

(19)



(10) **LT 6458 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **6458** (51) Int. Cl. (2017.01): **G01N 27/00**
G01N 30/00
G01N 33/00
- (21) Paraiškos numeris: **2016 001**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2016-01-06**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-07-10**
- (45) Patent paskelbimo data: **2017-09-25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Vincas BŪDA, LT
Rita BUTKIENĖ, LT
Laima BLAŽYTĖ-ČEREŠKIENĖ, LT
Dalė PEČIULYTĖ, LT
Violeta APŠEGAITĖ, LT
- (73) Patent savininkas:
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS, Akademijos g. 2, LT-08412 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Grūdų užteršimo pelėsiniais grybais aptikimo būdas
- (57) Referatas:

Išradime aprašytas paprastas, greitas ir ypatingai jautrus grūdų užteršimo pelėsiniais grybais nustatymo būdas. Šis išradimas susijęs su nustatymu grūdų viršerdvėje esančio arba nesančio specifinio lakaus metabolito (biomarkerio), naudojant dujų chromatografiją, sinchronizuotą su vabzdžio elektroantenografija ir vertinant ypatingai jautrių vabzdžių rūšių antenų uoslės receptorių atsakus ties sulaikymo laiku, atitinkančiu biomarkerio sulaikymo laiką.

Technikos sritis

Grūdai dažnai gali būti užteršti juos gadinančiais pavojingais mikroorganizmais, kurie išskiria nepageidaujamus junginius taip pakeisdami grūdų skonį, todėl dauguma produktų tampa netinkami maistui. Be to šie mikroorganizmai gali gaminti toksines medžiagas, kurios kelia rimtą pavojų žmonių ir gyvulių sveikatai ir dėl grūdų netinkamumo panaudoti pagal paskirtį gali susidaryti labai dideli ekonominiai nuostoliai.

Išradimas susijęs su greitu ir jautriu grūdų užteršimo pelėsiniais grybais aptikimo būdu, paremtu pelėsinų grybų produkuojamų lakių metabolitų aptikimu, tam naudojant sinchronizuotą dujų chromatografijos ir vabzdžių elektroantenografijos metodą ir vertinant elektroantenografinį atsaką, registruojamą laiku, atitinkančiu chromatografo kolonėlėje sulaikymo laiką žinomo standarto, kuris būdingas pelėsiniais grybais užterštiems grūdams.

Technikos lygis

Užterštumui pelėsiniais grybais nustatyti naudojama daug įvairių metodų: molekuliniai, naudojant lateksinius agliutinacijos rinkinius, imunofermentinės analizės (ELISA), bioluminescensiniai metodai (patentai CN 102094080, RU 2079128 ir kt.). Gali būti naudojami ir kiti esami metodai - mikroskopavimas, grybų kultūrų auginimas ant terpių, o taip pat kai kurių grybų metabolitų, tokių kaip chitino, ergosterolio ar mikotoksinų, nustatymas naudojant chromatografiją (WO 2013/135889; US patento paraiška Nr. 2014/0356978, ir t.t.) ar Ramano spektroskopiją (*Grow A.E., Wood L.L., Claycomb J.L. et al. 2003. New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. J. Microbiol. Methods. 53: 221-233*).

JAV patente Nr. US 8,127,593 yra aprašytas pelėsinų grybelių nustatymo gyvenamose ir kitose patalpose būdas, paremtas tam tikrų lakių organinių junginių mišinio aptikimu.

Europos patente Nr. EP2568283 atskleistas mikotoksinų nustatymo aplinkoje būdas, paremtas chemine analize pagal "pirštų atspaudų" principą. Šis metodas apima visos eilės lakių organinių junginių, susijusių su mikotoksikogeneze, analizę.

Tačiau visi šie būdai ne visada tinkami naudoti, nes yra pakankamai brangūs ir užima daug laiko, skirtą vieno mėginio analizei arba reikalauja aukštos kvalifikacijos profesionalų darbo. Be to, kai kurios grūdus užkrečiančių grybų linijos negamina toksinų, todėl remiantis tiesioginiu nuodingųjų metabolitų aptikimu, būtų gaunamos klaidinančios išvados apie pelėsinų grybų buvimą/nebuvimą.

Elektroninė nosis taip pat taikyta grybų lakiems junginiams aptikti (Magan N., Evans P. 2000. *Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of Electronics nose technology for early detection of grain spoilage*. J. Stored Prod. 36: 319–340), tačiau nežiūrint didelio šio metodo jautrumo, jis nėra specifinis ir pernelyg priklausomas nuo aplinkos sąlygų.

Konkrečiai grūdų užterštumui ir kokybės kritimui nustatyti yra pasiūlyta analizuoti lakius organinius junginius (Stawicki S., Kaminski E., Niewiarowicz A. et al. 1973. *The effect of microflora on the formation of odours in grain during storage*. Annales de Technologie Agricole 22: 449–476; Kaminski E., Stawicki S., Wasowicz E. 1974. *Volatile flavour compounds produced by moulds of Aspergillus, Penicillium and fungi imperfecti*. Appl. Microbiol. 27: 1001–1004.; Abramson D., Sinha, R.N., Mills, J.T. 1980. *Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage*. Cereal Chemistry 57: 346–351).

Išanalizavus daugelį pelėsiais užterštų grūdų pavyzdžių, buvo nustatyta, kad lakųjų organinių junginių (LOJ) emisijose yra tam tikrų bendrų junginių mišinių. Kaip antai jeigu lakūs organiniai junginiai ekstrahuojami iš pelėsiais užterštų grūdų pavyzdžių ir analizuojami, juose aptinkami dideli kiekiai alkoholių, aldehidų ir ketonų (Magan N., Evans P. 2000. *Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of Electronics nose technology for early detection of grain spoilage*. J. Stored Prod. 36: 319–340).

Grūdų užterštumo grybais indikatoriais buvo pasiūlyta grupė C₇, C₈ ir C₉ lakųjų organinių junginių (JAV patentas Nr. US 4,314,027), o taip pat daugelis kitų grupių (WO 2013/135889). Šių junginių aptikimui ir analizei yra naudojami dujų chromatografijos arba dujų chromatografijos su masių spektrometrija (MS) metodai bei atitinkama įranga. Šių metodų taikymui reikia gana daug cheminių medžiagų, tame

tarpe ypač aukšto grynumo (standartų).

Antra vertus yra žinomas elektroantenografinis (EAG) metodas, taikomas tokiems LOJ aptikti, į kuriuos reaguoja vabzdžių antenų uoslės receptoriai. Šis metodas remiasi potencialo pasikeitimo registravimu tarp elektrodų, prijungtų prie vabzdžio antenos pagrindo ir galiuko, ir remiasi tuo, kad uoslės receptorių reakcijos atsiranda kai šie receptoriai stimuliuojami kai kuriais LOJ, kaip antai – kairomonais. Pavyzdžiui, Europos patente EP0852723 pateikiama biosensorinė (EAG) sistema, turinti vabzdžio anteną, kuri skirta vieno ar kelių LOJ, atsirandančių augalų pažeidus vabzdžiui-kenkėjui, aptikimui ore.

Paminėtina dujų chromatografija (DC), taikoma kartu su elektroantenografiniu detektoriumi (EAD), dar žinoma kaip DC-EAD, taikoma vabzdžių infocheminiams junginiams nustatyti (*Arn H., Stadler E., Rauscher S. 1975. The electroantennographic detector: a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. Z. Naturforsch. 30C: 722-725; Baker T.C., Francke W., Millar J.G. et al. 1991. Identification and bioassay of sex pheromone components of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller). J. Chem. Ecol. 17: 1973-1988*). Šią sistemą sudaro vabzdžio antena, įtvirtinta tarp dviejų elektrodų, iš kurių sustiprintas elektrinis signalas registruojamas kompiuteriu. Tiriamų junginių srautas iš dujų chromatografo kolonėlės padalinamas į dvi dalis, viena iš kurių patenka į liepsnos jonizacinį detektorių (LJD), o kita – į EAD, kas leidžia vienu metu registruoti dviejų detektorių parodymus (vienas iš detektorių - LJD - yra neselektyvus, o kitas – EAD - labai selektyvus).

Remiantis JAV patentu Nr. US 4,314,027, kuris skirtas grūdų apkrėstumo pelėsinų grybų toksinais nustatymui, grūdų lakieji junginiai buvo absorbuojami kietafaziu sorbentu, esančiu specialiaame įrenginyje. Vienintelis aprašyme pateikiamas išradimo įgyvendinimo pavyzdys atskleidžia kaip testuoti kukurūzų pavyzdį, apie kurį žinoma, kad jis yra užkrėstas aflatoksinu: imamas 100 g grūdų pavyzdėlis, iš kurio 120 min. renkami LOJ, vakuumuojant pavyzdį. Pavyzdys būtinai kaitinamas iki 100 °C, kad pakankamai išsiskirtų LOJ. Junginių grupės iš C₇ – C₉ alkoholių, ketonų ir aldehydų, t.y. lakių junginių, rodančių mikotoksinų buvimą, aptikimui naudojama dujų chromatografija. Duomenys interpretuojami stebint ar būdingi C₇, C₈ ir C₉ junginiai yra

ir jie lyginami su tų pačių junginių-standartų registravimu chromatografu.

Tokiai analizei atlikti reikia daugelio standartų (nuo C₇ iki C₉ alkoholių, ketonų ir aldehidų). Kaip minėta aukščiau kai kurie grūdus užteršiantys pelėsiniai grybai gali gaminti ir kitus metabolitus, tačiau ne mikotoksinus, ir mikotoksinų nebuvimas gali būti klaidingai konstatuojamas taikant minėtą metodą. Ši analizė gali duoti ir neapibrėžtą rezultatą, jei kai kurių (vieno ar kelių) markerinių junginių analizuojamame pavyzdyje nėra aptinkama.

Be to, kadangi išvada priklauso nuo bendro surinktų LOJ kiekio (ekstrahuojamų iš tiriamo pavyzdžio), tai remiantis pateiktu pavyzdžiu, LOJ rinkimo trukmė turi būti ne mažesnė nei 2 val. Būtinai specialus nestandartinis LOJ surinkimo įrenginys, kuris turi būti pripildytas specialaus sorbento ir pagamintas ir priderintas prie dujų chromatografo injektoriaus. Naudojantis tik vienu detektoriumi (be papildomo MS ar EAD) ir lyginant tiriamo pavyzdžio ir standarto chromatogramas gali būti padaryta klaidinga tyrimo išvada, sąlygota dar vienos aplinkybės - skirtingų junginių, turinčių panašius ar netgi visiškai tapačius sulaikymo laikus, pvz., terpenų ir kitų organinių junginių.

Akivaizdu, kad yra būtinas greitas ir aukšto jautrumo, o taip pat pagal gautus registracijos duomenis lengvai interpretuojamas būdas, kuriuo būtų galima patikimai ir ankstyvoje stadijoje nustatyti grūdų užterštumą pelėsiniais grybais, taip išvengiant grūdų produkcijos arba jos dalies nuostolių.

Išradimo esmė

Šio išradimo svarbiausias tikslas – sukurti grūdų užterštumo pelėsiniais grybais aptikimo būdą, kuris apima virš grūdų susidariusių LOJ mėginio surinkimą ir surinkto mėginio analizavimą dujų chromatografija, nustatant jame ir markerinį(ius) LOJ. Šis metodas pasižymi tuo, kad (i) dujų chromatografija sinchronizuoja su vabzdžio elektroantenografija ir (ii) grūdų užterštumą pelėsiniais grybais nustato vertinant vabzdžio antenos receptorių atsaką konkrečiu laiku, atitinkančiu vieno specifinio biomarkerio sulaikymo chromatografo kolonėlėje laiką.

Minėtas specifinis biomarkeris, nurodantis užteršimą pelėsiniais, yra 3-metil-1-butanolis.

Siūlomame būde dujų chromatografiją ir vabzdžio elektroantenografiją vykdo vienu metu.

Paprastai lygiagrečiai su vabzdžio elektroantenografine detekcija atlieka ir liepsnos jonizacinę detekciją. Tuo atveju tiriamų junginių srautas, išeinantis iš dujų chromatografo padalinamas į dvi lygias dalis (1:1), kurių viena patenka į liepsnos jonizacinį detektorių, o kita – į elektroantenografinį detektorių.

Optimaliame šio išradimo įgyvendinimo variante LOJ surinkimą nuo grūdų mėginio atlieka esant normaliam atmosferos slėgiui ir temperatūroje iki $40\pm 5^{\circ}\text{C}$; LOJ surinkimas nuo 25 g grūdų pavyzdžio trunka mažiausiai 30 min.

Šiame išradime siūlomam būdai vykdyti tinkama naudoti elektroantenografijos stadijoje vabzdžio antena gali būti pasirenkama iš vabzdžių rūšių grupės, apimančios *Plodia interpunctella*, *Tenebrio molitor* L., *Geotrupes stercorarius* L., *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Drosophila melanogaster* (Meigen), *Musca domestica* L., *Coreus marginatus* L., *Vespula germanica* (Fabricius) ir *Apis mellifera* L., pirmenybė teiktina šioms rūšims: *Drosophila melanogaster*, *Plodia interpunctella* ir *Apis mellifera*.

Taikant šį metodą tinkamiausios naudoti elektroantenografijos stadijoje – yra *Drosophila melanogaster* antenos.

Šio išradimo būdas gali būti taikomas nustatyti bent jau grūdų užterštumui pelėsiniais grybais, pasirinktais iš grupės, apimančios *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochrachloron*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium raistricki*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium expansum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Rhizopus oryzae* ir *Gusarium* spp.

Dar vienas svarbus šio išradimo objektas – tai sistema, skirta grūdų užteršimo

pelėsiniais grybais aptikimui, kuri būtų itin jautri, leidžianti detektuoti ypač mažas grybų koncentracijas, t.y. pagal submikrogramų eilės išskiriamus LOJ kiekius.

Grūdų užteršimui pelėsiniais grybais aptikti sistema apima kietafazės mikroekstrakcijos įtaisą (KFME) ir dujų chromatografą (DC), sujungtą su elektroantenogramų detektoriumi (EAD) lygiagrečiai su liepsnos jonizaciniu detektoriumi (LJD), kur DC turi srauto dalytuvą, leidžianti sinchronizuotai registruoti LJD ir EAD atsakus.

Elektroantenogramų detektorius (EAD) apima vabzdžio anteną, įtvirtintą tarp dviejų elektrodų, nuo kurių sustiprintas elektrinis signalas gali būti registruojamas kompiuteriu, turinčiu specialią programinę įrangą, ir oro srovės tiekimo priemonės, skirtas apipūsti vabzdžio antenai, kurių dėka iki antenos atnešami LOJ, išeinantys iš DC kolonėlės.

Dar vienas svarbus šio išradimo aspektas yra 3-meti-1-butanolio panaudojimas kaip vienintelio biomarkerio grūdų užterštumo pelėsiniais grybais elektroantenografinėi detekcijai.

Trumpas paveikslo aprašymas

Pav. 1 vaizduoja sinchronizuotą DC-EAD sistemos dviejų detektorių signalų įrašą, kai analizuojami erdvėje virš grūdų pavyzdžio surinkti lakūs organiniai junginiai. Registruojami dujų chromatografo (LJD) ir biologinio detektoriaus (EAD) atsakai į lakius junginius, kai tiriami:

A – neužkrėsti pelėsiniais grybais grūdai (neregistruojamas nei LJD, nei EAD atsakas kai biomarkerio nėra);

B – pelėsiniais grybais užkrėsti grūdai (silpnas LJD atsakas, bet stiprus EAD atsakas kai biomarkerio kiekis yra mažas);

C – pelėsiniais grybais užkrėsti grūdai (labai stiprus LJD atsakas bei stiprus EAD atsakas kai biomarkerio kiekis yra didelis);

D – pelėsiniais grybais užkrėsti grūdai (neregistruojamas LJD atsakas, bet aiškus EAD atsakas, kai yra labai mažas biomarkerio kiekis, kuris yra pakankamas

aptikti EAD, bet nepakankamas – LJD).

Detalus išradimo aprašymas

Kaip minėta aukščiau, pagrindinis šio išradimo tikslas yra sukurti būdą grūdų užterštumo pelėsiniais grybais nustatymui, panaudojant specifinį pelėsinų grybų produkuojamą lakų junginį. Būdas apima lakų junginių surinkimą ir dujų chromatografiją (DC), sinchronizuotą su vabzdžio elektroantenografija (EAD). Lakų junginių mišinys injekuojamas į DC ir lygiagrečiai registruojamas vabzdžio EAD atsakas. EAD atsakas pasirodo, jeigu lakų junginių mišinyje yra biomarkeris, žinomas kaip būdingas pelėsiniais grybais užterštiems grūdams.

Ištyrus visą eilę LOJ mišinių, surinktų nuo užterštų pelėsiniais grybais grūdų pavyzdžių, buvo nustatyta, kad pelėsiui aptikti pakanka vieno lakaus junginio. Vabzdžių sandėlių kenkėjų elgesio tyrimai parodė, kad specifinis LOJ arba kitaip biomarkeris yra tas junginys, kurį vabzdžiai naudoja pelėsiu užterštų grūdų atpažinimui. Toks junginys pasirodė esąs 3-metil-1-butanolis; visais atvejais kai grūdai buvo užteršti pelėsiniais grybais, buvo gauti vabzdžių antenų EAD atsakai į šį junginį. Be to, atsakas į 3-metil-1-butanolį registruojamas anksčiau negu pvz., į seskviterpenus, kuriuos siūloma naudoti patente EP2568283. Taip pat 3-metil-1-butanolis turi privalumą, nes yra ankstyvesnio užteršimo indikatorius, lyginant su kitais junginiais, atsirandančiais vėlesnėse užsikrėtimo stadijose, kai pelėsis grūduose jau ir vizualiai matomas.

3-metil-1-butanolio standartas buvo naudojamas DC analizei šio junginio sulaikymo laikui nustatyti.

Atitinkamai, pelėsinų grybų detektavimui pagal šį išradimą naudojama sistema, susidedanti iš kietafazės mikroekstrakcijos prietaiso (KFME) ir dujų chromatografo (DC), sinchronizuoto su elektroantogramų detektoriumi (EAD).

KFME yra portatyvus, standartinis prietaisas, pritaikytas rinkti ir injekuoti į DC lakius organinius junginius ir kuris lengvai prijungiamas prie DC-EAD sistemos. Pagrindinės DC-EAD sudedamosios dalys yra: dujų chromatografas, vabzdžio antenos preparatas, registravimo elektrodai, stiprintuvas, registravimui ir analizei skirtas kompiuteris ir oro srovės tiekimo priemonės, generuojančios nuolatinę oro srovę, atnešančią LOJ iš DC prie vabzdžio antenos.

Tiriamas grūdų pavyzdys paimamas įprastu būdu. Grūdai suberiami į stiklinę kolbą, kuri uždengiama aliuminio folija ir laikoma pastovioje temperatūroje kol grūdų viršerdyje nusistovi pastovi lakių junginių koncentracija. LOJ ekstrahuojami juos absorbuojant kietafaziu strypeliu, naudojant KFME laikiklį. Apsaugai nuo mechaninio pažeidimo strypelis yra KFME laikiklio adatos makštyje. Naudojant laikiklį strypelis išstumiamas tik LOJ rinkimui ir pernešimui į DC. Pelėsinių grybų išskiriamų LOJ rinkimui naudojamas strypelis padengtas divinilbenzeno/polidimetilsiloksano (DVB/PDMS) arba polidimetilsiloksano (PDMS) sluoksniu. Laikiklio adata praduriama kolbą dengianti folija, išstumiamas strypelis ir laikomas grūdų viršerdyje tam tikrą laiką. Pakankama absorbcijos trukmė - nuo 30 min. iki 60 min. Per tą laiką grūdų pavyzdžio LOJ yra absorbuojami ant strypelio polimerinio apvalkalo.

Baigus absorbciją strypelis įtraukiamas į adatą, KFME laikiklis pernešamas nuo grūdų mėginio prie DC kur adata įstumiama į DC injekavimo portą. Vykstant desorbcijai dujos-nešėjos (vandenilis arba helis) nuneša LOJ mišinį į DC kolonėlę. LOJ srautas padalinamas į du, kurių vienas patenka į liepsnos jonizacinį detektorių (LJD), o kitas – į elektroantengramų detektorių (EAD). EAD susideda iš vabzdžio antenos (įtvirtintos tarp dviejų elektrodų), stiprintuvo ir elektroninio prietaiso, kontroliuojančio oro srovę atnešančią LOJ prie antenos. Elektrodai su vabzdžio antena sujungiami naudojant fiziologinį tirpalą (pvz. KOH ar Ringerio tirpalas) arba elektrogelį, pavyzdžiui, naudojamą registruojant elektrokardiogramas. Fiziologinis tirpalas ir elektrogelis stabdo dehidrataciją ir pažeistų vabzdžio audinių gijimą bei įgalina užregistruoti antenų elektrinius signalus. Taip pat elektroantengramas galima registruoti naudojant ir visą vabzdį ar jo galvą. Tokiu atveju registruojantis elektrodas jungiamas prie antenos galiuko, o indiferentinis elektrodas – prie vabzdžio kūno. LOJ iš chromatografo kolonėlės po srauto padalijimo nunešami prie LJD ir EAD (vabzdžio antenos). Srauto padalijimas leidžia tuo pačiu metu registruoti ir lyginti LJD ir EAD atsakus. Sustiprintas EAD signalas registruojamas kompiuterine programa.

Pelėsinių grybų išskiriami LOJ renkami ant strypelio, padengto divinilbenzeno/polidimetilsiloksano (DVB/PDMS) arba polidimetilsiloksano (PDMS) sluoksniu. Siekiant sumažinti mažiau polinių junginių absorbciją, verta naudoti PDMS sluoksniu padengtą strypelį. LOJ emisijos pusiausvyros nusistovėjimui grūdų

viršerdyje ir substrate reikia 15 – 60 min. (minimali 15 min. trukmė yra pakankama). LOJ absorbcijos trukmė nuo 30 iki 60 min. Absorbcijos laiko ilginimas ne tik padidina visos analizės trukmę, bet ir dėl konkurencinės absorbcijos-desorbcijos proceso gali neigiamai paveikti analizės rezultatus. Absorbcija gali būti vykdoma temperatūrų intervale nuo kambario temperatūros iki 40 ± 5 °C. Žemesnė temperatūra gali lemti mažesnę tiriamo junginio (biomarkerio) emisiją, o aukštesnė – padidinti desorbciją. Taigi, optimali absorbcijos temperatūra lakaus biomarkerio surinkimui yra 40 °C. DC analizei gali būti naudojamos įvairaus polingumo silikageliu dengtos kolonėlės, tokios kaip 100 % polietilenglikolio ar 5 % fenilmetilpolisiloksano. LOJ mišinio išskirstymui turi būti parenkama tinkama temperatūrinė chromatografavimo programa ir srauto greitis. Desorbcijos trukmė injekavimo porte gali būti nuo 1 iki 3 min, tačiau tinkamiausias analitės desorbcijai laikas yra 1,5 min. Nuolatinio oro srauto greitis, kuriuo apipučiama vabzdžio antena gali svyruoti nuo 0,25 iki 1,5 m/s, bet optimalus yra 0,5 m/s.

Šio išradimo būdas yra tinkamas aptikti grūdų užteršimą įvairiomis pelėsinų grybų rūšimis, tokiomis kaip *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochrachloron*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium raistricki*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium expansum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Rhizopus oryzae*, *Gusarium* spp. ir kitomis.

Ypač svarbu taikant šį būdą – tinkamo vabzdžio antenos parinkimas. Antenos gali būti naudojamos tokių vabzdžių rūšių: *Plodia interpunctella*, *Tenebrio molitor* L., *Geotrupes stercorarius* L., *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Drosophila melanogaster* (Meigen), *Musca domestica* L., *Coreus marginatus* L., *Vespula germanica* (Fabricius) ir *Apis mellifera* L.

Tačiau *Drosophila melanogaster*, *Plodia interpunctella* ir *Apis mellifera* yra tinkamiausi vabzdžiai, nes jų antenų receptorių jautrumas išradime siūlomam biomarkeriui (3-metil-1-butanoliui) yra didžiausias.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžių aprašymas

Žemiau pateikiami konkretūs pavyzdžiai, iliustruojantys išradimo taikymą; tačiau jie nėra apribojantys šio išradimo apsaugos apimtį.

Pavyzdys 1. Lakių junginių surinkimas iš grūdų mėginio

Grūdų pavyzdys dedamas į stiklinę kolbą, kurią uždengus triguba aliuminio folija, inkubuojama 40 °C temperatūroje 0,5 val. Tada atliekama 1 val. trukmės lakių organinių junginių (LOJ) kietafazė mikroekstrakcija. LOJ absorbcijai naudojamas polidimetilsiloksano (PDMS, 100 µm, Supelco, JAV) strypelis. Tuo pat po mikroekstrakcijos LOJ 1,5 min. desorbuojami dujų chromatografe ir registruojami LJD ir EAD atsakai (DC-EAD).

Pavyzdys 2. DC-EAD

Ant KFME strypelio absorbuoti LOJ analizuojami DC-EAD. Ši analizė atliekama Clarus 500 dujų chromatografu (PerkinElmer, Waltham, MA, JAV), kuriame naudojama DB-Wax kapiliarinė kolonėlė (30 m; vidinis diametras 0.25 mm, sluoksnio storis 0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, JAV) ir LOJ srauto dalintuvas, leidžiantis tuo pačiu metu registruoti LJD ir EAD atsakus į atskirtus mišinio LOJ.

Injektoriaus ir detektoriaus temperatūra - 240 °C. Analizės temperatūrinė programa: pradinė 40 °C temperatūra palaikoma 2 min, po to keliama iki 200 °C 5 °C/min. greičiu, po to keliama iki 240 °C 10 °C/min. greičiu ir palaikoma 14 min. Dujos nešėjos - vandenilio dujos (2.5 ml/min.).

Išeinantis iš kolonėlės srautas dalijamas į dvi dalis (1:1), kurių viena nukreipiama į LJD, o kita – į EAD. Vabzdžio antena naudojama kaip detektorius elektrofiziologiškai aktyviems lakiems junginiams nustatyti. Nukirptos vabzdžio antenos pagrindas pritvirtinamas prie indiferentinio stiklinio elektrodo, kuris užpildytas 0,9 % NaCl fiziologiniu tirpalu (Ilsanta, Lietuva) ir į kurį įkišta sidabrinė vielutė.

Registravimo elektrodas - toks pat fiziologiniu tirpalu užpildytas stiklinis kapiliaras, kurio galiukas suliečiamas su antenos galiuku. Toks paruoštas antenos preparatas yra prijungiamas prie IDAC-232 stiprintuvo (Syntech, Olandija), kuris turi jungtį su kompiuteriu, turinčiu DC-EAD atsakų registravimo programą GcEad V. 4.4 (Synthech, Olandija 1998). Junginiai, kurie sukelia atkartojamus antenos receptorių atsakus, laikomi EAD aktyviais.

Vabzdžio antenų receptorių atsakus sukeliantis 3-metil-1-butanolis identifikuojamas lyginant jo sulaikymo laiką su autentiško sintetinio standarto sulaikymo laiku.

Pavyzdys 3. Tinkamiausi vabzdžiai-detektoriai

Siekiant atrasti ypatingai jautrų vabzdžių-detektorių rūšį, tinkamiausią užterštumui pelėsiams pagal biomarkerį 3-metil-1-butanolį aptikti, buvo tirti 9 rūšių vabzdžių antenų elektrofiziologiniai atsakai. Vabzdžių antenų preparatai paruošti taip pat, kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

10 µl testuojamo junginio (biomarkerio) tirpalo heksane užlašinama ant filtro popieriaus juostelės (5 x 45 mm) (Whatman®1, Anglija). Nugaravus tirpikliui, filtro popieriaus juostelė įdedama į Pastero pipetę, per kurią tekėdama oro srovė (7 ml/s) perneša kvapias medžiagas į nuolatinę oro srovę (20 ml/s), apipučiančią anteną. Stimuliavimo trukmė (0,5 s) nustatoma kontrolieriu (CS 55; Syntech, Olandija). Buvo tiriamos šešios 3-metil-1-butanolio koncentracijos (0,1, 1, 10, 10², 10³ ir 10⁴ µg) didėjimo tvarka. Nugarintas tirpiklis (10 µl heksano) testuotas kaip kontrolinis stimulus prieš mažiausią koncentraciją ir po didžiausios koncentracijos. Reakcijos dydis mV nustatomas pagal pikinę amplitudę, t.y. įvertinus atstumą iki labiausiai nutolusio nuo nulinės linijos taško. Po kiekvieno stimuliavimo daroma 1 min. pertrauka, per kurią leidžiama antenos uoslės receptoriams atsistatyti.

Sandėlių kenkėjas *P. interpunctella*, medunešė bitė *A. mellifera* ir vaisinė muselė *D. melanogaster* buvo jautriausiai į 3-metil-1-butanolį reaguojantys vabzdžiai. Nelauktai didžiausią jautrumą šiam biomarkeriui parodė *D. melanogaster* – vaisinė muselė, visiškai nesusijusi su sandėliuojamais grūdais. Vabalų *T. molitor*, *G. stercorarius* ir *L. decemlineata*, taip pat musių *M. domestica*, blakių *C. marginatus* ir vapsvų *V. germanica* jautrumas šiam junginiui buvo maždaug 100 kartų mažesnis.

Pavyzdys 4. Pelėsinių grybų LOJ detekcija

Šiame pavyzdyje buvo testuojami 25 g kviečių mėginiai. Pirmasis mėginys - švarūs, pelėsiais neužkręsti kviečių grūdai. Kiti kviečių mėginiai buvo užkrečiami laboratorijoje *Aspergillus flavus* arba *Alternaria alternata* pelėsinais grybais.

Kiekvieno mėginio LOJ buvo renkami pagal 1 pavyzdyje aprašytą KFME metodiką. Po to buvo atliekama absorbuotų LOJ DC-EAD analizė pagal 2 pavyzdyje aprašytą metodiką, siekiant nustatyti ar surinktų LOJ mišinyje yra/nėra 3-metil-1-butanolio, indikuojančio užteršimą pelėsinais grybais.

Tyrimo rezultatai pateikti 1 paveiksle. (Pav. 1). Neužteršto grūdų mėginio DC-EAD tyrimų rezultatų grafiniame vaizde nei DC, nei EAD juostose reakcijų smailių ties 3-metil-1-butanoliui būdingu sulaikymo laiku nėra, t.y. nei LJD, nei EAD nerodo atsako, t.y. 3-metil-1-butanolio LOJ mišinyje nėra, o kartu tai reiškia jog grūdai pelėsiu neužteršti (Pav. 1, A). Grūdų mėginių, užkręstų *Aspergillus flavus* (Pav 1, B), *Alternaria alternata* (Pav. 1, C) pelėsinais grybais, LOJ DC-EAD analizės grafinis vaizdas rodo reakcijų smailės tiek DG, tiek EAD juostoje ties sulaikymo laiku, būdingu 3-metil-1-butanoliui, taigi, tiek vienas, tiek kitas grūdų mėginys užterštas pelėsinais grybais. Biologinio detektoriaus – EAD atsakas yra ryškus tiek esant mažai (Pav 1, B), tiek didelei (Pav. 1, C) 3-metil-1-butanolio koncentracijai.

Ketvirto grūdų mėginio, užkręsto *Aspergillus flavus* (Pav. 1, D), LOJ mišinyje 3-metil-1-butanolio koncentracija buvo mažesnė už LJD detekcijos slenkstį (Pav. 1, D DC juostoje smailė neregistruojama), tačiau biologinis detektorius – EAD, ties sulaikymo laiku, būdingu 3-metil-1-butanoliui, registruoja vabzdžio receptorių atsaką, todėl išvada - šis mėginys užterštas pelėsinais grybais. Šis pavyzdys rodo didesnį EAD jautrumą nei LJD.

Analogiški rezultatai buvo gauti tiriant grūdus, užterštus ir kitais pelėsinais grybais, tokiais kaip *Fusarium graminearum*, *Penicillium aurantiogriseum* ir kt.

Aukštas metodo efektyvumas buvo pasiektas dėl žemiau išvardintų sąlygų:

Nepaprastai didelis jautrumas, detekcijai pakankama LOJ koncentracija viršerdyje yra ppb eilės;

Paprasta analizė, kuri remiasi tik vienu markeriniu junginiu, nereikia indeksų skaičiavimo ir lyginimo, kurie atliekami kai analizuojama visa eilė junginių;

Nėra neaiškumų, kurie dažnu atveju atsiranda skaičiuojant indeksus;

Tyrimui reikalinga tik standartinė įranga;

EAD registravimui tinkamiausia vaisinė muselė - *Drosophila melanogaster* - yra lengvai laboratorijos sąlygomis kultivuojamas vabzdys.

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad siūlomas išradimas turi keletą naujų privalumų:

1. Pelėsinų grybų aptikimas yra greitas ir supaprastintas, nes pakanka registruoti tik vieną lakų junginį.

2. Rezultatai neperkrauti bereikalinga informacija, todėl perskaityti ir suprasti tyrimo rezultatus gali kiekvienas, tam nereikia kvalifikuotų profesionalų.

3. Didesnis būdo jautrumas leidžia užteršimą detektuoti ankstyvoje stadijoje (tik pradėjus daugintis pelėsiniam grybui), o tai labai svarbu, nes ankstyvas pelėsinų grybų aptikimas leidžia imtis priemonių ir išvengti galimų grūdų produkcijos nuostolių.

Naujas techninis sprendimas leidžia grūdų mėginio lakius junginius surinkti įprastu kietafazės mikroekstrakcijos (KFME) būdu esant normaliam slėgiui ir temperatūrai, artimai kambario temperatūrai. Analizei pakanka mažo grūdų mėginio - iki 25 g grūdų. Užterštumo analizei naudojami du detektoriai, būtent - liepsnos jonizacinis (LJD) ir elektroantenogramų (EAD) detektorius, kurie daro analizę patikimesnę ir tikslesnę.

Reikalingas minimalus aukšto švarumo standartų skaičius, t.y. tik vienas.

Siūlomo būdo jautrumas lyginant su kitais žinomais būdais (pvz. JAV patentas Nr. US 4,314,027) yra didesnis dėl jo papildymo vabzdžio EAD. LJD gali registruoti ppm eilės medžiagos koncentraciją ore, tuo tarpu EAD užregistravimui (sužadinti vabzdžio uoslės receptoriams) pakanka nuo 1 iki kelių ppb koncentracijos, t.y. 1000 kartų mažesnės. MS analizė ir su ja susijusi įranga, naudojant siūlomą būdą, nereikalinga. Surenkant LOJ nereikia naudoti vakuumavimo ir mėginio kaitinimo virš

40 °C. Pakanka trumpo DC-EAD įrašo (apie 10 min) kad galima būtų padaryti išvadą.

Tuo atveju, kai abiejų detektorių - LJD ir EAD - atsakai yra aiškiai matomi, pelėsinių grybų produkuojamo biomarkerio koncentracija yra ppm ribose, o kai LJD atsako nėra (triukšmų lygyje), tačiau yra EAD atsakas, užteršimas pelėsiais yra mažesnis ir jų produkuojamo biomarkerio koncentracija yra ppb ribose. Atsižvelgiant į tai, pelėsių detekcija gali būti vykdoma išjungus LJD, ir naudojant tik EAD.

Išradimo privalumai lyginant su kitais žinomais būdais (paminėtas aukščiau) grūdų užteršimui pelėsiais grybais nustatyti.

- visa analizė, nuo mėginio surinkimo iki DC-EAD užrašymo, trunka apie 45 min. (iki 1 valandos), t. y. žymiai trumpiau nei aukščiau paminėtame metode.

- būdas pranašesnis, nes galima detektuoti ir tas pelėsinių grybų linijas, kurios negamina mikotoksinų (pavyzdžiui, *Aspergillus ochraceus* linijos tokios kaip KA-95, KA-101, KA-284).

- analizė yra daug paprastesnė nei kituose žinomuose būduose, nes pakanka aptikti ir analizuoti tik vieną biomarkerį.

- didesnis būdo jautrumas lyginant su esamais būdais, nes į pastaruosius nėra įtrauktas biologinis (ypač jautrus) detektorius.

- mėginius analizuoti galima ne tik laboratorijoje, bet ir grūdų sandėliavimo vietose, turint portatyvinę DC-EAD įrangą.

Šio išradimo siūlomas būdas yra draugiškas aplinkai; nereikia naudoti organinių tirpiklių.

Pramoninis pritaikumas

Išradimas gali būti naudingas žemės ūkyje vertinant grūdų kokybę sandėliavimo vietose, taip pat pašarų kokybės vertinimui, maisto pramonėje vertinant maistinių grūdų, kruopų ar miltų kokybę ir kt.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Grūdų užteršimo pelėsiniais grybais aptikimo būdas, apimantis virš grūdų susidariusių lakių junginių mėginio surinkimą ir surinkto mėginio analizavimą dujų chromatografija, nustatant jame markerinį(ius) lakų(ius) junginį(ius), b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (i) dujų chromatografiją sinchronizuoja su vabzdžio elektroantenografija ir (ii) grūdų užteršimą pelėsiniais grybais nustato vertinant antenų receptorių atsaką tam tikru sulaikymo laiku, kuris būdingas vieninteliui specifiniam biomarkeriui.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas vienintelis specifinis biomarkeris, indikuojantis užteršimą pelėsiniais grybais, yra 3-metil-1-butanolis.

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad chromatografiją ir vabzdžio elektroantenografiją atlieka vienu metu.

4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lygiagrečiai su vabzdžio elektroantenografine detekcija atlieka liepsnos jonizacinę detekciją, padalinant iš chromatografo išeinančių dujų-nešėjų srautą tarp liepsnos jonizacinio detektoriaus ir elektroantenografinio detektoriaus santykiu 1:1.

5. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lakių junginių nuo grūdų mėginio surinkimą vykdo esant normaliam atmosferos slėgiui ir temperatūroje iki 40 ± 5 °C, renkant lakius junginius nuo 25 g grūdų mėginio bent 30 min.

6. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tinkama naudoti elektroantenografijos stadijoje vabzdžio antena pasirenkama iš vabzdžių rūšių grupės, apimančios *Plodia interpunctella*, *Tenebrio molitor* L., *Geotrupes stercorarius* L., *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Drosophila melanogaster*

(Meigen), *Musca domestica* L., *Coreus marginatus* L., *Vespula germanica* (Fabricius) ir *Apis mellifera* L., geriausiai *Drosophila melanogaster*, *Plodia interpunctella* ir *Apis mellifera*.

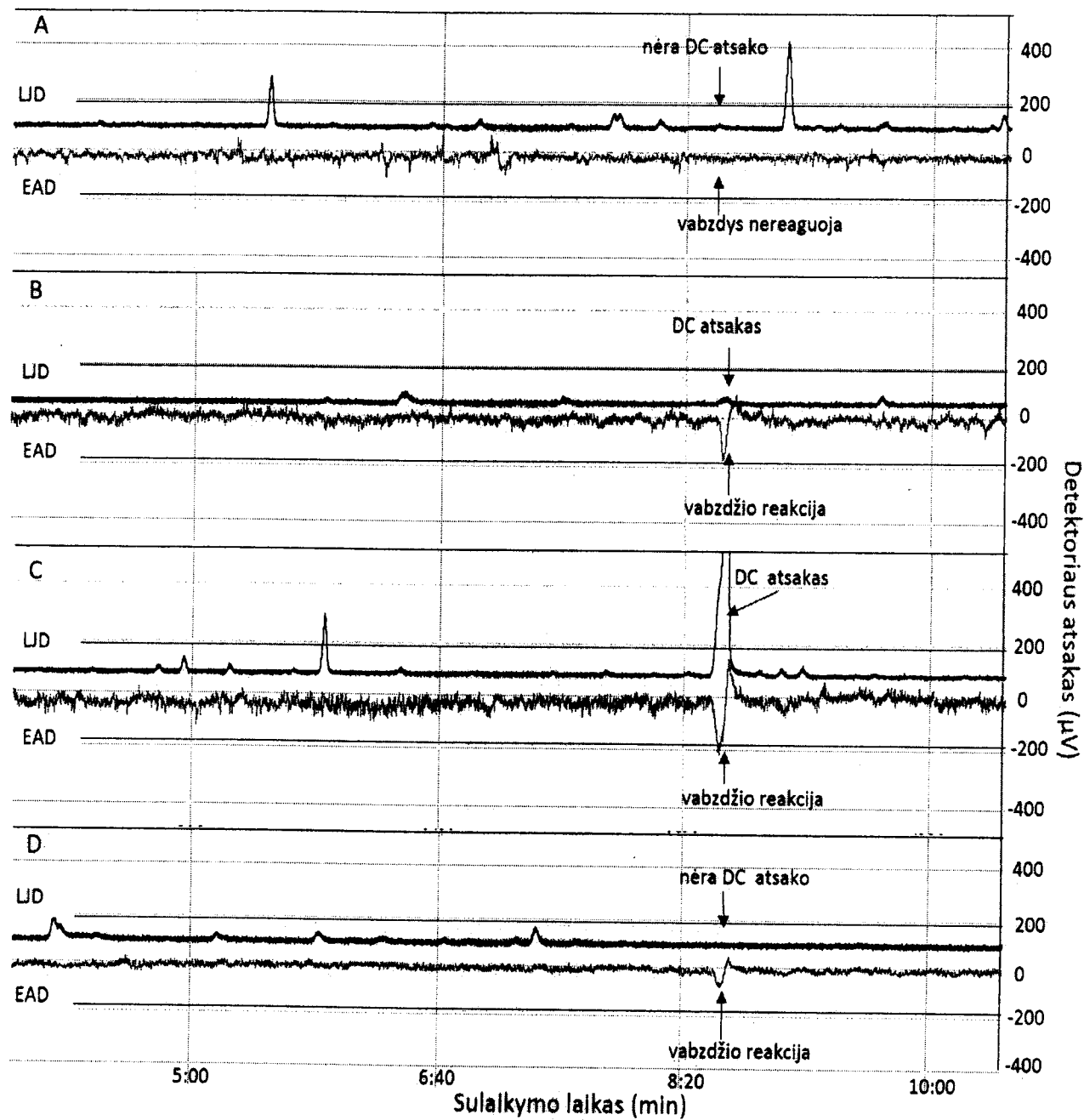
7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tinkamiausia naudoti elektroantenografijos stadijoje yra *Drosophila melanogaster* antena.

8. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad grūdų užteršimo pelėsiniai grybai yra pasirinkti iš grupės, apimančios *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochrachloron*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium raistricki*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium expansum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Rhizopus oryzae* ir *Gusarium* spp.

9. Sistema, skirta grūdų užteršimo pelėsiniais grybais aptikimui būdu pagal bet kurį iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima kietafazės mikroekstrakcijos įtaisą (KFME) ir dujų chromatografą (DC), sujungtą su elektroantenografiniu detektoriumi (EAD) lygiagrečiai su liepsnos jonizaciniu detektoriumi (LJD), kur DC turi srauto dalytuvą, leidžiantį sinchronizuotai registruoti LJD ir EAD signalus.

10. Sistema pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad elektroantenografinis detektorius (EAD) apima vabzdžio anteną, patalpintą tarp dviejų elektrodų, nuo kurių sustiprintas signalas gali būti registruojamas kompiuteriu, ir oro srovės tiekimo priemonės, skirtas apipūsti vabzdžio antenai iš DC išeinančiais lakiais junginiais.

11. 3-metil-1-butanolio panaudojimas grūdų užteršimo pelėsiniais grybais elektroantenografiniam aptikimui.



Pav. 1