



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Paulius Žitinevičius

**VASARINIŲ KVIEČIŲ *FUSARIUM* SPP. TARŠOS
MONITORINGAS IR PREVENCIJOS GALIMYBĖS
ANTIMIKROBINIAIS BIOPRODUKTAIS**

Baigiamasis magistro darbas

Vadovas

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

KAUNAS, 2015

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS
MAISTO MOKSLO IR TECHNOLOGIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas
Doc. dr. Loreta Bašinskiėnė

**VASARINIŲ KVIEČIŲ *FUSARIUM* SPP. TARŠOS
MONITORINGAS IR PREVENCIJOS GALIMYBĖS
ANTIMIKROBINIAIS BIOPRODUKTAIS**

Baigiamasis magistro darbas
Maisto mokslas ir sauga (M1026L21)

Vadovas
Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Recenzentas
Dr. Daiva Žadeikė

Projektą atliko
Paulius Žitinevičius

KAUNAS, 2015



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Paulius Žitinevičius

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga, M1026L21

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Baigiamojo projekto „VASARINIŲ KVIEČIŲ *FUSARIUM* SPP. TARŠOS MONITORINGAS IR
PREVENCIJOS GALIMYBĖS ANTIMIKROBINIAIS BIOPRODUKTAIS“
AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 ____ m. _____ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Pauliaus Žitinevičiaus** baigiamasis projektas tema „VASARINIŲ KVIEČIŲ *FUSARIUM* SPP. TARŠOS MONITORINGAS IR PREVENCIJOS GALIMYBĖS ANTIMIKROBINIAIS BIOPRODUKTAIS“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o 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)

Žitinevičius, P. *Vasarinių kviečių Fusarium spp. taršos monitoringas ir prevencijos galimybės antimikrobiniais bioproductais*. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Maisto mokslo ir technologijos katedra.

Kaunas, 2015. 68 psl.

SANTRAUKA

Darbas skirtas vasarinių kviečių *Fusarium spp.* taršos kontrolei ir prevencijai grūdų laikymo metu, tiriant kompleksinių technologinių priemonių panaudojimo galimybes grūdų kokybės užtikrinimui ir nuostolių mažinimui: (i) greito akustinio metodo DON įvertinimui (lygiagrečiai atliekant DON analizę ELISA metodu); (ii) elektrocheminių daviklių panaudojimo dujų, susidarančių grūdų laikymo metu, monitoringui; (iii) pieno rūgšties bakterijomis (PRB) fermentuotų produktų panaudojimo *Fusarium spp.* užkrėstų laikomų grūdų taršos prevencijai.

Eksperimentu nustatytas stiprus atvirkštinis ryšys ($R^2 = 0,9017$) tarp akustinio metodo (dažnis 27 kHz) parametro (A_p) ir ELISA gautų DON koncentracijų laikomuose grūduose, rodo, kad akustinė technika gali būti taikoma, kaip alternatyva, tradiciniam ELISA metodui.

Užkrėstų grūdų laikomų metu susidariusių dujų monitoringo rezultatai rodo, kad CO_2 pokyčio dinamika priklauso nuo mikroskopinio grybo rūšies ir grūdų užkrėstumo laipsnio. *F. graminearum* pasižymėjo vidutiniškai 20,8 % didesniu CO_2 susidarymo intensyvumu ir turėjo didesnę įtaką grūdų kvėpavimo intensyvumui nei *F. culmorum*. O_2 pokyčių analizė rodo, kad *F. graminearum*, lyginant su *F. culmorum*, greičiau adaptuojasi grūdinėje sistemoje. H_2S pokyčiams didžiausią įtaką turėjo grūdų užkrėstumo laipsnis. Stebėtas ryšys ($R^2 = 0,9760$) tarp H_2S susidarymo ir baltymų nuostolių grūdų laikymo metu (*F. culmorum*). Nustatyti SM nuostoliai *F. graminearum* užkrėstose vasarinių kviečių sistemose po 42 dienų laikymo buvo vidutiniškai 15,9 % didesni nei *F. culmorum*. Stipri tiesinė priklausomybė visais atvejais nustatyta tarp *F. graminearum* ir *F. culmorum* užkrėstumo laipsnio ir susidarančio laikomuose grūduose DON kiekio.

Fusarium spp. užterštų vasarinių kviečių grūdų apdorojimas PRB bioproductais mažina CO_2 susidarymą grūdų laikymo metu. Didžiausiu mikrofloros kvėpavimo efektyvumą mažinančiu poveikiu pasižymėjo *P. pentosaceus* bioproductai, kurie lėtino CO_2 ir H_2S susidarymą *Fusarium spp.* užkrėstuose grūduose. Be to, grūdų bioapdorojimas mažina baltymų ir sausųjų medžiagų nuostolius juos laikant. *F. culmorum* užkrėstuose grūduose didžiausią baltymų nuostolius mažinantį poveikį turėjo *P. acidilactici* bioproductai, o *F. graminearum* užkrėstus grūdus - *P. pentosaceus* bioproductai. Visais atvejais buvo stebimas DON koncentracijos mažėjimas PRB bioproductais apdorotuose mėginiuose: didžiausią poveikį *F. culmorum* užterštiems kviečių grūdams darė *P. pentosaceus* bioproductai, o *F. graminearum* užterštuose grūduose - *P. acidilactici* bioproductai (DON koncentracija lyginant su kontrole sumažėjo, 56,50 % ir 95,47 %, atitinkamai).

Zitinevicius, P. Contamination monitoring of summer wheat *Fusarium* spp by using antimicrobial bio-products. Master thesis / supervisor Prof. Dr. Grazina Juodeikiene; Kaunas University of technology, Faculty of Chemical Technology, Department of food science and technology.

Kaunas, 2015. 68 p.

SUMMARY

This paper describes quality control and prevention possibilities in *Fusarium* spp. contaminated cereals. Performed assay analysing the combination of different technological tools in order to ensure unchanged quality and decrease dry matter and economical losses of grains: (i) rapid acoustic method for DON detection (results compared to ELISA); (ii) application of electrochemical sensors for gas, resulting from the storage of the grains, monitoring; (iii) use of different LAB strains to prevent *Fusarium* spp. contamination in grains.

Experiment revealed strong reverse link ($R^2 = 0,9017$) between the parameter (A_p) of acoustic method (freq. 27 kHz) and DON concentrations measured using ELISA. It leads to the conclusion, that acoustic techniques could be used as alternative to ELISA method.

The results of gas (CO_2 , O_2 , H_2S), resulted from stored cereals, monitoring show the concentration change of CO_2 dependance on fungi strain and contamination level. *F. graminearum* caused more intensive CO_2 emission rate (avg. more than 20,8 %) and had bigger impact to respiration intensity in comparison with *F. culmorum*. The analysis of O_2 concentration changes verifies the state, that adaptation process of *F. graminearum* in cereal mass is faster, comparing to *F. culmorum*. Contamination rate was determined as main factor to H_2S concentration changes. The strong linear link ($R^2 = 0,9760$) between H_2S concentration values and protein losses (*F. culmorum*) was revealed. Dry matter losses after 42 days storage in *F. graminearum* contaminated cereals were 15,9 % bigger in comparison with *F. culmorum* contaminated grains. Strong linear link between *Fusarium* spp. contamination rate and synthesized DON concentration was identified.

Cereal model systems processed with LAB bioproducts characterized to emit less CO_2 during storage, in comparison to not processed model systems. *P.pentosaceus* bioproducts had significant impact in reducing CO_2 and H_2S emission in *Fusarium* spp. contaminated cereals model systems. The main trend, that *P. acidilactici* strain is more effective to *F. culmorum*, whereas *P. pentosaceus* to *F. graminearum* infected grains, in terms of reducing proteins and dry matter losses, should be marked.

The decrease of DON concentrations was observed in all cases, where grains were processed with LAB bioproducts: *P. pentosaceus* bioproducts were more efficient to *F. culmorum* contaminated grains, *P. acidilactici* bioproducts to *F. graminearum* contaminated grains, in reduction of DON concentrations, where it was 56,50 % and 95,47 % lower, respectively, in comparison with control samples (not processed with LAB bioproducts).

TURINYS

LENTELIŲ IR PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	8
TERMINŲ IR SĄVOKŲ PAAIŠKINIMAI BEI SANTRUMPOS	9
ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS ANALIZĖ.....	12
1.1. <i>Fusarium</i> spp. kviečių grūdų užterštumas, jo įtaka grūnės žaliavos saugos ir kokybės kriterijams bei nuostoliams	12
1.1.1. <i>Fusarium</i> spp. mikroskopinių grybų charakteristika.....	14
1.2. Greiti metodai mikotoksinų grūdinėje žaliavoje aptikimui.	16
1.2.1. Grūdų taršos įvertinimas akustiniu metodu.....	16
1.2.2. Grūdų taršos įvertinimas fiksuojant CO ₂ koncentracijos pokytį laikymo metu	18
1.3. DON susidarymas	20
1.4. CO ₂ susidarymas ir galimi sausųjų medžiagų nuostoliai <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų grūdų laikymo metu	21
1.5. Antimikrobinių bioproduktų taikymo galimybės mikrobiologinės saugos mažinimui	24
1.5.1. Pieno rūgšties bakterijų: <i>P. pentosaceus</i> ir <i>P. acidilactici</i> charakteristikos	26
2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS	28
2.1. Tyrimų kryptys	28
2.2. Tyrimų objektai ir medžiagos	30
2.3. Tyrimų metodai.....	31
2.3.1. Imunofermentinis ELISA metodas DON nustatymui	31
2.3.2. Akustinis metodas DON grūduose monitoringui	31
2.3.3. α -amilazės aktyvumo nustatymas pagal ICC metodą Nr, 108 (ICC, 1998).	33
2.3.4. Ksilanolitinio aktyvumo nustatymas	34
2.3.5. Susidariusių dujų koncentracijos laikomuose grūduose nustatymas OPTIMA 7 BIOGAS dujų analizatoriumi.....	35
2.3.6. Aerobinių kolonijų skaičiaus nustatymas	36
2.3.7. Baltymų kiekio nustatymas pagal azotą Kjeldalio metodu	36
2.3.8. Drėgmės kiekio nustatymas terminio džiovavimo būdu	38
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ.....	39
3.1. Akustinio metodo taikymas DON aptikimui laikomuose vasarinių kviečių grūduose.....	39
3.2. Dujų susidarymo kinetika <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų grūdų laikymo metu	40
3.2.1. CO ₂ ir O ₂ koncentracijos pokyčių vertinimas.....	40
3.2.2. H ₂ S koncentracijos pokyčių vertinimas.....	43
3.3. <i>Fusarium</i> spp. grūdų užterštumo įtaka DON susidarymui grūdų laikymo metu.....	45
3.4. Baltymų pokyčiai <i>Fusarium</i> spp. užterštuose grūduose laikymo metu	46

3.5.	<i>Fusarium</i> spp. mikroskopinių grybų fermentinių aktyvumų palyginamasis įvertinimas ...	48
3.5.1.	<i>F. culmorum</i> ir <i>F. graminearum</i> amilolitinio aktyvumo nustatymas	48
3.5.2.	<i>F. culmorum</i> ir <i>F. graminearum</i> ksilanolitinio aktyvumo nustatymas.....	48
3.6.	Ryšys tarp <i>Fusarium</i> spp. taršos ir sausųjų medžiagų nuostolių laikomuose kviečių grūduose.....	49
3.7.	Grūdų apdoravimo PRB bioproductais įtaka dujų susidarymui laikymo metu.....	52
3.7.1.	CO ₂ ir O ₂ dujų susidarymo pokyčiai	52
3.7.2.	H ₂ S dujų susidarymo pokyčiai	54
3.8.	Bioproducto ruošimui naudotos pieno rūgšties bakterijos padermės įtaka DON susidarymui grūduose laikymo metu.....	55
3.9.	Baltymų pokyčiai PRB bioproductais apdorotuose laikomuose kviečių grūduose	57
3.10.	Pieno rūgšties bakterijų bioproductų įtaka <i>Fusarium</i> spp. užkrėstų kviečių grūdų sausųjų medžiagų nuostoliams.....	58
	IŠVADOS	61
	LITERATŪRA	63
	PRIEDAI	69

LENTELIŲ IR PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

16 pav. Ryšys tarp akustinio signalo parametro (Ap) verčių ir DON koncentracijos, nustatytos ELISA metodu	39
17 pav. DON verčių nustatytą akustiniu ir ELISA metodu koreliacija	40
18 pav. CO ₂ koncentracijos pokyčiai, <i>F. graminearum</i> (A) ir <i>F. culmorum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu	41
19 pav. CO ₂ susidarymo greitis skirtingo užkrėstumo grūdų modelinėse sistemose	42
20 pav. O ₂ koncentracijos pokyčiai, <i>F. graminearum</i> (A) ir <i>F. culmorum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu	43
21 pav. H ₂ S koncentracijos pokyčiai, <i>F. culmorum</i> (A) ir <i>F. graminearum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu	44
22 pav. DON koncentracijos pokyčiai, <i>F. graminearum</i> (A) ir <i>F. culmorum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu	46
23 pav. Baltymų kiekio kitimo rezultatai, <i>Fusarium spp.</i> mikroskopiniais grybais (<i>F. culmorum</i> ir <i>F. graminearum</i>) užkrėstose laikomų vasarinių kviečių modelinėse sistemose	47
24 pav. <i>F. culmorum</i> ir <i>F. graminearum</i> amilolitinis aktyvumas	48
25 pav. <i>F. culmorum</i> ir <i>F. graminearum</i> ksilanolitinis aktyvumas	49
26 pav. Sausųjų medžiagų nuostoliai <i>F. graminearum</i> (A) ir <i>F. culmorum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu	50
27 pav. Neužteršto grūdo mikroskopinė (didinimas 20 μm) nuotrauka	50
28 pav. <i>F. culmorum</i> (A) ir <i>F. graminearum</i> (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių mikroskopinės (20 μm) nuotraukos, darytos po 42 dienų laikymo	51
29 pav. <i>F. graminearum</i> (A; B) ir <i>F. culmorum</i> (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių CO ₂ koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu	53
30 pav. <i>F. graminearum</i> (A; B) ir <i>F. culmorum</i> (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių O ₂ koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu	54
31 pav. <i>F. graminearum</i> (A; B) ir <i>F. culmorum</i> (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių H ₂ S koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu	54
32 pav. <i>F. graminearum</i> (A; B) ir <i>F. culmorum</i> (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių DON koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu ..	56
33 pav. <i>F. graminearum</i> (A) ir <i>F. culmorum</i> (B) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių baltymų kiekio pokyčiai grūduose po 42 dienų laikymo	57
34 pav. <i>F. graminearum</i> (A; B) ir <i>F. culmorum</i> (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių SM pokyčiai po 42 dienų laikymo	58
35 pav. <i>F. culmorum</i> (A) ir <i>F. graminearum</i> (C) mikroskopiniu grybu užkrėstų ir PRB apdorotų (C; D) vasarinių kviečių mikroskopinės (20 μm) nuotraukos, po 42 dienų laikymo	60

TERMINŲ IR SĄVOKŲ PAAIŠKINIMAI BEI SANTRUMPOS

DON – deoksinivalenolis;

SM – sausosios medžiagos;

PRB – pieno rūgšties bakterija;

KSV – kolonijas sudarantis vienetas;

ppm – milijoninė dalis (1 ppm = 0,0001%).

IVADAS

Gyventojų skaičius Žemėje nuolat auga, taip įtakodamas bei maisto produktų ir pašarų paklausos augimą. Grūdinė žaliava jų gamybai užima svarbią vietą. Grūdinės kilmės produktų, tokių kaip kviečiai, kukurūzai, ryžiai, miežiai ir avižos maistui ir pašarams per metus pasaulyje užauginama ir suvartojama šimtais milijonų tonų. Jungtinių tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos (*angl.* United Nations Food and Agricultural Organisation) statistikos departamento duomenimis, 2007 m. dvidešimtyje didžiausią kiekį grūdinių javų auginančiose šalyse užauginta per 526 mln. t. kviečių ir 682 mln. t. kukurūzų. Grūdų derlius nuimamas vieną kartą per metus, tačiau grūdinės žaliavos paklausa išlieka stabili visus metus, todėl yra svarbus efektyvus grūdinių kultūrų saugojimas, turintis įtakos grūdų produktų kokybei ir nuostolių kiekiui.

Grūdinės žaliavos laikymo metu, neteisingas temperatūrinis režimas ir drėgmės kiekis gali sudaryti palankias sąlygas mikroorganizmų (bakterijų ir mikroskopinių grybų) dauginimuisi. Tai gali būti plika akimi matomų, fizikinių cheminių ir juslinių grūdo savybių pasikeitimų, sausųjų medžiagų nuostolių bei maistinės vertės sumažėjimo pasekmė. Neretai netinkamose sąlygose laikomi grūdų produktai būna apkrėsti įvairiais mikotoksinais, kurie jų vartotojams gali sukelti ūmias lėtines ligas arba net mirtį. FAO duomenimis nuo 25 % iki 50 % kasmet užauginamų grūdų yra užkrėsti mikotoksinais. Dėl šios priežasties patiriami didžiuliai ekonominiai nuostoliai, nes užkrėsta mikotoksinais žaliava negali būti parduodama ar perdirbama. Apskaičiuota, kad dėl grūdų užterštumo mikotoksinais, kasmet patiriama apie 1 mlrd. dolerių nuostolių, neįtraukiant išlaidų kokybės tikrinimui, mėginių ėmimui ir tyrimams laikymo metu.

Daugelyje pasaulio šalių yra nustatytos leidžiamos mikotoksinų užterštumo ribos skirtingiems grūdų produktams, taip pat aprašyti mėginių ėmimo ir naudojamų tyrimų metodai. Europos Sąjungoje šiais norminiais dokumentais vadovaujasi visi grūdų auginėjai ir perdirbėjai. Pasaulyje dar yra likusi ne viena šalis, kurioje tokie reikalavimai netaikomi, todėl tai apsunkina ne tik produktų atsekamumą, bet ir prekybinius santykius.

Gerai parinkti prevenciniai veiksmai yra geriausias būdas išvengti grūdų užterštumo mikotoksinais. Deja tai padaryti nėra lengva, nes fuzariozė gali prasidėti prieš derliaus nuėmimą – laukuose ir po derliaus nuėmimo – laikymo metu ar tolimesniuose maisto produkto gamybos grandinės etapuose. Sukurta ne viena grūdinės žaliavos užterštumo valdymo sistema, apimanti tiek grūdų auginimo, tiek ir laikymo etapus.

Preveninės/kontrolinės priemonės skirstomos į fizines, chemines ir biologines. Taip pat naudojamos jų kombinacijos. Visų naudojamų priemonių tikslas — apsaugoti vartotoją nuo žalingo mikotoksinų poveikio, atkreipiant dėmesį į užterštumui mūsų klimatinėse sąlygose jautriausius grūdinius javus ir tolesnes prevencinių priemonių vystymo galimybes.

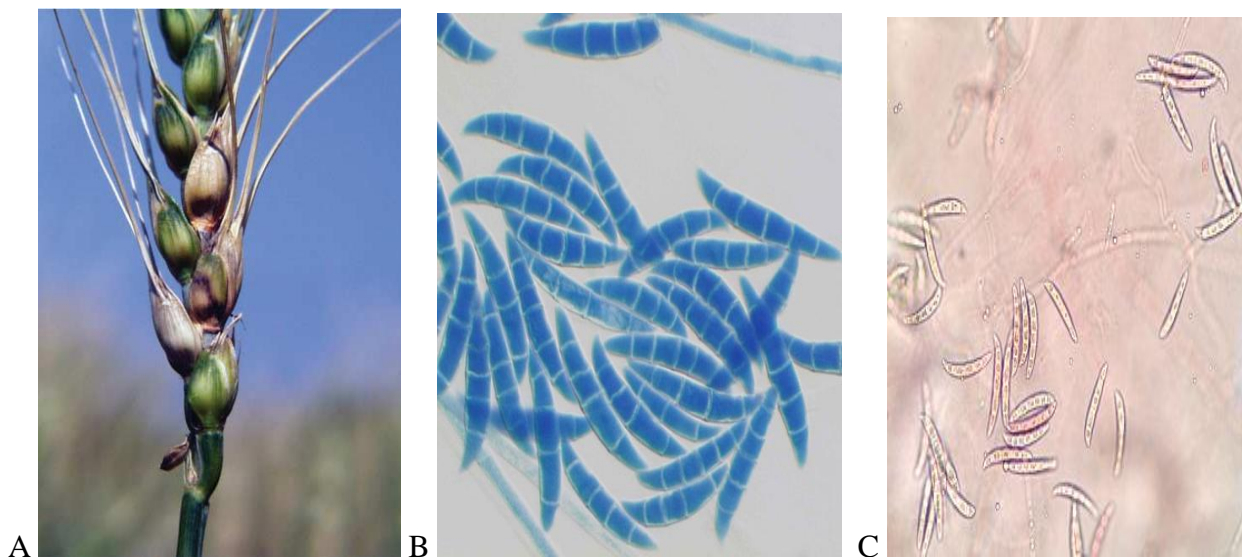
Šio darbo tikslai:

- 1) Įvertinti DON koncentracijas, skirtingais *Fusarium* spp. (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) mikroskopiniais grybais užkrėstose laikomose vasarinių kviečių grūdų sistemose, akustiniu metodu ir gautus rezultatus palyginti su rezultatais gautais ELISA metodu.
- 2) Išanalizuoti dujų (CO_2 , O_2 ir H_2S) pokyčių kinetiką, DON susidarymą ir baltymų bei kt. sausųjų žaliavų nuostolius modelinių vasarinių kviečių grūdų sistemų laikymu metu, keičiant užkrėsto *Fusarium* spp. rūšį (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) ir laipsnį.
- 3) Įvertinti PRB bioproduktų įtaką *Fusarium* spp. (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) mikroskopiniais grybais užterštų vasarinių kviečių modelinių sistemų pokyčiams laikymo metu.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. *Fusarium* spp. kviečių grūdų užterštumas, jo įtaka grūdinės žaliavos saugos ir kokybės kriterijams bei nuostoliams

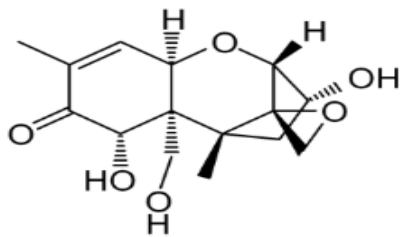
Kviečiai yra vienas iš pagrindinių produktų žmonių mityboje [19]. *Fusarium* rūšies mikroskopiniai grybai sukelia kviečių varpų amarą ir grūdų puvimą bei stiebo ligas. Šie faktoriai turi neigiamą įtaką grūdinės žaliavos gamybos efektyvumui. *Fusarium* spp užkrėstų grūdų išeiga gali sumažėti iki 40 % [8]. *F. graminearum* ir *F. culmorum* yra svarbiausi *Fusarium* spp. atstovai, labiausiai paplitę centrinėje Europoje, Šiaurės Amerikoje ir Azijoje. 1 paveiksle pateikta kviečio varpa, užkrėsta *Fusarium* spp. (A), atskiru vaizdu pateiktos *F. culmorum* konidijos (B) ir *F. graminearum* makrokonidijos (C).



1 pav. Kviečio varpa užkrėsta *Fusarium* spp. (A), *F. culmorum* konidijos (B), *F. graminearum* makrokonidijos (C) [75].

Fusarium spp užkrėstuose grūduose gali kauptis žmonėms ir gyvuliams toksiški antriniai metabolitai – toksinai: deoksinivalenolis (DON), zearalenonas, T-2 toksinas, nivalenolis ar kt. Net ir mažos jų koncentracijos yra labai kenksmingos žmonėms ir gyvuliams. Vieno iš *Fusarium* toksino deoksinivalenolo (DON) LD50 (mirtina dozė) yra 70 mg/kg, o nivalenolo - 4 mg/kg. Kancerogeninio ir mutageninio šių mikotoksinų poveikio nepastebėta [66].

Deoksinivalenolis, kurį daugiausiai išskiria *F. graminearum* ir *F. culmorum*, išlieka stabilus tiek grūdų laikymo metu, tiek grūdus apdorojant aukštoje temperatūroje [66]. Cheminė DON struktūra pateikta 2 paveiksle.



2 pav. Cheminė DON struktūra

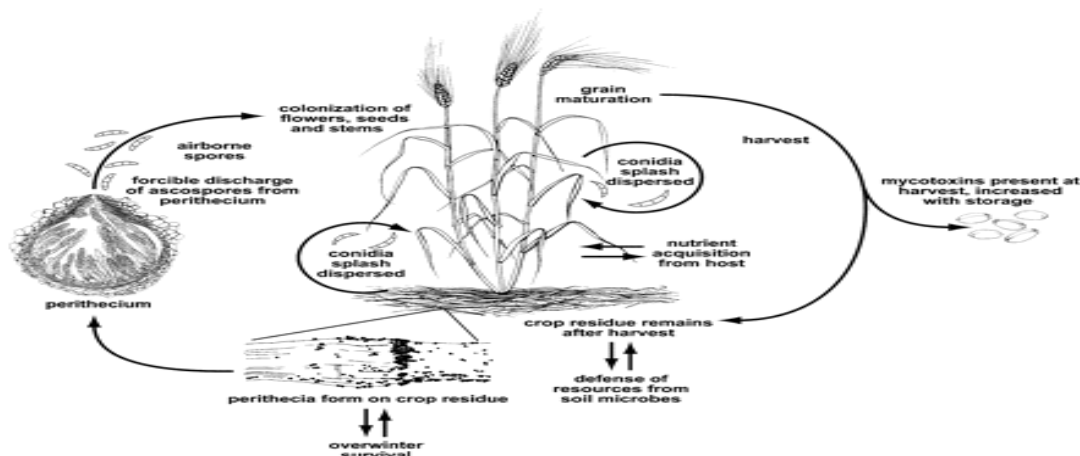
Fusarium spp. toksinai užkrėsti grūdai gali ne tik pabloginti iš jų gaminamų produktų kokybę, bet ir sukelti įvairius negalavimus žmonėms ir gyvuliams. Šiuo metu toksinų kiekis grūduose ar iš jų pagamintuose produktuose yra apibrėžtas Europos Komisijos reglamente (EB) Nr. 856/2005. Superkamuose grūduose mikotoksinų kiekis neturi viršyti šiame reglamente numatytų normų [74]. Pagal grūdų masėje matomus požymius neįmanoma nustatyti, kurios rūšies *Fusarium* mikroskopiniai grybai sukėlė varpų fuzariozę. Kviečių pasėliuose šio ligos pažeistos varpos pasimato pieninės brandos metu arba vaškinės brandos pradžioje. Pažeista varpa ar jos dalis būna pabalusi. Visiškai išbalusios ar balkšvai žalios varpos ypač gerai matomos žaliame pasėlyje.

Laikotarpis, kada kviečių pasėlyje labai gerai matomos dėl fuzariozės išbalusios varpos, yra labai trumpas. Pradėjus bręsti javams ir pakitus pasėlių spalvai, fuzariozės pažeistas varpas galima atskirti pagal rausvai oranžinę spalvą. Tiek kviečių, tiek miežių varputėse ir ant bręstančių varpų varpažvynių, ypač užsitęsus drėgniems orams, susidaro rausva *Fusarium* grybų sporų masė.

Labiausiai paplitusi yra *Fusarium* spp. sukeliama varpų amaro liga (*angl.* Head blight disease), kurios gyvavimo ciklas pateikiamas 3 paveiksle. *Fusarium* spp. pelėsiniai grybai yra pakankamai atsparūs aplinkos veiksniams ir nuimto derliaus likučiuose, lapuose ir dirvos paviršiuje (iki 36 cm gylyje), jie gali išbūti per žiemą. Grybo sporos sudaro sklerotį – kuriame yra pakankamai maisto medžiagų, reikalingų išsilaikyti šaltuoju metų laiku. Pavasarį pakilus temperatūrai ir padidėjus drėgmės kiekiui, pelėsio ląstelės suaktyvėja. Vėjo ir lietaus genamos sporos paskleidžiamos ant augalų. Patogeno sporos įsitvirtina augalo varputėje ir į vidinius augalo audinius dažniausiai patenka per ką tik užsimezgsų pumpurą arba pažeistą audinį. Infekcijos pradžioje pelėsis dauginasi ląstelės viduje, išoriškai jokių amaro simptomų nesukelia, tačiau plinta per augalo vandens indus, ląstelieną ir šerdį [10]. Augalo nekrozė prasideda, kai didžioji dalis audinių kolonizuojama pelėsinio patogeno. Audinyje pradeda kaupti vanduo ir jis pabąla. Pirmalaikis javų varpų spalvos kitimas dažniausiai yra požymis apie amarą ir gali būti susijęs su grūdų struktūros pokyčiais.

F. graminearum pelėsio sporos ne tik įsitvirtina užkrėsto augalo audiniuose, tačiau ir plinta javų lauke, taip užkrėsdamos daugiau augalų. Iš karto po to, kai užkrečiamas augalo žiedynas, pelėsis išskiria genus, reikalingus deoksinivalenolio (DON) sintezei [40]. DON yra pagrindinis kviečiuose virulentiškumo faktorius, sukeliantis audinių nekrozę [63] ir leidžiantis iš varpos amarui užkrėsti ir augalo stiebą. Pelėsinio patogeno kolonizuojamose besiformuojančiose kviečio sėklose ne tik

kaupiasi DON mikotoksinas, bet ir dauginasi mikroskopiniai grybai, kurių išskiriami fermentai skaido sausąsias grūdo medžiagas, todėl subrendę grūdai būna susiraukšlėję ir nevienodo dydžio [63].



3 pav. *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų gyvavimo ciklas

Varpų fuzarioze augalai labiausiai užsikrečia, kai vyrauja drėgni ir šilti orai. Tokiose sąlygose sporoms sudygti reikia laikotarpio, ne mažesnio kaip 12 val. Užkratui palankus temperatūros intervalas yra nuo 16 iki 30 °C. Jei žydėjimo metu, 48–72 val pasėliuose laikosi drėgni orai (temperatūra apie 22–27 °C), galima prognozuoti fuzariozės varpuose protrūkį.

Vėsesniu oru liga išplinta, jei ilgai laikosi didelis santykinis oro drėgnis. Kai kuriems varpų fuzariozės sukėlėjams palanku, kai oro temperatūra yra žemesnė, pvz., *Fusarium nivale* užkratui optimali yra mažesnė nei 18 °C temperatūra. Šis pelėsinis grybas neišskiria toksinų, tačiau jis yra labai žalingas grūdų sėklos patogenas, sukeliantis pavasarinį puvinį.

Didžiausią žalą varpų fuzariozė gali padaryti šiai ligai jautrių grūdinių javų genotipų pasėliuose, kai kuriais metais sukeliant šios ligos epidemijas. Šiuo metu selekcininkai, išvesdami naujus grūdinių javų genotipus, daug dėmesio skiria javų atsparumui varpų fuzariozei. Kol kas visiškai šiai ligai atsparių genotipų nėra, tačiau kiekvienais metais selekcininkai pateikia javų augintojams vis daugiau atsparesnių fuzariozei grūdų genotipų. Lietuvoje kol kas nepakanka informacijos apie auginamų veislių jautrumą ar tolerantiškumą šiai ligai.

1.1.1. *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų charakteristika

Fusarium culmorum yra vienas iš labiausiai paplitusių, dirvožemyje plintančių mikroskopinių grybų, turinčių didelį saprotrofinį pajėgumą – maisto medžiagas gali gauti iš negyvų organinių medžiagų, įsiurbdami smulkiamolekulinius organinius junginius. Kaip fakultatyvinis parazitas, šis mikroskopinis grybas gali sukelti augalų puviną dar jų augimo stadijoje ir javų varpų ligas. Jų poveikis kviečiams ir avižoms yra savitas [17]. *F. culmorum* makronidijos, 40-50 mikrometrų ilgio, tiesios ar nedaug išlenktos, dažniausiai sudaryti iš keturių ląstelių (4 pav.).



4 pav. *F. culmorum* makronidijos

Priklausomi nuo geografinės vietos ir klimatinės zonos *F. culmorum* gali būti kelių genotipų [23]: I genotipas gamina mikotoksiną – deoksinivalenolį (DON) ir jo darinius (3-ADON, 15-ADON) ir II genotipas gamina Nivalenolį (NIV). Nustatyta, kad NIV yra 10 kartų toksiškesnis nei DON [58]. Mikotoksinų gamybai labiausiai įtakos turi temperatūra ir grūdinės žaliavos drėgmės kiekis [38]. Optimaliausios sąlygos *F. culmorum* mikroskopiniui grybui gaminti mikotoksinus būtų tokios: reikalingas $>0,90$ aw drėgmės kiekis ir 28-35 °C temperatūra [50].

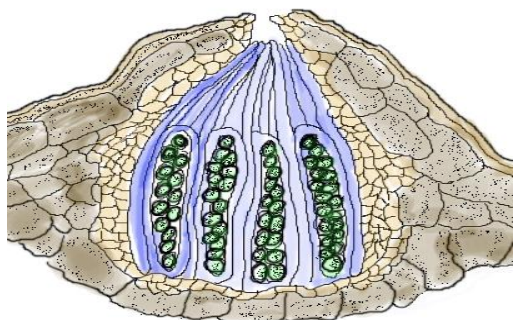
Augalo infekcijos fazėje pH padidėja, suaktyvėja ląstelių išoriniuose sluoksniuose esantys fermentai, kurie ardo ląstelių sienelės ir prasideda mikotoksinų išskyrimas. Sienelės galintys suardyti fermentai yra vienas iš pagrindinių virulentiškumo faktorių, nes gali hidrolizuoti augalo ląstelės pektinus, ksilanus ir celiuliozę, tai leidžia mikroskopiniui grybui patekti į vidinius audinius per 3-4 dienas ir kuria palankias sąlygas DON susidarymui [44].

F. culmorum sukuria geras (šarminė terpė) sąlygas maksimaliam pektinliazių ir kitų depolimerizuojančių fermentų aktyvumui. Aktyviai yra ardomi arabinoksilanai, kurie sudaro apie 40 % augalo ląstelių sienelių. Taip pat su *F. culmorum* augimu ant augalų ląstelių sienelių (anglies šaltinis) siejamas ir kitų, ląstelės sienelės ardančių fermentų (glikanazės, chitinazės, ksilanazės, pektinazės), aktyvumų padidėjimas.

Fusarium graminearum mikroskopinis grybas labiausiai pavojingas grūdiniams javams ir kukurūzams, geba daugintis ir kenkti, išskirdamas mikotoksinius, esant įvairioms aplinkos sąlygoms [12]. Įvairių rūšių *F. graminearum* sukeliama fuzariozė, yra daugiausiai žalos grūdų augintojams visame pasaulyje daranti liga [24]. Šis mikroskopinis grybas gali išskirti kelių rūšių mikotoksinius, tokius kaip deoksinivalenolį (DON) ir zearalenoną (ZEN). DON lėtina grūdų augimą, o ZEN savo ruožtu sukelia grūdų reprodukcinės problemas. *F. graminearum* ir jo išskiriami mikotoksinai, taip pat siejami su žala žmonių sveikatai [26].

Fusarium graminearum turi lytinį ir nelytinį dauginimosi ciklą. Lytinis ciklas trunka apie dvi savaites. Mejozės metu, vyksta ląstelės DNR replikacija, susidariusios vyriškos lyties askosporos

išskiriamos į aplinką ir patenka ant kito augalo, kuriame yra moteriškos lyties, kolbos formos, mikroskopinio grybo sporos (lot. *Perithecium*). Jose vyksta susijungimas ir užbaigiamas *F. graminearum* dauginimosi procesas (5 pav.)



5 pav. Lytinis *F. graminearum* dauginimosi būdas - vyriškos lyties askosporos (žalia spalva), susijungusios su moteriškos lyties spora (ruda spalva).

Nelytinio mikroskopinio grybo dauginimosi metu, konidijos susidaro ypatingai drėgnais periodais ir aplinkoje plinta lietingu laikotarpiu. Šiuo būdu susidariusios *F. graminearum* konidijos yra atsparios aplinkos veiksniams ir dirvoje gali išsilaikyti per žiemą – pasėlių likučiuose [54].

1.2. Greiti metodai mikotoksinų grūdinėje žaliavoje aptikimui.

1.2.1. Grūdų taršos įvertinimas akustiniu metodu

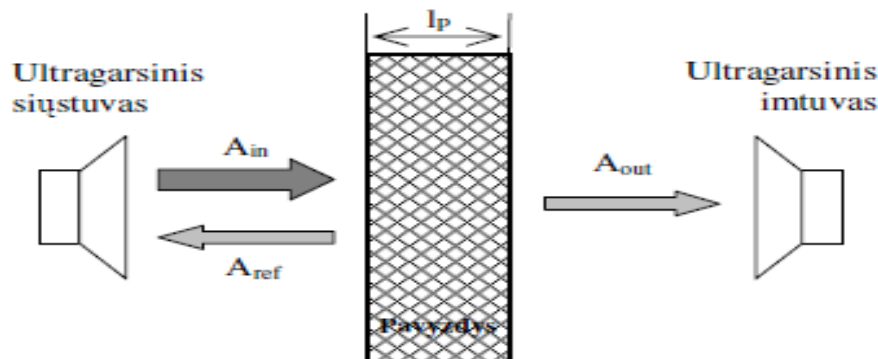
Kviečių ar kukurūzų grūdų masė priklauso poringoms struktūroms. Šių medžiagų analizei naudojami įvairūs matavimo metodai: mechaniniai, optiniai, elektriniai, fotografiniai, radijo izotopiniai, infraraudonųjų bei rentgeno spindulių metodai. Šiuo metu labai didelio susidomėjimo sulaukia spektrometriniai matavimo metodai, kuriuose kaip informacijos nešėjai naudojamos elektromagnetinės bei akustinės bangos. Iš elektromagnetinių bangų spektro dažniausiai naudojamos infraraudonosios bangos. Šie metodai pasižymi dideliu tikslumu ir yra dažnai naudojami praktikoje. Tačiau juos sunku taikyti gamybos procese, jei aplinkoje yra daug trikdžių. Tinkamiausias metodas atlikti matavimus tokioje aplinkoje yra laiko intervalų tarp signalų matavimas, t. y. ultragarso greičio, sklindančio medžiagoje, matavimas. Taip pat galima matuoti ir ultragarsinio signalo amplitudės pokytį. Akustinių bangų greitis daugelyje poringų medžiagų yra apie 1000-2000 m/s. Toks palyginti nedidelis greitis gali būti išmatuojamas dideliu tikslumu. Dėl akustinės bangos sklidimo savybių jų taikymas tirti poringas medžiagas yra perspektyvus. Kai yra parenkamas optimalus ultragarsinių bangų dažnis, gali būti tiriamos medžiagos, sudarytos iš įvairaus dydžio dalelių.

Tiriant poringas medžiagas, geriausi rezultatai yra gaunami tuomet, kai yra naudojamos žemo dažnio ultragarsinės bangos. Geriausiai tinkami metodai naudoti automatizuotose gamybos sistemose yra ultragarsinio greičio per medžiagas matavimas bei ultragarso slopimo medžiagoje matavimas. Šie metodai yra labai greiti, nereikalauja specialaus gaminio paruošimo ir nesuardo gaminio. Jie gali būti naudojami kontroliuoti gamybos parametrus nepertraukiamame gamybos procese, dėl ko jie

tampa dar patrauklesniais. Dažnai naudojamas tiesioginis akustinio matavimo metodas, kai ultragarsinio signal parametrai yra matuojami prieš patenkant į gaminį ir jau perėję gaminį (1 pav.). Tuomet poringumas yra nustatomas tiriant šių signalų santykį. Lyginant medžiagų pavyzdžius, reikia, kad jų storis būtų kiek įmanoma panašesnis. Šiuo atveju, perėjusio medžiagą signalo amplitudė nustatoma naudojant išraišką:

$$A_{out} = K_0 A_{in} e^{-\alpha \rho l_p}$$

čia A_{in} ir A_{out} – atitinkamai, išsiūsto ir priimto signalo amplitudės; K_0 – korekcinis daugiklis, priklausomai nuo matavimo aplinkos; α – ultragarso slopinimas poringoje medžiagoje; l_p – medžiagos mėginio storis.



6 pav. Poringos medžiagos įvertinimas naudojant tiesioginį ultragarsinį metodą. A_{in} , A_{out} , A_{ref} – atitinkamai, išsiūsto ir priimto ir atsispindėjusio signalo amplitudės; l_p – medžiagos mėginio storis.

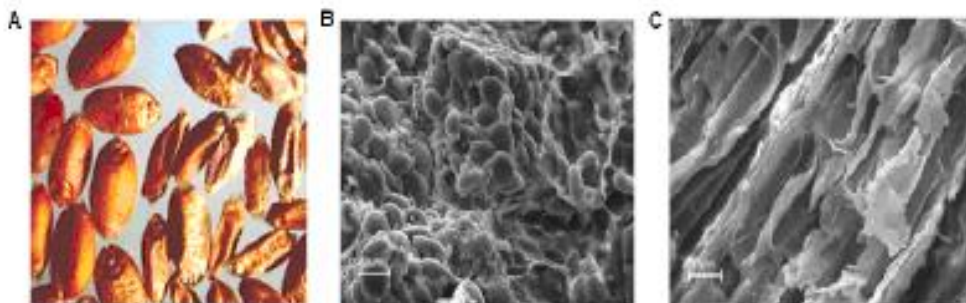
Tiesioginis matavimo metodas gali būti sujungiamas kartu su akustiniu aidolokaciniu metodu. Šiuo atveju matuojamas perėjusio ir atsispindėjusio akustinio signalo parametrų santykis.

Įrodyta, kad garso sklaida per poringas struktūras silpnėja ir garso greitis priklauso nuo poros dydžio ir poringumo koeficiento [72]. Esant žemiems garso dažniams, papildomai galima įvertinti kitas tiriamo objekto savybes, pvz., kliūtis, kurią sutinka akustinė banga, paviršiaus formą, kada garsinė banga sklinda per ją arba aplink ją, ar atsispindi nuo kitų medžiagų. Akustinei bangai sklindant ar atsispindint nuo medžiagos, bet kurie sklidimo kelio charakteristikos pokyčiai turi įtakos greičiui ir/ar bangos amplitudei, kurie gali būti išmatuojami [47]. Sparčioji Furjė transformacija (FFT) paverčia laiko domeno rezultatus į dažnio domeną, ir rezultatai tampa palyginami su spektriniais matavimais.

Poringoms struktūroms priklauso ir kviečių ar kukurūzų grūdų masė. Žemo dažnio akustinės bangos gali penetruoti per poringas medžiagas (pvz., javų grūdų sluoksnį) arba atsispindėti (dalinai) nuo šių poringų medžiagų. Granuliuotas poringos medžiagos, tokios kaip grūdai, labai gerai absorbuoja akustinę terpę. Akustinė energija poringoje aplinkoje (pvz., javų grūduose) gali būti perduodama per struktūrą/tekstūrą ir orą. Grūdų analizės atveju akustinės bangos pagrinde perduodamos per orą ir per tarp grūdines oro ertmes [34].

Kai grūdai yra užkrėsti mikroskopiniais grybais ir susiraukšlėję, dėl padidinto pašalinės mikrofloros fermentinio aktyvumo, hidrolizės metu suardoma krakmolo granulių struktūra (7 pav.).

Fermentinių procesų rezultate susidarę užkrėstų grūdų struktūros pokyčiai siejami su oro tuštumų atsiradimu ir tarp grūdinės erdvės padidėjimo pokyčiais. Plačiau apie fuzariozės pažeistų grūdų mikrostruktūros ir cheminės sudėties pokyčius, turinčius įtakos akustiniams matavimams, pateikta G. Juodeikienės ir kt. straipsnyje [76].



7 pav. Sveiki (kairėje) ir susiraukšlėję (dešinėje) kviečių grūdai (A); sveikų grūdų su sveikomis krakmolo granulėmis mikroskopinis vaizdas (B); *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų su suardytomis krakmolo granulėmis mikroskopinis vaizdas (C) (Juodeikienė ir kt., 2014).

Garso perėjimas per sveikus neužkrėstus grūdus, lyginant su užkrėstais susiraukšlėjusiais grūdais su pažeista krakmolo granuliu struktūra (sergančiais taip vadinama šašų liga), bus skirtingas. Kai oru sklindančios garso bangos susiliečia su nesuardytomis grūdų dalelėmis, dalis energijos atsispindi, o kita dalis perduodama per terpę ir jos likutis išsisklaido. Tai rodo, kad garso dinamiką poringoje medžiagoje iš esmės apsprendžia terpės, kuria sklinda garsas, fizinės savybės. Nustatyta, kad akustikos dinamikai poringoje granuliuotoje terpėje įtakos turi poringumas, paviršiaus forma ir oro srauto varža. Be to, nustatyta, kad grūdų masėje garso absorbcijai įtakos turi dalelių dydis ir forma [29]. Todėl patartina, kad sukurta akustinė įranga būtų naudojama derliaus nuėmimo metu, t.y. grūdų perdirbimo grandinės pradžioje (prieš grūdų laikymą, malimą, salyklo gamybą), kai dominuoja viena grūdų genotipas ir tokiu būdu eliminuojami matavimo tikslumui įtakos galintys turėti veiksniai (grūdų dydis ir forma). Be to akustinė įranga gali būti pritaikoma kitos aktualios problemos sprendimui, grūdų saugos monitoringui laikymo metu.

1.2.2. Grūdų taršos įvertinimas fiksuojant CO₂ koncentracijos pokytį laikymo metu

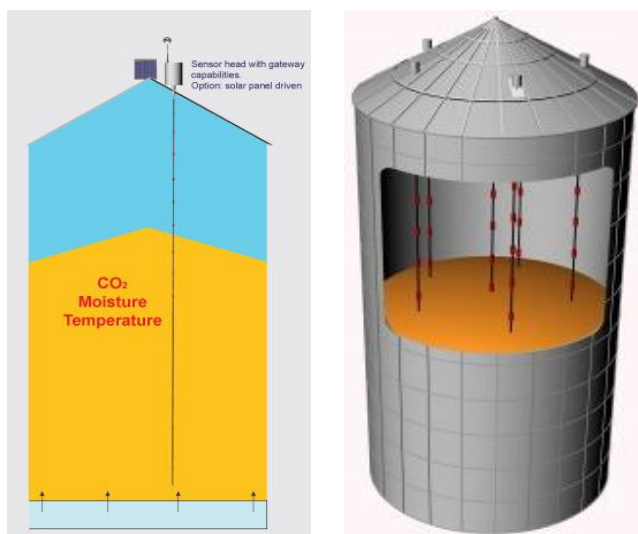
Grūdų masės ir kokybės nuostoliai laikymo metu išlieka didžiausia problema augintojams visame pasaulyje. Ankstyvas grūdinės žaliavos taršos nustatymas šio etapo metu padeda ženkliai sumažinti kokybinius ir kiekybinius nuostolius, sumažinti mikotoksinų susikaupimą maisto grandinėje ir išvengti finansinių nuostolių [42]. Tipinis metodas nustatyti grūdų taršos laipsnį – termokabelių, kurie matuoja grūdų temperatūrą realiu laiku, naudojimas talpyklose. Grūduose ir aplink grūdą esanti mikroflora išskiria šiluminę energiją, tokiu būdu, nustatomi taršos židiniai. Tačiau temperatūros matavimas nėra pakankamai jautrus metodas dėl mažo grūdų masės šilumos laidumo [13]. Gautus rezultatus sunku interpretuoti dėl aplinkos temperatūros svyravimų. Pvz., 35 °C

temperatūra gali reikšti, kad grūduose yra aktyvus taršos židinis arba, kad grūdų temperatūra pakilo dėl pasikeitusios aplinkos temperatūros. Talpykloje, kurioje saugomi grūdai, CO₂ koncentracijos padidėjimas, taip pat yra galėtų būti tinkamas kintamasis gamybinėje praktikoje, grūdų kokybės pablogėjimui aptikti [15]. Išmatuotos CO₂ koncentracijos lyginamos su aplinkos CO₂ koncentracija, kuri yra apie 0,04 % (400 ppm). CO₂ koncentracijų svyravimų monitoringo efektyvumas patvirtintas laboratoriniais tyrimais. Iš tirtų 39 talpyklų su įvairiomis grūdinėmis kultūromis, 34 talpyklose, kuriuose CO₂ koncentracija fiksuota didesnė nei aplinkos, buvo patvirtintas grūdų užterštumas.

Didesnė CO₂ koncentracija rodė didesnę grūdų užterštumą pelėsiniais grybais arba vabzdžių aktyvumą, pvz., kai CO₂ koncentracijai lygi 0,04 - 0,05 %, grūdų užterštumas nefiksuotas, 0,05 - 0,12 % — nežymus užterštumas, 0,15 % ir daugiau — žymus užterštumas.

CO₂ koncentracijos monitoringas grūdų saugojimo metu, lyginant su temperatūros monitoringu, padeda nustatyti grūdų užterštumą mikroorganizmais ankstyvesnėje stadijoje [14]. CO₂ koncentracijos monitoringas talpyklose ar maišuose (didmaišiuose) yra svarbesnis indikatorius, nes išlaikomos hermetiškos sąlygos ir eliminuojamas aplinkos poveikis [42].

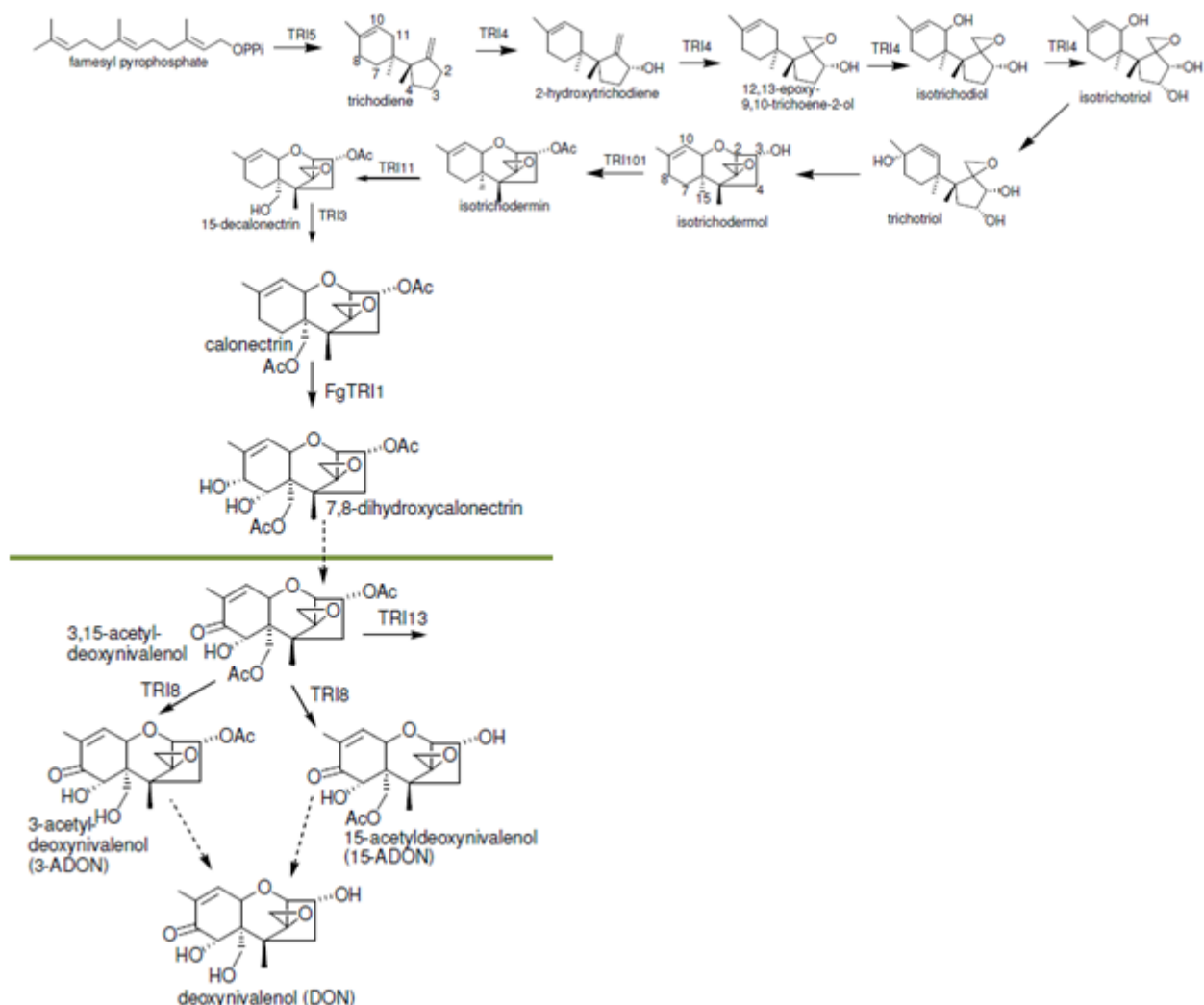
Atliekant CO₂ monitoringą talpyklose, priklausomai nuo talpyklos dydžio ir stogo konstrukcijos, maždaug 1 m virš grūdų sampilos, įmontuojami CO₂ davikliai, kurie realiu laiku fiksuoja CO₂ koncentraciją (8 pav.). Labai svarbu pašalinti galimą CO₂ nutekėjimą, todėl vieta, kurioje įmontuojami davikliai, turi būti hermetizuota. Daviklių energijos blokas dažnai yra montuojamas ant stogo ir kombinuojamas su saulės energijos moduliu. Valdymo pultas statoma talpyklos išorėje, 1,5 m virš žemės. Surinkti CO₂ matavimo duomenys apdorojami pagrindiniame valdymo bloke ir bevieliu ryšiu siunčiami į pagrindinį serverį. Pasiekus tam tikrą nustatytą CO₂ koncentracijos ribą arba esant staigiems CO₂ koncentracijos pokyčiams, gali būti siunčiamas pavojaus signalas pasirinktu būdu (telefonu, žinute, elektroniniu paštu ar kt.).



8 pav. CO₂ daviklių sistema grūdų talpykloje

1.3. DON susidarymas

Deoksinivalenolio (DON) biosintezė (9 pav.), sukeliama *Fusarium* spp mikroskopinių grybų, prasideda farnezil-pirofosfato susidarymo procesu, tokiu būdu suformuojamas trichodienas. Ši reakcija katalizuojama fermento terpenciklazės, trichodiensintazės (Tri5). Pirmą kartą Tri5 genas išskirtas iš *Fusarium spototrichioides* mikroskopinio grybo metabolitų [37].



9 pav. DON biosintezė

Trichodienas oksiduojamas keliais etapais, dalyvaujant P450 monooksigenazei, genas užkoduotas Tri4 pavadinimu [36], kuris kontroliuoja deguonies prijungimą prie C-2, C-3, C-11 ir C-12 anglies atomų, bei oksiduoja C-13 anglies atomą, tokiu būdu, susidaro tarpinis junginys – izotrichotriolis [55]. Izotrichotriolis izomerizuojamas ir suformuojamas izotrichodermolis. Šio proceso metu, deguonies atomas, kuris yra prisijungęs prie C-2 anglies atomo, tampa susidariusio pirano žiedo dalimi, o hidroksilo grupė nuo C-11 anglies atomo atskyla. Izotrichodermolis (prie C-3 atomo OH grupė) katalizuojamas acetiltransferazės (Tri101) verčiamas į izotrichoderminą (prie C-3 atomo OR grupė). Papildomos hidroksilo grupės prijungiamos prie C-15 ir C-4 anglies atomų ir vėliau yra acetilamos (kontroliuojama Tri11, Tri3 genų) [2]. Papildomos hidroksilo grupės prijungiamos prie C-7 ir C-8 anglies atomų ir vėliau virsta keto grupėmis (tikslios šio etapo genetinės

transformacijos nėra gerai iširtos) [56; 57]. Paskutinis deoksinivalenolio sintezės etapas – acetilo grupės atskilimas nuo C-3 arba C-15 anglies atomo, katalizuojamas Tri8 esterazės. Skirtingi šio fermento aktyvumai yra nustatomi tiriant DNR. Nuo to priklauso ar sintetinamas 3-ADON (3-acetil deoksinivalenolis) ar 15-ADON (15-acetil deoksinivalenolis) genotipas [3].

1.4. CO₂ susidarymas ir galimi sausųjų medžiagų nuostoliai *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų laikymo metu

Grūdinės žaliavos prieš vartojimą pereina ilgą procesų grandinę, susidedančią iš tokių etapų: kultyvavimo, derliaus nuėmimo, džiovavimo, laikymo, tiekimo ir prekybos. Kadangi kokybiniai grūdinės žaliavos rodikliai tiesiogiai priklauso nuo aplinkos sąlygų, neretai neišvengiama ir mikrobiologinės taršos bei infekcijos [1]. Grūdų kokybės blogėjimui po derliaus nuėmimo įtakos turi fiziniai, cheminiai ir biologiniai veiksniai bei jų kombinacijos [52].

Mikrobiologinės taršos šaltiniai gali būti vėjo nešamos dulkės, vanduo, apkrėsti augalai, vabzdžiai, dirva, trąšos, gyvūnų išmatos. Dažniausiai ant grūdų randamos bakterijų šeimos - *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae*, pelėšiai – *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*. Šių patogenų mikrobinės kompozicijos žinojimas ir jų sąveikos laikomuose grūduose vertinimas yra labai svarbus faktorius tinkamų laikymo sąlygų parinkimui, nes mikroorganizmų augimo ir dauginimosi procesai gali pakeisti produkto savybes [49].

Grūdų kokybės blogėjimas susijęs su grūdų ir ant jų esančių mikroorganizmų kvėpavimo procesais, kurie neatsiejami nuo didėjančios CO₂ koncentracijos, grūdų temperatūros ir drėgmės kiekio padidėjimo. 14 % grūdų drėgnis yra priimtinas ilgalaikiam grūdinės žaliavos saugojimui, norint užtikrinti optimalų kokybės ir laikymo trukmės santykį [49]. Jei priimamų laikymui grūdų drėgmės kiekis yra didesnis, norint sumažinti kokybinius ir kiekybinius masės nuostolius, žaliava turi būti džiovinama iki saugaus drėgno.

Teisingas saugios grūdų laikymo trukmės parinkimas gali atsakyti į klausimą, kiek laiko galima laikyti atitinkamos drėgmės grūdinę žaliavą, išlaikant nepablogėjusius jos kokybės parametrus. Pagrindiniai parametrai grūdų laikymo praktikoje galėtų būti CO₂ koncentracijos pokyčiai ir sausųjų medžiagų nuostoliai.

Mikrobiologinė grūdų tarša yra natūralus ir nuolatinis procesas. Vidutinio klimato zonose, kuriose vyrauja vidutinis arba didelis santykinis oro drėgnis, grūduose nuolat fiksuojamas mikrobiologinis užterštumas, turintis įtakos kvėpavimo procesų suaktyvėjimui. *Fusarium*, *Alternaria* ir *Helminthosporium* pelėšiai, dar vadinami „lauko pelėšiais“ yra dominuojančios rūšys grūdinėje žaliavoje. Ilgalaikio saugojimo metu, 2-3 mėnesių laikotarpyje „lauko pelėšiai“ pakeičiami „sandėlio pelėšiais“ – *Aspergillus* ir *Penicillium* [21].

Grūdų kokybės blogėjimas tiesiogiai susijęs juos supančios mikrofloros kvėpavimu (procesu kai angliavandeniai oksiduojami iki anglies dioksido ir vandens). Kvėpavimo metu naudojamos sausosios medžiagos, o energija išskiriama šilumos pavidalu. Kvėpavimo reakcijos cheminė formulė:



Apskaičiuota, kad skylant 1 g sausos medžiagos sunaudojama 1,07 g. deguonies. Šio proceso metu išskiriama 1,47 g CO₂, 0,6 g vandens ir 15,4 kJ šiluminės energijos. Grūdų perkaitimas yra fiksuojamas tada, kai išskiriama daugiau šiluminės energijos nei žaliava gali absorbuoti. Didėjant temperatūrai, deguonies, reikalingo reakcijai vykti, kiekis taip pat auga, kol pasiekiamas maksimumas 40 °C temperatūroje ir lėtai mažėja kylant temperatūrai iki 65 °C. Kvėpavimo koeficientas (*angl.* RQ – Respiratory quotient) – sunaudoto deguonies ir išskirto CO₂ kiekio santykis, 40-65 °C temperatūroje kinta ribose nuo 0,7 iki 0,9. Pagal išsiskyrusio CO₂ kiekį galima apskaičiuoti sausųjų medžiagų nuostolius. F. Fleurat-Lessard (2002) eksperimentu nustatė, kad sumažėjus 1 % sausųjų medžiagų, tiriant 1 kg grūdų, išskiriama 14,7 g CO₂ dujų. Be to, jeigu kvėpavimo koeficientas yra <1.0, suaktyvinami grūduose esančių lipidų ir baltymų metabolizmo procesai, pvz., esant kvėpavimo koeficientui 0.7. tripalmitinas susidaro iš grūduose esančios palmitino rūgšties. Kuo didesnis išskiriamas CO₂ kiekis, tuo trumpesnė grūdinės žaliavos laikymo trukmė, nepatiriant jos nuostolių [20].

Pačio grūdo ir mikrofloros aplink grūdą kvėpavimo aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo žaliavos drėgnio. Kvėpavimas vyksta lėtai, jeigu saugomi grūdai yra sausi (<14 %). Tačiau jei drėgmės kiekis yra 15-19 % (aw = 0.75-0.85), *Fusarium* spp. pelėsiai tampa neaktyvūs ir žūva per pirmus 2 laikymo mėnesius, o *Aspergillus* spp. ir *Penicillium* spp. lėtai auga ir kvėpavimo procesai suaktyvėja [46].

Jau nuo aštunto XXa. dešimtmečio ieškoma būdų, kaip tiksliai apskaičiuoti grūdų laikymo trukmę ir įvertinti visus šį procesą įtakančius faktorius. Po daugybės eksperimentų su įvairiais kviečių mėginiais išvesta matematinė formulė (1), kuri naudojama grūdų išskiriamo CO₂ kiekio apskaičiavimui [73].

$$X = a + bT + ct + dt^2 + eM_w \quad (1)$$

Čia: X – išsiskyrusio CO₂ kiekis, mg kg⁻¹s.m./24val; T – grūdų temperatūra, °C; t – laikas, val; M_w – drėgmės kiekis grūduose, %; a b c d e – empirinės konstantos.

Vėliau formulė patobulinta [69]:

$$X = \exp (aM_w + bT + c) \quad (2)$$

Čia: X – išsiskyrusio CO₂ kiekis, mg (100gs.m.)⁻¹/24val; T – grūdų temperatūra, C; M_w – drėgmės kiekis grūduose, %; a b c – empirinės konstantos.

Grūdų kokybės pokyčių laikymo metu įvertinimui, šios formulės nėra labai tikslios, nes reikia atlikti papildomą eksperimentinę analizę ir susieti išsiskyrusio CO₂ kiekį su grūdų kokybiniu pablogėjimu. Be to, jeigu grūdų drėgnis yra mažesnis nei 14 %, CO₂ išsiskyrimas yra labai lėtas ir jį sunku pamatuoti. Taigi, grūdų saugojimo trukmės nustatymui šio formulės buvo nepriimtinos.

Patvirtinta, kad grūdinės žaliavos sausųjų medžiagų nuostoliai dėl vykstančių kvėpavimo procesų yra galimų produkto kokybės pokyčių indikatorius [67]. Kai kurie autoriai (Martin, Homedes, Sanchis; 1999) teigia, kad priimtini sausųjų medžiagų nuostoliai gali sudaryti iki 0,5 % žaliavos masės. Tačiau ilgalaikiais tyrimais įrodyta, kad didelio drėgnio kviečiuose 0,5 % žaliavos nuostoliai galimi laike 7 dienų, kartais be akivaizdaus pelėjimo požymių. Dideli grūdų kiekiai gali tapti netinkami vartojimui dėl per didelių juose susidariusių mikotoksinų koncentracijų [51].

Įvertinant grūdų masės pokyčius laikymo metu, pasiūlyta grūdinę žaliavą skirstyti į 3 kategorijas [32] :

- Premium klasės grūdus – sausųjų medžiagų nuostoliai iki 0,1 % [73];
- Žmonių maistui tinkamus grūdus – sausųjų medžiagų nuostoliai iki 1 % ;
- Gyvūnų maistui tinkamus grūdus – sausųjų medžiagų nuostoliai iki 2 % .

Tačiau vis dar diskutuojama, kokios sausųjų medžiagų nuostolių ribos turėtų būti priimtinos ir mokslininkų nuomonės šiuo klausimu yra labai prieštaringos.

Tikslesniam sausųjų medžiagų nuostolių teoriniam apskaičiavimui pradėta vertinti ne tik temperatūros, drėgnio ir saugojimo trukmės, bet ir pažeistų grūdų įtaką [71]:

$$DML = 0,0883 (\exp 0,006 t_r - 1) + 0,00102 t_r \quad (3)$$

$$t_r = \frac{t}{M_M \cdot M_T \cdot M_D} \quad (3.1)$$

$$M_M = 0,103 \{ \exp [455 (100M)^{-1,53}] - 0,845M + 1,558 \}; 0,149 \leq M \leq 0,538 \text{ kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O s.m.} \quad (3.1.1)$$

$$M_T = 32,3 \exp [-3,48 (0,03T + 0,53)] + 0,01 (M_w - 19) \exp [0,61 (0,03T - 0,47)] \quad (3.1.2)$$

$$M_D = 0,001 (MD)^2 - 0,1101 (MD) + 3,426 \quad (3.1.3)$$

Čia: DML – sausųjų medžiagų nuostoliai, %; t – saugojimo laikas, val; M_M – grūdų drėgnio daugiklis; M_T – grūdų temperatūros daugiklis; M_D – grūdų pažeidimo daugiklis; MD – pažeistų grūdų kiekis, %; T – grūdų temperatūra, C; M_w – grūdų drėgnis, %; M - drėgmės kiekis, kg H₂O kg⁻¹ sausųjų medžiagų.

Al-Yahya (2001) tirdamas kviečių laikymo trukmės ir kokybės priklausomybes, įvertino saugojimo laiko, grūdų drėgnio ir sausųjų medžiagų nuostolius ir išvedė formulę patikimam saugojimo laiko apskaičiavimui [4]:

$$t = \exp (6,490336 - 0,024165 T - 0,163337 M_w + 1,292568 (DML)) \quad (4)$$

Čia: t – saugojimo laikas, dienomis; T – grūdų temperatūra, °C; M_w – grūdų drėgnis, %; DML – sausųjų medžiagų nuostoliai. $4C < T < 40C$; $15\% < M_w < 24\%$; $0.25\% < DML < 1\%$.

Iš pateiktų formulių matyti, kad grūdinės žaliavos laikymo trukmė yra atvirkščiai proporcinga jos drėgniui ir temperatūrai.

Šiluminė energija susidaro vykstant grūdų, mikroorganizmų ir vabzdžių kvėpavimo procesams. Jeigu šie procesai vyksta drėgnuose grūduose, jie tampa ypatingai pavojingi dėl mažo grūdų specifinio šilumos laidumo. Taip sukuriama palankios sąlygos mikroorganizmų dauginimuisi, dėl to suintensyvėja kvėpavimo procesas ir didėja išskiriamos šilumos energijos kiekis [43].

1.5. Antimikrobinių bioproduktų taikymo galimybės mikrobiologinės saugos mažinimui

Mikotoksinai yra antriniai metabolitai, kuriuos gamina mikroskopiniai grybai, tokie kaip *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Dėl jų patiriami dideli maitinės vertės nuostoliai ir kyla grėsmė visai maisto tiekimo grandinei bei jos saugai [64].

Rizikos mažinimui, geriausiai turėtų būti išvystytos prevencinės užterštumo mikotoksinais priemonės, kurios neleistų patogenams patekti ant grūdinės žaliavos ir gaminti antrinių metabolitų. Tačiau priklausomai nuo daugybės faktorių (derliaus drėgmės, pažeistų grūdų kiekio, laikymo sąlygų ir t.t.), kai mikrobiologinės taršos nepavyksta išvengti, gali būti taikomi fiziniai ir cheminiai metodai grūdų taršos mažinimui. Pasirinkus vienokią ar kitokią taršos mažinimo strategiją, ji turėtų atitikti pagrindinius kriterijus [31]:

1. Mikotoksinai turi būti detoksikuoti arba transformuoti į netoksiškus junginius;
2. Mikroskopinių grybų sporos turi būti sunaikintos – be galimybės gaminti naujus toksinus;
3. Maisto produktas ar pašaras turi neprarasti savo maistinės vertės ir išlikti priimtinas vartotojui.
4. Fizinės žaliavos savybės negali kisti ir taikomi procesai turi būti efektyvūs, t.y. taršos mažinimo priemonių sąnaudos turėtų būti mažesnės nei užterštos žaliavos kaina.

Gamybiniame grūdų perdirbimo procese plačiai paplitęs fizinis taršos prevencijos būdas, kuris padeda mažinti mikotoksinų kiekį grūdiniuose produktuose — sausas grūdų valymas malimo metu. Tokiu būdu, naudojant frakcionavimą, galima atskirti grūdų luobeles, kuriose yra didžiausias mikroskopinių grybų ir mikotoksinų kiekis ir taip sumažinti taršą miltuose. Dauguma mikotoksinų yra atsparūs karščiui, todėl žaliavos veikimas karščiu neturi didelės įtakos mikotoksinų kiekiui. Daug pastangų įdėta ieškant būdų, kaip mikotoksinus paversti į netoksiškus junginius, naudojant šarminius ir oksiduojančius tirpiklius. Nors pasiekti rezultatai mikotoksinų lygio sumažinimui buvo patenkinami (koncentracijos sumažintos iki minimumo), panaudoti cheminiai reagentai blogino maistinę vertę ir nebuvo pakankamai saugūs tolesniam grūdinės žaliavos vartojimui žmonių maistui. Daugybę absorbentų buvo bandyta pritaikyti mikotoksinų surišimui, tačiau iki šiol nėra rastas

optimalus sprendimas, nes jais surišama tik maža dalis mikotoksinų, o didžioji dalis pasilieka grūdininėje žaliavoje [39].

Nauja tyrimų kryptis – biologinis taršos mažinimas ir mikotoksinų biodegradacija / bioabsorbicija, panaudojant mikroorganizmus ir fermentus. Bakterijos ir mikroskopiniai grybai gali suardyti mikotoksinus. Šiuo atveju nenaudojami detoksikacijai cheminiai junginiai, produktai nepraranda maistinės vertės ir išlieka patrauklūs vartotojui. Fermentacija yra vienas iš geriausiai priimtinių gamybai ir pigiausių maisto konservavimo būdų, kuriam naudojamos įvairių rūšių mielės (populiariausios *S.cerevisiae* ir *Candida krusei*) ir pieno rūgšties bakterijos [41].

Biologinė mikotoksinų detoksifikacija biologinėse sistemose gali vykti dviem etapais, fermentine degradacija ir sorbcija. Vyrauja skirtingos nuomonės dėl biologinės detoksifikacijos, kurias apibendrina Dalie (2010). Mikotoksinų suardymas biologinėse sistemose gali būti vykdomas įvairiais būdais [59]:

1. Mikroorganizmas gali būti naudojamas kaip starterinė kultūra (pvz., sūrio gamybai naudojamos pieno rūgšties bakterijos);
2. Naudojamas tik išgrynintas fermentas, tirpioje arba imobilizuotoje (biofiltras) formoje;
3. Fermentų aktyvumas gali būti padidintas, naudojant genų inžinerijos metodus.

Gyvi mikroorganizmai gali absorbuoti mikotoksino molekulę, prijungdami ją prie savo ląstelės sienelės arba aktyviai juos inkorporuoti į ląstelės vidų ir ten juos kaupti. Net ir negyvi mikroorganizmai gali absorbuoti mikotoksinus, šis fenomenas gali būti naudojamas biofiltrų kūrimui, skystų produktų taršos mažinimui arba probiotikuose, siekiant mažinti patekusių į organizmą mikotoksinų žarnyne lygiui.

Mielių ir pieno rūgšties bakterijų ląstelės ant savo sienelių gali surišti įvairias kompleksines struktūras, tokias kaip toksinai, metalų jonai ir kt. Pieno rūgšties bakterijų mikotoksinų absorbcija labai priklauso nuo bakterijos padermės. Aflatoksino B1 surišimo mechanizmo tyrimui buvo naudotos PRB *L.rhamnosus* (LGG ir LC105 padermės), kurios sudarė tvirtą junginį su mikotoksinu. Bandant jį išardyti, naudoti pakartotiniai praplovimai vandeniu, tačiau išliko 38-50 % sudarytų ryšių (PRB ląstelė/mikotoksinas). Kompleksą paveikus rūgštimi ir aukšta temperatūra, išliko 66-71 % sudariusių ryšių [7; 9; 65].

Kitas galimas pieno rūgšties bakterijų veikimo mechanizmas - mikotoksinų suardymas arba biotransformacija. Mikotoksinų biotransformacijos tyrimai prasidėjo prieš 40 metų. Buvo įrodyta, kad kai kurie mikroorganizmai gamina fermentus, kurie gali pakeisti mikotoksinų struktūrą, paversti juos į mažiau aktyvius ir nepavojingus / mažiau pavojingus junginius.

Įrodyta, kad deoksivalenolio (DON) toksiškumas priklauso nuo 12; 13 pozicijoje susidarančio epoksido žiedo [45]. Specialūs fermentai (eposkidazės) trukdo susidaryti šiam žiedui, todėl DON toksiškumas mažėja. Buvo atlikti tyrimai su *Eurobacterium* BBSH 797 bakterija ir izoliuoti jos

gaminami fermentai (epoksidazės), kurie kaip paaikėjo, prisideda prie mikotoksinų destrukūrizavimo, katalizuojant epoksidinio žiedo suardymą (10 pav.).



10 pav. DON detoksifikacija (biotransformacija)

1.5.1. Pieno rūgštis bakterijų: *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici* charakteristikos

Pieno rūgštis bakterijos (PRB) reiklios mitybinei terpei. Jos gali naudoti tik nedidelį anglies šaltinių spektrą. Daugumą pieno rūgštis bakterijų fermentuoja monosacharidus, disacharidus, pirmiausiai versdamos juos monosacharidais. PRB reikalingi sudėtingi organiniai azoto junginiai, o taip ir įvairios aminorūgščių kombinacijos. Daugumai jų būtinas argininas, cisteinas, glutamo rūgštis, leucinas, fenilalaninas, triptofanas, tirozinas, valinas. PRB yra atsparios džiovinimui, CO₂. Pagal gebėjimą išskirti dujas, jos gali būti skirstomos į dujas sudarančias ir dujų nesudarančias [53]. Anglies ciklo metabolizmo metu pieno rūgštis bakterijos ne tik gamina antimikrobinius junginius, bet ir konkuruoja su kitomis mikroorganizmų rūšimis taip parūgštindamos aplinką bei sparčiai naudodamos maistines medžiagas. Kaip antrinius metabolizmo produktus, PRB gali išskirti bakteriocinus (pvz., nizina), antibiotikus (pvz., reuterikliną) ir mažos molekulinės masės antibiotikus, tokius kaip reuterinas [16].

Pediococcus pentosaceus ir *P. acidilactici* yra gram teigiamos fakultatyvios anaerobinės ir sporų nesudarančios pieno rūgštis bakterijos. Kaip ir dauguma kitų PRB, *P. pentosaceus* yra atsparios rūgštims, nesintetina porfirino, metabolizmo metu, kaip pagrindinį produktą, išskiria pieno rūgštį [5]. Morfologiniu požiūriu, *Pediococcus* genties ląstelės yra sferinės, 1-2 μm skersmens. *Pediococcus* galima apibūdinti, kaip vieninteles acidofilines, homofermentines pienarūgštes bakterijas, kurios dauginasi dviejose plokštumose suformuodamos tetraedrus [28]. *P. pentosaceus* auga 40 °C temperatūroje, jų augimui palanki 4,5-8,0 pH terpė, esant 9-10 % NaCl, hidrolizuoja arginina. *Pediococcus acidilactici* augimo nenuslopina net 50 °C temperatūra. PRB *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici* morfologija pavaizduota 11 paveiksle.

Pediococcus padermėse yra nuo trijų iki penkiu protoplazmų [28]. Todėl jos gali rauginti rafinozę ir sacharozę, taip pat gaminti bakteriocinus [25].

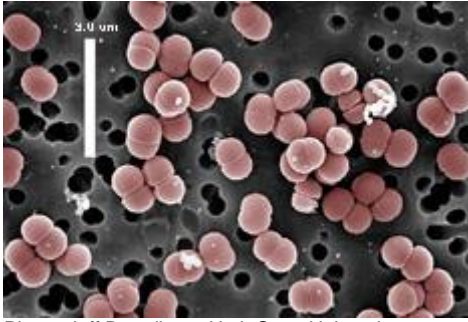


Photo: Jeff Broadbent, Utah State University

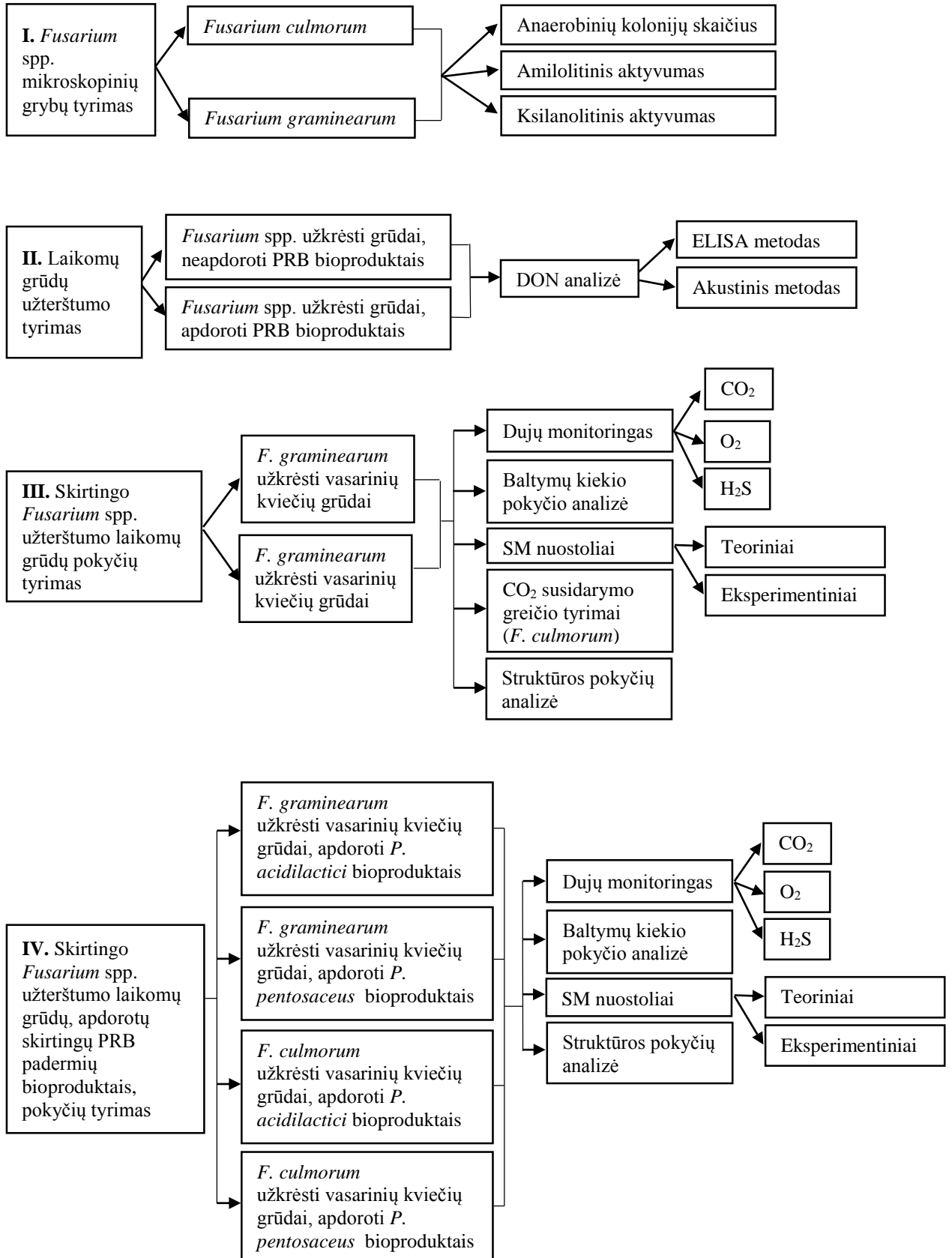
11 pav. *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici* morfologija

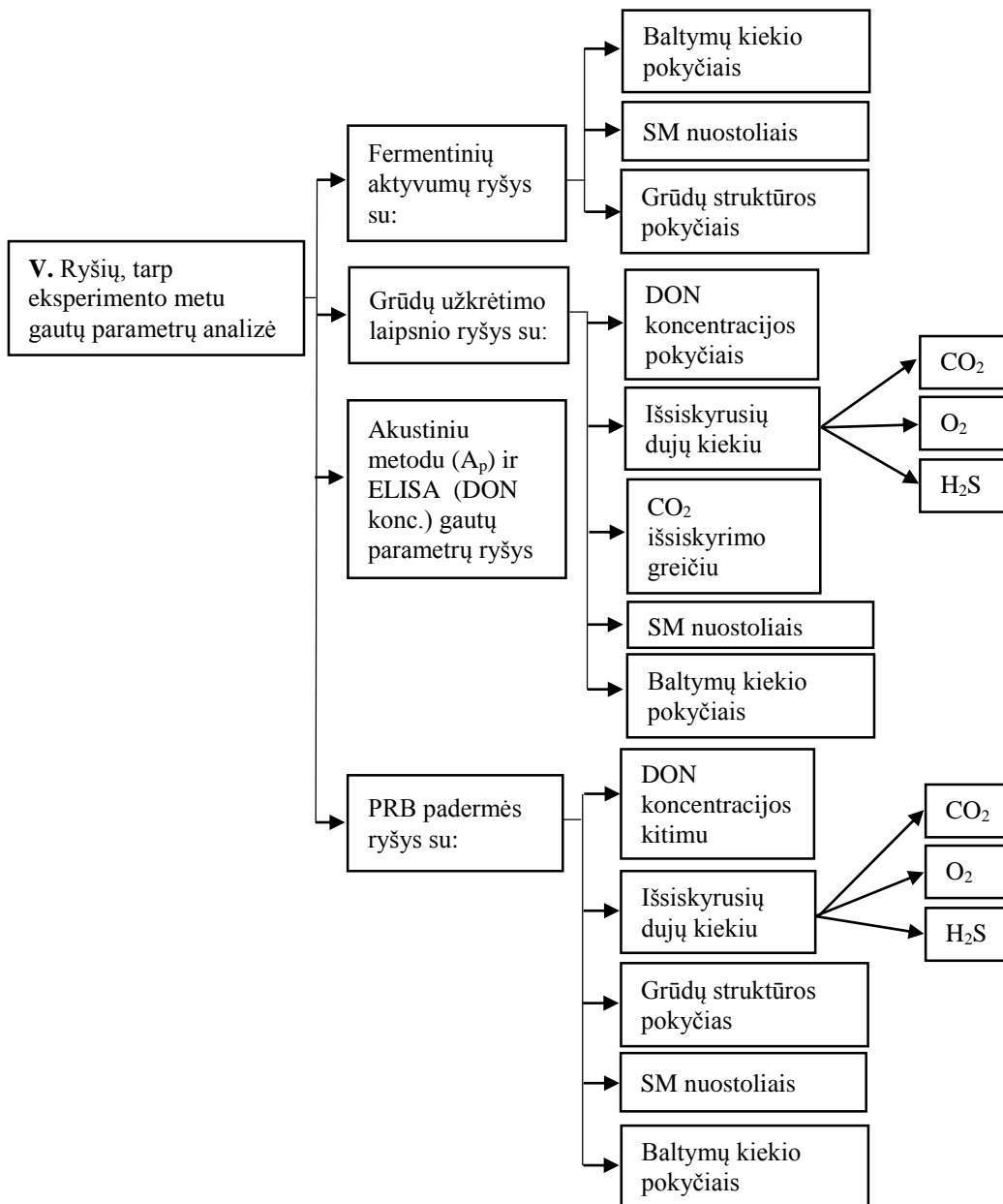
Klimato kaitos įtakoje užterštumo mikotoksinais problema išlieka aktuali ir įvairūs maisto produktai, tokie kaip grūdai, vaisiai, riešutai, prieskoniai, pienas ir mėsa gali sudaryti papildomų sunkumų šių produktų tiekėjams, išlaikyti tinkamą, ES įstatymų leidžiamą užteršimo mikotoksinais lygį, nes užkrėstų ir saugių produktų maišymas yra draudžiamas. Žinant, kad grybų sporos gali išlikti įvairių apdorojimų metu, yra atvejų, kai per dideli mikotoksinų kiekiai užfiksuoti vyne, aluje ir pieno produktuose, Europoje ir Afrikos žemynuose [6]. Dėl šių priežasčių vis dažniau tokių produktų gamyboje, kaip komponentas naudojamos pieno rūgšties bakterijos ir išskirtiniais atvejais mieles (*S. cerevisiae*). Šie mikroorganizmai, turintys geras mikotoksinų surišimo savybes, gali būti naudojami, kaip pradinės kultūros fermentacijos procesuose, arba kaip papildomas prevencinis ingredientas, kuris neturi įtakos galutinių produkto savybių, tačiau apsaugo nuo užterštumo mikotoksinais arba inaktyvuoja jau esančius žaliavoje mikotoksinius. Pagal atliktus tyrimus, pieno rūgšties bakterijos detoksikuojantį poveikį turi produktams, užterštiems tokiais mikotoksinais, kaip deoksivalenolis (DON) [22], aflatoksinas (AF) [27], ochratoksinas (OTA) [62], patulinas (PAT) [70] ir fumonizinas [60].

2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

2.1. Tyrimų kryptys

Eksperimentas vykdytas kryptimis, pateiktomis 12 paveiksle.





12 pav. Eksperimento krypčių žemėlapis

Tyrimas atliktas Kauno Technologijos Universiteto, Maisto mokslo ir technologijos katedroje, grūdų produktų mokslinėje tyrimų laboratorijoje. Tyrimams ruoštos įvairios modelinės užterštų grūdų sistemos, maišant neužkrėstą grūdinę žaliavą su skirtingais *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais (*Fusarium culmorum* ir *Fusarium graminearum*) (Į grūdinę žaliavą pridėti skirtingi kiekiai ($6,0 \times 10^6$ KSV; $1,0 \times 10^7$ KSV; $1,0 \times 10^7$ KSV) mikroskopinių grybų, tirpalų pavidalu), taip buvo imituojamos skirtingo jų užterštumo sąlygos. Mikroskopinių grybų tirpalai analizuoti mikrobiologiškai, įvertinant juose aerobinių kolonijų skaičių. Be to, įvertintas juose mikroskopinių grybų amilolitinis ir ksilanolitinis fermentinis aktyvumas.

Pirmajame eksperimento etape visose modelinėse grūdų sistemose nustatytas DON kiekis dviem metodais: akustiniu ir tradiciniu – ELISA. Apskaičiuotos priklausomybės tarp DON koncentracijos tyrimų rezultatų, gautų akustiniu metodu ir tradiciniu ELISA.

Kito etapo metu atliktas vasarinių kviečių tyrimas laikymo metu (trukmė – 42 dienos), tiriant susidariusių dujų (CO₂, O₂ ir H₂S) kieki, dujų koncentracijos fiksuotos kas 7 dienas, Optima 7 BIOGAS dujų analizatoriumi. Tokiu būdu, buvo vertinama taršos įtaka grūdinės žaliavos kvėpavimo aktyvumui.

Papildomai analizuotas baltymų kiekis laikomose vasarinių kviečių modelinėse sistemose (prieš ir po laikymo), įvertintas baltymų kiekio pokyčių ryšys su sausųjų medžiagų nuostoliais. Teoriškai apskaičiuoti sausųjų medžiagų nuostoliai, gautus rezultatus palyginant su nustatytais SM nuostoliais, technologinio eksperimento metu.

Darbo metu tirtas CO₂ susidarymo greitis (aptikimo riba – 1 % CO₂ koncentracija) *F. culmorum* užkrėstų grūdų laikymo metu, išbandant KTU vystomą CO₂ daviklių sistemą.

Atskiro eksperimento metu tirtos *Fusariumm* spp. užterštų grūdų detoksikacijos biologiniu būdu galimybes. Tam buvo paruoštos kviečių modelinės sistemos, analogiškos tirtoms pradiniam darbo etape, ir eksperimento metu naudotos tos pačios jų laikymo sąlygos. Šiuo atveju tiriami grūdai papildomai buvo apdoroti įvairiomis *Pediococcus* PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*). Vertinant bioapdoravimo įtaką laikomų grūdų kokybei, analizuoti aukščiau išvardinti parametrai.

2.2. Tyrimų objektai ir medžiagos

Eksperimentui buvo pasirinkti sveiki lietuviški 2012 m derliaus vasariniai kviečių grūdai, gauti iš UAB „Kauno grūdai“.

Grūdų užkrėstumo imitacijai buvo naudotos *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų kultūros (*F. culmorum* ir *F. graminearum*), gautos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro žemdirbystės instituto (LAMMCZI), Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus.

Tyrimams pasirinktos PRB: *Pediococcus acidilactici* KTU 05 - 7 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU 05 – 8 padermės, kurios prieš tai buvo išskirtos iš savaiminių ruginių duonos raugų ir saugomos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Tolimesniems tyrimo etapams naudotos PRB padermės buvo 18 val. kultyvuotos MRS terėje (De Man Rogosa ir Sharpe terpė; Biolife, Italija), 35 °C temperatūroje (pH 3,95), koncentracijos 1,77±0,11x10⁹ KSV/ml ir 1,89±0,10x10⁹ KSV/ml, atitinkamai.

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Imunofermentinis ELISA metodas DON nustatymui

ELISA metodas pagrįstas tuo, kad tam tikruose polimerų (imunosorbentų) paviršiuose adsorbuojami specifiniai antikūnai, žymėti fermentais.

Tvirtafazis imunosorbentinis testas atliekamas keturiais etapais:

Pirmas etapas – savitųjų (žinomų) antikūnų adsorbcija imunosorbentų (tvirtosios fazės) paviršiuje. Paprastai naudojamos bespalvės skaidrios polichlorvinilinės (silochrominės ar akytojo stiklo) plokštelės su duobutėmis, kurių dugnai plokšti. Antikūnai nekovalentiškai sujungiami su duobučių sienelės paviršiumi, juose lieka laisvi antikūnų aktyvieji centrai (Fab), todėl jie išsaugo gebėjimą specifiskai sąveikauti su atitinkamais antigenais.

Antras etapas – pridedama žinomų antikūnų, kurie sąveikauja su antigenu, esančiu mėginyje (tiriamoje medžiagoje), jei jie specifiski antigeno molekulėms, adsorbuotoms pirmojo etapo metu plokštelės duobelės paviršiuje, ties tvirtosios fazės (plokštelės polimeras) ir skysčio (antigeno tirpiklis) riba. Po to, norint iš sistemos pašalinti kitus, su antikūnais nesujungtus komponentus, duobelės labai gerai perplaunamos tirpalu, kuriame yra silpno nejoninio detergento.

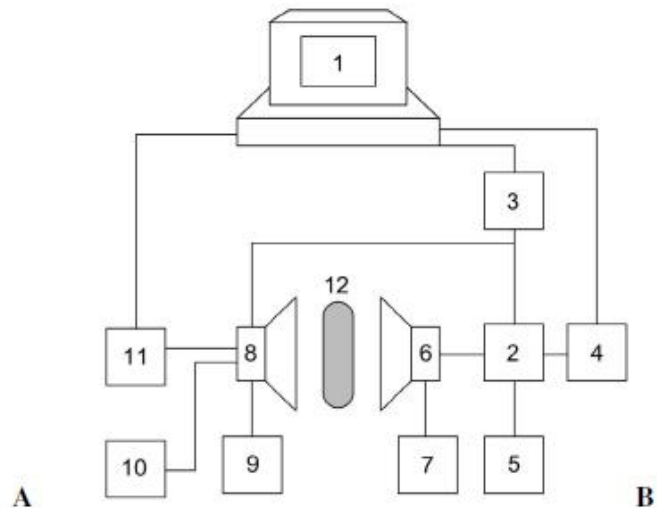
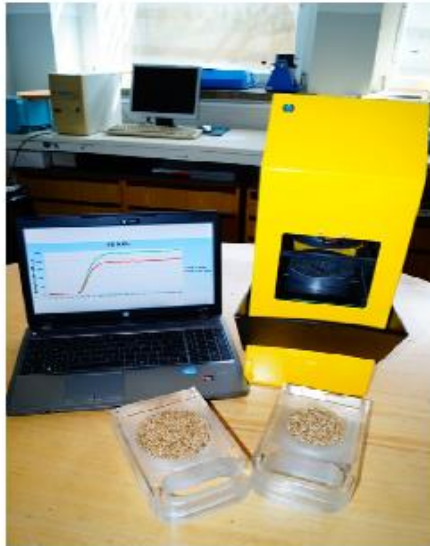
Trečias etapas – tvirtoji fazė (plokštelių paviršius su prisitvirtinisiais antikūno-antigeno kompleksais) apdorojama homologiniais antikūnais, specifiskais vartotiems antigenams, žymėtaisiais fermentais. Tokie žymėtieji antikūnai jungiasi su antikūnų – antigenų kompleksų, susidariusių antrojo etapo metu, antigenais. Mėginyje esantis jų perteklius plaunant pašalinamas.

Ketvirtas etapas – testo vertinimas: rezultatai vertinami, atsižvelgiant į žymens prigimtį.

Antigeno ir antikūnų kompleksas susidaro, jeigu jie yra specifiski vienas kitam. Jei mėginyje yra antigenų, specifiskų pridėtiesiems antikūnams, sorbento paviršiuje prisitvirtina „antikūnų-antigeno-antikūnų“ kompleksas. Fermento veikimą lengva nustatyti kolorimetriniu arba fluorimetriniu būdu. Naudojami chromogenai, reaguojantys spalvinėmis reakcijomis. Jie turi būti labai jautrūs, stabilūs ir lengvai reaguoti. Pakitusią spalvą kartais pakanka įvertinti plika akimi, o tiksliau nustatoma fotometriniiais įrenginiais. Fotometriniai matavimai atliekami prie 450 nm bangos ilgio. Adsorbcija yra atvirkščiai proporcinga DON koncentracijai mėginyje.

2.3.2. Akustinis metodas DON grūduose monitoringui

DON kiekiui kviečių grūdų masėje įvertinti, taikytas KTU Maisto produktų technologijos katedroje vystomas akustinis metodas, kuriuo įvertinama per tiriamąjį objektą perėjusio akustinio signalo amplitudės vertė (A_p). Tyrimui naudotas elektroakustinio prietaiso prototipas, kuris veikia žemų dažnių (10-80 kHz) diapazone padalintame į 63 matavimų taškus, analizės trukmė – 60 s. Prietaiso schema pateikta 13 pav.



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

Grūdų mėginio paruošimas ir analizė. Pirminiais tyrimais nustatyta, kad šiukšlinės priemaišos turi labai reikšmingą įtaką akustinio signalo parametrų vertėms. Todėl prieš analizuojant akustine technika, pašalinės priemaišos pašalinamos, sijojant grūdų mėginius dviejų sietų sistema (3,5 mm ir 1,0 mm akučių diametro). Tiriamasis ėminys atsitiktiniu būdu paimamas iš bendros grūdų mėginio masės (200 g) ir supilamas į matavimo kiuvetę (indą). Tiriamojo ėminio dydis optimizuotas, atlikus eilę matavimų naudojant skirtingo diametro (mažo - 40 mm, vidutinio - 80 mm ir didelio - 100 mm) kiuvetes (grūdų sluoksnio storis – 50 mm) ir nustačius mažiausias matavimo paklaidos ir variacijos koeficiento vertes.

Duomenų matematinė statistinė analizė. Naudojamas programų Analyse-it ir Microsoft Exel analizės paketus. Pagrindinės tendencijos ir analizuojamų duomenų verčių išsidėstymas buvo vertinami, naudojant aprašomąją statistiką. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti naudota dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška. Matuojamų parametrų vidurkių tarp duomenų grupių įvertinimui taikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (ANOVA). Faktoriaus reikšmingumo lygmuo nustatytas pagal Fišerio (F) kriterijų, esant patikimumui 95 %. Tiriant grūdus akustiniu spektrometru, matavimai kartoti 6-10 kartų. Mikotoksinų kiekis kiekviename grūdų mėginyje ELISA metodu nustatytas 2 kartą. Tyrimai tekstūros analizatoriumi kartoti 3 kartus.

2.3.3. α -amilazės aktyvumo nustatymas pagal ICC metodą Nr, 108 (ICC, 1998).

α -amilazės aktyvumo vienetas, tai fermento kiekis, galintis 30 °C temperatūroje per 10 min. katalizuoti 1g tirpaus krakmolo hidrolizę į dekstrinus.

Paruošiami tyrimui reikalingi tirpalai:

- Substrato (1 % krakmolo) tirpalas – 1 ± 0,01 g tirpaus krakmolo ir sumaišoma su 25 ml distiliuoto vandens. Tirpalas šildomas vandens vonioje, kol krakmolas ištirps. Gautas krakmolo tirpalas atvėsinaamas ir praskiedžiamas iki 100 ml acetatiniu buferiniu tirpalu. Krakmolo tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.
- Standartinis jodo tirpalas – 0,5 g jodo ir 5 g KI ištirpinama mažame vandens kiekyje ir atsargiai maišoma, kol medžiagos ištirps. Tirpalas praskiedžiamas iki 200 ml.
- Darbinis jodo tirpalas – 2 ml standartinio jodo tirpalo praskiedžiama 0,1 M HCl iki 100 ml. Prieš analizę patikrinama tirpalo absorbcija, kai bangos ilgis lygus 440 nm, ribos turi būti 0,22±0,01. Koreguojama su HCl arba standartiniu jodo tirpalu.
- Standartinis fermento tirpalas – 1 ml skystos tiriamosios medžiagos ištirpinama distiliuotame vandenyje ir praskiedžiama iki 100 ml.

Fermentinė hidrolizė. Tiriami du lygiagretūs mėginiai. Į mėgintuvėlį įpilama 10ml krakmolo tirpalo ir 10 min laikoma 30 °C temperatūroje. Į mėgintuvėlį, kuriame yra kontrolinis tirpalas, įpilama 5 ml CaCl₂, o į tiriamąjį mėgintuvėlį – 5 ml tiriamojo fermento tirpalo. Sumaišoma ir laikoma 10 min, 30 °C temperatūroje.

Po inkubacijos iš kiekvieno mėgintuvėlio paimama po 0,25 ml tiriamojo tirpalo ir supilama į 25 ml praskiesto jodo tirpalo. Kontrolinis tirpalas nusidažo mėlyna spalva, o tiriamasis violetine. Iš karto spektrofotometru matuojama absorbcija, kai bangos ilgis lygus 670 nm.

Skaičiavimai:

Hidrolizuoto krakmolo kiekis apskaičiuojamas pagal formulę

$$m = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1 \quad (4)$$

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

α -amilazės aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę

$$A = \frac{7,264 \cdot m + 0,03766}{m_1 \cdot 5} \cdot PF \cdot V \quad (5)$$

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

2.3.4. Ksilanolitinio aktyvumo nustatymas

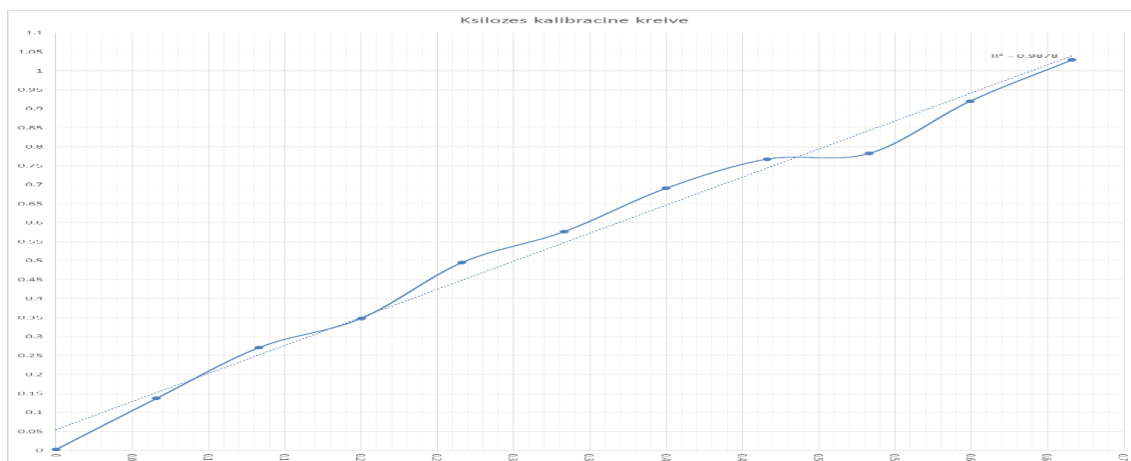
Metodas paremtas fermentine natrio arabinoksilano hidrolize. Nehidrolizuotas arabinoksilanas reaguoja su 3,5-dinitrosalicilo rūgštimi ir gali būti aptinkamas fotometru, naudojant 540 nm bangos ilgį. Ksilanzės aktyvumas apskaičiuojamas išreiškus jį 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ – kiek arabinoksilano suskaldoma per vieną minutę.

Pasiruošiami tyrimui reikalingi tirpalai:

- Ksilano tirpalas (1%) – 1 g gryno ksilano sumaišomas su 60 ml acetato buferio tirpalo. Pasiekiamas pH $4,5 \pm 0,05$ ir tirpalas inkubuojamas 30 min ir 60 °C temperatūroje. Po inkubacijos tirpalas praskiedžiamas iki 100 ml.
- DNS (3,5-dinitro salicilo rūgšties) tirpalas – 10 g DNS, 16 g natrio hidroksido ir 300 g kalio natrio tartrato sumaišoma su 500 ml vandens. Tirpalas palaipsniui šildomas, kol ingredientai ištirpsta. Praskiedžiama vandeniu iki 1000 ml. Tikrinama spektrofotometru, naudojant 540 nm bangos ilgį, maksimali absorbcija negali būti didesnė nei 0,05.
- DNS-laktozės tirpalas. Paruošiamas 0,120 g/l koncentracijos laktozės monohidrato tirpalas. Prieš naudojimą 150 ml paruošto DNS tirpalo sumaišoma su 50ml laktozės tirpalo. Naudojamas tik šviežiai paruoštas tirpalas.
- Mėginio paruošimas – pasirinktas kiekis tiriamo mėginio ištirpinamas distiliuotame vandenyje. Galimos mėginio absorbcijos ribos – 0,150-0,400.
- Standartinis ksilozės tirpalas – 0,5 g ksilozės ištirpinama distiliuotame vandenyje ir praskiedžiama iki 100 ml. Gautas tirpalas skiedžiamas vandeniu iki pasiekiamos darbinės 250; 500 ir 750 $\mu\text{mol}/\text{l}$ koncentracijos.

Fermentinio aktyvumo matavimas. 0,1 ml tiriamojo tirpalo sumaišoma su 1,9 ml ksilano tirpalo, pašildyto iki 40 °C temperatūros. Po 10 minučių pilama 4 ml DNS-laktozės tirpalo – sustabdoma reakcija. Mėginys patalpinamas į verdančio vandens vonią 15 min, tada atvėsinaamas iki kambario temperatūros. Netirpūs dariniai pašalinami centrifuguojant. Spalvos intensyvumas matuojamas spektrofotometru 540 nm bangos ilgiu. Paraleliai matuojamas tuščias mėginys.

Standartinės kreivės sudarymas. Vietoj tiriamojo tirpalo naudojami paruošti standartiniai ksilozės tirpalai (200; 500 ir 750 $\mu\text{mol}/\text{l}$), išmatavus gautų tirpalų spalvos absorbciją spektrofotometru braižoma standartinė kreivė (14 pav.)



14 pav. Ksilozės kalibracinė kreivė

Skaičiavimai:

Tiriamąjį mėginį fermentinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę (6), ksilanazės koncentraciją surandant iš standartinės kreivės.

$$U/g = \frac{(C_x - C_{RB}) \times D}{W \times 10 \times V} \quad (6)$$

Čia:

C_x – tiriamojo mėginio koncentracija (iš standartinės kreivės), $\mu\text{mol/l}$;

C_{RB} – tuščio mėginio koncentracija, $\mu\text{mol/l}$;

D – praskiedimo faktorius;

W – tiriamo mėginio kiekis, g;

10 – inkubacijos laikas;

V – tyrimui paimtas mėginio tūris, ml.

2.3.5. Susidariusių dujų koncentracijos laikomuose grūduose nustatymas OPTIMA 7 BIOGAS dujų analizatoriumi

Dujoms, susidariusioms kviečių laikymo metu, surinkti ir analizuoti suprojektuota sistema (15 pav.), kurią sudaro:

- Grūdų talpykla – šviesai nelaidus stiklinis indas
- Vandens vonelė skirta pastovios temperatūros palaikymui, grūdų laikymo metu
- Dujų surinkimo kolba
- Dujų analizatorius – OPTIMA 7 BIOGAS

Kas 7 dienas buvo imamas 100 ml dujų mėginys – išsiurbiamas iš laikomų grūdų kameros OPTIMA 7 BIOGAS dujų analizatoriumi.

Matuojami parametrai:

1. CO_2 koncentracija
2. O_2 koncentracija
3. H_2S koncentracija



15 pav. Dujų surinkimo ir analizavimo sistema

2.3.6. Aerobinių kolonijų skaičiaus nustatymas

Aerobinių mikroorganizmų skaičius nustatytas pagal LST EN ISO 4833-1:2013 „Maisto grandinės mikrobiologija. Bendrasis mikroorganizmų skaičiavimo metodas“.

Metodo esmė. Paimta 1 ml tiriamosios medžiagos (pelėsinio tirpalo) ir 9 ml skiediklio (buferinio peptono vandens). Buvo daromas dešimtkartinis skiedimas (10^{-1}). Pipete atmatuojamas po 1ml 10^{-1} skiedinio ir supilama į dvi sterilias Petri lėkšteles, po to užsėjamos kitos Petri lėkštelės su sekančiais dešimtkartiniais skiediniais. Tyrimui naudojama agarų mitybinė terpė. Inkubuojama 72 ± 3 h, aerobinėmis sąlygomis $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Po inkubavimo skaičiuotos kolonijos lėkštelėse, kuriose išaugo mažiau nei 300 kolonijų. Atrinktos 4 lėkštelės dviejų vienas po kito sekančių praskiedimų, po dvi kiekvieno praskiedimo. Kai išauga nedaug kolonijų, skaičiuojamos lėkštelės, kuriose yra mažiausiai 15 kolonijų.

Mikroorganizmų skaičius tiriamajame mėginyje apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = \frac{\Sigma C}{V * (n^1 + 0,1 * n^2) * d} \quad (7)$$

Čia: ΣC – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra mažiausiai 15 kolonijų; V – užsėtos medžiagos tūris lėkštelėje mililitrais; n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

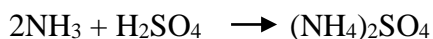
2.3.7. Baltymų kiekio nustatymas pagal azotą Kjeldalio metodu

Tiriamąjį produkto organinės medžiagos mineralizuojamos, kaitinant mėginį su koncentruota sieros rūgštimi. Medžiagos oksiduojamos iki galutinių skilimo produktų: H_2O ir CO_2 , o baltymų amino grupės azotas atskyla amoniako pavidalu - NH_3 .

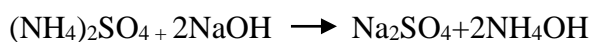
Analizės pradžioje kaitinama sieros rūgštis skyla, susidarant SO_2 ir atominiam deguoniui:



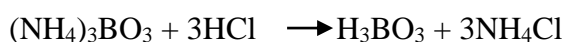
Deguois oksiduoja organinius junginius, tarp jų ir baltymus. Tuo tarpu CO₂ šildant išgaruoja, o amoniakas jungiasi su sieros rūgšties pertekliumi į amonio sulfatą.



Amonio sulfatas nelakus, todėl jis lieka virinamajame mišinyje. Veikiant gautą produkto mineralizatą koncentruotu šarmu, amoniakas iš sulfato atskeliamas:



Distiliuojant pašarminą mineralizuotą tirpalą, amoniakas renkamas į žinomos koncentracijos rūgšties tirpalą (3 % boro rūgšties tirpalą). Prieš titruojant, į mėginį įlašinami keli lašai Taširo indikatorius, susidaro žalia tirpalo spalva. Pagal amoniako surenkančios rūgšties ir nutitruoto šarmo tūrių skirtumą sprendžiama kiek rūgšties sujungė iš distiliuojamo mėginio išsiskyręs amoniakas. Sujungto rūgšties kiekis atitinka išsiskyrusio NH₃ (t.y. baltymų azoto) kiekį. Tokiu atveju apskaičiuojama, kiek susidarė amonio borato, kuris nutitruojamas žinomos koncentracijos druskos rūgštimi. Titruojant druskos rūgštimi, tirpalo spalva kinta iš žalios į violetinę:



Analizė atlikta šiais etapais:



Tiriami du lygiagretūs mėginiai ir skaičiuojamas jų baltymų kiekio vidurkis. Tiriamasis kviečių mėginys (~1 g) sveriamas į Kjeldalio kolbą 0,0002 g tikslumu. Pilama 20 ml koncentruotos sieros rūgšties, įdedama katalizatorius tabletė (K₂SO₄; CuSO₄·xH₂O; TiO₂) ir kaitinama/mineralizuojama 90 min 60 °C temperatūroje. Gautas tirpalas distiliuojamas. Distiliatas nutitruojamas 0,1N HCl tirpalu. Kontrolinis mėginys nudistiliuojamas analogiškėmis sąlygomis, vietoj distiliato nutitruojant distiliuotą vandenį.

Iš tiriamojo mėginio išsiskyręs azoto (N) kiekis (%) apskaičiuojamas pagal lygtį (8):

$$N = \frac{(1,4 \cdot n \cdot K [V_1 - V_0])}{m} \quad (8)$$

Čia: V₁ – 0,1N HCl kiekis sunaudotas iš distiliatui nutitruoti, ml; V₀ – 0,1N HCl kiekis sunaudotas kontroliniui mėginiui nutitruoti, ml; m – analizei pasvertas tiriamosios medžiagos kiekis, g; n – druskos rūgšties normalingumas; K – HCl tirpalo pataisos koeficientas.

Baltymų kiekis (B_{pr}) apskaičiuojamas pagal lygtį (9):

$$B_{pr} = N \cdot 5,70 \quad (9)$$

Čia: N – išsiskyręs azoto (N) kiekis; 5,70 – koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį grūduose.

2.3.8. Drėgmės kiekio nustatymas terminio džiovavimo būdu

Darbo eiga. Švarūs sausi biuksai ir jų dangteliai džiovunami (trukmė 1 val.) džiovavimo spintoje, kurioje nustatyta 105 °C temperatūra. Dangteliai dedami greta biuksų, kad visi paviršiai džiūtų vienodai. Biuksai su dangteliais išimami iš spintos ir sudedami į eksikatorių. Atvėسę biuksai uždengiami dangteliais ir pasveriami 0,1 mg tikslumu.

Paruoštas biuksas atidengiamas ir ant jo dugno kuo skubiau vienodu sluoksniu paskleidžiama 2-10 g mėginio. Biuksas uždengiamas ir su turiniu pasveriamas 0,1 mg tikslumu (W_1). Jeigu sveriamas daugiau nei vienas biuksas, uždengti biuksai sudedami į eksikatorių, kol vis mėginiai bus pasverti ir paruošti sudėti į džiovavimo spintą.

Biuksai ir jų dangteliai atskirai dedami į džiovavimo spintą. Džiovinama 105 °C temperatūroje periodiškai pasveriant, kol pavyzdžio masė nekinta ($\pm 0,2$ mg). Džiovavimo laikas priklauso nuo mėginio drėgmės. Baigus džiovinti, biuksai išimami iš džiovavimo spintos, uždengiami ir dedami į eksikatorių, kuriame ataušta iki kambario temperatūros. Atvėسę mėginiai su turiniu pasveriami 0,1 mg tikslumu (W_2).

Rezultatų skaičiavimas:

Drėgmės kiekis skaičiuojamas procentais pagal formulę (10):

$$W = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1} \right) \times 100 \quad (10)$$

Čia:

W – analizuojamo produkto pavyzdžio drėgmė, %;

W_1 – analizuojamo produkto pavyzdžio masė gramais prieš džiovinimą;

W_2 – analizuojamo produkto pavyzdžio masė po džiovavimo.

Aritmetinis vidurkis skaičiuojamas pagal trijų mėginių rezultatus.

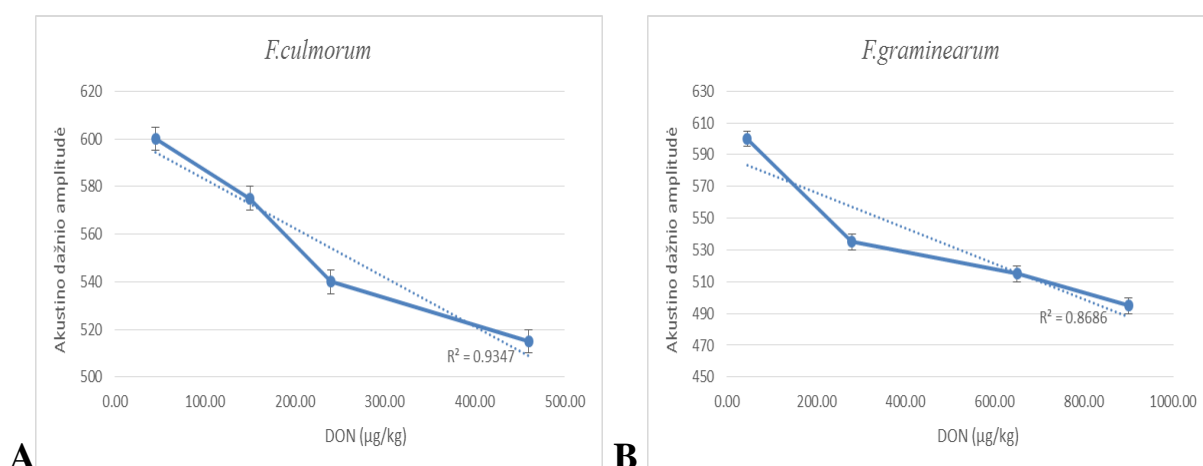
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

3.1. Akustinio metodo taikymas DON aptikimui laikomuose vasariniuose kviečių grūduose

Ankstesnių studijų metu ir paskelbtuose darbuose (Juodeikienė ir kt., 2014) pagrindinis dėmesys buvo skiriamas mikotoksinų taršos monitoringui tiriant grūdinę žaliavą po derliaus nuėmimo tikslu, kad *Fusarium* spp. užkrėsti grūdai nepatektų į saugyklas. Šio darbo eigoje tirtos akustinio metodo taikymo galimybės laikomų grūdų saugos kontrolei. Tam tikslui analizuotos skirtingo užterštumo grūdų modelinės sistemos. DON kiekis grūduose vertintas prieš grūdų laikymą ir po jo, naudojant tiek tradicinį, tiek ir vystomą akustinį metodą. Ruošiant mėginius DON analizei, vadovautasi aprašymu, pateiktu Juodeikienės ir kt. (2014) literatūroje.

Pradiniu eksperimento metu buvo renkama akustinio signalo dažninė charakteristika, įvertinant, kad esant labai žemam akustinių bangų dažniui (4-10 kHz) fiksuojami įvairūs triukšmai, o esant >40 kHz intervalui, signalo sklidimui didelę įtaką daro oro sūkuriai. Optimalus dažnis eksperimentui (27 kHz) pasirinktas, nustačius minimalias amplitudės (A_p) standartinio nuokrypio vertes ir įvertinus gautas matavimo paklaidas bei variacijos koeficientus. Tyrimai parodė, kad veikiant tiriamąją medžiagą šio dažnio bangomis, gaunama mažiausia akustinio signalo amplitudės verčių sklaida.

Vasarinių kviečių modelinių sistemų tyrimai parodė (16 pav.), kad tarp akustiniu metodu nustatytų praėjusių per grūdų mėginius akustinio signalo parametro (A_p) verčių ir DON koncentracijos, nustatytos ELISA metodu, yra atvirkštinis ryšys. Tiriant šiais metodais *F. culmorum* užkrėstas modelines grūdų sistemas, ryšys tarp A_p parametro ir DON koncentracijos (ELISA) sudarė $R^2 = 0,9347$, o vertinant *F. graminearum* užkrėstus grūdų mėginius – $R^2 = 0,8686$.

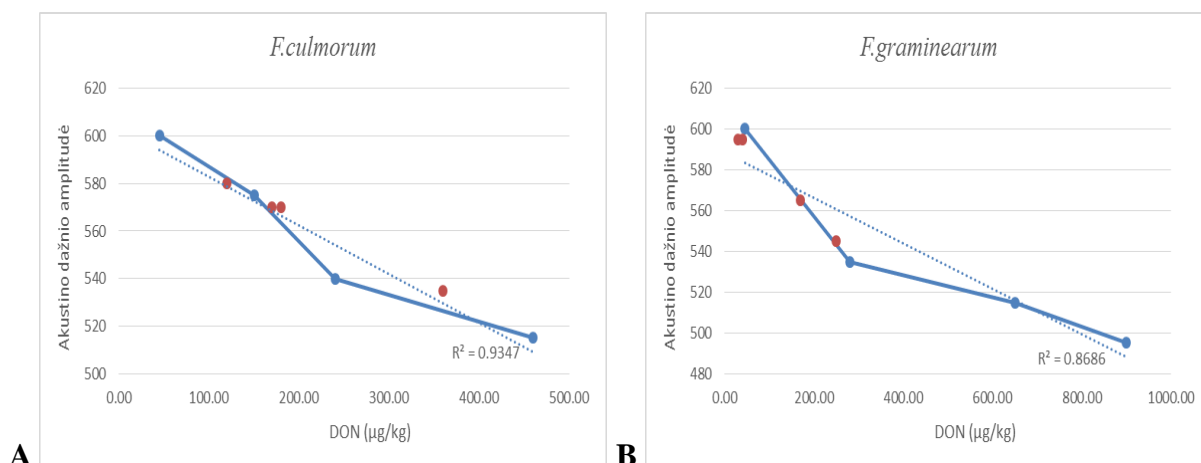


16 pav. Ryšys tarp akustinio signalo parametro (A_p) verčių ir DON koncentracijos, nustatytos ELISA metodu

Akustinio metodo patikimumo įvertinimas papildomai atliktas su kitomis modelinėmis grūdų sistemomis, gautomis, įvertinus bioapdoravimo įtaką *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų detoksikacijai (antras etapas). Tam tirtuose grūduose išmatuotos A_p vertės ir gauti rezultatai palyginti su iš pirmame

eksperimento etape gautomis kreivėmis, nustatant galimas DON koncentracijas. Akustiniu metodu fiksuotos DON koncentracijos palygintos su ELISA metodu nustatytomis DON koncentracijų vertėmis.

Iš 17 paveiksle pateiktų rezultatų matyti, kad akustiniu metodu gautos DON vertės (raudoni taškai grafikuose) koreliuoja su ELISA metodo rezultatais (mėlyna). *F. culmorum* užkrėstų kviečių grūduose akustiniu metodu nustatytų DON koncentracijų paklaidos, lyginant su gautomis ELISA metodu, sudarė vidutiniškai 4,7 %, o tiriant *F. graminearum* modelines sistemas – 7,8 %.



17 pav. DON verčių nustatytų akustiniu ir ELISA metodu koreliacija

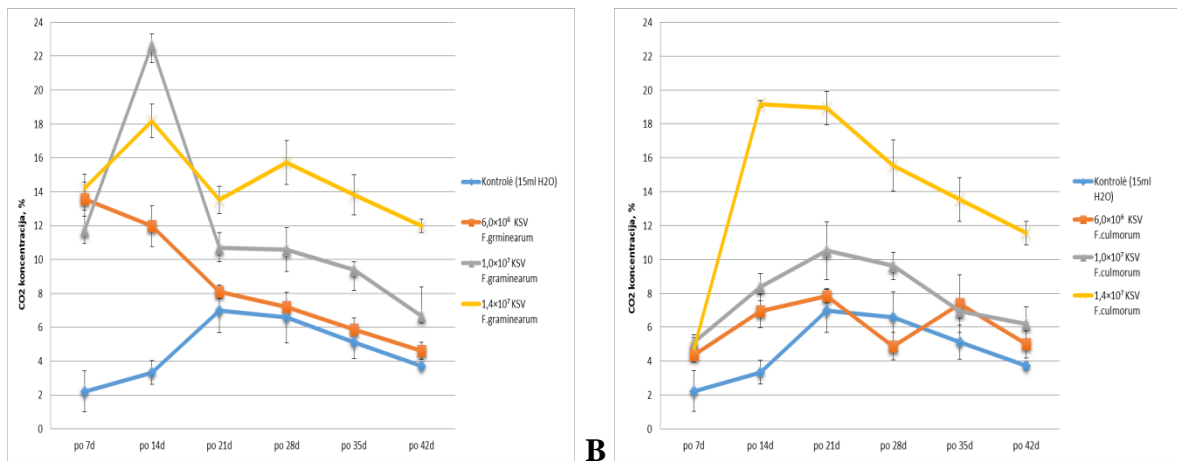
Regresinės analizės rezultatai ir akustinio metodo patikimumo vertinimas leidžia daryti išvadą, kad akustiniu metodu galima atlikti ne tik kokybinę, bet ir kiekybinę DON analizę. Metodas yra pakankamai tikslus ir tinkamas DON aptikimui grūdinėje žaliavoje.

3.2. Dujų susidarymo kinetika *Fusarium* spp. užterštų grūdų laikymo metu

3.2.1. CO₂ ir O₂ koncentracijos pokyčių vertinimas

Šiame skyriuje pateikta skirtingais mikroskopiniais grybais (*F. culmorum*; *F. graminearum*), kurie yra labiausiai paplitę Rytų Europos regione ir sudarantys grėsmę mikotoksinų susidarymui, laikomų vasarinių kviečių CO₂ susidarymo dinamika. Eksperimento metu buvo stebimos šiais mikroskopiniais grybais užkrėstų grūdų CO₂ koncentracijos pokyčiai, laikant grūdus 42 dienas. CO₂ susidarymas fiksuotas kas 7 dienas, imituojuant laikymo aruode sąlygas (su periodine aeracija). Tokiu būdu, grūdų laikymo metu periodiškai susidaręs dujų mišinys buvo keičiamas aplinkos oru.

Tyrimų rezultatai, pateikti 18 paveiksle (A ir B) rodo, kad tiriamų grūdų laikymo metu visais atvejais stebima CO₂ koncentracijos didėjimo tendencija iki pasiekia maksimalią vertę ir po to pradeda mažėti.



18 pav. CO₂ koncentracijos pokyčiai, *F. graminearum* (A) ir *F. culmorum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu.

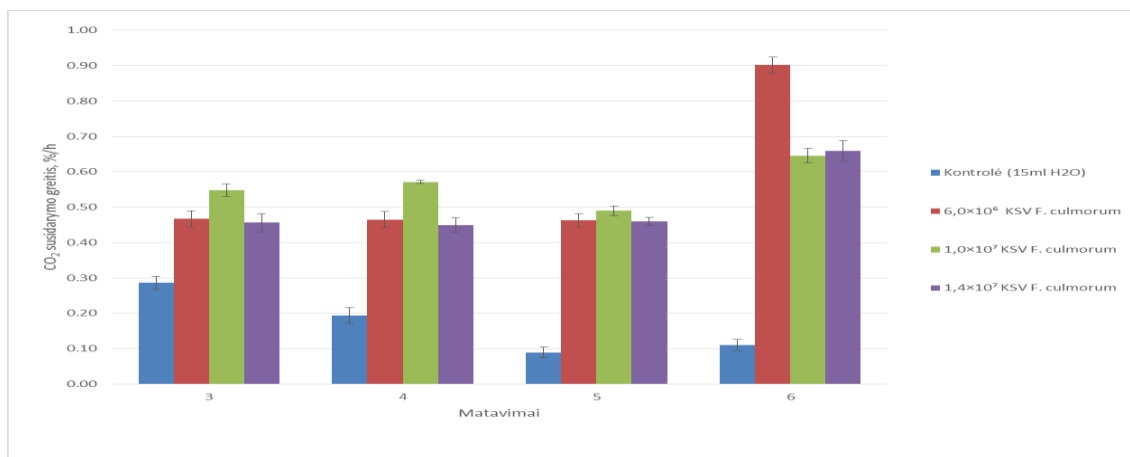
CO₂ pokyčio dinamika priklauso nuo mikroskopinio grybo rūšies ir grūdų modelinių sistemų užkrėstumo laipsnio. Didžiausias CO₂ susidarymo intensyvumas pastebėtas, analizuojant didžiausia *F. graminearum* koncentracija užkrėstame grūdų mėginyje ($1,4 \times 10^7$ KSV). Per pirmąsias 7 dienas CO₂ koncentracija šiame mėginyje pasiekė 14,23 %. Mažesnėmis koncentracijomis užkrėstuose *F. graminearum* mėginiuose ($6,0 \times 10^6$ KSV ir $1,0 \times 10^7$ KSV) po 7 dienų susidarė 2,50 % ir 0,66 % mažiau CO₂, nei su labiausiai užterštais grūdais (11,73 %, 13,57 %, atitinkamai).

Tolesnio grūdų laikymo metu buvo stebimas CO₂ koncentracijos didėjimas, pasiekęs maksimalias vertes (22,61 %) po 14 dienų laikymo, esant vidutiniam *F. graminearum* užkrėstumo laipsniui ($1,0 \times 10^7$ KSV). Kituose mėginiuose po 14 dienų nebuvo pastebėta vienareikšmė priklausomybė tarp grūdų užterštumo šiuo mikroskopiniu grybu laipsnio ir CO₂ susidarymo. Tolesnio tiriamų grūdų mėginių laikymo metu (nuo 14 dienos iki 42 dienos) buvo stebima CO₂ susidarymo mažėjimo tendencija. Didžiausio užkrėstumo grūduose CO₂ koncentracijos kitimo pokyčiai buvo mažiausi (6,19 %). Tuo tarpu mažesnio užkrėstumo grūdų mėginiuose buvo nustatyti didesni CO₂ koncentracijos pokyčiai ir jie buvo atvirkščiai proporcingi grūdų užkrėstumo *F. graminearum* koncentracijai. Po 42 dienų laikymo didžiausia CO₂ koncentracija (11,99 %) nustatyta didžiausio užterštumo mėginyje ($1,4 \times 10^7$ KSV), lyginant su mažesnio užkrėstumo grūdais (6,68 % ir 4,6 %), tai sudarė atitinkamai 5,31 % ir 7,39 % daugiau.

Tiriant kitu *Fusarium* spp. mikroskopiniu grybu (*F. culmorum*) užkrėstus vasarinių kviečių mėginius, stebėtos analogiškos tendencijos, kaip ir pirmojo eksperimentinio etapo metu, tačiau CO₂ susidarymas buvo mažiau intensyvus. Didžiausio užkrėstumo grūdų mėginiuose ($1,4 \times 10^7$ KSV) maksimalios CO₂ koncentracijos pasiektos po 14 dienų (19,17 %). Tuo tarpu kituose šiuo mikroskopiniu grybu užkrėstuose grūduose susidarė mažiau CO₂ (vidutiniškai 7,66 %) ir maksimalios vertės fiksuotos po 21 dienos, atitinkamai 10,52 % ir 7,83 %. Tolesnio laikymo metu stebėtas CO₂ koncentracijų mažėjimas ir pokytis nustatytas didžiausias, tiriant didžiausio užkrėstumo grūdų mėginius (9,71 %).

Analizuotuose kontroliniuose grūdų mėginiuose taip pat buvo stebima CO₂ susidarymo tendencija, tačiau CO₂ susidarymas viso grūdų laikymo metu buvo neintensyvus su nežymiu CO₂ koncentracijos prieaugiu po 21 grūdų laikymo dienos (9,95 %).

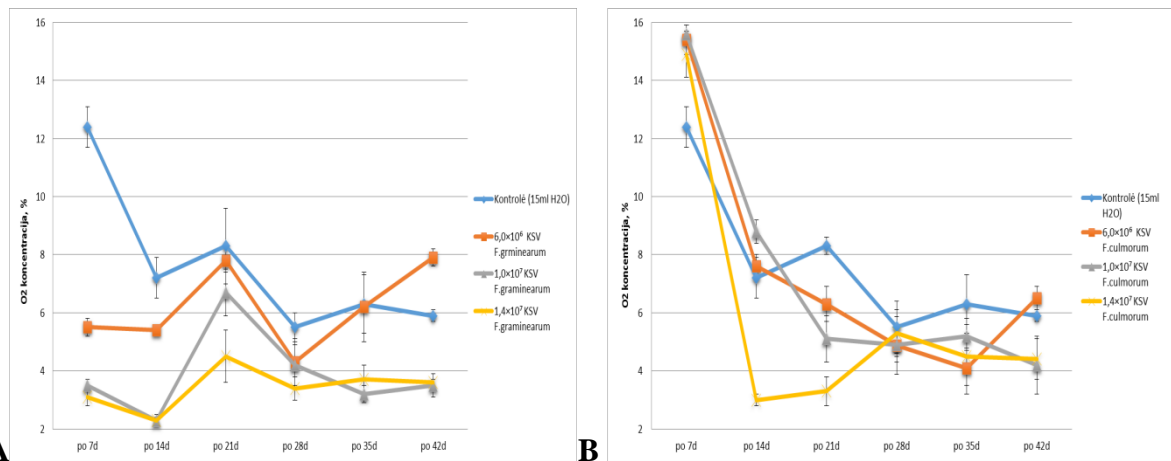
Papildomo eksperimento metu vertintas CO₂ susidarymo greitis, išbandant specialius daviklius CO₂ koncentracijai nustatyti *F. culmorum* užkrėstuose grūdų mėginiuose (19 pav.). Ribinė CO₂ matavimo vertė buvo 1 proc. CO₂ koncentracijai pasiekus iki 1 proc., visais atvejais atlikta mėginių aeracija ir matavimai analogiškai kartoti 4 kartus.



19 pav. CO₂ susidarymo greitis skirtingo užkrėstumo grūdų modelinėse sistemose

Gauti rezultatai patvirtino, kad mikroskopinio grybo rūšis turi įtakos CO₂ koncentracijos dinamikai, tačiau grūdų užkrėtimo laipsnio įtakos CO₂ susikaupimui davikliui nefiksavo. Tai rodo, kad CO₂ koncentracijoms vertinti tikslingai būtų naudoti didesnių ribinių matavimų verčių daviklius.

Apibendrinant galima teigti, kad CO₂ susidarymo dinamika priklauso nuo mikroskopinio grybo rūšies ir užkrėstumo koncentracijos, nes kitos laikymo sąlygos eksperimento metu (pradinis grūdų drėgnis ir laikymo temperatūra) buvo tos pačios. Lyginant mikroskopinius grybus tarpusavyje pagal CO₂ susidarymo dinamiką, *F. graminearum* užkrėstuose vasarinių kviečių grūdų mėginiuose stebėtas intensyvesnis CO₂ susidarymas nei su *F. culmorum* tirtose grūdų modelinėse sistemose. Abiem atvejais CO₂ susidarymas buvo proporcingas grūdų užkrėstumo mikroskopiniais grybais laipsniui. Įvertinant tai, kad eksperimento metu nebuvo sudaryta griežtų anaerobinių sąlygų (20 pav. A ir B), eksperimento metu vertintą O₂ koncentracijos mažėjimą galima sieti su mikroskopinių grybų veikla.



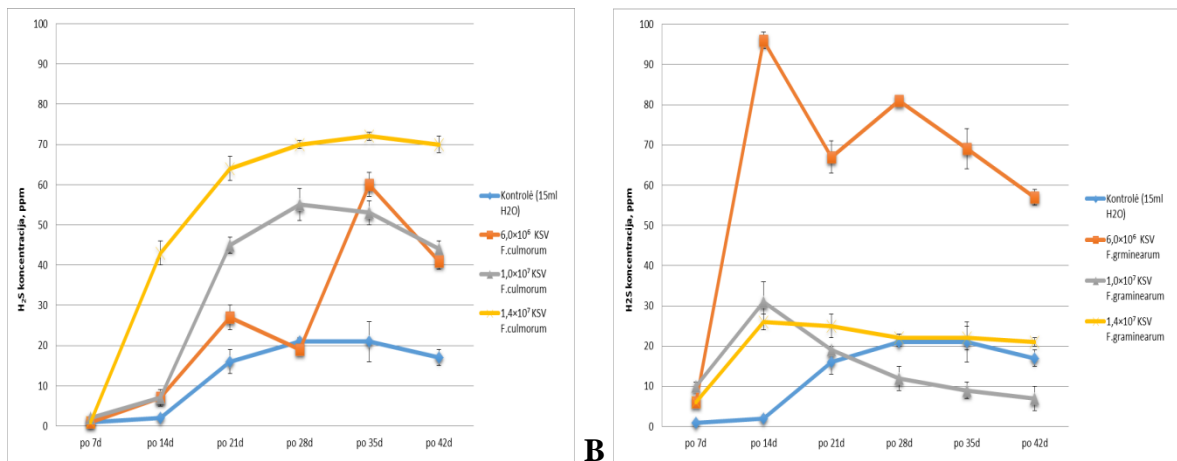
20 pav. O₂ koncentracijos pokyčiai, *F. graminearum* (A) ir *F. culmorum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu

F. graminearum užkrėstuose grūduose O₂ likutinės koncentracijos buvo fiksuotos vidutiniškai 0,70 % mažesnės nei *F. culmorum* užkrėstuose mėginiuose. Be to, sprendžiant pagal O₂ koncentracijos dinamiką, matyti, kad *F. graminearum*, lyginant su *F. culmorum*, greičiau adaptuojasi grūdinėje sistemoje. Po 7 dienų grūdų laikymo *F. graminearum* užkrėstuose grūdų mėginiuose O₂ koncentracija sumažėjo vidutiniškai 16,87 %, kai *F. culmorum* modelinėse grūdų sistemose O₂ koncentracijos pokytis buvo 3 kartus mažesnis (sudarė vidutiniškai 5,6 %).

3.2.2. H₂S koncentracijos pokyčių vertinimas

Vandenilio sulfidas yra vienas iš baltymų skilimo (anaerobinė proteolizė) produktų, galinčių susidaryti baltyminių medžiagų hidrolizės metu. Šiame darbe, pagal šio junginio susidarymą buvo vertinamas užkrėstos grūdinės žaliavos laikymo stabilumas laikymo metu. Tyrimo metu stebėta H₂S koncentracijos kitimo dinamika įvairiais *Fusarium spp.* mikroskopiniais grybais (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) užkrėstų vasarinių kviečių grūdų laikymo metu. Eksperimento trukmė, sąlygos ir aeracijos periodiškumas buvo analogiškas, kaip ir tiriant CO₂ susidarymą (3.2.1 skyrius).

Tyrimų rezultatai (21 pav.) rodo, kad visais atvejais vasarinių kviečių laikymo metu stebimas H₂S koncentracijos didėjimas ir šio junginio susidarymo intensyvumas priklausė nuo mikroskopinio grybo rūšies ir grūdų užkrėstumo *Fusarium spp.* laipsnio.



21 pav. H₂S koncentracijos pokyčiai, *F. culmorum* (A) ir *F. graminearum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu

Grūdų modelinių sistemų, užkrėstų *F. culmorum* mikroskopiniu grybu, atveju, H₂S koncentracija buvo tiesiogiai proporcinga užkrėstumo laipsniui (A). Visuose šiuo mikroskopiniu grybu užterštų vasarinių kviečių mėginiuose, H₂S susidarymas fiksuotas jau po 14 dienų grūdų laikymo. Didžiausio užkrėtimo grūdų mėginyje ($1,4 \times 10^7$ KSV) H₂S koncentracija šiuo laiko momentu fiksuota didžiausia (43 ppm), kai mažesnio užkrėstumo ($6,0 \times 10^6$ KSV ir $1,0 \times 10^7$ KSV) grūdų mėginiuose nustatyta vidutiniškai 36 ppm mažesnė H₂S koncentracija (7 ppm). Pažymėtina, kad *F. culmorum* užkrėsti grūdai pasižymėjo mažiausiu stabilumu laikymui ir tai labiausiai išryškėjo vertinant didžiausio užterštumo mėginį ($1,4 \times 10^7$ KSV). Analizuojant juos, H₂S išskyrimo geba didėjo ir pasiekė maksimumą po 35 ir 42 dienų grūdų laikymo, atitinkamai 72 ppm ir 70 ppm). Tolesnio grūdų laikymo metu buvo stebimas H₂S mažėjimas.

Kituose *F. culmorum* užkrėstuose vasarinių kviečių grūdų mėginiuose (mažiausio ir vidutinio užkrėstumo) buvo stebima H₂S koncentracijos didėjimas, tačiau mažiausio ir vidutinio užkrėstumo mėginiuose ($6,0 \times 10^6$ KSV ir $1,0 \times 10^7$ KSV) H₂S susidarymo intensyvumas buvo mažesnis nei didžiausio užterštumo modelinėje grūdų sistemoje: vidutinio užterštumo mėginyje H₂S koncentracija po 28 ir 42 dienų grūdų laikymo nustatyta, atitinkamai 55 ir 44 ppm, o mažiausio užterštumo mėginiuose ($6,0 \times 10^6$ KSV) — po 35 ir 42 dienų laikymo – 60 ir 41 ppm.

Analizuojant *F. graminearum* mikroskopiniu grybu (B) užterštus vasarinių kviečių mėginius, didžiausias H₂S susidarymas fiksuotas po 14 dienų, laikant mažiausio užterštumo grūdų mėginius ($6,0 \times 10^6$ KSV). Tuo tarpu vidutinio ir didžiausio užterštumo grūdų mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $1,4 \times 10^7$ KSV) po 14 dienų laikymo H₂S koncentracijos nustatytos, atitinkamai 31 ir 26 ppm. Tolesnio laikymo metu H₂S susidarymo geba mažėjo ir tai buvo stebima analizuojant visas užterštų šiuo mikroskopiniu grybu grūdų modelines sistemas. Tiriant mažiausio užterštumo grūdus, H₂S koncentracijos sumažėjimas fiksuotas (41 %), o laikant vidutinio ir didžiausio užterštumo grūdų mėginius ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $1,4 \times 10^7$ KSV), atitinkamai 77 ir 19 %.

Kontroliniame mėginyje po 14 dienų laikymo H₂S neaptikta (koncentracijos buvo mažesnės už matavimo įrangos paklaidą - <5 ppm) ir šiame mėginyje H₂S koncentracijos didėjimo tendencija pastebėta tik po 21 dienos grūdų laikymo. Maksimali H₂S koncentracija buvo fiksuota po 28 dienų (21 ppm), kuri lyginant su užterštais grūdais (H₂S susidarymo ekstremumu) buvo vidutiniškai 2,6 karto mažesnė. Tolesnio grūdų laikymo metu stebėtas H₂S mažėjimas, kuris galiniame laikymo momente (po 42 dienų) sudarė 11 ppm.

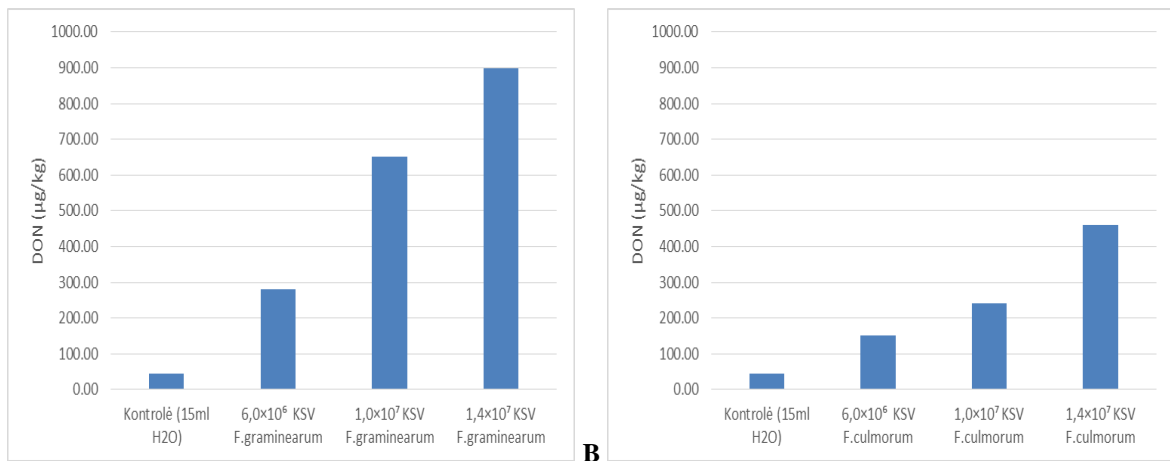
Apibendrinant tyrimų rezultatus, galima teigti, kad H₂S susidarymo intensyvumui įtakos turi grūdinės žaliavos užterštumas *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais, priklausantis nuo mikroskopinio grybo rūšies ir atskirais atvejais, pvz., *F. culmorum*, nuo užterštumo laipsnio. Didesne geba sudaryti H₂S pasižymėjo *F. culmorum* užterštos grūdų modelinės sistemos nei naudojant *F. graminearum*. *F. culmorum* užkrėstuose grūduose H₂S susidarymas buvo tiesiogiai proporcingas užterštumo laipsniui ($R^2=0,700$). Tuo tarpu modelinėse grūdų sistemose, ruošiose su *F. graminearum*, ryšio tarp užkrėštumo laipsnio ir H₂S susidarymo nepastebėta. Gauti tyrimų duomenys rodo, kad mikroskopiniai grybai matomai pasižymi skirtingu proteaziniu aktyvumu. Kontroliniame grūdų mėginyje H₂S susidarymas gali būti siejamas su patekusia į grūdų masę pašaline mikroflora, kurios veikla buvo dirbtinai stimuliuota, pakeliant grūdų masės drėgnį (iki 19,13 %).

Kadangi azoto ir sieros medžiagų apykaita augalinėje žaliavoje yra tarpusavyje labai susijusi (organiniuose junginiuose esanti azotas ir siera dalys juose yra palyginti vienodos) [74], kito etapo metu buvo tikslinga įvertinti baltymų pokyčius *Fusarium* spp. užterštoje grūdinėje žaliavoje, siejant juos su H₂S susidarymu.

3.3. *Fusarium* spp. grūdų užterštumo įtaka DON susidarymui grūdų laikymo metu

Dujų susidarymo tyrimai rodo, kad dirbtinai įvairiais *Fusarium* spp. užterštuose kviečių grūduose suaktyvėjo mikrofloros kvėpavimo procesai ir susidarė tinkamos sąlygos mikroskopiniams grybams (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) augti ir daugintis, atitinkamai tai galėjo turėti įtakos ir susidariusio DON kiekiui. Šiame skyriuje pateikta DON koncentracijų, išmatuotų tradiciniu ELISA metodu po 42 dienų grūdų laikymo, analizės rezultatai, vertintas ryšys tarp DON koncentracijos ir užkrėštumo laipsnio bei mikroskopinio grybo rūšies.

Eksperimento metu, visais atvejais stebėta tiesinė DON koncentracijos priklausomybė nuo užterštumo laipsnio (22 pav. A ir B)



22 pav. DON koncentracijos pokyčiai, *F. graminearum* (A) ir *F. culmorum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu

Analizuojant *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstus vasarinių kviečių grūdus po laikymo (42 dienų), didžiausia DON koncentracija (900 µg/kg) fiksuota, didžiausio užkrėstumo laipsnio grūdų modelinėse sistemose (1,4×10⁷ KSV). Vidutinio ir mažiausio užkrėstumo mėginiuose (1,0×10⁷ KSV ir 6,0×10⁶ KSV) tirto mikotoksino kiekis buvo 28 % ir 69 % mažesnis nei didžiausio užterštumo grūdai ir sudarė 650 µg/kg ir 280 µg/kg, atitinkamai.

F. culmorum mikroskopinis grybas buvo mažiau aktyvus ir fiksuotos DON koncentracijos šiuo patogeno užkrėstuose mėginiuose buvo vidutiniškai 53 % mažesnės nei su *F. graminearum* užkrėstuose grūduose. Didžiausio užkrėstumo (1,4×10⁷ KSV) modelinėje sistemoje po 42 dienų kviečių grūdų laikymo nustatyta maksimali DON koncentracija (460 µg/kg). Mažesnio užkrėstumo mėginiuose (1,0×10⁷ KSV ir 6,0×10⁶ KSV) fiksuotos, atitinkamai 48 % ir 68 % mažesnės DON koncentracijos (240 µg/kg ir 150 µg/kg, atitinkamai), lyginant su maksimaliu užterštumo laipsniu.

Pažymėta, kad kontroliniame (neužkrėstame) mėginyje DON koncentracija nustatyta 45 µg/kg.

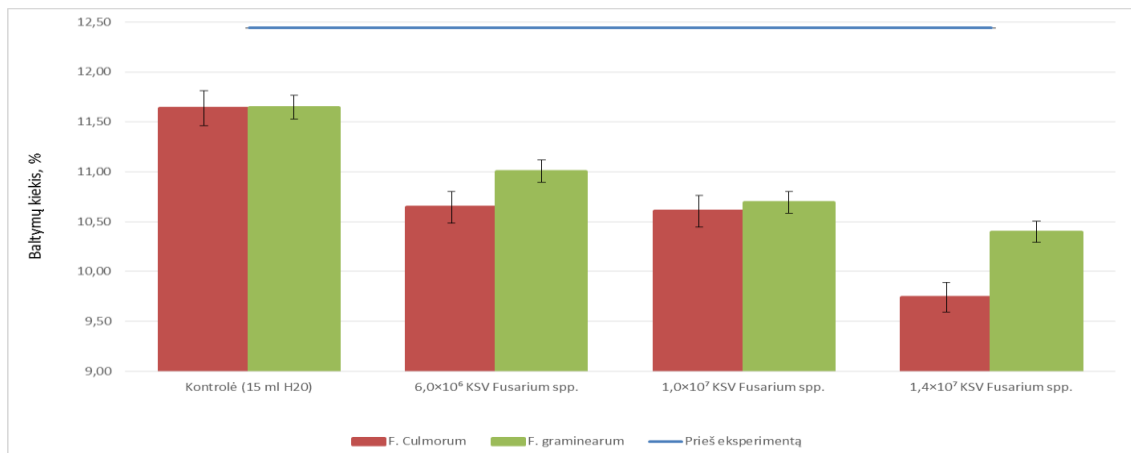
Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai daro įtaką DON susidarymui laikomuose kviečių grūduose ir tai įrodoma laboratorinėse sąlygose. Nustatytas stipri tiesinė priklausomybė tarp *F. graminearum* ir *F. culmorum* užkrėstumo laipsnio ir susidarancio vasarinių kviečių grūduose DON kiekio ($R^2 = 0,9717$; $R^2 = 0,9165$, atitinkamai).

3.4. Baltymų pokyčiai *Fusarium* spp. užterštuose grūduose laikymo metu

Šame skyriuje pateikti baltymų kiekio kitimo rezultatai, *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) užkrėstų vasarinių kviečių modelinių sistemų laikymo metu (23 pav.).

Visais atvejais stebima tiesioginė priklausomybė tarp baltymų kiekio mėginiuose sumažėjimo ir grūdų užkrėtimo mikroskopiniu grybu laipsnio. Ši baltymų nuostolių tendencija buvo stebima, analizuojant grūdus, užkrėstus tiek *F. culmorum*, tiek *F. graminearum*. Pradinė baltymų koncentracija grūduose (pradiniame eksperimento taške, vaizduojama 23 pav. mėlyna linija) nustatyta 12,44 %.

Laikymo metu (po 42 dienų) visais atvejais nustatytas baltymų kiekio sumažėjimas, kurio pokytis priklausė nuo užterštumo laipsnio ir mikroskopinio grybo rūšies (*F. culmorum* ar *F. graminearum*).



23 pav. Baltymų kiekio kitimo rezultatai, *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) užkrėstose laikomų vasarinių kviečių modelinėse sistemose

Didžiausi baltymų nuostoliai fiksuoti daugiausiai *F. culmorum* ($1,4 \times 10^7$ KSV) užkrėstame vasarinių kviečių mėginyje, kuriame baltymų nuostoliai sudarė 21,7 % (likutinė baltymų vertė – 9,74 %). Mažesnio užkrėtimo laipsnio tos pačios rūšies mikroskopiniu grybu apkrėstuose mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $6,0 \times 10^6$ KSV) baltymų nuostoliai nustatyti mažesni, ir sudarė 14,5 % ir 14,7 % atitinkamai (likutinės baltymų koncentracijų vertės 10,61 ir 10,64 %).

Tiriant *F. graminearum* užkrėstas grūdų modelines sistemas, buvo nustatyti mažesni baltymų nuostoliai laikymo metu, tiriant didžiausio užkrėtumo grūdus jie sudarė 16,4 %. Mažesnio ir vidutinio užterštumo grūdų mėginiuose, baltymų nuostoliai, lyginant su maksimalia užterštumo koncentracija, buvo vidutiniškai 3,6 % mažesni.

Kontroliniame mėginyje, kuris nebuvo užkrėstas *Fusarium* spp. mikroskopiniu grybu, tačiau buvo sudrėkintas prieš laikymą iki 19,13 % drėgnio, po 42 dienų grūdų laikymo, fiksuoti baltymų nuostoliai – 6,4 % (likutinė baltymų koncentracija 11,64 %).

Gauti rezultatai rodo, kad *F. culmorum* pasižymi didesne baltymų skaidymo geba nei *F. graminearum*. Baltymų nuostoliai tiriant su abiem mikroskopiniais grybais užterštus grūdų mėginius koreliuoja su užterštumo laipsniu. Be to, stebimas ryšys ($R^2=0,9760$) tarp baltymų nuostolių ir H₂S susidarymo (*F. culmorum* atveju). Tiriant kontrolinį mėginį, nustatytą baltymų sumažėjimą galima sieti su natūralios mikrofloros žaliavoje proteolitinio aktyvumo padidėjimu, inicijuotu papildomu grūdų sudrėkinimu.

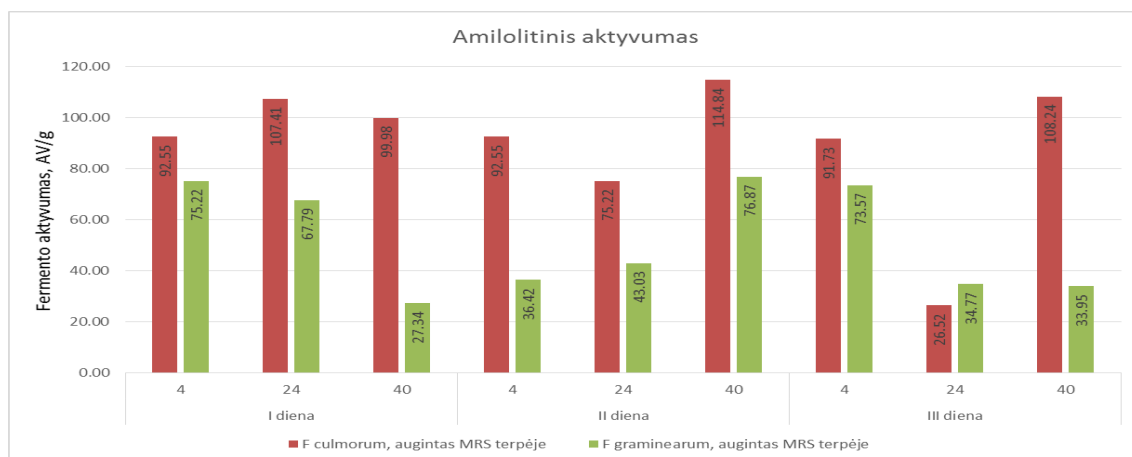
3.5. *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų fermentinių aktyvumų palyginamasis įvertinimas

Manoma, kad daugelis užkrėstų grūdų komponentų pokyčių yra susiję su įvairiais patogenų (mikroskopinių grybų) aktyvumais. Šiame darbe nustatyti įvairių *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) amilolitiniai ir ksilanolitiniai fermentiniai aktyvumai. Tolimesniuose eksperimento etapuose tikslinga vertinti fermentinių aktyvumų įtaką tiriamiems parametrams – sausųjų medžiagų nuostoliams, baltymų kiekio ir grūdų struktūros pokyčiams.

3.5.1. *F. culmorum* ir *F. graminearum* amilolitinio aktyvumo nustatymas

Šiame skyriuje analizuojamas *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) ksilanolitinio aktyvumo ryšys su pelėsio augimo sąlygomis (auginimo trukmė ir temperatūra). Eksperimento metu, skirtingose temperatūrose (4 °C ; 24 °C; 40 °C) augintų *F. culmorum* ir *F. graminearum* mikroskopinių grybų mėginiai, fermentinių aktyvumų tyrimui buvo imami 3 kartus, kas 24 val. Pagal 2.3.3 skyriuje pateiktą amilolitinio aktyvumo nustatymo metodiką apskaičiuoti skirtingose sąlygose augintų *Fusarium* spp. pelėsių amilolitiniai aktyvumai.

Iš 24 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad visais atvejais *F. culmorum* mikroskopinis grybas pasižymėjo didesniu amilolitininiu aktyvumu nei *F. graminearum*.



24 pav. *F. culmorum* ir *F. graminearum* amilolitininis aktyvumas

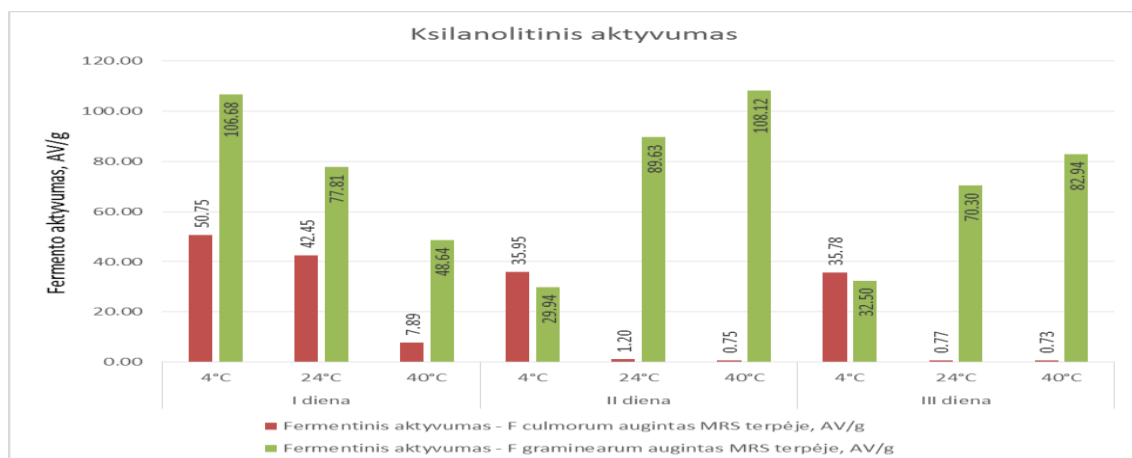
Didžiausi abiejų patogenų amilolitiniai aktyvumai fiksuoti 40 °C temperatūroje (optimalios mikroskopinio grybo augimo sąlygos) laikytame pelėsiniame tirpale, kurių tiriamieji mėginiai buvo paimti po 48 valandų nuo užsėjimo. Šiuo laiko momentu fiksuotas maksimalus *F. culmorum* amilolitininis aktyvumas sudarė 114,84 AV/g. Didžiausias *F. graminearum* mikroskopinio grybo amilolitininis aktyvumas buvo 1,5 karto mažesnis nei *F. culmorum* ir sudarė 76,87 AV/g.

3.5.2. *F. culmorum* ir *F. graminearum* ksilanolitinio aktyvumo nustatymas

Šiame skyriuje analizuojamas *Fusarium* spp. mikroskopinių grybų (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) ksilanolitinio aktyvumo ryšys su pelėsio augimo sąlygomis (augimo trukmė, temperatūra). Mėginiai tyrimui buvo imami analogiškais intervalais, kaip aprašyta 3.5.1 skyriuje.

Pagal 2.3.3 skyriuje aprašytą ksilanolitinio aktyvumo nustatymo metodiką, nustatyti mėginių *Fusarium* spp. ksilanolitiniai aktyvumai.

Iš 25 pav. pateiktų rezultatų matyti, beveik visais atvejais *F. graminearum* mikroskopinio grybo ksilanolitinis aktyvumas buvo didesnis nei *F. culmorum*.



25 pav. *F. culmorum* ir *F. graminearum* ksilanolitinis aktyvumas

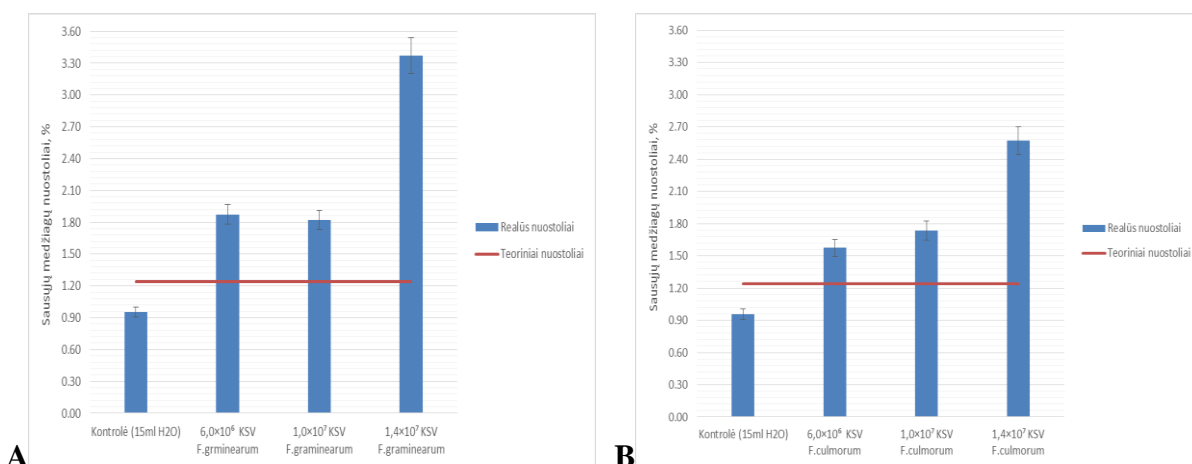
Didžiausias *F. graminearum* ksilanolitinis aktyvumas fiksuotas 40 °C temperatūroje kultivuotame tirpale, kurio tiriamasis mėginys buvo paimtas tyrimui po 48 valandų nuo užsėjimo (108,12 AV/g). Stebima tendencija, kad *F. culmorum* mikroskopinio grybo ksilanolitiniai fermentai (ksilanazės) buvo aktyviausi, mažiausioje temperatūroje (4 °C) laikytuose pelėsinuose tirpaluose (vidutiniškai 40,88 AV/g), kai tuo tarpu kituose temperatūriniuose režimuose (24 °C ir 40 °C) laikytuose mėginiuose ksilanolitiniai aktyvumai sudarė vidutiniškai 14,81 AV/g ir 3,12 AV/g, atitinkamai. Didžiausias *F. culmorum* ksilanolitinis aktyvumas fiksuotas 4 °C temperatūroje laikytame pelėsiname tirpale iš kurio tiriamasis mėginys paimtas tyrimui po 24 valandų nuo užsėjimo (50,75 AV/g), tai sudarė 53,16 % mažiau, nei maksimalus fiksuotas *F. graminearum* mikroskopinio grybo ksilanolitinis aktyvumas.

3.6. Ryšys tarp *Fusarium* spp. taršos ir sausųjų medžiagų nuostolių laikomuose kviečių grūduose

Grūdinės žaliavos laikymo metu suaktyvėja mikrofloros kvėpavimo procesai. Ypač šiai tendencijai ryški, kai grūdų drėgnis nėra optimalus saugiam laikymui (>14 %), galintis turėti įtakos sausųjų medžiagų nuostoliams.

Eksperimento metu, tiriant skirtingų *Fusarium* spp. genotipų (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) ir užterštumo laipsnio įtaką grūdinės žaliavos nuostoliams, buvo sukurtos palankios sąlygos laikomuose grūduose (drėgnis padidintas iki 19,13 %) esančių mikroorganizmų kvėpavimui ir dauginimuisi, tuo suaktyvinant grūduose esančių komponentų metabolizmo procesus.

Nustatyti sausųjų medžiagų nuostoliai (masių skirtumai prieš ir po laikymo) palyginti su apskaičiuotais pagal 3 formulę, pateiktą 1.4 skyriuje (raudona linija 26 pav.). Iš 26 paveiksle pateiktų tyrimo rezultatų išryškėjo tiek *Fusarium* spp. rūšies, tiek ir užterštumo laipsnio įtaka sausųjų žaliavų nuostoliams.

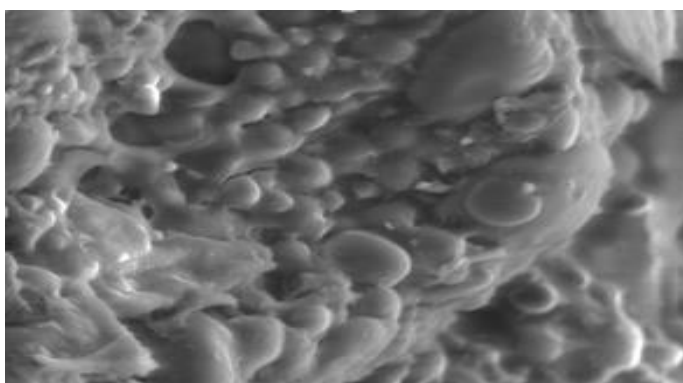


26 pav. Sausųjų medžiagų nuostoliai *F. graminearum* (A) ir *F. culmorum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių laikymo metu

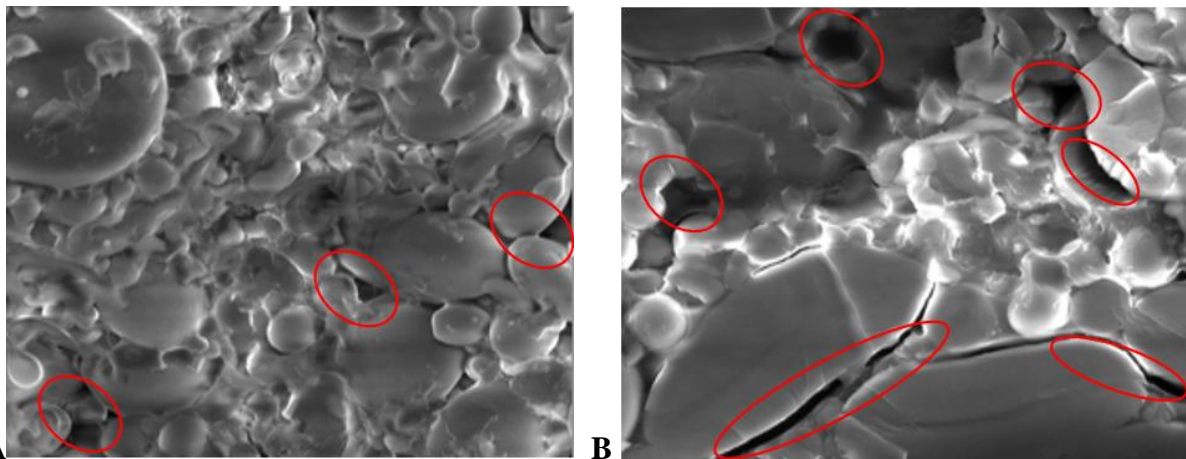
F. graminearum turėjo didesnę įtaką sausųjų medžiagų nuostoliams nei *F. culmorum*. Ši tendencija ypač aiški, vertinant didžiausio užkrėstumo ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginius: *F. graminearum* vasarinių kviečių modelinėje sistemoje (A) sausųjų medžiagų (SM) nuostoliai, lyginant su *F. culmorum*, nustatyti 24 % didesni ir sudarė 3,37 % ir 2,57 %, atitinkamai. Mažesnio užterštumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $6,0 \times 10^6$ KSV) SM nuostoliai taip pat buvo 19 % ir 4,6 % didesni vertinant *F. graminearum* užterštus grūdus nei *F. culmorum*.

Lyginant eksperimentinius SM tyrimų rezultatus maksimaliai užterštuose grūdų mėginiuose su teoriškai apskaičiuotais (1,24 %), galima konstatuoti apie daromą mikroskopinių grybų įtaką laikomų grūdų kiekybiniais nuostoliams. Kontroliniuose grūdų mėginiuose (be užkrato) sausųjų žaliavų nuostoliai buvo 30,53 % mažesni nei teoriškai apskaičiuotuose mėginiuose (0,95 %).

Gautų rezultatų patvirtinimui ir palyginimui, skenuojamu elektroniniu mikroskopu buvo padarytos sveikų ir *Fusarium* spp. užkrėstų grūdų (didinimas 20 μm) nuotraukos (27 pav. pateikti neužteršti grūdai; 28 pav. A ir B – užteršti).



27 pav. Neužteršto grūdo mikroskopinė (didinimas 20 μm) nuotrauka



28 pav. *F. culmorum* (A) ir *F. graminearum* (B) mikroskopiniu grybu apkrėstų vasarinių kviečių mikroskopinės (20 μm) nuotraukos, darytos po 42 dienų laikymo

Pateiktose mikroskopinėse nuotraukose stebimi, vasarinių kviečių grūdų mikrostruktūros pokyčiai. Neužteršto grūdo atveju (27 pav), aiškiai matyti taisyklingos formos krakmolo grūdėliai pasiskirstę nesuardytoje baltymų matricoje. Po 42 dienų, *F. culmorum* ir *F. graminearum* užterštų grūdų laikymo padarytose nuotraukose matomi aiškūs krakmolo grūdėlių struktūros pokyčiai, jie yra destrukūrizuoti, praradę formą, suardytomis sienelėmis, sudarantys pavienius aglomeratus. *F. graminearum* užkrėstumo atveju stebimi ryškūs baltymų matricos pažeidimai (juodi ruožai, nuotraukose apvesti raudonai), kurie labiausiai galėjo įtakoti SM nuostolius. Pateiktos nuotraukos patvirtina eksperimento metu gautus *F. graminearum* užkrėstų grūdų laikymo metu didesnius baltymų ir SM nuostolius nei *F. culmorum* užkrėstose modelinėse sistemose.

Apibendrinant SM nuostolių tyrimų rezultatus, pažymėtina, kad *F. graminearum* gali sudaryti didesnius laikomų grūdų nuostolius nei *F. culmorum*. Tai sietina su skirtingais mikroskopinių grybų fermentiniais aktyvumais. Eksperimento metu tirtas α -amilazinis ir ksilanazinis abiejų mikroskopinių grybų aktyvumas. Tyrimų rezultatai, pateikti 24 ir 25 paveiksluose, rodo, kad mikroskopiniai grybai pasižymi savitais fermentiniais aktyvumais. *F. culmorum*, lyginant su *F. graminearum*, buvo būdingas 57,9 % didesnis α -amilazinis aktyvumas ir 3 kartus mažesnis ksilanazinis. Tokiu būdu, *F. graminearum* daugiausiai ardo grūdų paviršiuje esančias skaidulines medžiagas. Be to, 3.4 skyriuje pateikti baltymų tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad šis mikroskopinis grybas gali pasižymėti didesniu ir proteolitiniu aktyvumu, sąlygojančiu didesnius laikomuose grūduose baltymų nuostolius.

Skirtingai nei *F. graminearum*, *F. culmorum*, pasižymėdamas reikšmingu amilaziniu aktyvumu, gali skaidyti vidinius grūdų komponentus, pvz., krakmolą, todėl galima daryti išvadą, kad *F. graminearum* labiau prisideda prie kitų grūde esančių sausųjų medžiagų (angliavandenių, riebalų) ardymo.

3.7. Grūdų apdorojimo PRB bioproductais įtaka dujų susidarymui laikymo metu

Atlikti tyrimai rodo, kad grūdinės žaliavos užkrėtimas *Fusarium spp.* grybais gali turėti įtakos ne tik grūdų saugai ir kokybei bet ir ekonominiams rodikliams, nes mikotoksinai yra atsparūs terminiam apdorojimui ir praktiškai nepašalinami iš gatavo produkto,. Todėl jie turi būti pastoviai kontroliuojami įvairiose grūdų gamybos etapuose, jų tarpe po derliaus nuėmimo ir laikymo metu. Be to, aktuali ir efektyvių detoksikacijos būdų paieška, nes mikotoksinų kontrolei trūksta greitų metodų, o esami yra brangūs ir susiję su griežtais mėginių paėmimo analizei reikalavimais. Todėl jų taikymas grūdų produktų gamybos praktikoje dažnai būna ribotas. *Fusarium* toksinų, pvz., DON ir FmB detoksikacijai gali būti naudojami fizikiniai metodai, atskiriant gravitacijos principu susiraukšlėjusius grūdus nuo sveikų. Kiti cheminiai metodai, pvz., ozonavimas, apdorojimas chloru ir bisulfitu gali būti efektyvūs tik kai kurių mikotoksinų eliminavimui.

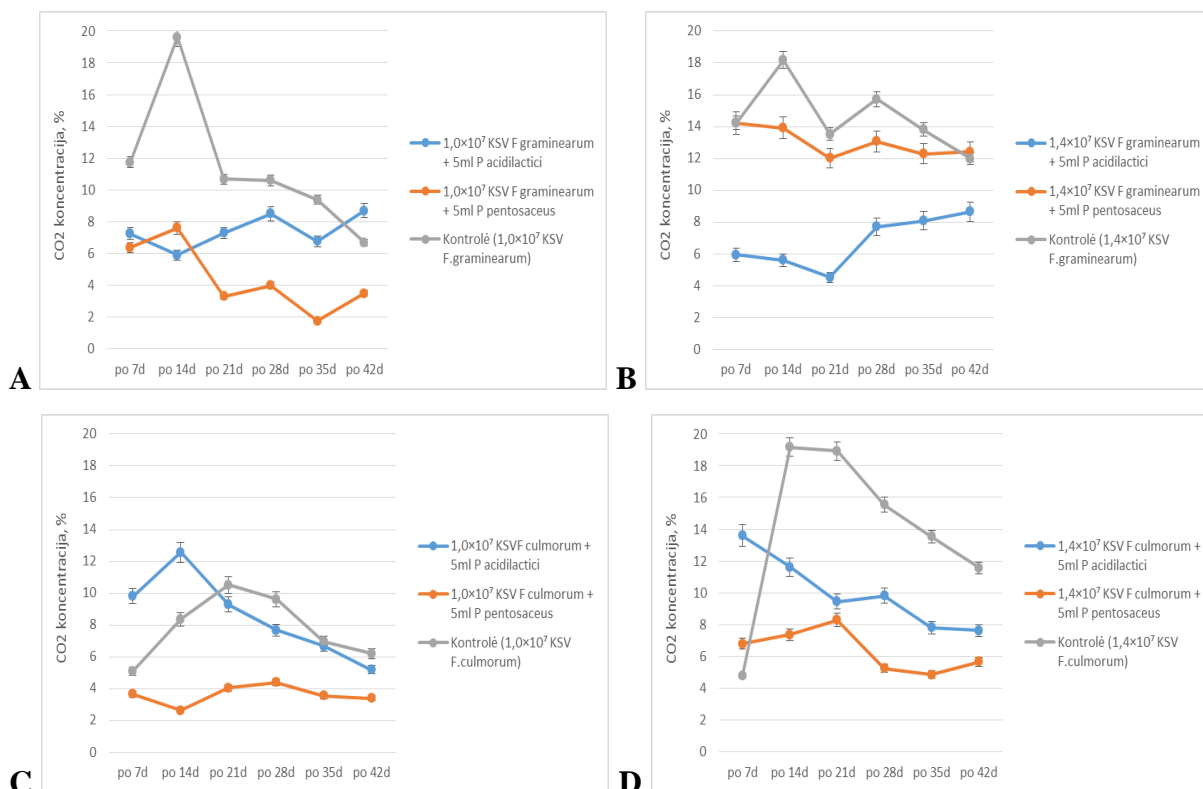
Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į biologinius mikotoksinų absorbentus, pagamintus naudojant tokius mikroorganizmus, kaip mielės ir pieno rūgšties bakterijos (PRB). Šiame darbe buvo bandomas laikomų grūdų apdorojimas PRB bioproductais, pagamintais naudojant įvairias PRB padermes (*Pediococcus acidilactici* ir *Pediococcus pentosaceus*), įvertinant dujų susidarymo kinetiką ir sausųjų medžiagų, įskaitant baltymus, nuostolius.

3.7.1. CO₂ ir O₂ dujų susidarymo pokyčiai

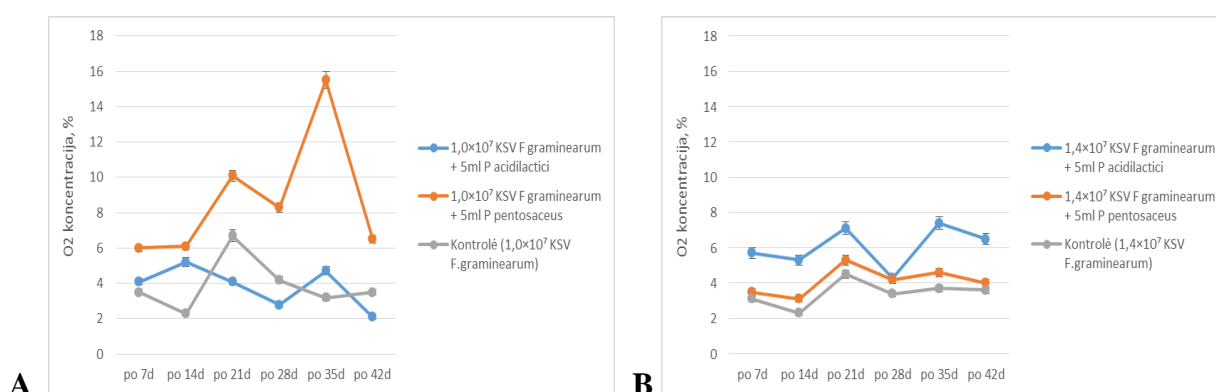
Šiame skyriuje tirta CO₂ ir O₂ koncentracijų pokyčio kinetika apdorotų PRB bioproductais užkrėstų skirtingais *Fusarium spp.* grybais vasarinių kviečių grūdų laikymo metu. Eksperimento metu naudotos grūdų laikymo ir tyrimo sąlygos, aprašytos 3.2.1 skyriuje. Tyrimų rezultatai, pateikti 29 pav., rodo, kad CO₂ koncentracijos grūdų laikymo metu kito vidutiniškai nuo 1,7 % iki 19,6 %, priklausomai nuo grūdų bioapdorojimui naudotos PRB padermės, mikroskopinio grybo rūšies ir užterštumo laipsnio. Visais atvejais užterštų vasarinių kviečių grūdų apdorojimas PRB bioproductais mažino, lyginant su kontrole, CO₂ susidarymą laikymo proceso metu. Efektyviausias CO₂ pokyčio mažėjimas fiksuotas, laikant labiausiai *F. culmorum* užkrėstus ($1,4 \times 10^7$ KSV) grūdus (vidutiniškai 8 %). Tuo tarpu tiriant labiausiai *F. graminearum* užkrėstus ($1,4 \times 10^7$ KSV) grūdus CO₂ pokytis buvo mažesnis ir sudarė vidutiniškai 4,5 %. Be to, išryškėjo skirtingų PRB padermių detoksikacijos savitumai. Didžiausiu mikrofloros kvėpavimo efektyvumą mažinančiu poveikiu pasižymėjo *P. pentosaceus* fermentuoti produktai, kurie lėtino CO₂ susidarymą laikant tiek *F. graminearum*, tiek ir *F. culmorum* užkrėstus grūdus (išskyrus didžiausio *F. graminearum* grūdų užterštumo ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginį). *P. acidilactici* bioproductai labiausiai lėtino CO₂ susidarymą, laikant didžiausio *F. graminearum* grūdų užterštumo mėginį (vidutiniškai 8 %). Tuo tarpu tiriant laikomus mažesnio *F. graminearum* užterštumo grūdus ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $6,0 \times 10^6$ KSV) tokio efektyvaus veikimo nebuvo

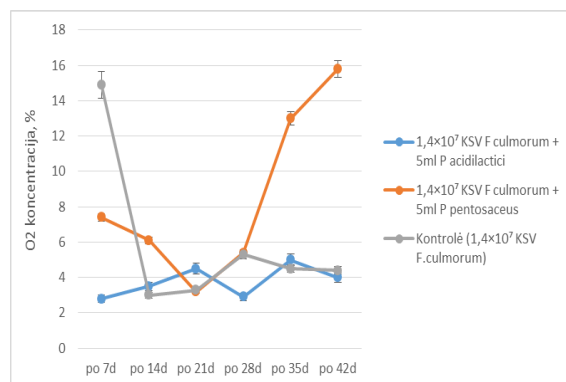
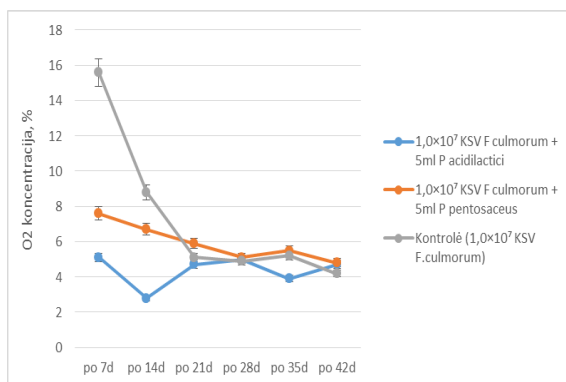
fiksuota. Tokiu būdu, laikant skirtingo užterštumo laipsnio kviečių grūdus nebuvo stebima vienareikšmė CO₂ koncentracijų mažėjimo tendencija.

Deguonies koncentracijų tyrimų rezultatai laikomuose grūduose (30 pav.) patvirtina, kad grūdų apdorojimas PRB bioproductais turi tendenciją lėtinti kvėpavimo procesą ir ji išryškėja po 14-21 dienos laikymo. Tai gali turėti įtakos ir grūdų gedimo procesui, o tuo pačiu ir SM nuostolių pokyčiams.



29 pav. *F. graminearum* (A; B) ir *F. culmorum* (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių CO₂ koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu

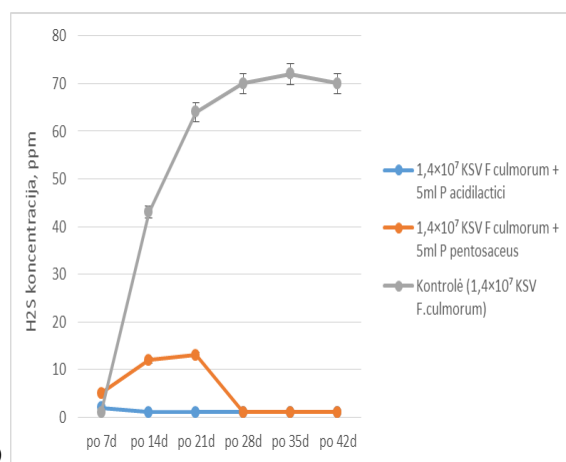
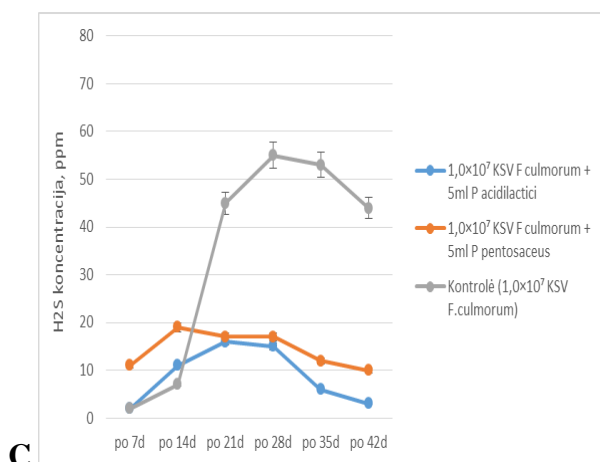
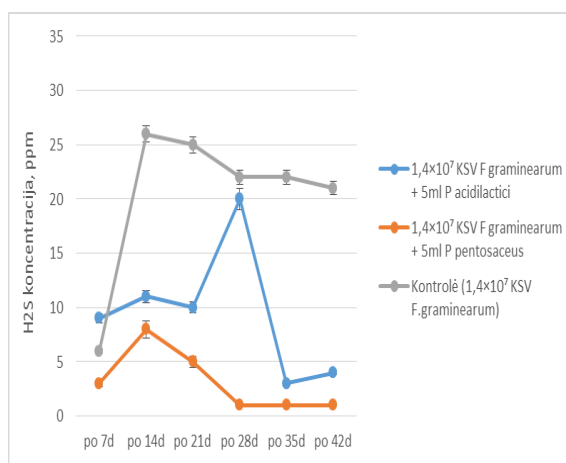
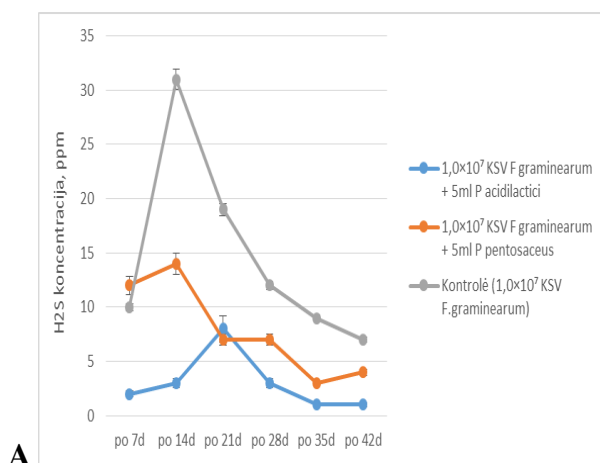




30 pav. *F. graminearum* (A; B) ir *F. culmorium* (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių O₂ koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu

3.7.2. H₂S dujų susidarymo pokyčiai

Šiame skyriuje tirti H₂S koncentracijų pokyčiai užkrėstų skirtingais *Fusarium* spp. grybais ir apdorotų pieno rūgšties bakterijomis (PRB) kviečių grūdų laikymo metu. Iš pateiktų (31 pav.) rezultatų matyti, kad visais atvejais, mažesnės H₂S koncentracijos susidaro PRB bioproduktais (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotuose grūdų modelinėse sistemose, lyginant su kontroliniais mėginiais (neapdorotais PRB bioproduktu).



31 pav. *F. graminearum* (A; B) ir *F. culmorium* (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių H₂S koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu

Didžiausią įtaką grūdų bioapdorėjimas darė *F. culmorum* užkrėstiems grūdų mėginiams, laikymo metu susidarančio H₂S koncentracijos sumažėjo vidutiniškai 66,3 % tiriant vidutinio užkrėstumo mėginius (1,0×10⁷ KSV; C) ir vidutiniškai 93,75 % - didžiausio užterštumo mėginius (1,4×10⁷ KSV; D). *F. graminearum* užterštuose grūdų mėginiuose H₂S koncentracijos taip pat mažėjo ir pokytis sudarė: vidutinio užterštumo (1,0×10⁷ KSV; A) vasarinių kviečių mėginiuose 63,07 %, didžiausio užterštumo (1,4×10⁷ KSV; B) grūdų mėginiuose – 68,85 %.

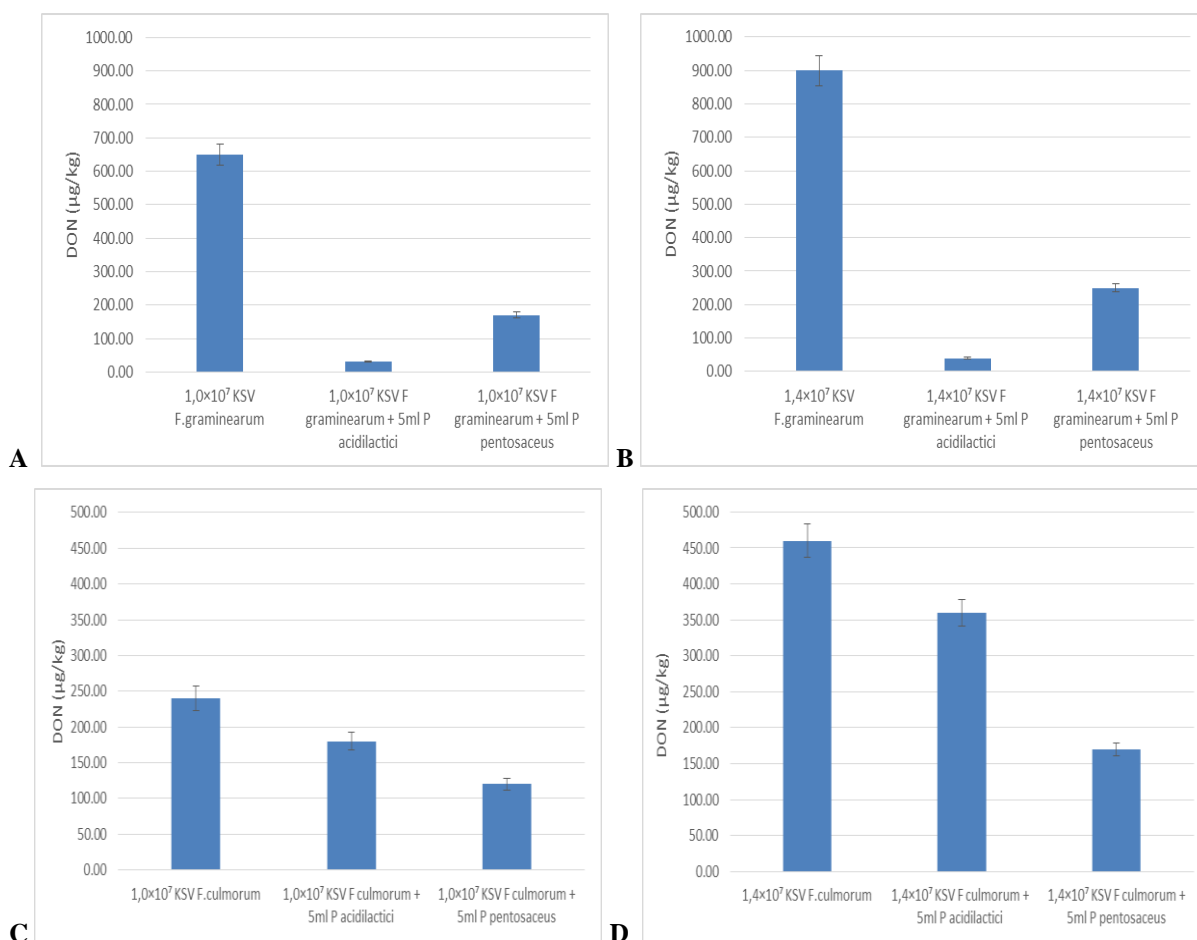
Didžiausią poveikį *F. culmorum* užkrėstiems grūdų mėginiams darė *P. acidilactici* bioproduktai (31 pav C ir D). Eksperimento metu, šiuo bioproduktų apdorotuose vidutinio (1,0×10⁷ KSV) ir didžiausio (1,4×10⁷ KSV) užkrėstumo laipsnio kviečių grūdų modelinėse sistemose H₂S susidarė, atitinkamai 74,27 % ir 97,81 % (53 ppm ir 7 ppm) mažiau nei neapdorotose modelinėse sistemose (206 ppm ir 320 ppm).

P. pentosaceus bioprodukto įtaka *F. culmorum* užkrėstiems grūdams buvo panaši, tačiau ne tokia efektyvi lyginant su *P. acidilactici* bioproduktu. Vidutinio ir didžiausio *Fusarium* spp. užkrėstumo mėginiuose (1,0×10⁷ KSV ir 1,4×10⁷ KSV) buvo užfiksuotos, atitinkamai 58,25 % ir 89,69 % (86 ppm ir 33 ppm) mažesnės H₂S vertės, lyginant su kontroliniais mėginiais – neapdorotais šiuo PRB bioproduktu (206 ppm ir 320 ppm).

F. graminearum užterštuose grūdų modelinėse sistemose buvo stebima nevienareikšmė H₂S koncentracijos kitimo priklausomybė nuo PRB padermės, naudotos bioprodukto ruošimui. Stebėta tendencija, kad vidutinio užterštumo (1,0×10⁷ KSV) mėginiuose efektyvesnis buvo *P. acidilactici* bioprodukto veikimas, kuriuose viso grūdų laikymo metu susidaręs H₂S kiekis buvo 79,55 % mažesnis, lyginant su kontrole (neapdorotais bioproduktu grūdais). H₂S koncentracijos pokytis, lyginant su kontrole, *P. pentosaceus* bioproduktu apdorotuose mėginiuose nustatytas 46,59 % mažesnis. Pastebėta, kad didžiausio užterštumo (1,4×10⁷ KSV) *F. graminearum* užkrėstuose grūdų mėginiuose aktyviau veikė *P. pentosaceus* bioproduktas nei *P. acidilactici*. Tiriant juos, nustatyti, lyginant su kontrole, 84,42 % mažesni H₂S pokyčiai nei naudojant grūdų apdorėjimui *P. acidilactici* bioproduktą (53,28 %).

3.8. Bioprodukto ruošimui naudotos pieno rūgšties bakterijos padermės įtaka DON susidarymui grūduose laikymo metu

Šiame skyriuje tirta naudotos bioproduktų fermentacijai pieno rūgšties bakterijų (PRB) padermės įtaka DON susidarymui vasariniuose kviečių grūdų laikymo metu. Eksperimento metu užkrėstuose grūduose tradiciniu ELISA metodu buvo įvertintos DON koncentracijos po 42 dienų grūdinės žaliavos laikymo. Pateiktuose tyrimo rezultatuose (32 pav.) stebimi ryšiai tarp DON koncentracijos pokyčių ir bioproduktų ruošimui naudotos PRB padermės.



32 pav. *F. graminearum* (A; B) ir *F. culmorum* (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių DON koncentracijų pokyčiai grūdų laikymo metu

Visais atvejais buvo stebimas DON koncentracijos mažėjimas PRB bioproduktais apdorotuose mėginiuose. *F. culmorum* užkrėstuose ir PRB bioproduktais apdorotose vidutinio užterštumo ($1,0 \times 10^7$ KSV) modelinėse sistemose DON koncentracija sumažėjo vidutiniškai 37,5 %, didžiausio užterštumo ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginiuose – 42,4 %. Tuo tarpu *F. graminearum* užkrėstuose ir PRB apdorotuose vidutinio užterštumo ($1,0 \times 10^7$ KSV) mėginiuose DON koncentracijos sumažėjimas sudarė 84,7 %, didžiausio užterštumo ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginiuose – 83,9 %.

Didžiausią poveikį *F. culmorum* užterštiems kviečių grūdams darė *P. pentosaceus* PRB bioproduktai, fiksuota DON koncentracija po 42 dienų laikymo, lyginant su kontrole (neužkrėstu *Fusarium* spp. grūdų mėginiu), sumažėjo vidutiniškai 56,5 %. Vidutinio užkrėstumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV) nustatytas 50 % DON koncentracijos sumažėjimas, didžiausio užkrėstumo mėginiuose ($1,4 \times 10^7$ KSV) – 63 %. *P. acidilactici* bioprodukto įtaka *F. culmorum* užkrėstiems grūdams buvo panaši, tačiau ne tokia efektyvi, lyginant su *P. pentosaceus* bioproduktu. Vidutinio ir didžiausio *Fusarium* spp. užkrėstumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $1,4 \times 10^7$ KSV) buvo užfiksuotos, atitinkamai 25 % ir 21,74 % (180 µg/kg ir 360 µg/kg) mažesnės DON koncentracijos, lyginant su kontroliniais mėginiais, neapdorotais šiuo PRB bioproduktu (240 µg/kg ir 460 µg/kg).

F. graminearum užterštuose grūdų modelinėse sistemose buvo stebimas ryšys tarp DON koncentracijos ir PRB padermės, naudotos bioproducto ruošimui. Didžiausiu poveikiu pasižymėjo *P. acidilactici*. Šiuo bioproductu apdorotuose kviečių grūdų mėginiuose po 42 dienų nustatytos vidutiniškai 95,47 % mažesnės DON koncentracijų vertės nei kontroliniuose mėginiuose. Vidutinio užterštumo mėginiuose fiksuotas 95,38 % DON koncentracijos sumažėjimas, o didžiausio užterštumo – 95,56 % (atitinkamai, 30 µg/kg ir 40 µg/kg). *P. pentosaceus* bioproductų poveikis DON sumažėjimui buvo mažesnis. Vidutinio ir didžiausio *Fusarium* spp. užkrėstumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV ir $1,4 \times 10^7$ KSV) buvo užfiksuotos, atitinkamai 73,85 % ir 72,22 % (170 µg/kg ir 250 µg/kg) mažesnės DON koncentracijų vertės, lyginant su kontroliniais mėginiais, neapdorotais šiuo PRB bioproductu (650 µg/kg ir 900 µg/kg).

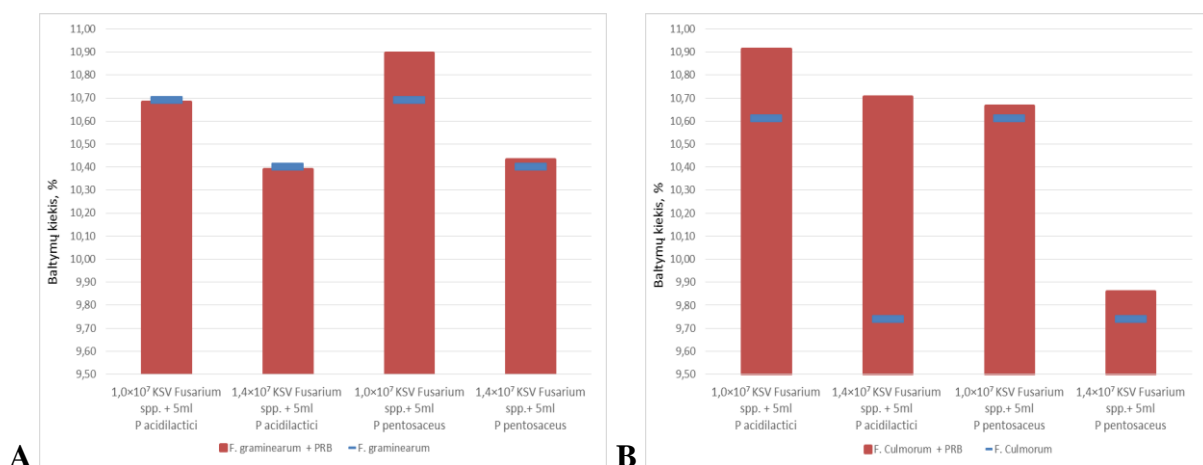
Tokiu būdu, atlikti tyrimai įrodo detoksikuojantį tirtų bioproductų poveikį. Jų gamybai reiktų parinkti didžiausiu antigrybiniu poveikiu pasižyminčias PRB ar jų kombinacijas.

3.9. Baltymų pokyčiai PRB bioproductais apdorotuose laikomuose kviečių grūduose

Šame skyriuje pateikti baltymų kiekio pokyčiai, tirti *Fusarium* spp. mikroskopiniais grybais (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) užkrėstose laikomų vasarinių kviečių modelinėse sistemose, kurios buvo apdorotos bioproductais, ruoštais su įvairiomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pediococcus*) (33 pav.).

Visais atvejais fiksuota teigiama bioproductų įtaka baltymų nuostolių mažinimui, išskyrus grūdų mėginį, ruošą su *F. graminearum* ir *P. acidilactici* kombinacija. Pastaruoju atveju baltymų nuostoliai buvo tokie patys, kaip ir kontroliniuose mėginiuose (neapdorotuose PRB).

Stebima priklausomybė tarp baltymų kiekio mažėjimo ir vasarinių kviečių mėginių apdorėjimui panaudotos PRB padermės, bioproducto ruošimui.



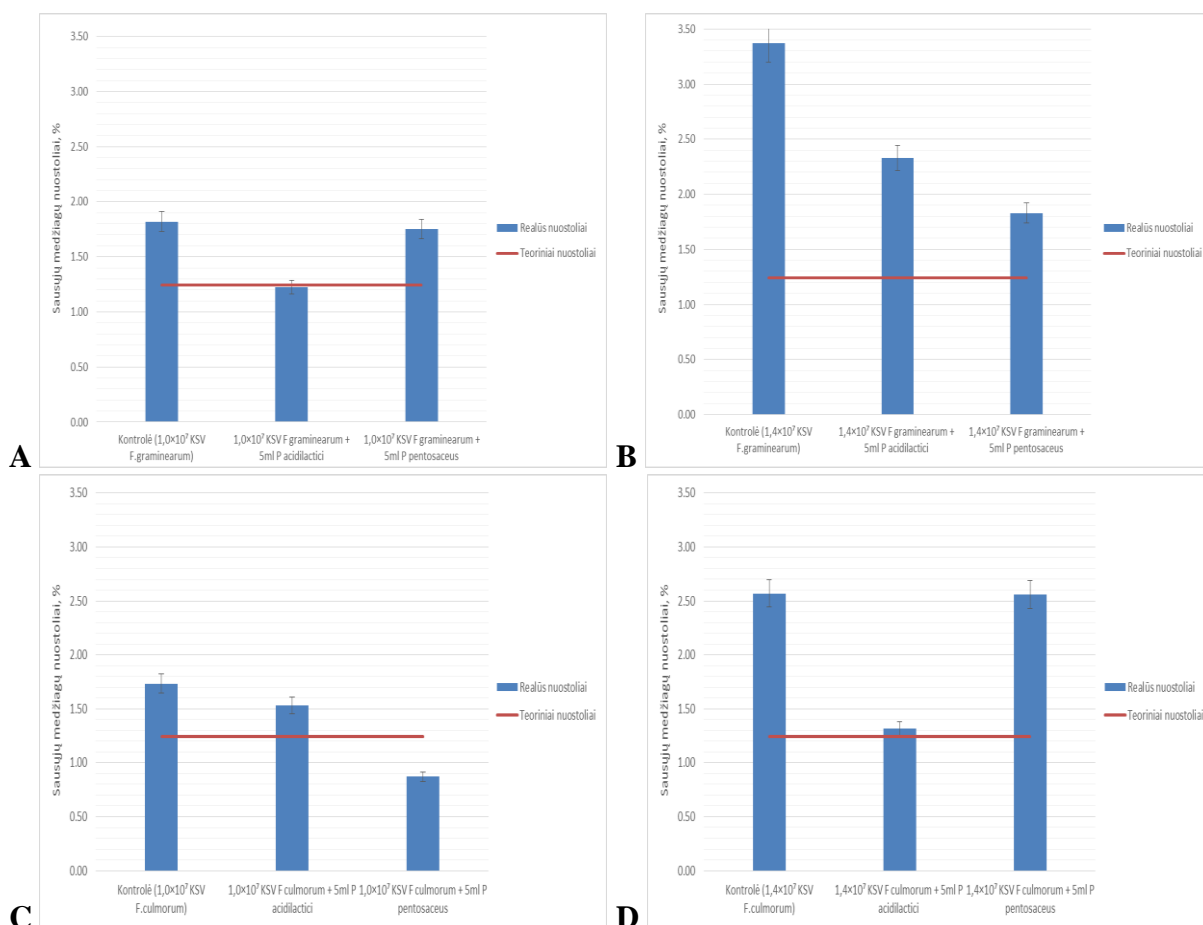
33 pav. *F. graminearum* (A) ir *F. culmorum* (B) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių baltymų kiekio pokyčiai grūduose po 42 dienų laikymo

Didžiausią teigiamą poveikį *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užterštų vasarinių kviečių baltymų nuostoliams darė *P. acidilactici* bioproduktai. Didžiausio užterštumo mėginiuose ($1,4 \times 10^7$ KSV) baltymų nuostoliai sumažėjo 7,80 %, vidutinio užterštumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV) – 2,41 %. *P. pentosaceus* PRB apdorotuose ir *F. culmorum* užterštuose mėginiuose taip pat fiksuotas nedidelis baltymų nuostolių mažėjimas: didžiausio užterštumo mėginiuose ($1,4 \times 10^7$ KSV) baltymų nuostoliai, lyginant su kontrole (neapdorotais bioproduktu grūdų mėginiais), buvo 0,96 % mažesni, vidutinio užterštumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV) – 0,48 %.

Kito grūdų užterštumo atveju (*F. graminearum* užterštų kviečių grūduose) baltymų nuostoliams didžiausią įtaką darė *P. pentosaceus* bioproduktai. Didžiausio užterštumo mėginiuose ($1,4 \times 10^7$ KSV) baltymų nuostoliai sumažėjo, lyginant su kontrole, 0,24 %, vidutinio užterštumo mėginiuose ($1,0 \times 10^7$ KSV) – 1,69 %.

3.10. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų įtaka *Fusarium* spp. užkrėstų kviečių grūdų sausųjų medžiagų nuostoliams

Eksperimento metu tirta PRB bioproduktų įtaka sausųjų medžiagų nuostoliams *Fusarium* spp. užkrėstoje laikomoje grūdinėje žaliavoje. Rezultatai, užfiksuoti po 42 dienų laikymo, buvo palyginti su SM rezultatais prieš laikymą ir taip pat buvo apskaičiuoti SM nuostoliai (34 pav.).

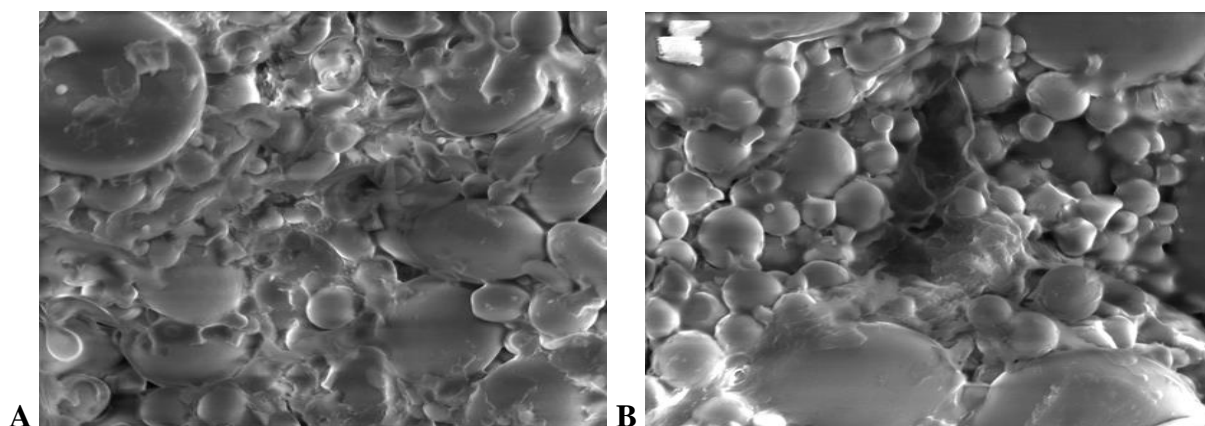


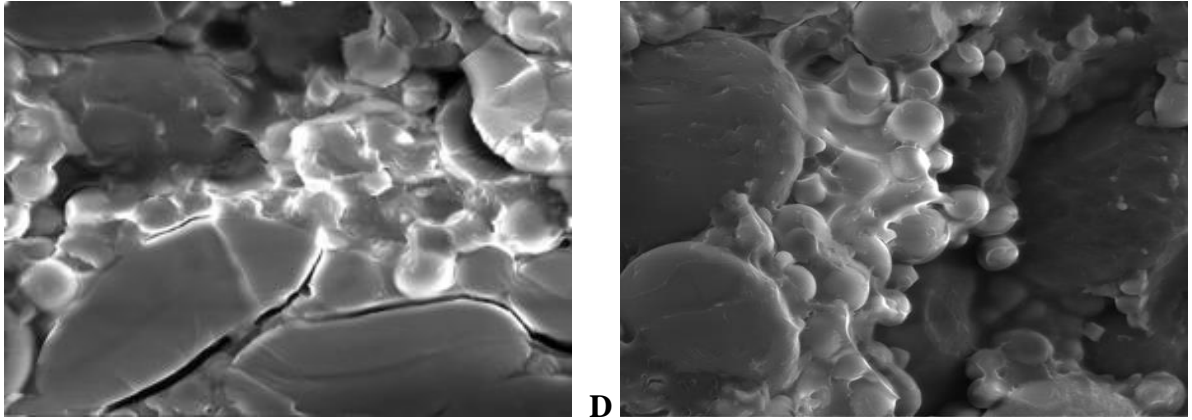
34 pav. *F. graminearum* (A; B) ir *F. culmorum* (C; D) mikroskopiniais grybais užterštų ir skirtingomis PRB apdorotų vasarinių kviečių SM pokyčiai po 42 dienų laikymo

Tyrimų rezultatai rodo efektyvų PRB produktų poveikį laikomų vasarinių kviečių grūdų SM nuostolių mažinimui. Vienareikšmės PRB padermės įtakos šio parametro vertėms nepastebėta. Vidutinio *F. graminearum* užterštumo laipsnio ($1,0 \times 10^7$ KSV) vasarinių kviečių grūdų modelinėse sistemose mažesni SM nuostoliai (1,22 %) nustatyti *P. acidilactici* bioproduktais apdorotuose mėginiuose, lyginant su apdorotais *P. pentosaceus* bioproduktais (1,75 %). Kontrolinio mėginio (neapdoroto PRB bioproduktais) laikymo metu fiksuoti SM nuostoliai sudarė 1,82 %. Tuo tarpu didžiausio užterštumo laipsnio ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginiuose SM nuostoliams didesnę įtaką turėjo *P. pentosaceus* bioproduktai, jais apdorotose modelinėse sistemose užfiksuoti 1,83 % SM nuostoliai. *P. acidilactici* bioproduktais apdorotuose mėginiuose nustatyti 1,3 karto didesni SM nuostoliai (2,33 %), lyginant su *P. pentosaceus* bioproduktais apdorotų mėginių SM nuostoliais. Abiem atvejais nuostoliai yra vidutiniškai 31 % ir 46 % mažesni, lyginant su kontroliniais mėginiais, neapdorotais PRB bioproduktais (3,37 %).

Vidutinio *F. culmorum* užterštumo laipsnio ($1,0 \times 10^7$ KSV) laikomuose kviečių grūduose mažesni SM nuostoliai (0,87 %) nustatyti *P. pentosaceus* bioproduktais apdorotuose mėginiuose, lyginant su apdorotais *P. acidilactici* bioproduktais (1,53 %); tai sudaro, atitinkamai, 50 % ir 12 % mažiau, lyginant su eksperimento metu fiksuotais nuostoliais kontrolinių mėginių (neapdorotų PRB) analizės metu (1,74 %). Didžiausio užterštumo laipsnio ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginiuose SM nuostoliams didesnę įtaką darė *P. acidilactici* bioproduktai. Jais apdorotuose mėginiuose nustatyti SM nuostoliai nustatyti beveik 2 kartus mažesni (1,32 %) nei kontroliniuose mėginiuose (2,57 %). *P. pentosaceus* bioproduktai didžiausio *F. culmorum* užterštumo laipsnio ($1,4 \times 10^7$ KSV) mėginių laikymo metu SM nuostoliams įtakos beveik neturėjo. Jie buvo panašūs nustatytiems kontrolinių grūdų mėginių laikymo metu (2,57 %).

Papildomai atlikta PRB apdorotų užkrėstų grūdų, po 42 dienų laikymo, struktūros analizė. Aukštos skiriamosios gebos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu buvo padarytos grūdų nuotraukos (didinimas 20 μm). Iš 35 pav matyti, kad abejais atvejais vasariniuose kviečių grūduose po bioapdoravimo krakmolo grūdelių struktūra juos supanti baltymų matrica buvo mažiau pakitusi, lyginant su PRB neapdorotais grūdais.





35 pav. *F. culmorum* (A) ir *F. graminearum* (C) mikroskopiniu grybu užkrėstų ir PRB apdorotų (C; D) vasarinių kviečių mikroskopinės (20 μm) nuotraukos, po 42 dienų laikymo

Apibendrinant galima pažymėti, kad visais atvejais PRB bioproduktai mažino sausųjų medžiagų nuostolius (lyginant su kontrole) laikomuose grūduose ir prisidėjo prie sveikos grūdo sandaros išlaikymo, todėl gali būti efektyvūs, kaip technologinė priemonė jų taršos mažinimui.

IŠVADOS

- I. Įvertinus DON koncentracijas akustiniu metodu, o taip pat ELISA metodu skirtingais *Fusarium* spp. (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) mikroskopiniais grybais užkrėstose laikomose vasarinių kviečių grūdų modelinėse sistemose, nustatyta:
 1. Optimalus akustinių bangų dažnis grūdų analizei, įvertinus nuokrypių vertes, paklaidas ir variacijos koeficientus, yra 27 kHz.
 2. Tarp akustiniu metodu tirto parametro (praėjusių per grūdų mėginius akustinio signalo amplitudės) ir DON koncentracijos, tirtos ELISA metodu, yra stiprus atvirkštinis tiesinis ryšys ($R^2 = 0,9017$).
 3. Akustiniu metodu nustatyti DON koncentracijų skirtumai lyginant su ELISA metodu sudarė vidutiniškai 6,3 %. Tokiu būdu, akustinis metodas gali būti naudojamas, kaip alternatyva ELISA metodui DON koncentracijos grūduose įvertinimui.
- II. Išanalizavus dujų (CO_2 , O_2 ir H_2S) pokyčių kinetiką, DON susidarymą ir baltymų bei kt. sausųjų žaliavų nuostolius modelinių vasarinių kviečių grūdų sistemų laikymų metu, keičiant užkrėsto *Fusarium* spp. rūšį (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) ir laipsnį, nustatyta:
 1. CO_2 pokyčio dinamika priklauso nuo mikroskopinio grybo rūšies ir grūdų užkrėstumo laipsnio. Maksimalios CO_2 koncentracijų vertės fiksuotos po 14 dienų užkrėstų grūdų laikymo (22,61 % - *F. graminearum*; 19,17 % - *F. culmorum*). *F. graminearum* mikroskopinis grybas, sprendžiant pagal vidutiniškai 20,8 % didesnę CO_2 susidarymo intensyvumą nei *F. culmorum*, turėjo didesnę įtaką grūdų kvėpavimo intensyvumui.
 2. O_2 pokyčių analizė rodo, kad *F. graminearum*, lyginant su *F. culmorum*, greičiau adaptavosi grūdinėje sistemoje. Po 7 dienų grūdų laikymo *F. graminearum* užkrėstuose grūdų mėginiuose O_2 koncentracija sumažėjo vidutiniškai 16,87 %, kai *F. culmorum* modelinėse grūdų sistemose O_2 koncentracijos pokytis buvo 3 kartus mažesnis (sudarė vidutiniškai 5,60 %).
 3. H_2S pokyčiams didžiausią įtaką turėjo grūdų užkrėstumo laipsnis. Stebėtas ryšys ($R^2=0,9760$) tarp H_2S susidarymo ir baltymų nuostolių grūdų laikymo metu (*F. culmorum* atveju).
 4. Sausųjų medžiagų nuostoliams grūdų laikymo metu didesnę įtaką turėjo *F. graminearum* nei *F. culmorum*. Nustatyti SM nuostoliai *F. graminearum* užkrėstose vasarinių kviečių modelinėse sistemose po 42 dienų laikymo buvo vidutiniškai 15,9 % didesni, lyginant su *F. culmorum*.

5. Visais atvejais stipri tiesinė priklausomybė nustatyta tarp *F. graminearum* ir *F. culmorum* užkrėstumo laipsnio ir susidarančio vasarinių kviečių grūduose DON kiekio ($R^2 = 0,9717$; $R^2 = 0,9165$, atitinkamai).

III. Vertinant PRB bioproduktų apdoravimo įtaką *Fusarium* spp. (*F. culmorum* ir *F. graminearum*) mikroskopiniais grybais užterštų vasarinių kviečių modelinių sistemų pokyčiams laikymo metu, nustatyta:

1. *Fusarium* spp. užterštų vasarinių kviečių grūdų apdorojimas PRB bioproduktais mažino, CO₂ susidarymą laikymo proceso metu. Didžiausiu mikrofloros kvėpavimo efektyvumą mažinančiu poveikiu pasižymėjo *P. pentosaceus* fermentuoti produktai, kurie lėtino CO₂ susidarymą, laikant tiek *F. graminearum*, tiek ir *F. culmorum* užkrėstus grūdus (vidutiniškai 5 % mažiau, lyginant su kontroliniu mėginiu).
2. PRB bioproduktais (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotuose grūdų modelinėse sistemose nustatyti mažesni H₂S koncentracijos pokyčiai. Didžiausią poveikį *F. culmorum* užkrėstiems grūdų mėginiams darė *P. acidilactici* bioproduktas (susidarė vidutiniškai 86,04 % mažiau H₂S, lyginant su kontrole).
3. Apdorojimas bioproduktais mažino baltymų ir sausųjų medžiagų nuostolius grūdų laikymo metu. *F. culmorum* užkrėstuose grūduose didžiausią baltymų nuostolius mažinantį poveikį turėjo *P. acidilactici* bioproduktas (baltymų nuostoliai sumažėjo vidutiniškai 5,1 %). *F. graminearum* užkrėstas modelines sistemas efektyviausiai veikė *P. pentosaceus* bioproduktai (nustatyti vidutiniškai 0,97 % mažesni baltymų nuostoliai).
4. Visais atvejais buvo stebimas DON koncentracijos mažėjimas PRB bioproduktais apdorotuose mėginiuose. Didžiausią poveikį *F. culmorum* užterštiems kviečių grūdams darė *P. pentosaceus* bioproduktai (DON koncentracija sumažėjo vidutiniškai 56,5 %, lyginant su kontrole). *F. graminearum* užterštuose grūdų modelinėms sistemoms didžiausią poveikį turėjo *P. acidilactici* bioproduktas (DON koncentracija lyginant su kontrole sumažėjo vidutiniškai 95,47 %).

LITERATŪRA

1. Abdullah, N., Nawawi, A., Othman, I. (2000). Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (aw). *Journal of Stored Products Research*, Vol. 36, No. 1, (January 2000), p. 47-54.
2. Alexander, N.J.; Hohn, T.M.; McCormick, S.P. The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, p. 64, 221–225.
3. Alexander, N.J.; McCormick, S.P.; Waalwijk, C.; van der Lee, T.; Proctor, R.H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 2011, p. 48, 485–495.
4. Al-Yahya, S. A. (2001). Effect of storage conditions on germination in wheat. *Journal of Agronomy & Crop Science*, Vol. 186, No. 4, (June 2001), p. 273-279.
5. Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects*, 2nd edition, Revised and Expanded. Edited by S.Salminen and A. von Right, p. 1-72.
6. Blesa J, Soriano JM, Molto JC, Manes J (2004) Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *J. Chromatogr. A.* 1054, p. 397-401.
7. Bolognani F, Rumney CJ, Rowland IR (1997) Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vitro mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.* 35, p. 535-545.
8. Bottalico, A.; Perrone, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 2002, p. 108, 611–624.
9. Brady D, Stoll A D, Strake L, Dunkan J R (1994) Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 44, p. 297-302.
10. Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C (2003) Histology and physiology of *Fusarium* head blight. In KJ Leonard, WR Bushnell, eds, *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS Press, St. Paul, MN, p. 44–83.
11. C. Pronyk, W.E. Muir, N.D.G. White, D. Abramson. Carbon dioxide production and deterioration of stored canola. *Canadian Biosystems Engineering*, 46 (2004), p. 325–333.
12. CAB International. (2003). *Gibberella zeae* (Schwein.) CPC Datasheet [online]. Crop protection compendium. Wallingford, Oxford, United Kingdom: CABI Publishing, CAB International. <http://www.cabi.org/cpc/> [žiūrēta: 2014 kovo 28d.].

13. D. Singh, W.E. Muir, R.N. Sinha. Finite element modeling of carbon dioxide diffusion in stored wheat. *Canadian Biosystems Engineering*, 25 (1983), p. 149–152.
14. D.E. Maier, R. Hulasare, P. Armstrong. Monitoring carbon dioxide levels for early detection of spoilage and pests in stored grain. L. Lorini (Ed.), et al., *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*, 15–18 October 2006, Campinas, Brazil, Brazilian Post-harvest Association-ABRAPOS, Passo Fundo, Brazil (2006), p. 1174–1181.
15. D.J.P. Moog, R.L. Stroshine, L.M. Seitz. Fungal susceptibility at four temperature-moisture combinations and carbon dioxide kit color reader evaluation. *Cereal Chemistry*, 87 (2010), p. 182–189.
16. De Muynck, C., Leroy, I.J.a., De Maeseeneire, S., Arnaut, F., Soetnaert, W. And Vandamme, E.J. 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research* 159, p. 339-346.
17. Eifler, J., Martinelli, E., Santonico, M., Capuano, R., Schild, D. and Di Natale, C.(2011) Differential detection of potentially hazardous *Fusarium* species in wheat grains by an electronic nose. *PLoS ONE*, p. 6.
18. Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AA, Tester RF (2004) Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit. Contam.* 21, p. 592-597.
19. Farshadfar, E.; Ghasempour, H.; Vaezi, H. Molecular aspects of drought tolerance in bread wheat (*T. aestivum*). *Pakistan J. Biol. Sci.* 2008, p. 11, 118–122.
20. Fleurat-Lessard, F. (2002). Review. Qualitative reasoning and integrated management of the quality of stored grain: a promising new approach. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 38, No. 3, p. 191-218.
21. Frisvad, J. C. (1995). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. In: *Stored-grain Ecosystems*, D. S. Jayas, N. D. G. White, W. E. Muir, (Eds.), p. 251-288.
22. Garda J, Macedo RM, Faria R, Bernd L, Dors GC, Badiale-Furlong RE (2005) Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichotecenes. *Food Control*. 16, p. 423-428.
23. Gargouri, S., Bernier, L., Hajlaoui, M.R. and Marrakchi, M. (2003) Genetic variability and population structure of the wheat foot rot fungus, *Fusarium culmorum*, in Tunisia. *Eur. J. Plant Pathol*, p. 109, 807–815.
24. Gilbert, J. and Tekauz, A. (2000). Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, p. 1–8.
25. Gonzalez, C.F. and BS Kunka. 1986. Evidence for plasmid linkage of raffinose utilization and associated α -galactosidase and sucrose hydrolase activity in *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, p. 105-109.

26. Goswami, R.S. and Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, p. 515–525.
27. Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA (2002) Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt. *Food Addit. Contam.* 19, p. 1043-1050
28. Graham, D.C. and L.L. McKay. 1985. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, p. 532-534.
29. Guo M., Shang Z., Shi H., 2005. Sound absorption measurements of various types of grain. *Acta Acustica united with Acustica* 91, p. 915–919.
30. H.B. Gonzales, P.R. Armstrong, R.G. Maghirang. Simultaneous monitoring of stored grain with relative humidity, temperature, and carbon dioxide sensors. *Applied Engineering in Agriculture*, 25 (2009), p. 275–289
31. Halász A, Lásztity R, Abonyi T, Bata A (2009) Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Rev. Int.* 25, p. 284–298.
32. Hall, C. W., Dean, P. E. (1978). Storage and preservation of cereal grains. In: *Cereals 78: better nutrition for the world's millions*, Y. Pomeranz, (Ed.), p. 223-243.
33. Harris LJ, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P, Butler B, Young JC, Weston G, Proctor RH, Hohn TM (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Dis* 83, p. 954–960.
34. Hickling R., Wei W., 1995. Sound transmission in stored grain. *Applied Acoustics* 45, p. 1–8.
35. Hohn, T.M.; Beremand, P.D. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 1989, p. 79, 131–138.
36. Hohn, T.M.; Desjardins, A.E.; McCormick, S.P. The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1995, p. 95–102
37. Hohn, T.M.; VanMiddlesworth, F. Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase. trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, p. 756–761.
38. Homdork, S., Fehrmann, H. and Beck, R. (2000) Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. *J. Phytopathol*, p. 7–15.
39. Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122, p. 179-188.
40. Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichothecene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, p. 16892–16897

41. Jespersen L (2003) Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3 ,p. 191-200.
42. K.E. Ileleji, D.E. Maier, C. Bhat, C.P. Woloshuk. Detection of a developing hot spot in stored corn with a CO₂ sensor. *Applied Engineering in Agriculture*, 22 (2006), p. 275–289.
43. Kaleta, A., Górnicki, K. (2011). Databases on physical properties of plant and agricultural products. In: *Encyclopedia of Agrophysics*, J. Gliński, J. Horabik, J. Lipiec, (Eds.), p. 189-194.
44. Kang, Z. and Buchenauer, H. (2002) Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, p. 653–660.
45. Karlovsky P (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat. Toxins.* 7, p. 1-23.
46. Kreyger, J. 1972. Drying and storing grains, seeds and pulses in temperate climates. Institute for Storage and processing of Agricultural Products, Bulletin, p. 205.
47. Kulmyrzaev A., Cancelliere C. and McClements D.J., 2000. Characterization of aerated foods using ultrasonic reflectance spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 4 , p. 235–241
48. Kunigelis V., Senulis M., 2002. Acoustic investigation of air-filled porous materials. *Acta Acustica United with Acustica* 88, p. 14–18.
49. Laca, A., Mousia, Z., Diaz, M., Webb, C., Pandiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, Vol. 72, No. 4, (February 2006), p. 332-338.
50. Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M. and Jimenez, M. (2004) Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int. J. Food Microbiol.* 94, p. 43–54.
51. Martin, S., Homedes, V., Sanchis, V., Ramos, A. J., Magan, N. (1999). Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 35, No. 1, (January 1999), p. 15-26.
52. Mason, L. J., Rulon, R. A., Maier, D. E. (1997). Chilled versus ambient aeration and fumigation of stored popcorn. Part 2: Pest management. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 33, No. 1, (January 1997), p. 51-58.
53. Masteikienė, R.R. 2002. Maisto produktų mikrobiologija. Vadovėlis. 1 knyga, p. 261-278.
54. Mathre, D.E. (1997). *Compendium of Barley Diseases*. 2nd Edition. APS Press, St. Paul, MN., p. 90.

55. McCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Proctor, R.H. Fusarium Tri4 encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* 2006, 52, p. 636–642.
56. McCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Proctor, R.H. Heterologous expression of two trichothecene P450 genes in *Fusarium verticillioides*. *Can. J. Microbiol.* 2006, 52, p. 220–226.
57. McCormick, S.P.; Harris, L.J.; Alexander, N.J.; Ouellet, T.; Saparno, A.; Allard, S.; Desjardins, A.E. Tri1 in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, p. 2044–2051.
58. Minervini, F., Fornelli, F. and Flynn, K.M. (2004) Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythro leukemia cell line. *Toxicol. Vitro* 18, p. 21–28.
59. Moreno-Aribas MV, Polo MC (2010) Wine Chemistry and Biochemistry. In: Magan N, Olsen M, editors. *Mycotoxins in food Detection and control: Biological decontamination of mycotoxins*. New York: Springer, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press: LLC., p. 2006-2211.
60. Niderkorn V, Boudra H, Morgavi DP (2006) Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Appl. Environ. Microb.* 101, p. 849-856.
61. Odhav B, Naicker V (2002) Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit. Contam.* 19, p. 55-61.
62. Piotrowska M, Zakowska Z (2000) The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. In: Bielecki S, Tramper J, Polak J, editors. *Progress in Biotechnology (Food Biotechnology)*. Vol. 17. Amsterdam: Elsevier, p. 307-310.
63. Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a triHarris LJ, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P, Butler B, Young JC, Weston G, Proctor RH, Hohn TM (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Dis* 83: 954–960
 thothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact* 8, p. 593–601.
64. Reddy KRN, Salleh B, Saad B, Abbas HK, Abel CA, Sheir WT (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev.* 29, p. 3-26.
65. Santos A, Marquina D, Leal JA, Peinado JM (2000) (1-6)- β -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl. Environ. Microb.* 66, p. 1809-1813.
66. Scientific Committee on Food, (SCF), 1999. Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON)
67. SEIB, P.A., PFOST, A SUKABDI, V.G. RAO and R. BURROUGHS. 1980. Spoilage of Rough Rice Measured by Evolution of Carbon Dioxide. *Proceedings of Grain Post-Harvest Workshop*. Kuala Lumpur, Malaysia. p. 75-94.

68. Simpson W.J. and H. Taguchi. 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*, p. 125-172.
69. Srour, S. (1988). Thermic properties of grains-production of heat and CO₂, In: *Preservation and Storage of Grains, Seeds and their By-Products*, J. L. Multon, (Ed.), p. 189-202.
70. Stinson EE, Osman SF, Bills DD (2006) Water soluble products from patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *J. Food Sci.* 44(3), p. 788-789.
71. Thompson, T. L. (1972). Temporary storage of high-moisture shelled corn using continuous aeration. *Transactions of the ASAE*, Vol. 15, No. 2, p. 333-337.
72. Umnova O., Turo, D., 2008. Semi-empirical time domain model of sound attenuation in porous materials. *Journal of the Acoustical Society of America* 123(5), p. 3034.
73. White, N. D. G., Sinha, R. N., Muir, W. E. (1982). Intergranular carbon dioxide as an indicator of biological activity associated with the spoilage of stored wheat. *Canadian Agricultural Engineering*, Vol. 24, p. 35-42.
74. Prieiga per internetą: http://www.manoukis.lt/print_forms/print_st_z.php?s=955&z=45 [žiūrėta 2015 vasario 11d.].
75. Prieiga per internetą: <http://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/> [žiūrėta 2015 gegužės 13d.].
76. Juodeikienė G. ir kt. 2011. *Acoustic sensing of deoxynivalenol in co-occurrence with zearalenone and T-2/HT-2 toxin in winter wheat cultivar Sirvinta from Lithuania* (*World Mycotoxin Journal*, 2011, Vol. 4, p. 395-404).

PRIEDAI

1.1 lentelė. Akustinio vasarinių kviečių grūdų tyrimo rezultatai

Amplitudžių verčių vidurkis	
Mėginys	A _p
Kontrolė (15ml H ₂ O)	600
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. culmorum</i>	575
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	540
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	515
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. graminearum</i>	535
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	515
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	495
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	570
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	535
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	580
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	570
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	595
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	595
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	565
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	545

1.2 lentelė. ELISA vasarinių kviečių grūdų tyrimo rezultatai

ELISA duomenys	
Mėginys	DON (µg/kg)
Kontrolė (15ml H ₂ O)	45.00
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. culmorum</i>	150.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	240.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	460.00
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. graminearum</i>	280.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	650.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	900.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	180.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	360.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	120.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	170.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	30.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	40.00
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	170.00
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	250.00

2.1 lentelė. CO₂ koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	CO ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	2.22	3.33	6.98	6.58	5.13	3.72
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. culmorum</i>	4.37	6.96	7.83	4.88	7.39	5
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	5.1	8.36	10.52	9.62	6.96	6.2
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	4.75	19.17	18.93	15.55	13.53	11.56

2.2 lentelė. O₂ koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	O ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	12.4	7.2	8.3	5.5	6.3	5.9
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. culmorum</i>	15.4	7.6	6.3	4.88	4.1	6.5
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	15.6	8.8	5.1	4.9	5.2	4.2
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	14.9	3	3.3	5.3	4.5	4.4

2.3 lentelė. H₂S koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	H ₂ S konc., ppm					
	Po 7d	Po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	1	2	16	21	21	17
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. culmorum</i>	1	7	27	19	60	41
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	2	7	45	55	53	44
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i>	1	43	64	70	72	70

2.4 lentelė. CO₂ koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	CO ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	9.29	10.21	5.72	6.54	5.12	4.74
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. graminearum</i>	13.57	11.97	8.09	7.21	5.87	4.6
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	11.73	22.61	10.68	10.59	9.38	6.68
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	14.23	18.18	13.52	15.72	13.82	11.99

2.5 lentelė. O₂ koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	O ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	4.9	4.6	7.7	5.4	7.8	5.2
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. graminearum</i>	5.5	5.4	7.8	4.3	6.2	7.9
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	3.5	2.3	6.7	4.2	3.2	3.5
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	3.1	2.3	4.5	3.4	3.7	3.6

2.6 lentelė. H₂S koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų grūdų laikymo metu

Mėginys	H ₂ S konc., ppm					
	Po 7d	Po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
Kontrolė (15ml H ₂ O)	10	48	29	28	17	16
6,0×10 ⁶ KSV <i>F. graminearum</i>	6	96	67	81	69	57
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	10	31	19	12	9	7
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i>	6	26	25	22	22	21

3.1 lentelė. CO₂ koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	CO ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	9.82	12.56	9.29	7.67	6.67	5.19
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	13.59	11.63	9.45	9.82	7.8	7.62
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	3.66	2.63	4.05	4.39	3.54	3.4
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	6.79	7.36	8.29	5.23	4.85	5.64

3.2 lentelė. O₂ koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	O ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	5.1	2.8	4.7	5	3.9	4.7
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	2.8	3.5	4.5	2.9	5	4
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	7.6	6.7	5.9	5.1	5.5	4.8
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	7.4	6.1	3.2	5.4	13	15.8

3.3 lentelė. H₂S koncentracijos kitimas *F. culmorum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	H ₂ S konc., ppm					
	Po 7d	Po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	2	11	16	15	6	3
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	2	1	1	1	1	1
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	11	19	17	17	12	10
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. culmorum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	5	12	13	1	1	1

3.4 lentelė. CO₂ koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	CO ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	7.25	5.89	7.28	8.49	6.76	8.69
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	5.96	5.62	4.52	7.7	8.08	8.66
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	6.38	7.6	3.29	3.99	1.74	3.48
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	14.23	13.92	12.03	13.07	12.29	12.41

3.5 lentelė. O₂ koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	O ₂ konc., %					
	po 7d	po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	4.1	5.2	4.1	2.8	4.7	2.1
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	5.7	5.3	7.1	4.3	7.4	6.5
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	6	6.1	10.1	8.3	15.5	6.5
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	3.5	3.1	5.3	4.2	4.6	4

3.6 lentelė. H₂S koncentracijos kitimas *F. graminearum* mikroskopiniu grybu užkrėstų skirtingomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) apdorotų grūdų laikymo metu

Mėginys	H ₂ S konc., ppm					
	Po 7d	Po 14d	po 21d	po 28d	po 35d	po 42d
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	2	3	8	3	1	1
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. acidilactici</i>	9	11	10	20	3	4
1,0×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	12	14	7	7	3	4
1,4×10 ⁷ KSV <i>F. graminearum</i> + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	3	8	5	1	1	1

4.1 lentelė. *F. culmorum* ir *F. graminearum* mikroskopinių grybų amilolitinis aktyvumas

Pelėsinis tirpalas	I diena			II diena			III diena		
	4°C	24°C	40°C	4°C	24°C	40°C	4°C	24°C	40°C
<i>F. culmorum</i> augintas MRS terpėje, AV/g	92.55	107.41	99.98	92.55	75.22	114.84	91.73	26.52	108.24
<i>F. graminearum</i> augintas MRS terpėje, AV/g	75.22	67.79	27.34	36.42	43.03	76.87	73.57	34.77	33.95

4.2 lentelė. *F. culmorum* ir *F. graminearum* mikroskopinių grybų ksilanolitinis aktyvumas

Pelėsinis tirpalas	I diena			II diena			III diena		
	4°C	24°C	40°C	4°C	24°C	40°C	4°C	24°C	40°C
<i>F. culmorum</i> augintas MRS terpėje, AV/g	50.75	42.45	7.89	35.95	1.20	0.75	35.78	0.77	0.73
<i>F. graminearum</i> augintas MRS terpėje, AV/g	106.68	77.81	48.64	29.94	89.63	108.12	32.50	70.30	82.94

5.1 lentelė. Baltymų kiekio nustatymas skirtingo *F. culmorum* užterštumo grūduose po 42 dienų laikymo

<i>F. culmorum</i>	Kontrolė (15 ml H ₂ O)	6,0×10 ⁶ KSV <i>Fusarium</i> spp.	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp.	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp.
I masė, g	1.02	1.01	1.02	0.96
nutitruota HCl (0.1N), ml	15.22	13.48	13.12	12.12
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	2.09	1.87	1.80	1.77
Baltymų kiekis %	11.91	10.65	10.26	10.07
II masė, g	1.05	1.00	0.99	1.01
nutitruota HCl (0.1N), ml	14.96	13.33	13.58	11.91
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.99	1.87	1.92	1.65
Baltymų kiekis %	11.37	10.64	10.95	9.41
Vidurkis	11.64	10.64	10.61	9.74

5.2 lentelė. Baltymų kiekio nustatymas skirtingo *F. graminearum* užterštumo grūduose po 42 dienų laikymo

<i>F. graminearum</i>	Kontrolė (15 ml H ₂ O)	6,0×10 ⁶ KSV <i>Fusarium</i> spp.	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp.	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp.
I masė, g	0.99	1.01	1.01	1.00
nutitruota HCl (0.1N), ml	15.00	14.78	13.46	13.38
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	2.12	2.05	1.87	1.87
Baltymų kiekis %	12.09	11.68	10.63	10.68
II masė, g	1.04	0.99	0.78	1.10
nutitruota HCl (0.1N), ml	14.60	12.82	10.51	13.95
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.97	1.81	1.89	1.78
Baltymų kiekis %	11.20	10.33	10.75	10.12
Vidurkis	11.65	11.01	10.69	10.40

5.3 lentelė. Baltymų kiekio nustatymas skirtingo *F. culmorum* užterštumo, apdorotų įvairiomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*), grūduose po 42 dienų laikymo

<i>F. culmorum</i> + PRB	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. acidilactici</i>	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. acidilactici</i>	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. pentosaceus</i>
I masė, g	0.97	1.01	0.99	1.02
nutitruota HCl (0.1N), ml	13.61	12.98	13.15	13.29
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.96	1.80	1.86	1.82
Baltymų kiekis %	11.20	10.26	10.60	10.40
II masė, g	1.01	1.00	1.03	1.03
nutitruota HCl (0.1N), ml	13.45	13.98	13.85	12.03
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.86	1.96	1.88	1.64
Baltymų kiekis %	10.63	11.16	10.73	9.32
Vidurkis	10.91	10.71	10.67	9.86

5.4 lentelė. Baltymų kiekio nustatymas skirtingo *F. graminearum* užterštumo, apdorotų įvairiomis PRB padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*), grūduose po 42 dienų laikymo

<i>F. graminearum</i> + PRB	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. acidilactici</i>	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. acidilactici</i>	1,0×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. pentosaceus</i>	1,4×10 ⁷ KSV <i>Fusarium</i> spp. + 5ml <i>P. pentosaceus</i>
I masė, g	1.02	1.01	1.00	1.00
nutitruota HCl (0.1N), ml	13.16	12.79	13.08	13.13
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.81	1.77	1.83	1.84
Baltymų kiekis %	10.30	10.11	10.44	10.48
II masė, g	1.01	0.98	1.01	1.00
nutitruota HCl (0.1N), ml	14.01	13.11	14.37	13.02
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	1.94	1.87	1.99	1.82
Baltymų kiekis %	11.07	10.68	11.35	10.39
Vidurkis	10.68	10.39	10.90	10.43

5.5 lentelė. Neužkrėstų grūdų baltymų kiekio nustatymas

Prieš eksperimentą	
I masė, g	1.06
nutitruota HCl (0.1N), ml	16.11
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	2.13
Baltymų kiekis %	12.13
II masė, g	1.02
nutitruota HCl (0.1N), ml	16.30
išsiskyres azoto (N) kiekis, %	2.24
Baltymų kiekis %	12.75
Vidurkis	12.44