СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕН ОХРИДСКИ”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”

Живка Кръстева Атанасова

ПРОУЧВАНЕ НА ПРОБИОТИЧНИЯ КАПАЦИТЕТ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ ВЛИЗАЩИ В СЪСТАВА НА СТАРТЕРНИ КУЛТУРИ ЗА РАЗЛИЧНИ ВИДОВЕ СИРЕНЕ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА

Д И С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен **„Доктор”**

По научна специалност:

4.3. Биологически науки (Микробиология)

Научен ръководител: проф. дбн Искра Иванова

София
2015 година

Дисертационният труд съдържа 182 страници на формат А4, 22 таблици и 41 фигури. В библиографската справка са включени 274 литературни източника, от които 16 заглавия на кирилица и 258 на латиница. Експерименталната работа е извършена в лаборатория „Микробиология“ на НИРД, „Ел Би Булгарикум“ ЕАД, лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология на СУ „Св. Климент Охридски“ и в INRA Center Nantes, Франция.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 17.04.2015 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед..... на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Научно жури:

1. Проф. дбн Искра Иванова
2. Проф. д-р Вяра Иванова
3. Проф. д-р Илия Илиев
4. Доц. д-р Петя Христова
5. Доц. д-р Велизар Гочев

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

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

София
2015 година

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕН ОХРИДСКИ”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”

Живка Кръстева Атанасова

ПРОУЧВАНЕ НА ПРОБИОТИЧНИЯ КАПАЦИТЕТ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ ВЛИЗАЩИ В СЪСТАВА НА СТАРТЕРНИ КУЛТУРИ ЗА РАЗЛИЧНИ ВИДОВЕ СИРЕНЕ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА

Д И С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен **„Доктор”**

По научна специалност:

4.3. Биологически науки (Микробиология)

Научен ръководител: проф. дбн Искра Иванова

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АК – Аминокиселини

БСС – Бяло саламурено сирене

БАП – Биологично активни пептиди

ГИТ – Гастроинтестинален тракт

КФП – Казеино-фосфопептид

МКБ – Млечнокисели бактерии

ПА/PA – Протеолитична активност

СЗО – Световна здравна организация

ACE – Angiotensin converting enzyme (Ангиотензин I конвертиращ ензим)

CN –Казеин

HPLC – High-performance liquid chromatography (Високоефективна течна хроматография)

OPA – o-phtaldialdehid

Quorum sensing – начина на регулиране плътността на популацията при прокариотите

SDS – Sodium dodecyle sulfate (натриев додецилсулфат)

SDS-PAGE – SDS-polyacrilamid gel electrophoresis (Poliakrilamidna gel-elektroforeza)

Caco-cells – Cell Line Human Caucasian Colon Adenocarcinoma

LC-ESI/MS – Liquid chromatography – lectrospray ionization/ mass spectrometry/ Електроспрей йонизационна масспектрометрия

LC-MS-MS – Liquid chromatography – tandem mass spectrometry

MALDI-TOF – Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-light (TOF) – Лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица-Време на летене при матрично асистиран лазерен десорбционен йонизатор

ATCC – American Type Culture Collection

WHO – World Health Organization

Съдържание

VPP – трипептид (валил-пролил-пролин)

IPP – трипептид (изолевцил-пролил-пролин)

LZ – Лизозим

LF – Лактоферин

GRAS – Generally Recognize As Safe

FAO – Food and Agriculture Organization

LFcin – Лактоферицин

IgA – Имуноглобулин А

IgG – Имуноглобулин G

IgM – Имуноглобулин М

CMP – Caseino-macropeptides

NPN – Non-protein nitrogen

WP – whey proteins (суроватъчни протеини)

MS – mass spectrometry

TCA – trichloroacetic acid (трихлороцетна киселина)

PBS – Фосфатно буфериран физиологичен разтвор

CECT – Spanich Type Culture Colection

Единици:

Da – Далтон (единица за молекулна маса)

CFU /КОЕ – Colony Forming Units /Колонии образуващи единици (за численост на бактерии)

УВОД

Съвременните тенденции в храненето изискват хранителните продукти да доставят на организма, не само необходимите хранителни съставки, но и специфични вещества, които влияят благоприятно върху здравето.

Млечнокиселите бактерии се намират по растенията, в млякото и млечните продукти. Те са част от нормалната флора на устната кухина, чревния тракт и уретрата на хората и животните. Днес млечнокиселите бактерии, които се използват от векове в различни хранителни продукти са приели GRAS статут.

Млякото е храна, приготвена от самата природа. Няма друг хранителен продукт за човека, който така сполучливо да съчетава всички необходими вещества, както млякото. Хипократ го определя, като „най-съвършеният продукт на храненето".

Освен млякото голямо значение за храненето на човека през всички периоди на неговия живот имат различните млечни продукти. Подобно на млякото те съдържат всички основни хранителни вещества в добре балансирана форма. Сиренето отдавна присъства в хранителния режим на хората, обогатявайки го със значително количество важни хранителни вещества, като протеини, биоактивни пептиди, аминокиселини, мастни киселини, витамини и минерали. Включването на щамове с пробиотичен потенциал в закваските за млечнокисели продукти е начин за обединяване на пробиотични микроорганизми и функционални храни. Функционалните храни съдържащи биоактивни пептиди стимулират или подпомагат определени функции в човешкия организъм и имат здравословно въздействие върху него. Те въздействат върху метаболизма на човека и повлияват баланса на интестиналната микрофлора в човешкия храносмилателен тракт. Най-разпространените храни, съдържащи биоактивни пептиди, са яйцата, месото, рибата, зърнените култури и соята. Млякото и млечните продукти, обаче остават най-добрите прекурсори на биоативни пептиди.

Развитието на млечната промишленост в наши дни е в пряка зависимост от развитието и разширеното познание на хранителната микробиология, в частност от познанието за функционалните и биологични свойства на различните компоненти на млякото и млечните продукти.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Предвид значението на млечнокиселата микрофлора при производството, зреенето и оформянето на органолептиката на бялото саламурено сирене и с оглед на извършване на подбор на подходящи щамове за използването им като стартерни култури за сирене, същевременно носещи и пробиотичен потенциал, си поставихме за цел:

Проучването на пробиотичния капацитет на млечнокисели бактерии, влизащи в състава на търговски стартерни култури за сирене, както и извършването на съвременна характеристика на националния ни продукт Българско бяло саламурено сирене в подкрепа на тезата му, като функционална храна.

За постигането на целта си поставихме следните конкретни задачи за изпълнение:

1. Оценка на някои пробиотични свойства на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на търговски стартерни култури за кисело мляко и сирене.
   - 1.1. Определяне на антимикробната активност на млечнокисели бактерии и стартерни култури.
   - 1.2. Определяне на протеолитичната активност на изследваните млечнокисели бактерии в краве и козе мляко.
   - 1.3. Определяне на антихолестеролната активност на млечнокиселите бактерии.
   - 1.4. Скрининг за формиране на нискомолекулни пептиди от монокултури и стартерни култури при култивирането им в козе мляко.
   - 1.5. Определяне *in vitro* способността на избрани производствено значими щамове да преживяват в условия симулиращи различни отдели на гастроинтестиналния тракт.
   - 1.6. Определяне на адхезивните способности на избрани млечнокисели бактерии при *in vitro* условия.

2. Охарактеризиране на различни видове бели саламурени сирена.

2.1. Определяне динамиката на общия брой характерни микроорганизми, физикохимичните показатели и титруема киселинност в различни видове Българско бяло саламурено сирене по време на зреене.

2.2. Определяне на свободните аминокиселини в различни видове Българско бяло саламурено сирене по време на зреене.

2.3. Идентификация и секвенция на биологично активни пептиди в различни видове Българско бяло саламурено сирене по време на зреене.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми.

1.1. Стартерни култури от колекцията на „Ел Би Булгарикум“ ЕАД;

1.2. Монокултури от колекцията на „Ел Би Булгарикум“ ЕАД;

1.3. Тест-микроорганизми от АТСС;

2. Други материали – краве, козе и овче сирене от Млекопреработвателно предприятие „Ел Би Булгарикум“ ЕАД, гр. Видин и Млекопреработвателно предприятие „Костови“, гр. Съединение.

3. Хранителни среди.

4. Оценка на някои пробиотични свойства на МКБ, влизащи в състава на търговски стартерни култури за кисело мляко и сирене.

4.1. Определяне на антимикробната активност на млечнокисели бактерии и стартерни култури;

4.2. Определяне влиянието на протеолитични ензими и термична обработка върху антибактериалната активност на щамовете;

4.3. Определяне на протеолитичната активност на изследваните млечнокисели бактерии;

4.4. Изследване киселинообразуването на проучваните млечнокисели бактерии при култивирането им в козе и краве мляко;

4.5. Определяне на антихолестеролната активност на млечнокиселите бактерии;

4.6.Скрининг за формиране на нискомолекулни пептиди от монокултури и стартерни култури при култивирането им в козе мляко;

4.7. Определяне *in vitro* способността на избрани производствено значими щамове да преживяват в условия симулиращи различни отдели на гастроинтестиналния тракт;

4.7.1. Приготвяне на храносмилателни сокове;

4.7.2. Изпитване на МКБ за преживяемост в стомашен сок;

4.7.3. Изпитване на МКБ за преживяемост в интестинален сок;

4.8. Определяне на адхезивните способности на избрани млечнокисели бактерии при *in vitro* условия;

5. Охарактеризиране на различни видове бели саламурени сирена.

5.1. Изброяване на характерни микроорганизми – количествено определяне на *L. bulgaricus и S. thermophilus;*

5.2. Определяне на физикохимичните показатели на саламурените сирена;

5.2.1. Определяне на маслено съдържание на сирене по метода на Гербер;

5.2.2. Определяне на белтъчното съдържание по метода на Келдал;

5.2.3. Метод за определяне на съдържанието на натриев хлорид по метода на Мор;

5.2.4. Определяне на общата (титруема) киселинност на сирене;

5.3. Подготовка на водноразтворими екстракти от бели саламурени сирена на различна възраст;

5.3.1. Анализ на водноразтворимите екстракти от различни видове бели саламурени сирена за определяне на освободените аминокиселини на различни етапи от зреенето –

HPLC анализ;

5.3.2. Идентификация и секвенция на биологично активни пептиди в различни видове бели саламурени сирена по време на зреене;

5.3.2.1. RF-HPLC анализ / Обратно фазова високоефективна хроматография под високо налягане/;

5.3.2.2. Масспектрометрични анализи платформа "*Biopolymers-Interaction-Structural Biology";*

ESI-MS / Електроспрей-йонизационна масспектрометрия;

Масспектрометрията *(LC-ESI/MS*) беше извършена, като се използва *Waters-600 controller system*, свързан с *an ion trap mass spectrometer (LCQ Advantage, Thermo-Finnigan, San Jose, USA*).

MALDI - TOF спектрометрия/Лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица (mass-спектрометър на *Autoflex III smartbeam, Bruker apparatus*).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Определяне на антимикробната активност на млечнокисели бактерии и стартерни култури.

През последните десетилетия млечнокиселите бактериите намират широко приложение, като стартерни култури (закваски) в млечната и месна промишленост. Всяка чиста култура от млечнокисели бактерии, която съдържа висок титър активни клетки и служи за внасяне и ферментация на млечни хранителни продукти се нарича закваска. В млечната промишленост се използват щамове, както хомоферментативни, така и хетероферментативни бактерии със строго определени свойства и условия на култивиране за производство на кисело мляко, кисело сметанено масло, различни видове сирена и напитки.

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). Продуцирането на голям брой антимикробни съединения от млечнокиселите бактерии биха могли да бъдат от голямо значение за ферментацията и съхранението на храните.

Във връзка с това е проучена антимикробната активност на 72 щама млечнокисели бактерии и 22 закваски за кисело мляко, сирене и кашкавал по метода на дифузия в агар. За целта бяха използвани безклетъчни супернатанти, получени след 24 часово култивиране на синтетични среди – MRS бульон, M17 бульон, Elliker бульон, сухо обезмаслено мляко (СОМ) и свежи краве и козе млека, без корекция на pH (с кисело pH) и с корекция на pH 6,0, за да бъде елиминиран инхибиращия ефект на продуцираната от млечнокиселите бактерии млечна киселина. Антимикробната активност на изследваните щамове и закваски бе проучена при температури 30^0C, 37^0C, 42^0C, за да се определят условията, при които се синтезират инхибиторните вещества и някои техни свойства. От свойствата на инхибиторните вещества са проучени:

1. Влияние на продължителността на култивиране върху антимикробната активност.
2. Влияние на вида на средата за култивиране върху антимикробната активност.
3. Определяне влиянието на протеолитични ензими и термична обработка върху инхибиторните вещества.

За определяне на антимикробната активност на стартерните култури и щамове бяха използвани различни тест-микроорганизми със значение при производството на млечните продукти, а именно *E. coli, E. aerogenes, S. aureus, S. enteritidis, L. monocytogenes, B. subtilis, S. thyphimurium, L. inocua, B. cereus.* Тези тест-микроорганизми са свързани с оценката за безопасност и качество на млечните продукти и с хигиената на тяхното производство.

E. coli е един от основните бактериални видове обитаващ дебелите черва на бозайниците, в т. ч. и на човека. Причинител е, както на интестинални инфекции (диарии), а също така и на извън интестинални, като менингити, перитонити, инфекции на уринарния тракт и др. По естествен начин *E. coli* се отделя във външната среда – вода, почва и други, където установяването му се използва, като санитарномикробиологичен показател.

Стафилококите често присъстват в суровото мляко. Пастьоризацията, като правило е гибелна за стафилококите, но при обработка на млечната суровина нищо не може да гарантира от вторично замърсяване със стафилококи. Рискови от гледна точка на стафилококова инфекция са много млечни продукти –прясно сирене, извари, меки сирена, млечни десерти и др. Млечнокиселата ферментация, като правило унищожава стафилококите в киселото мляко те загиват след 48-72 часа, при зреенето на саламурените и твърдите сирена – след 20-25-я ден. Ето защо контролът върху коагулазо-положителните стафилококи се извършва по производствената верига и в готовите млечни продукти за гарантиране на епидемичната безопасност на продукцията. Ето защо на проучваните от нас производствени щамове и закваски бе изследвана антимикробната активност към *S. aureus*.

Бактериите от рода *Salmonella* са най-актуалните за храните патогенни чревни микроорганизми, причинители на остри инфекции и токсикоинфекции. Салмонелните гастроентерити се предизвикват от редица салмонели (*S. typhimurium, S. enteritidis и др*.). Възможен преносител на салмонели са практически всички продукти от животински произход, включително млечните продукти. В суровото мляко другата микрофлора е конкурентна за салмонелите, а пастьоризацията е достатъчно ефективна при първично инфектирано мляко. Салмонелите попадат в млечните продукти, като правило вторично – от околната среда, от носители и др. Най-незащитени са прясното сирене, топени сирена, произведени при ниски температури, сладоледи, млечни десерти и пр. На практика на контрол за отсъствие на салмонели подлежат всички млечни проукти.

L. monocytogenes през последните две десетилетия придоби голяма актуалност в контрола на млякото и млечните продукти поради сериозната преоценка на степента на риск от заразяване на продукцията и описаните масови тежки епидемии сред населението на много, включително високо развити страни. Това наложи въвеждането на задължително нормиране на отсъствие на листерии в млечни храни и автоматично ги включи в листата на показателите за техния контрол. От млякото и млечните продукти най-голям риск от листерии носят суровото мляко, термизирано при сравнително ниски режими (под 70^0C) млека, млечни продукти получени от сурово мляко, млечни продукти произведени при условия не гарантиращи от вторични замърсяване. Поради водещата роля на *L. monocytogenes,* като причинител на листериози лабораторната диагностика на практика се свежда до доказването именно на този вид.

E. aerogenes е Грам отрицателен патоген, представител на семейство *Enterobacteriaceae*, който причинява инфекции във всички тъкани и органи, вкл. сепсис и раневи инфекции при човека.

Бактериите от рода *Bacillus* са широко разпространени в природата. Те са важна съставна част на термоустойчивите микроорганизми, един важен за хигиената на млечните продукти интегрален показател. Патогенните им представители са малко. *B. cereus е* често разпространен в природата. Попадайки в млякото, спорите му преживяват успешно голяма част от технологичните етапи на обработка – ниска и висока пастьоризаци, дори стерилизацията на млякото, както и процесите на топлинно пулверизационно сушене. *B. cereus* може да бъде условно-патогенен, да отделя токсини и, когато е в големи количества в продукта, да предизвиква хранителни токсикоинфекции. Това определя необходимостта от диагностика на *B. cereus* в някои млечни храни.

B. subtilis (сенната пръчица) в млякото предизвиква пептонизация без видима предварителна коагулация. Всъщност и тук се извършва също така най-напред пресичане на млякото, но действието на протеолитичните ензими е много по-бързо и те веднага втечняват коагулума (Славчев, Г., и др., 2006).

Резултатите от трикратно повторени опити са обобщени в Таблица 1 (*включени са щамовете и закваските, които показаха антимикробна активност след неутрализация на супернатантата и култивиране на различни хранителни среди).*

Табл. 1. Антимикробна активност на щамове и стартерни култури спрямо различни бактериални патогени

Щамове и стартерни култури		Хранителна среда	t°C на инкубация	*E. coli ATCC 11777*	*S. aureus ATCC 12600*	*S. enteritidis ATCC 13076*	*S. typhimurium 123 (IBM)*	*L. monocytogenes CECT 4032*	*L. innocua F*	*B. subtilis ATCC 6633*	*E. aerogenes ATCC 13048*
L. bulgaricus	b38	MRS	37°C	-	-	-	-	-	**20**	-	-
		FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	**13/14**
		MRS	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-
	b21	FSCM	37°C	-	-	-	**10**	-	-	-	-
		FSGM	37°C/42°C	-	-	-		-	-	-	**14/17**
		MRS	37°C	**10**	-	-	**11**	-	-	-	-
	b5	FSCM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	-	-
		SM	37°C	**12**	-	-	-	-	-	-	-
		MRS	37°C/42°C	-	-	-	**11**	-	-	-	-
		FSGM	37°C/42°C	-	-	**14**	-	-	-	-	**11/15**
	b144	FSGM	37°C/42°C	-	**13**	-	-	-	-	-	**10/15**
		FSCM	37°C/42°C	**10**	-	-	-	-	-	-	-
	b24	FSGM	42°C	**12**	-	-	-	-	-	-	**13/15**
		MRS	37°C	**20**	-	-	-	-	**20**	-	-
	b7	FSGM	42°C	-	-	-	**10**	-	-	-	**13** неясна
		MRS	37°C	-	-	-	**10**	-	-	-	-
		FSCM	37°C	-	-	-	-	-	**25**	-	-
	b120	MRS	37°C	-	**12**	-	-	-	-	-	**13/14**
	b2	FSGM	42°C	-	-	-	-	-	-	-	**12**
		FSCM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	-	-
	b2/1	MRS	37°C	-	**12**	-	-	-	**20**	-	-
	b28	FSGM	37°C	-	-	-	-	-	-	-	**17**
	Db	FSGM	42°C	-	-	-	-	-	-	-	**13**

Щамове и стартерни култури		Хранителна среда	t°C на инкубация	*E. coli ATCC 11777*	*S. aureus ATCC 12600*	*S. enteritidis ATCC 13076*	*S. typhimurium 123 (IBM)*	*L. monocytogenes CECT 4032*	*L. innocua F*	*B. subtilis ATCC 6633*	*E. aerogenes ATCC 13048*
L. bulgaricus	b41	MRS	37°C	-	20	-	-	-	-	-	-
		FSGM	37°C	-	-	-	12	-	-	-	-
		SM	37°C	10	-	-	12	-	-	-	-
	b48	SM	37°C	**12**	-	-	-	-	-	-	-
		FSCM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	-	-
		FSGM	37°C	-	-	-	**11**	-	-	-	-
L. helveticus	Q40	MRS	37°C	**10**	**10**	-	**10**	-	**9**	-	-
		FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	15/16
	h25	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	13/15
	h3П14	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	**13/15**
		SM	37°C	14	-	-	-	-	-	-	-
		MRS	37°C	-	-	-	-	-	19	-	-
	h9	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	**14/15**
		MRS	37°C	11	-	-	11	-	-	-	мътна зона
	h4	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	мътна зона
		FSCM	37°C	-	**9**	-	-	-	-	-	-
L. lactis	1043	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	-	**9/16**
		MRS	37°C	**9**	**10**	-	**10**	-	-	**12**	-
S. thermophilus	t2	FSGM	37°C/42°C	-	**12**	**9**	-	**9**	-	-	**17/12**
	t24	FSGM	42°C	-	-	-	-	**9**	-	-	-
		SM	42°C	**12**	-	-	-	-	-	-	-
	t18	FSGM	42°C	-	**14**	-	-	-	-	-	-
	t12	FSGM	42°C	-	**13**	-	-	-	-	-	-

Щамове и стартерни култури		Хранителна среда	t°C на инкубация	*E. coli ATCC 11777*	*S. aureus ATCC 12600*	*S. enteritidis ATCC 13076*	*S. typhimurium 123 (IBM)*	*L. monocytogenes CECT 4032*	*L. innocua F*	*B. subtilis ATCC 6633*	*E. aerogenes ATCC 13048*
S. thermophilus	tn_1	SM	37°C	**11**	**13**	-	**12**	-	-	-	-
	Dt1	FSCM	42°C	**14**	-	-	-	-	-	-	-
		SM	42°C	**17**	-	-	-	-	-	-	-
	Dt2	FSCM	42°C	**13**	-	-	-	-	-	-	-
		SM	42°C	**11**	-	-	-	-	-	-	-
	t10	SM	37°C	-	-	-	**12**	-	-	-	-
	t12	SM	37°C	**13**	-	-	-	-	-	-	-
Lc. lactis	*l 70*	SM	32°C	-	-	-	**13**	-	-	-	**11**
	l 162	Elliker	**32°C**	**11**	-	-	-	-	-	-	-
	l 588/6	Elliker	**32°C**	-	-	-	-	-	-	-	**11**
	l 526/5	Elliker	**32°C**	**9**	-	-	**13**	-	-	-	-
		SM	**32°C**	-	**9**	-	-	-	-	-	-
	l 526	M17	**32°C**	-	**11**	-	-	-	-	-	-
	l 216	FSCM	**32°C**	-	**11**	-	-	-	-	-	**11**
	l 598	FSGM	**32°C**	-	-	-	-	-	-	-	**11**
	l 99	FSGM	**32°C**	-	-	-	-	-	-	-	**11**
	l 400	FSGM	**32°C**	-	-	-	-	-	-	-	**10**
Стартерни култури	C 310-40	FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	-	**10**	-
	BY 24	MRS	37°C/42°C	-	**11**	-	**11**	-	-	-	-
		SM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	**20**	**10**	**13**
	BY 21	MRS	37°C	-	-	-	**11**	-	-	-	-
		FSCM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	**10**	-
		FSGM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	-	**15**

Щамове и стартерни култури		Хранителна среда	t°C на инкубация	*E. coli ATCC 11777*	*S. aureus ATCC 12600*	*S. enteritidis ATCC 13076*	*S. typhimurium 123 (IBM)*	*L. monocytogenes CECT 4032*	*L. innocua F*	*B. subtilis ATCC 6633*	*E. aerogenes ATCC 13048*
Стартерни култури	BY D4	MRS	37°C	-	-	-	**11**	-	-	-	-
	BY 37-18	FSGM	37°C	**10**	-	-	-	-	-	**10**	-
		MRS	37°C	-	-	-	**11**	-	-	-	-
	BY 28-22	MRS	37°C	-	-	-	-	-	**21**	**10**	-
	YC 3	MRS	37°C	-	-	-	-	-	**20**	**10**	-
	BY 144-12	FSGM	37°C/42°C	**11**	**10**	-	**11**	-	-	-	-
	BY 5-12	MRS	37°C/42°C	**10**	**11**	-	**11**	-	-	-	-
		FSGM	37°C/42°C	-	-	-	-	-	**20**	-	-
	BY 41-8	FSGM	37°C/42°C	**11**	**11**	-	**11**	-	-	-	-
	BY 122-17	MRS	37°C	-	**13**	-	**11**	-	-	-	-
	YC 3	FSGM	37°C	-	**11**	-	**11**	-	-	-	-
	C 2	FSCM	32°C	-	-	**11** мътна зона	-	**10**	-	-	-
	BY 5-12	MRS	32°C	**11**	-	-	-	-	-	-	-
		SM	32°C	-	-	-	-	-	**20**	-	-
	BY 41-8	FSGM	32°C	11	-	-	-	-	-	-	-
	BY 2	MRS	37°C	-	-	**11**	-	-	-	-	-
	YC 1	FSGM	37°C	-	-	-	-	-	**20**	-	-
		MRS	37°C	-	**10**	-	-	-	-	-	-
	C 1	MRS	32°C	-	-	-	**11**	-	**20**	-	-
	C 216-40	SM	32°C	**10**	**11**	-	-	-	-	-	-
		FSGM	32°C	**11**	-	-	-	-	-	-	-
	BY 145-18	FSGM	37°C	-	-	-	**13**	-	-	-	-

FSCM - Свежо обезмаслено краве мляко **FSGM - Свежо обезмаслено козе мляко** **SM - Сухо обезмаслено мляко**

Резултати и обсъждане

От представените резултати се вижда, че повечето от изследваните МКБ показаха антимикробна активност при температура 37^0C. При температура 42^0C, обаче културите проявили антимикробна активност продуцираха по-големи инхибиторни зони.

При култивиране на МКБ и стартерните култури в сухо обезмаслено мляко, установихме, че антимикробната активност се появява по-късно и в по-малка степен в сравнение, когато културите се отглеждат в синтетични среди.

Изследването продължи с култивиране на културите в свежи обезмаслени краве и козе млека. Установено беше, че инхибиторното действие се проявява след по-продължително култивиране. Наблюдавано беше, че инхибиторна активност, която показаха някои монокултури, не се прояви при изпитването на стартерните култури в които те участват, като компонент. Нарастване на антимикробната активност в смесената култура в резултат от съвместното действие на две монокултури не беше наблюдавано. Тя остана на ниво на монокултура-компонент, леко понижена, или антимикробна активност не бе проявена.

Продуцирането на млечна киселина е първият механизъм, чрез които се експресира активността на изследваните щамове по отношение на патогенните.

Много пробиотични бактерии синтезират биоактивни пептиди, наречени бактериоцини. В литературата има и много съобщения за продуцирането от МКБ на антимикробни пептиди (АП).

Използването на млечнокиселите бактерии, като биоконсервиращи агенти им придава голямо икономическо значение (De Vuyst. L, F. Leroy, 2007). Най-важните антимикробни вещества са бактериоцините. Бактериоцините са група протеинови съединения, които обикновено показват антимикробна активност към близкородствени бактерии (Ivanova et al., 2013). Въпреки това, някои млечнокиселите бактерии произвеждат бактериоцини с широк антибактериален спектър (Jack et al., 1995, Collins B., et al., 2010, De Vuyst L., F. Leroy, 2007). Установено е, че такива млечнокисели бактерии могат да инхибират не само растежа на Грам положителни патогенни (Atanasova et al., 2003; Cintas et al., 1995, Abee T.,1995), но също така и растежа на Грам отрицателни бактерии (Cardi, 2002). Много автори съобщават, че активността на бактериоцина зависи от средата за култивиране на щам-продуцента и в синтетична среда тя обикновено е по-висока.

От получените резултати се вижда, че към Грам-отрицателната ***E. coli*** **ATCC 11777** антимикробна активност показват:

- 7 щама *L. bulgaricus - b21 (MRS), b5 (FSCM, SM), b144 (FSCM), b24 (MRS, FSCM) b2 (FSCM), b41 (SM), b48 (SM, FSCM),*

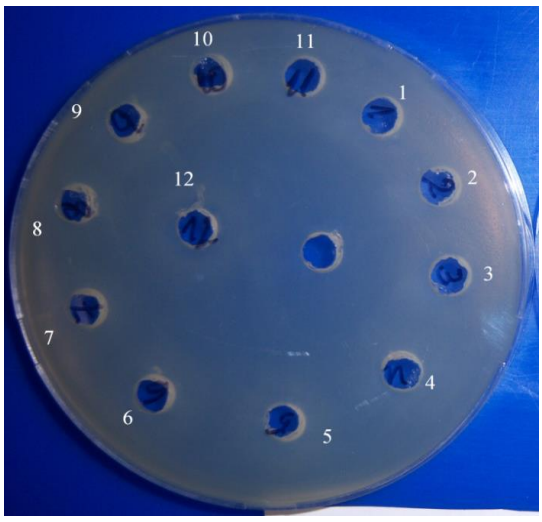
- 3 щама *L. helveticus - Q40 (MRS), h3П14 (SM), h9 (MRS),*
- 1 щам *L. delbrueckii lactis 1043 (MRS),*
- 5 щама *S. thermophilus - t24 (SM), tn1 (SM), Dt1 (SM), Dt2 (FSCM), t21 (SM),*
- 2 щама *L. lactis - l162 (Elliker), l526 / 5 (Elliker),*
- 8 стартерни култури, от които 4 за кисело мляко - *BY 21(MRS, FSCM), BY D4(MRS), BY 144-12(FSGM), BY 5-12(FSGM),* 3 за сирене *C-2 (FSCM, SM), C-1(MRS), C 216-40(SM)* и 1 за кашкавал *YC-3(MRS).*

Към Грам положителния ***S. aureus* ATCC 12600** антимикробна активност показват:

- 5 щама *L. bulgaricus* - b144 (FSGM), b120 (MRS), b24 (FSGM, MRS) b2/1 (MRS), b41 (MRS),
- 2 щама *L. helveticus* - Q40 (MRS), h9 (MRS), 1 *L. delbrueckii lactis 1043* (MRS),
- *4* щама *S. thermophilus* - t2 (FSGM), t18 (FSGM), tn1 (SM),
- 2 щама *Lc.lactis* - l526/5 (FSCM), l216 (FSCM, FSGM) и
- 9 стартерни култури, от които 6 са за кисело мляко - *BY 24 (FSGM), BY 144-12(FSGM), BY 5-12 (FSGM), BY 41-8 (FSGM), BY 122-17(MRS), BY 145-18 (FSGM),* 2 закваски за кашкавал *Y-3(MRS)* и *Y-1(FSCM)* и 1 закваска за сирене *C-1(MRS).*

При използване на тест-култура ***S. enteritidis* ATCC 13076** антимикробна активност показват следните култури:

- *L. bulgaricus* b5 (FSGM),
- *S. thermophilus* t2 (FSGM),
- 3 стартерни култури, от които 2 стартерни култури за кисело мляко BY 24 (SM), BY 122-17 (FSGM) и 1 стартерна култура за сирене C-2 (FSGM).



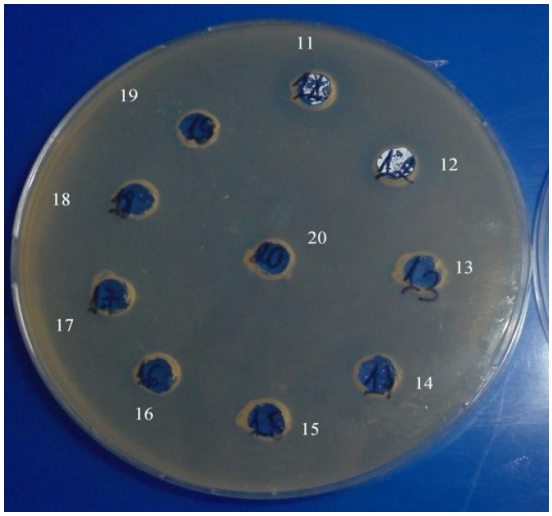
Фиг. 1. А) **12 -** Антимикробна активност на *S. thermophilus* t2 срещу *S. enteritidis* ATCC 13076.

Инхибиторна активност към ***S. typhymurium* 123** (IBM) показват:

- 5 щама *L. bulgaricus* - b21 (MRS, FSCM), b5 (MRS), b7 (FSGM, MRS), b41 (FSGM, SM), b48 (FSGM),
- 2 щама *L. helveticus* - Q40 (MRS), h9 (MRS), *L. delbrueckii lactis 1043* (MRS),
- 2 щама *S. thermophilus* - tn1 (SM), t10 (SM),
- 1 щам *L. lactis* l70 (SM),
- 9 стартерни култури от, които 7 стартерни култури за кисело мляко *BY 24(FSGM), BY 21(FSGM), BY D4(FSGM), BY 144-12(FSGM), BY 5-12(FSGM), BY41-8(FSGM), BY 122-17(MRS),* 1 стартерна култура за кашкавал *YC-1(MRS)* и 1 стартерна култура за сирене *C 216-40(FSGM).*

При скрининга за антимикробна активност на изследваните щамове към ***L. monocytogenes CECT 4032*** активност показват:

- 2 щама *S. thermophilus* – t2(FSGM), t24 (FSGM),
- 1 стартерна култура за кисело мляко BY 122-17 (FSGM).

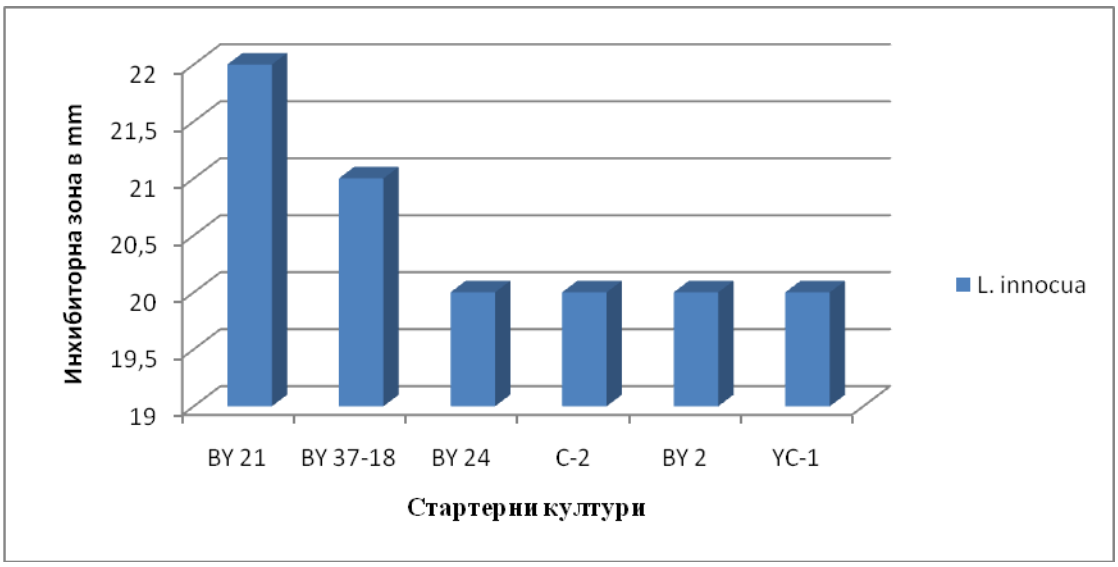


Б)

Фиг. 1. Б) Антимикробна активност на *S. thermophilus* срещу *L. monocytogenes* CECT 4032: **11 -** *S. thermophilus* t2 (37^0C), **12 -** *S. thermophilus* t24 (37^0C).

Към непатогенната ***L. innocua* F** антимикробна активност показват:

- 4 щама *L. bulgaricus* - b3 (MRS), b24 (MRS), b7 (MRS, FSCM), b2/1 (MRS),
- 2 щама *L. helveticus* - Q40 (MRS), h3П14 (MRS) и
- 8 стартерни култури от които 6 стартерни култури за кисело мляко BY 24 (MRS), BY 21(MRS), BY 37-18(MRS), BY 28-22(MRS), BY 5-12(MRS), BY 2(MRS), 1 стартерна култура за кашкавал YC-1(MRS) и 1 стартерна култура за сирене C-2 (MRS).

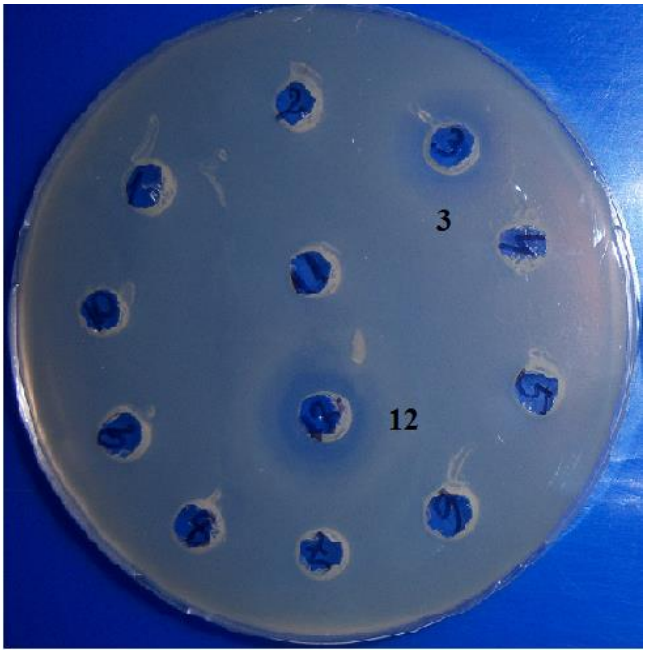


Фиг. 2. Антимикробна активност на стартерни култури към *L. innocua F.*

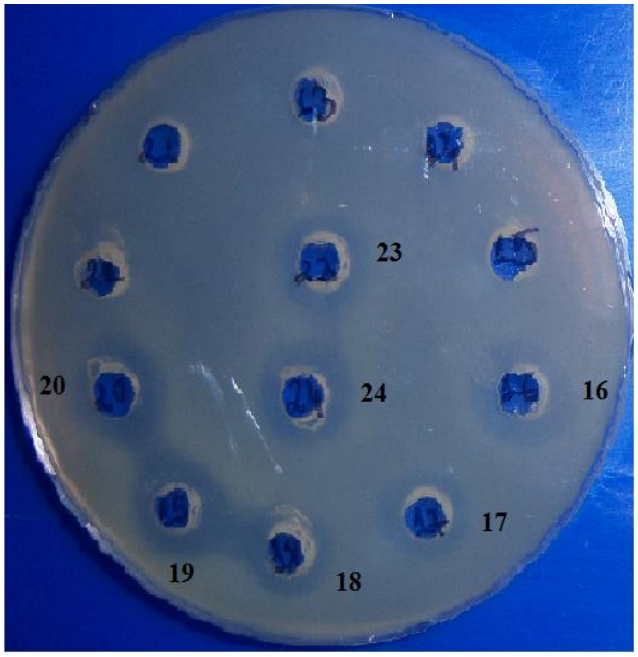
При изпитване на изследваните култури за антимикробна активност към ***E. aerogenes ATCC 13048*** активност показват следните щамове:

- 10 щама *L. bulgaricus – b38(FSGM), b21(FSGM), b5(FSGM), b144(FSGM), b24(FSGM), b7(FSGM), b120(MRS), b2(FSGM), b28(FSGM), Db(FSGM),*
- *5 щама L. helveticus – Q40(FSGM), h25(FSGM), h3П14(FSGM), h9(FSGM, MRS), h4(FSGM),*
- 1щам *L. delbrueckii lactis - 1043(FSGM),*
- 1щам *S. thermophilus – t2(FSGM),*
- 5 щама *L. lactis - l70(SM), l598(FSGM), l588/6(FSGM), l99(FSGM), l400(FSGM),*
- 2 стартерни култури за кисело мляко BY 21*(FSGM)* и BY 24 *(FSGM).*

Демонстрираната активност към *E. aerogenes* в повечето от случаите, културите показват, когато са култивирани в козе мляко и при температура 37^0C.



А)

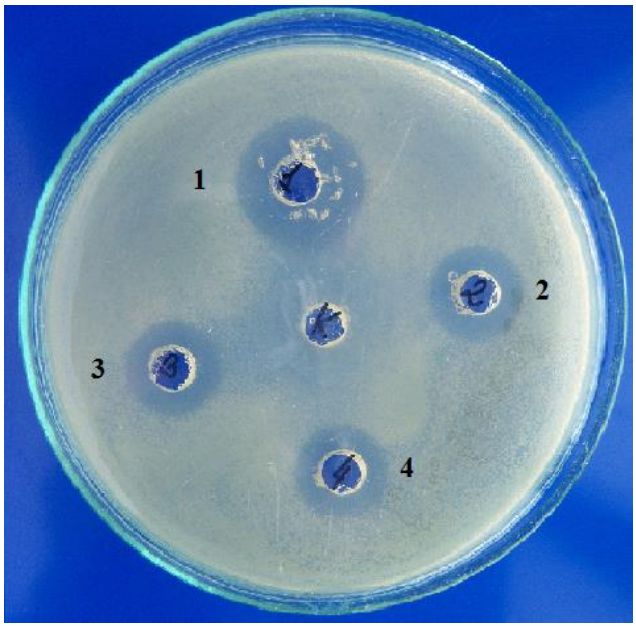


Б)

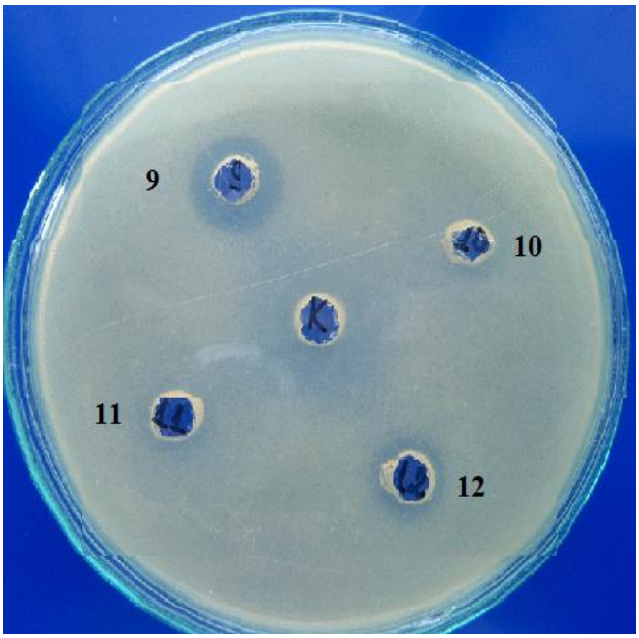
Фиг. 3. Антимикробна активност на монокултури и стартерни култури, култивирани на козе мляко срещу *E. aerogenes ATCC 13048.*

А) **3** - *S. thermophilus* t 12 (37^0C), **12** - *S. thermophilus* t 12 (42^0C);

Б) **16** - *L. helveticus* Q40 (37^0C), **17** - *L. bulgaricus* b120 (37^0C), **18** - *L. bulgaricus* b38 (37^0C), **19** - *L. bulgaricus* b21 (37^0C), **20** - *L. helveticus* h25 (37^0C), **23** - *L. helveticus* 3П14 (37^0C), **24** - *L. helveticus* h9 (37^0C);



В)



Г)

Фиг. 3. Антимикробна активност на монокултури и стартерни култури, култивирани на козе мляко срещу *E. aerogenes ATCC 13048.*

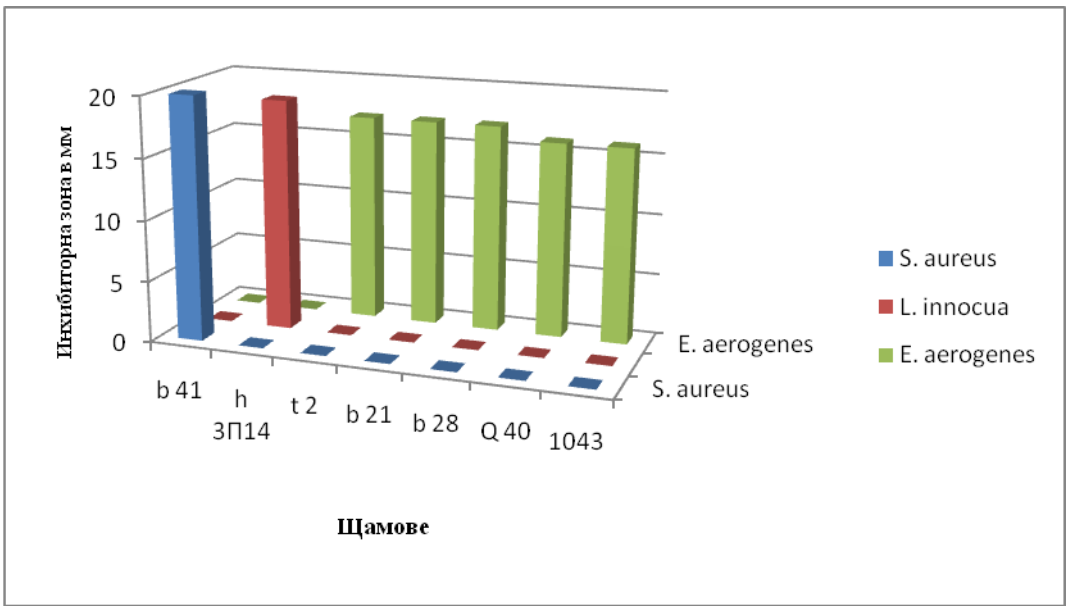
В) *L. bulgaricus b24*, култивиран в козе мляко при температура 37^{0}C, *L. bulgaricus* b21, култивиран в козе мляко при температура 37^{0}C, *L. bulgaricus* b38, култивиран в козе мляко при температура 37^{0}C, *L. helveticus* h3П14, култивиран в козе мляко при температура 37^{0}C;

Г) антимикробна активност на стартерна култура BY 21, култивирана в козе мляко при температура 43^{0}C.

От получените резултати беше констатирано, че най–голям брой активни щамове бяха селекционирани сред групата на лактобацилите. Диаметърът на инхибиторните зони варираще от 9 до 17 mm. При анализът на тези резултати се установи, че от всички щамове култивирани на 37°C антимикробна активност срещу *E. aerogenes ATCC 13048* проявяват 14,6% от изследваните щамове *L. bulgaricus*, 9,8% от щамовете *L. helveticus*, 2,4% от щамовете *L. lactis* и 2,4% от щамовете *S. thermophilus*.

Към *B. cereus ATCC 11778* антимикробна активност не прояви нито една култура.

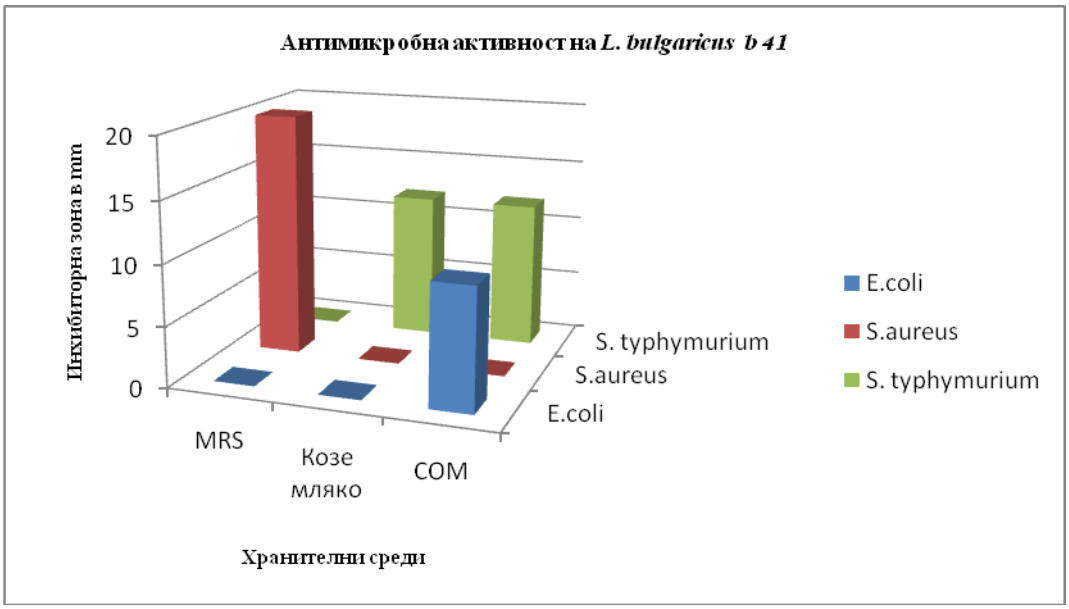
Към *B. subtilis ATCC 6633* антимикробна активност показа само *L. delbrueckii lactis 1043* (MRS).



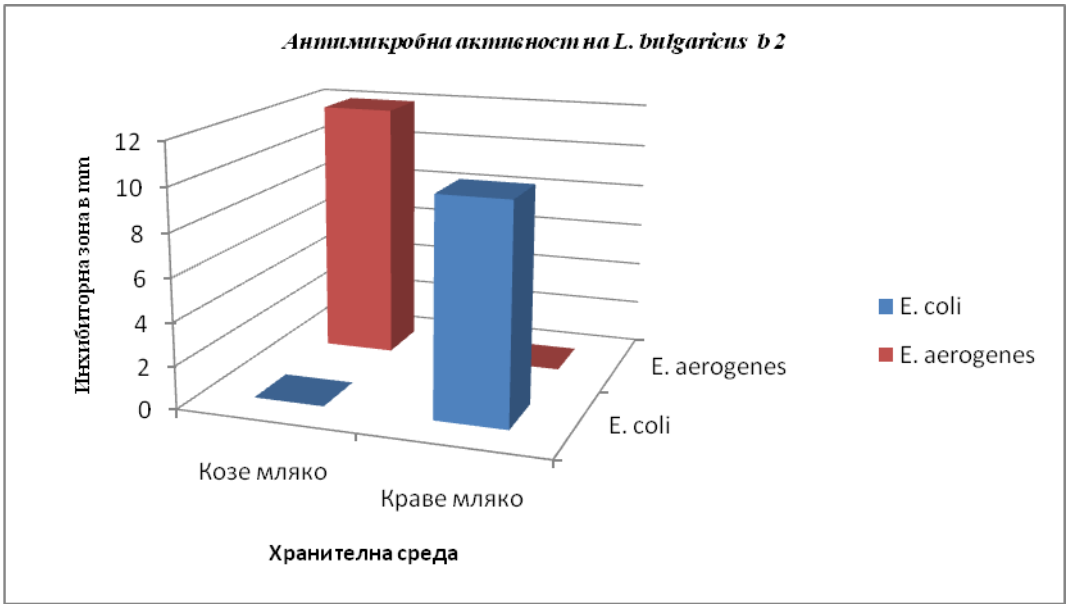
Фиг. 4. Антимикробен спектър на щамове с максимална инхибиторна активност

На следващата фигура – Фиг. 5 (А, Б, В, Г) са обобщени резултатите за щамове и стартерни култури, показали най-широк спектър на антимикробна активност.

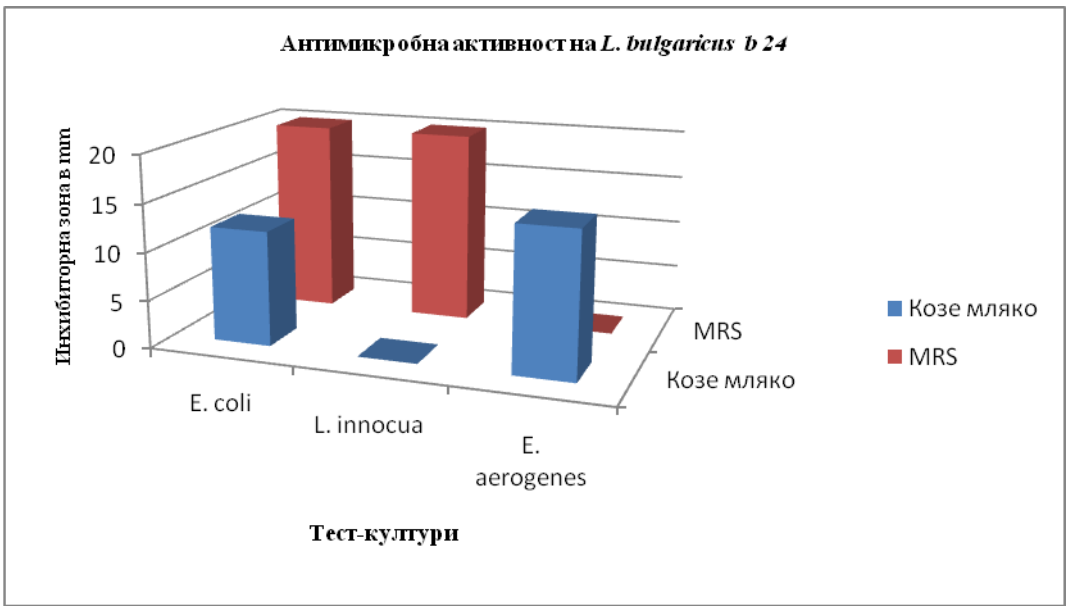
От групата на *L. bulgaricus* широк спектър антимикробна активност показват *L. bulgaricus* – b41, b24, b21, b2.


Антимикробна активност на L. bulgaricus b 41
Инхибиторна зона в mm
20
15
10
5
0
MRS
Козе мляко
COM
S. typhymurium
S.aureus
E.coli
E.coli
S.aureus
S. typhymurium
Хранителни среди

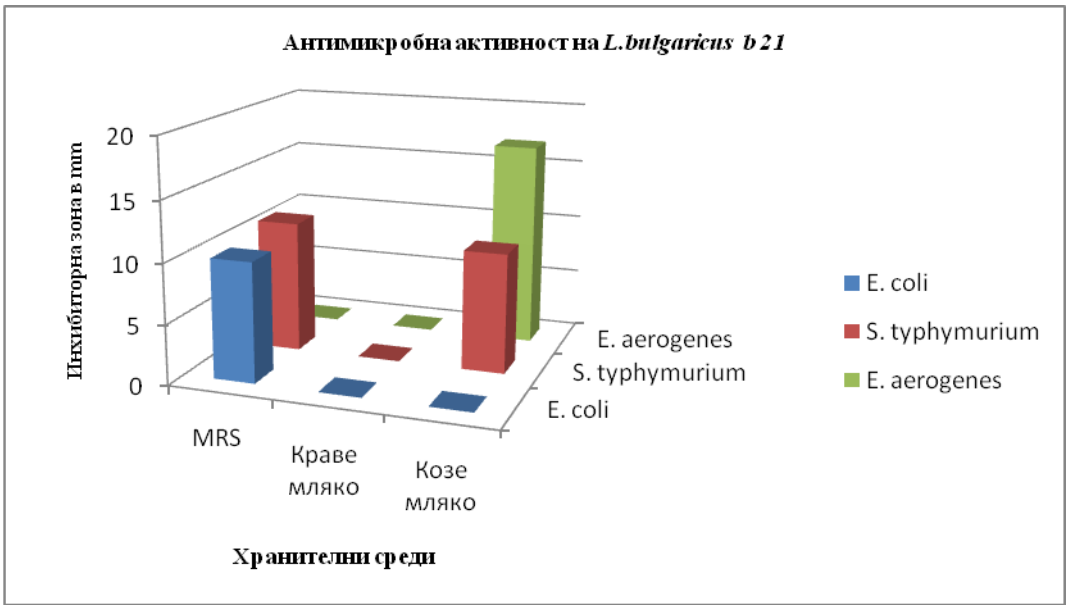
А)


Антимикробна активност на L. bulgaricus b 2
Инхибиторна зона в mm
12
10
8
6
4
2
0
Козе мляко
Краве мляко
E. aerogenes
E. coli
E. coli
E. aerogenes
Хранителна среда

Б)



В)



Г)

Фиг. 5. Щамове от вида *L. bulgaricus* с най-широк спектър на активност.

Пробиотиците са способни да повлияват интестиналните патогенни, чрез продуциране на антибактериални вещества, включително млечна киселина и антибиотик-подобни вещества (бактериоцини), чрез конкуренция за хранителни вещества и/или места за прикрепване, чрез повлияване на ензимната активност или чрез повишаване активността на макрофагите и нивата на специфични антитела (De Vuyst L., F. Leroy, 2007).

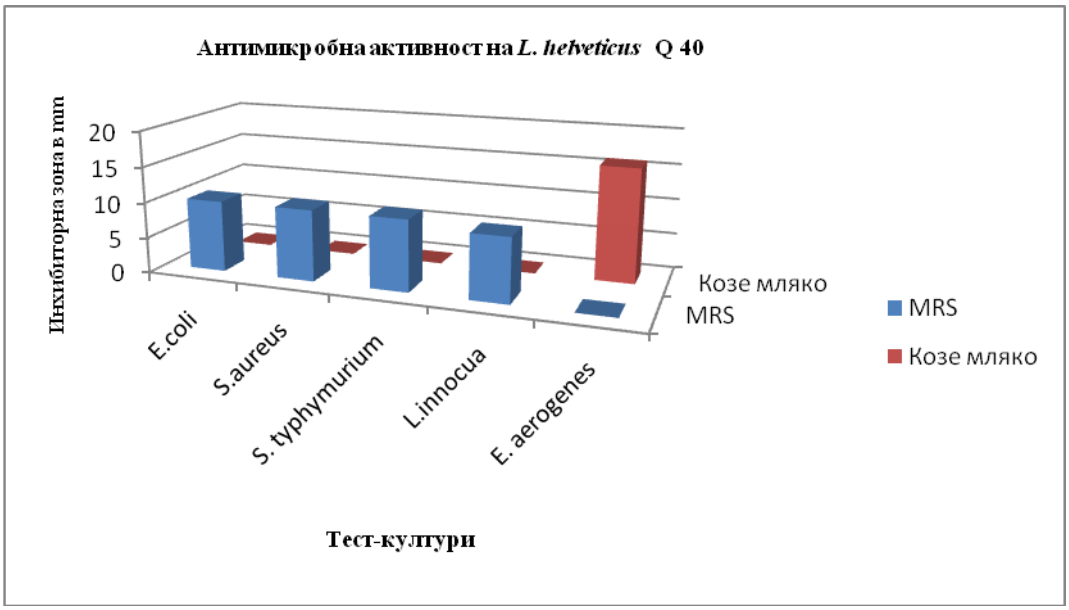
За антимикробната активност на млечнокиселите бактерии по отношение на Грам (-) патогенни бактерии докладват и други автори (Domitille Fayol-Messaoudi et al., 2005, Ivanova I. et al., 2013).

Известно е, че *L. bulgaricus* притежава силно антимикробно действие спрямо редица Грам-положителни бактерии - стафилококи, микрококи, сарцини, спороносни бактерии, и по отношение на Грам-отрицателните – паратифни, тифни, салмонели, дизинтерийни бактерии, бактерии от групата коли и др. (Oullette AJ. Am. J Phisiol, 1999, Ayabe T., et al., 2000).

Casey et al., 2004 също докладват, че щамове отнесени към род *Lactobacillus*, могат да инхибират растежа на *Salmonella* между 30% и 80%.

Щамовете от *L. helveticus* показват антимикробна активност само, когато са култивирани в синтетична среда. Това беше манифестирано, когато щамовете са култивирани, като монокултури или като смесени култури.

От изследваната група щамове *L. helveticus* Q40 проявява антибактериална активност *към E. coli ATCC 11777, S. aureus ATCC 12600, S. thiphymurium 123 (IBM), L. innocua F и E. aerogenes ATCC 13048.*



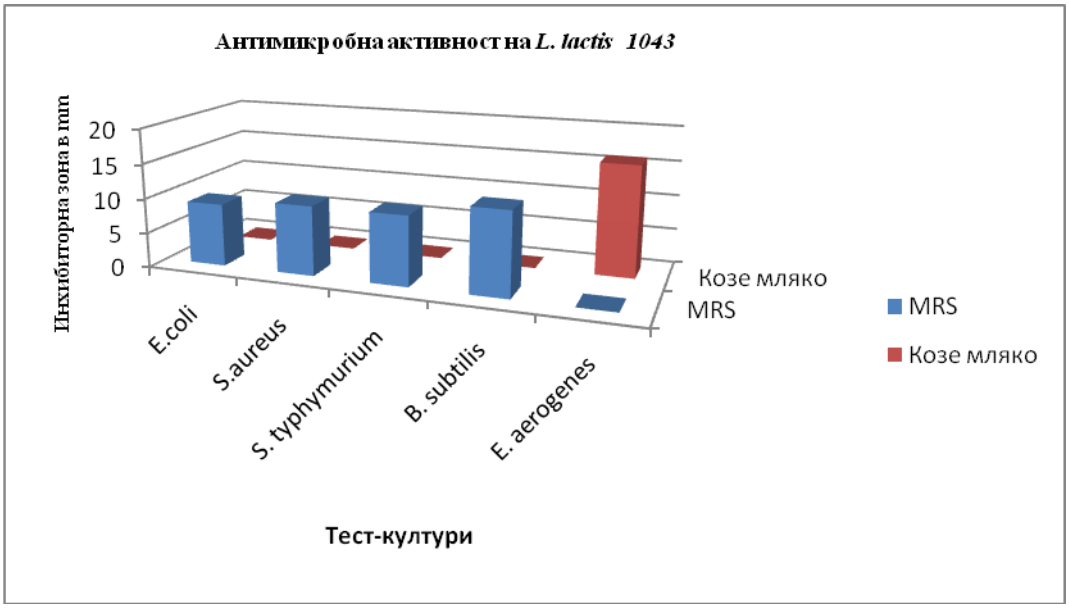
Фиг. 10. Антимикробна активност на *L. helveticus Q40.*

Ivanova, I et al., 1998, съобщават за широк спектър инхибиторна активност на щамовете *L. helveticus h 9 и L. delbrueckii lactis 1043.*

Miteva,V. et al., 2002 проучват антимикробната активност на щама *Lactobacillus delbrueckii* 1043. Те изследват антибактериална субстанция продуцирана от щам изолиран

от български кашкавал. Продуцентът принадлежи към вида *L. delbrueckii*, който е рядък продуцент на бактериоцини. Инхибиторният агент е топлинно стабилен и активен срещу различни видове млечнокисели бактерии и някои хранителни патогени: *L. monocytogenes, S. aureus, E. faecalis, E. coli, Yersinia enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*.

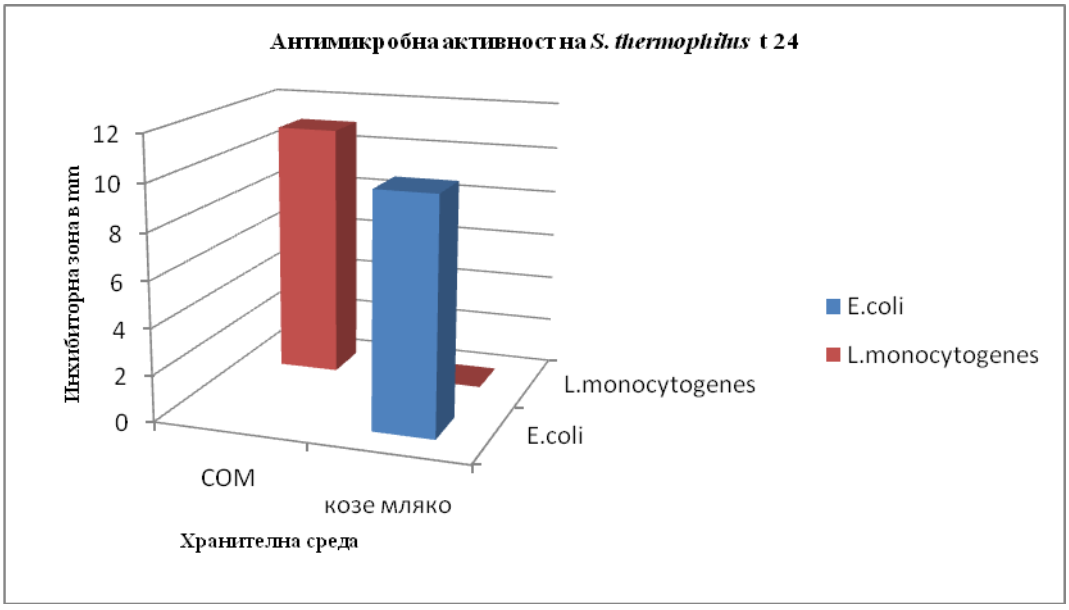
В изследването на подбраната група лактобацили включихме и *L. helveticus h 9 u L. delbrueckii lactis 1043*, като доказани щамове с антимикробна активност. Антимикробния потенциал на тези два щама бе препотвърден в нашето изследване срещу по-горе цитираните патогенни (Фиг. 7).



Фиг. 7. Антимикробна активност на *L. delbrueckii lactis 1043.*

От групата на *S. thermophilus* широка антимикробна активност показаха *S. thermophilus* t2 и t24. Интересен е фактът, че *S. thermophilus* прояви антимикробна активност основно при 42^0C.

А) *S. thermophilus* t 2



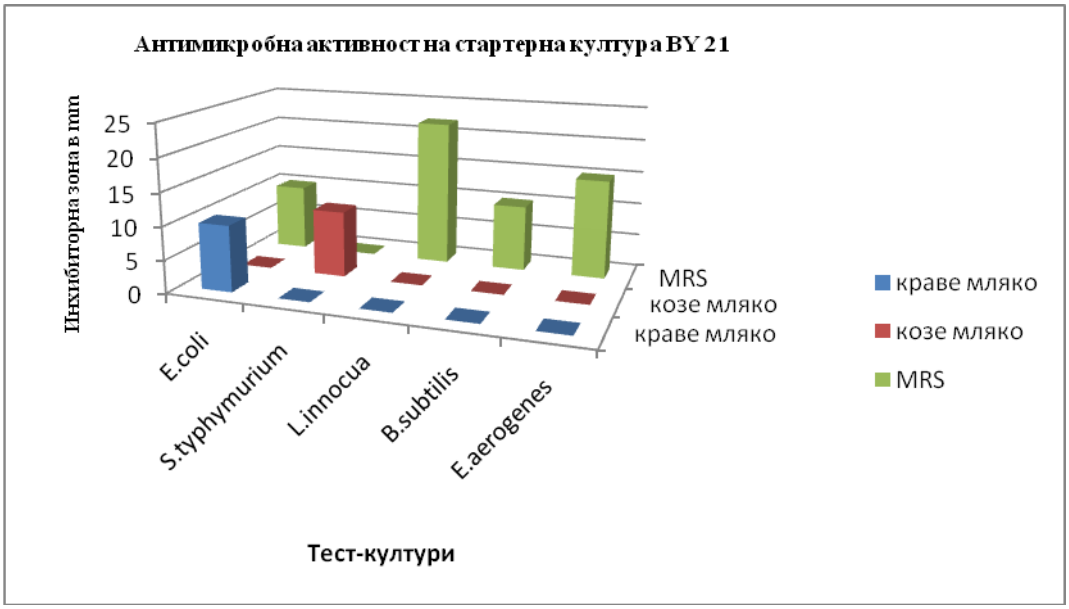
Б) *S. thermophilus* t 24

Фиг. 8. Антимикробна активност на *S. thermophilus* с най-широк спектър на активност (А, Б)

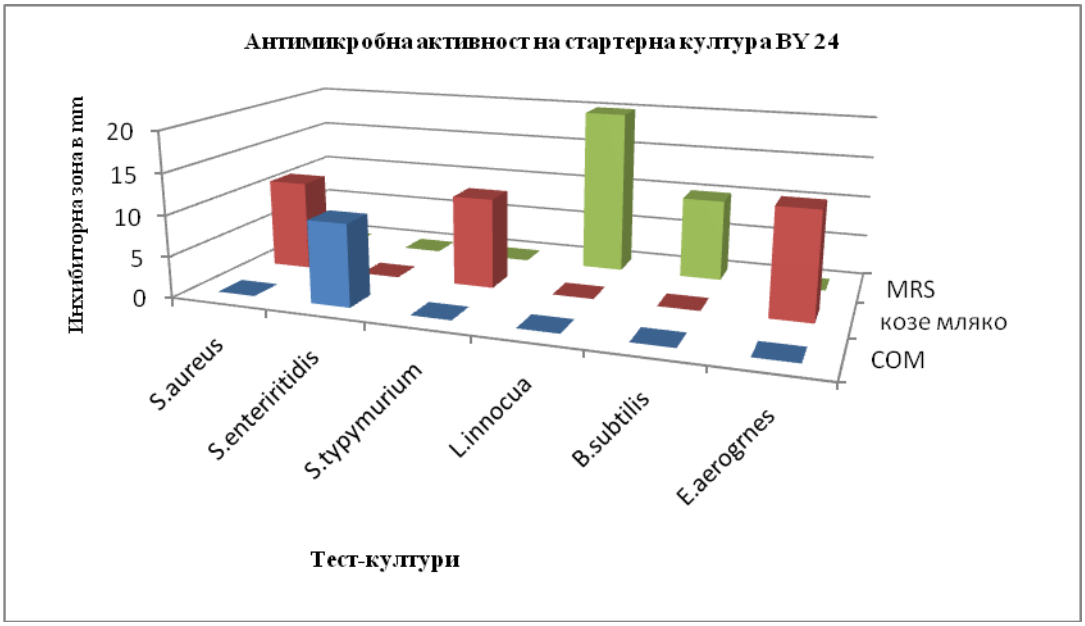
При температура 42^{0}C *S. thermophilus* първоначално потиска растежа на *S. thyphimurium*, като инактивира бактериалните клетки. В много страни, киселото мляко се поставя в групата "безопасни храни", като мощно биологично средство за борба с хранителни отравяния, причинени от стафилококи и салмонела. *S. thermophilus* притежава по-силна инхибиторна активност спрямо *S. thyphimurium* и *S. gallinarum* от *L. bulgaricus*.

Инхибиторното действие на млечната киселина е незначително в сравнение със синтезираните антимикробни съставки (Ivanova, I., 1998).

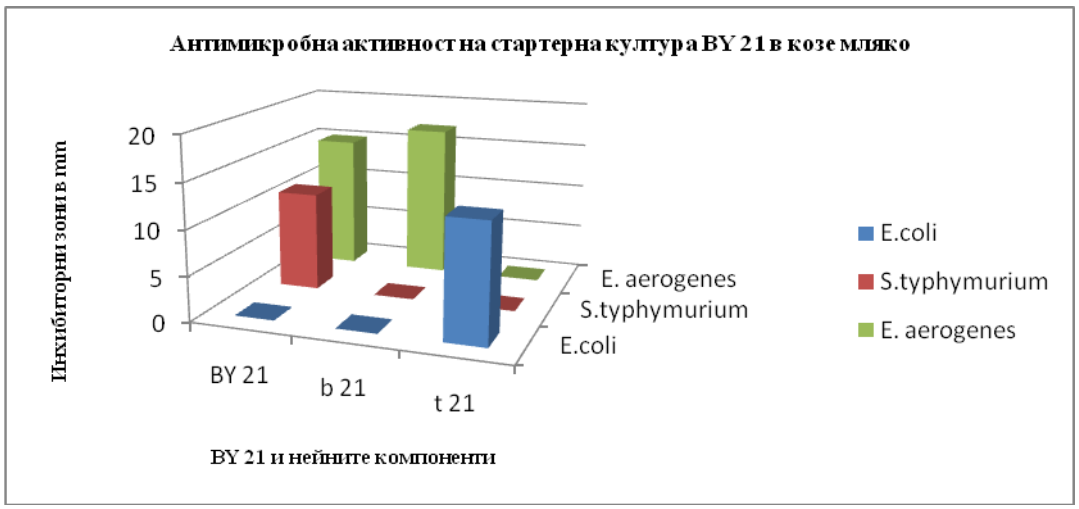
От изследваните 22 стартерни култури, 2 показаха най-широка антимикробна активност. Това са стартерните култури за кисело мляко BY 24 и BY 21 (Фиг. 9, 10 и 11).



Фиг. 9. Антимикробна активност на стартерна култура за кисело мляко BY 21.

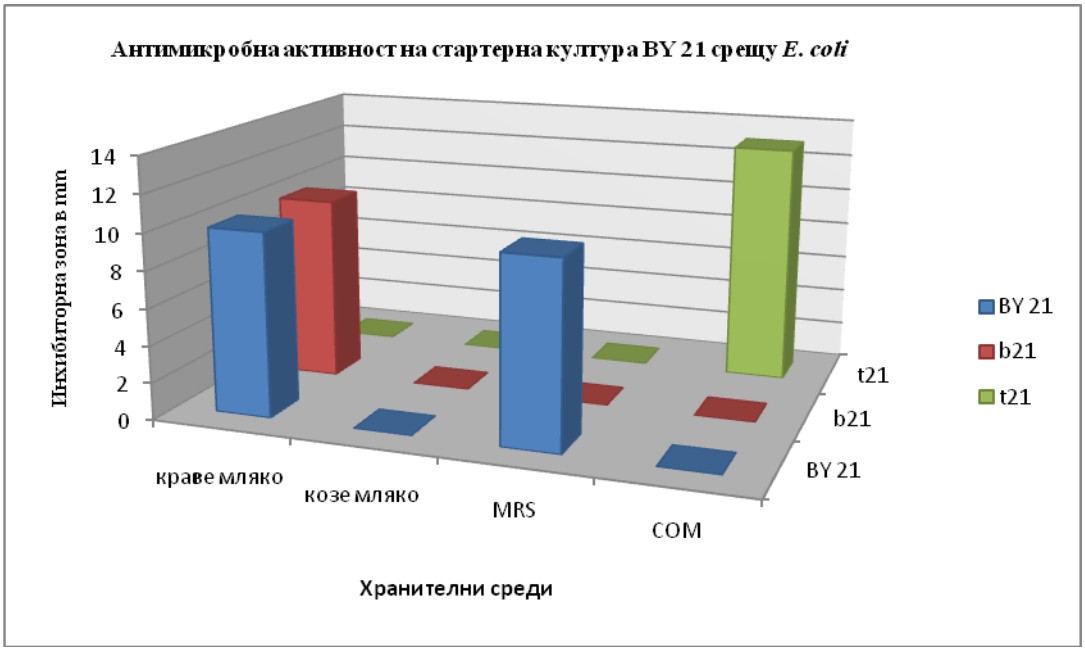


Фиг. 10. Антимикробна активност на стартерна култура за кисело мляко BY 24.



Фиг. 11. Антимикробна активност на стартерна култура за кисело мляко BY 21 в козе мляко.

Голяма част от изследваните култури показаха антимикробна активност, когато се култивираха в млечна среда и по-голяма активност бе проявена, когато културите се култивираха в обезмасленото козе мляко. Особен интерес показва изследването на стартерна култура за кисело мляко BY 21.



Фиг. 12. Антимикробна активност на стартерна култура за кисело мляко LBB BY 21 срещу *E. coli ATCC 11777.*

Резултати и обсъждане

От илюстрираните резултати на фигура 16 се вижда, че закваската проявява антибактериална активност срещу *E.coli ATCC 11777* при култивиране в MRS бульон и в краве мляко. Нейните компоненти *L. bulgaricus b21*, прояви активност при култивиране в MRS бульон, а *S. thermophilus t21* при култивиране в сухо обезмаслено мляко. В литературата има описани различни случай в които *L. bulgaricus* при съвместно култивиране с термофилния стрептокок повишава или намалява антагонистичното си действие, затова трябва да се проверява винаги антимикробната активност на готовата закваска. Получения резултат ни показва възможна бактериоцинова природа на антимикробното вещество.

При изследване на антимикробната активност на закваската за кашкавал YC-1 (*L. helveticus h3П14 и S.thermophilus t3Д1)* в козе мляко термофилните млечнокисели бактерии показаха активност само, когато бяха в комбинация. При самостоятелното култивиране на двата микроорганизма, същите не проявиха никаква активност към *S. aureus ATCC 12600.* Закваската прояви антимикробна активност към *S. thyphymurium 123 (IBM) и L. inocua F* при култивиране в MRS бульон. *S.thermophilus* влизащ в комбинацията не прояви никаква активност, докато *L. helveticus h3П14* показа активност при самостоятелно култивиране в козе мляко срещу *E. aerogenes ATCC 13048*, при култивиране на сухо обезмаслено мляко срещу *E. coli ATCC 11777* и в MRS бульон срещу *L. inocua F*.

Като щамове с най-широк спектър на антимикробна активност бяха определени следните монокултури:

1. *L. helveticus* Q40 с антимикробна активност срещу *E. coli ATCC 11777, S. aureus ATCC 12600, S. typhimurium 123 (IBM), L. innocua* F и *E. aerogenes ATCC 13048;*
2. *L. delbrueckii lactis 1043* с антимикробна активност срещу *E. coli ATCC 11777, S. aureus ATCC 12600, S. typhimurium 123 (IBM), B subtilis ATCC 11778 и E. aerogenes ATCC 13048;*
3. *S. thermophilus* t2 с антимикробна активност срещу *S. aureus ATCC 12600, S. enteritidis ATCC 13076 и E. aerogenes ATCC 13048 и L. monocytogenes CECT 4032;*
4. *L. bulgaricus b21* с антимикробна активност срещу *E. coli ATCC 11777, S. typhimurium 123 (IBM) и E. aerogenes ATCC 13048;*
5. *L. bulgaricus b5* с антимикробна активност срещу *E. coli ATCC 11777, S. aureus ATCC 12600, S. typhimurium 123 (IBM) и E. aerogenes ATCC 13048;*

Като стартерни култури с най-широка антимикробна активност бяха определени следните култури:

1. Стартерна култура за кисело мляко BY 24 с антимикробна активност към *S. aureus ATCC 12600, S. enteridis ATCC 13076, S. typhimurium 123 (IBM), L. innocua F, B. subtilis ATCC 6633* и *E. aerogenes ATCC 1304;*
2. Стартерна култура за кисело мляко BY 21 с антимикробна активност към *E. coli ATCC 11777, S. typhimurium 123 (IBM), L. innocua F, B. subtilis ATCC 6633* и *E. aerogenes ATCC 1304;*

На Фиг. 13. е показан дела в % на изследваните щамове и стартерни култури към отделните тест- култури.

Фиг. 13. Антимикробна активност в % на млечнокисели бактерии и стартерни култури спрямо патогенни тест-култури.

Най-голяма антимикробна активност изследваните щамове проявиха срещу *E. aerogenes ATCC 13048* - 30,55%, а най-малка към *B. subtilis ATCC 6633.* От своя страна стартерните култури проявиха най-голяма активност срещу *S. typhimurium 123 (IBM)* - 40,91%, а най-малка активност към *E. aerogenes ATCC 13048*. Получените данни потвърждават резултатите от други автори, че антимикробната активност на млечнокиселите бактерии е променлива.

Изследванията на активни щамове, като t2, t24, b21, b24, Q40, b5 u 1043 способни да подтискат развитието на значими патогенни, представляват интерес във връзка с тяхното приложение като пробиотици. При селекцията на пробиотици е необходимо да се постигне добро съчетание между функционалните качества и технологичните ограничения. Дори и най-стабилните пробиотични бактерии способни да оцелеят в чревния тракт, търпят ограничения в обхвата на хранителните им приложения. За момента се смята, че млечните продукти са най-добрата среда за развитие на пробиотиците, тъй като се съхраняват при по-ниски температури и се характеризират с благоприятен състав и pH. Получените резултати допълват информацията за охарактеризиране на щамовете и възможността за използването им в състава на стартерни култури и храни. Изборът на нови щамове продуценти на антимикробни вещества е важна и полезна работа за производителите на стартерни култури заради възможността те да бъдат използвани, произвеждани и прилагани при производството на млечни продукти, като биопротекторни култури.

1.1.Определяне влиянието на протеолитични ензими и термична обработка върху антимикробната активност

Наличието на антимикробно действие след корекция на pH на супернатантите показва, че част от щамовете (Табл. 2) синтезират освен млечна киселина и други антибактериални вещества, чиято порода трябва да бъде изследвана допълнително.

За тази цел за 9 представителни култури (*L. delbrueckii lactis 1043* и *S. thermophilus t3D1, S. thermophilus t2, S. thermophilus t24, L. bulgaricus b24, L. bulgaricus b21, L. helveticus h3П14, стартерна култура за кисело мляко BY 24 и стартерна култура за кашкавал YC-1*) бе направена начална характеристика на антибактериалните вещества, синтезирани от тях. Супернатантите от културалните течности с коригирано pH бяха подложени на температурна обработка (100^0C за 10 мин), третиране с Протеиназа К (200 μg/мл за 2-2,5 часа при 37^0C) и Трипсин. Обработените по този начин супернатанти бяха анализирани за антимикробна активност спрямо *S. thyphymurium 123(IBM), S. aureus ATCC 12600, E.coli ATCC 11777 и L. inoccua F.* В качеството на контрола бе използвана нетретирана супернатанта.

Резултатите от определяне влиянието на протеолитични ензими и термична обработка върху инхибиторните вещества са показани в таблица 2.

Табл. 2. Антимикробна активност на избрани щамове и стартерни култури след ензимна и термична обработка на супернатантите

Антимикробна активност (mm инхибиторна зона)											
Култура №	*S. THYPHYMURIUM 123 (IBM)*		*S. AUREUS ATCC 12600*		*E. COLI ATCC 11777*		*L. INNOCUA F*		Трипсин	Термична обработка	Протеиназа К
	1	*2*	*1*	*2*	*1*	*2*	*1*	*2*	3	4	5
1043	+ *12*	+ *10*	+ *13*	+ *10*	-	-	+ *22*	+ *22*	10 Staph.	-	-
t-2	-	-	+ *12*	+ *12*	-	-	-	-	12 Staph.	-	-
BY-24	+ *12*	+ *11*	+ *12*	+ *11*	-	-	+ *21*	+ *20*	21 Listeria	21 Listeria	21 Listeria
t-24	-	-	+ *12*	+ *8*	-	-	-	-	-	-	-
b-24	+ *13*	+ *11*	-	-	+ *22*	+ *20*	+ *20*	+ *19*	20 Listeria /Salm.неясна зона	19 Listeria	19 Listeria
YC-1	+ *12*	+ *11*	+ *11*	+ *10*	-	-	+ *21*	+ *20*	19 Listeria	21 Listeria	20 Listeria
h3П14	+ *12*	+ *11*	-	-	-	-	+ *22*	+ *21*	21 Listeria / Salm.неясна зона	21 Listeria	21 Listeria
t3D1	+ *12*	+ *10*	+ *9*	-	-	-	-	-	9 Salmonella	-	-
b-21	-	-	+ *9*	-	+ *12*	+ *10*	+ *22*	+ *22*	-	-	-

Легенда: 1 – Без неутрализация на супернатантата; *2* – С неутрализация на супернатантата; ”+”стерилна зона в mm; ”-”без стерилна зона

Щамове *L. delbruckii lactis 1043, S. thermophilus t2* и *S. thermophilus t3D1* след обработка на пробата с трипсин запазват активността си. След термична обработка на пробите и обработка с Протеиназа К щамовете не проявяват антимикробна активност. От получения резултат може да се предположи, че веществата определящи антимикробната активност при двата щама имат белтъчен произход. Резултатът е потвърждение на предишни изследвания на щам *L. delbruckii lactis 1043.*

Резултатите показват, че за *L. bulgaricus b24, L. helveticus h3П14, стартерна култура за кисело мляко BY 24 и стартерна култура за кашкавал YC–1* антимикробната активност по всяка вероятност се обуславя от термоустойчиви вещества с небелтъчна структура, тъй като се запазва и след термичното въздействие и третирането с Протеиназа К (Табл. 2.). *S. thermophilus t24* и *L. bulgaricus b21* не показаха никаква антимикробна активност след третиране на супернатантите. Резултатите дават основание за понататъшна работа с горецитираните култури и тяхното охарактеризиране.

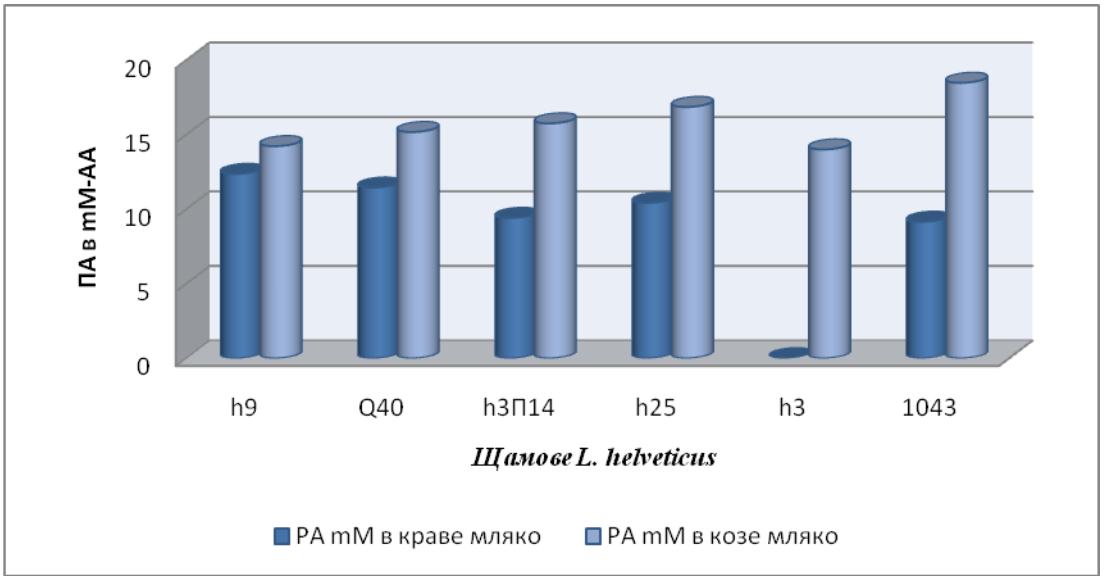
2. Определяне на протеолитичната активност и други характеристики на изследваните млечнокисели бактерии. Изследване киселинообразуването на проучваните МКБ при култивирането им в краве и козе мляко. Количествено определяне на общия брой жизнеспособни клетки в стартерните култури.

Протеолитичната активност на млечнокиселите бактерии трябва да се разглежда от две гледни точки. Първо това свойство характеризира способността на микроорганизма да разгражда белтъка и да използва продуктите от неговата хидролиза за собствена конструктивна обмяна на веществата. В този случай по степента на образуването и използването на продуктите от хидролизата на белтъците, главно свободните аминокиселини може да се съди за активността на размножаването и вероятно за други процеси при развитието на микроорганизма. Крайните продукти на хидролизата, свободните аминокиселини имат важно значение в общия метаболизъм. От друга страна, когато продуктите от хидролизата на белтъците не се използват от микроорганизмите в процеса на техния метаболизъм те се натрупват в млечнокиселите продукти, повишавайки техните хранителни стойности и вкусовите им качества.

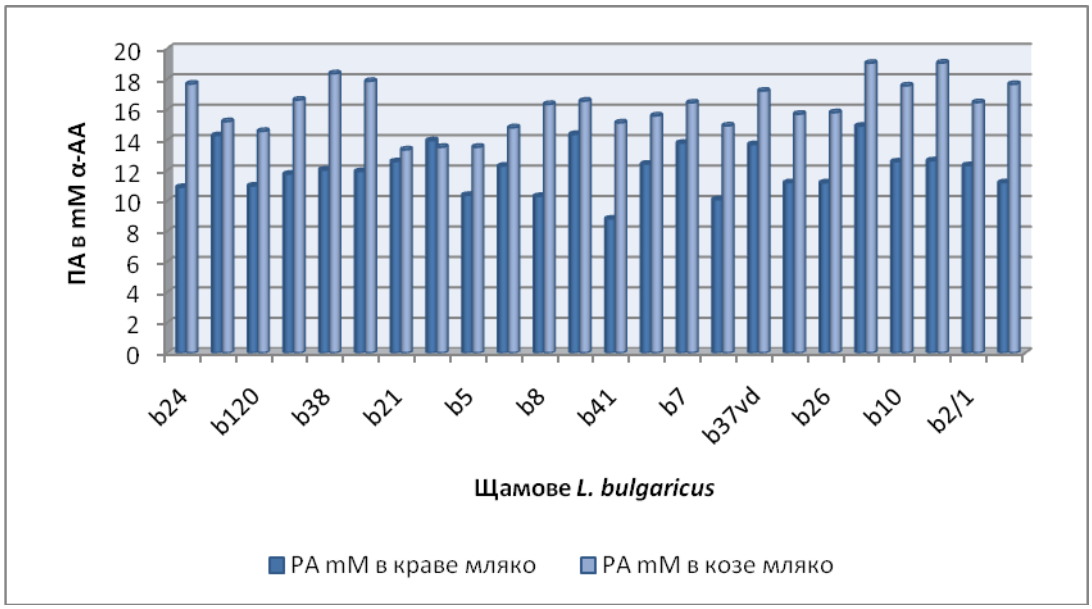
Резултати и обсъждане

Млечнокиселите бактерии се считат за бактерии със слаба протеолитична активност в сравнение с много други групи бактерии, *Bacillus, Proteus, Pseudomonas.* Установено е, че протеолитичните системи на лактобацилите и лактококите са много сходни по отношение на съставните си части и начина си на действие.

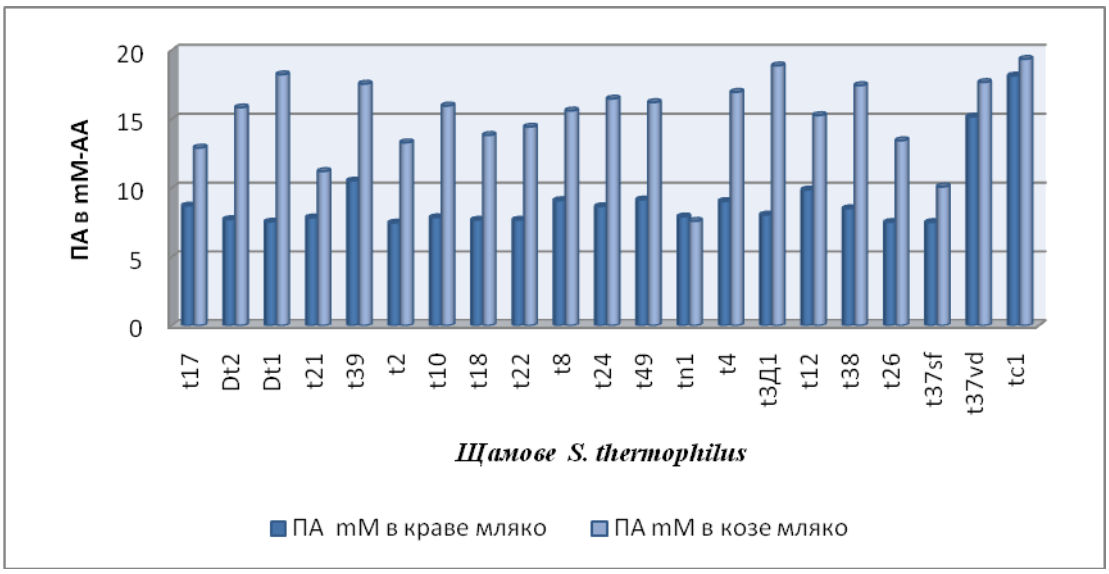
Протеолитичната активност на 46 щама беше определена с помощта на *O-phthaldialdehyde (OPA*) спектрометричен анализ (Graciela Savoy de Giori and Elvira Maria Hebert, 2001). Получените резултати са представени на Фиг. 14.



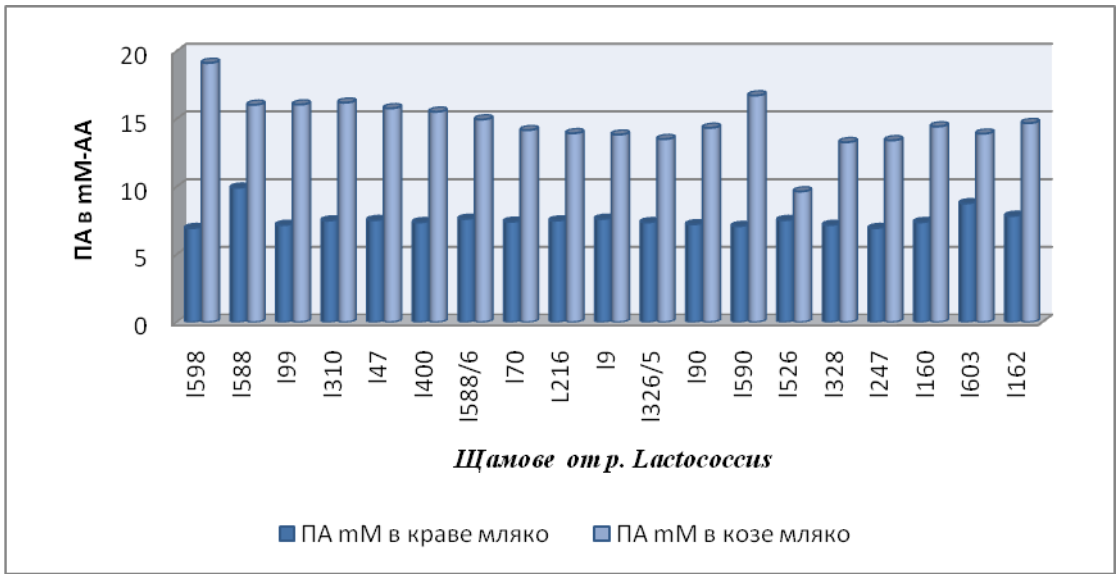
А)



Б)



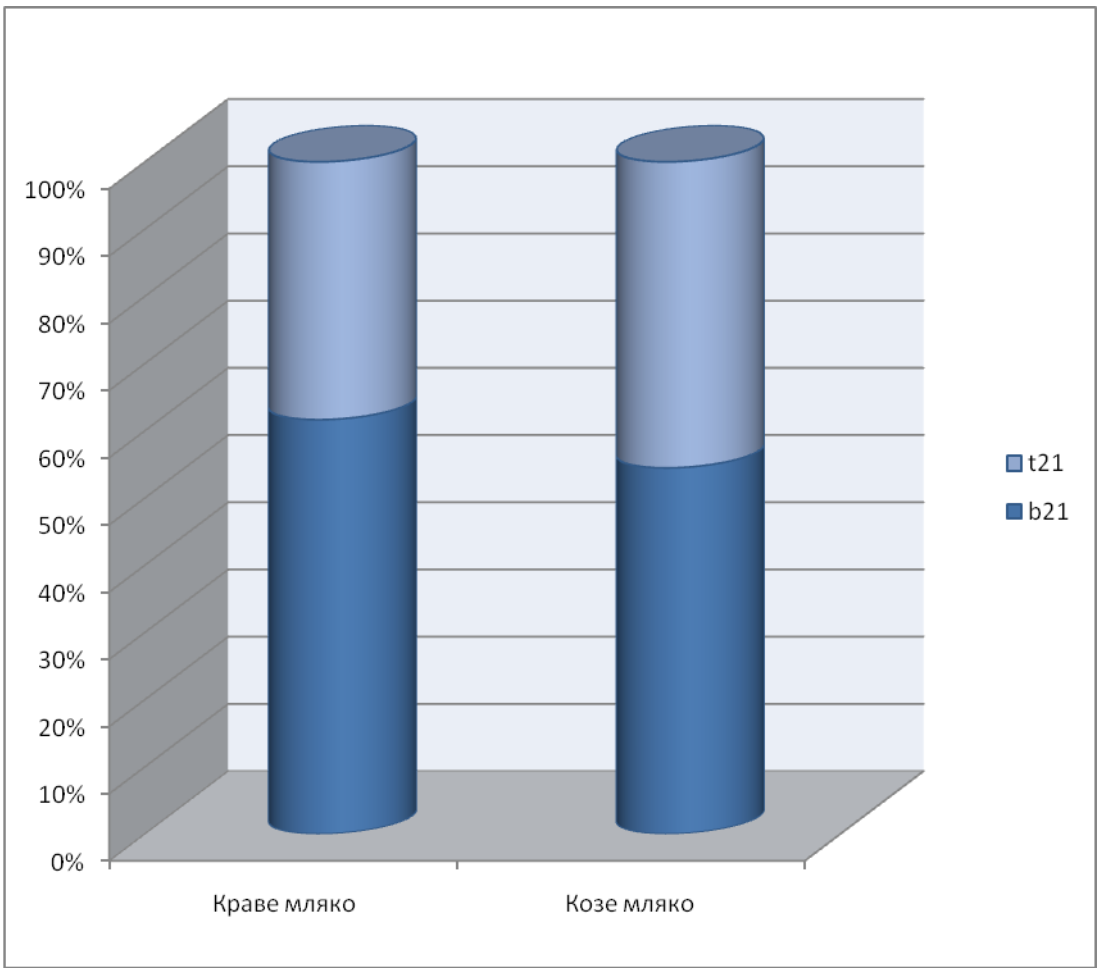
В)



Г)

Фиг. 14. Протеолитична активност на изследваните щамове в краве и козе мляко
А) *L. helveticus*, Б) *L. bulgaricus*, В) *S. thermophilus*, Г) лактококи

Получените резултати от нашето изследване потвърждават досега докладваната протеолитична активност на млечнокиселите бактерии от други изследователи. С висока протеолитична активност се отличава групата на лактококите и лактобацилите, докато *S. thermophilus* показа по-слаба протеолитична активност (Law B.A. and J. Kolstadov, 1983; Shihata A. & Shah N.P., 2000; Savijoki K. et al., 2006).



Фиг. 15. Протеолитична активност на стартерна култура за кисело мляко BY 21 в краве и козе мляко.

Млечнокиселите бактерии се характеризират с широка ауксотрофност към голям брой аминокиселини и растежни фактори, като пептиди и аминокиселини (Shihata A. et al., 2000).

Трябва да бъде отбелязана протеолитичната активност на следните култури от изследваните *L. lactis l598, S. thermophilus tc1, L.delbrueckii lactis 1043, L. bulgaricus b39.* Цитираните монокултури са с най-висока протеолитична активност (Фиг. 14).

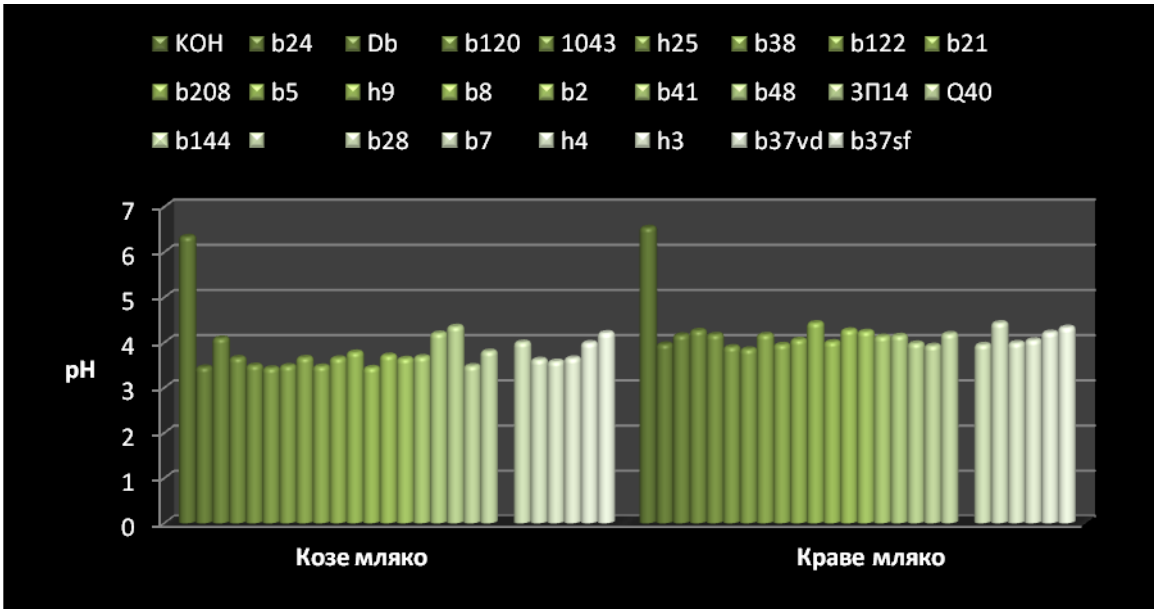
Според някои изследователи, *L. bulgaricus*, като чиста култура показва по-висока протеолитична активност от *S. thermophilus,* която е най-висока в логаритмичната фаза. (Чомаков, 2007).

Известно е, че щамовете млечнокисели бактерии от вид *L. helveticus* притежават по–добра протеолитична активност от щамовете от вид *L. bulgaricus* (Фиг. 14. А, Б).

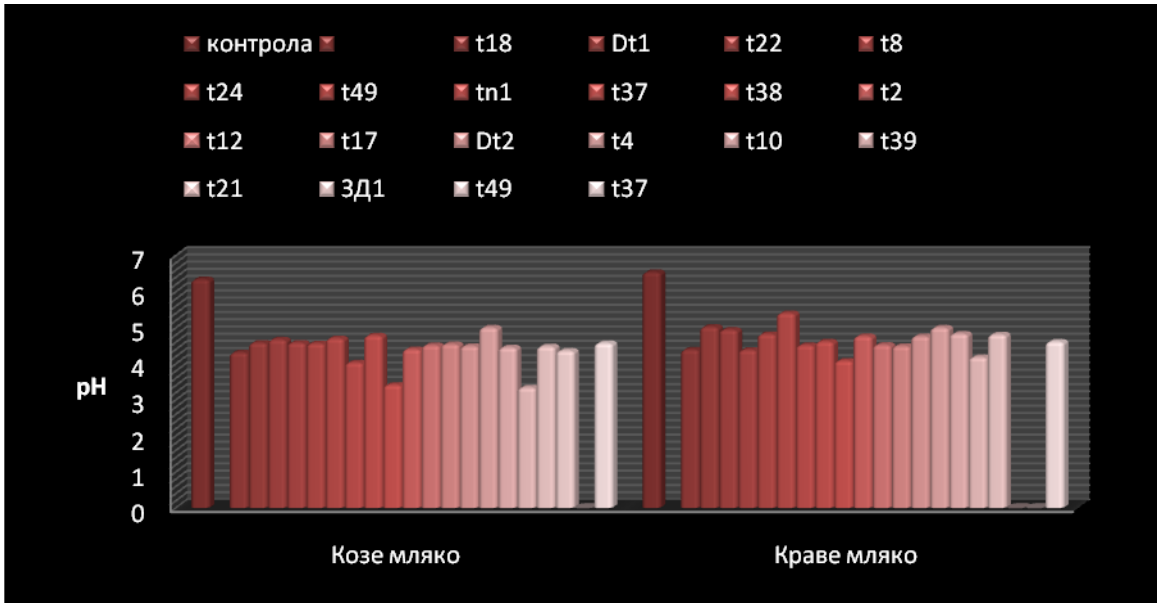
Изявената протеолитична активност на *L. helveticus* обуславя и по-висока степен на хидролиза на казеина, в сравнение с други видове. Тази характеристика прави щамовете от този вид особено интересни за приложение при производството на ферментирали млечни продукти с антихипертензивни и имуномодулаторни ефекти, а също и при

производството на сирена. Включването към стартерните култури на щамове с изявена протеолитична активност води до повишаване на хранителните и физиологични свойства на произвеждания млечен продукт.

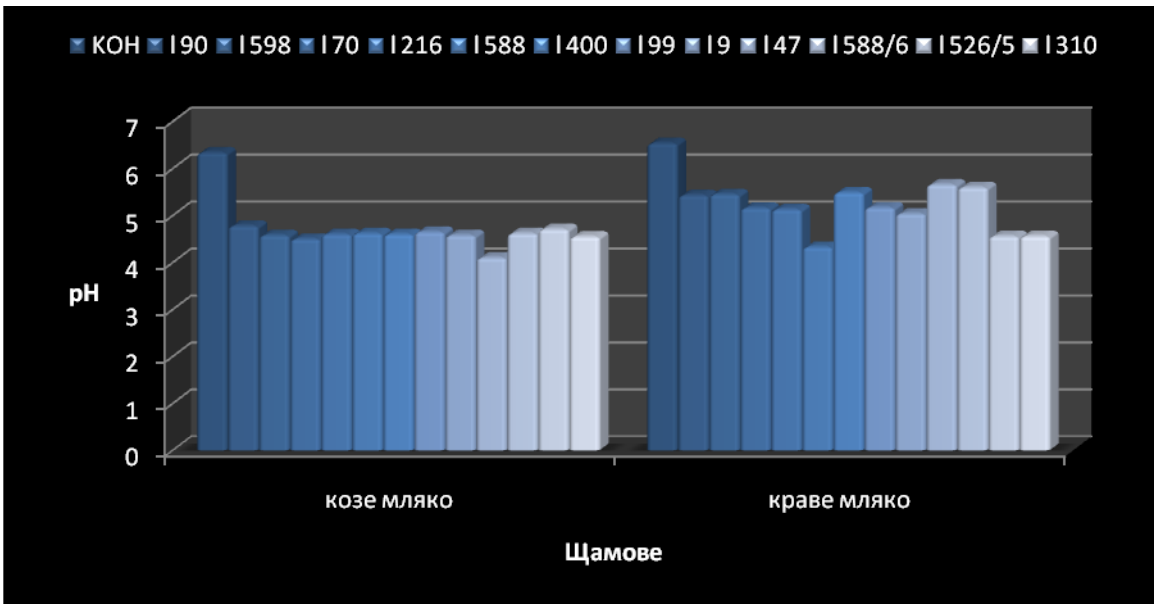
Беше изследвано киселинообразуването на изследваните щамовете в козе и краве мляко. Резултатите са представени на фиг. 16, 17 и 18.



Фиг. 16. Киселинообразуване на щамове от род *Lactobacillus* на краве и козе мляко след 20 часово инкубиране.



Фиг. 17. Киселинообразуване на щамове на *S. thermophilus* на краве и козе мляко след 20 часово инкубиране.



Фиг. 18. Киселинообразуване на щамове от род *Lactococcus* на краве и козе мляко след 20 часово инкубиране

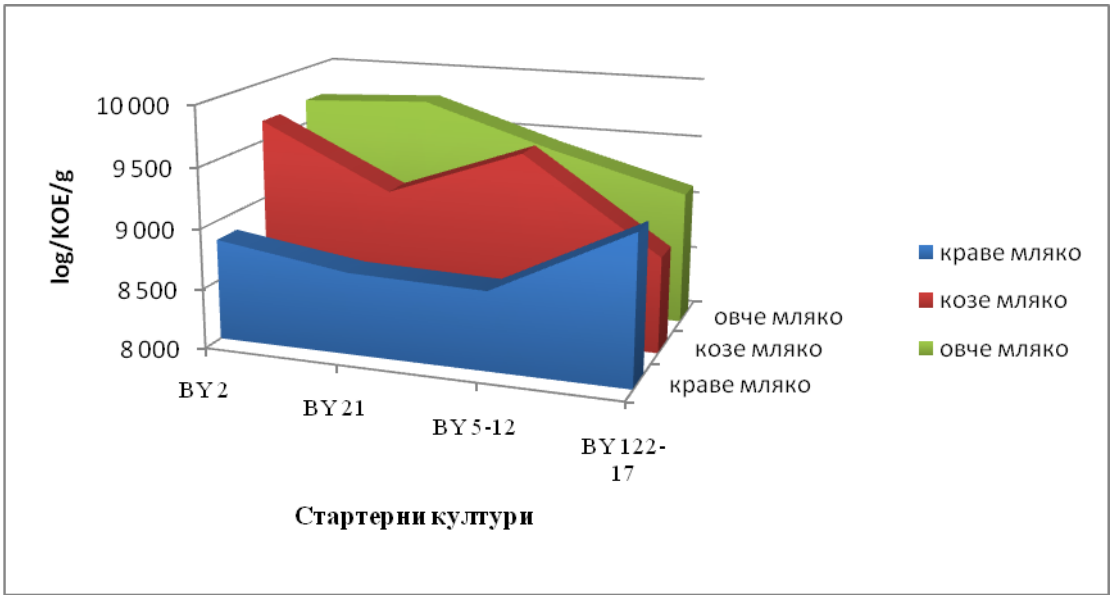
Фигурите показват, че щамовете от род *Lactobacillus* култивирани в козе мляко го подкисляват от pH 4,35 до 3,43. Същите култивирани в краве мляко го подкисляват от pH 4,27 до 3,85, като щам с най-силно киселинообразуване в този вид мляко беше определен b38. Най-силно подкислява козето мляко b24 от вида *L. bulgaricus* с pH-3,45. От вида *L. helveticus* най-силно киселинообразуване в козето мляко показа *h25* с pH - 3,43, като в кравето мляко същия щам показа също най-високо киселинообразуване pH 3,90. Щамовете *S. thermophilus* отглеждани в козе мляко на 20 час достигат pH 5,00 до 3,34. Същите отглеждани в краве мляко го подкисляват от pH 5,02 до 4,18. Най-силна киселинообразуваща способност в двата вида млека показа *S. thermophilus* t39. Щамовете от р. *Lactococcus* отглеждани в козе мляко го подкисляват от pH 4,78 до 4,10. Същите отглеждани в краве мляко го подкислиха от pH 5,66 до 4,33. В козето мляко най-силно киселинообразуване показа *L. lactis* l47 с pH-4,10, а в кравето мляко *L. lactis* l588 с pH – 4,33.

Киселинообразуващата способност на щамовете е важен параметър на ферментативния процес. Не прекомерното подкисляване на средата е предпочитано в производствения процес, тъй като се счита, че това осигурява по-хомогенна структура на коагулума и по-висока вискозност на крайния продукт при производството на различни видове ферментирали млечнокисели продукти.

Киселинообразуващата способност на отделните щамове при подбора им за стартерни култури за сирена е важен селекционен показател. Тя оказва влияние върху

зреенето на сиренето и формирането на вкусовите особености на крайния продукт. При подбора на сиренарски закваски е важно щамовете да са слаби киселинообразувачи, за да подържат определено време по-високо pH в резултат на което липолитичните ензими действат по-дълго време и се получава сирене с по-добър аромат.

Броят жизнеспособни клетки в една стартерна култура е показател за активността на стартерната култура и гарант за производствения процес. На фиг. 19 е показан броя на жизнеспособните клетки при четири избрани стартерни култури за кисело мляко култивирани в различни видове млека.



Фиг. 19. Сравнителен брой жизнеспособни клетки на стартерни култури за кисело мляко в различни видове млека.

Табл. 3. Киселинообразуване (pH) на стартерни култури за кисело мляко, при култивиране на козе и краве мляко (инкубирани на 43^0C с 2% инокулум за 3 часа).

Вид на млякото	BY 2	BY 21	BY 5-12	BY 122-17
Козе мляко	4,76	4,67	4,76	4,59
Краве мляко	4,55	4,45	4,56	4,34

В добре подбраните симбиотични закваски добре корелират помежду си показатели, като коагулираща способност, pH, протеолитична активност и антимикробна активност. При съчетаване на подбраните по всички показатели щамове в заквасните може да се наблюдава засилване или отслабване на един или друг производствено ценен

показател. Поради това проверката на горепосочените показатели е необходима не само за щамовете, но и за комбинациите.

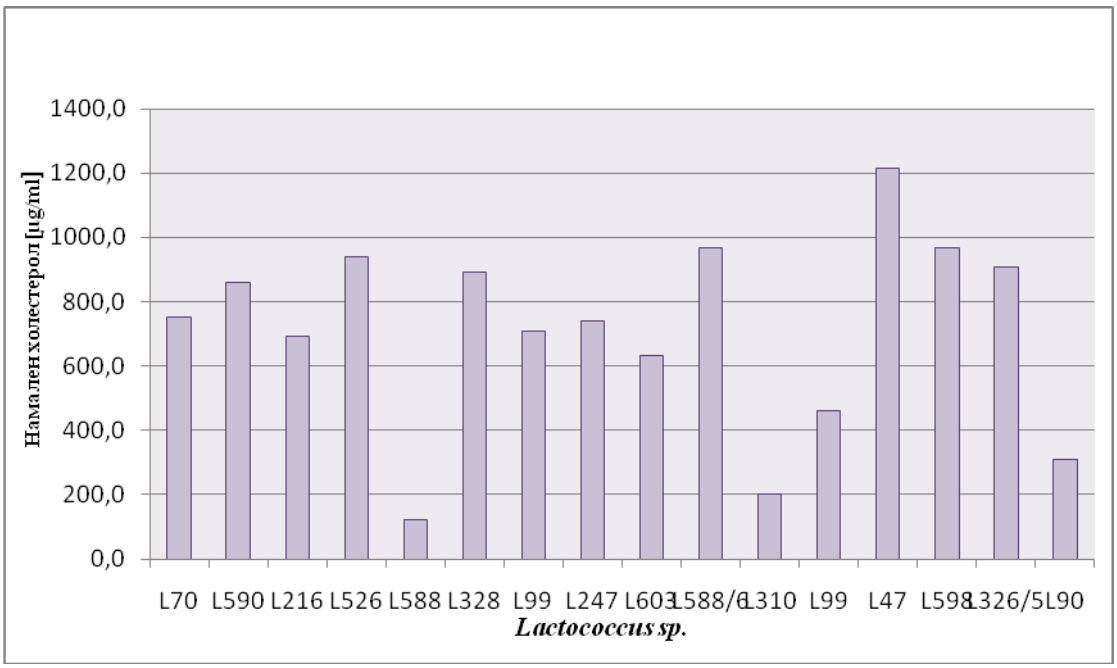
3. Определяне на антихолестеролната активност на млечнокиселите бактерии

Повишеният холестерол в серума при хората обикновено е рисков фактор, свързан с развитието на коронарна болест на сърцето. Сърдечно-съдовата болест е най-важната причина за смърт в западните страни и е силно свързана с хиперхолестеролемията. Намаляването на серумния холестерол, следователно, е много важно за предотвратяване на сърдечно-съдовите заболявания. Установено е, че дори минималното намаляване на серумния холестерол от 1 % , намалява риска от коронарна болест на сърцето с 2 до 3 %.

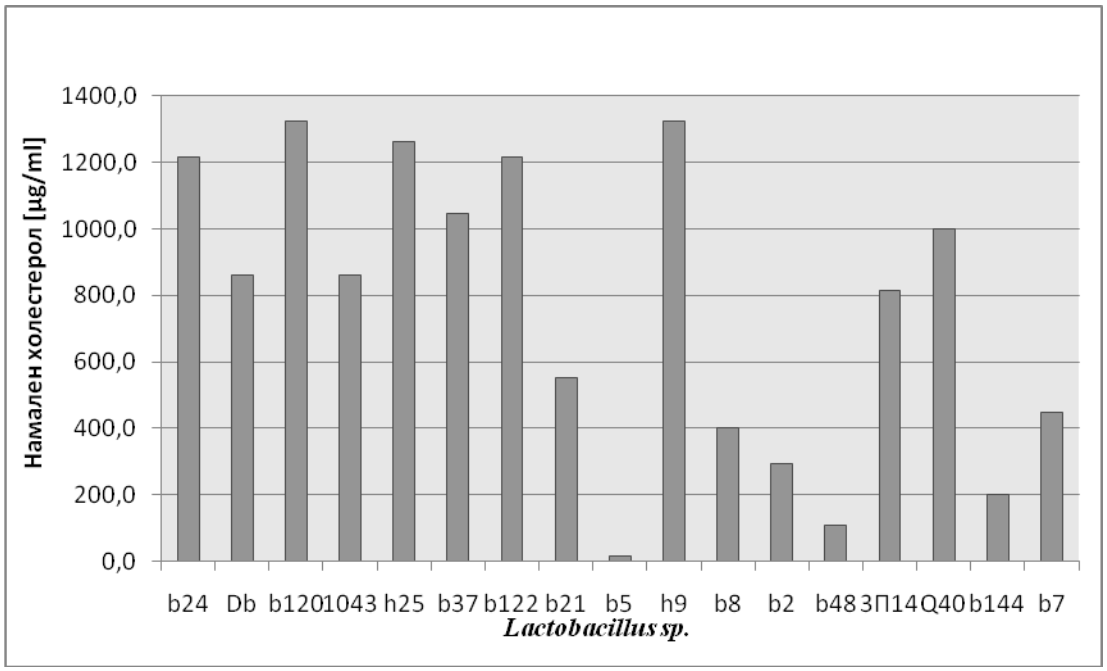
Антихолестеролният ефект на млечнокиселите бактерии (*LAB: Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus и Bifidobacterium*) е добре познат и е обект на проучвания от много изследователи. Последните години специално ударение се поставя върху ферментиралите продукти със специфични микроорганизми, притежаващи специфични диетични и терапевтични свойства (Hyeong-Jun Lim et al., 2004; Bouras A.D., 2006; Kimoto H. et al., 2002; Soomro A.H. et al., 2002).

Беше изследвана антихолестеролната активност на 50 щама млечнокисели бактерии. От тези щамове 17 принадлежаха към род *Lactobacillus,* като 12 от тях бяха щамове от вид *L. bulgarisus*, 4 от вид *L. heveticus* и 1 от вид *L. delbrueckii lactis*. Към вид *S. thermophilus* принадлежаха 18 от изследваните щамове. Към род *Lactococcus* се отнасяха 15 от щамовете, като 14 бяха от вид *L. lactis*, а 1 от вид *L. cremoris*.

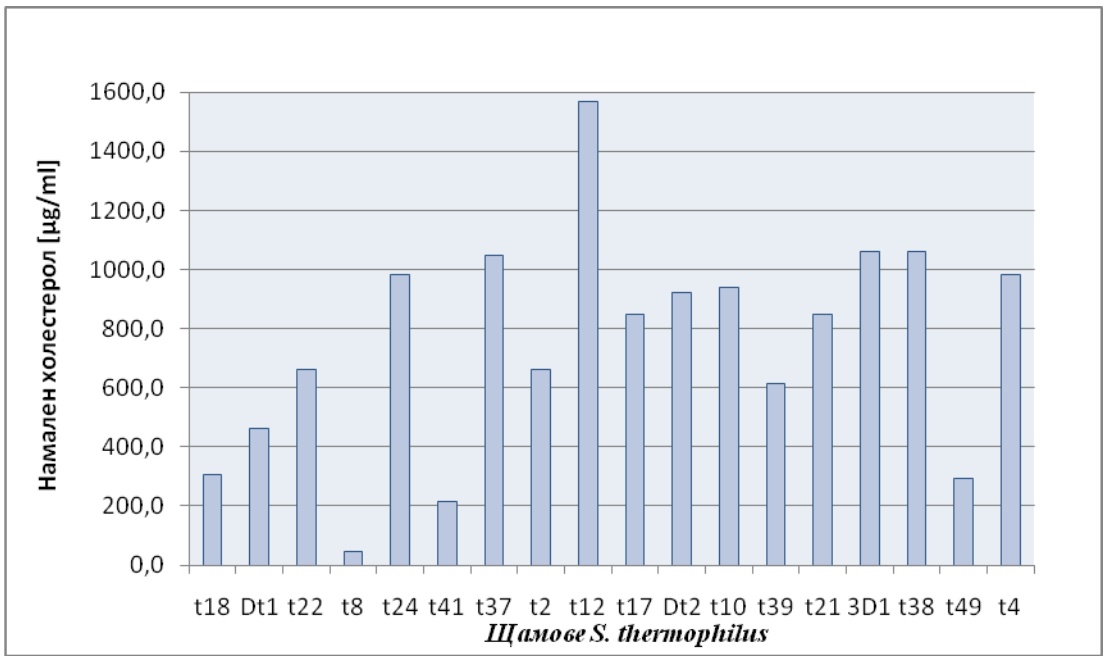
Резултатите получени при изследване на културите за антихолестеролна активност са представени на Фиг. 20 (А, Б, В).


1400,0
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
Намален холестерол [µg/ml]
L70 L590 L216 L526 L588 L328 L99 L247 L603 L588/6 L310 L99 L47 L598 L326/5 L90
Lactococcus sp.

А


1400,0
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
Намален холестерол [µg/ml]
b24 Db b120 1043 h25 b37 b122 b21 b5 h9 b8 b2 b48 3П14 Q40 b144 b7
Lactobacillus sp.

Б



В

Фиг. 20. Намаляване на холестерола в растежната среда от различни видове млечнокисели бактерии (А, Б, В).

От получените резултати е видно, че при изследваните 15 щама *Lactococcus* 11 бяха намалили повече от 50% от холестерола в средата. Тези щамове бяха *L. lactis* l70, l590, l216, l526, l328, l99, l247, l603, l588/6, l598, l326/5. Установено беше, че 5 щама лактококи бяха намалили от 50 до 80% от холестерола в растежната среда. Тези щамове бяха l526, l328, l588/6, l598 и l326/5. Най–силно изразена способност за намаляване на холестерола беше наблюдавана при *L. lactis* l598, който беше намалил 90% от холестерола в средата. Само при 2 от изследваните 15 щама *Lactococcus* - *L. lactis* l588 и l310 намаления холестерол беше под 20%. Най–слабо изразена способност за намаляване на холестерола беше наблюдавана при *L. lactis* l588, които беше редуцирал само 7% холестерол (Фиг. 20 А).

От изследваните 17 щама лактобацили от род *Lactobacillus* 5 щама бяха намалили повече от 60% от холестерола в средата. Най–силна антихолестеролна активност проявиха два щама от род *Lactobacillus*, които редуцираха 66% от холестерола в средата. Тези щамове бяха *L. bulgaricus* b120 и *L. helveticus* h9. Малко по-слаба редуцираща способност беше проявил *L. bulgaricus* b24, който беше намалил 63% от холестерола. Малко по-слаба антихолестеролна активност от него бяха проявили *L. bulgaricus* b122 и *L. helveticus* h25. Те намалиха 61% от холестерола в растежната среда. Това количество намален холестерол е много по–малко от количеството намален холестерол от лактококите. При 6 от 12-те

щама *L. bulgaricus* намаления холестерол беше под 25%, при три щама *L. bulgaricus* беше от 25% до 40%, докато при всички щамове *L. helveticus* и *L. lactis* количеството намален холестерол беше над 40% (Фиг. 20 Б).

Беше изследвана антихолестеролната активност на 18 щама *S. thermophilus.* От тях 8 щама намаляват над 40% от холестерола в средата. Тези щамове бяха *S. thermophilus* t24, t37, t12, Dt2, t10, t3Д1, t38 и t4. Най–голяма антихолестеролна активност прояви *S. thermophilus* t12, който намалява 73% от холестерола в средата. Най–слаба способност за намаляване на холестерола проявиха *S. thermophilus* t8 и t49 в резултат на което беше стигнато до заключението, че тези два щама не проявяват антихолестеролна активност (Фиг. 20 В).

Изследваните от нас щамове проявиха много висока антихолестеролна активност. От трите групи млечнокисели бактерии, щамовете от род *Lactococcus* проявиха най–силна антихолестролната активност, тази активност е по–слабо изразена при щамовете от род *Lactobacillus* и е най–слаба при щамовете от вид *S. thermophilus*.

Подобно изпитване за понижаване нивото на холестерол от различни видове МКБ е проведено от Hyeong-Jun Lim et al., 2004. От изследваните щамове от род *Streptococcus*, един щам понижава 57% от холестерола в MRS бульон не съдържащ жлъчни соли и 49,4% в MRS бульон, съдържащ 0,3% жлъчни соли (оксгал). Осем щама *Lactobacillus* понижават нивото на холестерола повече от 50% в MRS бульон без значение дали присъстват или не жлъчни соли.

Киселото мляко е един от най–старите пробиотици, използвани от човека. По време на млечнокиселата ферментация микроорганизмите *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* предизвикват дълбоки промени в състава на млякото. Получават се биологично активни съставки, които оказват благотворно влияние и редица здравословни ефекти върху организма. В резултат на проведеното от нас изследване върху способността за намаляване на холестерола от растежната среда от различни щамове млечнокисели бактерии беше установено, че при повечето от изследваните щамове антихолестеролната активност е много висока. С оглед на тези факти можем да направим заключение, че в киселото мляко способността за намаляване на холестерола, проявена от *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* е сумирана.

4. Формиране на нискомолекулни пептиди от монокултури и стартерни култури при култивирането им в козе мляко

Биоактивните пептиди се получават от всички видове казеини (α_S-, β-, и к- казеин) и от суроватъчните протеини (β-лактоглобулин, α-лакталбумин, серумен албумин, имуноглобулини, лактоферин).

С цел да се проследи евентуалното образуване на биологично активни пептиди от тестваните щамове, суроватъчната фракция, получена след 24 часово култивиране на щамовете и стартерните култури в обезмаслено козе мляко беше анализирана електрофоретично на Tris-Tricine PAGE**.** Резултатите от електрофоретичния анализ са представени на Фиг. 21.

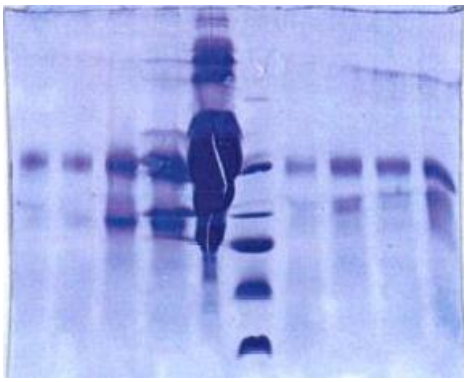
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Легенда

Пътеки:
1 – *L. delbrueckii lactis 1043;*
2 – Стартерна култура за кисело мляко BY 2;
3 – *S. thermophilus* t 2;
4 – *L. bulgaricus b* 2;
5 – козе мляко;
6 – Маркер;
7 – Стартерна култура за сирене С 310-40;
8 – *L. lactis l 310*;
9 – *L. helveticus* Q 40;
10 – *L. bulgaricus* b 48.

А)

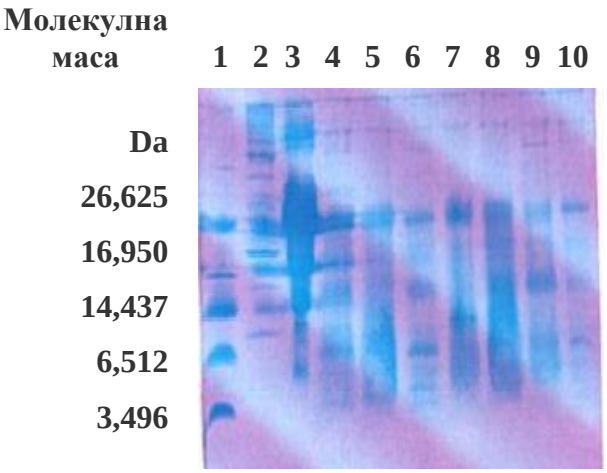
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Легенда

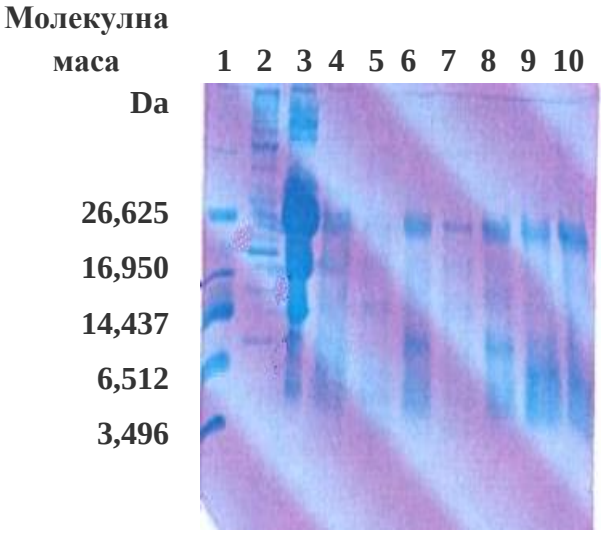
Пътеки:
1 – Стартерна култура за кисело мляко BY D4;
2 – *L. bulgaricus* b D4;
3 – *S. thermophilus* t D1;
4 – *S. thermophilus* D t2;
5 – козе мляко;
6 – Маркер;
7 – *L. bulgaricus* b 5;
8 – *S. thermophilus* t 12;
9 – Стартерна култура за кисело мляко BY 5-12;
10 – *S. salivarius* sal 1.

Б)



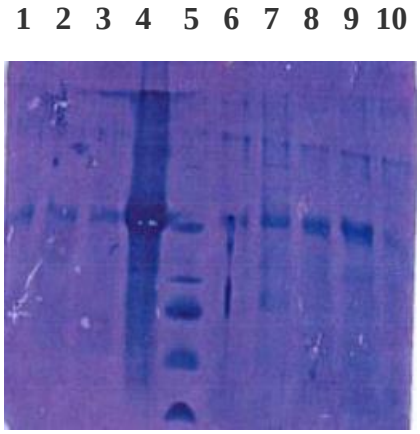
Легенда
Пътеки:
1 – Маркер;
2 – Маркер 1;
3 – козе мляко
4 – Стартерна култура за кисело мляко BY 21;
5 – *L. bulgaricus* b 21;
6 – *S. thermophilus* t 21;
7 – Стартерна култура за кашкавал YC-1;
8 – *L. helveticus* h 3П14;
9 – *S. thermophilus* t 3D1;
10 – *L. helveticus* h 9.

В)



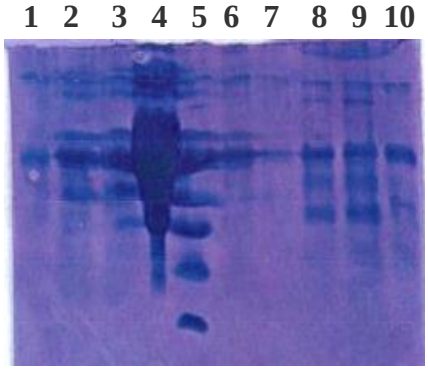
Легенда
Пътеки:
1 – Маркер
2 – Маркер 1;
3 – козе мляко;
4 – Стартерна култура за сирене С-2;
5 – *L. bulgaricus* b 38;
6 – *S. thermophilus* t 37;
7 – *L. helveticus* Q 40;
8 – *S. thermophilus* t D1;
9 – Стартерна култура за кисело мляко BY 145-18;
10 – *L. bulgaricus* b 48.

Г)



Легенда
Пътеки:
1 – Стартерна култура за кисело мляко 144-12;
2 – *L. bulgaricus* b 144;
3 – *S. thermophilus* t 12;
4 – козе мляко;
5 – Маркер;
6 – Стартерна култура за кисело мляко BY 24;
7 – *L. bulgaricus* b 24;
8 – *S. thermophilus* t 24;
9 – *L. helveticus* h 7;
10 – *L. bulgaricus* b 7.

Д)



Легенда:
Пътеки:
1 – Стартерна култура за кисело мляко BY 122-17;
2 – *L. bulgaricus* b 122;
3 – *S. thermophilus* t 17;
4 – козе мляко;
5 – Маркер
6 – *L. bulgaricus* b 208;
7 – *L. helveticus* h 4;
8 – *L. helveticus* h 9;
9 – *L. helveticus* h 25;
10 – *L. lactis* l 588.

Е)

Фиг. 21. Tris-Tricine PAGE на суроватъчни фракции, получени след 24 часа култивиране на тестваните щамове и стартерни култури в обезмаслено козе мляко. (А, Б, В, Г, Д, Е)

Резултатите получени от трис-трициновата електрофореза на суроватъчната фракция показват формиране на нискомолекулни белтъчни фрагменти с по- хидрофилна природа, отколкото белтъците представени в контролата (суроватка от козе мляко получена без култивиране на щамове). Проявената антибактериална активност на суроватката получена след култивирането на бактериите в козето мляко, води до заключението, че тази активност се дължи на образуваните белтъци в резултат на протеолитичната активност от страна на тестваните щамове. Все още остава открит въпроса за природата на новообразуваните пептиди.

Получените резултати свидетелстват, че при култивиране на изследваните щамове и стартерни култури в обезмаслено козе мляко бяха намерени нискомолекулни белтъчни фрагменти с молекулна маса между 5-17 кDa (Фиг. 22). Електрофоретичния анализ показва, че белтъци с най-висока електрофоретична подвижност са пептиди с молекулна маса 4-5 kDa. Щамовете млечнокисели бактерии при които са установени белтъчни фрагменти с ниска молекулна маса са следните : *S. thermophilus - t2* - 5 кDa, *S. thermophilus t3D1* - 4 kDa, *S. thermophilus t37vd* - 5 kDa, *S. thermophilus tD1*- 6,5 kDa, *L. helveticus* h9 - 5 kDa.

Ниско молекулни фрагменти бяха намерени при следните стартерните култури: стартерна култура за кисело мляко *BY 21* - 14 кDa, 5 кDa, стартерна култура за сирене *C-1* – 14 кDa и стартерна култура за кашкавал *YC-1* – 10 кDa.

Биоактивни пептиди могат да бъдат генерирани от стартерни бактерии използвани в производството на ферментирали млечни продукти и нестартерни бактерии. Биоактивни пептиди могат да се освободят от млечни протеини не само с помощта на живи микроорганизми, но и като се приложат протеолитични ензими, изолирани от млечнокисели бактерии (Nagpal R., et al., 2011).

Най-добре изучени са протеолитичните свойства на млечнокиселите бактерии. Тези бактерии първоначално използват извънклетъчна протеиназа, за да разделят интактния млечен протеин казеин на олигопептиди с различна дължина. Извършени изследвания показват, че млечнокиселите протеинази на *Lactococcus sp.* и *Lactobacillus sp*. например могат да хидролизират повече от 40% от пептидните връзки на α_{s1}-CN и β-CN, което води до образуването на повече от 100 различни олигопептида. Следващата стъпка от протеолитичния път на МКБ е разграждане на олигопептидите до пептиди. По-дългите от тези олигопептиди могат да съдържат биоактивни пептиди. За разграждането на олигопептиди МКБ използват вътреклетъчни пептидази, включително ендопептидази, аминопептидази, трипептидази и дипептидази. Някои от пробиотичните свойства на щамове млечнокисели бактерии са свързани именно с възможността им да образуват биоактивни пептиди.

Установено е, че протеолитичните МКБ продуцират по-голямо разнообразие от млечни антимикробни пептиди, отколкото продуцираните пептиди от храносмилателните протеази. При прекалено силна протеолитична активност се стига до допълнително разграждане на антимикробните пептиди до по-малки, неактивни фрагменти веднага щом антимикробните пептиди бъдат освободени от прекурсорните молекули. Друго предимство на протеолитичните МКБ е, че могат да се използват специфични бактериоцин-продуциращи щамове МКБ, които също така да могат да генерират антимикробни пептиди в храните.

Механизмът на действие на антимикробните пептиди, получени от млечни протеини, все още не е добре изучен. Причината е, че поради разнообразието в своя аминокиселинен състав, структура и физико-химични характеристики, антимикробните пептиди влияят по различен начин на чувствителните бактерии. Все пак е установено, че антимикробните пептиди въздействат предимно върху плазмената мембрана на бактериите, чрез създаването на електростатична връзка между пептидът и компонентите на плазмената мембрана. Електростатичното свързване е възможно единствено, ако хидрофобните и хидрофилни участъци на пептида са пространствено организирани в амфипатична форма т.е хидрофобните участъци са разположени от едната страна, а хидрофилниите участъци – от противоположната страна. В такава структура,

хидрофобните фрагменти взаимодействат с липидите на мембраната, докато хидрофилните фрагменти взаимодействат с отрицателно заредените фосфатни групи по вътрешната страна на мембраната (Fitzgerald R.J., B.A. Murray, 2006; Marshall S.H., G. Arenas, 2003; Muro Urista C., et al., 2011).

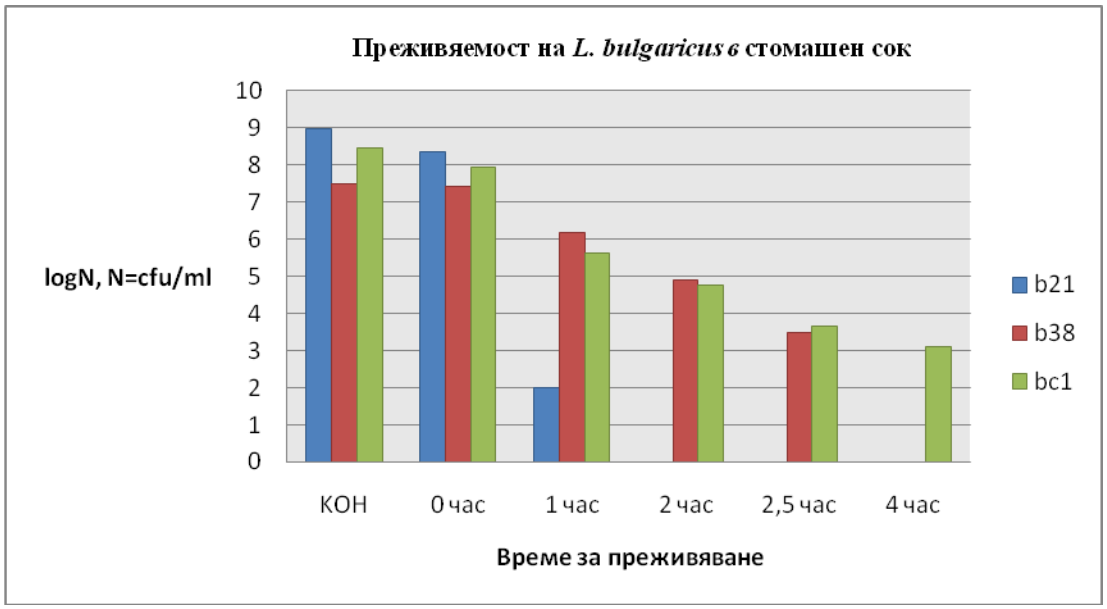
5. Определяне *in vitro* способността на избрани производствено значими щамове да преживяват в условия, симулиращи различни отдели на гастроинтестиналния тракт

Бактериите се намират по цялата храносмилателна система. Чревната екосистема е съставена от три съставки – клетки на индивида, бактерийни клетки и хранителни съставки. Тези три съставки са в непрекъснат контакт и се намират в сложни взаимоотношения.

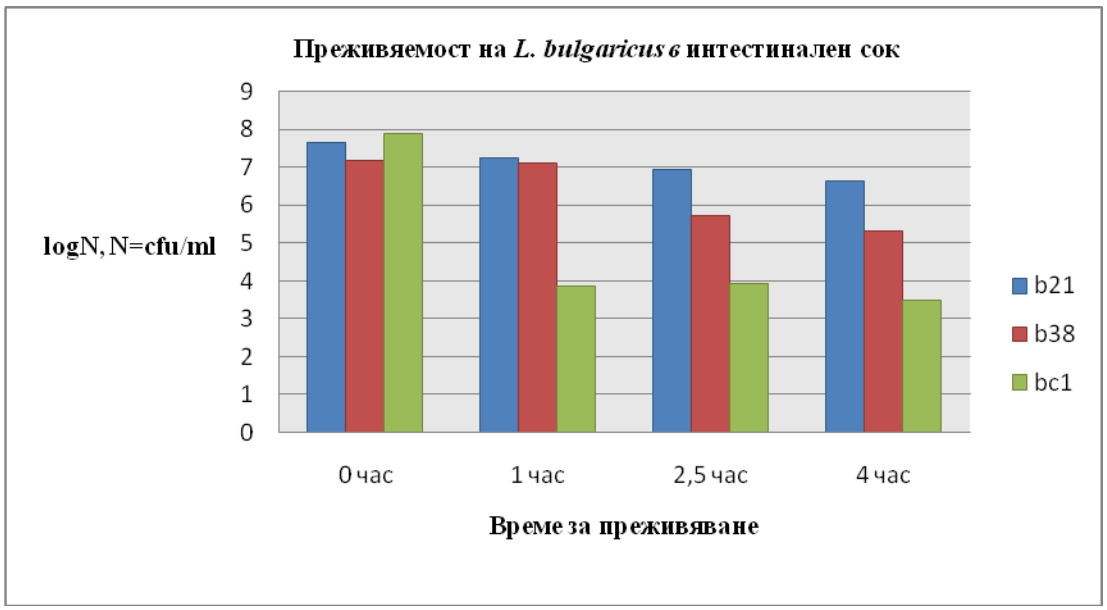
Пробиотичния ефект при бактериите зависи от броят на преживелите в стомаха и тънките черва бактерийни клетки и постъпилите в дебелото черво. При нормални условия времето за преминаване на храната през стомашно-чревния тракт при човека е от 55 до 72 часа. Храната преминава бързо през стомаха за 1,5 до 2 часа, а през цекума за 4-6 часа. Смляната храна в дебелото черво създава условия за колонизирането на голям брой бактерии. Тук протича бурно метаболитната дейност на микроорганизмите и дебелото черво изпълнява ролята на биологичен реактор в организма на човека. Храносмилателните сокове в стомашно-чревния тракт на бозайниците представляват сериозна бариера за навлизането на микроорганизми. При избора на пробиотични бактерии, които се включват, като компоненти на функционалните храни се изисква те да са устойчиви на въздействията на различните отдели на ГИТ (Salminem, Bouley et al., 1998). Навлезлите в стомашно-чревния тракт бактерии с храната попадат първо в стомаха в условията на ниски стойности на pH и в присъствието на пепсин. След това заедно с разградената храна се отправят в тънките черва, където концентрацията на жлъчни киселини достига до 0,3% и преминават към дебелото черво, където стойностите на pH са неутрални. Тези, които оцеляват при екстремните условия в стомаха, след това са подложени на стрес в тънките черва, причинени от жлъчните и панкреатични сокове и само преживелите достигат дебелото черво и колонизират мукозните повърхности (Naidu et al, 1999).

Проведено бе изследване на способността на 11 избрани щама (3 - *L. bulgaricus, 5 – S. thermophilus, 2 – L. helveticus* и *1- L. lactis lactis*) влизащи в състава на сиренарски закваски да преживяват в различни отдели на храносмилателния тракт при симулирани

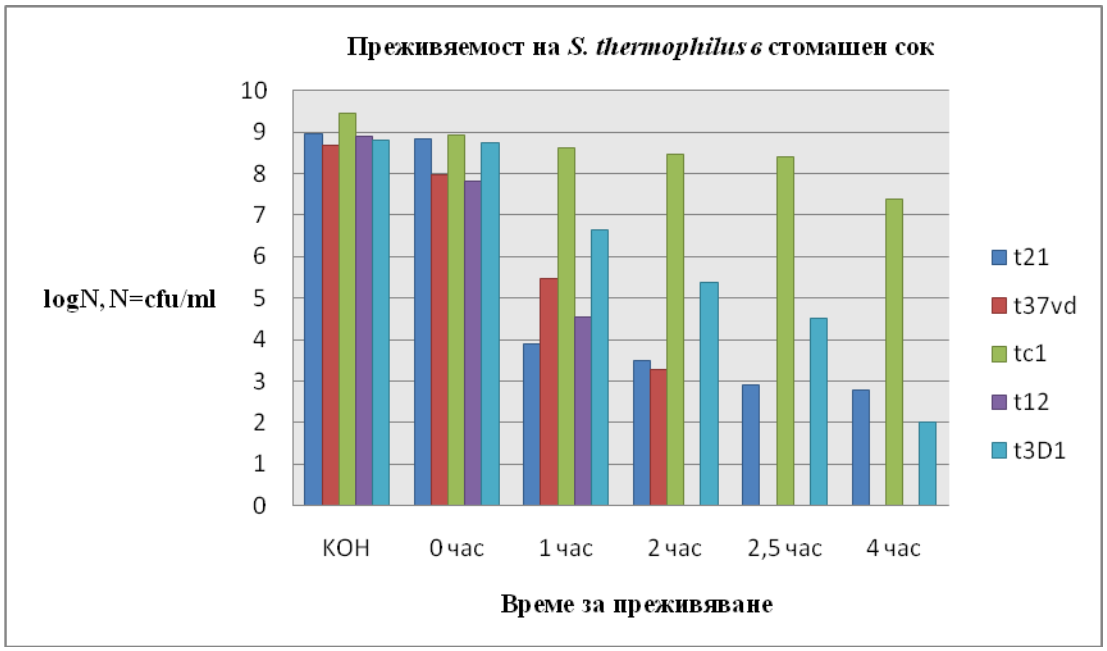
условия *in vitro*. При използваната методика, подобие на условията в горните отдели на храносмилателната система е постигнато, чрез съвместно въздействие на ниски стойности на pH и пепсин. *In vitro* симулацията на условията в тънките черва е проведена при неутрални стойности на pH, без да се отчита въздействието на перисталтиката. Щамовете бяха култивирани в хранителна среда MRS бульон. Получените резултати са показани на Фиг. 22.



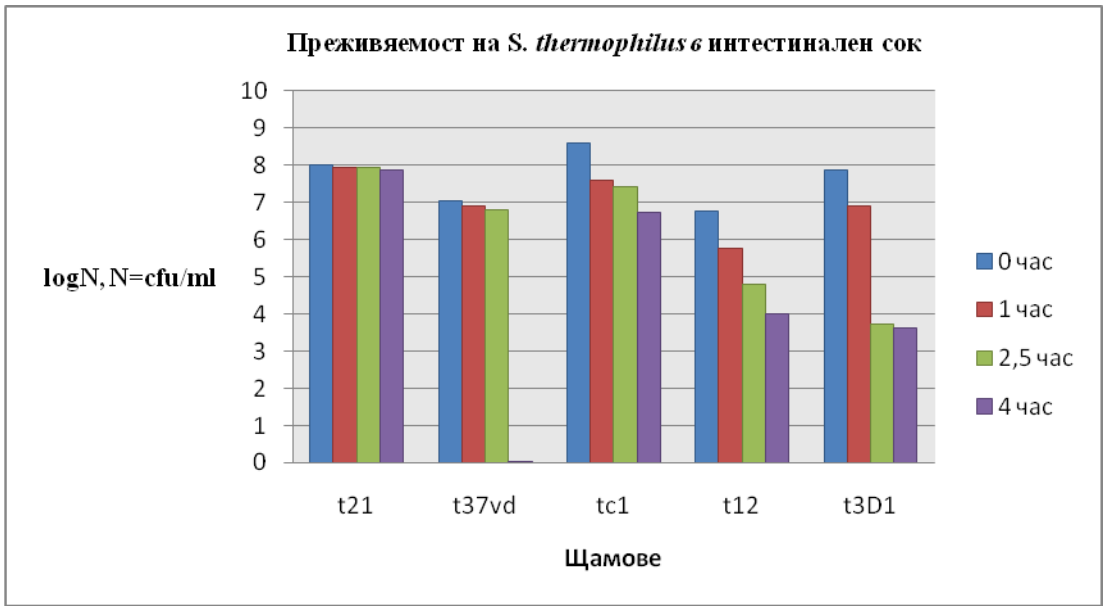
А



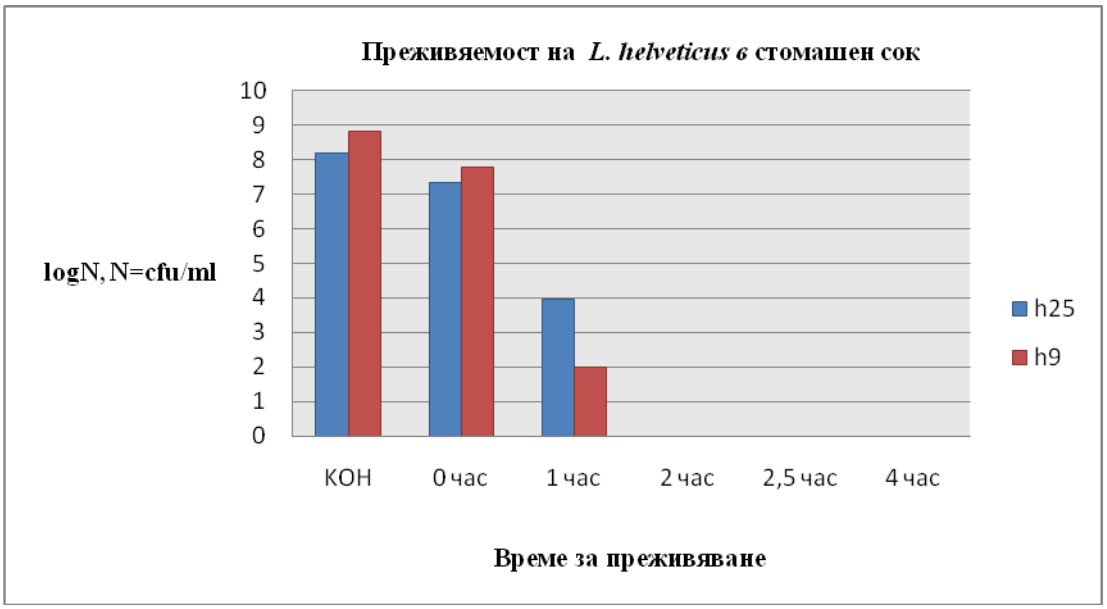
Б


Преживяемост на S. thermophilus в стомашен сок
logN, N=cfu/ml
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
КОН
0 час
1 час
2 час
2,5 час
4 час
Време за преживяване
t21
t37vd
tc1
t12
t3D1

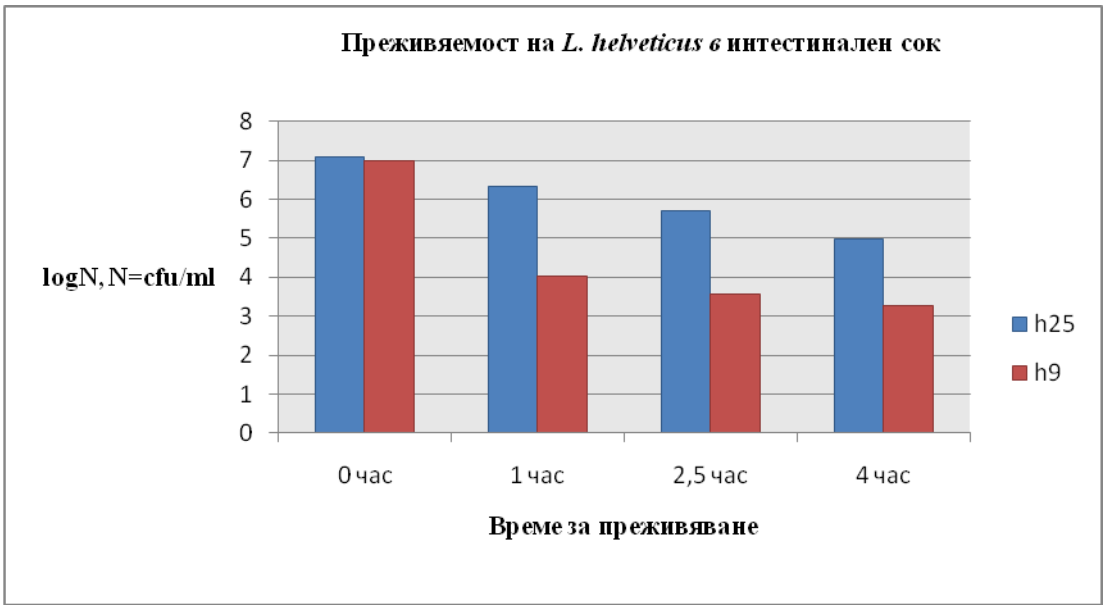
В


Преживяемост на S. thermophilus в интестинален сок
logN, N=cfu/ml
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
t21
t37vd
tc1
t12
t3D1
Щамове
0 час
1 час
2,5 час
4 час

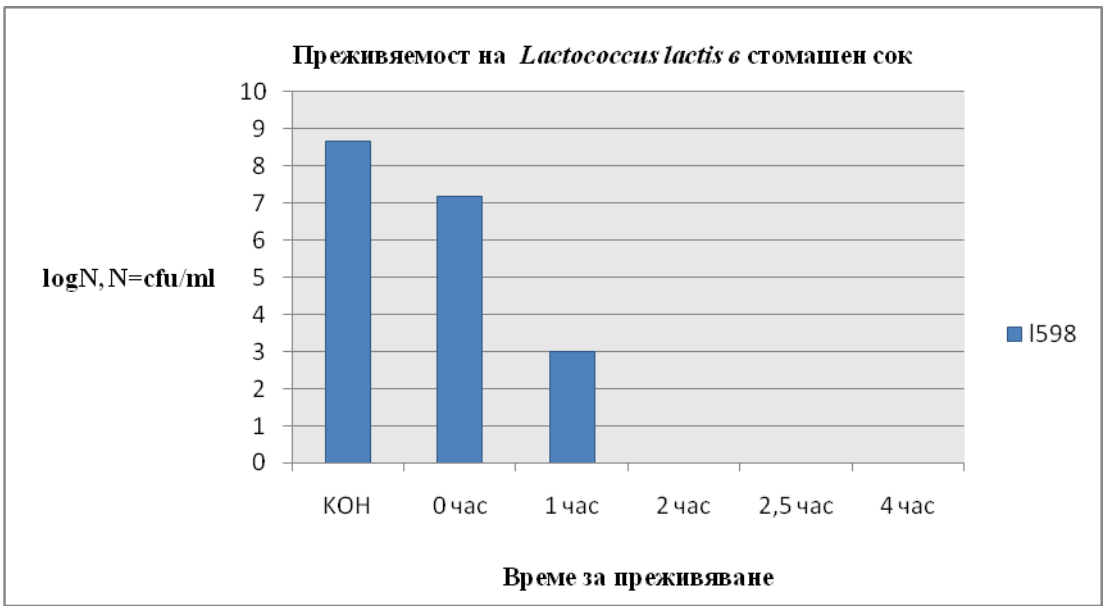
Г


Преживяемост на L. helveticus в стомашен сок
logN, N=cfu/ml
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
КОН
0 час
1 час
2 час
2,5 час
4 час
h25
h9
Време за преживяване

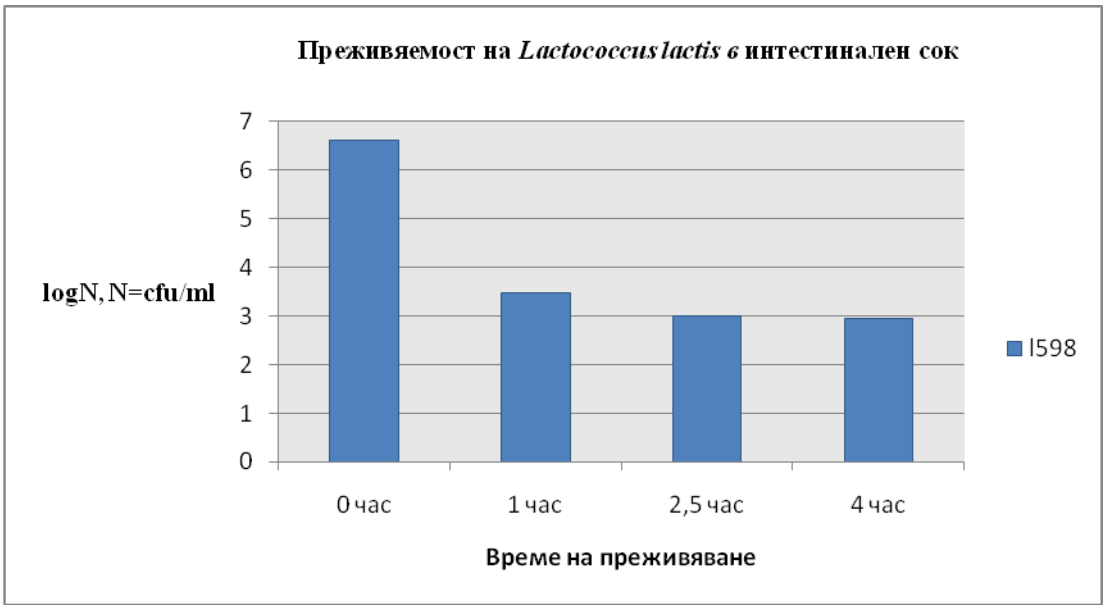
Д


Преживяемост на L. helveticus в интестинален сок
logN, N=cfu/ml
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0 час
1 час
2,5 час
4 час
h25
h9
Време за преживяване

Е



Ж



З

Фиг. 22. Преживяемост на млечнокисели бактерии при симулирани условия на различни отдели на ГИТ (А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З).

На базата на получените резултати е необходимо да се отбележи, че от групата на *L. bulgaricus* единствено клетките на щам *L. bulgaricus* bc1 преживяват до 4-я час в стомашен сок. Всички *L. bulgaricus* са чувствителни към киселото pH и пепсин. *L. bulgaricus* b21 показва най-добра преживяемост в интестинален сок, като намалява концентрацията на жизнеспособните си клетки с една логаритмична единица. Изследванията показват, че не всички щамове *L. bulgaricus* устояват на високата

киселинност в стомаха и действието на жлъчните киселини в дуоденома. Преживяемостта на *L. bulgaricus* към киселинния и протеолитичен стрес в храносмилателната система може да се увеличи значително, чрез защитното действие на съставките на млякото (Чомаков, 2007).

S. thermophilus показаха най-голяма устойчивост в стомашен сок. От всички изследвани щамове от вида *S. thermophilus, S. thermophilus* tc1 преживя до 4-я час. Всички изследвани култури показаха висока степен на преживяемост в интестинален сок, при неутрално pH. При щамове *S. thermophilus* t21 и tc1 логаритъма от КОЕ/мл намалява с по-малко от 1 единица до 4-я час.

При изпитването на щамове от *L. helveticus* всички изгубиха жизнеспособността си след 1 час в стомашен сок. Към интестиналния сок същите щамове показаха толеранс и добра преживяемост до 4-я час, като и в двата сока по-висока концентрация на жизнеспособните клетки показа *L. helveticus* h25. В свои изследвания Denkova et al. (2007) установяват, че щам от вида *L. helveticus* намалява броя на жизнеспособните клетки с четири логаритмични единици в условията на ниско pH и пепсин при продължителност на въздействието 4 часа, а е значително по-резистентен при неутрално pH и в присъствието на пепсин.

При изпитването на способността за преживяемост на щам *L. lactis lactis* за в симулирани условия на ГИТ същия отмира след инкубация повече от 1 час в стомашен сок, като за 1 час концентрацията на жизнеспособните му клетки намалява с 5,5 логаритмични единици. При изпитването на същия щам за преживяемост в интестинален сок, щама прояви по-добра резистентност и преживя до 4-я час, макар и със силно намален брой жизнеспособни клетки.

След направения анализ от проведените изследвания за поносимост на млечнокиселите бактерии към симулирани условия в различни отдели на ГИТ можем да направим извода, че щамовете са много чувствителни към pH 2,0, особено представителите на *p. Lactobacillus.* Прави впечатление по-високата толерантност към ниско pH на представителите на *S. thermophilus.*

Получените резултати потвърждават данните в литературата изнесени от други автори (Both E. et al., 2010, Marteau, P. et al., 1997; Бойчева С., 2008; Movsesyan I. et al., 2010).

Броят на *L. bulgaricus* и *S. thermophilus*, които преживяват в стомашно-чревния тракт е много по-голям, когато се приемат под формата на йогурт (Pochart P. et al., 1989). В последно време сиренето се приема за идеален преносител на пробиотични бактерии в храносмилателната система на човека. Резултатите от моето изследване за преживяемост

на щамовете млечнокисели бактерии влизащи в състава на сиренарски закваски подкрепят добрия подбор на щамовете и възможността за по-добрата преживяемост на щамовете, ако се приемат във формата на кисело мляко и/или сирене.

Въпреки, че pH на стомаха може да бъде по-ниско и от 2,0 запазването на жизнеспособността на лактобацилите след 3 часа на въздействие може да се счита за задоволителен критерий при предварителен подбор на потенциални пробиотични щамове (Georgieva et al., 2009).

За да проявят полезните си свойства щамовете трябва да могат да преодолеят физичните и химични бариери на гастроинтестиналния тракт, особено киселинния стрес и въздействието на жлъчните соли (Георгиева Н. и С. Данова, 2013).

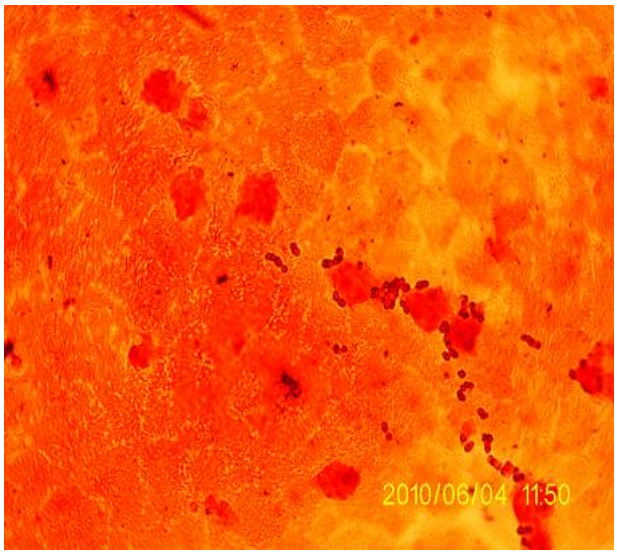
Млечнокиселите бактерии играят важна роля в поддържане здравето на индивида. Те, освен че служат за бариера срещу патогенните бактерии в чревния тракт, подобряват и средата за развитие на полезните за организма бактерии.

6. Определяне на адхезивните способности на избрани млечнокисели бактерии при *in vitro* условия

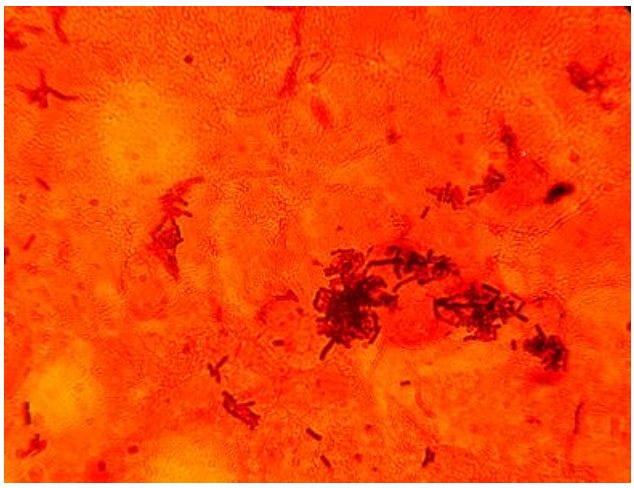
Освен преживяемостта, основен показател за здравословния ефект на пробиотика върху организма е способността му за адхезия към чревната мукоза, която стимулира имунната система. Адхезията на пробиотичните щамове към интестинални повърхности и последваща колонизация на човешкия ГИТ е важна предпоставка за действието на пробиотика. Адхезиращите щамове на пробиотичните бактерии вероятно пребивават по-дълго време в интестиналния тракт и поради тази причина имат по-добри възможности да проявят метаболитни и имуномодулаторни ефекти от неадхезиращите щамове. Адхезията към епитела на вътрешните органи обхваща и способността за колонизация на стомашно-чревния и уро-гениталния тракт и е важна характеристика за пробиотичните щамове (Георгиева Н. и С. Данова, 2013).

Подбрани са шест производствено значими щамове *L. bulgaricus* b21, *S. thermophilus* t21, *L. bulgaricus* b24, *S. thermophilus* t24, *L. helveticus h*3П14, *L. bulgaricus* b120 и е изследвана способността им да адхезират към епителна клетъчна линия Caco–2. След инокулирането на монослоевете, те бяха инкубирани за 1 час при 37°C. Инокулацията беше извършена с всеки един от изследваните щамове с концентрация 10^8 КОЕ/мл. След изтичане на инкубационното време плаките се промиваха с PBS буфер за отстраняване на незалепените клетки и бяха оцветени по Грам. Наличието на адхезирали

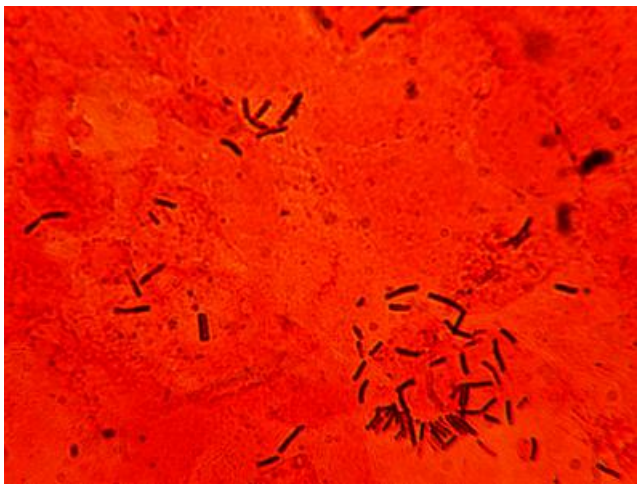
клетки беше отчитано микроскопски. Броят на адхезиралите бактериални клетки към Caco–2 клетките беше отчетено, чрез визуално изброяване на адхезиралите клетки в 20 произволно избрани полета. Адхезивните способности на изследваните щамове беше изразена, като брой адхезирали бактерии на 1 епителна клетка. Фигура 23 показва микроскопски снимки на адхезията на *L. bulgaricus* b21, *S. thermophilus* t24 и *L. helveticus h*3П14 към епителни клетки след оцветяване по Грам.



А)



Б)



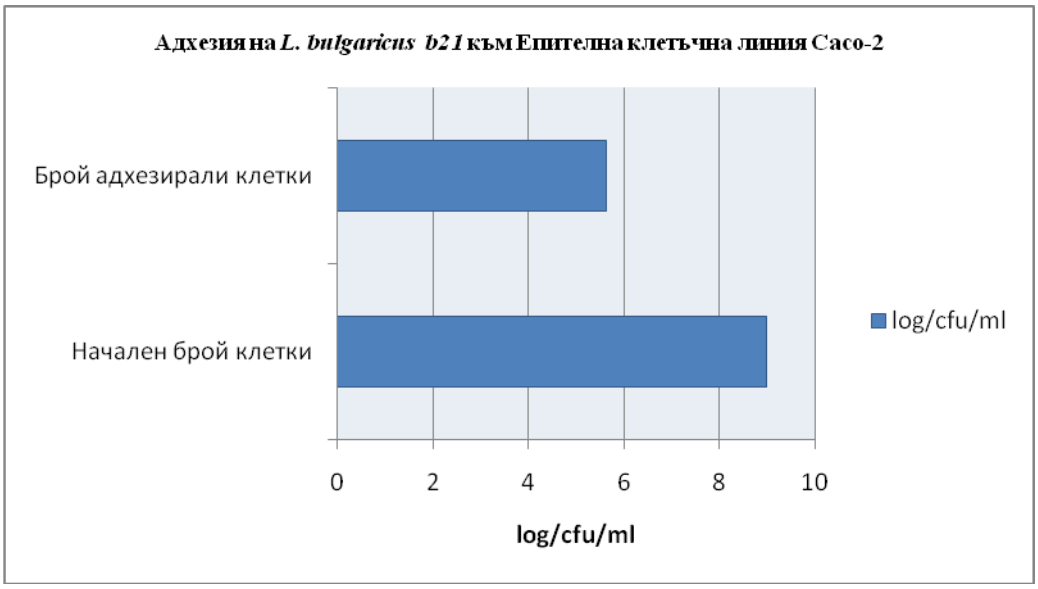
В)

Фиг. 23. Микроскопски препарати на адхезия на МКБ към Епителна клетъчна линия Caco–2: А) - *S. thermophilus* t24, Б) - *L. bulgaricus* b21, В) - *L. helveticus* h3П14

Трите щама показват умерено адхезивни способности *in vitro* към епителните клетки на Caco–2 клетъчната линия. Адхезивния капацитет на *L. bulgaricus* b21 е средно по 40 бактериални клетки/1 епителна клетка, адхезивният капацитет на *L. helveticus h*3П14

е средно по 46 бактериални клетки/1 епителна клетка, а на *S. thermophilus* t24 - 6 бактериални клетки/1 епителна клетка. Останалите щамове, участващи в изпитването не показаха адхезивни способности, като при щам *L. bulgaricus* b120 наблюдавахме липса на всякакво прилепване на бактериални клетки към епителните клетки. Някои изследователи считат, че за пробиотичните щамове адхезията не е задължително условие, за да проявят своя пробиотичен ефект. Добре е, обаче микроорганизмите да проявяват признаци на колонизиране. Това дава възможност за формиране на постоянна популация в чревния тракт, за разлика от бактериите, които представляват транзитна микрофлора и се изхвърлят вън от организма.

L. bulgaricus b21 е определен, като щам с най-добри адхезивни способности от проучваните. Установихме, че след едночасово инкубиране на културата с формиран монослой на Caco–2 клетъчна линия над 62% от клетките адхезират (Фиг. 24)



Фиг. 24. Изследване на способността на щам *L. bulgaricus b21* да адхезира на *Caco-2 Епителна клетъчна линия*.

Адхезията на лактобацилите към повърхността на чревния епител е строго специфична. Молекулните механизми на адхезията на *Lactobacillus spp.* не са напълно проучени. Трудностите, свързани с изучаването на бактериалната адхезия *in vivo* са довели до прилагане на различни клетъчни линии *in vitro*, като моделна система за предварителен подбор на потенциално адхезиращи щамове (Tuomola E.M. and S.J. Salminen, 1998). Изпитванията *in vitro* не могат да симулират добре условията *in vivo*, но са достатъчно надежден тест за откриване на пробиотични щамове с адхезивни способности. От литературата е известно, че има големи различия в степента на адхезия при щамовете от

един и същ вид. Въпреки, че *L. bulgaricus* не се счита за колонизиращ микроорганизъм, той притежава висока свързваща способност (Чомаков Хр., 2007). Резултатите показват, че високите нива на адхезия не са характерни за всички видове МКБ (Kirjavainen et al., 1999).

Благодарение на адхезионната си способност пробиотичните щамове изключват конкурентно патогенните микроорганизми, като надделяват в съревнованието за местата за свързване и за хранителни вещества. (Gueimonde et al., 2006., Lee et al., 2003; Sherman et al., 2005).

Според едни автори, отговорни за адхезията са някои повърхностни белтъци (от типа на лектините или т.нар. S-слойни протеини), докато други автори посочват ролята на липотейхоевите киселини и въглехидратите, синтезирани от съответните видове (Чомаков Хр., 2007). Много щамове лактобацили продуцират специфични адхезионни белтъци мукозния адхезионен белтък MapA (mucusadhesion protein A) u мукус-свързващия белтък Mub (mucus-bindingprotein). Те подпомагат адхезията на щама към епитела, но тяхната роля *in vivo* все още не е добре изучена.

Пробиотичните щамове млечнокисели бактерии се конкурират с чревните микроорганизми при адхезията към мускуса и епителните клетки и развиват конкурентни механизми за трайно доминиране в нишата, чрез продукция на антимикробни агенти такива, като органични киселини, диацетил, водороден пероксид и бактериоцини (Saarela et al., 2000; Morelli, 2007). Млечнокиселите бактерии с антимикробна активност, които коагрегират с патогени, представляват сериозен защитен механизъм при гостоприемниците по отношение на инфекции в гастроинтестиналния и урогениталния тракт.

Определянето на пробиотичния потенциал при млечнокиселите бактерии стимулира изследванията на агрегационните и адхезионните им свойства, възможната роля на повърхностни структури при адхезията към човешките интестинални клетки, продуциране или индуциране продукцията на биологично активни вещества. Способността да адхезират към епителни клетки се счита, като важен щамово специфичен критерий при *in vitro* подбора на потенциално пробиотични щамове (Ouwehand et al., 1999).

7. Охарактеризиране на различни видове бели саламурени сирена

Сиренето има дълга история в хранителния режим на човека. В сравнение с млякото сиренето е продукт със значително по-голяма трайност. Трайносттта му се обуславя от наличието на млечна киселина, готварска сол и по-високото съдържание на сухо вещество. То е носител на значително количество важни хранителни вещества: по-специално протеини, биоактивни пептиди, аминокиселини, мазнини, мастни киселини, витамини и минерали. Зреенето на бялото саламурено сирене е продължителна фаза (от 45-60 дни) и е от съществено значение за развитието на аромата и вкуса на крайния продукт. То протича под действието на много ензими, освободени от млечнокиселите бактерии. По време на зреенето протеина в сиренето, основно казеина се хидролизира до пептиди с ниско молекулно тегло и аминокиселини. Протеолизата е основения и най-важен биохимичен процес, който се извършва по време на зреене на сиренатa.

Всеки вид сирене има своя собствена характеристика, относно съдържанието на свободни аминокиселини, които са резултат от ензимно разграждане на пептиди от различни ензими, а също и от вътрешна конверсия и деградация на аминокиселини. Днес основната причина за консумацията на сирене не е гладът, а приемането на важни биологично активни вещества, както и разнообразното му използване в менюто на човека. Днес се наблюдава изместване на фокуса от „най-доброто качество на продукта“ към „най-доброто за здравето на потребителите“. Днес все повече хора изразяват желание да контролират здравето си, чрез хранителния режим поради, което пазарът на функционални храни стана един от най-бързо развиващите се на световния пазар.

За целите на това изследване бяха произведени 3 вида бяло саламурено сирене от овче, козе и краве мляко. Като стартерна култура при производството на сиренатa беше използвана стартерна култура BY–21 (*L. bulgaricus b21 u S. thermophilus t21*), а като ензим микробиална формулаза. Сиренатa бяха произведени в Млекопреработвателно предприятие „Ел Би Булгарикум” ЕАД, град Видин и Млекопреработвателно предприятие „Костови”, град Съединение. От всеки вид сирене бяха отделени проби, които се се поставиха в камера за зреене, да зреят за период от 60 дни при температура 10-12^{0}C. Сиренатa бяха анализирани на 5, 11, 25, 32, 40, 50 и 60-ти ден от производството им по следните физикохимични показатели:

- Киселинност по T^0
- Общ брой млечнокисели бактерии
- Сухо вещество в %

- Водно съдържание в %
- Масленост %
- Масленост в сухото вещество %
- Сол %
- Общ белтък
- Разтворим белтък
- Степен на зрялост

На отделните етапи от времето за зреене от сиренатa бяха взимани проби от, които се приготвиха водноразтворими екстракти. Екстрактите се концентрираха на Concentrator plus (Ependorf AG 22 331) и бяха анализирани посредством HPLC анализ за определяне на вида и количеството на освободените аминокиселини в сиренатa на отделните етапи от зреенето. От същите водноразтворими екстрати бяха заделени и обработени проби за изолиране и секвениране на пептиди с мас-спектрометрични методи.

7.1. Динамика на общия брой млечнокисели бактерии, физикохимичните показатели и киселинообразуване, в различни видове бели саламурени сирена по време на зреене.

В последно време сиренето се приема за идеален преносител на пробиотични бактерии в храносмилателната система на човека. Причините за това са високия буферен капацитет, благоприятното pH в границите 4,8–5,2 и съдържанието на значително количество млечна мазнина, която предпазва бактериите от действието на млечната киселина. Всичко това осигурява по-добра преживяемост на пробиотичните бактериии в сиренето, отколкото във ферментиралите млека.

Прясната сиренина и формираното сирене са подходяща среда за развитието на много микробни видове. Сложната и разнообразна технологична обработка на отделните типове сирене има една основна цел – да създаде благоприятни условия за развитие на желаните микроорганизми и да подтисне развитието на нежеланите.

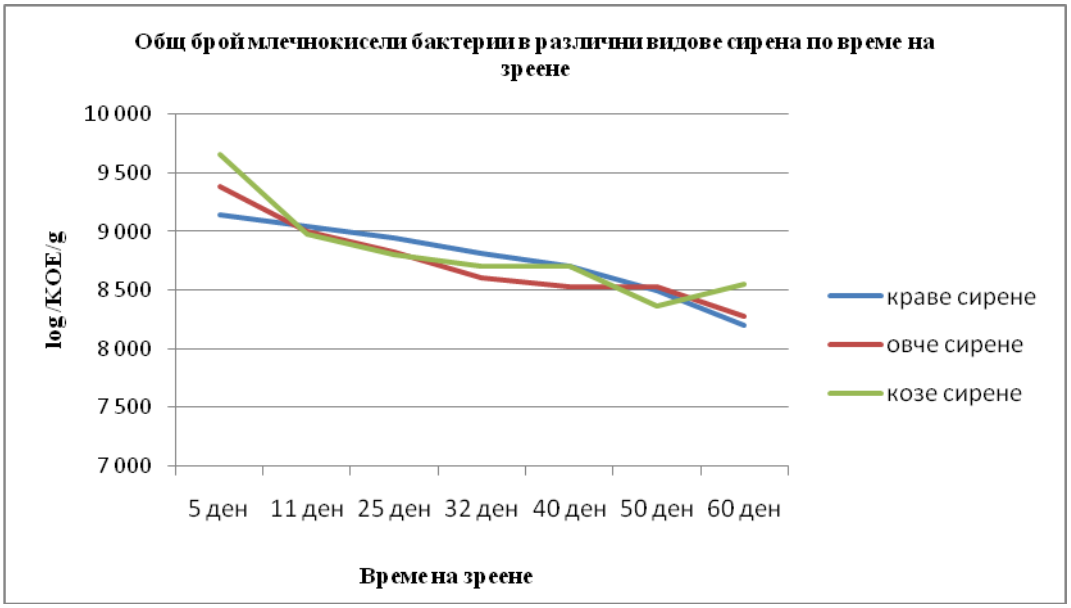
Основно изискване е бактериите в сиренето да преживеят всички етапи на производствения процес и в неговия край, броят на живите клетки да бъде в оптимални норми. Също така е необходима оценка на способността на млечнокиселите стартери да преживяват в екстремни условия, на каквито клетките са подложени при преминаването им в стомаха. Оцеляването им в тези условия създава предпоставка достигайки тънките черва те да колонизират успешно и да изразят своя регулаторен и пробиотичен ефект.

Динамиката на киселинообразуване при проучваните видове бели саламурени сирена е представена на Табл. 14.

Табл. 4. Динамика на киселинообразуване при различни видове бели саламурени сирена.

Етап на зреене	Овче бяло саламурено сирене, $К^0Т$	Краве бяло саламурено сирене, $К^0Т$	Козе бяло саламурено сирене , $К^0Т$
24 час	158	156	156
48 час	188	178	179
5 ден	192	188	188
11 ден	194	190	190
25 ден	204	230	229
32 ден	242	238	235
40 ден	278	268	250
60 ден	280	275	260

Резултатите за общия брой жизнеспособни клетки в произведените бели саламурени сирена са представени на Фиг. 25.



Фиг. 25. Динамика на общия брой млечнокисели бактерии в различни видове бели саламурени сирена по време на зреене.

Общият брой млечнокисели бактерии във всички видове от изследваните бели саламурени сирена е най-висок на 5-я ден от производството, като на 60-я ден от времето на зреене КОЕ/гр при козето бяло саламурено сирене е най-висок.

Киселото мляко използвано, като закваска определено влияе върху формирането на вкусовите качества на бялото саламурено сирене. Стрептококите и по-конкретно *S. thermophilus* са преобладаващ вид в бялото саламурено сирене. В сиренето приготвено със закваска от кисело мляко максималния брой микроорганизми се достига на 30 дни. (Чомаков, 2007). Микрофлората на киселото мляко е важен екологичен фактор за формиране на микробната популация в сиренето. *S. thermophilus* хидролизира β и к-казеина, тъй като съдържа левцинаминопептидаза, която е силно активна спрямо дипептидите.

Първоначално лактобацилите са слабо представени в сиренината (10^3-10^4 cfu/g), но по време на зреенето броят им се повишава значително, като стават доминираща микрофлора в зрялото сирене, достигайки до 10^7-10^8 cfu/g (Fox et al., 1996, Marino et al., 2003). В късните етапи на зреене те са добре адаптирани към неблагоприятните условия (ниско pH, висока концентрация на сол, отсъствие на разтворими захари, анаеробни условия и съдържание на бактериоцини, продуцирани от стартерните бактерии) във вътрешността на сиренето.

Резултатите от динамиката на физикохимичните показатели на експерименталните сирена са представени на Табл. 15 (А, Б и В).

Табл. 5. Динамика на физикохимичните показатели на различни видове бели саламурени сирена по време на зреене.

А) Овче бяло саламурено сирене

	Сухо вещество, %	Водно съдържание, %	Масленост, %	Масленост в сухото вещество,%	Сол, %	Общ белтък	Разтв. белтък	Степен на зрялост
5 ден	50,38	49,62	25,19	50	2,00	18,34	1,56	8,51
11 ден	50,86	49,14	26,5	52,10	3,00	17,21	1,85	10,75
25 ден	51,61	48,39	28	54,25	3,20	18,90	2,01	10,63
32 ден	51,90	48,10	30	57,80	3,57	18,56	2,08	11,20
40 ден	52,93	47,07	30	56,68	3,72	16,78	2,45	14,60
60 ден	48	52	24,96	52	3,7	19,58	3,62	18,49

Б)/ Краве бяло саламурено сирене

	Сухо вещество, %	Водно съдържание, %	Масленост, %	Масленост в сухото вещество,%	Сол, %	Общ белтък	Разтв. белтък	Степен на зрялост
5 ден	47,60	52,40	27	56,72	2,00	17,53	1,61	9,18
11 ден	50,58	49,42	27	53,38	3,00	17,30	1,64	9,48
25 ден	51,61	48,39	28	54,25	3,20	17,91	1,77	9,88
32 ден	47,60	52,40	27	56,72	3,57	16,44	1,70	10,34
40 ден	45,89	54,11	24	52,29	3,72	16,58	2,56	15,44
60 ден	46	54	22,1	44	3,72	21,96	3,45	15,71

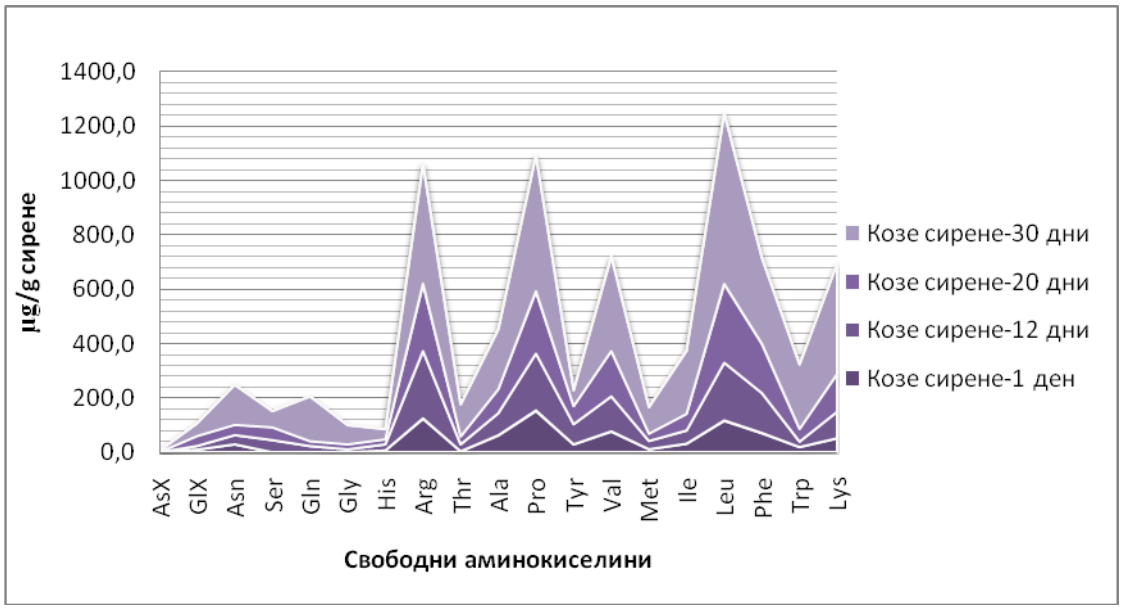
В) Козе бяло саламурено сирене

	Сухо вещество, %	Водно съдържание, %	Маслеост, %	Маслеост в сухото вещество,%	Сол, %	Общ белтък	Разтв. белтък	Степен на зрялост
5 ден	45,00	55,00	21,02	46,72	2,40	17,53	1,61	9,18
11 ден	50,58	49,42	27,0	53,38	3,00	17,30	1,64	9,48
25 ден	47,60	52,40	24,5	49,88	3,57	16,44	1,70	10,34
32 ден	49,12	50,88	20,70	46,00	3,47	16,44	1,70	10,34
40 ден	47,60	52,40	27,0	56,72	3,57	16,44	1,70	10,34
60 ден	46,00	54,0	20,24	44,00	3,72	21,96	3,45	15,71

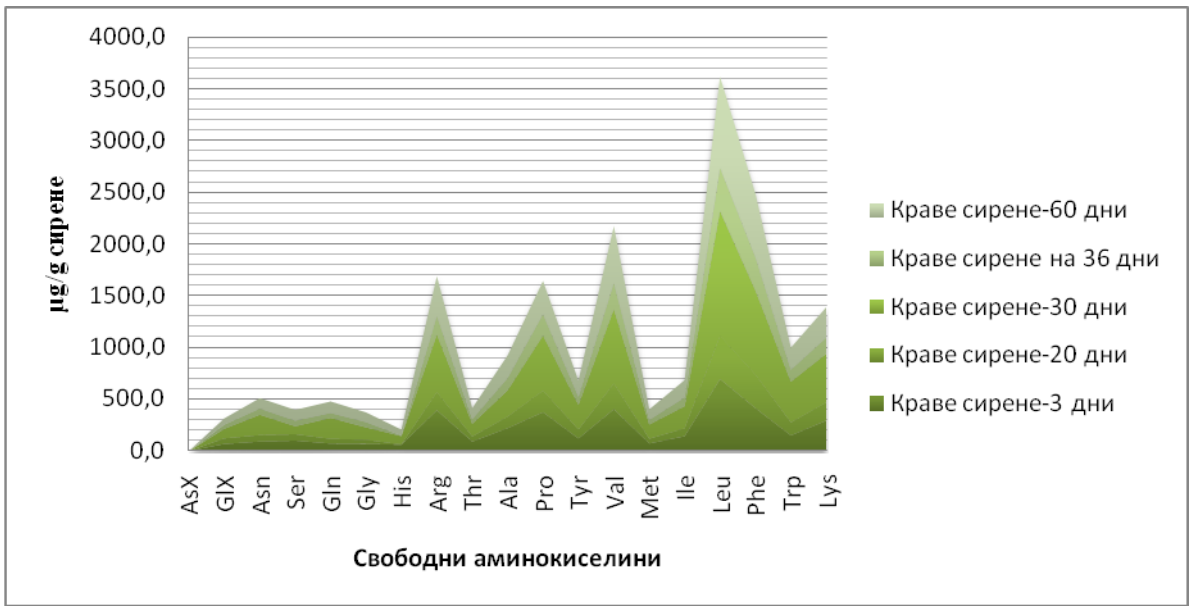
7.2. Определяне на освободените аминокиселини в различни видове Българското бяло саламурено сирене по време на зреене

Целта на изследването е да се проучи отделянето на свободни аминокиселини и биоактивни пептиди по време на зреене на Българското бяло саламурено сирене.

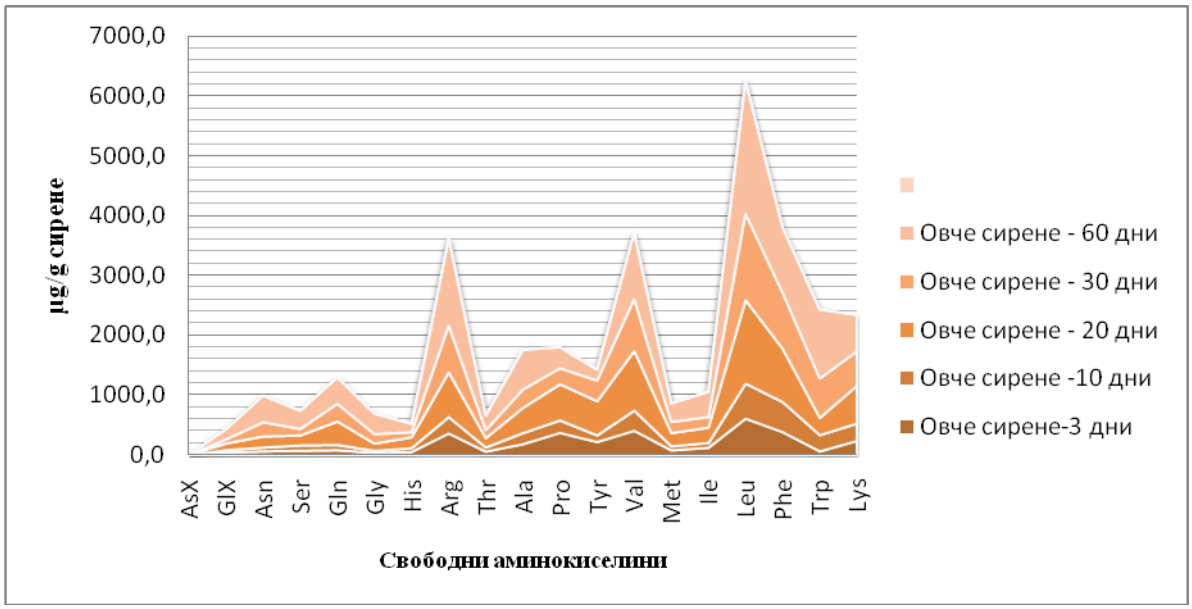
Ултрафилтратите, направени от различни видове саламурени сирена на различна възраст бяха анализирани с HPLC анализ, съгласно Bidlingmeyer et al, 1984. HPLC анализите бяха извършени на Alliance, Waters апарати с Empower Pro програма, съгласно Dalgalarrondo et al., 1990. Абсорбицията се отчиташе при 254 nm. Получените резултати за вида и количествата аминокиселини и тяхното освобождаване по време на зреене са представени на Фигура 26 (А, Б, В). Количествата аминокиселини са изразени в µg/g сирене.



А



Б



В

Фиг. 26. Освобождаване на аминокиселини по време на зреене на Българско бяло саламурено сирене (А, Б, В).

Поведението на някои аминокиселини през периода на зреене заслужава да бъде отбелязано. Концентрациите на пролина и лизина не се различават значително между различните видове сирена. Концентрацията на тези аминокиселини е една и съща за различните сирена с време на зреене 30 дни. Концентрацията на пролина и лизина в сирената на 60-я ден от времето на зреене намалява, но количеството на лизина за овчето

бяло саламурено сирене се увеличава. (Фиг. 26 В). Пролина е аминокиселина, свързана със сладникавия вкус в сиренета. Други изследвания, при които се използват протеинази в сирена от краве мляко се съобщава също така за същите или много по-ниски нива на тези аминокиселини (Law B.A., et al. 1983).

Аминокиселината аргинин (Arg) се свързва с горчивия вкус в сиренета. Концентрацията на тази аминокиселина се увеличава в по-голяма степен при всички проби овче сирене и на 60-я ден от времето на зреене има най-висока концентрация 1,467 μg/g. В козето и кравето сирене на 60-я ден, концентрацията на аргинина намалява.

Най-висока концентрация в сиренета във всички проби имаше аминокиселината левцин (Leu). При сиренета на 30 дни от овче и краве мляко нивото на тази аминокиселина е едно и също. Най-ниска концентрация на левцин (Leu) беше установена в козето бяло саламурено сирене (Фиг. 26 и 27). Концентрацията на левцин (Leu) при овчето бяло саламурено сирене на 60-я ден нараства и достига до 2,224 μg/g. (Фиг. 26 А и В).

Концентрацията на фенилаланин (Phe) при овчите и крави сирена на 30-я ден е една и съща. Концентрацията на фенилаланин (Phe) в овчето бяло саламурено сирене на 60-я ден нараства и достига до 1,096 μg/g. В кравето бяло саламурено сирене на 60-я ден фенилаланина (Phe) намалява и достига нива по-ниски от нивата на фенилаланина (Phe) в сиренето на 30 дни (Фиг. 26).

Концентрацията на триптофан (Trp) при овчето бяло саламурено сирене на 30–я ден е 658 μg/g, докато в кравето бяло саламурено сирене концентрацията на триптофан (Trp) на 30-я ден е 394 μg/g. В овчето бяло саламурено сирене на 60 дни, концентрацията на триптофан (Trp) се увеличава почти два пъти и е 1,155 μg/g. Концентрацията на триптофан (Trp) в кравето бяло саламурено сирене на 60 дни, намалява три пъти и достига ниво от 214,4 μg/g (Фиг. 26 А, Б, В).

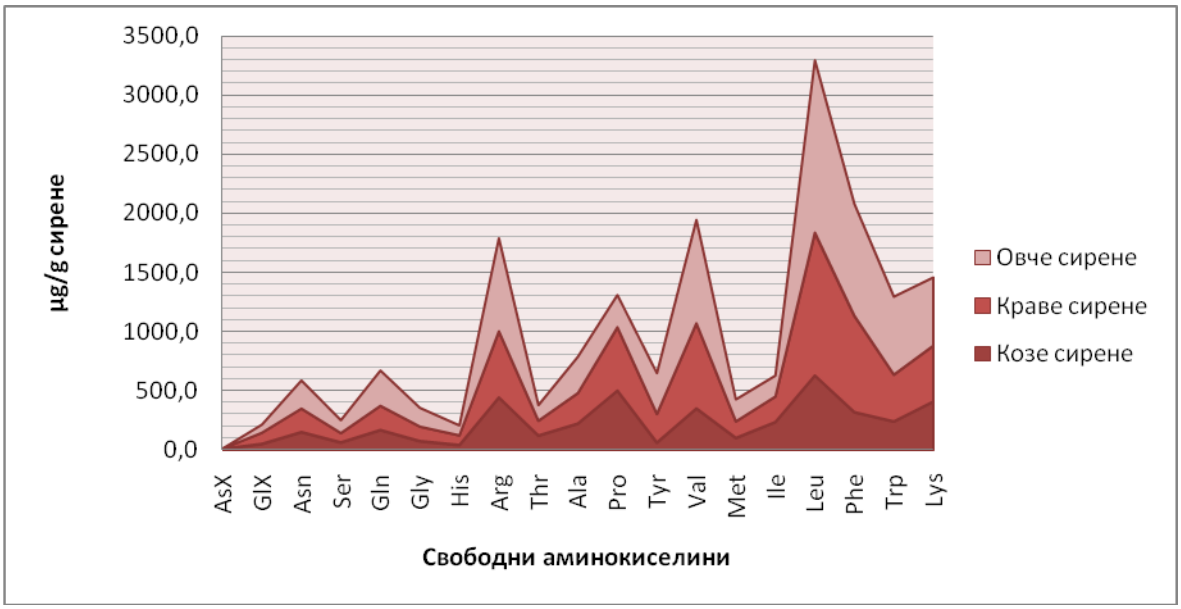
Концентрацията на валин (Val) при овчето бяло саламурено сирене на 30-я ден е 873 μg/g, докато в кравето бяло саламурено сирене концентрацията на валин (Val) на 30-я ден е 718 μg/g. В овчето бяло саламурено сирене на 60 дни концентрацията на валин (Val) се увеличава и достига 1,116 μg/g. Концентрацията на валин (Val) в кравето бяло саламурено сирене на 60-я ден намалява достига нива от 550 μg/g.

Беше установено, че козето бяло саламурено сирене с 30 дни период на зреене съдържа най-големи количества от следните свободни аминокиселини: пролин (Pro), аргинин (Arg), лизин (Lys), валин (Val) и фенилаланин (Phe) (Фиг. 27).

При овчето бяло саламурено сирене на 30 дни се установяват най-големи количества свободни аминокиселини: левцин (Leu), фенилаланин (Phe), валин (Val),

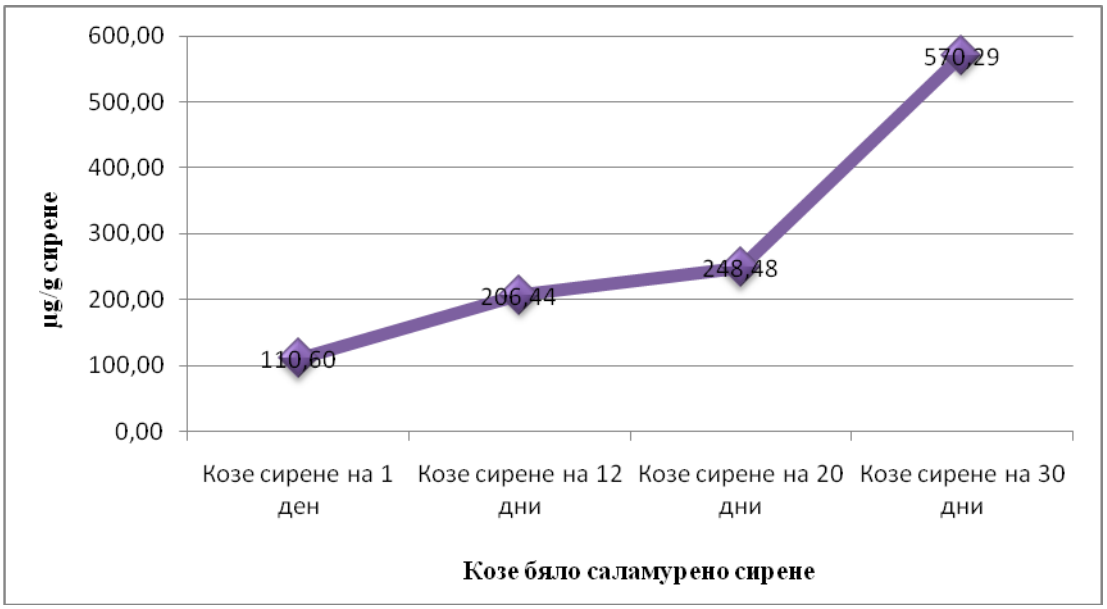
аргинин (Arg) и триптофан (Trp). Количествата на отделните аминокиселини при овчето бяло саламурено сирене са два пъти по-големи с сравнение с количествата свободни аминокиселини в кравето и козе сирене (Фиг. 27).

При изследваното краве бяло саламурено сирене на 30 дни се установяват най-големи количества от следните свободни аминокиселини: левцин (Leu), фенилаланин (Phe), валин (Val), пролин (Pro), аргинин (Arg), лизин (Lys) и триптофан (Trp) (Фиг. 27).



Фиг. 27. Свободни аминокиселини в различни видове бели саламурени сирена на 30 дни.

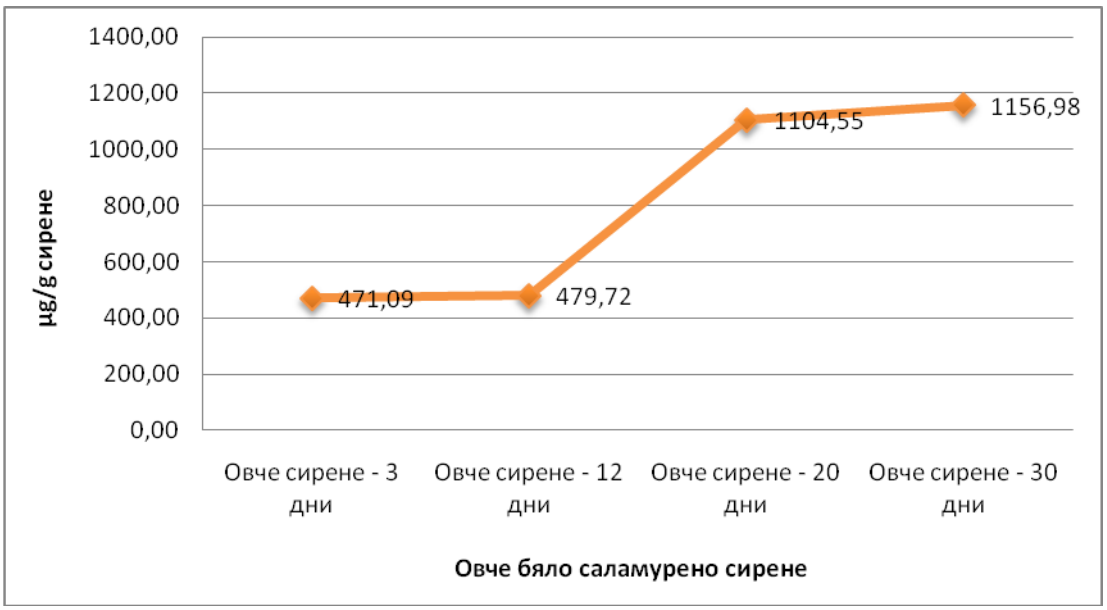
В пробите овче сирене *общата концентрация на свободните аминокиселини* се увеличаваше до 60-я ден. В пробите краве сирене *общата концентрация на всички аминокиселини* на 60-я ден е по-ниска от общото количество аминокиселини на 30-я ден. Най-голяма концентрация на *общо количество аминокиселини* беше наблюдавана в сиренатa с 30 дневен срок на зреене, съответно в овчето сирене - 1156,98 µg/g и най-малката концентрация на общо количество аминокиселини се установи в козето сирене - 570,29 µg/g. *Общото количество аминокиселини* в кравето сирене с време на зреене 30 дни беше 907,61 µg/g Фиг. 28 (А, Б, В).


600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
µg/g сирене
110,60
206,44
248,48
570,29
Козе сирене на 1 ден
Козе сирене на 12 дни
Козе сирене на 20 дни
Козе сирене на 30 дни
Козе бяло саламурено сирене

А)

1000,00
900,00
800,00
700,00
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
µg/g сирене
318,36
530,71
635,05
907,61
Краве сирене-3 дни
Краве сирене -12 дни
Краве сирене - 20 дни
Краве сирене - 30 дни
Краве бяло саламурено сирене

Б)



В)

Фиг. 28. Динамика на общото количество аминокиселини по време на зреене на различни видове бяло саламурено сирене (А, Б, В)

Концентрациите на различните аминокиселини в сиренето са свързани с технологията на производство (типа на сиренината, добавянето на протеинази, стартерни култури и условията на зреенето (Mariani et al., 1993; Christensen et. al., 1995, Freitas et. al, 1999, Pintado et al, 2008). Някои свободни аминокиселини са изключително важни за оформянето на аромата и вкуса на продукта. Например аргинина (Arg) се свързва с развитие на горчив вкус, докато пролина (Pro), серина (Ser), аспаргина (Asn) се свързват с оформяне на сладък вкус (Izco and Torre, 2000). Въпреки, че прякото участие на свободните аминокиселини в типичния аромат и вкус на сиренето са малко ограничени, те са свързани с летливата фракция в сиренето (Salles et al., 2000), тъй като те са предшественици на много летливи ароматни съединения (като например амини, карбоксилни киселини, тиоли, естери, алкохоли, алдехиди и тиоестери). Видът на млякото, използвано за производството на сирене се отразява на действието на стартерната култура и има пряк ефект върху профила на свободните аминокиселини в сиренето.

Ароматните съставки в сиренето се получават главно от промените в цикличните аминокиселини – фенилаланин (Phe) и тирозин (Tyr). Участие взимат и разклонените аминокиселини – валин (Val), левцин (Leu) и изолевцин (Ile), както и аминокиселините метионин (Met), серин (Ser), цистин и цистеин (Cys), които съдържат серни атоми и служат, като източници на летливи серни съединения, вземащи участие във вкуса и

аромата на сиренето. Летливи серни съединения продуцира *L. bulgaricus* в бялото саламурено сирене.

Участие в аромата на сиренето вземат и монокарбоксилните киселини, които се получават от аминокиселините. Най-голямо е участието на оцетната киселина. Тя се продуцира в значителни количества от *L. bulgaricus* в бялото саламурено сирене.

Въпреки, че *L. bulgaricus u S. thermophilus* са описани, като видове, които не се развиват при температура под 20^0C и 2% готварска сол, в бялото саламурено сирене те се развиват при температура под 15^0C, при 4% готварска сол в общата маса и 7,5% във водната фаза на сиренето (Чомаков, Х., 2007).

Freitas A.C. et. al., 1999, наблюдават, че времето за узряване на сиренето рефлектира и оказва по-голямо въздействие върху крайния продукт в сравнение със състава на изходното мляко, подсирващия ензим и осоляването. Вида на млякото също така показва, статистически значим ефект, като овчето мляко показва по-значителен ефект върху общото количество свободни аминокиселини. Преобладаващите свободни аминокиселини, намиращи се в различни експериментални сирена, през периода на зреене са валин (Val), левцин (Leu) и фенилаланин (Phe). Всяка една аминокиселина представлява повече от 10 % (т/т) от общото количество на всички свободни аминокиселини. Високото съдържание на сол в сиренето се свързва с намалено освобождаване на свободни аминокиселини, които могат да бъдат свързани с естествената млечнокисела микрофлора на млякото.

Freitas A.C., et al., 1997, проучват влиянието на млякото, като суровина върху профила на свободните аминокиселини в Picante сирене. При узряване на последното е установено, че концентрацията на общото количество аминокиселини се увеличава по време на узряване на овче и козе сирене. Авторите заключват, че времето на узряване действително проявява по-силен ефект от фактора мляко. Също така Izco J.M., et al., 2000 в Ossau-Iraty сирене от овче мляко отчитат подобна обща концентрация на аминокиселини за сирена на 2, 15 и 30 дни от времето за узряване.

Pappa&Sotirakoglou, 2008, изследват сирене Teleme. Отчетените стойности на свободните аминокиселини са по-ниски, отколкото намерените концентрации в изследване на Pino A., et al., 2009. Последните отбелязват, че сирена произведени от краве мляко имат по-високо съдържание на свободни аминокиселини от сирена, произведени от овче мляко.

Tavaria F.K., et al., 2003, в своите изследвания върху Serra Da Estrela сирена, установяват в края на узряването на сирената следните аминокиселини – валин

глутаминова киселина (Glu), валин (Val), левцин (Leu) и лизин (Lys), които представляват 56-70% от общия брой свободни аминокиселини намерени в сиренета.

Деградацията на άs1-казеин при Махон сирене води до увеличаване на левцина (Leu), фенилаланина (Phe) и валина (Val) (Frau M., et al., 1997). Вследствие на казеиновата хидролиза (под действието на ензими) по време на първия етап от зреенето на сиренето се наблюдава продуцирането на големи пептиди. След това микробните ензими разграждат големите пептиди до малки пептиди и свободни аминокиселини, така че профилът на свободните аминокиселини в сиренето се определя от стартерните култури или нестартерните култури или вторичната микрофлора, която участва в узряването на сиренето (Fox et al., 1993).

Garcia – Palmer, J., et al., 1997 и Poveda J.M., et al., 2004 установяват силна корелация между нивата на почти всички свободни аминокиселини с времето на зреене при Махон и Manchego сирена. Количеството на аминокиселините изолевцин (lle), триптофан (Thr), левцин (Leu), валин (Val), лизин (Lys), глицин (Gly), тирозин (Tyr), аспартанова киселина (Asp), глутаминова киселина (Glu), фенилаланин (Phe) най-добре се корилира с времето на зреене при двата вида сирена. Аминокиселините, които показват най-ниските коефициенти на корелация с времето на зреене при двата вида сирена са аргинин (Arg) и триптофан (Trp). Други автори съобщават за ниска корелация на аргинина (Arg) с времето на узряване в различни видове сирена (Puchades et al, 1989; Poveda J.M., et al., 2003.).

Franko I., et al., 2003 в Babia - Laciana сирене, произведено от козе мляко отчитат подобно съдържание на аминокиселините - хистидин (His), серин (Ser), триптофан (Thr), глицин (Gly), аланин (Ala), левцин (Leu) и лизин (Lys) на 15, 30 и 60 ден от периода на зреене, докато концентрациите на другите аминокиселини са по-ниски от тези, докладвани тук за сирена с двата вида ензим.

По време на зреенето на сиренето количеството на свободните аминокиселини непрекъснато се увеличава. Основните свободни аминокиселини, които се намират по време на целия период на зреене при всички видове бели саламурени сирена са левцин (Leu), фенилаланин (Phe), аргинин (Arg), валин (Val) и пролин (Pro). Концентрацията на *общото количество свободни аминокиселини* на 30 дни се увеличава във всички сирена. Аминокиселините под действието на окисляването и на микробиалните ензими се дезаминират, декарбоксилират, влизат в реакция с други продукти и се модифицират. В резултат на тези дейности се получават различни химични съединения. Те играят най-голямата роля за формирането на вкуса и аромата на сиренето.

7.3. Идентификация и секвенция на Биологично активни пептиди в различни видове Българско бяло саламурено сирене

Биологично активните компоненти в млякото са главно пептиди и протеини. Някои от биологично активните млечни протеинови компоненти са латентни, и се реализират само под протеолитично действие. Казеините се разделят на *α-, β- и κ-* казеини. Основните казеини в козето, овчето и кравето мляко са α_{s1}*- CN,* α_{s2}*- CN, β- CN и k-* CN.

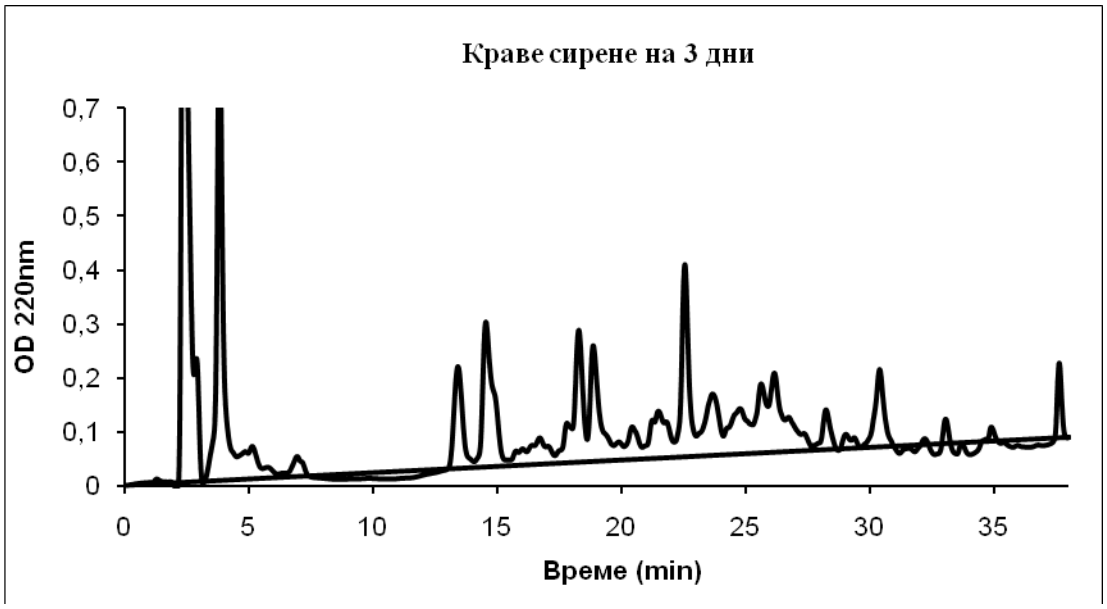
Биоактивните пептиди, извлечени от млякото са кодирани, както в казеините (α_S-, β-, и κ- казеин), така и в суроватъчните протеини (β-лактоглобулин, α-лакталбумин, серумен албумин, имуноглобулини, лактоферин). Много малко от пептидите проявяват своята активност, докато са част от интактната протеинова молекула и обикновено тази активност е сравнително ниска. Повечето биоактивни пептиди са неактивни в „майчиния" протеин и се активират само, ако бъдат освободени от протеина, чрез разкъсването му на отделни фрагменти. След това биоактивните пептиди се отделят от общата смес под формата на пептидна фракция, чрез различни методи. Биоактивни пептиди могат да се получат и по време на производството на даден хранителен продукт в резултат на извършващите се структурни и химични изменения в хранителните протеини. От голямо значение е фактът, че производствения процес може да доведе до появата на биоактивни пептиди, които иначе не биха се формирали от „майчиния" протеин при нормални условия. Например, по време на производството на храна, „майчините" протеини могат да бъдат подложени на топлинна обработка и/или алкално третиране. Това може да доведе до формирането на допълнителни вътрешни ковалентни връзки, устойчиви на хидролиза, или пък конформацията на аминокиселините в протеина да се промени от L на D, правейки някои от пептидните връзки неразградими. Така, когато обработения „майчин" протеин се подложи на разграждане, вместо обичайните пептидни връзки в него ще се образуват други нови връзки. В резултат на новообразуваните връзки от „майчиния" протеин ще се освободят биоактивни пептиди, различни от нормалните. Подобни пептиди могат да се отделят при производството на някои млечни продукти. Например, по време на зреенето на сиренето.

Биологичните активности на пептиди криптирани в основните млечни протеини са латентни, докато бъдат освободени и активирани (например, чрез ензимна протеолиза, по време на храносмилането или производството на храни). Протеолитичната система на млечнокиселите бактерии допринася за освобождението на биоактивни пептиди в млечните продукти.

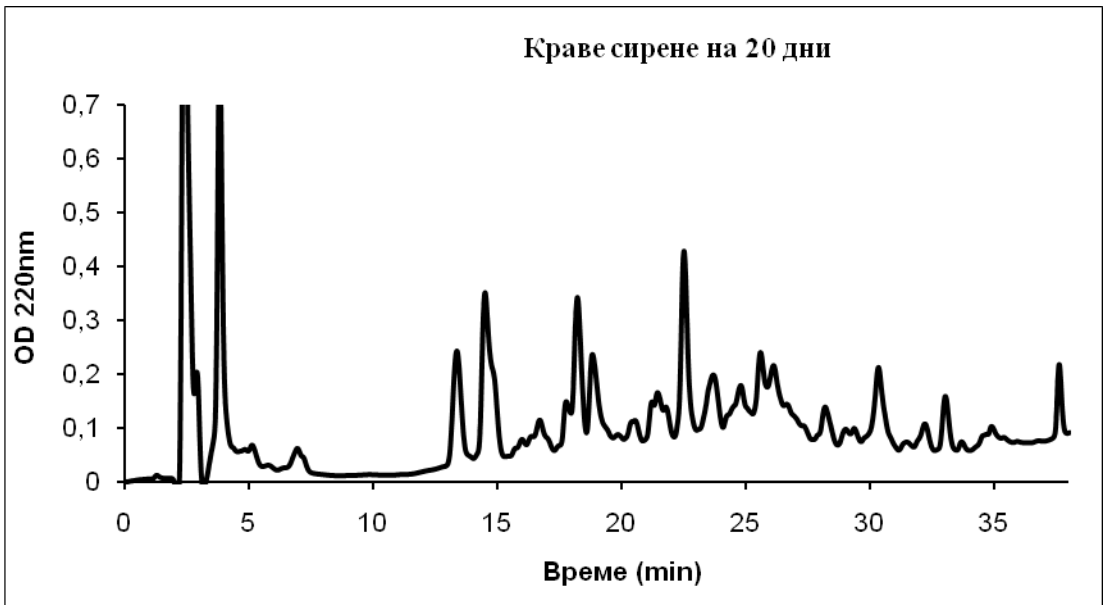
7.3.1.Резултати от RF-HPLC анализа

HPLC анализа на ултрафилтратите е направен с помощта на обратно фазова хроматография върху колона Jupiter Proteo, описан в точка 9.1. на раздел Материали и Методи. Абсорбцията беше измерена между 220 и 320 nm. Детекцията беше направена с помощта на фотодиоден детектор Waters, PDA 996.

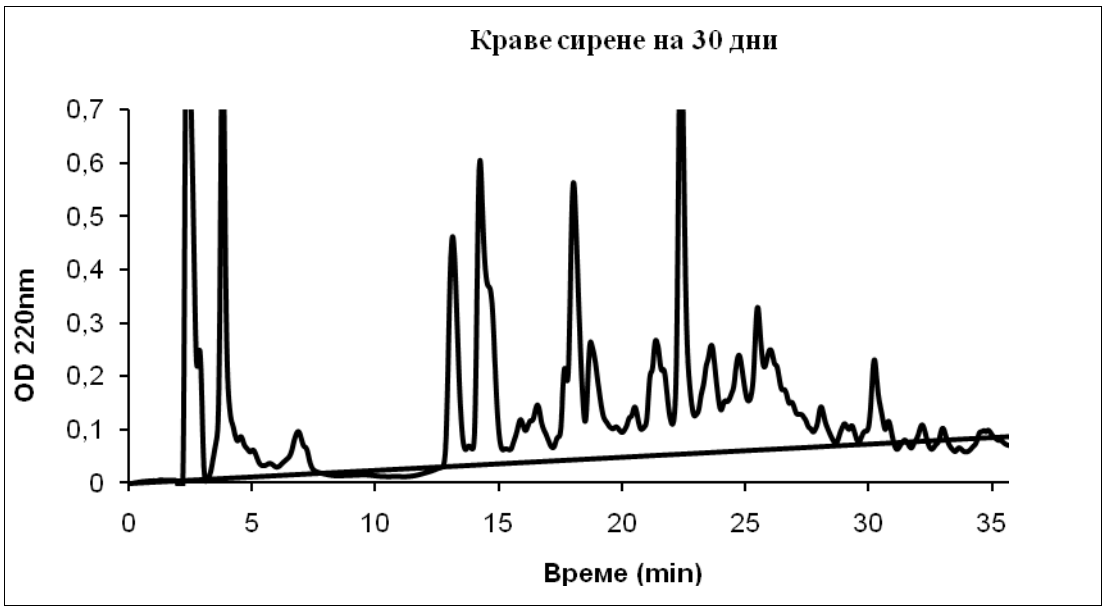
Хроматографските профили на намерените пептиди са показани на фигури 29, 30 и 31.



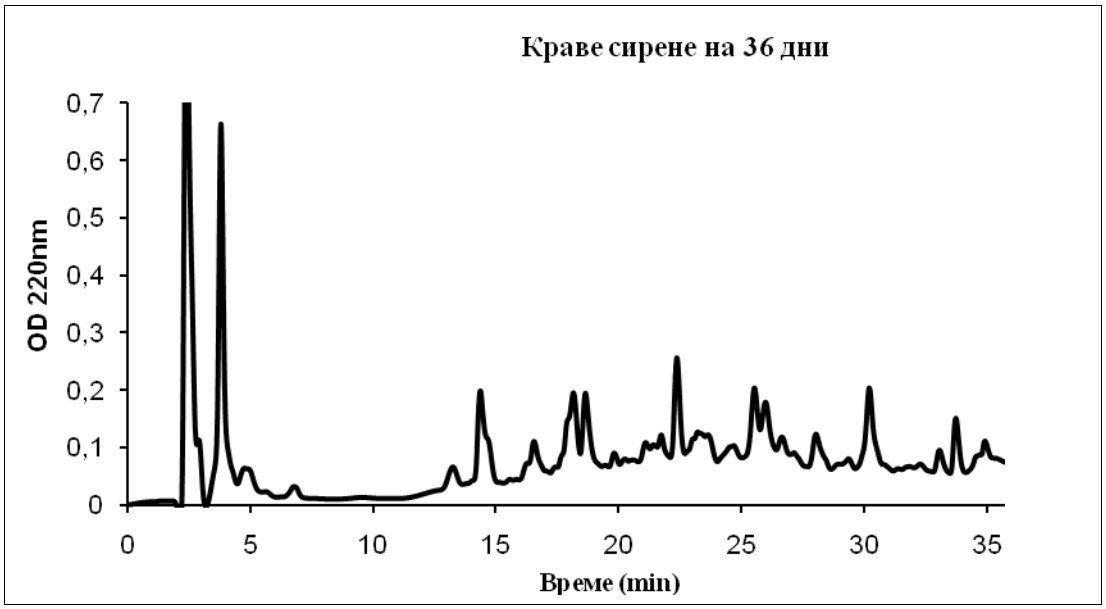
А)



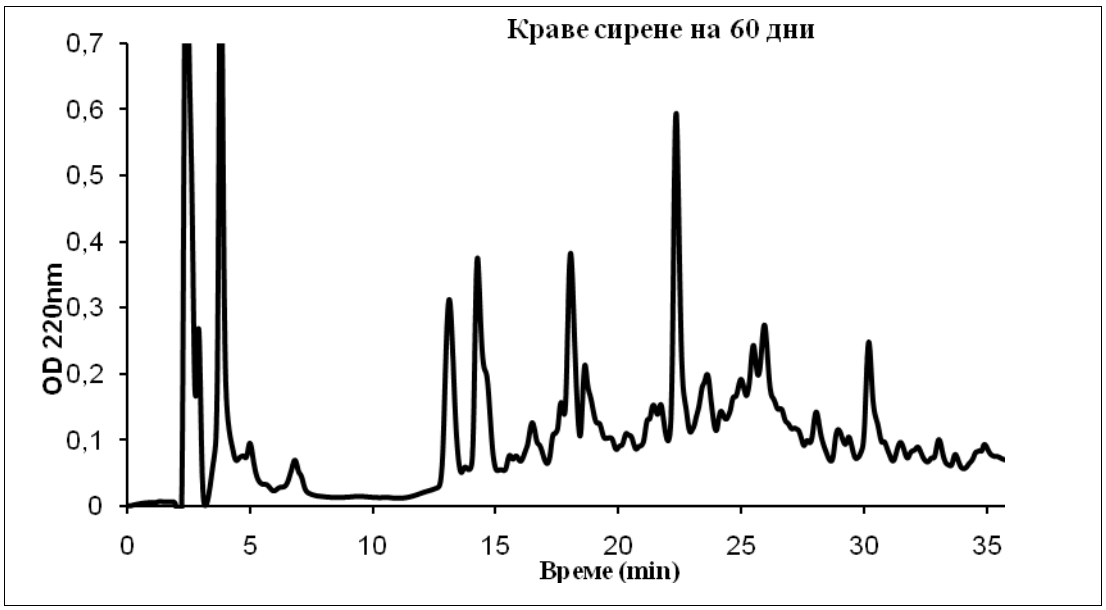
Б)


Краве сирене на 30 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Време (min)

В)

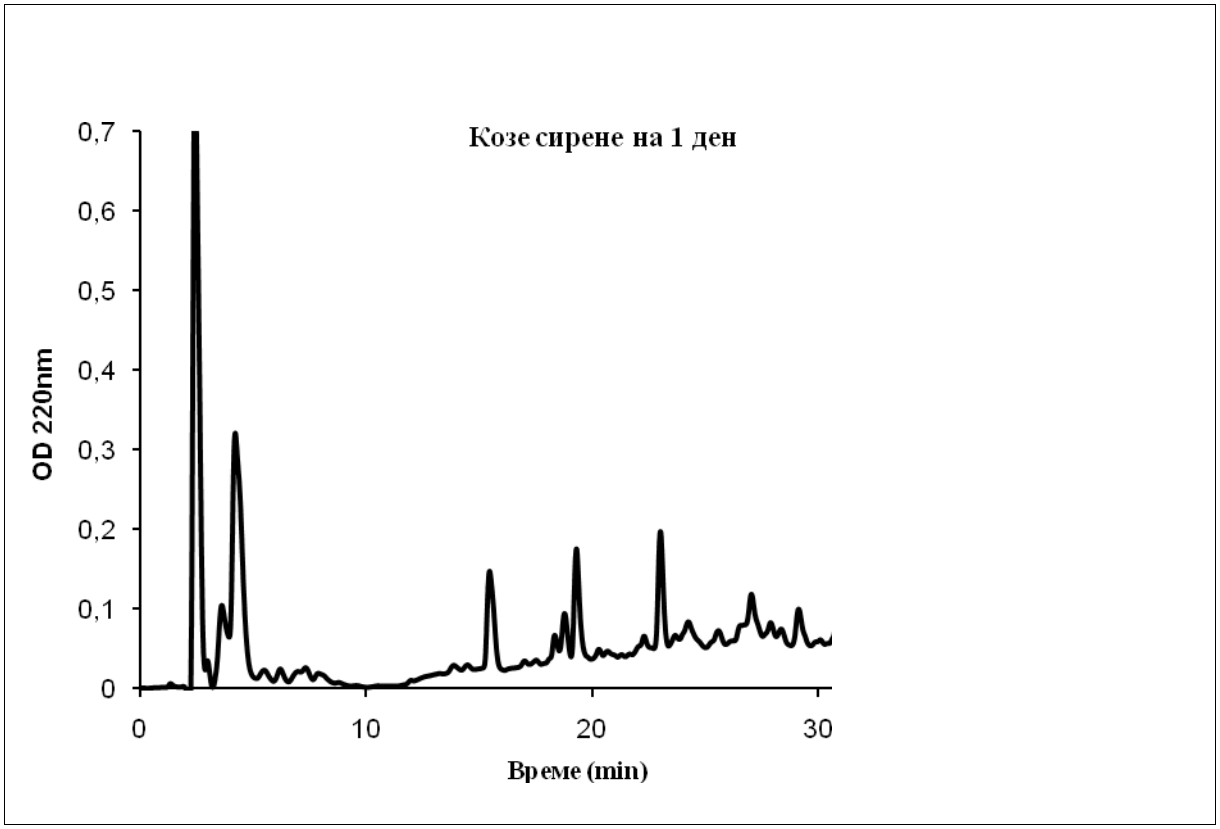

Краве сирене на 36 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Време (min)

Г)

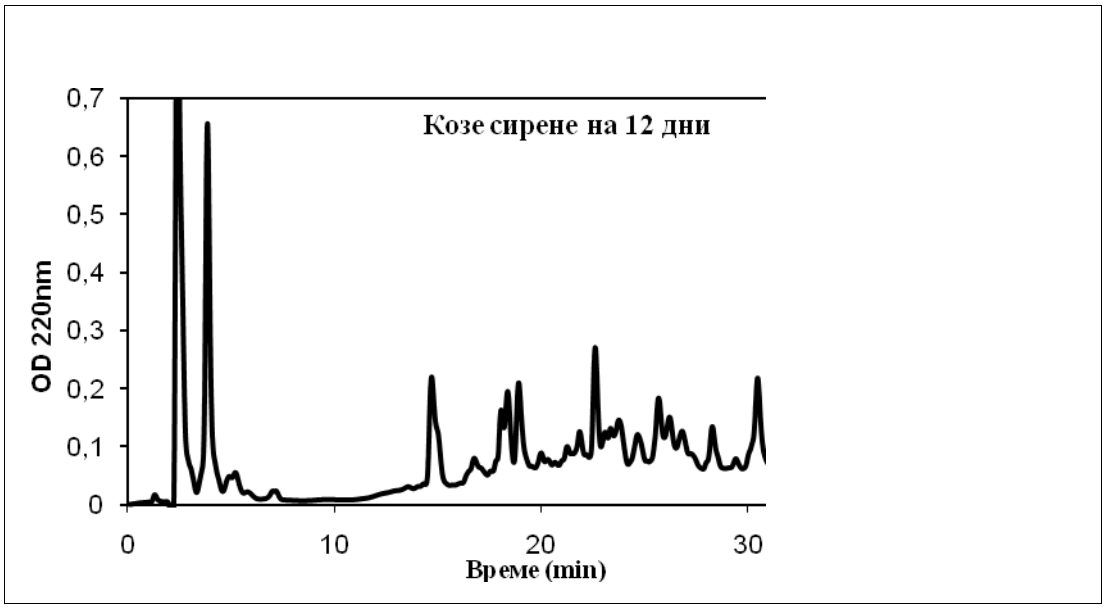


Д)

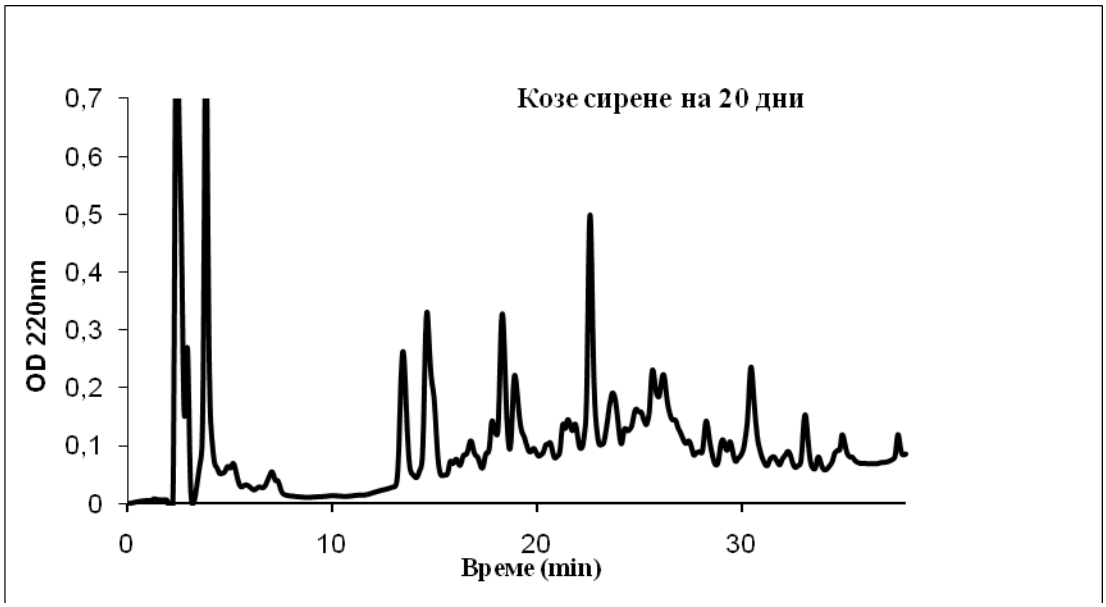
Фиг. 29. RF - HPLC хроматографски профили на пептиди, детектирани в извлеци от краве бяло саламурено сирене по време на зреене (А, Б, В, Г, Д).



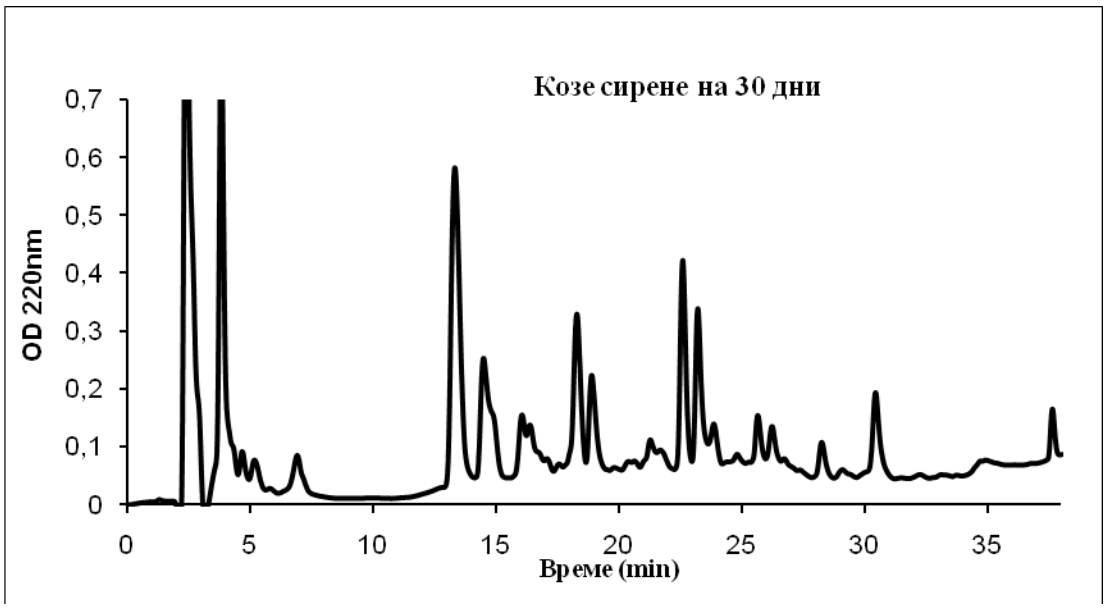
А)


Козе сирене на 12 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
Време (min)

Б)

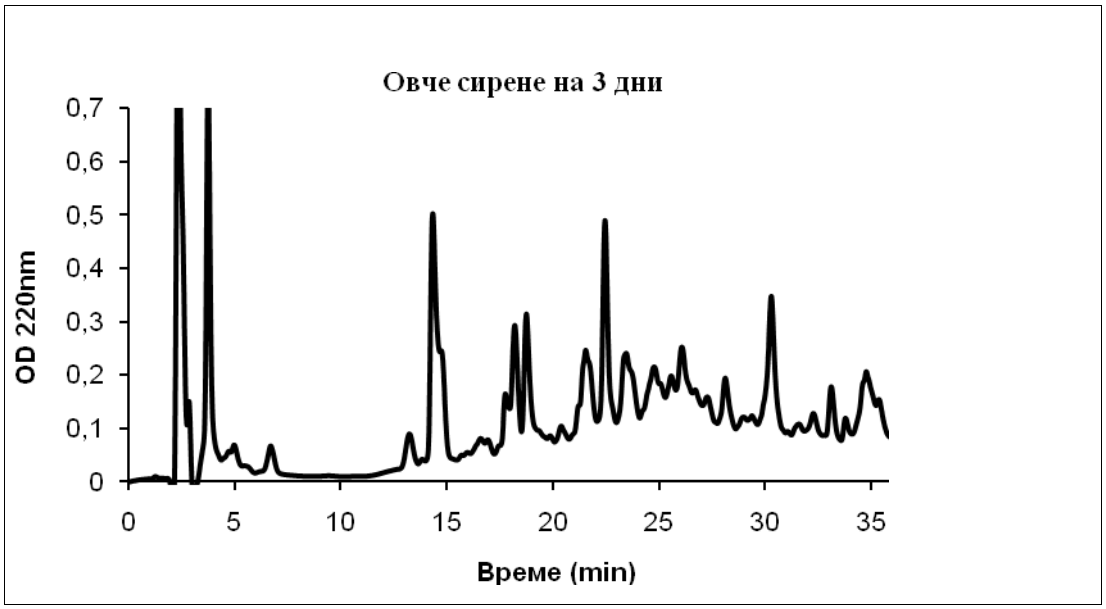

Козе сирене на 20 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
Време (min)

В)

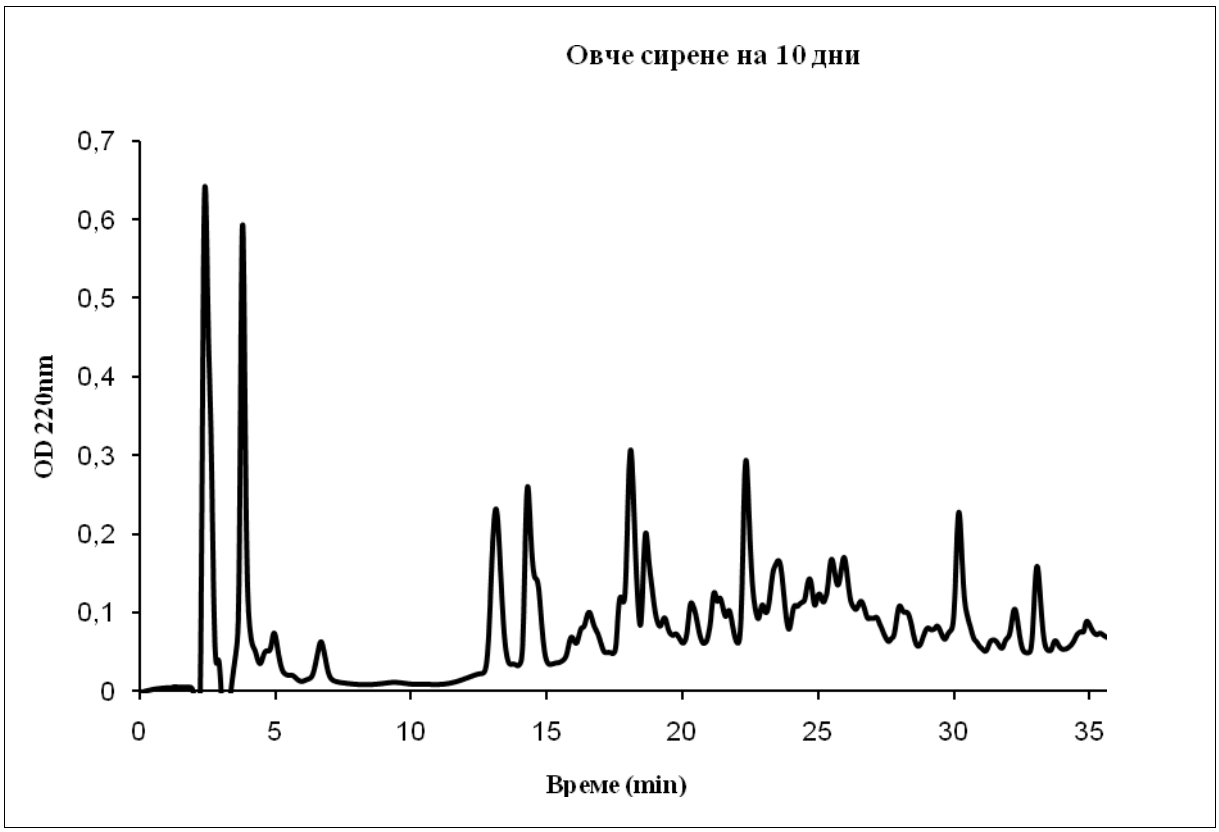


Г)

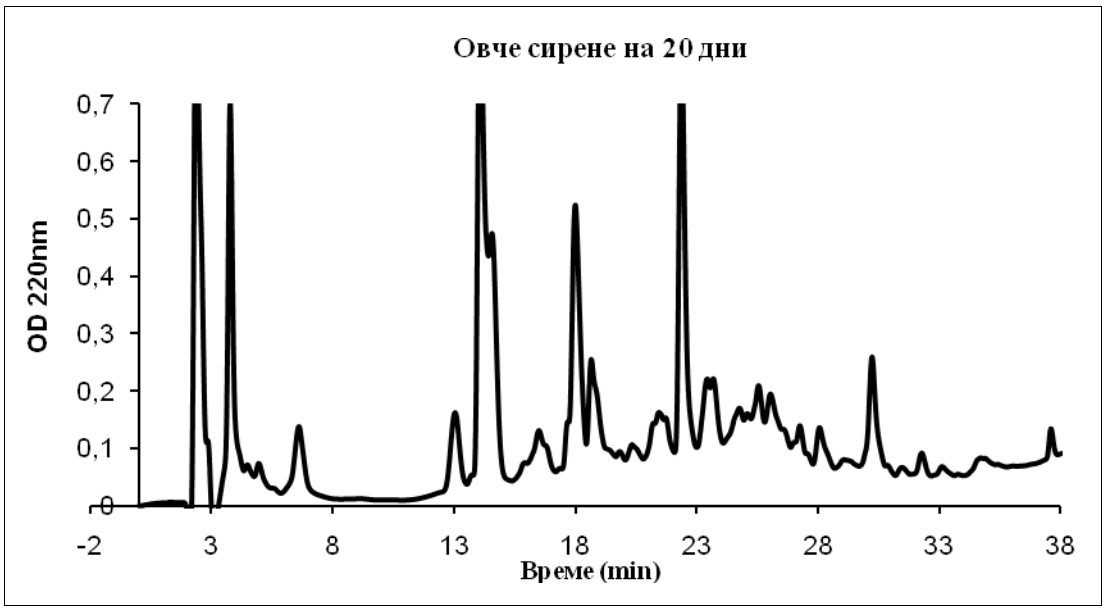
Фиг. 30. Хроматографски профили на пептиди, детектирани в извлеци от козе бяло саламурено сирене по време на зреене (А, Б, В, Г).



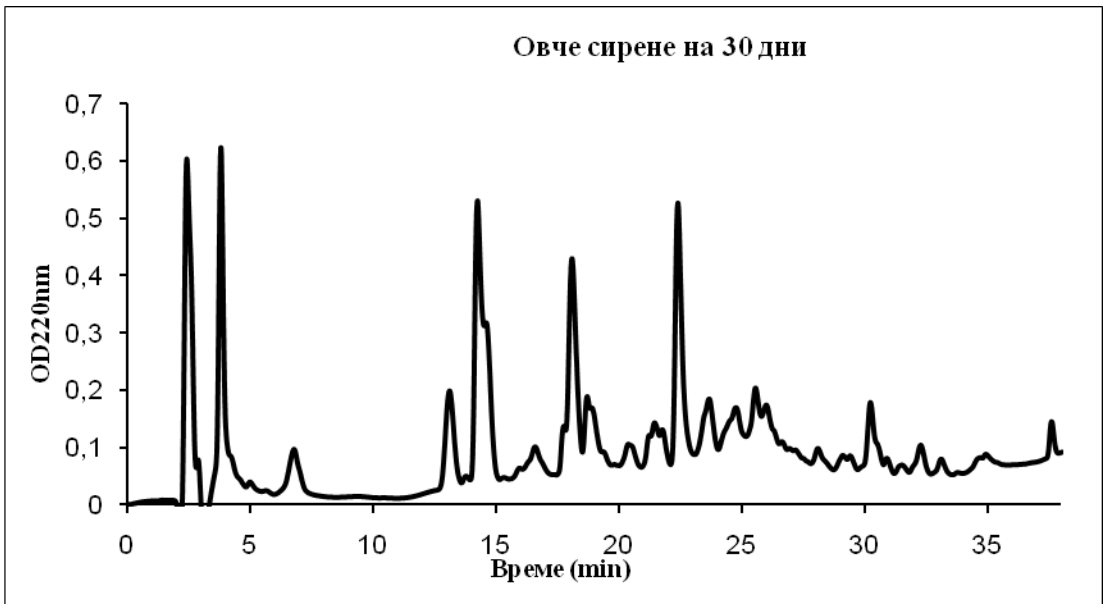
А)


Овче сирене на 10 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Време (min)

Б)


Овче сирене на 20 дни
OD 220nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-2
3
8
13
18
23
28
33
38
Време (min)

В)



Г)

Фиг. 31. Хроматографски профили на пептиди, детектирани в извлеци от овче бяло саламурено сирене по време на зреене (А, Б, В, Г).

Резултатите от хроматографските профили, получени след обратно-фазовата HPLC, показват, че образуваните пикове варират при различните видове сирена и също така зависят от степента на зреене на сиренатa. Интензитетът на пиковете показва количеството на пептидите в пробите. При всички видове сирена се наблюдават най-много пикове в пробите сирена с време на зреене 30 дни. От всички изследвани проби са детектирани най-много пептиди в кравето бяло саламурено сирене на 30 дни. Основните пикове от HPLC анализа се събират и се идентифицират с мас-спектометрични анализи.

7.3.2. Резултати от мас-спектрометричните анализи

Резултати от ESI /LC-MS-MS/ масспектрометричния анализ

Масспектрометричните анализи са проведени на платформата „*Biopolymers-Interaction-Structural Biology"*в INRA Center Nantes, Франция (INRA Research Unit 1268). Масспектрометрията *(LC-ESI/MS*) беше извършена, като се използва *Waters-600 controller system*. Mass данните бяха придобити с помощта на *X-Calibur версия 1.3 софтуер.* Хроматографското разделяне се извърши върху колона *RP,* при скорост на потока от 150 µl.min-1, при условията, описани по-горе.

Голяма част от пептидите намерени, чрез LC-MS-MS метода, са в ултрафилтратите от краве бяло саламурено сирене. Най-голямата част от детектираните пептиди в кравето бяло саламурено сирене на 30 дни произхождат от αS1-казеиновата хидролиза, много пептиди са намерени и от β-казеина. Само 4 пептида са намерени от αS2-казеина. В

таблица 18 са показани намерените пептиди в краве бяло саламурено сирене на 30 дни с LC-MS-MS.

Табл. 6. Пептиди, идентифицирани в краве бяло саламурено сирене на 30 дни с LC/MS/MS.

Наблюдавана маса	Изчислена маса	Пептидна секвенция	Фрагмент	Тип казеин
939.26	939.45	T.YKQEKNM.A	20-26	αS2-CN
776.10	776.38	Y.KQEKNM.A	21-26	
601.16	601.31	A.LNEIN.Q	82-86	
1137.28	1137.58	Q.GPIVLNPWDQ.V	102-111	
1139.71	1139.68	RPKHPIKHQ.G	1-9	αS1-CN
1534.93	1534.88	-RPKHPIKHOGLPQ.E	1-13	
1664.9		RPKHPIKHQGLPQE.V	1-14	
1989.88	1990.12	RPKHPIKHOGLPQEVLN.E	1-17	
2345.86	2346.29	RPKHPIKHQGLPQEVLNENL.L	1-20	
758.10	758.42	K.HPIKHQ.G	4-9	
1608.36	1608.87	K.HPIKHQGLPQEVLN.E	4-17	
601.16	601.31	V.LNENL.L	16-20	
661.24	661.39	E.NLLRF.V	19-23	
805.07	805.4	F.FVAPFPE.V	24-30	
904.24	904.47	F.VAPFPEVF.G	25-32	
1801.59	1801.96	F.VAPFPEVFGKEKVNEL.S	25-40	
805.17	805.40	V.APFPEVF.G	26-32	
673.13	673.37	F.GKEKVN.E	33-38	
915.19	915.50	F.GKEKVNEL.S	33-40	
616.11	616.35	G.KEKVN.E	34-38	
730.17	730.9	K.EKVNEL.S	35-40	
1271.54	1271.81	L.RLKKYNVPQL.E	100-109	
1002.35	1002.62	L.KKYKVPQL.E	102-109	
583.12	583.36	Y.KVPQL.E	105-109	
920.08	920.37	N.SAEERLH.S+P-Ser	115-121	
771.17	771.37	E.ERLHSM.K	118-123	
781.12	781.41	M.KEGIHAQ.Q	124-130	
936.97	935.49	Y.PELFRQF.Y	147-153	
674.12	674.32	-.RELEE.L	1-5	β-CN
3846.16	3846.70	-RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIE.K+4P-Ser.	1-31	
631.03	631.31	R.ELEEL.N	2-6	
616.11	616.31	E.LEELN.V	3-7	
3181.20	3181.50	N.KKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF.A+P-Ser.	28-52	
3053.03	3053.4	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF.a+PHOSPHO S	29-52	
3481.17	3481.60	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPFAQTQ.S+P-Ser.	29-56	
755.22	755.40	Q.DKIHPF.A	47-52	

592.98	593.28	P.FAQTQ.S	52-56	
3822.18	3822.05	L.VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM..G	59-93	
816.24	816.47	M.GVSKVKEA.M	94-101	
627.84	628.35	A.PKQKE.M	104-108	
3302.976	3302.71	Y.PVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSW.M	115-143	
3023.24	3023.63	L.SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF.L	164-190	
1879.85	1880.05	L.YQEPVLGPVRGPFPIIV	193-209	
1718.0		Y.QEPVLGPVRGPFPIIV	194-209	
1589.9		Q.EPVLGPVRGPFPIIV	195-209	
1264.7		Q.EPVLGPVRGPFP.I	195-206	

От пептидите, идентифицирани в кравето БСС на 30 дни от зреенето, 22 пептида бяха определени, като биологично активни. От тях дванадесет БАП са от αS1-казеина и десет са от β-казеина. От αS1-CN са освободени шест ACE-инхибиторни пептида, един – имунопептид, четири αS1-казокинина и един – казеино-фосфопептид. От β-CN са освободени четири казеино-фосфопептида, два мултифункционални пептида, един ACE-инхибиторен пептид, един – антибактериален, един β-казокинин и един – имунопептид.

Резултати от MALDI TOF спектрометричния анализ

Ултрафилтратите на сирената бяха анализирани с MALDI TOF mass-спектрометър на Autiflex III Smartbeam, Bruker apparatus. Беше избран обхват m/z 800 – 3500. За идентификация на пептидите, данните са обработени в BIOPEP data base. По признака маса/заряд (m/z) са идентифицирани някои от продуцираните пептиди, които са биоактивни в "on line" базата данни BIOPEP – (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index_en.php) и е установено тяхното място в молекулата на казеина.

Повече от сто пептиди бяха намерени, чрез MALDI TOF анализа. На таблици 7, 8 и 9 са показани намерените пептиди от казеиновата хидролиза на α-S1, α-S2 и β-казеина.

Табл. 7. Пептиди генерирани от αS1-казеина в Българското бяло саламурено сирене

Секвенция	Фрагмент	Краве БСС	Козе БСС	Овче БСС
RPKHPIKHQ.G	1-9	X	X	X
-RPKHPIKHOGLPQ.E	1-13	X	X	X
RPKHPIKHQGLPQE.V	1-14	X		X
RPKHPIKHOGLPQEVLN.E	1-17	X	X	X
RPKHPIKHQGLPQEVLNENL.L	1-20	X	X	X
K.**HPIKHQ**.G	4-9	X		X
K.HPIKHQGLPQEVLN.E	4-17	X		N
Q.GLPQEVLN.E	10-17			X
E.VLNENLL.R	15-21			X

V.LNENL.L	16-20	X		
N.ENLLRF.F	18-23		X	X
E.NLLRF.V	19-23	X		X
F.FVAPFPE.V	24-30			X
F.**VAPFPEVF**.G	25-32	X	X	X
F.**VAPFPEVFGKEKVNEL**.S	25-40	X		
V.**APFPEVF**.G	26-32	X		X
F.GKEKVN.E	33-38	X		
F.GKEKVNEL.S	33-40	X		
G.KEKVN.E	34-38	X		
K.EKVNEL.S	35-40	X		
K.VNELSKDI.G	37-44		X	X
(K)VNELSKDIGSE(S)	52-62		X	X
(E)DVPSERYLGY(L)	85-94	X	X	X
L.RLKKYNVPQL.E	100-109	X	X	X
L.**KKYKVPQL**.E	102-109	X		
Y.**KVPQL**.E	105-109	X		
N.**SAEERLH**.S+P-Ser	115-121	X		X
E.ERLHSM.K	118-123	X		
M.KEGIHAQ.Q	124-130	X		
Y.PELFRQF.Y	147-153	X		
(Q)LDAYPSGAWYYVPLG(T)	156-170	X	X	
(A)WYYVPLGTQYTDAPS(F)	164-178	X	X	X
Общ брой пептиди, намерени при БСС, генерирани от αs1-казеина.	32			
Общ брой пептиди, намерени при краве БСС.	27			
Общ брой пептиди, намерени при козе БСС.	12			
Общ брой пептиди, намерени при овче БСС.	20			

Табл. 8. Пептиди генерирани от αS2-казеина в Българското бяло саламурено сирене.

Секвенция	Фрагмент	Краве БСС	Козе БСС	Овче БСС
T.YKQEKNM.A	20-26	X		X
Y.KQEKNM.A	21-26	X	X	X
K.ENLCS.T	33-37		X	
K.ENLCSTFC.K	33-40		X	
K.EVVRNANEEE.Y	42-51		X	X
A.LNEIN.Q	82-86	X		
Q.GPIVLNPWDQ.V	102-111	X		
L.**KKISQ**.R	165-169			X
Общ брой пептиди намерени при БСС, генерирани от αS2-казеина.	8			
Общ брой пептиди, намерени	4			

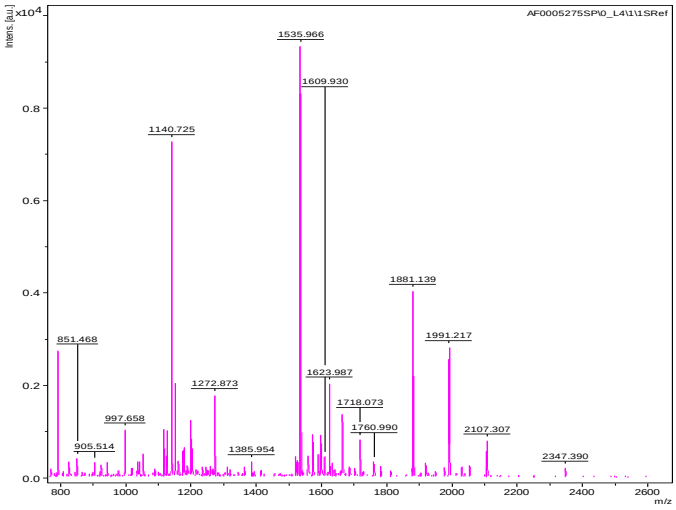
при краве БСС	
Общ брой пептиди, намерени при козе БСС	4
Общ брой пептиди, намерени при овче БСС	4

Табл. 9. Пептиди генерирани от β-казеина в Българското бяло саламурено сирене.

Секвенция	Фрагмент	Краве БСС	Козе БСС	Овче БСС
-.RELEE.L	1-5	X		
-**RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIE**.K+4P-Ser.	1-31	X		
R.ELEEL.N	2-6	X		
E.LEELN.V	3-7	X		
N.**KKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF**.A+P-Ser.	28-52	X		
K.**KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF**.a+PHOSPHO S	29-52	X		
K.**KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPFAQTQ**.S+P-Ser.	29-56	X		
Q.DKIHPF.A	47-52	X		
P.FAQTQ.S	52-56	X		
L.**VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM**.G	59-93	X		
M.GVSKVKEA.M	94-101	X		
A.PKQKE.M	104-108	X		
Y.PVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSW.M	115-143	X		
L.**SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF**.L	164-190	X		
(I)QAFLLYQEPVLGPV(R)	188-201		X	X
(F)LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	191-209	X	X	X
(L)LYQEPVLGPVRGPFPIIV	192-209	X	X	X
L.**YQEPVLGPVRGPFPIIV**	193-209	X	X	X
Y.**QEPVLGPVRGPFPIIV**	194-209	X	X	X
Q.**EPVLGPVRGPFPIIV**	195-209	X		X
Q.**EPVLGPVRGPFP**.I	193-206	X		
L.**GPVRGPFPIIV**	199-209		X	X
Общ брой пептиди намерени при бялото саламурено сирене, генерирани от β-казеина.	22			
Общ брой пептиди намерени при краве бяло саламурено сирене.	20			
Общ брой пептиди намерени при козе бяло саламурено сирене.	6			
Общ брой пептиди намерени при овче бяло саламурено сирене.	7			

На фигури 31 – 33 са показани масите на пептидите и интензитета на пиковете.

а) 1 ден

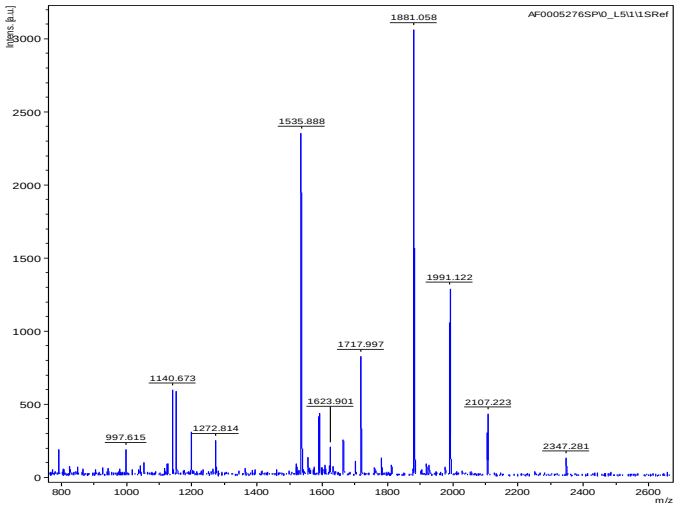


Пептиди:

m/z 1535.966

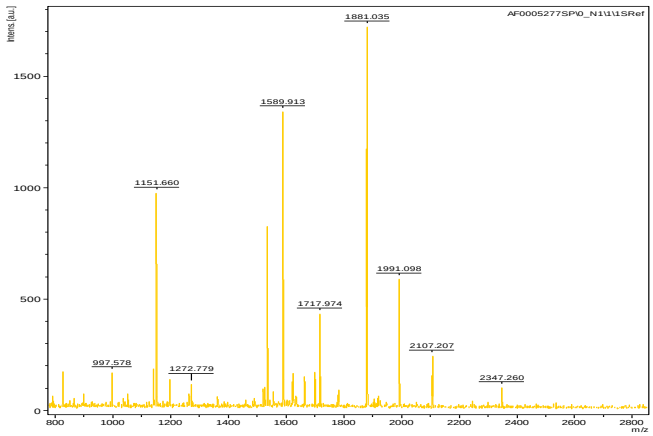
α-S1f(1-13)
m/z 1609.930
α-S1f(4-17)
m/z 1140.725
α-S1f(1-9)
m/z 1881.139
β-cn f(203-219)

б) 20 ден



m/z 1881.051

β-cn f(203-219)
m/z 1535.888
α-S1f(1-13)
m/z 1991.122
α-S1f(1-17)
m/z 1140.673
α-S1f(1-9)

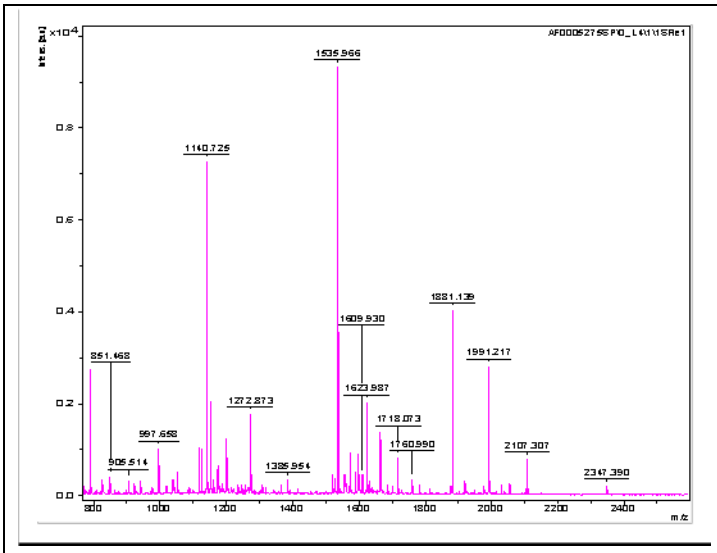


m/z 1881.035

β-cn f(203-219)
m/z 1589.913
β-cn f(194-209)
m/z 1151.660
β-cn f(203-219)
m/z 1991.098
α-S1f(1-17)

в) 30 ден

Фиг. 32. Пептиди от казеините определени с MALDI-TOF анализ в Българско краве бяло саламурено сирене по време на зреенето му (а, б, в).



а) 1 ден

Пептиди:

m/z 1535.966

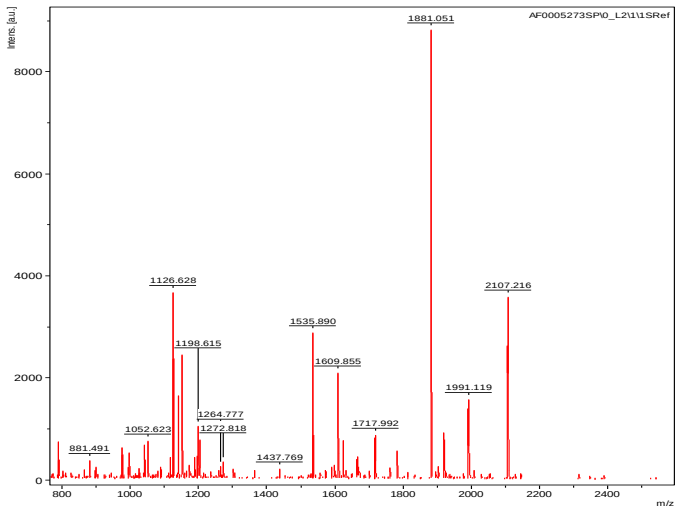
α-S1f(1-13)

m/z 1140.725

α-S1f(1-9)

m/z 1881.139

β-cn f(203-219)



б) 20 ден

m/z 1881.051

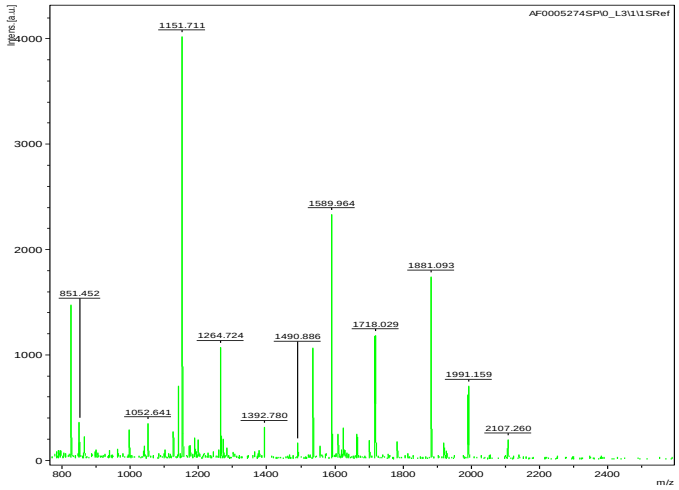
β-cn f(203-219)

m/z 1126.628

α-S1f(1-9)

m/z 2107.216

β-cn f(191-209)



в) 30 ден

m/z 1151.711

α-S1f(1-9)

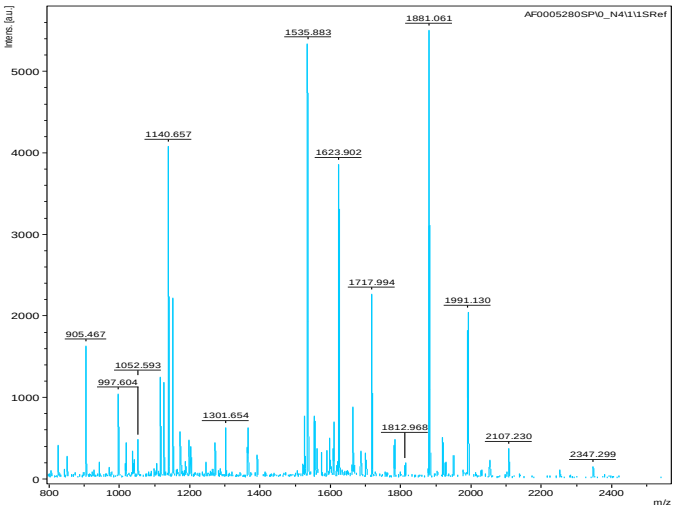
m/z 1589.964

β-cn f(194-209)

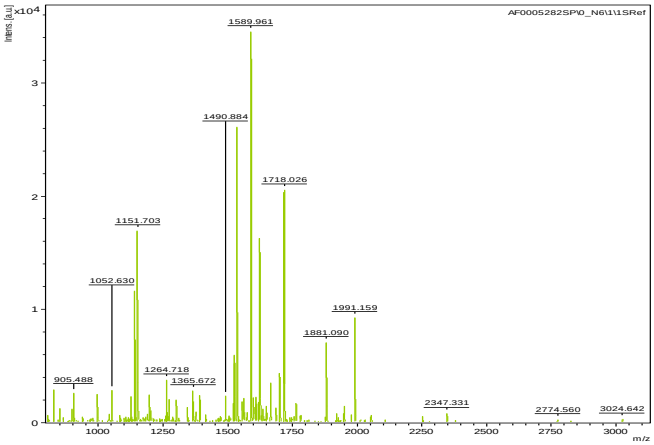
m/z 1881.093

β-cn f(203-219)

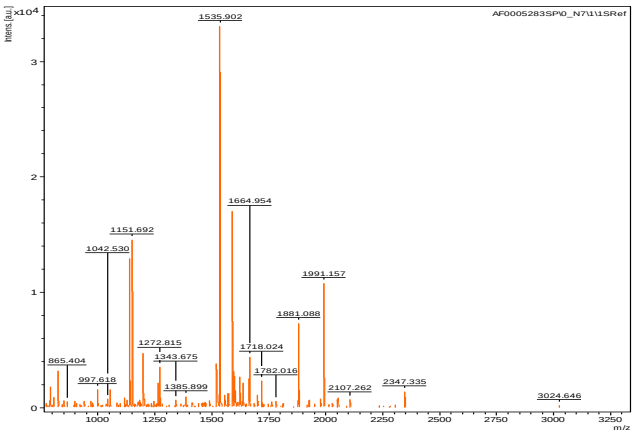
Фиг. 33. Пептиди от казеините определени с MALDI-TOF анализ в Българско козе бяло саламурено сирене по време на зреенето му (а, б, в).



а) 1 ден



б) 20 ден



в) 30 ден

Пептиди:

m/z 1535.966

α-S1f(1-13)

m/z 1609.930

α-S1f(4-17)

m/z 1140.725

α-S1f(1-9)

m/z 1881.139

β-cn f(203-219)

m/z 1881.051

β-cn f(203-219)

m/z 1535.888

α-S1f(1-13)

m/z 1991.122

α-S1f(1-17)

m/z 1140.673

α-S1f(1-9)

m/z 1881.035

β-cn f(203-219)

m/z 1589.913

β-cn f(194-209)

m/z 1151.660

β-cn f(203-219)

m/z 1991.098

α-S1f(1-17

Фиг. 34. Пептиди от казеините определени с MALDI-TOF анализ в Българско овче бяло саламурено сирене по време на зреенето му (а, б, в).

При трите вида сирена са намерени приблизително едни и същи пептиди. Някои от пептидите се установяват посредством двата метода LC/MS/MS и MALDI TOF. Други пептиди се установяват само посредством единия метод. Това означава, че двата метода са взаимно допълващи се. С MALDI-TOF анализа намерихме пептиди с маси между 800 и 3000, а с LC/MS/MS пептиди с маса между 200 и 2000.

В кравето бяло саламурено сирене са намерени 51 пептиди, в овчето бяло саламурено сирене са - 31 пептида и в козето бяло саламурено сирене са намерени 22 пептида (табл. 7 – 9).

Пептид αs1-CN (f35-40) намерихме само в кравето БСС. В кравето бяло саламурено сирене на 30 дни се установяват пептиди с най-голям интензитет от αs1-CN (f1-9) и β-CN (f194-203 и f203-219) – (фиг. 32). Пептиди αs1-CN f(24-30) и β-CN f(199-209) не са открити при кравето саламурено сирене.

В козето бяло саламурено сирене на 30 дни се установяват също най-много пептиди от αs1-CN, като се наблюдава тенденция за увеличаване на пептиди освободени от β-CN (фиг. 33). С най-голям интензитет са фрагменти αs1-CN (f1-9, f24-30) и от β-CN (f194-209 и f203-219).

В овчето саламурено сирене на 30 дни се установяват предимно пептиди от αs1-CN като също се наблюдава тенденция за увеличаване на пептидите освободени от β-CN. Пептидите с най-голям интензитет от αs1-CN са фрагменти (f1-9, f4-17, f1-13 и f1-17) – (фиг. 34). Пептид αs1-CN f(24-30) - 806 m/z се наблюдава с най-висока концентрация в овчето сирене на 60 дни.

Пептиди от αs1-CN f(1-9) - 1140 m/z, f(1-17) - 1991 m/z, f(1-20) – 2347 m/z запазват постоянна концентрация през целия период на зреене при всички видове сирене.

Пептид αs1-CN f(25-32) не беше открит в овчето и козе сирене на 60-я ден.

Концентрацията на пептида β-CN f(194-209) показва пик на 30-я ден от зреенето на козето и овче сирене.

Идентифицираният пептид αs1-CN f(1-20) се наблюдава при козето сирене на първия ден. В кравето и овчето сирене се наблюдава през целия период на зреене, като пикове има в овчето сирене на 30 и 60-я ден.

Фрагменти f (1-9, 1-13, 1-17, 1-20, 100-109) генерирани от αS1-казеина се срещат при трите вида сирена. Фрагмент f (21-26) генериран от αS2-казеина и фрагменти f (191-209, 192-209, 1-17, 193-209, 194-209) генерирани от β-казеина се срещат при трите вида сирена.

Между намерените пептиди в изследваните бели саламурени сирена с MALDI-TOF 24 пептида са определени, като биологично активни пептида. Единадесет от тях са намерени от αS1-CN: шест ACE-инхибиторни пептида, шест αS1-казокинина, един казеинофосфопептид и един имунопептид. Дванадесет БАП са намерени от β-казеина: един ACE-пептид, четири казеино-фосфопептида, един имунопептид, един β-казокинин, един антибактериален пептид и четири мултифункционални пептида. От освободените пептиди от αS2-CN е намерен един биоактивен пептид с антимикробна активност. Ние свързахме получените пептиди с пептидите описани в JAFC 2001-gagnaire. Някои пептиди са известни. (Табл. 10).

Табл. 10. Познати Биоактивни пептиди.

№	Пептиди	Секвенция	Биоактивност	Литература
1	aS1-CN 1-9	RPKHPIKHQ.G	ACE инхибиране	Jeffery R, 1998, Saito et. al., 2000, Ryhanen et al., 2001
2	aS1-CN 1-17	RPKHPIKHQGLPQEVLN.E	ACE инхибиране	Oommen B. S et al., 2002
3	aS1-CN 1-20	RPKHPIKHQGLPQEVLNENL.L	Имуномодулиращи и антибактериални пептиди	Lachov and Regelson, 1996
4	aS1-CN 4-9	K.HPIKHQ.G	ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999,
5	aS1-CN 24-27	FVAP	ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Maruyama et al., 1985
6	aS1-CN 24-30	F.FVAPFPE.V	ACE инхибиране aS1-казокинин	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
7	aS1-CN 25-27	VAP	ACE инхибиране	Meisel,H et. al.,1999, Meisel,H et. al.,1993 Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Ong L., 2007, Maruyama et al., 1987b
8	aS1-CN 25-32	F.VAPFPEVF.G	ACE инхибиране aS1-казокинин	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000
9	aS1-CN 25-40	F.VAPFPEVFGKEKVNEL.S	ACE инхибиране aS1-казокинин	Fitzgerald, R.J. et. al 2000
10	aS1-CN 26-32	V.APFPEVF.G	ACE инхибиране	Fitzgerald, R.J. et. al 2000
11	aS1-CN 27-30		ACE инхибиторен пептид, казокинин	Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Maruyama et al., 1987b
12	aS1-CN 28-34	FPEVFGK	ACE инхибиторен пептид, казокинин	Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Maruyama et al., 1987b
13	aS1-CN 32-34	FGK	ACE инхибиторен пептид, казокинин	Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Maruyama et al., 1987b
14	aS1-CN 102-109	L.KKYKVPQL.E	ACE инхибиране	Fitzgerald, R.J. et. al 2000 McCann et al., 2006
15	aS1-CN 105-	Y.KVPQL.E	ACE инхибиране	McCann et al., 2006

	109			
16	aS1-CN 115-121	N.SAEERLH.S+P-Ser	Казеино-фосфопептид, ACE инхибиране	Fitzgerald, R.J. et. al 2000 McCann et al., 2006
17	β-CN 1-31	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIE.K+4P-Ser.	Казеино-фосфопептид, ACE инхибиране	Meisel, H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
17	β-CN 28-52	N.KKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF.A+P-Ser.	Казеино-фосфопептид, ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
19	β-CN 29-52	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPF.a+PHOSPHO S	Caseinophospho peptide, ACE inhibition	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
20	β-CN 29-56	K.KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPFAQTQ.S+P-Ser.	Казеино-фосфопептид, ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, 2013
21	β-CN 47-52	Q.DKIHPF.A	ACE инхибиране	Ong et al., 2007
22	β-CN 59-93	L.VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM..G	Имунопептид, ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999
22	β-CN 60-66	YPFPGPI	ACE инхибиране, Пептид с опоидна активност	Saito,T., 2000, Fitzgerald, R.J. et. al 2000
23	β-CN 60-70	YPFPGPIPNSL	ACE инхибиране, Пептид с опоидна активност	Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
24	β-CN 63-68	PGPIPN	Имунопептид	Meisel, H et. al,1999, Saito et al., 2000, Migliore-Samour and Jolles, 1988, Parker et al., 1984
25	β-CN 74-76	IPP	ACE инхибиране	Meisel, H et. al,1 999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Dziuba M., et al., 2009, Nakamura et al., 1995a
26	β-CN 84-86	VPP	Антихипертензивен пептид, Опоидна антагонистична активност	Meisel, H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Dziuba M., et al., 2009, Nakamura et al., 1995a
27	β-CN 164-190	L.SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF.L	ACE инхибиране, β-казокинин	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000,
28	β-CN 169-175	KVLPVP	ACE инхибиране	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Maruyama et al., 1987b, Lopez-Fandino et al., 2006
29	β-CN 177-181	AVPYP	ACE инхибиторен пептид, казокинин	Meisel,H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Gobbetti, M., et. Al., 2004, Dziuba M., et al., 2009,
30	β-CN 177-179	AVP	ACE инхибиторен пептид, казокинин	Gobbetti, M., et al., 2004, Dziuba M., et al., 2009
31	β-CN 177-183	AVPYPQR	Антихипертензивен пептид	Pilanto A., 2006, Dziuba M., et al., 2009, Maruyama&Suzuki, 1982, Maruyama et al., 1987a,b, Meisel&Schlimme, 1994,

				Sofia V., Silva, F. Xavier Malcata, 2004
32	β-CN 193-209	L.YQEPVLGPVRGPFPIIV	Антимикробна и Имуномодулаторна активност, Митогенен ефект, ACE инхибиране	Jeffery R, 1998, Meisel, H., 1999
34	β-CN 181-183	PQR		Meisel, H et. al,1999, Fitzgerald, R.J. et. al 2000, Dziuba M., et al., 2009,
35	β-CN 194-209	Y.QEPVLGPVRGPFPIIV	Имуномодулираща и антибактериална активност, Пептид отговоренза горчивия вкус	International Dairy Journal, 2011
36	β-CN 195-209	Q.EPVLGPVRGPFPIIV	Антимикробна и Имуномодулаторна активност, Митогенен ефект, ACE инхибиране	Journal of Chromatographt, 2010
37	β-CN 193-206	Q.EPVLGPVRGPFP.I	Антимикробна и Имуномодулаторна активност, Митогенен ефект, ACE инхибиране	Hurley et al, 2000, Larsen, L.B., et al., 2010
38	β-CN 199-209	L.GPVRGPFPIIV	Антимикробна и Имуномодулаторна активност, Митогенен ефект, ACE инхибиране	Larsen L.B. et. al., 2010

Пептиди, описани като биологично активни от редица автори (Meisel H., et al., 1999; Lachov and Regelson, 1996; Recio et al., 2005; Dziuba M., et al., 2009; Fitzgerald R.J., et al., 2000, 2013) присъстват в анализираните от нас ултрафилтрати от БСС.

По-голямата част от идентифицираните от нас биоактивни пептиди са пептиди проявяващи ACE-инхибиране. За пептиди с подобна секвенция, установени в овчи и кози млечни продукти, съобщават и много други автори (McCann et al., 2006; Lopez-Exposito et al., 2006). Намерените пептиди са освободени от α- и β-казеина и се откриват при всички саламурени сирена с време на зреене 30 дни. Сиренето и млечните продукти са богат източник на биоактивни пептиди (Fox PF., et al., 1996; Silva SV.& FX Malcata, 2005; Sieber R. et al., 2010). По време на зреенето на бялото саламурено сирене се освобождават голям брой пептиди с различна дължина на веригите. Една голяма част от пептидите могат да се отнесат, като пептиди с ACE–инхибираща активност, неспецифични пептиди с различна дължина и секвенция на аминокиселините. Според някои автори концентрацията на ACE инхибиращи пептиди до 570 μg/g е обещаващо с оглед хранене и консумация на сирене. Според Sieber R. et al., 2010 много трудно може да се окаже влияние и да се контролира освобождаването на ACE инхибиращи пептиди по време на зреене на сиренета. Последните години редица учени търсят естествени ACE-инхибитори, без странични ефекти. Такива естествени инхибитори са ACE-инхибиторните пептиди, съдържащи се в

протеините на рибите, стридите, желатина и царевицата. Млечните протеини също са източник на редица АСЕ-инхибиращи пептиди. Въпреки, че естествените АСЕ-инхибиторни пептиди не са толкова силни колкото синтетичните АСЕ-инхибитори, те могат да бъдат интегрирани в храната ни и също да ни предпазват от хипертония. Засега АСЕ-инхибиторни пептиди се получават предимно от протеини на млякото.

αS1-цитокинин в литературата е известен, като многофункционален биоактивен пептид основно с АСЕ инхибиторна активност. Много пептиди извлечени от млякото показват многофункционални свойства т.е., специфични пептидни секвенции, които имат две или повече различни биологични активности. Някои региони в първичната структура на казеините съдържат припокриващи се пептидни последователности, които притежават различни свойства.

Втората най-голяма група биоактивни пептиди, която беше намерена в бялото саламурено сирене е групата на казеино-фосфопептидите. Казеино-фосфопептидите (КФП) представляват фосфорилирани казеин-производни пептиди, образувани от протеолитичното разграждане на α_{S1}-, α_{S2}- и β-казеина. Те подпомагат лечението на зъбен кариес. Повечето от намерените от нас казеино-фосфопептиди са генерирани от *β*-казеина (Табл. 9). Само един казеино-фосфопептид бе отделен от *αs1*-казеина. Много подобни пептиди от *β*-казеина са намерени и от други автори (Coste 1992; Smacchi and Gobbetti, 2000; Meisel H. and FitzGerald R. J., 2003).

Само 8 пептида са освободени от *αs2*-казеина, които произтичат от N-терминалната част на молекулата (Фиг. 8). Малкият брой намерени пептиди от този казеин могат да бъдат отнесени до ниското съдържание на *αs2*-казеина в млякото и следователно по-високата трудност при откриването на пептиди, които се генерират от него. *αs2*-CN f(165-169) антимикробен пептид е намерен само при овчето бяло саламурено сирене. Сложността на протеолитичните системи на млечнокиселите бактерии, могат да се окажат и недостатък, ако не се контролират внимателно. Например, прекалено силната протеолитична активност на МКБ може да доведе до допълнително разграждане на антимикробните пептиди до по-малки, неактивни фрагменти, веднага щом антимикробните пептиди бъдат освободени от прекурсорните молекули. Открити са множество антимикробни пептиди, но засега с най-голямо значение са пептидите, извлечени от млечни протеини. Причините са две. Първата е, че тези пептиди обикновено притежават допълнителни биологични активности, като напр. опоидна, антитромботична, имуномодулираща, антихипертонична и минерално-транспортна активност, както и физиологични функции. Втората причина е, че те са извлечени от безопасни източници, поради което техният потенциал за медицината и хранителната индустрия е огромен.

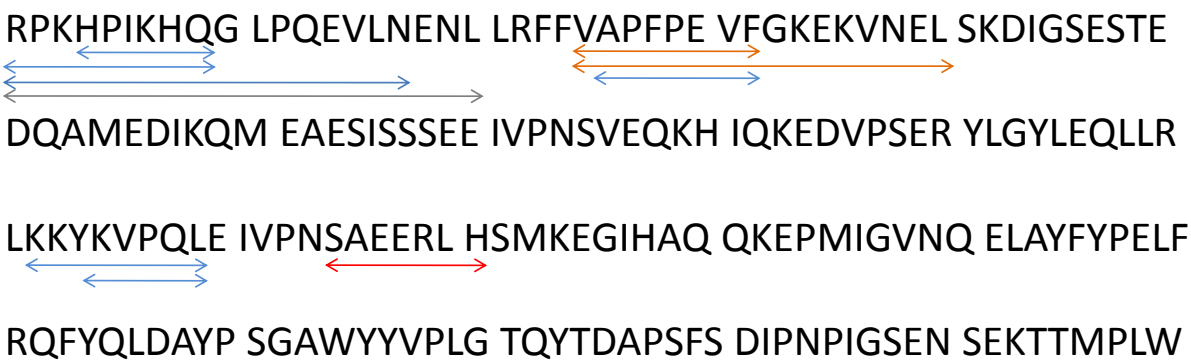
Известно е, че пептидите произхождащи от β-казеина, α-казеина и α-лакталбумина, с доказана имуностимулираща активност, влияят на фагоцитната активност (Schlimme, E. & Meisel, H., 1995 и модулират лимфоцитните функции (Migloire-Samour, D., et.al., 1989). Механизмите, по които млечнокиселите бактерии усилват имунната система са все още неясни, но е прието, че биоактивните компоненти освободени във ферментиралите продукти им придават антитуморни и усилващи имунната система свойства.

Addeo et al., 1992, Meisel et al., 1997, както и други изследват сирене Гауда и Parmigiano Reggiano на 6 и 15 месеца. Антибактериалните пептиди, които откриват в 6 месечните сирена не се откриват при 15 месечно сирене. Те правят извода, че биоактивните пептиди освободени от протеолитичните ензими по време на зреене на сиренето се разграждат допълнително до неактивни фрагменти поради обширна протеолиза.

Локализацията и секвенцията на намерените биоактивни пептиди в кравето бяло саламурено сирене са показани на фиг. 35-37.

Аминокиселинна последователност на αS1-казеин от краве мляко

199 аминокиселинни остатъка



Фиг. 35. Локализация на намерените биоактивни пептиди от αS1-казеина в ултрафилтрати от Българско краве БСС, образувани по време на зреене

Аминокиселинна последователност на αS2-казеин от краве мляко

169 аминокиселинни остатъка

KNTMEHVSSS EESIISQETY KQEKNMAINP SKENLCSTFC KEVVRNANEE

EYSIGSSSEE SAEVATEEVK ITVDDKHYQK ALNEINQFYQ KFPQYLQYLY

QGPIVLNPWD QVKRNAVPIT PTLNREQLST SEENSKKTVD MESTEVFTKK

TKLTEEEKNR LNFLKKISQR YQKFALPQYL KTVYQHQKAM KPWIQPKTKV

IPYVRYL

Фиг. 36. Локализация на намерените биоактивни пептиди от αS2-казеина в ултрафилтрати от Българско краве БСС, образувани по време на зреене

Аминокиселинна последователност на β-казеин от краве мляко

209 аминокиселинни остатъка

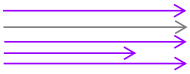
RELEELNVPG EIVESLSSSE ESITRINKKI EKFQSEEQQQ TEDELQDKIH

PFAQTQSLVY PFPGPIPNSL PQNIPPLTQT PVVVPPFLQP EVMGVSKVKE

AMAPK(H/Q)KEMP FPKYPVEPFT ESQSLTLTDV ENLHLPLPLL QSWMHQPHQP

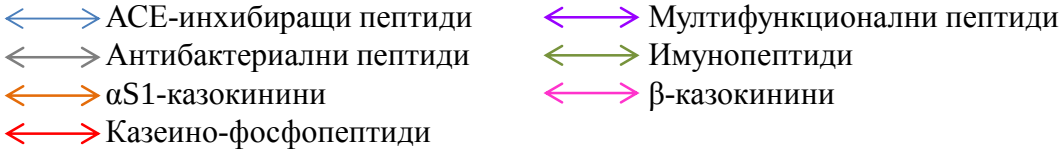
LPPTVMFPPQ SVLSLSQSKV LPVPQKAVPY PQRDMPIQAF LLYQEPVLGP

VRGPFPIIV



Фиг. 37. Локализация на намерените биоактивни пептиди от β-казеина в ултрафилтрати от Българско краве БСС, образувани по време на зреене

Легенда:



Биологичните активности на биоактивните пептиди се определят от структурните характеристики, хидрофобността, валентността, съставът и секвенцията на аминокиселините, съставящи въпросните пептиди. Много пептиди проявяват мултифункционални свойства т.е. имат повече от една биологична активност. Освен това е известно, че присъствието на главни аминокиселини придава на биоактивните пептиди специфични функции.

Видът на освободените аминокиселини и пептиди зависят пряко, както от съставът на протеините в млякото, така и от типа на протеолитичните ензими синтезирани от стартерната култура. Видът на стартерната култура е един от основните фактори за вида на синтезираните биоактивни пептиди. При хидролизата казеинът се разпада под действието на ензимите в клетъчната стена и автолизата им.

Протеолизата е основното събитие, което се случва по време на зреенето на сиренето. Непрекъснатото разцепване на αs1-казеина (199 аминокиселини), β-казеина (209 аминокиселини) и к-казеина (105 аминокиселини = f1-105 на к-казеин) по време на зреене на сиренето в полипептиди и тяхното по-нататъшно разграждане в олигопептиди и свободни аминокиселини води до образуването на голям брой пептиди в сиренето. Много автори проучват образуването на биоактивни пептиди в различни видове сирена (Fox PF., et al., 1996; Sieber V. S., F.X. Malcata, 2005; Rizzello CG et al., 2005; Gomez-Ruiz J.A., et al., 2006, 2007; Ong L.&N.P. Shah, 2008). Високоефективна течна хроматография (HPLC), в комбинация с различни масспектрометрични (MS) техники, се прилага успешно в няколко проучвания за идентифициране и количествено определяне на ACE-инхибиращи пептиди в сиренето (Lee et al., 2005a; Siber R., et al., 2010).

Ong L., et al., 2007, проучват освобождаването на три различни пептида в три варианта на сирене „Чедер", направени със лактококова закваска, като контрола и пробиотични закваски: *L.casei 279* или *L.casei LAFTI® L26* добавени към лактококовата закваска. Следните седем ACE инхибиращи пептиди са били идентифицирани в четири различни фракции: RPKHPIKHQ, RPKHPIK, RPKHPI, DKIHPF, FVAPFPEVE, KKYKVPQLE и RPKHPIKVLGPFPIV. Беше потвърдено, че ACE-инхибиторната активност на сиренните екстракти се влияе значително от степента на зрялост на сиренето. Повечето от ACE-инхибиращите пептиди се натрупват в по-ранните етапи на зреене.

В други проучвания поведението на фракциите съдържащи пептиди RPKHPIKHQ, RPKHPIK, RPKHPI се различава значително. Получените резултати показват, че много трудно може да се окаже влияние и да се контролира освобождаването на ACE-инхибиращи пептиди по време на зреене на сиренето.

Концентрацията на АСЕ–инхибиращите пептиди, като например VPP и IPP в сиренатa изглежда се влияе от различни фактори такива, като използваните стартерни култури, предварителната обработка на млякото и условията на зреене на сиренето. За да се разработи технология за производство на сирене, при която добива на сиренето и максималните концентрации на VPP и IPP да са постоянни е необходимо да се изследват количествено споменатите по-горе фактори, които оказват влияние за освобождаване на VPP и IPP (Sieber R. et al., 2010).

Подбора на стартерната култура, която се използва при производството на сирене е от особено важно значение за образуване на биоактивни пептиди. Протеолитичната активност на скринираните щамове е ключов фактор за образуването на биоактивни пептиди. Включването на щамове с пробиотичен потенциал в закваските за млечнокисели продукти е начин за обединяване на пробиотични микроорганизми и функционални храни. Функционалните храни съдържащи биологично активни пептиди стимулират или подпомагат определени функции в човешкия организъм и имат здравословно въздействие върху него.

Това проучване допринася за обогатяване на знанието за съдържанието на свободни аминокиселини в Българското бяло саламурено сирене и тяхното влияние върху формиране на вкуса, аромата и хранителната стойност на сиренето.

Биоактивните пептиди се определят като „пептиди с хормонална или лекарствено подобна активност, която евентуално променя физиологичните функции, чрез свързването на специфични рецептори от определената клетка, което води до индукцията на физиологичен отговор**.** Бионаличието на такива пептиди е важна предпоставка за да се получи ефект *in vivo*.

Биоактивните пептиди са пептиди, притежаващи разнообразни биологични активности. Тези активности са обект на засилени проучвания, заради многобройните благоприятни ефекти върху организма на човека. Потенциалът на биоактивните пептиди е огромен, тъй като те могат да бъдат предлагани на пазара, като хранителни добавки или да бъдат включени в хранителните продукти, като техни функционални съставки. По този начин, храната, която приемаме, ще играе ролята на лекарство, намаляващо риска от поява на различни заболявания. (Ivanova I., et al., 2013).

И З В О Д И

Въз основа на поставените задачи и резултатите от извършените експерименти можем да направим следните изводи:

1. От изследваните 72 щама млечнокисели бактерии, най-широк спектър на антимикробна активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии показват пет щама (четири лактобацила - *L. bulgaricus* b21 и b5, *L. helveticus* Q40 и *L. delbrueckii lactis* 1043 и един стрептокок *S. thermophilus* t2). От изследваните 22 стартерни култури за кисело мляко, сирене и кашкавал най-широк спектър на антимикробна активност показват две стартерни култури за кисело мляко BY 24 и BY 21.

2. Протеолитичната активност на млечнокиселите бактерии култивирани в различни видове млека е по-висока при използването на козе мляко. Щамове *Lc. lactis* 598 и *L. bulgaricus* bc1 притежават най-висока протеолитична активност култивирани в козе мляко.

3. От трите групи млечнокисели бактерии, щамовете от род *Lactococcus* проявяват най–силна антихолестролната активност, а най-слаба антихолестеролна активност проявяват щамовете от вида *S. thermophilus.* Най-значима антихолестеролна активност показват щамове *Lc. lactis* 598 и *S. thermophilus* t12.

4. Електрофоретичният анализ на суроватъчните фракции показва формиране на нискомолекулни белтъчни фрагменти с молекулна маса 4-5 kDa.

5. Изследваните щамове показват висока чувствителност към стомашен сок, при *in vitro* симулирани условия на изследване. Най-чувствителни са представителите на *p. Lactobacillus*. Изследваните култури показват висока степен на преживяемост в интестинален сок. *S. thermophilus tc1* се отличава с добра транзитна толерантност и може успешно да премине киселинната бариера на стомашния тракт.

6. *L. bulgaricus* b21 е определен, като щам с умерено адхезивни способности.

7. Определените аминокиселини в белите саламурени сирена от различни видове млека варират по отношение на вида и количеството им в процеса на зреене на сиренето. Максимална концентрация на свободните аминокиселини при

различните видове бяло саламурено сирене се достига на 30-я ден.

8. Основните свободни аминокиселини по време на целия период на зреене при всички видове бели саламурени сирена са левцин (Leu), фенилаланин (Phe), аргинин (Arg), валин (Val) и пролин (Pro). Левцинът (Leu) е с най-висока концентрация.

9. Концентрациите на различните аминокиселини в Българското бяло саламурено сирене са свързани с технологията на производство, стартерните култури и условията на зреенето.

10. Сто пептида са намерени по време на зреенето в различни видове Българско бяло саламурено сирене, чрез мас-спектрометричен анализ. От тях двадесет и четири пептида са биологично активни.

11. От αS1-казеина са намерени единадесет биологично активни пептида, от тях шест ACE инхибиторни пептида, три αS1-казокинини, един казеино-фосфопептид и един имунопептид.

12. От αS2-казеина е намерен един биологично активен пептид с антибактериална активност.

13. От β-казеина са намерени дванадесет биологично активни пептида. От тях един ACE инхибиторен пептид, четири мултифункционални пептида, четири казеино-фосфопептида, един β-казокинин, един имунопептид и един антибактериален пептид.

14. Максимална концентрация на биологично активни пептиди се наблюдава във всички видове бели саламурени сирена на 30-я ден от зреенето.

ПРИНОСИ

Приноси с научен характер

1. За първи път са намерени над сто пептиди с важни биологични свойства в краве, козе и овче Българско бяло саламурено сирене, които се отделят в процеса на зреенето на сиренето.

2. За първи път е доказана динамиката на свободните аминокиселини, които се освобождават по време на зреене на краве, козе и овче Българско бяло саламурено сирене.

Приноси с приложен характер

1. Изготвената пробиотична характеристика на стартерна култура LBB BY 21 е предпоставка за по-широкото й използване, като търговска култура предназначена за производството на различни млечни продукти, както и като компонент на различни пробиотични препарати.

2. За първи път на промишлено произведено Българско бяло саламурено сирене е направена характеристика на наличните биологично активни пептиди имащи здравословен ефект.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Jivka Atanasova,** Penka Moncheva, Iskra Ivanova, **2014.** Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, Volume 28, Number 6, December 2014, p. 1073-1078;

2. **Atanasova, J.**, I. Ivanova, **2010.** Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins – *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*. 24/**2010**/2. **Cited 14 Scopus.**

3. N. Kirilov, T. Petkova, **J. Atanasova**, Sv. Danova, I. Iliev, Y. Popov, T. Haertle, & I. V. Ivanova, **2009**. Proteolytic Activity in Lactic Acid Bacteria from Iraq, Armenia and Bulgaria, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 23:sup1, 643-646. **Cited 2 Scopus.**

4. Савова Т., З. Николов, **Ж. Атанасова, 1996.** Лактобацилус казеи: преживяемост в стомашно-чревния тракт и антимутагенна активност, сп. „Животновъдни науки", 7, 55-57.

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ И ПРОЕКТИ

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Jivka Atanasova,** Penka Moncheva, Iskra Ivanova, **2013.** Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk, "Bioscience development and new opportunities" – KLIMENTS"S DAYS (постер);

2. **J. Atanasova,** D. Yordanova, Z. Urchev, I. Ivanova, Zdr. Nikolov, **2010.** Asimilation of cholesterol by lactic acid bacteria. Twelfth Congres of the Bulgarian Microbiologists, October, **2010**, (постер);

3. Kirilov, N., Stojanovski, S., **Atanasova, J**., Dimov, S. and Ivanova I., **2009.** "Proteolytic activity of *Enterococcus spp*. isolated from milk and home made cheeses." SIXTH BALKAN CONGRESS OF MICROBIOLOGY – MICROBIOLOGIA BALKANICA **2009,** 6.26P, October 28-31 2009, Ohrid, Macedonia. (постер);

4. Kirilov N, T. Petkova, **J. Atanasova**, Sv. Danova, I. Iliev, Y. Popov, T. Haertle and I. V. Ivanova, **2009.** Proteolytic activity in lactic acid bacteria from Iraq, Armenia and Bulgaria *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*. 23/**2009**/SE, SPECIAL EDITION / ON – LINE , XI ANNIVERSARY SCIENTIFIC CONFERRENCE 120 YEARS OF ACADEMIC EDUCATION IN BIOLOGY, 45 YEARS FACULTY OF BIOLOGY. (постер);

5. Ivanova, I., Kirilov, N., Iliev, N., Danova, S. T., Dimov, S. G., **J. Krasteva**, Georgieva, R. R., Alkhaledy, S., Husseinova, N., Popov, Y., Tkhruni, F., Karapetyan, Y., el Gaish, G. S., Sitohy, S. M., Akhmad, A. N., Kuliev, K. I. A., Gulahmedov, S., Dalgalarrondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T. **2008**, *"Proteolytic Activities of the Selected LAB Strains from Balkans, Caucasus, Iraq and Egypt",* NINTH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA: HEALTH, EVOLUTION AND SYSTEMS BIOLOGY, D064, August 31 - September 5, **2008**, Egmond Zee, The Netherlands ; (постер);

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Договор за финансиране № ТК01/0442/ декември 2008 година.
„Молекулярна характеристика, имуномодулиращи свойства и механизми на здравословни ефекти при български лактобацили от различни екологични ниши". Проект съфинансиран от МОН. Ръководител: доц. Светла Данова.