СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ“

Лиляна Ангелкова-Дойчиновски

Изолиране, идентифициране и свойства на млечнокисели бактерии от Балкански млечни продукти

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление: 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Научен ръководител: проф. дбн Искра Иванова
Научен консултант: доц. д-р Илия Илиев

София, 2014

Дисертационният труд съдържа 104 страници на формат А4, 14 таблици и 13 фигури. В библиографската справка са включени 147 заглавия на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология“ на СУ „Св. Климент Охридски“ и катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиолоия към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 30.01.2014 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед ..... на Ректора на Софийски университет „Св. Кл. Охридски“.

Научно жури:

1. Проф. дбн Искра Иванова
2. Проф. д-р Пенка Мончева
3. Проф. дсн Невена Богацевска
4. Доц. д-р Соня Костадинова
5. Доц. д-р Вяра Иванова

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в..... в сградата на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите по защитата се намират на разположение на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

УВОД

Един подход за поддържане на здравето и контрол на заболяванията е използването на бактериални и въглехидратни хранителни добавки, които оказват благотворен ефект върху характерните за човешкия гастроинтестинален тракт бактериални групи и възпрепятстват навлизането на патогени. Този подход включва използването на пробиотици („живи организми, които прилагайки се в подходящи количества оказват благотворен ефект върху здравето на приемника“) и пребиотици.

Един от подходите за селективно подпомагане на бифидобактерии и лактобацили, като ендогенна полезна микрофлора е чрез приемането на определени субстрати, познати като пребиотици. Gibson и Roberfroid (1995) първи дефинират пребиотика като „неразградим хранителен компонент, който въздейства благотворно на приемника чрез селективно стимулиране растежа и/или активността на една или лимитиран брой бактерии в дебелото черво, което подобрява здравословния статус на приемника“. Възможно е да се модулира състава на микрофлората чрез храната, тъй като тя е основен фактор контролиращ интестиналната микрофлора. Пребиотичният субстрат селективно се оползотворява от полезните бактерии в стомашно-чревния тракт и не стимулира потенциалните патогени, като токсин-продуциращи клостридии, протеолитичните бактероиди и *Esherichia coli*. По този начин се постига „здравословния“ състав на микрофлората чрез доминиране на бифидобактерии и/или лактобацили, оказващи положителен ефект върху здравето.

Сентенцията „Нека храната бъде нашето лекарство, а лекарството наша храна“ изказана от Хипократ преди 2500 години, се радва на нов интерес. В действителност се наблюдава повишаващ се интерес на потребителите към специфични храни, или физиологично-активни хранителни добавки, т.н. функционални храни (Hasler, 1998).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящата дисертация е изолирането и охарактеризирането на щамове млечнокисели бактерии от млечни продукти от Балканския регион и тяхното използване в получаването на функционални млечни продукти, съдържащи пребиотични олигозахариди.

За осъществяване на тази цел, бяха поставени следните задачи:

1. Видова идентификация на щамовете.
2. Изследване растежните параметри на щамовете, антимикробна активност и чувствителност към антибиотици.
3. Изследване растежа на щамовете върху пребиотични олигозахариди.

4. Анализ за определяне на остатъчни захари и метаболитни продукти.
5. Анализ на ензимни активности, отговорни за усвояването на олигозахариди.
6. Анализ на растежа на изолираните щамове в моделна система с казеинов хидролизат в присъствие на пребиотични олигозахариди.
7. Анализ на остатъчното количество олигозахариди в кисело мляко.
8. Сензорен анализ на кисело мляко с пребиотични олигозахариди.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Бактериални видове

Всички изследвания са извършени с щамове *Lactobacillus delbrueckii,* и *Streptococcus thermophilus ,* изолирани от домашно приготвени Балкански млечни продукти и съхранявани при – 80°C в течна среда MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (MRS broth Fluka 69966) допълнена с 25% глицерол, като криптотектант в колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология“ при СУ „Св. Климент Охридски“ и в колекцията на катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Използвани в експерименталната работа щамове и тест култури, техните среди и температура на кутивиране са отразени в таблица 1.

Морфологията на колониите на изолираните щамове се определи под бинокулярна лупа след 16 – 18h култивиране на агарова MRS среда.

Формата на клетката е определяна чрез методите на светлинната (микроскоп Olympus, Carl Zeiss, Германия).

Отношение по Грам. Прилага се след 24 часово култивиране на изолираните щамове на MRS-агар.

Физиологична характеристика на щамовете

Каталазна проба

Щамовете бяха тествани, като върху единична колония от всеки щам се накапа 3% H_2O_2. Резултатите се отчетоха под бинокулярна лупа. За положителен резултат се приема образуването на мехурчета газ (O_2), а за отрицателен – липсата на мехурчета. За убедителност резултатът от експеримента се изчаква до 5 минути.

Млечно-киселите бактерии са каталазоотрицателни.

Коагулация на мляко

Изолираните щамове се посяха в 10% обезмаслено мляко. Посетите щамове се култивираха при 42°C в анаеробни условия. Отчитането на резултата се направи след 24h и 48h.

Таблица 1. Микроорганизми и тест-култури използвани в дисертационната работа.

№	Микроорганизъм	Източник	Среда на култивиране	Температура на култивиране
1	Щам 29	Овче кис. мляко	MRS	42°C
2	Щам 31	Овче кис. мляко	MRS	42°C
3	Щам 32	Овче кис. мляко	MRS	42°C
4	Щам 34	Овче кис. мляко	MRS	42°C
5	Щам 36	Овче кис. мляко	MRS	42°C
6	Щам 37	Овче кис. мляко	MRS	42°C
7	Щам 38	Овче кис. мляко	MRS	42°C
8	Щам 44	Овче кис. мляко	MRS	42°C
9	Щам 57	Овче кис. мляко	MRS	42°C
10	Щам IC1	Козе сирене	MRS	42°C
11	Щам IC2	Козе сирене	MRS	42°C
12	Щам IC3	Козе сирене	MRS	42°C
13	Щам IC4	Козе сирене	MRS	42°C
14	Щам IC5	Козе сирене	MRS	42°C
15	Щам C6	Краве кис. мляко	MRS	42°C
16	Щам C7	Краве кис. мляко	MRS	42°C
Тест Култури *Staphylloccocus aureus*			Nutritient agar	37°C
Escherichia coli ATCC 25922			LB	37°C
Listeria innoicua F 046			Elliker (Oxoid)	30°C

Степен на подкиселяване на средата

Степента на подкиселяване на средата от изолираните щамове беше определена след 24h култивиране на изолатите при 42°C в стерилно обезмаслено мляко. Измерването се направи с помощта на pH-метър Microprocessor pH 211, Hanna Instruments.

Чувствителност към антибиотици

Чувствителността на изолираните лактобацилни щамове към различни видове антибиотици беше определена чрез използване на дифузионен метод с единични хартиени дискчета, напоени със съответния вид антибиотик **(Bauer et al. 1966)**.

Видова идентификация с API-тест

С помощта на кит API 50 CHL (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) се определи способността на изолираните щамове да ферментират 49 въглеродни източника.

Резултатите по видовата идентификация на щамовете се обработиха с програмата IBIS (Intelligent Bacteria Identification System).

Хранителни среди и субстрати.

Хранителни среди за култивиране на млечнокисели бактерии в присъствие на олигозахариди.

Ферментационният експеримент е изпълнен в модифицирана MRS среда (mMRS). Оргиналната MRS среда съдържа 20,0 g/l глюкоза, като единствен енергиен източник, който в mMRS средата е заменен съответно с фруктоолигозахарид и галактоолигозахарид в концентрация 20,0 g/l. При всички случаи, енергийните източници бяха стерилизирани през мембранен филтър (Minisart®, 0,20 μm), след което са добавени стерилно към стерилната mMRS среда. Въглехидратите и олигозахаридите използвани в експеримента са: фруктоолигозахариди (Orafti, Belgium), и галактоолигозахариди (Borculo Domo Ingredients, Borculo, The Netherlands) и са представени в таблица 3.

Таблица 2. Използвани антибиотици за определяне на чувствителността на изолираните лактобацилни щамове.

Антибиотик	Концентрация (μg/диск)	Фирма производител
Бета лактами		
Пеницилин	6 μg	Бул Био-NCIPD, България
Ампицилин	10 μg	Бул Био-NCIPD, България
Аминогликозиди		
Стрептомицин	10 μg	Oxoid
Гентамицин	10 μg	Бул Био-NCIPD, България
Тетрациклини		
Тетрацилклин	30 μg	Бул Био-NCIPD, България
Хлорамфеникол	30 μg	Бул Био-NCIPD, България

Таблица 3. Характеристика на търговски пребиотични препарати (олигодахариди) използвани в настоящото изследване.

Олигозахарид	Търговско име	Производител	Състав (%)
Фруктоолигозахариди	**Raftilose P95**	**Orafti, Belgium**	**СП 2 – 12%**
			СП 4 – 48%
			СП 7 – 35%
		Глюкоза, фруктоза, захароза	**– 5%**
Галактоолигозахариди	**TOS-P**	**Yakult, Japan**	**СП 2 – 2%**
			СП 3 – 48%
			СП 4 – 38%
			СП 5 – 12%
Глюкоза		**Merck, Germany**	**чистота – 99%**

Използвани съкращения: СП – степен на полимеризация.

3.4. Характеристика на ферментационен експеримент.

Условия за провеждане на ферментация.

Ферментационият експеримент е осъществен в стерилни епруветки с 5ml mMRS хранителна среда, съдържаща като единствен енергиен източник 2% р-р на глюкоза, фруктоолигозахарид или галактоолигозахарид. Всички опити в експеримента са проведени с трикратна повторяемост и обработени статистически чрез компютърна програма Excel XP – 2000 и Programmable scientific calculation „CITIZEN“ SRP-45N.

Анализ на микробния растеж.

В хода на периодичното култивиране на всеки 2 h е измервана оптическата плътност на бактериалната популация, на спектрофотометър (UV/VIS Shimadzu, Japan) при дължина на вълната 600 nm (OD 600 nm), срещу контрола от MRS и mMRS среда.

Анализи

Степен на подкисляване на средата.

Степента на подкисляване на средата от изолираните щамове беше определена след 24 h култивиране на изолатите при 37°C в различните mMRS – среди. Измерването се направи с помощта на pH-метър Microprocessor pH211, Hanna Instruments. Измерванията са проведени с трикратна повторяемост.

Анализ на органични киселини и етанол

Количеството на млечната киселина е определено по ензимен метод детекция при UV 210 nm с участието на L-лактат дехидрогеназа и D-лактат дехидрогеназа (готов кит, Boehringer Mannheim GmbH) Code 10 139 084 035.

Количеството на оцетната киселина е определено по ензимен метод, детекция при UV 210 nm с участието на ацетил – КоА синтетаза, цитрат синтетаза, малат дехидрогеназа (готов кит, Boehringer Mannheim GmbH) Code Code 10 148 261 035.

Количеството на етанол е определено по ензимен метод, детекция при UV 210 nm с участието на алкохол дехидрогеназа и алдехид дехидрогеназа (готов кит, Boehringer Mannheim GmbH) Code 10 176 290 035.

HPLC анализ на олигозахариди

Тоталното количество олигозахариди и разпределението им по степен на полимеризация (СП) се определиха чрез хроматографски анализ на HPLC при използване на колона Symmetry C18 column 4,6x150 mm и модел на апарата Waters 1525 Binary HPLC Pump. Мобилната фаза беше дейонизирана вода 0,5 мл/мин. Олигозахаридите са детектирани чрез рефрактометър модел Waters 2414. Захарите като монозахариди и дизахариди са анализирани чрез HPLC, използвайки колона Zorbax Carbohydrate column 4,6x150 mm (Agilent, USA) и предколонап –

Analytical Guard Column Zorbax NH2 4,6x12,5 mm, мобилната фаза беше 75/25 ацетонитрил/вода, 0,5 мл/мин.

Всички резултати са обработени при използване на софтуер – Breeze Chromatography Manager Software (Waters, Milford, USA).

Измерванията са проведени с трикратна повторяемост.

Количественно определяне на белтък по метода на Lowry (1951).

Антибактериална активност.

Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове е проведен по метода на дифузия по (Tagg и McGiven, 1971; Bertrand-Harb et.al., 2003).

Определяне активността на ензими

Активността на β-галактозидаза е определена с използване на о-нитро фенил галактопиранозид (ONPG) разтворен в цитратно-фосфатен буфер. Една единица β-галактозидаза (U) се дефинира като количествотоензим, който освобождава 1 μmol ортонитрофенол за една минута при 37°C и pH 6.0 (**Kneifel et al., 2000**).

Активността на α – галактозидаза е определена с използване на р-нитро фенил галактопиранозид (PNPG) разтворен в цитратно-фосфатен буфер. Една единица β-галактозидаза (U) се дефинира като количествотоензим, който освобождава 1 μmol ортонитрофенол за една минута при 37°C и pH 6.5 (**Kontula et al., 2002**).

Анализ на биологично активни компоненти.

Използвани са неутрализирани клетъчни супернатанти, които се обработват с трипсин и протеиназа К. Към 100 μl от неутрализираните клетъчни супернатанти са прибавени 0,1 mg ml^{-1} трипсин (Sigma, n. T-8253) и 1 mg ml^{-1} протеиназа К (Sigma, n. P-0390) в концентрация mg/ml и се темперират при 37°C за 2 h. За температурна стабилност супернатантите се нагряват 10 минути на кипяща водна баня. В петриеви блюда със съответната тест култура се накапват по 100 μl от обработената с трипсин (протеиназа К) супернатанта, температурно обработена и стандартно получената. Периодът на дифундиране е 2 h при 4°C. След 24 h култивиране при 37°C се отчита активността в mm стерилни зони.

Електрофоретично доказване на биологично активни вещества с Трис-Трицин-SDS-ПААГЕ.

За анализиране на пептиди/протеини , образували се след 24 h култивиране на изолираните щамове в съответната mMRS среда с фруктоолигозахарид, глюкоолигозахарид, галактоолигозахарид и рафиноза е използвана Трис – Трицин – SDS полиакрил амидна гел електрофореза по метода на Schägger (1987). За целта е използван 16,5% полиакриламиден разделящ гел и 4% полиакриламиден концентриращ гел на апарат Mini Protean II (Bio-Rad,USA), съгласно метода на Schägger (1987).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране, морфологично и биохимично охарактеризиране на щамо-вете изолирани от млечнокисели продукти (краве кисело мляко и козе сирене)

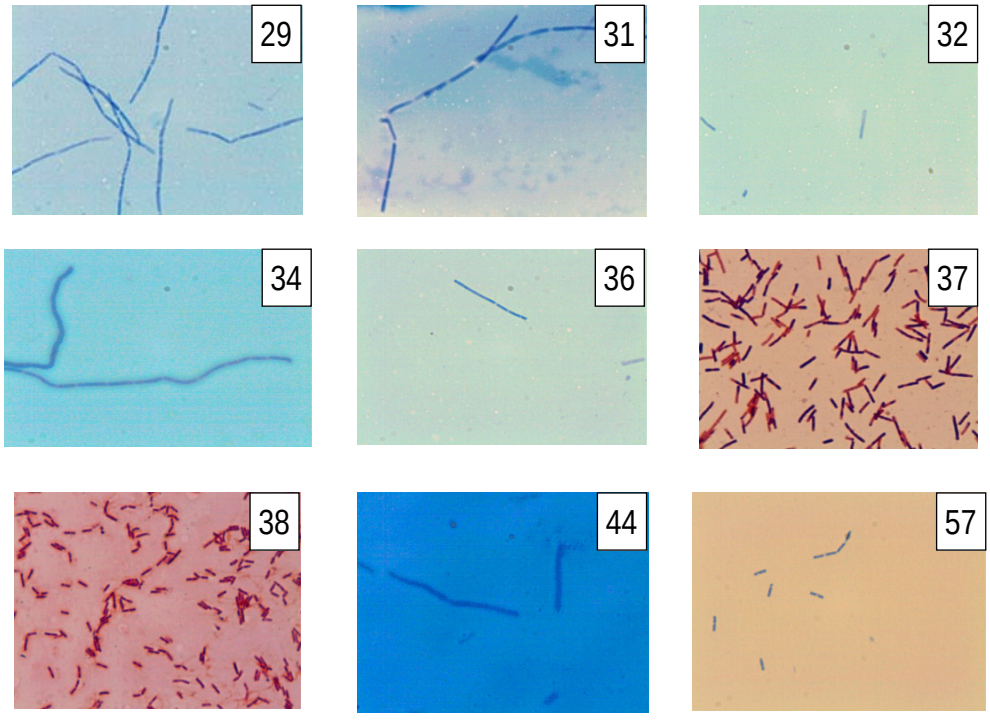
С помощта на класическите микробиологични подходи, бяха изолирани млечнокисели бактерии от два вида кисели млека – краве и овче и козе сирене. Пробите от краве и овче сирене бяха получени от г. Битола, Македония.

От използваните проби бяха изолирани до чисти култури 16 щама млечно кисели бактерии. За целта беше използвана среда MRS и температура 42^{o}C. Изолираните щамовете бяха анализирани микроскопски и им бяха идентифицирани с API тестове (фиг. 1 и 2).

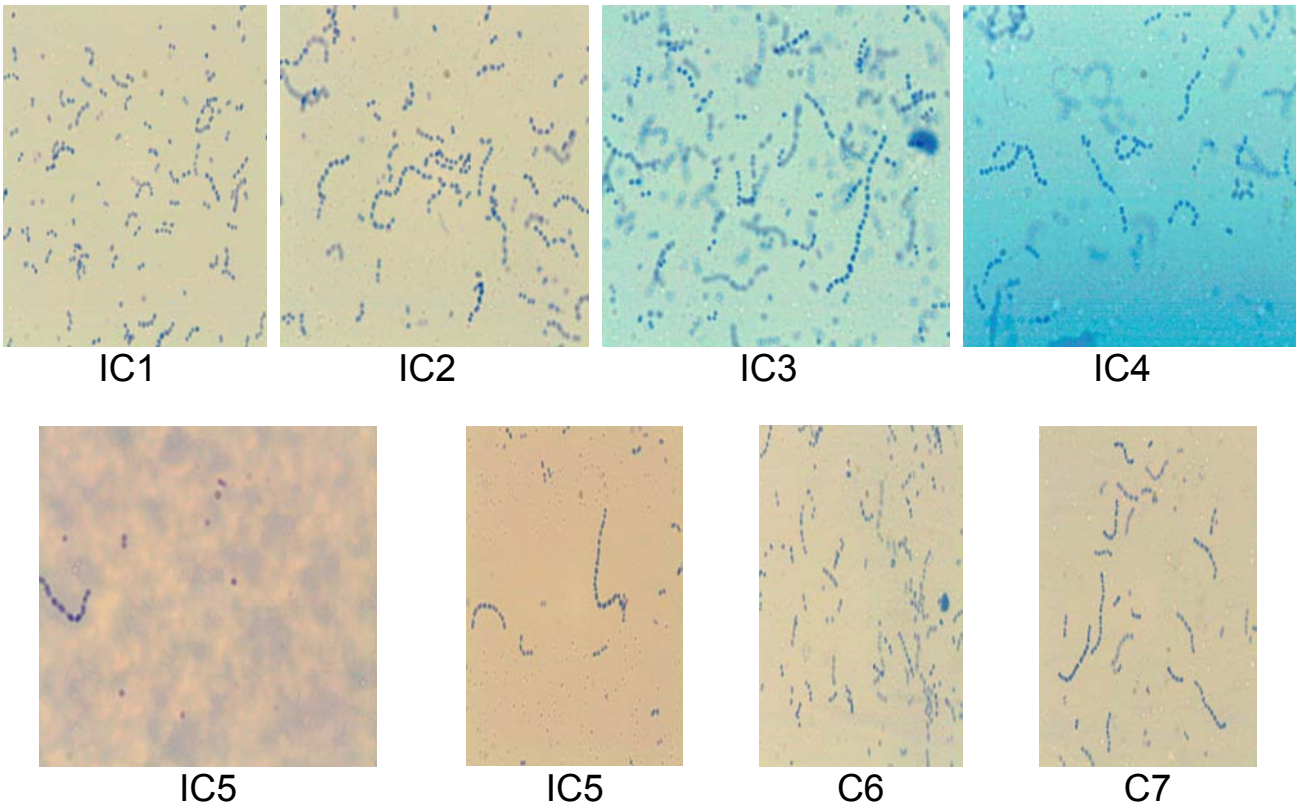
При наблюдение под светлинен микроскоп клетките на изолираните 16 щама, от които 9 имаха издължена пръчковидна форма, бяха разположени по единично, по двойки или във верижки (фиг. 2). Останалите 7 щама са коки.Те се оцветяваха положително по Грам и бяха неспорообразуващи.

Изолираните щамове дават отрицателна реакция за наличие на каталаза, което е типично за всички млечно кисели бактерии.

Млечно киселите бактерии могат да притежават хомоферментативен или хетероферментативен тип на ферментация, в зависимост от това дали превръщат въглехидратите напълно или частично в млечна киселина. Резултатите от проведения експеримент показаха, че всички изолирани щамове притежават хомоферментативен тип ферментация.



Фигура 1. Светлинно-микроскопска снимка на изолираните лактобацилни щамове.



Фигура 2. Светлинно-микроскопска снимка на изолираните стрептококи.

Проведеният експеримент показа, че всички тествани щамове, притежават способността да коагулират мляко. Инокулирани в обезмаслено мляко, те образуват плътен коагулум с цвик.

Видова идентификация на щамовете с API-тест

Видовата идентификация на изолираните щамове млечно кисели бактерии беше определена първоначално на базата на данните получени от тестовете за усвояване на 49 въглеродни източника, с помощта на кит API 50 CHL.

Резултатите по видовата идентификация на щамовете се обработиха с програмата IBIS (Intelligent Bacteria Identification System). Получените резултати показаха, че изследваните щамове се афилиират с различен процент на сходство към вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophillus*.

С най висок процент на сходство към *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – 99.8% се афилииряха щамове 37 и 57. С 99.7% на сходство се афилииряха щамове – 29, 32, 36, 38, 44. Щамове 34 и 31 показаха 99.4% сходство до този вид.

С най-висок процент на сходство към вида *Streptococcus thermophillus* са щамове IC3 и IC4 – 99,7%. Щамове IC1, IC2, IC5, C6 и C7 показаха 99.4% сходство до този вид.

Получените резултати от идентификацията на изолираните щамове показаха, че класическите подходи за таксономичното определяне на видове принадлежащи към двата рода са противоречиви и недостатъчно дискриминативни. Използването на морфологичните и физиологични анализи могат да бъдат използвани за да се характеризират успешно щамовете до ниво род, но те не са успешни за разграничаването на щамовете на един и същи вид. Недостатъците на класическите подходи за таксономично определяне могат да бъдат преодолени с използването на молекулярни методи.

Антибактериална активност

Антимикробната активност е търсено качество при подбора на щамове, тъй като щамове синтезиращи метаболитни компоненти, като органични киселини, мастни киселини, водороден прекис, бактериоцини показват антимикробни ефекти и имат защитен ефект (Tannock, 1992).

Антагонистичната активност срещу интестинални и хранителни патогени е важна част от пробиотичните функции на лактобацилите. Благодарение на способността си да продуцират различни антимикробни субстанции, те инхибират развитието на патогенни микроорганизми. Млечнокиселите бактерии, могат да продуцират разнообразни бактериоцини. Лактобацилите взаимодействат с патогените и предпазват организма от тях по различни механизми. Един от тях е свързан с продукцията на антимикробни вещества. Известно е, че млечнокиселите бактерии притежават антимикробна активност срещу редица Грам – положителни и Грам – отрицателни бактерии и фунги (*Garotte et al., 2000; Saloff-Coste, 1996*). Бактериоцините са извънклетъчни метаболити от микробната синтеза. Те представляват голяма група от антимикробни субстанции с белтъчна природа (пептиди). За бактериоцини се считат всички извънклетъчни първични или модифицирани продукти от рибозомалната бактериална синтеза, които имат относително тесен спектър на бактерицидно действие, включващ поне няколко щама от същия вид, от който е и щамът продуцент *(Jack et al.,2000).*

Изследваните от нас щамове бяха проучени за антимикробна активност. Резултатите получени от експеримента за антибактериална активност на безклетъчни и неутрализирани супернатанти на щамовете спрямо тест културите *E. coli* HB101 и *Listeria innocua* е представен на таблица 4.

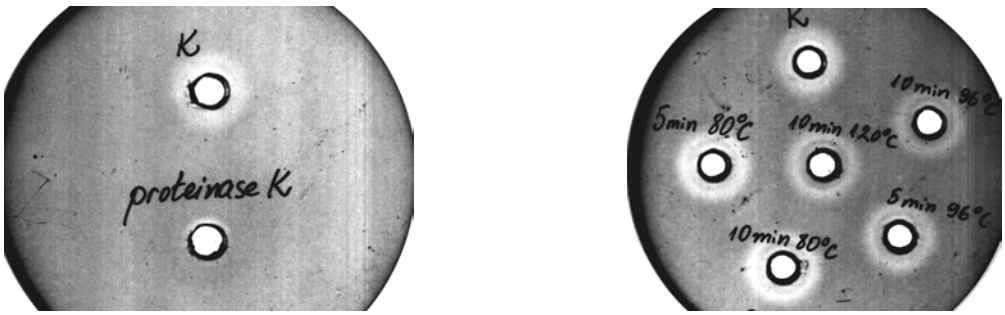
Получените резултати показаха, че щамове 37 (11 mm зона) и 57 (9mm зона) притежават антибактериална активност спрямо *E. coli* HB101, а спрямо *Listeria innocua*, активност показаха щамове 37, 57, IC3, IC6, IC7 (9mm зона). Само щамове 37 и 57, показаха антибактериална активност както спрямо *E. coli,* така и спрямо *Listeria innocua.*

Таблица 4. Антибактериална активност на изолираните щамове спрямо тест микроорганизми *E. coli* HB101 и *Listeria innocua.*

Щам	Активност спрямо *E. coli* – зона в mm	Активност спрямо *Listeria innocua* – зона в mm
***L. bulgaricus* 29**	0	9
***L. bulgaricus* 31**	0	0
***L. bulgaricus* 32**	0	0
***L. bulgaricus* 34**	0	0
***L. bulgaricus* 36**	0	0
***L. bulgaricus* 37**	11	8
***L. bulgaricus* 38**	0	0
***L. bulgaricus* 44**	0	0
***L. bulgaricus* 57**	9	9
***Str. thermophilus* IC1**	0	0
***Str. thermophilus* IC2**	0	0
***Str. thermophilus* IC3**	0	8
***Str. thermophilus* IC4**	0	0
***Str. thermophilus* IC5**	0	0
***Str. thermophilus* C6**	0	9
***Str. thermophilus* C7**	0	9

Неутрализирана супернатанта от щам 37, показващ най-добра активност срещу *E. coli* и *Listeria innocua,* беше изследана за определяне природата на инхибиращия фактор. Както се вижда от фигура 3а след обработка с протеиназа К пробата губи инхибиторната си активност. Използването на различна температурно третиране на пробата показа, че инхибиращият агент е температурно устойчив (120° за 10 min) (Фиг. 3б). На базата на получените резултати може да се предположи, че инхибиращият агент е бактериоцин.

а) *б)*



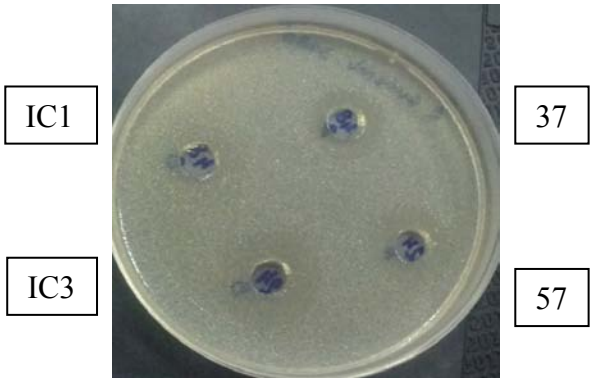
Фигура 3 (а и б). Антибактериална активност на щам *L. bulgaricus* 37 срещу *E. coli.*

Млечно-киселите продукти съдържат редица биоактивни пептиди. Основната причина за тяхното възникване е ензимна протеолиза от млечно кисели бактерии (Ivanova, I., et. al., 2013). По същество биоактивните пептиди произхождащи от млечни протеини въздействат върху

храносмилателната система, имунната система, сърдечно съдовата и нервната системи. (Ivanova, I., et. al., 2013).

Намерени са антибактериални пептиди с активни с широк спектър на действие срещу патогенни микроорганизми, като например *Escherichia, Helicobacter, Listeria, Salmonella u Staphylococcus*, дрожди и нишковидни гъби.

Суроватъчната фракция получена след 24h култивиране на тестваните щамове в обезмаслено мляко беше проверена за наличие на антибактериална активност срещу *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. Резултатите от този експеримент са показани на фигура 4.

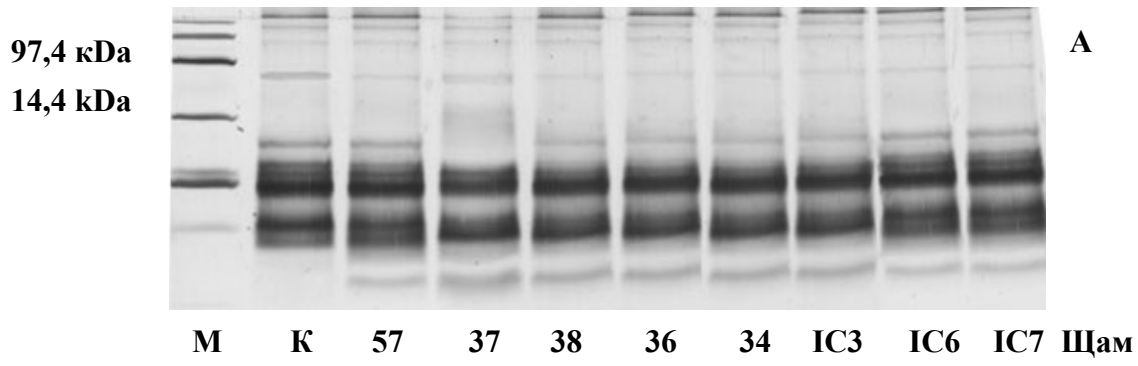


Фигура 4. Антимикробна активност на суроватъчна фракция, получена след култивиране на щамовете в обезмаслено мляко срещу *Staphylococcus aureus 746* на 24-тия час.

Получените резултатите от антимикробната активност срещу *St. aureus* и *E. coli* доказват активността на изследваната суроватъчна фракция само срещу *St. aureus.*

Срещу *St. aureus* най-силна активност проявяват щамове 37, 57, и IC3 малко по-слаба активност, проявява щам IC1.

Резултатите получени от трис трициновата електрфореза на суроватъчната фракция, показват формиране на нискомолекулни белтъчни фрагменти с молекулна маса 6 – 8 kDa отколкото белтъците представени в контролата (суроватка получена без култивиране на щамовете) (Фиг. 5).



Фигура 5. Трис-Трицин ПААГЕ на суроватъчната фракция, получена след 24 часа култивиране на тестваните щамове в обезмаслено мляко.

Получените резултати свидетелстват, че при култивирането на всички тествани щамове (57, 37, 38, 36, 34, IC3, IC6, IC7) в обезмаслено мляко се формират нискомолекулни белтъчни фрагменти с молекулна маса около 6 – 8 kDa.

Проявената антибактериална активност само при някои от изследваните щамове на суроватката получена след култивиране на бактериите в обезмаслено мляко, води до заключението, че тази активност се дължи на образуваните белтъци в резултат на протеолитична активност от страна на тестваните щамове. Все още остава открит въпроса за природата на новообразуваните пептиди.

От проведените изследвания както при култивиране в MRS среда и в обезмаслено мляко, щамовете 37, 57 и IC3 показват стабилна антимикробна активност.

Чувствителност към антибиотици

Чувствителността на изолираните щамове беше тествана към едни от най-често използваните антибиотици – Гентамицин, Ампицилин, Хлорамфеникол, Тетрациклин, Стрептомицин и Пеницилин.

Получените резултати са обобщени в таблица 5. Получените резултати показаха, че изолираните щамове се повлияват силно от тестваните антибиотици. Към Пеницилин, Ампицилин Тетрацилклин и Хлорамфеникол всички щамове имаха много силна чувствителност. Към аминогликозидните антибиотици, като Гентамицин и Стрептомицин, които имат широкоспектърно действие, повлиявайки иницииране на протеинената синтеза, щамовете показаха по-слаба чувствителност. Щам С7 единствен прояви резистентност към антибиотика Гентамицин. Чувствителността на млечнокиселите бактерии към антибиотици, използвани при терапия особено на чревни инфекции се счита, като нежелателна. Млечнокиселите бактерии са чувствителни към антибиотици и за това при антибиотична терапия ефективността на пробиотиците и функционалните храни намалява. От друга страна напоследък много автори изразяват хипотезата, че бактериите, които нормално се срещат в човешкия организъм, включително млечно киселите бактерии, могат да служат като източник на гени за антибиотична резистентност, трансферирайки тези гени към човешките патогени (Mathur S., Singh R. 2005). Установено е също така, че някои лактобацили притежават висока естествена резистентност (Danielsen and Wind, 2003), а при други е установено, че резистентността се дължи на спонтанна мутация (Curragh and Collins, 1992), на транспозони или е плазмидно детерминирана (Tannock, 1987; Langella et al., 1993). Clewell, 1993; Salyers et al., 1995).

Стартерните бактерии въведени в организма посредством консумацията на млечно киселите продукти преминават в големи количества в

тънките черва, където взаимодействат с останалата чревна микрофлора. В тази връзка се налага и схващането, че използването на стартерните култури, притежаващи гени за резистентност към антибиотици е предпоставка за създаване на патогенни микроорганизми с кръстосана антибиотична резистентност (WHO, 1997) и е необходим внимателен подбор на стартерните култури (Mathur S., Singh R. 2005)

Таблица 5. Антибиотична чувствителност на изолираните млечно кисели щамове

Щам	Антибиотици (стерилна зона в mm)					
	G*	A*	C*	T*	S*	P*
Щам 29	13	25	28	27	15	23
Щам 31	>40	>40	>40	>40	22	>40
Щам 32	22	>40	>40	>40	35	>40
Щам 34	15	36	37	29	16	27
Щам 36	18	>40	>40	>40	26	>40
Щам 37	16	34	28	26	19	30
Щам 38	20	>40	>40	>40	27	>40
Щам 44	16	28	27	28	17	28
Щам 57	15	36	38	32	20	35
Щам IC1	20	>40	>40	>40	30	>40
Щам IC2	9	29	27	27	14	26
Щам IC3	15	35	30	25	18	32
Щам IC4	13	25	25	26	16	13
Щам IC5	14	>40	>42	>40	18	>40
Щам C6	13	22	28	24	15	24
Щам C7	0	32	30	21	10	34

*****G – Гентамицин, A – Ампицилин, C – Хлорамфеникол, T – Тетрациклин, S – Стрептомицин , P – Пеницилин*

2. Изследване усвояването на галактоолигозахариди и фруктоолигозахариди

Проследяване кинетиката на бактериалния растеж и изчисляване на растежните параметри на щамовете култивирани на MRS среда.

Основните параметри характеризиращи растежа на бактериалната популация са n – броя деления; V – константа на скоростта на делене (броя деления за 1h); G – генерационното време (времето необходимо за едно делене). Тъй като всяка бактериална популация съдържа известен брой клетки, които не се делят се изчислява и μ – специфичната скорост на растеж, която показва изменението на биомасата за определено време. За изчисляване ефективността на растеж на щамовете се

изчислява Y – икономическия коефициент или клетъчния добив, който показва какво е количеството на биомасата достигнато през стационарната фаза. За да се установи, каква е специфичната скорост на изразходване на субстратите или образуване на продуктите се изчислява метаболитният коефициент – q (физиологичната активност).

Стойностите на растежните параметри на 16 изследвани щама са представени в таблица 6.

Таблица 6. Параметри на растеж на щамовете върху MRS – глюкоза и MRS – лактоза.

Параметър/щам	μ, (глюкоза) [h^{-1}]	pH (глюкоза)	μ, (лактоза) [h^{-1}]	pH (лактоза)
***L. bulgaricus* 29**	0,28±0,008	3,83	0,21±0,008	3,83
***L. bulgaricus* 31**	0,25±0,016	3,87	0,22±0,016	3,87
***L. bulgaricus* 32**	0,22±0,012	3,82	0,24±0,012	3,82
***L. bulgaricus* 34**	0,24±0,009	3,80	0,19±0,009	3,80
***L. bulgaricus* 36**	0,22±0,009	3,91	0,20±0,009	3,91
***L. bulgaricus* 37**	0,40±0,005	4,00	0,36±0,005	4,00
***L. bulgaricus* 38**	0,21±0,012	4,08	0,24±0,012	4,08
***L. bulgaricus* 44**	0,18±0,005	3,81	0,21±0,005	3,81
***L. bulgaricus* 57**	0,35±0,008	3,87	0,41±0,008	3,87
***Str. thermophilus* IC1**	0,22±0,008	4,00	0,35±0,008	4,00
***Str. thermophilus* IC2**	0,26±0,005	3,94	0,36±0,005	3,94
***Str. thermophilus* IC3**	0,28±0,012	3,92	0,41±0,012	3,92
***Str. thermophilus* IC4**	0,28±0,005	3,81	0,39±0,005	3,81
***Str. thermophilus* IC5**	0,14±0,009	3,95	0,22±0,009	3,95
***Str. thermophilus* C6**	0,19±0,005	4,08	0,25±0,005	4,08
***Str. thermophilus* C7**	0,20±0,005	4,01	0,29±0,005	4,01

± – стандартно отклонение.

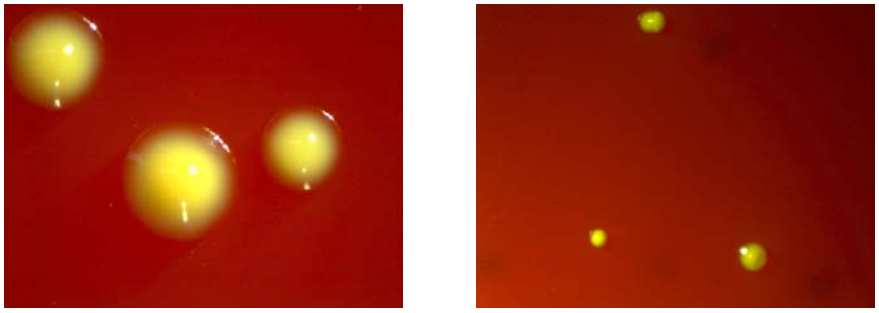
От данните в таблицата е видно, че върху MRS среда специфичната растежна скорост е най-висока при *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4. Съгласно стойностите получени за специфичната скорост на растеж – μ най-бавно растат щамовет *L. bulgaricus* 44 и *Str. thermophilus* IC5. При култивиране на MRS-лактоза изследваните стрептококи показват по-висока специфичната скорост на растеж от лактобацилите. С най-висока растежна скорост са щамове *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, *Str. thermophilus* IC2, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4.

При млечнокиселите бактерии притежаващи хомоферментативен път на разграждане на въглехидратите се получава повече от 90% млечна киселина като краен продукт на ферментацията. Изследваните от нас щамове подкисляват еднакво добре средата при култивиране на среда с глюкоза и лактоза.

От литературата има редица данни по отношение на скоростта на използване на субстрата глюкоза, като при едни тя бързо се изчерпва до 10 час, докато други видове имат дълга логаритмична фаза до 20 часа.

За да се проследи, какво е влиянието на въглехидратите и олигозахаридите с пребиотичен ефект върху растежа на щамове *Lactobacillus delbrueckii* и *Streptococcus thermophilus* е проведен първичен скрининг. Върху агарови среди съдържащи MRS-фруктоолигозахарид и MRS-галактоолигозахарид морфологично се идентифицират изследваните щамове за способността им да метаболизират съответните олигозахариди.

От получените резултати може да се каже, че щамовете, които метаболизират олигозахаридите с продуциране на киселини и техният растеж е като колонии заобиколени от жълта зона по-голяма от 3 мм на фона на червено-виолетовата среда. Неферментиращите колонии са по-малки и бели без жълти зони. Независимо, че основната сдреда е достатъчно ефективна да предизвиква образуване на колонии при всички изследвани щамове, само някои от изследваните щамове могат да ферментират олигозахаридите с достатъчно продукция на киселина, която да измени цвета(Фигура 6). Тези наши изследвания са подобни на такива направени от други автори (Kaplan et.al., 2000; Sghir et.al., 1998; Ignatova, Tz. et al., 2009). В резултат на проведената морфологича характеристика доказваща растежа на изследваните щамове на различни олигозахариди бе пристъпено към ферментационни експерименти.



Фигура 6. Микроскопски анализ на изслеваните щамове.
Фотографиите са направени с бинокулярен стереомикроскоп Olympus CX31 с цифрова камера SC 20.

Стойностите на растежните параметри на 16 изследвани щама метаболизиращи съответно галактоолигозахарид и фруктоолигозахарид са представени в таблица 7.

От даните в таблица 7 е видно, че изследваните щамове слабо метаболизират фруктоолигозахарида, като най-висока специфичната скорост на растеж е установена при щамове *L. bulgaricus* 31 и *L. bulgaricus* 37. Най-ниско pH на средата на 24 h от култивирането е измерено за щам *L. bulgaricus* 31. За да се включат в метаболизма на *Lactobacillus*, фруктоолигозахаридите трябва да се хидролизират до съответните хексози под действието на хидролази. Под действието на ензимите хидролази първо се атакува връзката между крайната глюкозна молекула и фруктозата, която е от типа α (1→2). Връзките между фруктозните молекули, които са от

типа β (2→6) при леваните и β (2→1) при инулина се разграждат под действието на β – фрукофуранозидазите. Според (Lefteris et.al., 2005) видовете *L. acidophilus IBB801* и *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei 8700:2* са способни да ферментират олигофруктоза, като източник на енергия и олигофруктоза обогатена с инулин, но само видът *L. paracasei subsp. paracasei 8700:2* може да ферментира дълги вериги инулин.

Таблица 7. Параметри на растеж на щамовете върху MRS с фруктоолигозахарид (ФОЗ) и MRS с галактоолигозахарид (ГалОЗ).

Параметър/щам	μ, (ФОЗ) [h^{-1}]	pH (ФОЗ)	μ, (ГалОЗ) [h^{-1}]	pH (ГалОЗ)
***L. bulgaricus* 29**	0,09±0,014	5,62	0,24±0,008	4,15
***L. bulgaricus* 31**	0,13±0,005	6,00	0,22±0,012	4,09
***L. bulgaricus* 32**	0,07±0,022	5,96	0,24±0,021	4,09
***L. bulgaricus* 34**	0,12±0,012	5,16	0,41±0,021	3,90
***L. bulgaricus* 36**	0,09±0,012	5,70	0,31±0,012	4,12
***L. bulgaricus* 37**	0,31±0,008	4,90	0,48±0,012	4,06
***L. bulgaricus* 38**	0,05±0,005	5,85	0,27±0,012	4,25
***L. bulgaricus* 44**	0,06±0,008	5,74	0,30±0,012	4,13
***L. bulgaricus* 57**	0,11±0,008	5,27	0,42±0,005	4,05
***Str. thermophilus* IC1**	0,05±0,005	5,90	0,21±0,008	4,66
***Str. thermophilus* IC2**	0,10±0,009	5,61	0,08±0,005	5,83
***Str. thermophilus* IC3**	0,12±0,012	5,16	0,58±0,012	3,93
***Str. thermophilus* IC4**	0,10±0,009	5,66	0,48±0,021	4,14
***Str. thermophilus* IC5**	0,08±0,008	5,96	0,34±0,005	4,18
***Str. thermophilus* C6**	0,06±0,012	6,10	0,33±0,014	4,18
***Str. thermophilus* C7**	0,08±0,012	6,00	0,30±0,014	4,28

± – стандартно отклонение.

От изследванията на Delphine et.al. (2007) е доказано, че при разграждането на късите вериги фруктоолигозахарид (scFOS), получения тризахарид 1-кестоза се утилизира с предимство в сравнение с тризахарида нистоза и пентазахарида фруктофуранозил нистоза. Разграждането на scFOS се извършва чрез захарозофосфоенол пируват транспортните системи (PTC) и β-фруктофуранозидаза. Под действието на ензимите пируватформат лиаза и пируват дехидрогеназа основните крайни продукти на ферментацията са лактат и ацетат.

Растежните параметри в таблица 7 показват, че галактоолигозахаридите много добре се метаболизират от всичките изследвани 16 щама. От данните в таблицата е видно, че върху MRS –ГалОЗ специфичната растежна скорост е най-висока при три лактобацилни щама *L. bulgaricus* 34, *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, както и при *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4. Най-добре подкисляват средата с галактоолигозахарид щамове 34 и IC3.

Галактоолигозахаридите са изградени от основна субединица [-D-глюкопиранозил-(1,4)-D-галактопиранозил-(1,6)]n, където n=2-5. Образуват се чрез реакции на трансглюкозилиране. Под действието на ензимите β-галактозидази и α-галактозидази се разграждат до млечна киселина, формиат, пропионат или ацетат. Под действито на хидролазни ензими галактоолигозахаридите се разграждат до D-глюкоза, D – галактоза и D – лактоза. Глюкозата се включва в пътя на ЕМП. Лактозата се хидролизира под действието на 3 – галактозидази до D – галактоза и D – глюкоза. D – галактоза се фосфорилира до D – галактозо-1-фосфат, който под действието на уридин трифосфат, като кофермен се превръща в глюкозо-1-фосфат и се включва в пътя на гликолизата.

От направения предварителен анализ по отношение на усвояването на лактозата и галакто-олигозахаридите се установи, че някои от изследваните щамове имат висока растежна скорост. В тази връзка бяха изследвани разликите в екпресията на ензимите α-галактозидаза и β-галактозидаза при щамове *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4.

Таблица 8. *α-Галактозидаза и β-галактозидаза* на щамове *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4 върху различни хранителни среди с лактоза, фруктоолиго захарид (ФОЗ), галактоолигозахарид (ГалОЗ) и обезмаслено мляко.

Хранителна среда	Щам/параметър	*L. bulgaricus* 37	*L. bulgaricus* 57	*Str. thermophilus* IC3	*Str. thermophilus* IC4
MRS-лактоза	*α-галактозидаза (U/mg)*	0,038 ± 0,004	–	0,047 ± 0,004	0,021 ± 0,002
MRS-лактоза	*β-галактозидаза (U/mg)*	0,208 ± 0,074	0,236 ± 0,033	0,324 ± 0,027	0,306 ± 0,022
Мляко+ГалОЗ	*α-галактозидаза (U/mg)*	0,108 ± 0,024	-	0,147 ± 0,015	0,128 ± 0,014
Мляко+ГалОЗ	*β-галактозидаза (U/mg)*	0,376 ± 0,074	0,436 ± 0,033	0,528 ± 0,030	0,506 ± 0,035
MRS-ГалОЗ	*α-галактозидаза (U/mg)*	0,022 ± 0,001	-	0,025 ± 0,003	0,019 ± 0,002
MRS-ГалОЗ	*β-галактозидаза (U/mg)*	0,142 ± 0,032	0,112 ± 0,024	0,154 ± 0,028	0,306 ± 0,022
MRS-ФОЗ	*α-галактозидаза (U/mg)*	–	–	–	–
MRS-ФОЗ	*β-галактозидаза (U/mg)*	–	–	–	–

Активността на β-галактозидазата при всички изследвани щамове е два пъти по-висока при култивиране на среда с мляко в сравнение с модифицирана MRS с лактоза като единствен въглехидратен източник (таблица 8). При използване на галактоолигозахарид, като субстрат активността на ензима е най-ниска, което показва, че той е по-слаб индуктор.

Активността на ензима α-галактозидаза е 10 пъти по-ниска в сравнивие с β-галактозидазата при използване както на мляко така и на лактоза и галактоолигозахарид като единствен въглехидратен източник при щамове *L. bulgaricus* 37, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4, докато при *L. bulgaricus* 57 такава не се установи. При използване на ФОЗ като основен субстрат не се отчете активност и за двата ензима. Получените от нас резултати се потяърждават и от други автори (Tabasco, R., et al., 2014).

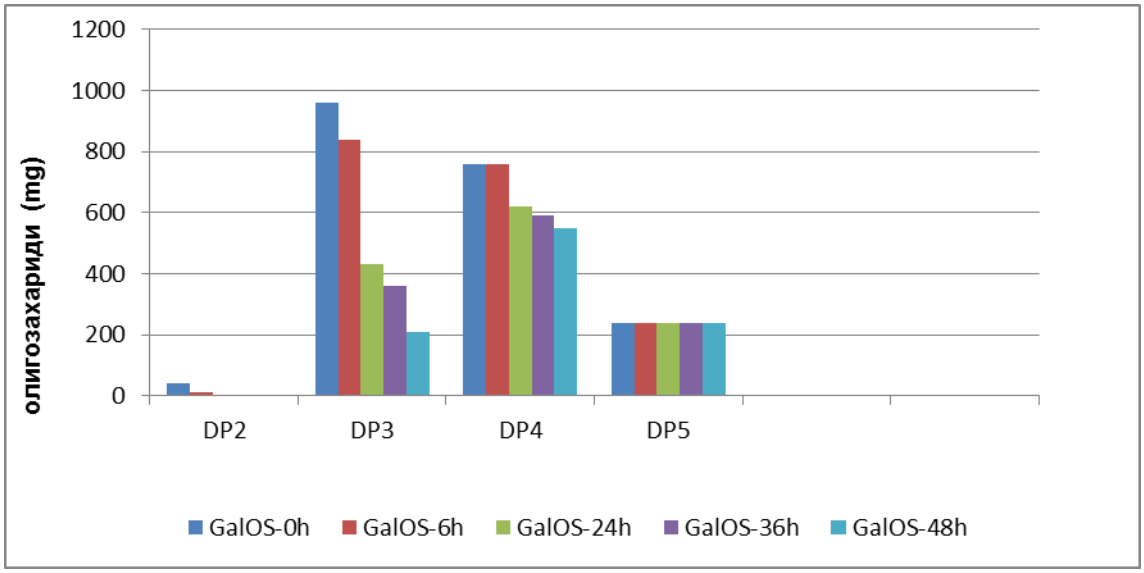
Анализ на остатъчното количество олигозахариди.

Остатъчното количество галактоолигозахариди бяха анализирани с HPLC анализ. Основните резултати са представени на фигури 7 и 8. Тези изследвания са проведени само със щамове *Lactobacillus bulgaricus* 37 и *Lactobacillus bulgaricus* 57, поради показаното по-добро усвояване на галактоолигозахарид. Най-интензивно се използва галактоолигозахарид със СП-2 и СП 3, вероятно те постъпват в клетката, като дизахариди. И двата щама *Lactobacillus bulgaricus* 37 и *Lactobacillus bulgaricus* 57 не могат да използват галактоолигозахарид със СП-5. Наблюдава се щамова специфичност по отношение скоростта на усвояване на олигозахаридите с различна степен на полимеризация. И двата щама консумират изцяло дизахаридите. Усвояването на ГалОЗ със СП 3 е по-интензивно през първите 24 часа при щам *L. bulgaricus* 57 – 51% от вложеното количество. При щам *L. bulgaricus* 37 се усвояват 55% от вложените ГалОЗ със СП 3 в първите 24 часа от култивирането, като в края на процеса (48 час) остават неусвоени само 22%. Двата щама усвояват ГалОЗ със СП 4 с различна скорост. Щам *L. bulgaricus* 57 усвоява 39% от посочените олигозахариди до края на култивирането за сметка на по-висок процент остатъчни ГалОЗ със СП 3. В сравнение с него щам 37 усвоява само 28% от ГалОЗ със СП 4 за сметка на по-виския процент усвоени ГалОЗ със СП 3 – 78%. По отношение на усвояването на галактоолигозахариди от изследваните щамове *Str. termophilus* беше установено, че два от тях IC3 и IC4 имат най-висока специфична скорост на растеж. Измерената активност на β-галактозидаза при култивиране на среда MRS-ГалОЗ е най-висока сред изследваните щамове. Необходимо е да се отбележи, че с най-висока скорост се метаболизират олигозахаридите със СП 2 и СП 3 (фиг. 9). Галактолоигозахаридите с СП 3 се усвояват до 98%, а тези с СП4 само 25%.

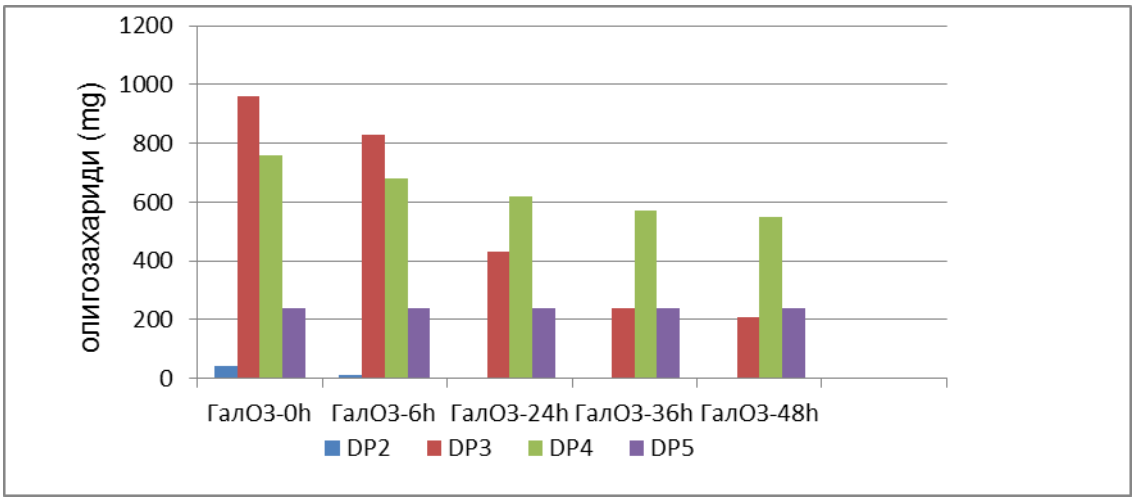
Получените резултати за усвояването на ГалОЗ, отчетена при култивирането на щамовете, са в корелация с резултатите за активността на β-галактозидазата.

С най-ниска специфична скорост на растев тестваните щамове имат на среда с фруктоолигозахариди. Следва да се предположи, че изследваните щамове не притежават или не експресират различни гликохидролазни ензими, отговорни за хидролизата на фруктоолигозахариди. Сравнително малко данни има в литературата за наличие на специфични ензими, разграждащи рядко срещащи се фруктозилни връзки.

Това до каква степен се ферментират въглехидратите вероятно зависи от тяхната структура и типа гликозидни връзки. Пребиотичният потенциал на олигозахаридите зависи не само от наличието на специфични ензими в млечнокиселите бактерии, но както и транспорта на тези вещества в микробната клетка или способността им да се адхезират върху клетъчната стена.



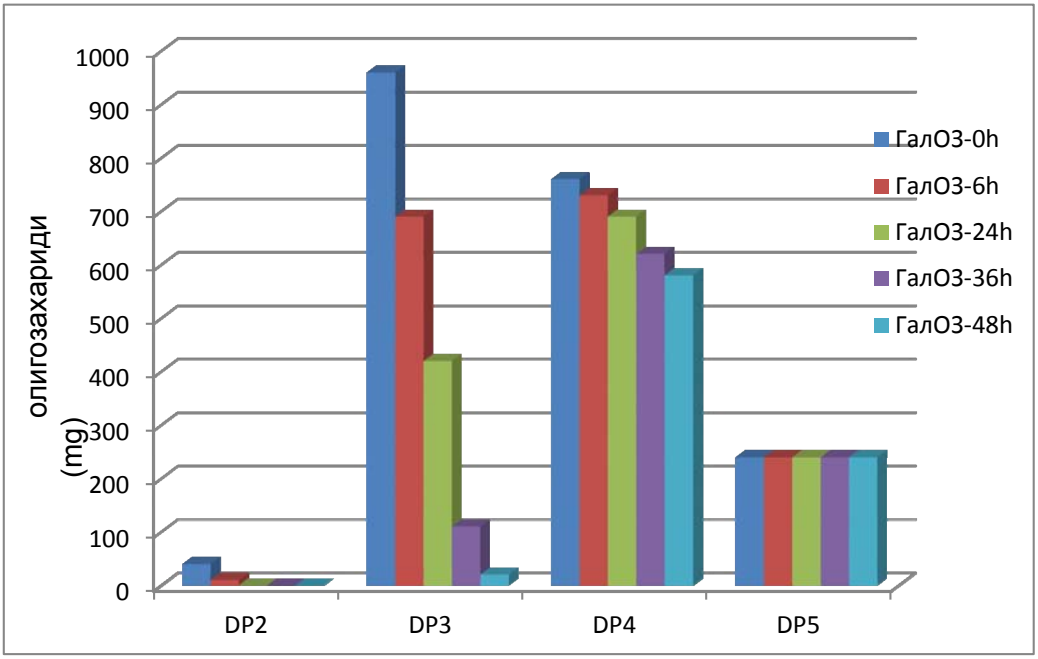
Фигура 7. Остатъчно количество олигозахариди при ферментацията на галактоолигозахарид от *Lactobacillus bulgaricus* 37. Използвани съкращения: DP-степен на полимеризация; ГалОЗ-галактоолигозахарид.



Фигура 8. Остатъчно количество олигозахариди при ферментацията на галактоолигозахарид *от Lactobacillus bulgaricus* 57. Използвани съкращения: DP-степен на полимеризация; ГалОЗ-галактоолигозахарид.

Има данни, че различни късоверижни въглехидрати с различни захарни компоненти и молекулно тегло се метаболизират и от основните видове обитаващи стомашно-чревният тракт на животните и човека (Van Laere et.al., 1997). Показано е, че фруктаните се ферментират много добре от *Clostridium*, а много малко видове са способни да фермен-

тират арабиноксилана. *Bifidobacterium* използват първо въглехидратите с ниска степен на полимеризация, а *Bacterioides* първо тези с висока. Следователно структурата на въглехидратите и бактериалните видове присъстващи в чревната екосистема са вероятно важен фактор за контролиране на ферментацията им. Kaplan and Hutkins, (2003), скринират 28 вида млечнокисели бактерии и показват, че те имат способност да метаболизират фруктоолигозахариди, като 12 от 16 вида *Lactobacillus* и 7 от 8 вида *Bifidobacterium* са способни да ферментират фруктоолигозахаридите, а 8 от изследваните *Enterobacteriaceae* не метаболизират фруктоолигозахаридите. Известно е, че видът *Lactobacillus plantarum WCFS1* е пробиотик изолиран от човешката слюнка (Molin, 2001). Една от важните характеристики на този вид е способността му да метаболизира различни въглехидрати, като монозахариди (глюкоза, маноза и галактоза), дизахариди (захароза, лактоза и трехалоза) и тризахариди (рафиноза и мелезитоза).



Фигура 9. Остатъчно количество олигозахариди при ферментацията на галактоолигозахарид от *Streptococcus thermophilus* IC3. Използвани съкращения: DP-степен на полимеризация; ГалО3-галактоолигозахарид.

Продукция на млечна киселина и оцетна киселина.

Хомофрментативните млечнокисели бактерии ферментират хексозите, като 90% от глюкозата се метаболизира в млечна киселина, поради високата активност на лактат дехидрогеназата.

В настоящата работа беше установено, че щамове *L. bulgaricus 37, L. bulgaricus 57, Str. thermophilus IC3 u Str. thermophilus IC4* продуцират различни количества млечна киселина и оцетна киселина в зависимост от вида на използваните въглехидратни източници и мляко (таблица 9). При сравняване на крайните продукти на ферментацията на глюкоза,

лактоза, и галактоолигозахарид основното заключение е, че продукцията на млечна киселина намалява незначително. Интересно е да се отбележи, че оцетна киселина киселина е установена само при използването на галактоолигозахариди. При култивиране върху обезмаслено мляко количеството на млечна киселина е два пъти по-високо в сравнение с това при лактоза, а не се детектира продукция на оцетна киселина. Незначителни са разликите при изучаваните щамове.

Таблица 9. Концентрация на млечна киселина и оцетна киселина при ферментация на щамове *L. bulgaricus* 37, *L. bulgaricus* 57, *Str. thermophilus* IC3 и *Str. thermophilus* IC4 върху различни хранителни среди с лактоза, фруктоолигозахарид(ФОЗ), галактоолигозахарид (ГалОЗ) и обезмаслено мляко.

Хранителна среда	Щам /параметър	*L. bulgaricus* 37	*L. bulgaricus* 57	*Str. termophilus* IC3	*Str. thermophiles* IC4
MRS-лактоза	Млечна киселина (μmol/ml)	49,7 ± 0,3	55, ± 0,3	48,4 ± 0,3	41,8 ± 0,3
MRS-лактоза	Оцетна киселина (μmol/ml)	–	–	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02
Мляко+ГалОЗ	Млечна киселина (μmol/ml)	80,3± 0,5	69,7± 0,4	65,7± 0,4	74,7± 0,4
Мляко+ГалОЗ	Оцетна киселина (μmol/ml)	–	–	–	–
MRS-ГалОЗ	Млечна киселина (μmol/ml)	34,4± 0,2	26,2± 0,2	38,1± 0,2	31,1± 0,2
MRS-ГалОЗ	Оцетна киселина (μmol/ml)	1,7 ± 0,01	1,8 ± 0,01	1,1 ± 0,01	0,8 ± 0,01
MRS-глюкоза	Млечна киселина (μmol/ml)	55,4 ± 0,3	59,8 ± 0,3	52,5 ± 0,2	48,8 ± 0,2
MRS-глюкоза	Оцетна киселина (μmol/ml)	–	–	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02
MRS-ФОЗ	Млечна киселина (μmol/ml)	31,2 ± 0,2	–	–	–
MRS-ФОЗ	Оцетна киселина (μmol/ml)	–	–	–	–

Най-общо казано олигозахаридите спомагат за растежа на млечнокиселите бактерии. Хипотетично в стомашно-чревния тракт тези млечнокисели бактерии, които имат специфични ензимни активности за пребиотичните субстрати имат потенциал да се конкурират с другите микроби. Получените от нас резултати еднозначно показват, че при използване на галактоолигозахариди мечнокиселите бактерии са способни да образуват крайни продукти типични за смесена ферментация.

Подобни наблюдения има в работите на Kontula et al. (1998), когато β-глюкоолигозахаридите и ксило-олигозахаридите се използват като субстрати. В работите на Sjőberg (1992) изследващи метаболизма на хомоферментативния *Lactococcus lactis* при ферментация на малтоза бе установено, че последния се изменя в посока на смесена ферментация. Механизмът, индуциращ метаболитната промяна към смесена ферментация не може да бъде в настоящия момент обяснен в детайли и най-вероятно тази промяна може да бъде идентифицирана чрез генна експресия (Garrigues et al., 1997). В дебелото черво присъстват както монозахаридите, така и олигозахаридите, което означава че е възможно да се препокриват ферментационни пътища. Гладуването най-вероятно е един от факторите, който изменя метаболизма от хомоферментативен към смесено-кисела ферментация (Thomass et al., 1979; Borch et al., 1991). От получените от нас резултати може де се предположи, че някои млечнокисели бактерии могат индивидуално да променят ферментационният модел, като това зависи от достъпните субстрати и метаболитните пътища на щамовете.

Стойностите на pH обаче не могат да дадат напълно обяснение за това, по какъв начин се метаболизират въглехидратите и олигозахаридите (Hartemink, 1997). Не всички видове продуцират достатъчно киселини, за да намалят pH на средата значително. От друга страна MRS средата е богата на белтъци и АК, а някои видове метаболизират белтъците, заедно с въглехидратите, което води до получаване на алкални продукти. Така, че от промяна в pH не може да се съди дали се метаболизират въглехидратите и в каква степен.

Устойчивостта на лактобацилните щамове към кисело pH е свързана със синтезата на специфични протеини. Установено е, че при понижаване на pH до 4,75 се експресират три (heat shock proteins) протеина (GroES, GroEL и DnaK) в *L. bulgaricus* (Lim et.al., 2000), а понижаването на pH до 4,5 води до синтезирането на девет протеина (14,1 до kDa) при *L. acidophilus* (Lorca and Fond de Valdez, 2001).

Антибактериална активност на неутрализирани супернатанти, получени след култивиране на щамовете върху въглехидрати и олигозахариди.

Получените резултати показаха, че само щамове 37 и 57, показаха антибактериална активност както спрямо *E. coli,* така и спрямо *Listeria innocua.*

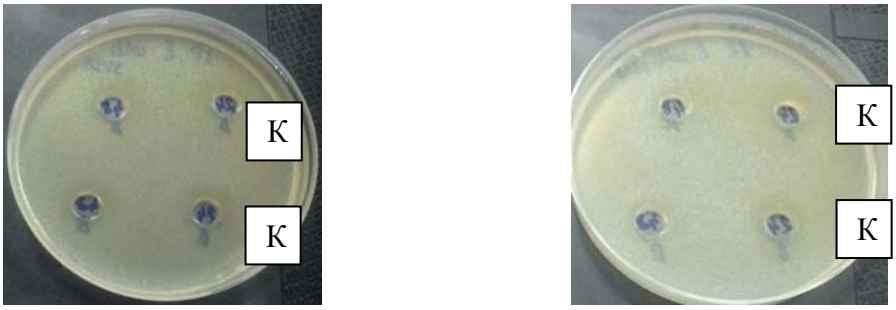
Ние проследихме антибактериалната активност, спрямо тест култура *E. coli HB101* при култивиране на модифицирана MRS-ГалО3. Резултатите получени от нас са показани на фигура 10.

Способността на млечнокиселите бактерии да синтезират инхибиращи субстанции, наравно с продуцирането на млечна киселина и H_2O_2, е един от факторите, потискащ развитието на патогенните микроорга-

низми от естествената микрофлора. За да се диференцира антимикробният ефект на млечната киселина от този на евентуално синтезирани други антимикробни субстанции (напр. бактериоцини) бе изпитано действието на супернатанти, получени след култивиране на изолатите в течна среда MRS и след корегиране на pH до 5.6 – 6.0.

След обработка с протеиназа К активността на неутрализираната супернатанта от щам 37, култивиран на среда MRS-ГалОЗ на 24 и 48 час губи своята активност. Изплолзването на различна температурно третиране на пробата показа, че инхибиращият агент е температурно устойчив (120^{o} за 10 min).

В литературата няма много данни относно образуването на биологично активни вещества от млечно кисели бактерии култивирани в среди съдържащи олигозахариди. В работи проведени от Leroy, 2006 и Chen et.al., 2007, бе установено, че различни въглехидрати (декстроза, рафиноза, трехалоза и фруктоолигозахариди) използвани, като единствен въглехидратен източник при култивиране на бактериоцин-продуциращи щамове, само фруктоолигозахарида и трехалоза спомагат за увеличаване на бактериоциновата активност. Най-вероятно разнообразието на енергетически субстрати стимулира продукцията на антимикробни пептиди.



а) температурно третиране б) третиране с протеиназа К

Фигура 10 (а и б). Антибактериална активност на щам *L. bulgaricus* 37 срещу *E. coli.*

Също така при in vitro опити с *Bifidobacterium sp*., растящи върху фруктоолиго-захариди се наблюдава, че те продуцират инхибиторни субстрати, които са антагонисти в различна степен срещу *Salmonella, Listeria, Camylobacter, Shigella* и *Vibrio* (Gibson, 1994a).

От получените резултати от Chen et.al., 2007 и Ignatova, et al., 2009 се доказва, че фруктоолигозахаридите и рафинозата най-силно повлияват продукцията на биологично-активни вещества. В настоящата работа използването на галактоолигозахариди запазва и не повлиява синтезата на антимикробни компоненти от изследваните щамове.

Усвояването и транспорта на галактоолигозахариди от млечнокиселите бактерии е слабо проучено. Вероятният механизъм за усвояването им е чрез ензимна хидролиза с участието на β-галактозидазата. Актив-

ността на β-галактозидазата в родовете *Lactobacillus, Streptococcus* и *Leuconostoc* е локализирана в цитоплазмата (Nguyen, et al., 2007). Резултатите от нашите изследвания показват стимулиране секрецията на β-галактозидазата при култивиране на изследваните щамове на среда с галактоолигозахариди. Транспортните системи на галактоолигозахариди не са идентифицирани и затова млечнокиселите бактерии използват ГалОЗ с ниска степен на полимеризация (Gopal et al., 2001). Млечно киселите бактерии използват захарите чрез вторичния активен транспорт, протон транспортна система или чрез АТФ-зависима система. Така например при изследването на *L. paracasei 1193* е показано, че транспорта не е свързан с АТФ-зависима транспортна система. Също така способността на *L. paracasei 1193* да акумулира фруктоолигозахарида е чувствителна към о-ванадат. Този агент е активен инхибитор на така наречената АТР-свързваща касетна (ABC) транспортна система (Kaplan and Hudkins, 2003).

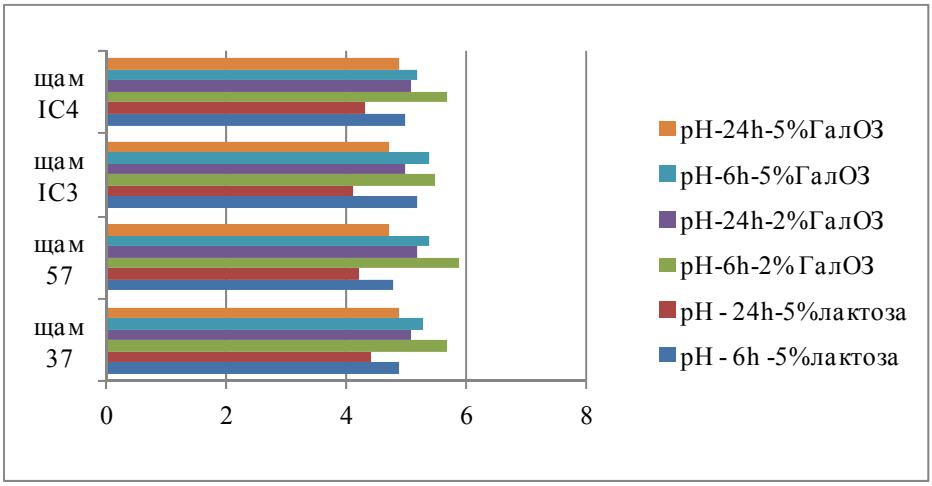
Изследване на растежа на изолираните щамове в казеинов хидролизат като моделна система

С цел оптимизиране на условията в моделната система се тестваха различни концентрации на казеинов хидролизат в комбинация с 5% лактоза и 2% и 5% галактоолигозахарид и фруктоолигозахарид съответно. Моделната система беше използвана за да се определи степента на усвояемост на олигозахаридите, изменението на pH и клетъчния растеж два щама *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* показали най-добри характеристики в проведените по-горе изследвания.

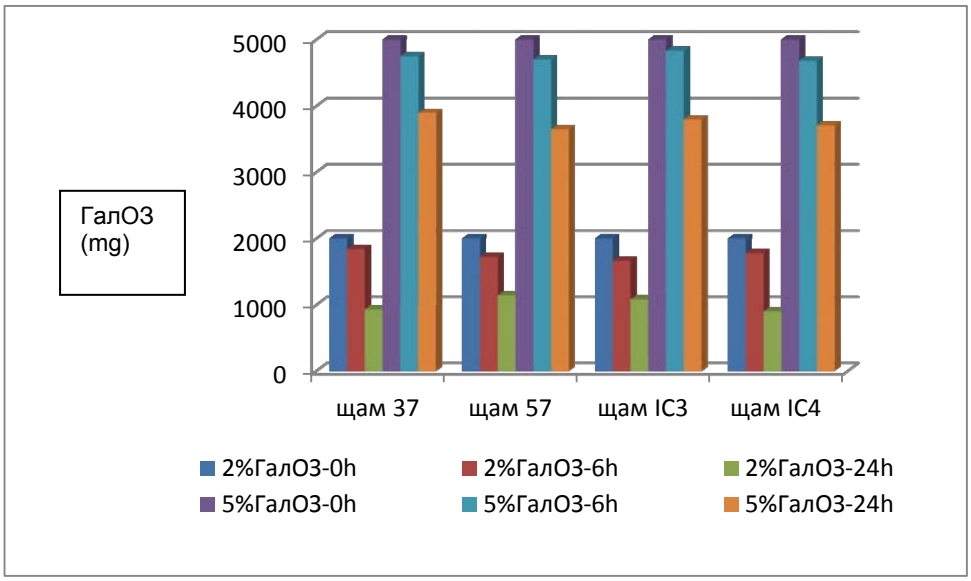
Получените резултати показват, че количеството на биомасата и изменението на pH при четирите щама относително по-слабо при култивиране на среда с казеинов ензимен хидролизат(КЕХ) и галактоолигозахариди (2% и 5%) в сравнение с модифицирана КЕХ-лактоза. По-слабият растеж на среда с олигозахариди може да бъде обяснен с наличието на допълнителен въглерден източник – аминокисселини, съдържащи се в КЕХ, както и на аминокиселини, получени в резултат на протеолитичните системи на изследвните щамове (таблица 10, фигура 11).

Таблица 10. Клетъчен растеж при култивиране на среда с 1% казеинов ензимен хидролизат и галактоолигозахариди.

Щам	КЕХ + 5% лактоза		КЕХ + 2% ГалОЗ		КЕХ + 5% ГалОЗ	
	Биомаса[g/L]		Биомаса[g/L]		Биомаса[g/L]	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h
Lactobacillus bulgaricus – 37	1,8	13,0	0,8	6,8	1,1	8,8
Lactobacillus bulgaricus – 57	2,6	14,5	1,1	6,9	1,4	8,6
Streptococcus thermophilus IC3	2,3	12,1	1,7	7,4	1,9	9,3
Streptococcus thermophilus IC4	1,6	10,9	1,0	7,1	1,1	9,6



Фигура 11. Изменение на pH при култивиране на среда с 1% казеинов ензимен хидролизат и галактоолигозахариди.



Фигура 12. Остатъчно количество галактоолигозахариди при култивиране на хранителна среда с 1% казеинов ензимен хидролизат.

От резултатите, представени на фигура 12 се вижда, че усвоеното количество на галактоолигозахаридите е сравнително еднакво при изследваните четири щама независимо от вложеното.

В използваната моделна система се потвърди възможността за усвояване на галактоолигозахариди в среди с казеинови деривати. Това предполага, че използваните щамове биха могли да се култивират в мляко с добавени олигозахариди. В тази връзка при разработването на нови функционални храни е уместно използването на комбинация от щамове с разнообразни свойства, притежаващи добър потенциал за усвояване на олигозахариди. Независимо, че олигозахариди като инулин, олигофруктоза, и устойчиво нишесте са основните видове пребиотици използвани в храните (Sajilata et al., 2006; Waligora-Dupriet et al., 2006),

налице е нарастващо търсене за галактоолигозахариди в хранителни продукти поради тяхното здравословно влияние и свързаните с тях ефекти (MacFarlane et al., 2007).

3. Получаване на кисело мляко, произведено с олигозахариди

Бактериите, традиционно използвани в производството на киселото мляко са *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus.* Докладвани и клинично доказани са различни ползи от приемането на храни с добавени пребиотици, включително следните: подобрена минерална абсорбция, особено на калция, което води до увеличаване на костната маса и превенция/забавяне на остеопорозата (Bosscher et al., 2006), намаляване риска от диария – свързана с чревна инфекция, намаляване на холестероловите нива поради положителното влияние върху липидната обмяната на веществата и модулатори на имунната система на човека (Renhe et al., 2008) и затлъстяването/инулинов резистентност (Delzenne and Cani, 2010).

Основното действие на пребиотиците е свързано с повишаване популацията на *Bifidobacterium spp.*и *Lactobacillus spp*. *И*ма две основни хипотези за метаболизирането на пребиотика. Най-подкрепена с факти е тезата, че пробиотичните микроорганизми притежават клетъчно асоциирани екзо-глюкозидази. Тези ензими хидролизират олигозахаридите от техния нередуциран край в резултат на което се получават монозахариди, които се усвояват. Алтернативен механизъм е усвояването на цели олигозахариди от пробиотици с последващ вътреклетъчен метаболизъм. Приема се, че пребиотиците имат антимикробни ефекти, тъй като селективно стимулират полезните бактерии. Те от своя страна продуцират антимикробни вещества, модулиращи функцията на имунната система.

В резултат на нашите проучвания показани в първите две глави от настоящия труд установихме, че от изследваните 16 щама млечнокисели бактерии, изолирани от традиционни млечнокисели продукти от балканския регион два щама *Streptococcus thermophilus IC3* и IC4 и два щама *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus 37 и 57* са подходящи да се използват за стартерни култури при получаване на кисело мляко. Те усвояват добре галактоолигозахариди и притежават антимикробна активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.

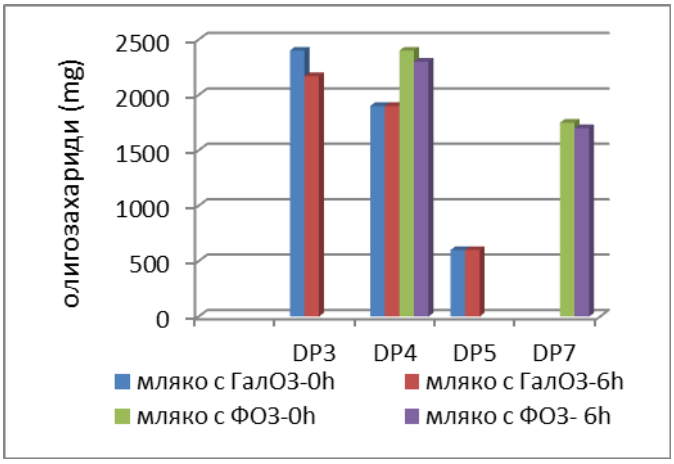
В последващите изследвания за получаване на симбиотични млечнокисели продукти се използваха щамове *Lactobacillus bulgaricus 37* и *Streptococcus thermophilus IC3.* Двата щама се култивираха в 10% сухо обезмаслено мляко с добавен 0,5% дрождев екстракт в продължение на 12 часа, след което бяха лиофилизирани в стерилни условия на лиофилизатор FreeZone Cascade Freeze Drier (LabConco, USA). Преживяемостта на клетките след лиофилизация за щам *Lactobacillus bulgaricus 37* е $2x10^7$ КоЕ/г и *Streptococcus thermophilus IC3* – $1x10^8$ КоЕ/г. При при-

готвяне на закваска се комбинираха двата щама в съотношение 1:1(закваска 1) и 1:2 (закваска 2).

При лабораторното производство на кисело мляко се използва стандартизирано прясно мляко с масленост 3,6% на фирма «ОМК» ООД, Пловдив. Технологичната схема включва следните последователни стъпки: 1) пастьоризация на млякото при 90°C за 30 мин.; 2) охлаждане до 70°C; 3)прибавяне на олигозахариди в крайна концентрация 5%, които предварително са стерилизирани през мембранен филтър 0,2μ; 4) охлаждане до 45°C; 5) прибавяне на закваска 0,4г за 100 мл мляко; 6/ култивиране при 37°C за 6 часа; 7) охлаждане до 4°C; 8) съхранение при 4°C.

Анализ на остатъчно количество олигозахариди

От проведения HPLC анализ на остатъчното количество олигозахариди, след производството на кисело мляко с използване на закваска 1 от щамове *Lactobacillus bulgaricus 37* и *Streptococcus thermophilus IC3* се установи, че консумацията на галактоолигозахаридите е около 10% от вложеното количество (фигура 13). При използване на закваска 2 консумацията на ГалОЗ е малко над 15%, което може да се обясни с повисоката β-галактозидазна активност при щам *Streptococcus thermophilus IC3.* Отчетеното остатъчно количество на ФОЗ при използване на двете закваски е над 93%, което показва че те не се усвояват от микроорганизмите. За провеждане на сензорния анализ се използва закваска 1.



Фигура 13. Остатъчно количество олигозахариди в кисело мляко, получено със закваска 1. Използвани съкращения: DP-степен на полимеризация; ГалОЗ-галактоолигозахарид; ФОЗ – фруктоолигозахариди.

Сензорен анализ

Резултати от производството на определено кисело мляко

Образуването на гел по време на производството на групата кисели млека с лиофилизирани култури се постигна на 6тия час на инкубация. През първите два часа не се наблюдава промяна на стойностите на pH, които бяха 6,5 и киселинност 26°D, измерена по метода за титруване на Дорник. След 6 часа стойностите на pH паднаха на 4,6 и киселинността

беше 80°D. Консистенцията на получените кисели млека беше провлачена, полу твърда и с минимален синергизъм.

Охладените проби (сервирани в контейнери) са готови за подлагане на сензорен анализ. Пробите бяха маркирани с 3 цифрен код.

Лабораторни условия за сензорния анализ

Място за оценяване:

Сензорната оценка бе проведена в несензорна стая, където всички условия за тестване бяха изпълнени, като:

- Изолирано пространство от мястото за подготовка
- Чисто и професионално изглеждащо
- Бяха използвани неутрални цветове за стените, пода и масите.
- Без излишни декорации и мебели.
- Помещението бе тихо по време на теста
- Сядането на участниците в теста бе организирано по начин, по който те да не си влияят.

Контрол на климата:

Сензорната стая бе с контролирана температура и без миризма. Температурата е 20 – 22°C и 55 – 60% влажност.Осветлението е 700 lux над масите.

Разглеждане на тестовия протокол

Процедурата за сервиране и примерни техники за подготовка са стандартизирани чрез създаване на протокол за изпитване. Протокола за изпитване съдържа: размер на пробата, контейнери за сервиране, колко проби трябва да се сервират за една сесия, дали участника трябва да си изплаква устата си между пробите, дали пробите трябва да бъдат изплюти или поглъщани.

Всички проби се съхраняват в един хладилник, за да имат еднаква температура.

Киселото мляко се сервира в 50 мл прозрачни пластмасови контейнери. Пробите бяха етикетирани със случайни трицифрени кодове, за да се избегне пристрастие. Също така пробите бяха подавани разбъркано, за да се избегнат артефактите по време на представянето им.

Всеки участник получи 3 проби: проба без олигозахариди, проба обогатена с фруктоолигозахариди и проба обогатена с галактоолигозахариди.

Бе осигурена и вода на всеки участник, за да се прочисти небцето между пробите. В една сензорна сесия взимаха участие по пет доброволеца. Участниците в изследването са сериозни потребители на кисело мляко.

Всеки участник получи писменни и устни инструкции за теста. Информацията се събира, чрез попълване на въпростник (лист за оценка).

Участваха общо 40 обучени участници, от които: 52,5% жени и 47,5% мъже.

Възрастови групи :

- 5% от участниците са между 21 до 25 годишни
- 50% от участниците са между 26 до 35 годишни
- 42,5% от участниците са между 36 до 45 годишни
- 2,5% от участниците са над 45 годишни

Бяха направени два типа теста на участниците:

I. Клас описатено/афективно

- Как обогатените продукти с два различни олигозахарида се различават по следните сетивни характеристики: структура, вкус, мекота и после вкус.
- Тип на теста: „Аналитичен“
- Как се харесват пробите и коя е за предпочитане
- Тип на теста: „9 точковаХедонистична скала“;

II. Клас афективно

- Тип на теста: „Сравнителен“
- Въпрос на интереси: Кои проба е за предпочитане и защо (проба предварително обогатен с един от олигозахаридите срещу референтната проба).

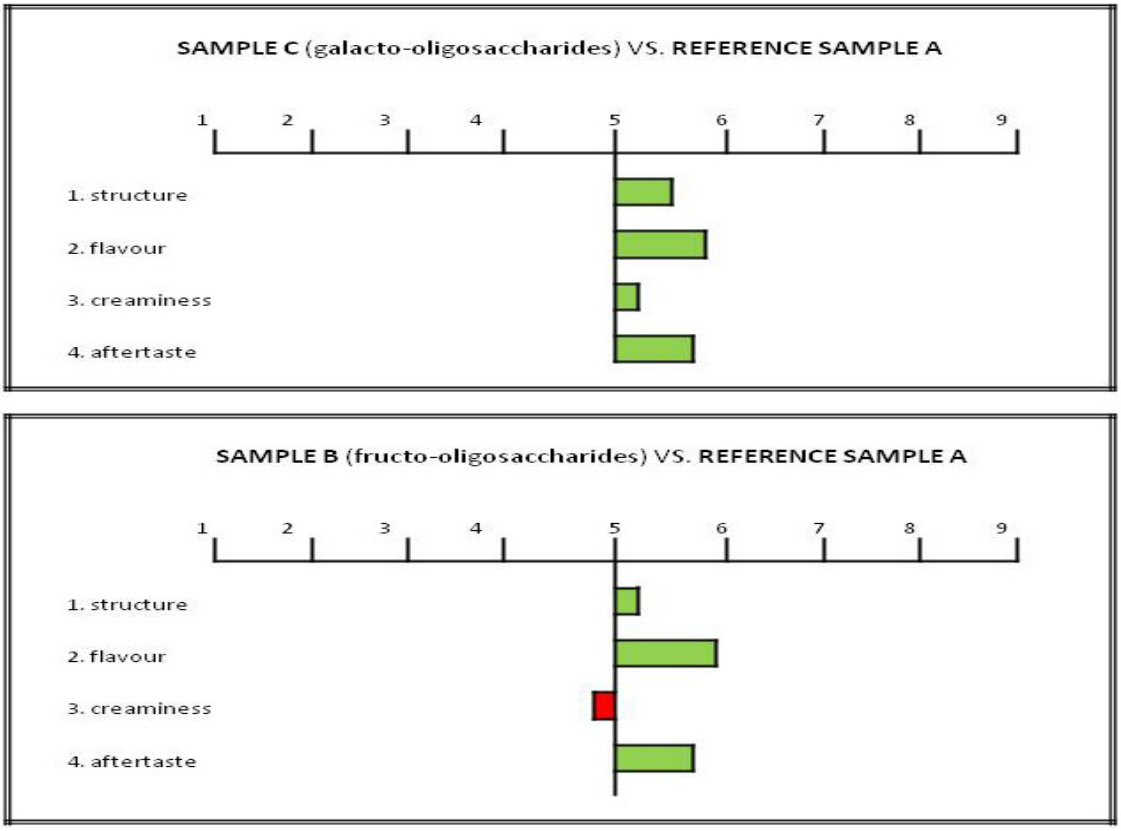
Таблица 11. Общ преглед на участниците.

Пол	Мъже	19
	Жени	21
Възраст	15 – 20	0
	21 – 25	2
	26 – 35	20
	36 – 45	17
	над 45	1
Колко често консумират кисело млако?	1. 2 – 3 дневно	3
	2. Веднъж дневно	12
	3. 5 – 6 пъти седмично	4
	4. 2 – 3 пъти седмично	11
	5. Веднъж седмично	6
	6. Веднъж на 2 седмици	2
	7. Веднъж месечно	2
	8. По-малко от веднъж месечно	0

Резултати и дискусия за сензорния анализ:

Резултатите показват, че проба С (кисело мляко обогатено с 2% галактоолигозахариди) има по-добра структура от референтната проба, участниците не харесаха кремообразността на проба В (киселото мляко обогатено с 2% фруктоолигозахариди) в сравнение с референтната проба (виж графиката по-долу). Двете проби бяха оценени с 6 по хедоничната скала като: „Малко харесван“ в сравнение с референтната проба. Обаче 57,5% от участниците предпочитат проба С пред проба В. Повече от 56,52% предпочитат референтната проба спрямо проба С и 29,41% предпочитат референтната проба спрямо проба В (таблица 12).

Таблица 12. Органолептична характеристика**.**



От общо 40 участници в изследването, 10 предпочитат проба С спрямо проба В, 11 предпочитат проба В спрямо проба С и 19 предпочитат рефернтната проба спрямо пробите обогатени с олигозахариди.
Коментари, дадени за референтната проба: кремава, с пълен вкус, освежаваща, по-добра и плътна структура, балансиран мек вкус, не толкова кисел и напомня на традиционното (Балканско – кисело мляко). Не се наблюдава отделяне на течност „суроватка“ в контролната проба.

Общо участниците предпочитат повече референтната проба, без олигозахариди и биха искали да закупуват този тип продукт, поради освежаващия вкус, който може да се комбинира с "полента"-царевично

брашно и всяка друга храна. Не се наблюдава значителна разлика между проба В и С, освен по-слабата мекота при проба В.

Основните коментари, дадени от участниците бяха: предпочитание е дадено на кремообразния вкус и по-малко кисел вкус. За пробите обогатени с олигозахариди участниците препоръчват да се добавят плодови парчета, което се дължи на по-сладникавия вкус на кисело мляко и предлагат следните плодове: ягоди, банани, портокали и къпини. Само един участник даде коментар, че никога няма да си купи някой от опитаните проби, което се дължи на лошият им вкус.

Резултати от въпросника и дискусия:

На всички участници бяха зададени по четири въпроса, за да се провери тяхната информираност, знания и предпочитания.

На въпроса: „Знаете ли какви са характериситиките на пребиотиците?“, само 16 учасници от 40 дадоха положителен отговор.

На въпроса: „Дали олигозахаридите са вид пребиотици?“, само 7 участника дадоха правилен отговот, 8 нямаха нужните знания и 25 дадоха грешен отоговор.

На въпроса: „Дали киселото мляко има положително влияние на здравето на консуматорите?“. Всички участници дадоха правилен отговор.

На отворения въпрос: „Каква е причината за вашата консумация на кисело мляко?“ бяха направени следните коментари: Освежаващо е, подобрява перисталтиката (положително влияние на отделителната система). Киселото мляко съдържа пробиотични бактерии, които са много полезни за чревната флора. Много полезна напитка и нейната консумация е навик и има приятен вкус. Добре върви в комбинация с различни продукти, като тип бюрек тестени изделия пълни със сиене или месо и други. Повечето участници приемат киселото мляко за закуска.

Заключение

В настоящата работа са използвани лактобацилни щамове, изолирани от домашно приготвени млечно кисели продукти. Такива щамове, които отговарят на определени критерии и следователно могат да бъдат използвани като стартерни култури.

Независимо от огромния брой проведени изследвания върху млечно киселите бактерии, изследването на щамове изолирани от домашно приготвени млечни продукти представлява една своеобразна ниша. Щамове изолирани от такива екологични ниши и използвани, като стартерни култури, от една страна увеличават биоразнообразието в продуктите, а от друга придават уникалните характеристики на традиционния продукт. В този аспект домашно приготвените млечно кисели

продукти са важен източник на нови потенциални стартери, които представляват голям интерес за млечно-киселата индустрия.

Съвременното разбиране за пребиотик е селективно усвояващ се ингредиент, който предизвиква специфични промени едновременно и в състава и/или в дейността в стомашно-чревната микрофлора, която ползва. Важни критерии са: Устойчива на стомашната киселина; Не се хидролизира от стомашно-чревни ензими; не се хидролизира от горния стомашно-чревен тракт; ферментира от чревните микроорганизми; предизвиква селективна стимулация на растежа и/или дейността на чревните бактерии, потенциално свързани със здравето и доброто физическо състояние.

Повечето от използваните пребиотици в настоящия момент са получени или след ензимна хидролиза на растителни полизахариди или чрез ензимна синтеза на база монозахариди и дизахариди. Почти всички клинични изследвания са проведени с ограничен брой пребиотици – фруктоолигозахариди, получени от инулин, галактоолигозахариди на база лактоза от млечна суроватка. Редица нови изследвания както ин витро така и ин виво при животни и човека разкриват пребиотичния потенциал на други олигозахариди, като ксилоолигозахариди, хитоолигозахариди, соеви олигозахариди, както и на полиолни съединения.

Модифицирането на функционалните свойства на стомашно-чревната микрофлора посредством пребиотици и пробиотици е широко обсъждана тема в научната литература. Първата генерация пребиотици беше фокусирана върху бифидогенния ефект на пребиотиците и използването им като фибри. Втората генерация пребиотици е насочена към регулация на липидния метаболизъм, усвояването на минерали, имуностимулиращ ефект и профилактика на рака на дебелото черво.

Развитието на пребиотиците в бъдеще е свързано все повече с изследвания върху модулиране микробиалната ферментация в гастроинтестиналния тракт и най-вече комплементарните свойства на пребиотиците и пробиотиците. Комплементарните свойства на различните пребиотици се очаква да предизвикат положителен ефект в различни отдели на СЧТ. Така, че новите пребиотици трябва да са така комбинирани, че да въздействат положително върху микробиалните съобщества в СЧТ като цяло, отколкото само върху определени видове бактерии. В тази връзка от особено важно значение за развитието на функционалните храни е да се изучи възможно най-пълно механизма на действие на олигозахаридите с пребиотични свойства. В момента механизма, по който пребиотиците селективно се метаболизират от полезната микрофлора на СЧТ не е адекватно изяснен. Съществуват две основни парадигми за метаболизма на пребиотиците. Най-много данни има за действието на

клетъчно-свързаните екзо-глюкозидази на пробиотичните микроорганизми върху пребиотиците. Като алтернативен механизъм на действие на пребиотиците се посочва директното им включване във вътреклетъчния метаболизъм на пробиотиците, в резултат на което се увеличава тяхната специфична скорост на растеж.

Изясняването механизма на транспорт и включване в общия метаболизъм на различните олигозахариди ще даде възможност да се преосмисли определението за пребиотичен им потенциал. От друга страна ще осветли механизма на действие на пребиотиците като пусков механизъм за синтез на компоненти с антимикробиани свойства както и върху антиадхезивните свойства на метаболитите на полезната микрофлора срещу патогенните микроорганизми.

В тази връзка получените резултати в настоящата дисертация биха могли да послужат като основа при провеждане на сравнителен анализ на транскрипционен профил, отговорен за идентифициране на генетичната основа за въглехидратния транспорт и метаболизъм при полезната микрофлора на СЧТ. Получените от нас данни по отношение на усвояването на олигозахаридите и свързаните с това процеси на синтеза на биологичноактивни вещества показва, че най-вероятно при тези процеси могат да се използват едни и същи транспортни системи. Също така резултатите недвусмислено показват, че метаболизмът е щамово специфичен. От друга страна смятаме за перспективно изучаването на микроорганизми, изолирани от естествени местообитания (домашно приготвени млечнокисели продукти). В тази връзка няколко от изолираните 16 щама млечнокисели бактерии имат специфични и уникални характеристики. По време на ферментационния процес на млякото, в следствие на ензимната хидролиза на протеините в него, се освобождават олигопептиди с различна дължина, които могат да служат за прекурсури на пептиди с биологична активност. Те продуцират антимикробни вещества както при ферментация в MRS среди с олигозахариди, като единствен въглехидратен източник, така и в среди с казеинов хидролизат и мляко, съдържащи галактоолигозахариди. Данните за метаболизирането на галактоолигозахаридите от изследваните от нас щамове се потвърждават от резултатите за β-галактозидазната активност.

В тази връзка при разработването на нови функционални храни е уместно използването на комбинация от щамове с разнообразни свойства и с възможност да метаболизират олигозахариди с пребиотичен потенциал.

Богатството от информация за последните 15 години върху пребиотиците, получено от експериментални изследвания върху животни и чо-

века целят да се разберат механизмите на действие и да се докаже положителния им ефект върху човешкото здраве.

Сензорният анализ представлява решаваща крачка по време на различните етапи на развитие на хранителни продукти. Сензорното въздействие, което пребиотичните или пробиотичните култури могат да окажат на храните и напитките, към които те са добавени е малко изучено, също така е разбрано, че продуктите, към които тези съставки са добавени могат да създадат различни вкусови профили, когато се сравняват с конвенционалните продукти. Известно е, че олигофруктозата осигурява някои подходящи сензорни качества на продуктите, към които е дабавена, като цялостно усещане в устата, притъпен аромат с намален послевкус и лека сладост. За тези качества е било показано, че са частично отговорни за високите стойности на оценките за вкус и възпримчивост на различните хранителни продукти.

От проведения в настоящата работа сензорен анализ беше установено, че 50% от дегустаторите предпочитат традиционния продукт. Коментари, дадени за референтната проба: кремава, с пълен вкус, освежаваща, по-добра и плътна структура, балансиран мек вкус, не толкова кисел и напомня на традиционното (Балканско-кисело мляко). Другите 50% от консуматорите харесват млека, обогатени с фруктоолигозахариди и галактоолигозахариди. Не се наблюдава значителна разлика между пробите с двата олигозахарида, освен по-слабата мекота при добавяне на галактоолигозахарид. Предпочитание е дадено на кремообразния вкус и по-малко кисел вкус. За пробите обогатени с олигозахариди участниците препоръчват да се добавят плодове като: ягоди, банани, портокали и къпини. Получените резултати затвърждават, че вкуса на традиционните продукти на даден пазар трудно може да се променя. Включването на функционални добавки (олигозахариди) изисква специално разработени стратегии за култивиране вкуса на потребителя към новите асотименти на млечните продукти.

Бъдещето на изследванията на пребиотиците ще даде по-добро разбиране на важните хранителни профили на хората използващи тези въглехидрати и няма съмнение факта, че болшинството от междинните маркери на риска и здравето са свързани с пребиотиците и модулацията на чревната микрофлора. Еволюцията на тези процеси е следствие на това, че „успешните микроорганизми“ правят най-доброто в тази околна среда, в която се и селектират.

Докато глобалните усилия в проучванията, свързани с човешката микробиота и терапевтичната микробиология се разширяват, познанията свързани с разнообразието в гастроинтестиналния тракт и функционалните последици от това разнообразие трябва да бъдат по-задълбочено

разбирани и оценявани. Внимателният подбор на лекарства, храни и бактериални щамове е съществен, тъй като антибиотиците, пробиотиците и пребиотиците имат различни биологични ефекти, всеки с въздействие върху човешката микробиота. Няма причина за абсолютни ограничения по отношение на наличните пребиотици. Коменсалните микроби използват множество органични субстрати и именно по-подробните изследвания на метаболитните пътища при тях могат да спомогнат за идентифицирането на нови пребиотици, които селективно стимулират цели класове полезни микроорганизми.

Изводи

1. Изолирани са 16 щама млечнокисели бактерии от Балкански млечнокисели продукти и е установена тяхната видова принадлежност към *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* и *Sterptococcus thermophiles.*
2. Два от изследваните щамове *Lactobacillus bulgaricus 37, Lactobacillus bulgaricus 57* продуцират антимикробни вещества, активни срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.
3. Установено е различие в специфичната растежна скорост при култивиране на среда с единствен въглехидратен източник галактоолигозахарид и фруктоолигозахарид, което е щамово специфично.
4. Изследваните лактобацилни щамове 37 и 57 усвояват преимуществено късоверигните галактоолигозахариди със СП 3.
5. Галактоолигозахаридите индуцират активността на β-галактозидаза в сравнение с α-галактозидаза.
6. Моделната система казеинов хидролизат плюс олигозахариди е подходяща за изследване усвояването на олигозахариди в млечни продукти.
7. Проведеният сензорен анализ показа, че въвеждането на пребиотици в състава на традиционни млечнокисели продукти (кисело мляко) изисква детайлно проучване на особеностите на хранителните изисквания на потребителите в определен географски район.

Научни приноси в дисертационния труд

1. Селекционирани са щамове млечнокисели бактерии с добри показатели, които биха могли да се използват като стартерни култури.
2. Разработена е моделна система с приложение в изучаването на млечни продукти с добавени олигозахариди и/или други добавки.

3. Разработена е схема за сензорен анализ на продукт (кисело мляко с олигозахариди), включваща комбинация от афективен, описателен и сравнителен тест.

Публикации във връзка с дисертацията:

1. Ivanova I., Ignatova T., Mandadjieva T., Dojcinovski L., Iliev I. (2011). Metabolic alterations during growth of Lactobacillus Strains in the presence of oligosaccharides, International conference Sofia, Prebiotics and Potential for Human Health, pp. 120 – 131;
2. Angelkov B., Dojcinovski L., Suleva S., Casitovska E. (2011). La mise en place de la methode HACCP et la legislation sur la securite et la qualite alimentaire en Republique de Macedoine, International Conference „Prebiotics & Probiotics Potential for human health, April: Sofia, R.Bulgaria, pp. 113 – 119;
3. Ivanova, I., Iliev, I., Ignatova, Ts., Vassileva, T., Mandadjieva, T., Dojcinovski, L., Kirilov, N., (2011) Lactic acid bacteria as an alternative for human and animal health. Acta Agriculturae, Boreali-Sinica ISSN 1000-7091, Proceedings of ZHONGGHANCUN global agricultural biotechnology innovation forum, 26, 438 – 449;
4. Angelkov B., Mandic M., Primorac Lj., Docinovski L., Sulevska S.. (2012) Chapter II: Appendix of methodology for microbiology examination Vademecum for food safety and sensory quality, Macedonian Science Society, Bitola, R.Macedonia, pp. 354 – 384;
5. Dojcinovski L., Ivanova I., Iliev I., (2014). Dairy products – functionality and healthy choice, J. BioSci. Biotech., accepted;

Участия в научни форуми:

- Angelkov B., Dojcinovski L. „Preliminary results and problems during implementation of HACCP systems in high risk food industry in R.Macedonia“ Food industry 7 – 8 , p.p. 5 – 6 Faculty of technology, Novi Sad, SR Jugoslavija (2004).
- B. Angelkov, Svetla T. Danova, Sulevska S., Dojcinovski L., Casitovska E „HACCP system implementation and the problems faced in production of traditional foods“, International Symposium „Traditional foods from Adriatic to Caucasus“, University Namik Kemal-Tekirdag-Turkey (2010) .
- Angelkov B., Dojcinovski L , „Successful essay on „DecisionTree“, modification in determination of significant hazards during HACCP Imlementaion. The First International Congress of food technology, Antalya, Turkey (2010) .

Специализации:

1. Dojcinovski L., „Evaluation of various starter cultures in fermentedmilk products“ – Master Degree Project Faculty of Agricultural and Biological Sciences – Gent University-Belgium (2003) pg. 1 – 60.
2. Ангелков Б., Дојчиновски Л. „Развој во областа на имплементација на националниот закон за храна и барањата во поглед на хигиената на храната во Р. Македонија“, Tempus-ES-Tempus – JPHES project No 158714 „Improving academia – industry links in Food Safety and Quality“, Faculty of technology and technics, Veles (2010).