pp.10-14.
75. CHELI, F., et al. *Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review*. LWT-Food Sci Technol, 2013, 54, pp. 307-314.
76. KUSHIRO, M. *Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat*. Int J, Mol Sci, 2008, 9, pp. 2127-2145.
77. RYU, D., BIANCHINI, A., BULLERMAN, LB. *Effects of processing on mycotoxins*. Stewart Postharvest Rev, 2008, 4, pp. 1-7.
78. SUMAN, M., GENEROTTI, S. *Transformation of mycotoxins upon food processing: masking, binding and degradation phenomena*. In Masked Mycotoxins in Food, Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry Publishing, 2015, Chapter 6.

79. RIOS, G., et al. *Impact of durum wheat milling on deoxynivalenol distribution in the outcoming fractions*. Food Addit Contam A, 2008, 26, pp. 487-495.
80. VIDAL, A., et al. *Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market*. Food Chem Toxicol, 2013, 53, pp. 133-138.
81. ZHANG, H., WANG B. *Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol- 3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing*. Food Control, 2014, 44, 86-91.
82. ZHENG Y., et al. *Effect of milling on the content of deoxynivalenol, nivalenol, and zearalenone in Japanese wheat*. Food Control, 2014, 40, pp. 193-197.
83. Stuper-Szablewskaa K., et al. *Changes in contents of trichothecenes during commercial grain milling*. LWT-Food Sci Technol, 2016, 69, pp. 55-58.
84. BRERA C., et al. *Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta*. Food Control, 2013, 31, pp. 309-312.
85. HERRERA, M., et al. *Comparison of deoxynivalenol, ochratoxin A and aflatoxin B1 levels in conventional and organic durum semolina and the effect of milling*. J Food Nutr, Res, 2009, 48, pp. 92-99.
86. ALY, SE. *Distribution of aflatoxins in product and by-products during glucose production from contaminated corn*. Nahrung, 2002, 46, pp. 341-344.
87. CANELA, R., et al. *Fate of fumonisins B₁ and B₂ in steeped corn kernels*. Food Addit Contam, 1996, 13, pp. 511-517.
88. PUJOL, R., et al. *Fate of fumonisin B1 in corn kernel steeping water containing SO₂*. J Agric, Food Chem, 1999, 47, pp. 276-278.
89. LEFYEDI, ML., TAYLOR, JRN. *Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt*. J Inst Brew, 2006, 112, pp. 108-116.
90. SCUDAMORE, K.A., et al. *Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production*. Food Addit, Contam, 2003, 20, pp. 1153-1163.
91. VIDAL, A., et al. 2014. *Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria*. Food Control, 2014, 40, pp. 234-242.
92. BULLERMAN, L.B., BIANCHINI, A. *Stability of mycotoxins during food processing*. Int J, Food Microbiol, 2007, 119, pp. 140-146.
93. KABAK, B. *The fate of mycotoxins during thermal food processing*. J Sci, Food Agric, 89, 2009, pp. 549-554.
94. LANCOVA, K., et al. *Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer*. Food Addit, Contam, 2008, 25, pp. 732-744.
95. PACIN, A., et al. *Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate*. Food Control, 2010, 21, pp. 492-495.
96. CASTELLS, M., et al. *Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review*. Food Addit, Contam, 2005, 22, pp. 150-157.
97. ACCERBI, M., et al. *Utilization of highly deoxynivalenol-contaminated wheat via extrusion processing*. J. Food Prot, 1999, 62, pp. 1485-1487.
98. SCUDAMORE, K.A., et al. *Fate of the fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain*. Food Addit, Contam, 2008, 25, pp. 331-337.

99. VANHOUTTE, I., et al. *Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds*. Front, Microbiol, 2016, 7, pp. 561.
100. HE, J., et al. *Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: A review*. Trend Food Sci, Technol, 2010, 21, pp. 67-76.
101. TAKAHASHI-ANDO, N., et al. *A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: Enzyme purification and gene cloning*. Biochem, J, 2002, 365 pp. 1-6.
102. TAKAHASHI-ANDO, N., et al. *Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene*. Appl Microbiol, Biotechnol, 2005, 67, pp. 838-844.
103. NOVOZYMES A/S. *Detoxification of Feed Products*. World Patent 2009109607, 2009.
104. STILES, ME., HOLZAPFEL, WH. *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. Int J, Food Microbiol, 1997, 36, pp. 1-29.
105. MILLER, N., WETTERSTROM, W. *The beginnings of agriculture: The ancient near east and north Africa*. The Cambridge World History of Food, Cambridge Univ Press, 2000, pp. 1123-39.
106. NURANDA, L. *A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods*. Food Sci, Human Wellness, 2015, 4, pp. 47-55.
107. ZANNINI, E., et al. *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides*. Appl Microbiol, Biotechnol, 2016, 100, pp. 1121-35.
108. INDIRA, K., et al. *Biopreservative potential of marine Lactobacillus spp.* Afr J, Microbiol Res, 2011, 5, pp. 2287-96.
109. NDAGANO, D., et al. *Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the Weissella genus isolated from food*. J Food Sci, 2011, 76, pp. 305-11.
110. GEREZ, CL., et al. *Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria*. J Food Sci, 2010, 75, pp. 354-9.
111. GEREZ, CL., et al. *Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria*. Biol, Control, 2013, 64, pp. 231-7.
112. ORANUSI, S., et al. *Antifungal properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Ricinus communis, Pentaclethra macrophylla and yoghurts*. Glo Adv, Res J, Food Sci, Technol, 2013, 2, pp. 1-6.
113. SCHILLINGER, U., VILLARREAL, JV. *Inhibition of Penicillium nordicum in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods*. Food Control, 2010, 21, pp. 107-11.
114. LANGA, S., et al. *Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens*. J Dairy Sci, 2014, 97, pp. 6116-21.
115. ZOU, ZY., et al. *In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria*. Food Sci, Biotechnol, 2012, 21, pp. 1677-83.
116. CORSETTI, A., et al. *Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by Lactobacillus sanfrancisco CBI*. Appl Microbiol, Biotechnol, 1989, 50, pp. 253-6.
117. DALIÉ, DKD., et al. *Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review*. Food Control, 2010, 21, pp. 370-80.
118. T.S., FRANCO., et al. *Lactic acid bacteria in the inhibition of Fusarium graminearum and deoxynivalenol detoxification*. Journal of Applied Microbiology, 2011, pp. 739-748.
119. ZOU ZY., et al. *In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria*. Food Sci, Biotechnol, 2012, 21, pp. 1677-83.

120. DIBNER J., BUTTIN, P. *Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism*. Journal of Applied Poultry Research, 2002, 11, pp. 453-63.
121. PAPATSIROS, VG., et al. *Alternatives to antibiotics for farm animals*. CAB Rev, Perspect, Agric, Vet Sci, Nutr, Nat Resour, 2013, 8, pp. 1-15.
122. DIEBOLD, G., EIDELSBURGER, U. *Acidification of diets as an alternative to antibiotic growth promoters*. Antimicrobial Growth Promoters, The Netherlands, Wageningen Academic Publishers, 2006, pp. 311-27.
123. VAITKEVIČIENĖ, R., et al. *Rice polish medium for the evaluation of lactic acid bacteria antifungal activity against some of Aspergillus spp. and Penicillium spp.* Žemdirbystė-Agriculture, 106, 2019, pp. 59-64.
124. BARTKIENE, E., et al. *The contribution of P. acidilactici, L. plantarum, and L. curvatus starters and L-(+)-lactic acid to the acrylamide content and quality parameters of mixed rye-wheat bread*. LWT - Food Science and Technology, 2017, 80, pp. 43-50.
125. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 712:2010]. Grūdai ir jų produktai. Drėgmės kiekio nustatymas (ISO 712:2010). [Žiūrėta 2017.10.28] Prieiga per: https://view.elaba.lt/standartai/view?search_from=primo&id=683629
126. Nancy, T., Lawrence, N. *Determination of Ash in Animal Feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited*. Journal of AOAC International, 2012, 99, pp. 1392-1396.
127. AOAC-AACC 960.52. *Microchemical Determination of Nitrogen*. [Žiūrėta 2017.11.10] Prieiga per: <http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=43039>.
128. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST ISO 21527-1:2008]. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis mielių ir pelėsinių grybų skaičiavimo metodas (ISO 21527-1:2008)*, 2008.
129. LUGAUSKAS A., PAŠKEVIČIUS A., REPEČKIENĖ J. *Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje*. Vilnius, 2002, pp. 3-434.
130. AOAC OFFICIAL METHOD 2007.01. *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate*. 2007. [Žiūrėta 2018.10.24] Prieiga per: <http://www.thenfl.com/pdf/AOAC%202007.1.pdf>
131. EUROPEAN COMMISSION (EC). *Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed (SANTE/12089/2016), implemented by 01/01/2017*. EC, Brussels, Belgium, 2016. [Žiūrėta 2019.04.27]. Prieiga per: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf
132. JUKONYTE R., et al. *A potential of brown rice polish as a substrate for the lactic acid and bioactive compounds production by the lactic acid bacteria newly isolated from cereal-based fermented products*. LWT Food Sci Technol. 2018, 97, pp. 323-331
133. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST 1553:1998]. *Miltiniai kepiniai ir konditerijos gaminiai. Rūgštingumo ir šarmingumo nustatymo metodai*, 1998.
134. BANU, S., et al. *A novel method for ash analysis in wheat milling fractions by using laser-induced breakdown spectroscopy*. Journal of Cereal Science, 2017, 78, pp. 33-38.
135. VAN DER FELLS-KLERX HJ., et al. *Mycotoxin contamination of cereal grain commodities in relation to climate in North West Europe*. Food Additives and Contaminants, Part A, 2012, 29, 1581-1592.
136. FREDLUND, E., et al. *Deoxynivalenol and other selected Fusarium toxins in Swedish oats - Occurrence and correlation to specific Fusarium species*. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167, pp. 276-283.

137. LIETUVOS HIDROMETEOROLOGIJOS TARNYBA PRIE APLINKOS MINISTERIJOS. *Archyvas*. [žiūrėta 2019.03.21]. Prieiga per <http://www.meteo.lt/lt/desimtadieniu-agrometeorologiniu-salygu-archyvas#>
138. HUNTINGFORD, C., et al. *Nutt all Impact of climate change on health: What is required of climate modellers?* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, 2, pp. 97-103.
139. EDWARDS, S.G., et al. Distribution of Fusarium mycotoxins in UK wheat mill fractions. 2011, 28, pp. 1694-1704.
140. SUNDSTOL, G., et al. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. Food and Chemical Toxicology, 2018, 11, pp. 189-205.
141. FATMANUR, D., et al. *Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs*. LWT - Food Science and Technology, 2017, 79, pp. 361-366.
142. OLIVEIRA, P.M., et al. *Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products*. Food Microbiology, 2014, 37, pp. 78-95.

PRIEDAI

1 Priedas. AESCh-DSGMS analizės priklausomi parametrai

Mikotoksinas	RT	Kiekybinis jonas	Teorinė masė m/z	Išmatuota masė m/z	Masės tikslumas, ppm	Patvirtinimo jonas	Teorinė masė, m/z	Išmatuota masė, m/z	Masės tikslumas, ppm
D3G	1.4	[M+NH ₄] ⁺	476.2126	476.2114	2.52	[M+H] ⁺	459.1860	459.1851	1.96
DON	1.5	[M+H] ⁺	297.1333	297.1338	-1.68	[M+Na] ⁺	319.1152	319.1161	-2.82
15-AcDON	2.2	[M+NH ₄] ⁺	356.1703	356.1709	-1.68	[M+H] ⁺	339.1438	339.1449	-3.24
HT-2	3.6	[M+NH ₄] ⁺	442.2425	442.2428	-0.68	[M+Na] ⁺	447.1989	447.1975	3.13
AOH	3.8	[M+H] ⁺	259.0601	259.0598	1.16	[M+Na] ⁺	281.2156	281.2144	4.27
T-2	4.7	[M+NH ₄] ⁺	484.2541	484.2528	2.68	[M+Na] ⁺	489.2095	489.2080	3.07
ZEA	6.5	[M+H] ⁺	319.1540	319.1548	-2.51	[M+Na] ⁺	341.1359	341.1364	-1.47
ENNB	10.0	[M+NH ₄] ⁺	657.4433	657.4444	-1.67	[M+Na] ⁺	662.3987	662.3993	-0.91
ENNB1	10.2	[M+NH ₄] ⁺	671.4589	671.4584	0.74	[M+Na] ⁺	676.4143	676.4153	-1.48
ENNA	10.3	[M+NH ₄] ⁺	685.4746	685.4732	2.04	[M+Na] ⁺	690.4300	690.4289	1.59

2 Priedas. AESCh-DSGMS analizės metu nustatyti mikotoksinai mėginiuose

Nr.	Koncentracija, µg/kg									
	DON	ZEA	15-AcDON	AOH	D3G	HT-2	ENNA	ENNB	ENNB1	T-2
1z	4236	126	48,0	7,44	599	2,64	5,15	217	54,1	
2z	4660	230	37,4	22,2	322	2,29	10,2	237	75,8	
3z	176				61,2	4,42	3,58	35,7	9,54	
4z	2017	20,4	9,42		238	16,8	5,64	104	35,6	1,56
5z	2117	401	10,4		202		7,10	102	36,8	
6z	1972	36,3			249	7,74	4,83	41,3	14,3	
7z	2959	105		29,5	241		22,2	677	220	
8z	4169	448	17,8	11,9	184	1,54	24,4	383	177	
9z	414				79,7		2,60	26,3	4,11	
10z	543				99,1	14,8	10,5	95,5	48,2	0,90

3 Priedas. Mikotoksinų kodai ir jų pavadinimai

Mikotoksinas	Sutrumpinimas	Kiekybinio įvertinimo riba, µg/kg
15-actil-deoksinivalenolis	15-AcDON	10
Aflatoksinas B ₁	AFB ₁	1
Alternariolas	AOH	5
Deoksiynivalenolio-3-gliukozidas	D3G	20
Deoksinivalenolis	DON	20
Eniatinas A	ENN A	1
Eniatinas B	ENN B	1
Eniatinas B ₁	ENN B ₁	1
HT-2 toksinas	HT-2	1
T-2 Toksinas	T-2	1
Zearelenonas	ZEA	10