

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ"



ГЕРГАНА СТОЯНОВА ДОБРЕВА-ЙОСИФОВА

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МЛЕЧНО КИСЕЛАТА
МИКРОФЛОРА НА БЪЛГАРСКИ РЪЖЕНИ
КИСЕЛИ ТЕСТА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"
Научна специалност 01.06.12 "Микробиология"

Научни ръководители:

доц. д-р Стефка Антонова-Николова
доц. д-р Светла Трифонова Данова

София, 2011 г.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ"

ГЕРГАНА СТОЯНОВА ДОБРЕВА-ЙОСИФОВА

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МЛЕЧНО КИСЕЛАТА МИКРОФЛОРА
НА БЪЛГАРСКИ РЪЖЕНИ КИСЕЛИ ТЕСТА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"
Научна специалност: 01.06.12 "Микробиология"

Научни ръководители:

доц. д-р Стефка Антонова-Николова
доц. д-р Светла Трифонова Данова

София, 2011

Дисертационният труд съдържа 175 страници, 37 фигури и 25 таблици. В библиографската справка са включени 293 литературни източника, от които 11 на кирилица и 282 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на Катедра „Обща и промишлена микробиология” към Биологически факултет на СУ ”Св. Климент Охридски” и насрочен за защита пред научно жури, сформирани със заповед № РД-19-180/28.04.2011 на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски”.

Списък на използваните съкращения

ATCC	- American Type Culture Collection
bp	- base pair, нуклеотидна база
CIP	- Collection of Bacteries de l’Institute Pasteur, Paris, France
PCR	- полимеразна верижна реакция
RAPD	- Randomly Amplified Polymorphic DNA’s Analysis, анализ на случайно амплифицирани полиморфни ДНК-и
ГИТ	- гастро-интестинален тракт
ИМБ	- Институт по микробиология, София, България
МКБ	- млечно кисели бактерии
НБПМКК	- Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни Култури.
ОТК	- обща титруема киселинност
ФКТ	- филтрувана културална течност

УВОД

Хлябът представлява основна част от човешкия хранителен режим. Всеки етап в неговото производство, от внимателния подбор на съставките, през технологията на приготвяне и обработка на тестото до процеса на изпичане, е един вид изкуство, което сътворява продукти с практически неограничено многообразие от цветове, форми и вкусове. В това многообразие, породено от различията в традициите, културните особености и географското разположение, най-харесвани са хлебните изделия, съдържащи една обща съставка, осигуряваща невъзпроизводимото им качество. Тази съставка е киселото тесто.

По своята същност киселото тесто представлява спонтанно ферментирал продукт от брашно и вода, вследствие на развитието на млечно кисели бактерии и дрожди, предизвикващи появата на газ и киселини. Взаимодействията между микроорганизмите от популацията и между микроорганизмите и суровинните материали, съставки и технологични параметри повлияват изключително характеристиките и свойствата на киселото тесто.

Продуктите от кисело тесто се характеризират с благоприятни технологични качества, богата микрофлора, уникален вкус и висока хранителна стойност и през последните години интересът към тях непрекъснато се повишава. Производството на хляб от ръжени и ръжено-смесени брашна, традиционно главно за Северна и Източна Европа, напоследък печели вниманието на консуматорите и от други части на света, поради техния благоприятен здравословен ефект и неизползването на консерванти. В България производството на ръжен хляб се основава на спонтанната ферментация на кисели теста, а консумацията му доскоро ограничена само в планинските райони, през последните години непрекъснато се увеличава. Всичко това определя големия интерес към киселите теста.

Присъствието на млечно кисели бактерии като доминантна популация в микрофлората на киселите теста, която е ендемично специфична и все още не добре проучена, привлича вниманието на много изследователи в търсенето на нови видове и щамове сред тях.

У нас не са провеждани изследвания върху микрофлората на ръжените кисели теста. Получаването на информация за състава, биологичните и технологични свойства на млечно киселата микрофлора открива възможности за разработването на полезни, качествени и разнообразни хлебни продукти и здравословни храни.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Изучаване на млечно киселата микрофлора на български ръжени кисели закваски и подбор на щамове с биологично и технологично значими свойства.

За постигането на тази цел бяха поставени следните основни задачи:

1. Микробиологично и технологично характеризиране на отделните етапи на спонтанната ферментация на ръжени брашна от различни географски райони на страната до стадий “кисело тесто”
2. Изолиране на млечно кисели бактерии и дрожди от микробните популации на три различни български ръжени кисели закваски и създаване на лабораторна колекция
3. Полифазно-таксономична характеристика на представителни извадки МКБ от различните закваски в колекцията
4. *In vitro* характеризиране на пробиотичните свойства на избрани щамове МКБ
5. Подбор на млечно кисели бактерии по технологично значими свойства
6. Оценка на приложимостта на избрани щамове МКБ като стартерни култури за производство на ръжен хляб

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Проби от ръжени кисели закваски: Бактериалните щамове бяха изолирани от три български ръжени кисели закваски. Всяка закваска е приготвена с брашно, което произхожда от различен географски регион на страната (табл.1).

Таблица 1. Произход на киселите закваски проучвани в дисертационния труд.

Кисела закваска	Произход
Кисела закваска А	мелница Казанлък (Розова долина)
Кисела закваска В	мелница Балван (северна част на Стара планина)
Кисела закваска С	мелница Конуш (Родопи)

2. Микроорганизми

Обект на изследването бяха 186 щамове млечно кисели бактерии (МКБ), изолирани от различните ръжени закваски. Използваните референтни МКБ и други тест-микроорганизми са представени на таблица 2. Щамове МКБ бяха съхранявани до началото на експериментите в MRS, съдържащ 20% (v/v) глицерол или в 10% (w/v) обезмаслено мляко, съдържащо 0.1% дрождев екстракт.

Таблица 2. Референтни щамове млечно кисели бактерии и тест микроорганизми.

Референтни МКБ:	Колекция*	Щам	Условия на култивиране
<i>L. plantarum</i>	ATCC	14917 ^T	30°C, MRS
<i>L. paraplantarum</i>	ATCC	700211	30°C, MRS
<i>L. pentosus</i>	ATCC	8041	30°C, MRS
<i>L. brevis</i>	ATCC	13648	30°C, MRS
<i>L. brevis</i>	ATCC	27305 ^T	30°C, MRS
<i>L. parabuchneri</i>	ATCC	49874	30°C, MRS
<i>L. buchneri</i>	ATCC	4005	30°C, MRS
<i>L. fermentum</i>	ATCC	13554	30°C, MRS
<i>L. fermentum</i>	ATCC	23271	30°C, MRS
<i>L. fermentum</i>	ATCC	14931 ^T	30°C, MRS
<i>L. coryniformis coryniformis</i>	ATCC	25602	30°C, MRS
Тест микроорганизми:			
• Грам (+) бактерии			
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6633	37°C, МПА
<i>Bacillus cereus</i>	НБПМКК		37°C, МПА
<i>Staphylococcus aureus</i> щам Smith	ИМБ		37°C, МПА
<i>Listeria innocua</i> F	CIP T82		30°C, ВНІ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	13048	30°C, МПА
• Грам (-) бактерии			
<i>Escherichia coli</i> HB 101	ИМБ	101	37°C, LB
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC	13076	30°C, МПА

3. Хранителни среди и разтвори

4. Микробиологични методи

5. Морфологични и физиолого-биохимични методи

6. Молекулярно-генетични методи

6.1. Изолране на хромозомна ДНК (Delley *et al.*, 1990).

6.2. PCR анализи: Мултиплекс-PCR (Tortiani *et al.*, 2001); видово-специфичен PCR анализ с праймери за *L. brevis* (Guarneri *et al.*, 2001); RAPD-PCR (Müller *et al.*, 2001); секвенционен анализ на 16S рДНК.

7. Технологични методи

7.1 Приготвяне на ръжени закваски (Караджов и сътр., 2003)

7.2. Определяне на подемна сила

7.3. Приготвяне на експериментални ръжени хлебчета

7.4. Органолептични тестове

7.5. Определяне на преживяемост на МКБ при лиофилизация

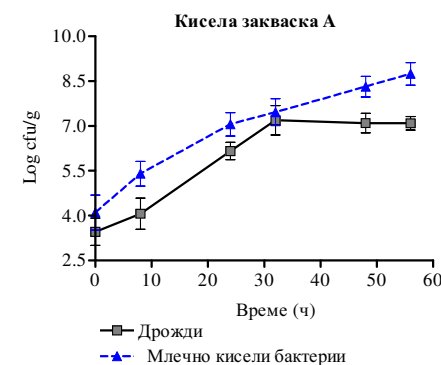
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Характеризиране на отделните етапи от спонтанна ферментация на ръжени брашна от различни географски райони на страната до стадий „кисело тесто“

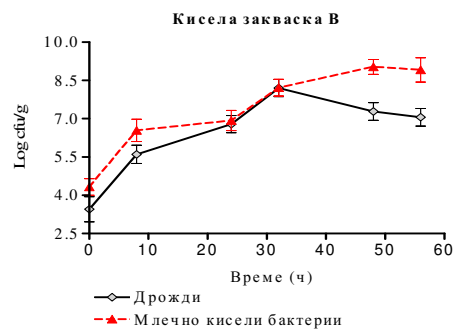
За целта бяха взимани проби в динамика ежедневно, непосредствено преди освежаване на закваската, на 8 ч. и на 16 ч. след това. Отчитани бяха микробиологични (брой на хетеротрофните и млечно кисели бактерии и дрожди, CFU/g) и основни технологични (активна и обща титруема киселинност) характеристики.

1. 1. Микробиологична характеристика на изследваните кисели закваски

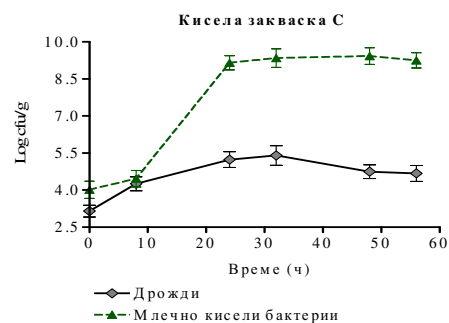
В първите часове на спонтанната ферментация бе наблюдаван обилен растеж на хетеротрофни, каталазо-положителни, Грам (-) и Грам (+) бактерии. С повишаване на киселинността на закваските той напълно се инхибира и след 24-ия час първоначално разнообразната микрофлора се ограничи до популация от млечно кисели бактерии (МКБ) и дрожди с различна динамика на растеж за двете микробни групи. (фиг. 1). През целия изследван период и в трите закваски бе отчетено преобладаване на МКБ.



(А)



(B)

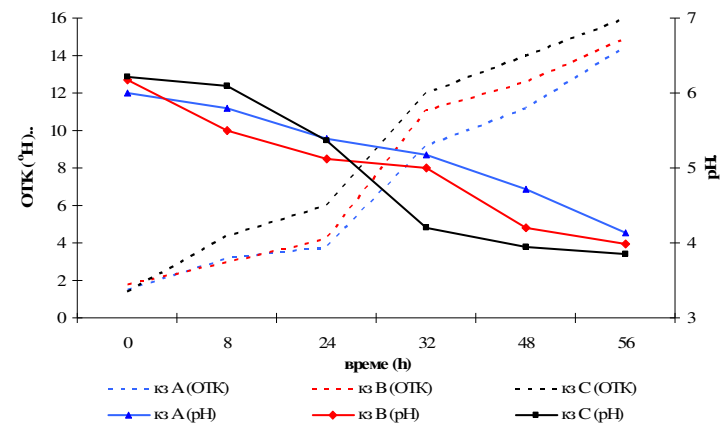


(C)

Фиг. 1. Сравнителен количествен микробиологичен анализ на дрожди и МКБ в хода на спонтанната ферментация на кисела закваска А (А), кисела закваска В (В) и кисела закваска С (С).

1.2. Технологична характеристика на изследваните кисели ръжени закваски

Промените в количеството и състава на микрофлората, свързани с намаляване на дрождите и увеличаване на млечно киселите бактерии, се съпровождат с отчетливо нарастване на общата титруема киселинност (ОТК) и понижаване на рН при трите закваски и сходство в динамиката на тяхната промяна (фиг. 2).



Фиг. 2. Изменение на активната и общата титруема киселинност в хода на спонтанната ферментация на киселите закваски.

Въпреки известните различия в динамиката на растеж на дрождевата и млечна киселата популация, спонтанната ферментация в трите закваски протича по сходен начин. Малките вариации вероятно се дължат на различните абсолютни стойности в броя на микроорганизмите и възможни различия във видовия състав на съответната микробна популация. Освен това колкото съотношението в асоциацията е по-голямо в полза на МКБ, толкова по-бързо спада рН стойността на закваската. При спазването на определени условия микробната асоциация на технологично зрялата кисела закваска, остава стабилна в по-нататъшния технологичен процес. Затова киселата закваска може да се разглежда като моделна система за изучаване на формирането и развитието на микробната асоциация на киселото тесто и е обект на проучване в настоящата дисертация.

2. Изолиране на млечно кисели бактерии и дрожди от микробните популации на три български ръжени кисели закваски и създаване на лабораторна колекция

Паралелно с количественото отчитане на МКБ и дрождите в динамика на получаване на трите зрели ръжени закваски от всички проби са изолирани по 3-10 колонии, представляващи наблюдаваното им морфологично разнообразие. В резултат бе създадена лабораторна колекция от 186 чисти култури МКБ и 31 чисти дрождеви култури.

2.1. Дрожди

На базата на морфология на колонии на среда YPD, микроморфология и тип на размножаване, характеризирани чрез светлинна и фазово-контрастна микроскопия, и на различия във въглехидратния им метаболизъм бе установено, че в българските ръжени кисели закваски преобладават дрожди от вида *Sacharomyces cerevisiae*, които се характеризират с вариации във ферментационния профил. Около 26% от изолатите се отнасят към вида *Candida glabrata*. Срещат се и единични представители на *C. pelliculosa*.

2.2. Млечно кисели бактерии от ръжени кисели закваски

Видовият състав и количеството на млечно киселата микрофлора в киселите закваски са ендемично специфични. Богатството на представените в нея видове се предопределя от екологичните особености, свързани с почвените и климатичните условия на географския район, производител на брашното. В България не са провеждани изследвания върху киселите закваски и тяхната микрофлора. За охарактеризиране на млечно киселата микрофлора на български ръжени кисели закваски от различни географски райони бе формирана група от 186 изолата в съответствие с критериите за МКБ: Грам (+), каталазо – и оксидазо – отрицателни, неподвижни и неспорообразуващи, която бе изследвана съгласно изискванията на полифазната таксономия.

3. Полифазно таксономична характеристика на представителни извадки МКБ от трите ръжени кисели закваски в колекцията

3.1. Видова идентификация с класически подходи -

3.1.1. Морфолого-културална характеристика на изолираните щамове МКБ –

Въз основа на класическите фенотипни критерии новоизолираните МКБ от трите ръжени закваски бяха групирани по морфотип. Най-голямо разнообразие в морфологията на колонии- 7 типа бяха отчетени за закваска В, а най-малко- 2 типа, за закваска С. В трите закваски бе отчетено различно съотношение между изолати с коковидна и с пръчковидна форма на клетките.

3.1.2. Физиолого-биохимична характеристика на млечно киселата микрофлора в български ръжени закваски

Резултатите от проведените микроскопски, начални биохимични и физиологични изследвания на млечно киселите изолати предполагат наличието на представители от р. *Pediococcus* и р. *Lactobacillus* в кисели ръжени закваски А и С (от района на Казанлък и

Родопите) и на представители на четири рода МКБ (р. *Pediococcus*, р. *Lactobacillus*, р. *Leuconostoc* и р. *Streptococcus*) в кисела закваска В (от района на Велико Търново). В изследваните ръжени кисели закваски през целия ферментационен период бе наблюдавана тенденция на преобладаване на хомоферментативните педиококи, съпроводена с нарастване количеството на лактобацилите в последните етапи на процеса. Потвърдено бе схващането, че таксономичния състав на млечно киселата микрофлора е ендемично специфичен.

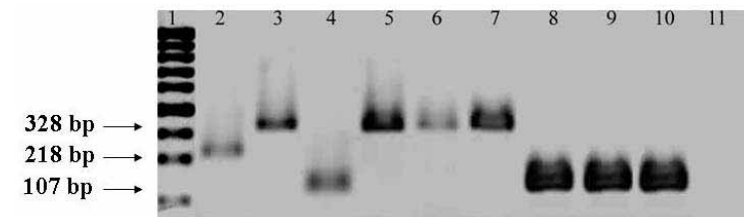
3.1.3 API тест

Получените резултати чрез мини-кит API LAB 50CHL показаха наличието на вида *L. plantarum* и бяха използвани като насочващи в подбора на най-подходящите сред многото съвременни молекулярни методи за доказване на видовата принадлежност на МКБ от български ръжени кисели закваски.

3.2. Молекулярно-таксономични изследвания на млечно кисели бактерии от български ръжени кисели закваски

3.2.1. Мултиплекс-PCR анализ

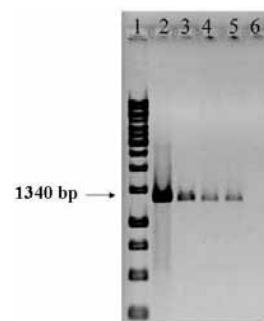
Първа стъпка от молекулярната идентификация на млечно киселите изолати бе доказването на определения с класическите подходи вид *L. plantarum*. С помощта на мултиплекс PCR анализ бяха анализирани 62 лактобацилни щамове. Установено бе наличие на амплификационен фрагмент с големина ~328 bp за 23 от изолатите, както и за типовия щам *L. plantarum* ATCC 14917^T (фиг. 3). При 13 от щамовете бе получен PCR продукт с големина 107 bp, съответстващ на вида *L. paraplantarum* (фиг. 7).



Фиг. 3. Мултиплекс PCR анализ на МКБ от ръжени кисели закваски. Фотонегатив на 1% агарозен гел, визуализиран с етидиев бромид: Позиции: 1- маркер за молекулно тегло -100 bp (Fermentas); 2- *L. pentosus* ATCC 8041; 3- *L. plantarum* ATCC 14917^T; 4- *L. paraplantarum* ATCC 700211; 5- a1; 6- b6; 7- c45; 8- a10; 9- b20; 10- c18; 11- отрицателна PCR контрола (на фигурата е представен резултатът с по един представител от закваска).

3.2.2. Видово-специфичен PCR анализ на лактобацили от кисели закваски

За определяне видовата принадлежност на останалите 26 неидентифицирани лактобацилни изолата бе приложен PCR анализ (по Guarneri *et al.*, 2001) с видово-специфични праймери за *L. brevis*, друг доминантен вид МКБ в киселите закваски. С помощта на този метод, 4 щама от закваска А, 10 и 9 щама съответно от закваски В и С бяха определени като представители на вида *L. brevis* (фиг. 4).



Фиг. 4. PCR анализ на лактобацилни щамове с видово-специфични праймери за *L. brevis*. Позиции: 1- маркер за молекулно тегло (1kb); 2- *L. brevis* ATCC 13648; 3- a24; 4- b47; 5- c16a; 6- отрицателна PCR контрола.(представен е резултатът с по един представител от закваска)

При анализа с видово-специфичните праймери за *L. brevis* три от проучваните щамове с пръчковидна морфология (b19, b79 и c36) не дадоха амплификационен продукт. С помощта на видово-специфичен PCR анализ за *L. fermentum* (по методика, на Dickson *et al.*, 2005) бе проверено възможното им отнасяне към този вид. Нито един от трите щама не даде положителен PCR резултат (резултатът не е показан) и тяхното идентифициране бе осъществено с помощта на допълнителен секвенционен анализ.

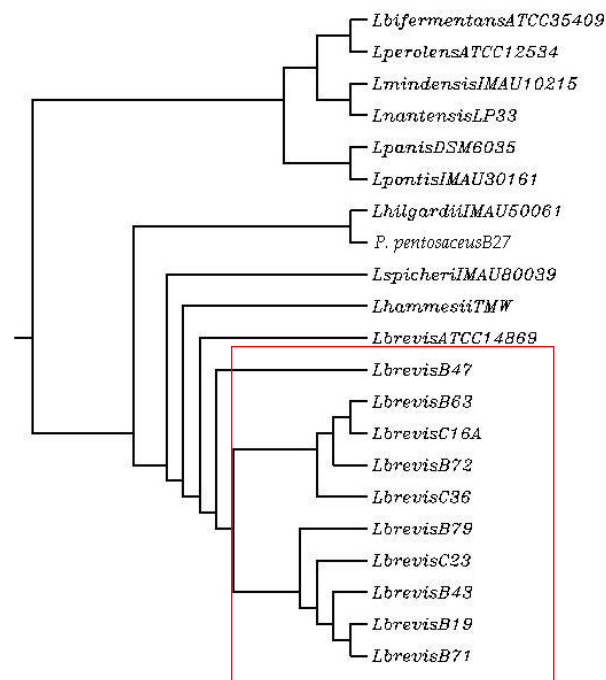
3.2.3. Секвенционен анализ

Подходът за изучаване на части от рибозомалния оперон и специално на 16S рРНК гени се е наложил като “златен стандарт” в бактериалната систематика. 16S рДНК анализите на 8 случайно избрани щама (b43, b47, b52, b63, b71, b72, c16a и c23) потвърдиха точното видово отнасяне на изолатите, определено чрез мултиплекс PCR и PCR анализите с видово специфични праймери (табл. 3). Секвенциите на щамовете са депозирани в GenBank (табл. 3).

Таблица 3. Таксономична идентификация на изолати МКБ от български кисели закваски, получена след секвениране на 16S рДНК.

Изолат	Секвениран фрагмент от 16S рДНК (bp)	Отнасяне в обществената база Ribosomal Data Project	Ниво на сходство (%)	Номер на секвенцията в GenBank
a4	818	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	99	HM018694
b16	200	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	99	HM018695
b19	627	<i>L. brevis</i>	98	HM018696
b27	767	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	99	HM018697
b43	777	<i>L. brevis</i>	99	HM018698
b47	842	<i>L. brevis</i>	99	HM018699
b52	811	<i>L. plantarum</i>	100	HM018700
b63	677	<i>L. brevis</i>	98	HM018701
b71	499	<i>L. brevis</i>	99	HM018702
b72	643	<i>L. brevis</i>	99	HM018703
b79	767	<i>L. brevis</i>	99	HM018704
c16a	619	<i>L. brevis</i>	97	HM018705
c23	731	<i>L. brevis</i>	99	HM018706
c36	827	<i>L. brevis</i>	99	HM018707
a2	558	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	99	HM018708
b22	815	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	99	HM536141

Секвенирането на 16S рРНК разреши проблема с идентификацията на щамовете b19, b79 и c36, определяйки ги с висок процент на достоверност като вида *L. brevis* (табл. 3). Освен липсата на позитивен PCR сигнал с видово-специфичните праймери за *L. brevis* и последващият 16S rDNA-ARDRA анализ на тези 3 щама с рестрикционните ензими *Hae*III и *Msp*I показва значителни разлики от типовата култура *L. brevis* ATCC 27305^T (даните не са показани). Секвенционният анализ и построеното филогенетично дърво на изолатите идентифицирани с много висок процент на сходство (99%) като вида *L. brevis* от български ръжени закваски също показват известни различия помежду си и спрямо типовата култура (фиг. 5). Затова бе наложително допълнителното генотипиране на щамовете отнесни към този вид и с други високо дискриминативни методи.



Фиг. 5. Филогенетично дърво, получено при анализ на 16S рДНК секвенциите на изолатите идентифицирани с много висок процент на сходство (99%) като вида *L. brevis* от български ржени закваски.

Идентифицирането чрез секвениционен анализ на всичките пет случайно избрани изолата с коковидна морфология (a2, a4, b16, b22, b27) като представители на вида *Pediococcus pentosaceus* (при 99% достоверност), ограничи работата с останалите изолати от р. *Pediococcus*.

В резултат на успешното комбиниране на класическите фенотипни и високо дискриминативни молекулярни методи бяха идентифицирани до вид 67 млечно кисели изолата (табл. 4).

Таблица 4. Видове МКБ, определени чрез молекулярни методи в изследваните кисели закваски.

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. pentosaceus</i>
Закваска А	11	1	4	2
Закваска В	10	3	12	3
Закваска С	2	9	10	0

Видовото идентифициране е с много висок процент на достоверност (над 98%), което е границата, определена съгласно съвременната полифазна таксономия. С помощта на тази голяма група изолати може отчасти да бъде характеризирано биоразнообразието на млечно киселата микрофлора на българските ржени кисели закваски и да се очаква наличието на нови таксони.

4. Вътревидова диференциация и шамово генотипиране на идентифицираните МКБ

За проучване на вътревидовото разнообразие сред идентифицираните млечно кисели бактерии от ржени кисели закваски бе приложен RAPD-PCR с помощта на праймер M13V.

4.1. Вътревидово разнообразие на изолатите от филогенетичната група *L. plantarum*

RAPD-PCR профилите, генерирани от шамовете *L. plantarum* от трите закваски са показани на фиг. 6А. UPGMA анализът добре разграничава трите референтни култури на видовете от филогенетичната група *L. plantarum* и групира изолатите (фиг. 6Б) в един основен нехомогенен кластер (I) и втори малък такъв (II). Последният включва само два щамa b75 и c45 и референтния *L. paraplantarum* ATCC 700211, но с много нисък процент на корелация 0.45%. Кластер II се състои от два подкластера А и В, в рамките на които се очертават 4 подгрупи с различен процент на сходство по RAPD профили.

Подобна хетерогенност в рамките на вида *L. plantarum* е докладвана и от други автори (Quere *et al.*, 1996; Van Reenen & Dicks, 1996; Swezey *et al.*, 2000; Kostinek *et al.*, 2005).

4.2. Вътревидово разнообразие в групата *L. paraplantarum*

По-голямо сходство може да се отбележи за RAPD-PCR профилите (фиг. 7А) на шамовете от трите закваски, идентифицирани като *L. paraplantarum*. Те формират 3 групи (с ~ 80% сходство помежду им) в компактен кластер, който добре корелира (58%) с типовата култура *L. paraplantarum* ATCC 700211 (фиг. 7Б).

4.3. Вътрешовидово разнообразие в групата *L. brevis*

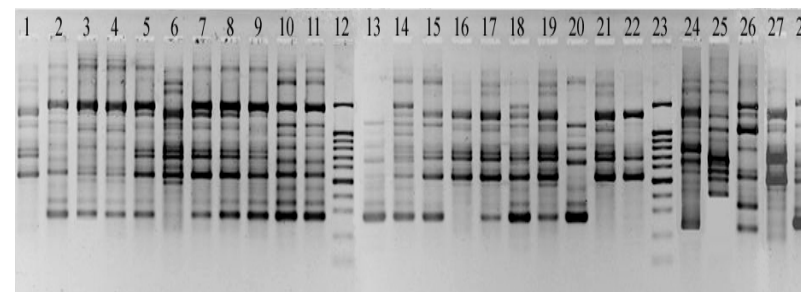
Най-многобройна бе групата изолати идентифицирани като *L. brevis*. Анализът на генерираните RAPD-PCR профили (фиг. 8А) на щамове от трите закваски показва обособяването на два кластера: кластер I, с общо 23 щам (с36, с6а, с3b, b70, b71, b63, b47, b30, b79, b72, b61, b23, с38, с35, с32, с31, с23, с16а, b43, с25, b19, b18, а30) с процент на корелация 0.62% и кластер II, в който наред с изолатите се групират двата референтни щам *L. brevis* ATCC 27305^T и *L. brevis* ATCC 13648. Последните се обособяват в подгрупа (със сходство 0.88%), като най- близки по ДНК-профил с тях се определят щамове от закваска А: а37, а25 и а24. Трябва да отбележим ниския процент на корелация с типовата култура (под 50%) на останалите *L. brevis* изолати от български ръжени закваски (фиг. 8Б). Сред българските изолати може да се допусне наличие на нов таксон, за чието доказване са нужни серия от допълнителни анализи и е обект на бъдещи изследвания.

4.4. Вътрешовидово разнообразие в *P. pentosaceus* групата

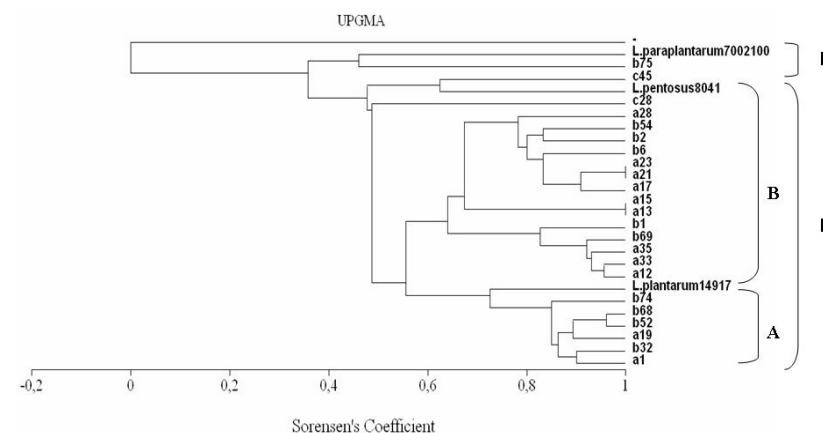
Най-слабо дискриминативен се оказа RAPD-PCR анализът при групата от щамове *P. pentosaceus* (фиг. 9А). При тях се генерират профили с висока степен на подобие, групирани в общ кластер с процент на сходство 0.72%. Най-отдалечен в групата е щам b22 (фиг. 9Б), а останалите осем щам (b27, а39, а20, а8, а5, а4, а3, а2) показват 0.82% хомоложност на профилите.

Проведените анализи доказват добрата приложимост и дискриминативна способност на RAPD анализите с помощта на праймер M13V при МКБ от ръжени кисели закваски. Те са своеобразно потвърждение на коректната видова идентификация на групата щамове. В допълнение, щамово-специфичните RAPD-PCR профили могат да послужат при бъдеща генетична паспортизация на тези изолати.

Прилагането на полифазния подход, който комбинира конвенционални морфологични характеристики и резултати от генотипирането позволи да бъде определен таксономичния статус на изследваните МКБ от български ръжени закваски (табл. 5).

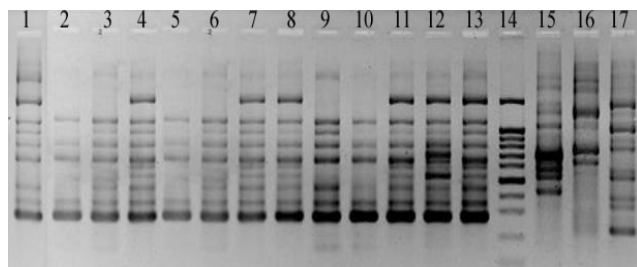


А

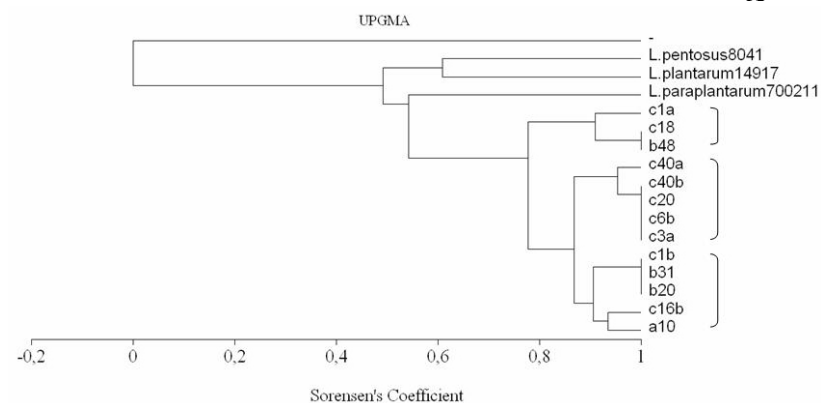


В

Фиг. 6. А) RAPD-PCR профили на щамове *L. plantarum*, закваски А, В и С. Фотонегатив на 2 % агарозен гел, след оцветяване с етидиев бромид. Позиции: 1- а1; 2- а12; 3- а13; 4- а15; 5- а17; 6- а19; 7- а21; 8- а23; 9- а28; 10- а33; 11- а35; 12- маркер за молекулно тегло (100 bp); 13- b1; 14- b2; 15- b6; 16- b32; 17- b52; 18- b54; 19- b68; 20- b69; 21- b74; 22- b75; 23- маркер за молекулно тегло (100bp); 24- *L. plantarum* ATCC 14917^T; 25- *L. paraplantarum* ATCC 700211; 26- *L. pentosus* ATCC 8041; 27- c28; 28- c45. **В)** Групиране на щамове на базата на получените профили (Дендрограмата е построена с помощта на UPGMA анализ).



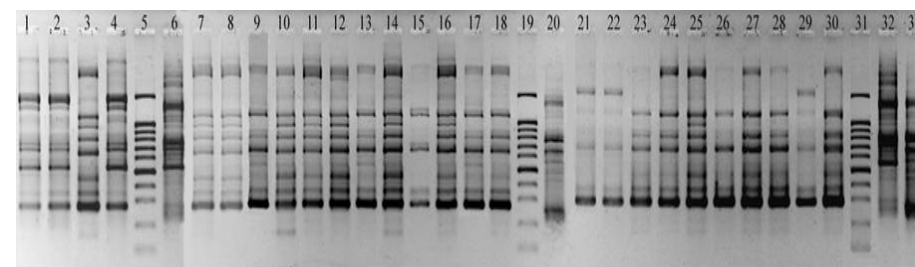
A



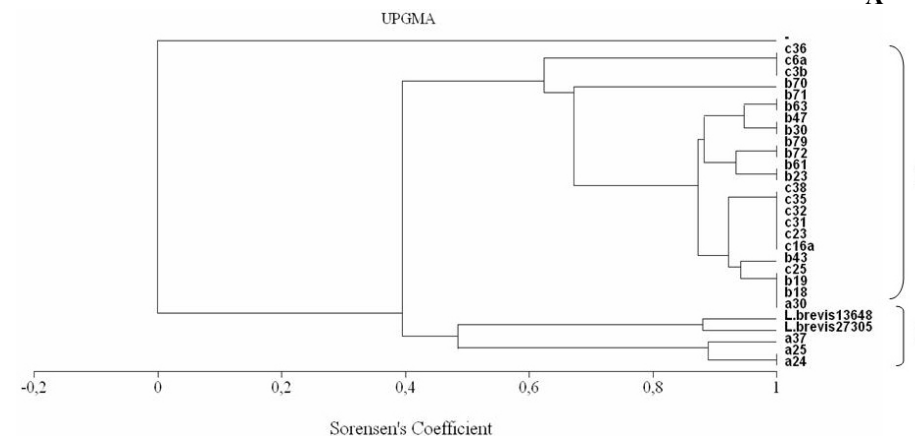
B

Фиг. 7. А) RAPD-PCR профили на щамове *L. paraplantarum*, закваски А, В и С. Фотонегатив на 2% агарозен гел, след оцветяване с етидиев бромид. Позиции: 1- a10; 2- b20; 3- b31; 4- b48; 5- c1a; 6- c1b; 7- c3a; 8- c6b; 9- c16b; 10- c18; 11- c20; 12- c40a; 13- c40b; 14- маркер за молекулно тегло (100 bp); 15- *L. paraplantarum* ATCC 700211; 16- *L. plantarum* ATCC 14917^T; 17- *L. pentosus* ATCC 8041.

В) Групиране на щамове на базата на получените профили (Дендрограмата е построена с помощта на UPGMA анализ).



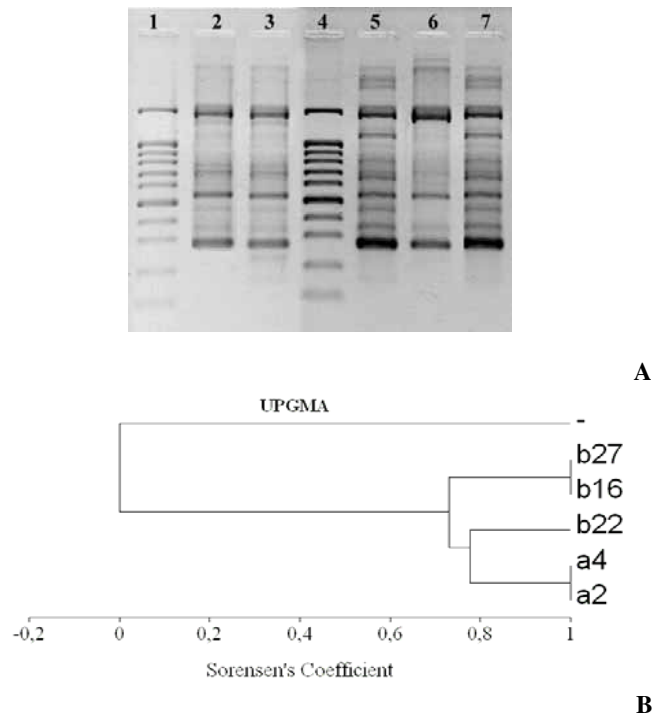
A



B

Фиг. 8. А) RAPD-PCR профили на щамове *L. brevis*, закваски А, В и С. Фотонегатив на 2% агарозен гел, след оцветяване с етидиев бромид. Позиции: 1- a24; 2- a25; 3- a30; 4- a37; 5- маркер за молекулно тегло (100 bp); 6- *L. brevis* ATCC 27305^T; 7- b18; 8- b19; 9- b23; 10- b30; 11- b43; 12- b47; 13- b61; 14- b63; 15- b70; 16- b71; 17- b72; 18- b79; 19- маркер за молекулно тегло (100 bp); 20- *L. brevis* ATCC 13648; 21- c3b; 22- c6a; 23- c16a; 24- c23; 25- c25; 26- c31; 27- c32; 28- c35; 29- c36; 30- c38; 31- маркер за молекулно тегло (100bp); 32- *L. brevis* ATCC 27305^T; 33- *L. brevis* ATCC 13648.

В) Групиране на щамове на базата на получените профили (Дендрограмата е построена с помощта на UPGMA анализ).



Фиг. 9. А) RAPD-PCR профили на щамове *P. pentosaceus*, закваски А и В. Фотонегатив на 2% агарозен гел, след оцветяване с етидиев бромид. Позиции: 1- маркер за молекулно тегло (100 bp); 2- a2; 3- a4; 4- маркер за молекулно тегло (100 bp); 5- b16; 6- b22; 7- b27.

В) Групиране на щамове на базата на получените профили (Дендрограмата е построена с помощта на UPGMA анализ).

Таблица 5. Полифазно-таксономична идентификация на млечно кисели бактерии от български ръжени кисели закваски (обобщение).

Идентифициран вид в български ръжени кисели закваски	Щамове, отнесени към вида по закваски	Методи за идентификация
<i>L. plantarum</i>	Закваска А a1, a12, a13, a15, a17, a19, a21, a23, a28, a33, a35	мултиплекс PCR, RAPD-PCR
Закваска В	b1, b2, b6, b32, b52, b54, b68, b69, b74, b75	API 50 CH, мултиплекс PCR, секвенционен анализ, RAPD-PCR
Закваска С	c28, c45	мултиплекс PCR, RAPD-PCR
<i>L. paraplantarum</i>	Закваска А a10	мултиплекс PCR, RAPD-PCR
Закваска В	b20, b31, b48	API 50 CH, мултиплекс PCR, RAPD-PCR
Закваска С	c1a, c1b, c3a, c6b, c16b, c18, c20, c40a, c40b	мултиплекс PCR, RAPD-PCR
<i>L. brevis</i>	Закваска А a24, a25, a30, a37	видово-специфичен PCR за <i>L. brevis</i> , RAPD-PCR
Закваска В	b18, b19, b23, b30, b43, b47, b61, b63, b70, b71, b72, b79	API 50 CH, видово- специфичен PCR за <i>L. brevis</i> , секвенционен анализ, RAPD-PCR
Закваска С	c3b, c6a, c16a, c23, c25, c31, c32, c35, c36, c38	видово- специфичен PCR за <i>L. brevis</i> , секвенционен анализ, RAPD-PCR
<i>P. pentosaceus</i>	Закваска А a2, a4	секвенционен анализ, RAPD-PCR
Закваска В	b16, b22, b27	секвенционен анализ, RAPD-PCR
Закваска С	-	секвенционен анализ, RAPD-PCR

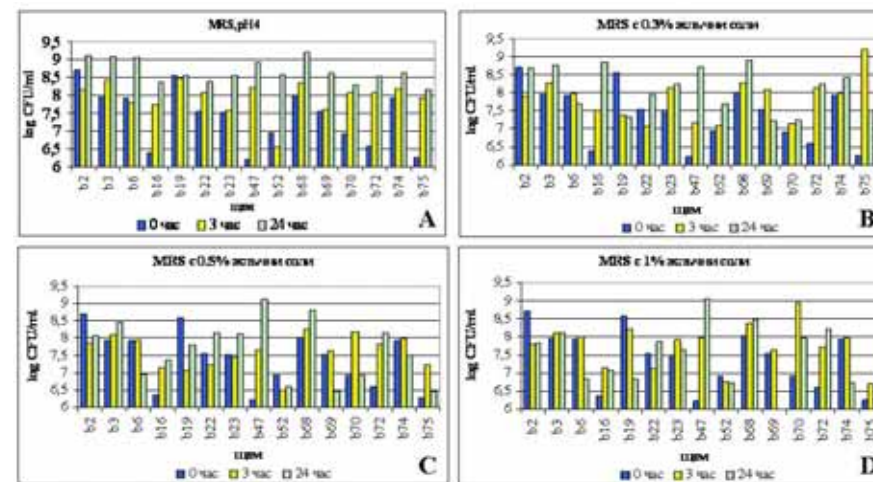
5. *In vitro* характеризиране на пробиотичните свойства на щамове млечно кисели бактерии

През последните години, с оглед разширяването на кръга на потенциалните пробиотици, интензивно се проучва млечно киселата микрофлора на различни ферментирани храни.

За характеризиране на пробиотичните свойства на щамове МКБ от микрофлората на български ръжени кисели закваски бе проведен скрининг на 23 щама МКБ от колекцията. Подбраните при него щамове бяха подложени на тестове в моделна система за *in vitro* симулиране на условията в стомашно-чревния тракт на човека. Допълнително бяха изследвани тяхната чувствителност към действието на различни антибиотици, продукция на водороден пероксид и спектър на антимикробно действие, които са важни компоненти на пробиотичното действие.

5.1. Подбор на щамове, устойчиви на въздействието на кисело рН и жлъчни соли

Първата стъпка в пробиотичното оценяване на 23-те МКБ от български ръжени кисели закваски бе свързана с първоначален подбор на щамове, способни да се развиват в присъствието на фактори, които *in vivo* въздействат на микроорганизмите в ГИТ, а именно: моделна среда MRS бульон с рН 4 и MRS бульон с 0.3, 0.5 и 1 % (w/v) жлъчни соли. Щамове бяха култивирани при температура 37°C за период от 24 часа. Проследена бе промяната в оптичната им плътност (590 nm) и бе определен броя на жизнеспособните клетки на 0, 3 и 24 ч. Тези параметри бяха сравнени със съответните данни за щамове при култивирането им на среда MRS с рН 6.5 като контрола. Повечето изпитвани МКБ преживяват и дори се развиват при тези селектиращи условия, доказателство за което е нарастването на броя живи клетки. В допълнение, при опитите с MRS бульон с рН 4 за преобладаващата част от щамове експоненциалният растеж започва още на третия час от инокуирането (фиг. 10).



Фиг. 10. Преживяемост на МКБ на MRS бульон (с рН 4) и в присъствието на жлъчни соли

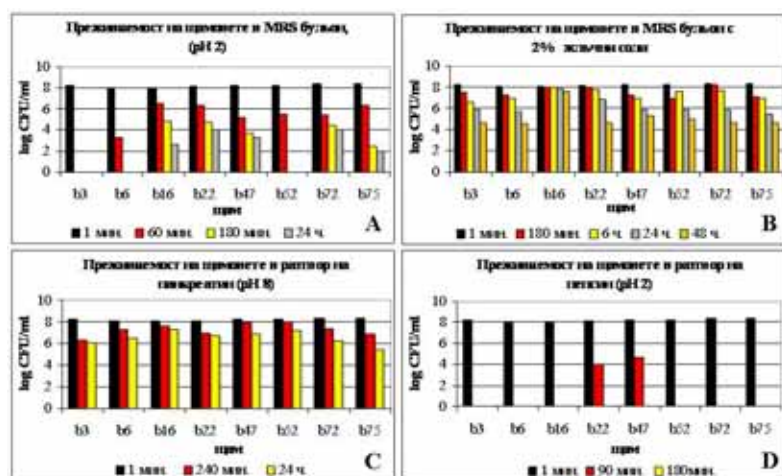
Подбрани бяха 8 щама, показващи най-добра преживяемост при въздействието на кисело рН и жлъчни соли: b3 (*L. plantarum*), b6 (*L. plantarum*), b16 (*P. pentosaceus*), b22 (*P. pentosaceus*), b47 (*L. brevis*), b52 (*L. plantarum*), b72 (*L. brevis*) и b75 (*L. plantarum*), които бяха подложени на тест “*in vitro* digestion”.

5.2 Транзитна толерантност при подбрани МКБ с помощта на тест “*in vitro* digestion”

Тест “*in vitro* digestion” представлява моделна система, симулираща условията в храносмилателния тракт и за целта изследва преживяемостта на щамове в 4 вида среди: MRS с рН 2, MRS с 2 % жлъчни соли, среда с пепсин (рН 2) и среда с панкреатин (рН 8) в различни времеви точки по схема. Осемте щама, показали най-висока жизнеспособност при теста за подбор бяха подложени на този тест. Първоначално бе изпитана преживяемостта им в среда MRS с рН 2.0 (фиг. 11A). Като най-устойчиви бяха определени b22 и b72. Въпреки дългият инкубационен период от 24 часа, част от тестваните МКБ показаха добра преживяемост с различен порядък на загиване. Единствено при щам b3 още на първия час не се установиха жизнеспособни клетки. Едновременно с това всички изпитани щамове бяха способни да понесат 2% концентрация на жлъчни соли в среда

MRS (фиг. 11B). Дори след 48 часа инкубиране титърът на жизнеспособни клетки остава висок, което е най-ясно изразено при щамове b16 и b47. Подобно е поведението на щамове при инкубиране в разтвор на панкреатин - всички запазват значителна жизнеспособност при изпитаната концентрация на ензима, която при щамове b16 и b52 почти не се променя в сравнение с изходната (фиг 11C).

Комбинацията от силно кисела среда (pH 2.0) и пепсин се оказва летална за повечето от изследваните МКБ (фиг. 11D). Още на 90-тата минута при всички щамове, с изключение на b22 и b47, се регистрира отсъствие на жизнеспособни клетки (фиг. 11D). До 180-тата минута загиват и щамове *P. pentosaceus* b22 и *L. brevis* b47. Въпреки това, жизнеспособността им при тези драстични условия за 90 мин. – време, за което се приема, че нормално храната престоява в стомаха след нейния прием, позволява тяхното оценяване като потенциално пробиотични щамове.



Фиг. 11. Тест "in vitro digestion" на избрани щамове МКБ от български ржени кисели закваски.

Макар получени в *in vitro* условия и при ограничен брой изследвани щамове, резултатите от първото проучване на транзитната толерантност на лактобацили и педиококи, изолирани от ржени кисели закваски очертават тази екологична ниша като възможен източник на МКБ с пробиотичен потенциал.

5.3. Антимикробна активност на МКБ от ржени кисели закваски

5.3.1. Антимикробна активност спрямо патогенни тест-микроорганизми

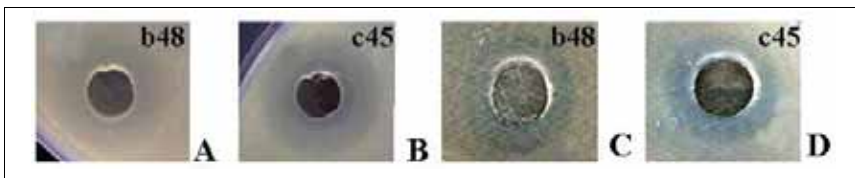
Антибактериалната активност е съществен критерий при подбора на пробиотични щамове, които са естествени антагонисти на потенциално вредните бактерии. Проучена бе антимикробната активност на щамове МКБ спрямо бактериални видове, докладвани като патогени (табл. 2). Използван бе метода на дифузия в агар. Изследвани бяха филтрувани културални течности от 24- и 48- часови култури. По-висока активност, изразена в (мм) стерилни зони бе отчетена при културите от късна експоненциална фаза (48 ч.). Вероятно, високото ниво на продуцираната млечна киселина в края на ферментационния период определя подобна инхибиторна активност. За премахване ефекта на органичните киселини, безклетъчните филтрата бяха неутрализиран до pH 6.2-6.5 и тестовите бяха повторени със същите тест- микроорганизми. Резултатите показаха липса на инхибиторен ефект за всички индикаторни щамове, с изключение на *L. brevis* щам b47, който подтиска растежа на *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Антибактериалната активност на изследваните от нас щамове, с изключение на *L. brevis* b47, е в резултат единствено на биосинтезата на органични киселини.

5.3.2. Антимикробна активност спрямо микроорганизми, причиняващи развала на храните

Антагонистичната активност на 44 идентифицирани щамове МКБ бе отчетена срещу тест културите *B. subtilis* ATCC 6633 (вегетативни клетки и спори) и *B. cereus* ATCC 11778 по метода на дифузия в агар. Изследвани бяха както свежи, така и неутрализиран до pH 6.0 културални течности на 24- и 48- часови култури.

Нативните културални течности на изследваните щамове проявяват антимикробна активност спрямо всички изследвани тест микроорганизми. В тестовите с третиране на спори на *B. subtilis*, по-добра активност бе наблюдавана при 24-часовите в сравнение с 48- часовите култури МКБ. Спрямо останалите индикаторни бактерии повечето от изолатите имат по-висока активност на 48 час когато супернатантите се отличават с по-ниско pH. В този смисъл, продуцираната в качеството си на естествен метаболит млечна киселина и други органични киселини (за хетероферментативните представители от групата), вероятно са основните инхибиторни субстанции.

Неутрализираните 24-часови културални течности на изследваните 44 щама МКБ не инхибират растежа на нито един от тест-микроорганизмите, което потвърждава хипотезата за млечната киселина, продуцирана като единствен антимикробен агент. Изключение правят щамове *L. paraplantarum* b48 и *L. plantarum* c45, които на 48 час показаха инхибиторна активност спрямо *B. subtilis* (вегетативни клетки) и *B. cereus* (фиг. 12).



Фиг. 12. Антимикробна активност на неутрализираните 48-часови културални течности по метода на дифузия в агар. (А) Зона на инхибиране срещу *B. subtilis* ATCC 6633 на щам b48; (В) Зона на инхибиране срещу *B. subtilis* ATCC 6633 на щам c45; (С) Зона на инхибиране срещу *B. cereus* ATCC 11778 на щам b48; (D) Зона на инхибиране срещу *B. cereus* ATCC 11778 на щам c45.

Редица изследователи също докладват за подобни антагонистични свойства на лактобацилите от кисели закваски, дължащи се на продукция на органични киселини и други, все още неохарактеризирани понастоящем антимикробни субстанции (Katina *et al.*, 2002; Valerio *et al.*, 2008). Антимикробната активност е една от характеристиките, признавани като основни при първичната селекция на потенциални пробиотични щамове. Нейното съчетаване със способността за преживяване в условията на ГИТ е в основата на успешното прилагане на избран пробиотичен щам.

5.4. Продукция на водороден пероксид

Продукцията на водороден пероксид увеличава пробиотичният потенциал на МКБ, тъй като подтиска растежа на редица патогенни и токикогенни микроорганизми.

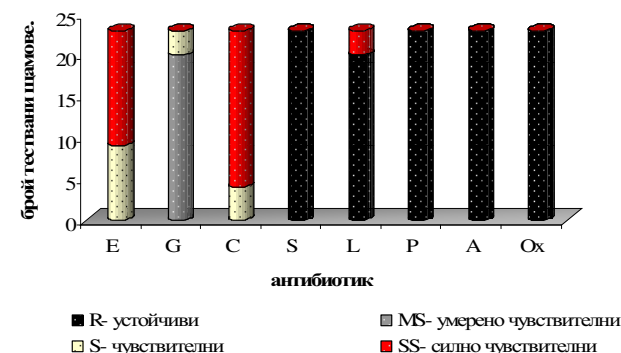
Способност за продукция на водороден пероксид, проучена с помощта на качествения метод на Eschenbach *et al.* (1989) бе установена при щамове b3, b6, b22, b52, b70 и b75. Липсата на подобна продукция при останалата част от изследваните щамове МКБ отчасти би могла да се разглежда като положително качество в технологичен аспект, защото H_2O_2 може да окаже негативен ефект върху останалите щамове от съпътстващата микрофлора на брашната, които допринасят за богатството на вкуса на ръжения хляб. В този смисъл,

сред млечната микрофлора на българските ръжени закваски има щамове, чиито свойства могат да послужат за разработването на различни стартерни и биопротективни комбинации.

5.5. Определяне на антибиотична чувствителност

Съгласно изискването на Световната Здравна Организация познаването на спектъра на антибиотична чувствителност е важен и задължителен критерий при подбора на щамове за приложение в медицината и храните (FAO/WHO, 2002). За характеризиране на антибиотичната чувствителност на изследваните от нас 23 щама МКБ бяха избрани често употребявани в клиничната практика антибиотици с различен механизъм на действие: 1) инхибитори на синтеза на клетъчната стена и 2) инхибитори на белтъчната синтеза.

Всички изпитани щамове показаха резистентност към антибиотиците от първата група, както към пеницилин, така и към ампицилин и оксацилин (табл. 6). По отношение на антибиотиците, инхибиращи белтъчната синтеза, бе наблюдавано различие в чувствителността, с изключение на стрептомицина, към който всички щамове показаха устойчивост (фиг. 13). Най-голям бе броят на щамове силно чувствителни към хлорамфеникол, последван от еритромицин.



Фиг. 13. Спектър на антибиотична чувствителност на 23 щама МКБ, изолирани от български ръжени кисели закваски. Е- еритромицин, G- гентамицин, С- хлорамфеникол, S- стрептомицин, L- линкомицин, Р- пеницилин, А- ампицилин, Ох- оксацилин.

Таблица 6. Антибиотична чувствителност на щамове МКБ от български ръжени кисели закваски

Щам №	а* Антибиотици							
	b* Инхибитори на синтеза на клетъчната стена				b** Инхибитори на синтеза на белтъци			
	P	A	Ox	E	G	C	S	L
b2	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b3	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b6	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b16	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b19	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b20	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b22	R	R	R	S	MS	SS	R	SS
b23	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b30	R	R	R	SS	S	SS	R	R
b31	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b32	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b43	R	R	R	SS	MS	SS	R	SS
b47	R	R	R	S	MS	S	R	R
b48	R	R	R	S	S	S	R	R
b52	R	R	R	S	S	SS	R	R
b63	R	R	R	S	MS	SS	R	R
b68	R	R	R	S	MS	SS	R	R
b69	R	R	R	SS	MS	S	R	R
b70	R	R	R	SS	MS	S	R	R
b71	R	R	R	SS	MS	SS	R	R
b72	R	R	R	S	MS	SS	R	SS
b74	R	R	R	S	MS	SS	R	R
b75	R	R	R	S	MS	SS	R	R

Легенда:

(a*) R-устойчиви, MS- умерено чувствителни (зона 7-16 mm), S- чувствителни (зона 16- 25 mm), SS- силно чувствителни (> 25 mm).

(b*) P- пеницилин; A- ампицилин; Ox- оксацилин.

(b**) E- еритромицин; G- гентамицин; C- хлорамфеникол; S- стрептомицин; L- линкомицин.

Установената добра преживяемост на щамовете *P. pentosaceus* b22 и *L. brevis* b47 в моделната система на ГИТ, устойчивостта им към често използвани в клиничната практика антибиотици, както и антимикробната им активност спрямо патогенни микроорганизми позволяват тяхното определяне като потенциални пробиотични щамове. Едно бъдещо изпитване на тези щамове в *in vivo* условия би ги квалифицирало комплексно и би определило възможната форма за тяхното приложение.

6. Подбор на млечно кисели бактерии по технологично значими свойства

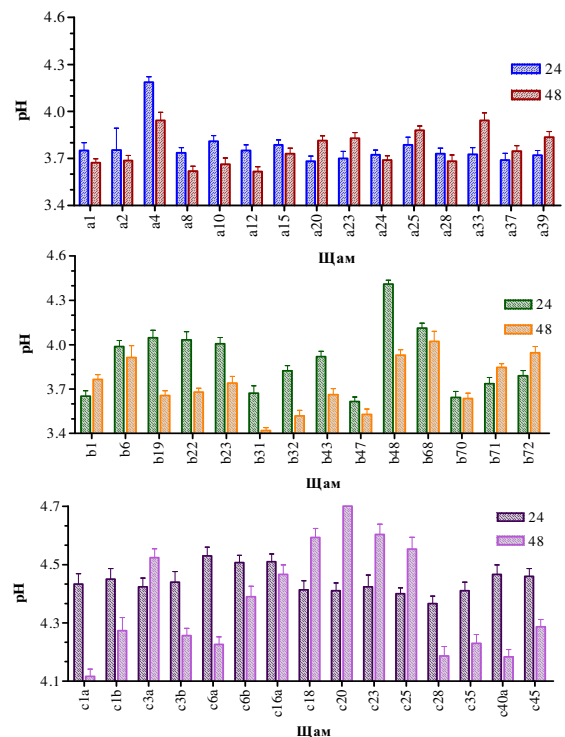
Една от основните задачи на настоящия дисертационен труд бе създаването на набор от характеризирани млечно кисели култури, които да послужат като база при подбора и създаването на български ръжени закваски.

Приготвянето на изходна ръжена кисела закваска би могло да се осъществи чрез спонтанна ферментация на тестото или чрез внасяне на чисти култури от млечно кисели бактерии- т.нар. стартерни култури, които трябва да отговарят на определени изисквания. Именно тези критерии бяха използвани за подбор на МКБ с технологично значими свойства сред създадената колекцията от български щамове от ръжени закваски.

6.1. Способност на МКБ за активно подкиселяване на средата

Представителна извадка от общо 44 щама МКБ, изолирани от трите ръжени кисели закваски бе подложена на тест за подкиселяване на среда mMRS. И при трите закваски бяха установени от умерено до силно подкиселяващи щамове (фиг. 14). От всички изпитани щамове, най-активно подкиселяват средата: *L. plantarum* b1, *L. brevis* b47 и *L. brevis* b70.

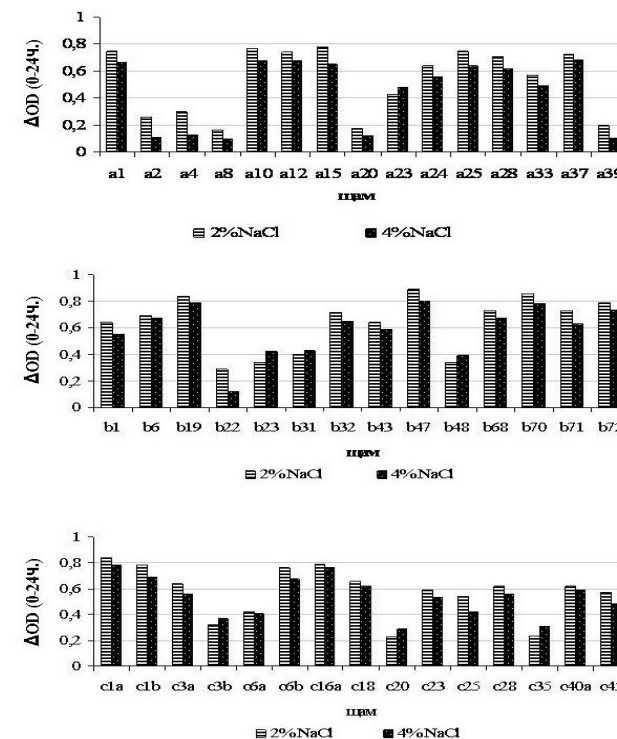
Продукцията на киселина от МКБ води както до технологични предимства при приготвянето на хлебните продукти, така и до повишаване на тяхната трайност чрез превенция от растежа на нежелани микроорганизми. В този смисъл, българските ръжени закваски представляват екологична ниша, която безспорно представлява научен интерес с оглед откриването на щамове с добра подкиселяваща способност.



Фиг. 14. Способност на МКБ, от кисели закваски А, В и С активно да подкиселяват среда mMRS (модифициран MRS с малтоза) при култивиране на 30°C за 24 ч. и 48 ч.

6.2. Устойчивост на МКБ към различни концентрации на натриев хлорид

В рецептурите за производство на ръжен хляб количеството на NaCl е в границите 1.5 - 2 % (Караджов и сътр., 2003), което обуславя наличието на оптимални условия за растеж в тази среда на преобладаващата част от изследваните щамове МКБ (фиг. 15).



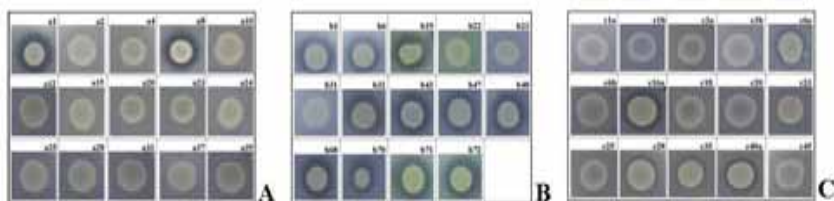
Фиг. 15. Способност за растеж на МКБ при различни концентрации на натриев хлорид в средата, отчетена по промяната в оптичната плътност ($\lambda=600nm$) при култивиране в среда mMRS (модифициран MRS с малтоза).

6.3. Начално проучване на протеолитична и амилазитична активност

6.3.1. Протеолитична активност

Протеолитичното разграждане на глютен в качеството си на единствен въглероден източник от 44-те подбрани МКБ бе анализирано в среда GMB - Gluten Maltose Broth (Пере *et al.*, 2003), модифицирана за целите на настоящото изследване, с 0.017% индикаторно багрито - бромкрезол пурпур. След 24-ч. култивиране при 30°C, всички изпитвани щамове показаха способност да се развият, усвоявайки глютен, визуализирана чрез трансформация на цвета на средата от виолетов в жълт. В същото време, едва при

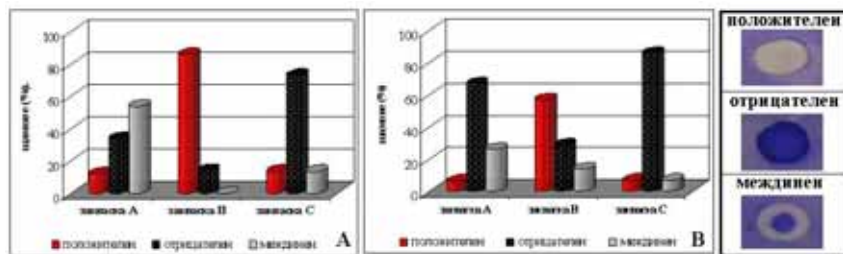
около 43% от щамовете бяха измерени зони вследствие на казеинолитична активност на среда Calcium caseinate agar (фиг. 16).



Фиг. 16. Скрининг за казеинолитична активност при щамовете МКБ, изолирани от три ръжени кисели закваски (А, В и С) на среда Calcium caseinate agar (Fluka).

Всички потенциално казеинолитични щамове (a1, a8, b1, b6, b19, b32, b43, b47, b48, b68, b70, b71, b72, c6a, c16a, c23, c28, c35 и c40a) бяха подложени на тест за коагулация на мляко и определени като бързо коагулиращи щамове по критерия на Hébert *et al.* (2001) (причиняват коагулация на млякото за по-малко от 16 ч. при 30°C).

Допълнително потвърждение на високия протеолитичен капацитет спрямо глутен и казеин бе получено по метода, предложен от Wehrle (Wehrle *et al.*, 1999) (фиг. 17), но само 33% от щамовете от закваска А, 71% от закваска В и 14% от закваска С показаха еднозначно способност за неговата хидролиза (фиг. 17А). Наблюдавана бе и разлика в разпределението на броя активни щамове спрямо казеин в отделните закваски, с тяхното преобладаване в закваска В (фиг. 17В). Следователно, методът на Wehrle се оказва с по-висока дискриминативна способност в сравнение с моделната система в индикаторната среда GMB и е подходящ за пре-селекция на щамове с такава активност.

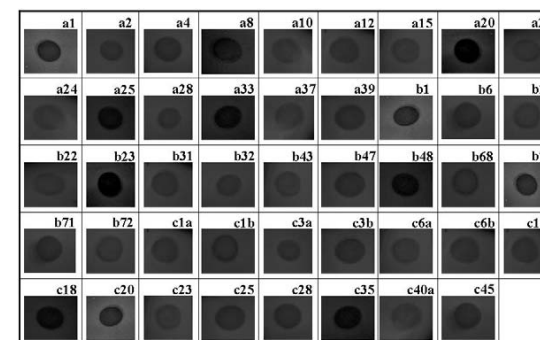


Фиг. 17. Качествена оценка на способността за хидролиза на глутен (А) и казеин (В) на щамове МКБ от български ръжени кисели закваски в моделни системи.

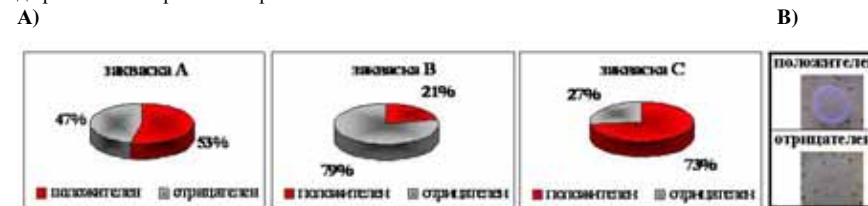
За да се даде количествена оценка на тестваните щамове по този важен технологичен показател е необходимо допълнително биохимично определяне в условия симулиращи процесите на получаване на кисел хляб. Но макар и качествена, преценката позволява начален подбор на МКБ, които да бъдат тествани в комбинации за закваски за ръжени кисели теста.

6.3.2. Амилолитична активност

Изпитана бе способността на 44-те МКБ за растеж на скорбелен агар. След 48-часово инкубиране при 30°C и последващо третиране с луголов разтвор, всички тествани щамове показаха различно изразени зони на просветляване около колонии, разчетени първично като положителен резултат (фиг.18). Но при последващите тестове само за 22 от щамовете бе определена способност за усвояване на скорбяла по метода с хромогенен субстрат AZCL- амилоза (фиг. 19). Несъответствието в получените резултати вероятно се дължи на различната специфичност на двата приложени метода.



Фиг. 18. Визуализиране на способността на щамовете МКБ от български ръжени закваски да растат на скорбелен агар.

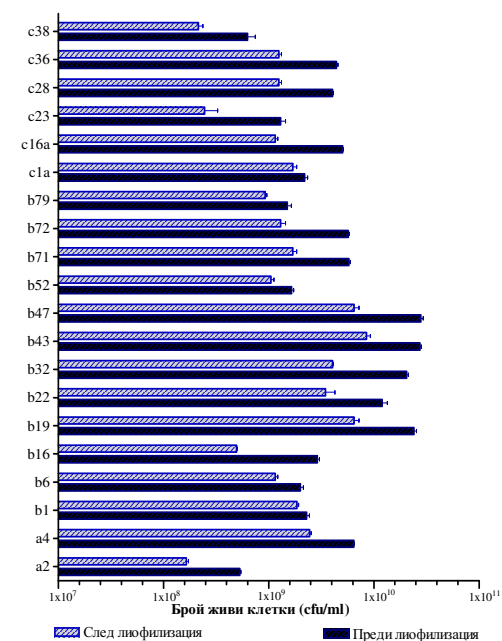


Фиг. 19. (А) Процентно представяне (по закваски) на щамовете МКБ с амилолитична активност, отчетена с качествен метод (В) на MRS агар, модифициран с AZCL- амилоза.

Получените от нас резултати показват присъствието на щамове МКБ с протеолитична и амилалитична активност в българските ръжени кисели закваски. Особен интерес представляват щамове, съчетаващи тези две метаболитни активности, като напр. *L. plantarum* b32, *L. brevis* b43, *L. brevis* c16a, *L. brevis* c23, и *L. brevis* c28. В бъдещи изследвания е желателно допълнителното охарактеризиране на тези щамове с оглед на тяхното биотехнологично приложение.

6.5. Преживяемост при лиофилизация

За практическото използване на изследваните от нас щамове МКБ като стартерни култури за хлебопроизводството бе оценена тяхната способност да преживяват процеса на лиофилизация, с оглед на приложението им под формата на лиофилизати. МКБ се характеризират с ниска преживяемост при лиофилизация. Лيوфилизирането на щамове бе извършено в НБПМКК по стандартна методика. Най-добра способност да понасят стреса, свързан с лиофилизацията и да запазват своята жизнеспособност показаха щамове b1, b52, b79, c18, c1a и b6 (фиг. 20). Най-слабо преживяват щамове b32 и b16 (~18-19%). Следователно, лиофилизацията може да бъде предложена като подходящ метод за успешно съхранение на изследваните щамове (с изключение на щамове b32 и b16).



Фиг. 20. Преживяемост на щамове МКБ от български ръжени кисели закваски при процес на лиофилизация със стандартен криопротектор (съгласно НБПМКК, България).

7. Оценка приложимостта на избрани щамове МКБ като стартерни култури за производство на ръжен хляб

Известно е, че различните стартерни култури допринасят за различие във вкусовите свойства на готовите хлебни изделия. Ето защо, за да се запази традиционният за региона вкусов профил на ръжения хляб, за предпочитане е да се използват стартерни култури от щамове, изолирани от местни, естествено ферментирани кисели теста.

В тази връзка, нашата цел бе да се направи оценка на приложимостта на избрани щамове МКБ като стартерни култури за приготвяне на кисели закваски при производството на ръжен хляб. За осъществяване на поставената цел бяха подбрани щамове МКБ от микробната колекция на основата на задължителните за статута “стартерна култура” санитарни, физиологични и технологични активности, с висок процент на преживяемост

след лиофилизиране, активно подкиселяващи средата и едновременно с това определени като потенциално пробиотични: хомоферментативния щам *P. pentosaceus* b22 и хетероферментативните щамове *L. brevis* b47 и *L. brevis* c16a. В допълнение, c16a е отчетен като щам с протеолитична и амилалитична активност. Тестовите са проведени съгласно общоприетите у нас рецептурни схеми за приготвяне на закваски за ръжен хляб (Караджов и сътр., 2003).

7.1. Технологична характеристика на лабораторно приготвени ръжени закваски

7.1.1. Проследяване на активната и общата титруема киселинност на закваските

За лабораторното приготвяне на закваските бе използвано ръжено брашно, тип 1000, любезно предоставено ни от мелница Балван (гр. Велико Търново). Замесена бе хомогенна смес от ръжено брашно и вода, която бе разделена на осем равни части за приготвяне на седемте варианта закваски и контролата, която е без добавка на МКБ. Избраните три щама *P. pentosaceus* b22, *L. brevis* b47 и *L. brevis* c16a бяха съчетани по схемата всеки с всеки, и заедно трите. Така бяха приготвени 7 комбинации стартерни култури за изпитване. Биомасата от активно растящи култури на тези щамове бе събрана чрез центрофугиране, двукратно промиване във физиологичен разтвор и ресуспендиране в стерилен физиологичен разтвор. Клетъчните суспензии бяха разреждени до оптична плътност 1 при 620 nm (OD₆₂₀), което приблизително съответства на 10⁹ CFU/ml и под тази форма бяха прибавени към съответната смес вода-брашно. Микробният състав на всеки от вариантите закваски е посочен на таблица 7.

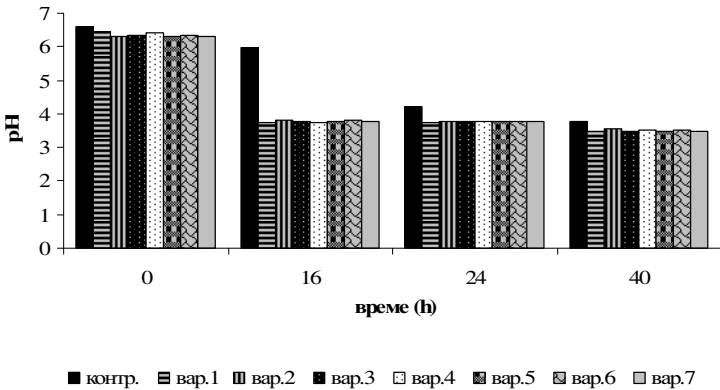
Таблица 7. Комбиниране на подобрите микробни култури в експериментални прототипи за стартерни култури за кисели теста и производство на ръжен хляб.

Варианти	Вар. 1	Вар. 2	Вар. 3	Вар. 4	Вар. 5	Вар. 6	Вар. 7	Контр.
Щам								
b22	-	-	+	-	+	+	+	-
b47	+	-	-	+	+	-	+	-
c16a	-	+	-	+	-	+	+	-

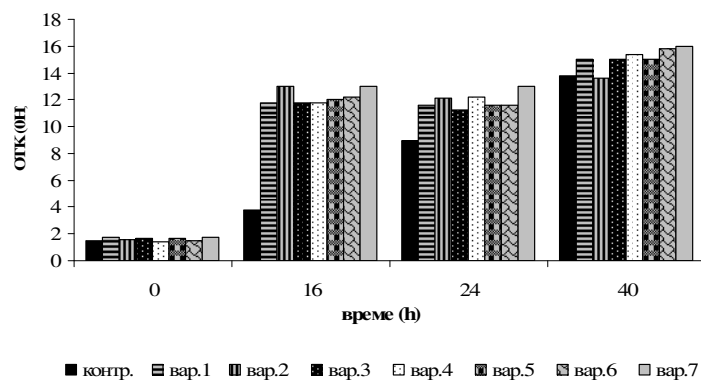
Така приготвените закваски бяха инкубирани при 22 ± 2°C и освежавани на всеки 24 часа чрез добавяне на определено количество ръжено брашно и вода до достигане на необходимите качества на тестото, което ще се ползва за закваска. Следена бе технологично определената като необходима общата титруема киселинност (ОТК)- 14-

16°Н (по Lönner and Arné, 1995), която се постига при тестваната стартерната култура. Проби бяха взимани в динамика, ежедневно, непосредствено преди освежаване на закваската, на 8^{-а} и на 16^{-а} час след това. Резултатите от измерванията на pH и ОТК на седемте варианта закваски и контролата са представени съответно на фигура 21 и фигура 22. Наблюдавано бе рязко повишаване на стойностите на ОТК на закваските на 16 ч. след началото на ферментацията. Във времеия интервал от 16 ч. до 24 ч. бе отчетен лек спад в стойностите на ОТК (с изключение на вар.7, при който стойността се запазва непроменена), последван от ново повишение след 24 ч. Обратнопропорционално изменение бе отчетено по отношение стойностите на активната киселинност- pH.

Както бе отбелязано, pH стойността на киселата закваска трябва да бъде под 4.5 (Lönner & Arné, 1995). На посочените условия отговарят и осемте лабораторно приготвени закваски. Според Попова (Попова и сътр., 1980) с добри технологични показатели е онази закваска, чиято ОТК е над 15°Н. Варианти 4, 6 и 7 (табл. 7) от приготвените и проучени от нас ръжени закваски, достигат този показател. За справка, това са вариантите, в които хетероферментативния щам *L. brevis* c16a е в комбинация с щамове *L. brevis* b47 и *P. pentosaceus* b22. Тези резултати биха могли да бъдат обяснени с добра симбиоза между посочените щамове, която е желан показател при селекцията на стартерни култури.



Фиг. 21. Изменение на активната (pH) киселинност в хода на ферментацията на лабораторните кисели закваски, приготвени чрез добавяне на стартерни култури.

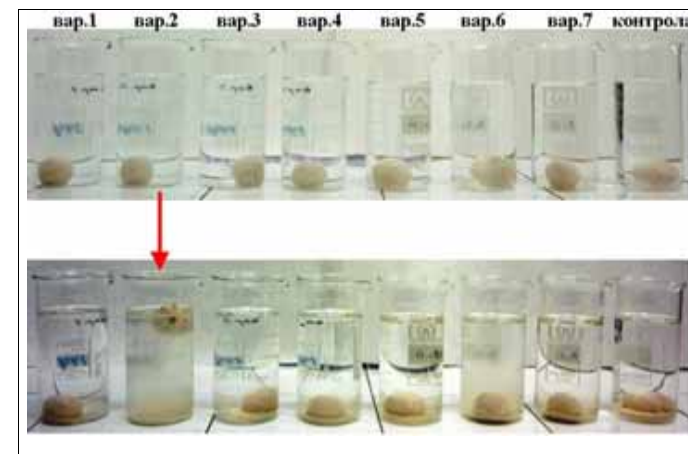


Фиг. 22. Изменение на общата титруема киселинност (ОТК) в хода на ферментацията на лабораторните кисели закваски, приготвени чрез добавяне на стартерни култури.

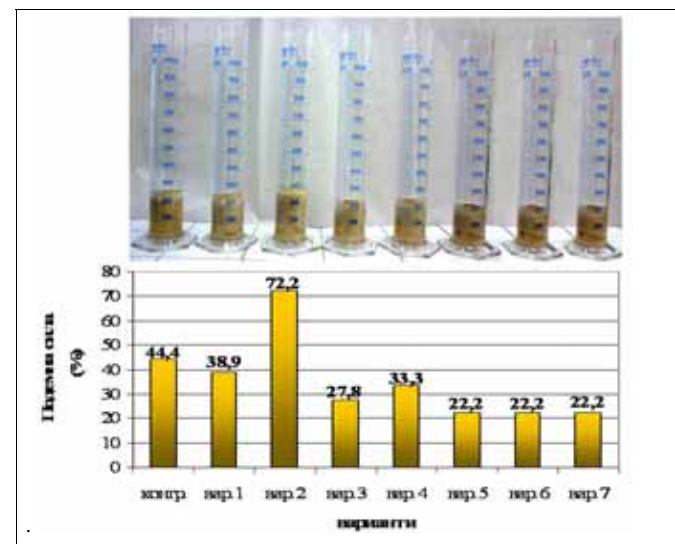
7.1.2. Газообразуваща способност

Едно от основните хлебопекарни свойства на брашното е неговата газообразуваща способност или т.нар. подемна сила (Караджов и сътр., 2003). Тя се характеризира с количеството отделен въглероден диоксид за определено време на ферментация на тестото (Караджов и сътр., 2003). Газообразуващата способност на лабораторно приготвените ръжени закваски бе определена при проби от по 10 гр. от всяка закваска с помощта на стандартен протокол в обем от 200 мл вода. Отчетено бе наличие или отсъствие на изплуване на тестеното топче на водната повърхност за единица време. Резултатите от проведения експеримент (фиг. 23) показаха подобно изплуване на тестеното топче вследствие добро газообразуване само при вариант 2.

За допълнително потвърждение на получените резултати, подемната сила на седемте варианта ръжени закваски и контролата бе определена по методиката на Zannini и колектив (Zannini *et al.*, 2009) (фиг. 24). С най-голяма подемна сила и при тази методика бе отличен отново вариант 2, което би могло да се обясни с изявения хетероферментативен тип метаболизъм на използвания щам *L. brevis* c16a. Прави впечатление, че вариантите 4, 6 и 7, показали подходящи стойности на pH и ОТК за стартерни култури, се характеризират със сравнително ниска подемна сила.



Фиг. 23. Газообразуваща способност на експерименталните закваски и контролата

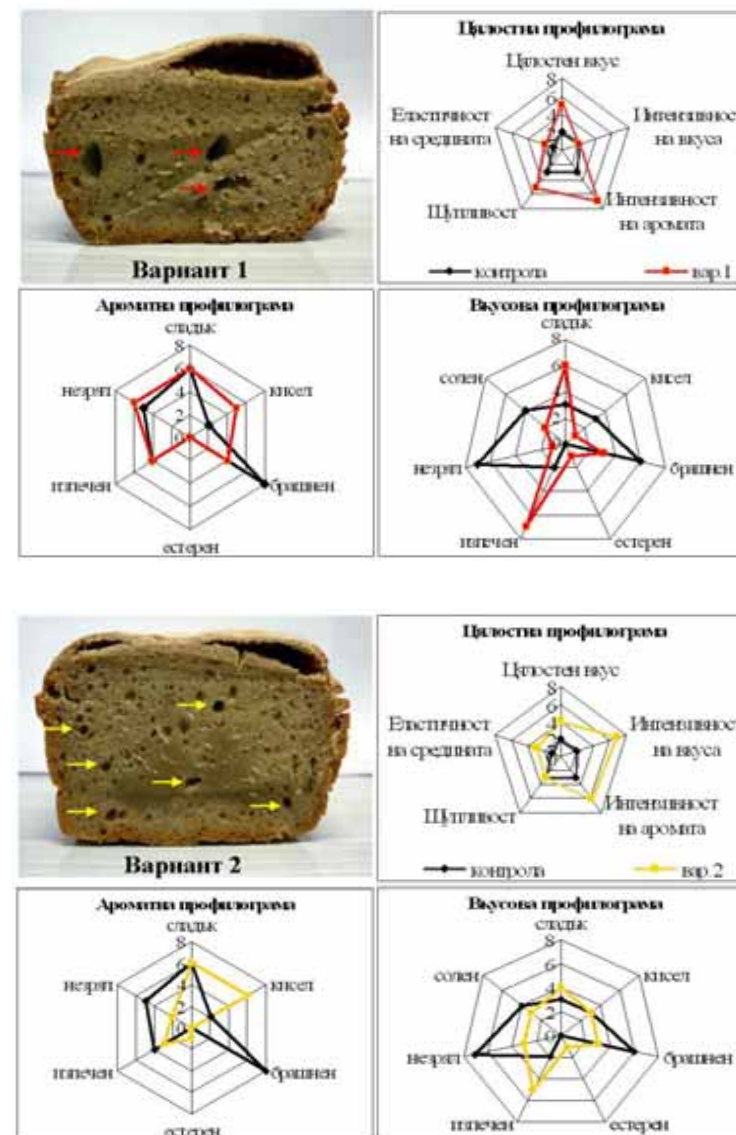


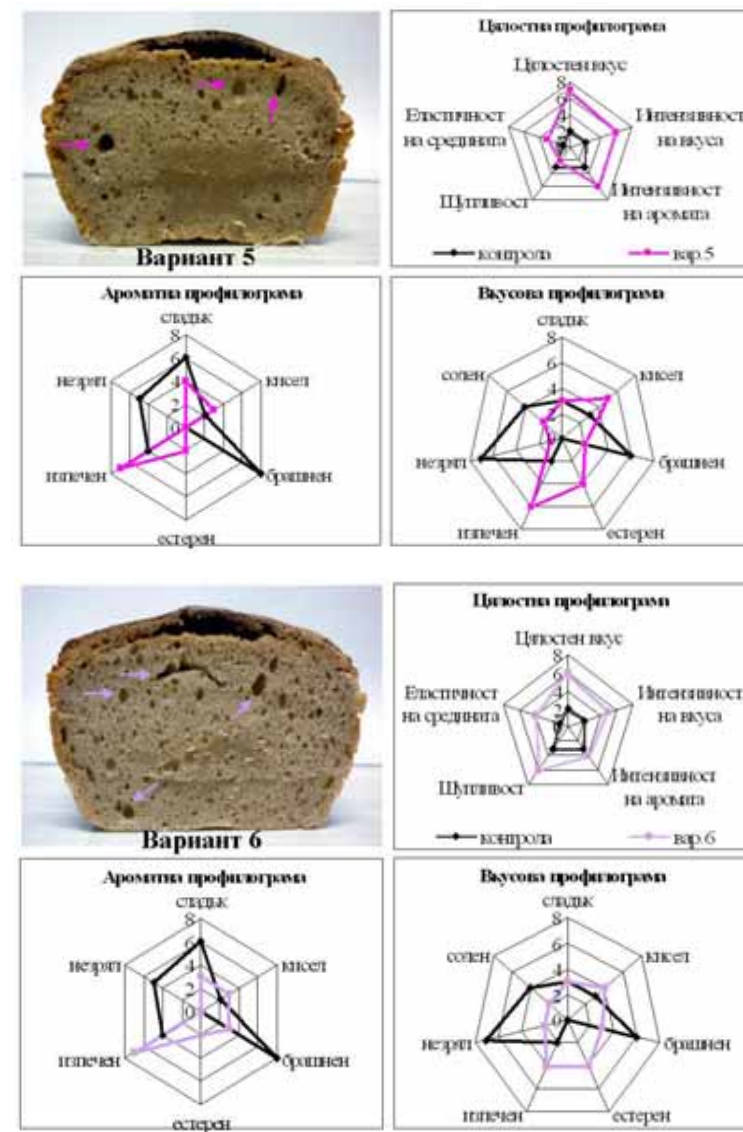
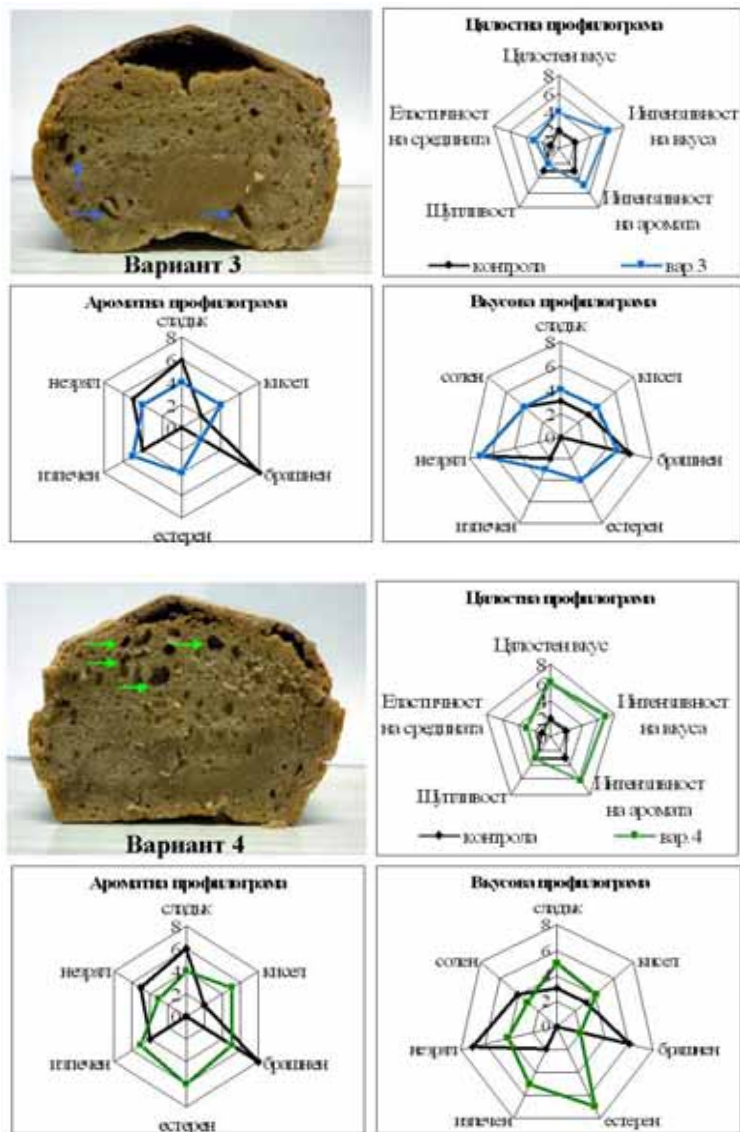
Фиг. 24. Подемна сила на лабораторно приготвени варианти ръжени кисели закваски по метода на Zannini (Zannini *et al.*, 2009).

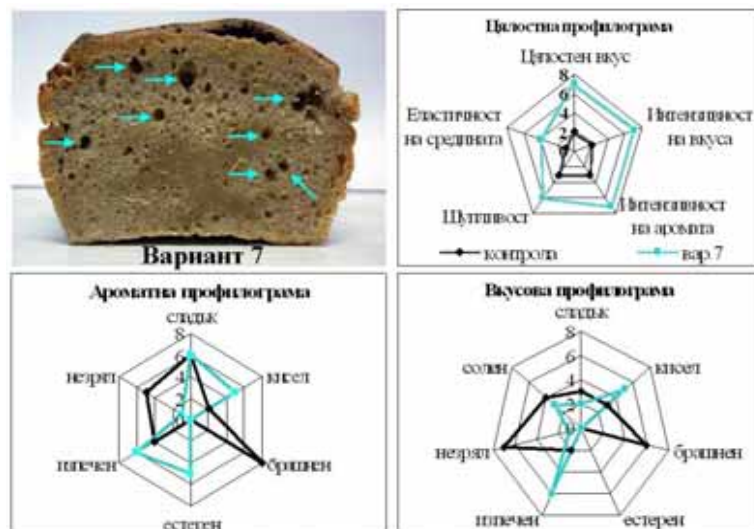
Различните щамове МКБ, подбрани за вариантите на проведените експерименти, притежават различни технологично значими свойства и могат да бъдат комбинирани с цел получаване на български ръжени кисели закваски като перспективни за производството на ръжен хляб. Основание за това твърдение ни дават резултатите от проведения финален етап, при който трите тествани щама бяха комбинирани за приготвяне и изпичане на ръжени хлебчета от изследваните вече ръжени закваски.

7.2. Органолептичен анализ на лабораторно приготвени ръжени хлебчета

От седемте варианта ръжени кисели закваски и контролата бяха приготвени и изпечени ръжени хлебчета, които бяха подложени на органолептичен анализ и сравнени с контролата (без добавка на МКБ). За целта бе използвана група от 12 непрофесионални дегустатори. Пробите бяха кодирани и представени на анализаторите в случаен ред. Участниците определиха последователно аромата, вкуса и цялостния профил на всяко хлебче, като използваха речник от общоприети за целта 11 термина и 8-точкова скала за оценяване на всяка характеристика. Получените резултати бяха записани и компютърно обработени под формата на ароматна, вкусова и цялостна профилограма за всяко ръжено хлебче (фиг. 25).







*Използвана е контрола без добавка на млечно кисели култури, която е представена на профилограмите за всеки един от вариантите с черен цвят (—●—).

Фиг. 25. Цялостни, ароматни и вкусови профилограми на ръжените хлебчета, лабораторно приготвени от съответните варианти ръжени кисели закваски.

Ръженият хляб се характеризира с приятен специфичен вкус и мирис, малък обем и слабо развита шупливост. Анализът на профилограмите показва най-добър цялостен вкус при вариантите закваски 4, 5, 6 и 7. Това са вариантите, в които като стартерни култури бяха използвани комбинации от трите щама (вж. табл. 7).

Проведеният органолептичен анализ на изследваните ръжени закваски ни дава основание да посочим получените ръжени хлебчета като доказателство за успешно преминал етап на лабораторна продукция. Най-добра профилограма, съгласно схемата за органолептична оценка показва вариант 7, в който са комбинирани и трите подобрени микробни култури (щамове *P. pentosaceus* b22, *L. brevis* b47 и *L. brevis* c16a).

ИЗВОДИ

1. Спонтанната ферментация в български ръжени кисели закваски се причинява от смесена микробна популация от дрожди и млечно кисели бактерии, които доминират в хода на процеса.
2. В микробната асоциация на българските ръжени кисели закваски са представени основно дрожди от вида *Saccharomyces cerevisiae*, характеризиращи се с разнообразие във ферментационния си профил, в комбинация с по-малобройно представени *Candida glabrata* и *Candida pelliculosa*.
3. Във всички изследвани български ръжени кисели закваски млечно киселите бактерии са представени от родовете *Pediococcus* и *Lactobacillus*. В закваската, получена от ръжено брашно от Предбалкана, се установяват и представители на родовете *Leuconostoc* и *Streptococcus*.
4. Българските ръжени кисели закваски представляват перспективна екологична ниша за изолиране на щамове МКБ с висока подкиселяваща способност.
5. В съответствие с изискванията на полифазната таксономия е доказано присъствието на видовете *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus brevis* и *Pediococcus pentosaceus* в българските ръжени кисели закваски.
6. Чрез високо-дискриминативни RAPD-PCR анализи в българските ръжени кисели закваски е установена вътревидовата хетерогенност на видовете *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus brevis* и *Pediococcus pentosaceus*.
7. Сред изолатите от български ръжени закваски се установяват щамове с пробиотичен потенциал, доказан на база основни *in vitro* критерии. Високата устойчивост към жлъчни соли и кисело рН, както и добрата транзитна толерантност в условия, симулиращи гастро-интестинален тракт на щамовете *Lactobacillus brevis* b47 и *Pediococcus pentosaceus* b22 ги определят като потенциални пробиотични щамове.
8. Активното киселинообразуване и вероятната синтеза на други вещества с антагонистично действие при някои щамове (*L. paraplantarum* b48 и *L. plantarum* c45), са в основата на високото ниво на антимикробна защита срещу развалящи храните микроорганизми, доказано за голям брой от изолатите.

9. Лيوфилизацията е подходящ метод за съхранение на млечно кисели бактерии от кисели ръжени закваски.
10. От успешно създадените прототипи на стартерни култури комбинацията на шам *L. brevis* c16a с щамове *L. brevis* b47 и *P. pentosaceus* b22 е с най-подходящи технологични показатели за млечно-кисела ръжена закваска за производство на ръжен хляб с добри органолептични характеристики.

Справка за приносите в дисертационния труд

1. За пръв път са проведени системни изследвания на микрофлората на български ръжени кисели закваски от различни географски райони на страната.
2. Създадена е първата у нас колекция от щамове млечно кисели бактерии и дрожди от български ръжени кисели закваски и е характеризирано видовото разнообразие на представителите от тази екологична ниша.
3. За първи път се докладва наличието на щамове млечно кисели бактерии, отговарящи на *in vitro* критериите за подбор на пробиотични култури в тази екологична ниша.
4. Научен и приложен принос имат получените за първи път данни за видовете доминиращи млечно кисели бактерии в български ръжени закваски, тяхната киселинообразуваща способност и антагонистично действие срещу микроорганизми развалящи храните.
5. Част от избраните култури с пробиотичен потенциал могат да послужат за разработката на диетични ферментационни храни на зърнена основа, адресирани към консуматори с лактозна непоносимост и алергии към млечни продукти и да способстват развитието на пазара на функционални храни у нас.
6. Успешно са създадени прототипи на стартерни култури млечно кисели бактерии с подходящи технологични показатели за производство на ръжен хляб с добри органолептични свойства.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Lyubomira Yocheva, Gergana Dobрева, Irena Savova, Stefka Antonova-Nikolova (2009). „Microflora of rye sourdoughs from different geographical regions of Bulgaria”, *Ecologica*, year XVI, 53: 9-14.
2. G. Dobрева-Yosifova, L. Yocheva, A. Mehmed, S. Danova, S. Antonova-Nikolova (2009). „*In vitro* characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria from Bulgarian rye sourdoughs”. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* - special edition, 23: 801-805.
3. Gergana Dobрева-Yosifova, Lyubomira Yocheva, Ralitsa Georgieva, Svetla Danova, Stefka Antonova-Nikolova (2009). „Phenotypic characterization and molecular analysis of lactobacilli from Bulgarian rye sourdough, crop 2004 year”. “Food Science, Engineering and Technologies 2009”, Plovdiv, October 23-24, 2009. Scientific works, volume LVI, Issue 1, pages: 609-614.
4. Gergana Dobрева-Yosifova, Ralitsa Georgieva, Stefka Antonova-Nikolova, Svetla Danova (2010). „Screening for proteolytic and amylolytic activity of lactic acid bacteria from Bulgarian rye sourdoughs”, Proceedings of the 1st international symposium on “Traditional foods from Adriatic to Caucasus”, pp.: 470-472.
5. Гергана Добрева-Йосифова, Любомира Йочева, Светла Данова и Стефка Антонова-Николова (2011). „Киселите закваски в производството на ръжени и ръжено-пшенични хлебни изделия”. *Хран.-вкус. пром.*, 5: 43-48.

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ НА КОНГРЕСИ

1. Любомира Йочева, Гергана Добрева и Стефка Антонова-Николова. „Антимикробна активност на млечнокисели бактерии, изолирани от български ръжени кисели закваски.” Eleventh Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation, International House of Scientists Frederic Joliot-Curie, St. Constantine, Varna, 5-7 October, 2006, Program and Abstract book, p. 177.
2. Гергана Добрева-Йосифова, Любомира Йочева, Светла Данова, Ралица Георгиева, Стефка Антонова-Николова. „Характеристика на нови потенциални пробиотични

щамове, изолирани от кисели теста". IV-та научно-практическа конференция по хранене на тема: „Нови храни, добавки и медикаменти в превенцията и лечението на съвременните болести" София, Военно-медицинска академия, 30-31 октомври 2008г., П6.

3. **G. Dobрева-Yosifova**, L. Yocheva, A. Mehmed, S. Danova, S. Antonova-Nikolova: „*In vitro* characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria from Bulgarian rye sourdoughs." XI ANNIVERSARY SCIENTIFIC CONFERENCE "biology –traditions and challenges" 27 – 29 May, 2009 – Sofia, Bulgaria, BT p.50.
4. **Gergana Dobрева-Yosifova**, Lyubomira Yocheva, Atidje Mehmed, Ralitsa Georgieva, Svetla Danova, Stefka Antonova-Nikolova: „Phenotypic characterization and molecular analysis of lactobacilli from Bulgarian rye sourdoughs." 4th International Symposium on Sourdough "from arts to science" 14-17 October 2009, Freising, Germany, Abstracts. p.27

Изказвам искрена благодарност на научните ми ръководители доц. д-р Стефка Антонова-Николова и доц. д-р Светла Данова, под ръководството на които разработих настоящия дисертационен труд.

Бих искала да изразя своята признателност на доц. Венета Грудева, която ми гласува доверие и ми позволи да направя първите си крачки в областта на микробиологията. Безкрайно съм благодарна и на ас. Любомира Йочева за нейната професионална и морална подкрепа.

Бих искала да отправя моите най-топли благодарности и към колектива на лаборатория 204 в секция „Микробна генетика" към Института по микробиология „Стефан Ангелов", БАН за оказаната ми изключително ценна професионална помощ и подкрепа при разработването на настоящия труд.

Изразявам най-дълбока благодарност и признателност на моите родители за неотменната им помощ и подкрепа, без които не бих могла да завърша тази дисертация.

Благодаря сърдечно и на моя съпруг Димитър Йосифов за проявеното разбиране при изработването и написването на настоящия дисертационен труд.

София, 2011

Гергана Добрева-Йосифова

