



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Вероника Пенчева Немска

**БИОТЕХНОЛОГИЧНИ И ФУНКЦИОНАЛНИ
ХАРАКТЕРИСТИКИ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните
и физиологично-активните вещества)

Научни ръководители: Доц. д-р Нели Георгиева
 Доц. д-р Светла Данова, дбн

Научно жури:

1. Доц. д-р инж. Михаил Камбуров - председател
2. Проф. д-р Мария Ангелова - рецензент
3. Проф. д-р Пенка Мончева - рецензент
4. Доц. д-р Нели Георгиева
5. Доц. д-р Екатерина Крумова

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 179 страници, съдържа 29 фигури и 28 таблици. Цитирани са 376 източника. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 26.07.2017 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 18.12.2017 г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Изказвам сърдечна благодарност на научните ми ръководители доц. д-р Нели Георгиева и доц. д-р Светла Данова, дбн, за всичко, на което ме научиха през изминалите години, за ценните съвети и помощта при изготвянето на настоящия дисертационен труд.

Благодаря на всички колеги от ХТМУ, Института по микробиология – секции по Микробна генетика и Микология, секция „Вирусология” на Националния Център по Заразни и Паразитни Болести и на фирма „Аквахим” АД за оказаната помощ и съвети при разработването на експерименталната част от дисертацията.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ACV (Acyclovir)- Ацикловир

CFU (Colony Forming Units) – колония образуваща единица

CV – кристал виолет

EFSA (European Food Safety Authority) - Европейската агенция за безопасност на храните

FAO (Food and Agriculture Organization) – Организация по прехрана и земеделие

FOS – фруктоолигозахариди

GRAS (Generally Recognized As Safe) – обикновено признат за безопасен

GLOS – глюкоолигозахариди

Glu (Glucose) – глюкоза

GOS – галактоолигозахариди

Lac (Lactose) – лактоза

MAL (Maltose) – малтоза

NCCLC (National Committee for Clinical Laboratory Standards) - Национална комисия за клинични лабораторни стандарти

PCR (Polymerase Chain Reaction) – полимеразна верижна реакция

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)- Случайно амплифицирана полиморфна ДНК

STR (Starch) - нишесте

WHO (World Health Organization) – Световна здравна организация

YE – лабораторен екстракт от хлебни дрожди

БДС - Български държавен стандарт

ДЕ – дрождев екстракт

ЕПЗ – екзополизахариди

ИЗ – индустриална закваска

КБФС - Кисели безклетъчно филтрувани супернатанти

КП – пептон от казеин

МКБ – млечнокисели бактерии

МНК - максимална нетоксична концентрация

НБФС - Неутрализирани безклетъчно филтрувани супернатанти

ОСМ – обезмаслено сухо мляко

ЦТК₅₀ - цитотоксична концентрация 50%

УВОД

През последните години традиционните млечни продукти добиват все по-голяма популярност сред учени и консуматори. Понастоящем са известни над 3500 традиционни ферментирани храни по целия свят, които са част от хранителната диета на човека още от древността. Затова те могат да се разгледат като източник на млечнокисела микрофлора, съчетаваща полезни технологични характеристики и ползи за здравето на консуматорите. Тези т.нар. пробиотични ефекти включват подобряване на чревния микробиален баланс и намаляване на риска от стомашно-чревни заболявания, повишаване имунната система, намаляване нивата на холестерола в кръвта, облекчаване лактозната непоносимост, увеличаване разнообразието на хранителни вещества и др.

Положителното въздействие при консумацията на ферментационно получени храни се дължи на взаимодействието между тяхната естествена микрофлора и гостоприемника, както и на метаболитната активност на внесените живи МКБ или на синтезираните от тях метаболити по време на ферментационните процеси. По тази причина изследването на автохтонната микробиота на тези продукти е много важно за продукцията на нови функционални храни с подобрени качества.

Млечнокиселите бактерии (МКБ) са хетерогенна група микроорганизми, включваща род *Lactobacillus*, чиито видове са признати за пробиотици. Същевременно много от тях играят ролята на стартерна микрофлора във ферментирани храни и са в основата на специфичните органолептични качества на различни млечни продукти. Това доказва дългата им история на безопасна употреба и тяхната класификация като GRAS (обикновено признати за безопасни). Освен положителното си влияние върху здравето, МКБ могат да подобрят вкуса, аромата и консистенцията на продуктите и играят роля на биоконсерванти, увеличавайки по естествен начин срока на годност на храните.

Според Организацията по прехрана и земеделие и Световната здравна организация (FAO/WHO, 2006) функционалните характеристики, определящи пробиотичния потенциал и приложимост на МКБ, обикновено са щамово-специфични, което налага по-пълното изучаване и охарактеризиране на новите щамове с цел последващото им биотехнологично внедряване.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е изолирането и охарактеризирането на млечнокисели бактерии от различни традиционни за България млечни продукти и подбора на щамове с биотехнологични и функционално значими свойства.

За постигане на тази цел, бяха поставени следните задачи:

1. Подбор на различни ферментационно получени продукти и начална микробиологична оценка на автохтонната млечнокисела микрофлора.
2. Изолиране и полифазно-таксономична характеристика на МКБ от традиционни български млечни продукти (катък, кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара).
3. *In vitro* оценка на основните функционални характеристики и пробиотичния потенциал на новоизолираните МКБ.
 - 3.1. Определяне на транзитна толерантност на щамовете в симулирани условия на стомашно-чревния тракт.
 - 3.2. Характеризиране на адхезионната и биофилм-формиращата способности на МКБ, като част от механизмите за трайна колонизация и преживяване на неблагоприятните условия.
 - 3.3. Ензимна активност на лактобацилните щамове.
 - 3.4. Изследване на спектъра на антимикробната активност на новоизолираните щамове и ролята им като биоконсерванти и пробиотици.
 - 3.5. Оценка на продукцията на екзополisahариди (ЕПЗ) от лактобацили.
 - 3.6. Изследване на способността на лактобацилните щамове да усвояват различни пребиотици.
 - 3.7. Оценка на спектъра на антибиотична чувствителност на новоизолираните лактобацили, съгласно критериите на Европейската агенция за безопасност на храните и оценка на риска (EFSA).
4. Оценка на биотехнологично значими свойства на подбрани активни щамове лактобацили от български млечни продукти.
 - 4.1. Оценка на растежа в различни хранителни среди.
 - 4.2. *In vitro* оценка на способността на новоизолираните лактобацили да преживяват в условия на осмотичен стрес.
 - 4.3. *In situ* оценка на приложимостта на подбрани щамове лактобацили като добавки към закваски за получаването на млечни продукти.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Хранителни среди, разтвори, буфери и химикали

2. Микроорганизми, тест култури и условия за култивиране

Обект на изследване в настоящия дисертационен труд са МКБ, изолирани от традиционни български млечнокисели продукти (кисело мляко, катък, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара), описани в **Табл. 1**:

Табл. 1. Домашно приготвени проби и изолати от традиционни български млечни продукти.

№	Млечен продукт	Суровина	Означение на млечния продукт	Произход	Означение на изолат (щам)
1.	Извара	козе мляко	J	гр. Трън	J4A, J6B
2.	Катък	овче мляко	S1	гр. Априлци	S1, S2, S3, S4
3.	Кисело мляко	биволско мляко краве мляко овче мляко	V B M Ro3	гр. Ловеч гр. Троян гр. Харманли гр. Твърдица	V1÷V10 1B, 2B, 7B M1A, M2A Ro32, Ro33, Ro34, Ro304
4.	Бяло саламурено сирене (полутвърдо, зреещо в саламура за 12-60 дни)	биволско мляко смес: биволско и краве мляко козе мляко овче мляко	Q, R N, BS S7 S8, S9 OC, O PS Ko	гр. Дряново гр. Мездра гр. София гр. Дряново гр. Казанлък гр. Кочериново	Q1A, Q1D, Q1B; R1÷R4 N1A, N2B, N2D; BS31, BS32, BS41, BS42 S7 S8, S9 OC1, OC2; O2B, O2A S5, S6, S12 Ko1, Ko2, Ko3
	(Незряло, безсолно сирене)	краве мляко	C P, KC S10 G H	гр. Абланица гр. Дряново гр. Казанлък гр. Трън	2C÷6C P1B, P2D; KC1, KC2 S10 G5B, G7D H2A, H3D, H4D, H6B
5.	Кашкавал	краве мляко козе мляко	S11 Kz, I, L	гр. Ябланица гр. Трън	S11 Kz1, Kz2, Kz3; I3D, I6D, I9A; L4D, L6D, L9B

Като тест-микроорганизми и контроли при различните анализи са използвани типовите референтни култури, представени в **Табл. 2**:

Табл.2. Тест-микроорганизми, щамове, колекции и условия за култивирането им.

Тест-микроорганизъм	Колекция и щам	Условия за култивиране
Близкородствени МКБ		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 14917 ^T	37°C, MRS
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	ATCC 700211 ^T	37°C, MRS
<i>Lactobacillus pentosus</i>	ATCC 8041 ^T	37°C, MRS
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC14917 ^T	37°C, MRS
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC14917 ^T	37°C, MRS
Хранително-асоциирани патогенни бактерии		
<i>Escherichia coli</i> K12	Катедра БТ,ХТМУ	37°C, LB/MacConkey

<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	30°C, NB/MPA
<i>Streptococcus mutans</i>	DSMZ 20523	37°C, BHI
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	37°C, MPA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	37°C, MPA
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	37°C, MPA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	37°C, MPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	37°C, MPA
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	37°C, MPA
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	37°C, MPA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	37°C, MPA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	37°C, MPA
Плесенни гъби		
Лабораторен екстракт от хлебни дрожди (УЕ)	Катедра БФ, СУ	37°C, УЕРД
<i>Candida albicans</i> 74	НБПМКК	30-37°C, УМ
<i>Candida albicans</i> 72	НБПМКК	30-37°C, УМ
<i>Candida albicans</i> 78	НБПМКК	30-37°C, УМ
<i>Aspergillus niger</i> MIC05	ИМ, БАН	20°C, AN-3/PDA
Вируси		
Клетки от човешки рабдомиосарком линия RD 64	НЦЗПБ	37°C, DMEM
<i>Herpes simplex virus</i> тип 1 (HSV-1) щам ТМ	НЦЗПБ	37°C, DMEM
<i>Herpes simplex virus</i> тип 2 (HSV-2) щам Вја	НЦЗПБ	37°C, DMEM

Легенда: Колекции – ATCC (American Type Culture Collection, Вирджиния, САЩ); НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести - гр. София; ИМ, БАН – Институт по Микробиология на Българската академия на науките; Катедра БТ, ХТМУ – Катедра „Биотехнология“ на ХТМУ - гр. София; Катедра БФ, СУ - Катедра „Биофизика“ на СУ „Св. Климент Охридски“; НБПМКК – Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни Култури.

3. Изолиране и количествено определяне на МКБ

4. Методи за фенотипна характеристика, необходими за идентификацията на МКБ

5. Молекулярно-генетични методи за идентификация на МКБ

5.1. Изолиране на тотална ДНК от новоизолирани МКБ

5.2. Методи на основата на PCR анализи

5.3. Агарозна гел-електрофореза

5.4. 16S рДНК секвенционен анализ

6. Методи и условия за определяне на функционални свойства на МКБ

6.1. *In vitro* тестове за определяне на жизнеспособност и транзитна толерантност на МКБ в условия на симулиран ГИТ

6.2. *In vitro* методи за определяне на адхезионни характеристики на МКБ и способност за трайна колонизация

7. *In vitro* методи за определяне на антимикробната активност на МКБ

7.1. Антибактериална активност на МКБ

7.2. Антигъбична активност на МКБ

7.3. Методи за *in vitro* определяне на антивирусна активност

8. Скринингов метод за възможна продукция на ЕПЗ от МКБ

9. Определяне на способност за усвояване на пребиотици

10. Метод за определяне на антибиотичната чувствителност на МКБ

11. Оценка на растежа на МКБ в среда с различен въглероден източник и определяне на способността им да образуват биофилм

12. *In vitro* анализ на устойчивостта на МКБ при различни концентрации на натриев хлорид

13. Методи за определяне на биотехнологично значими характеристики на МКБ

13.1. Ензимна активност на МКБ

13.1.1. Определяне на ензимния профил на МКБ

13.1.2. Определяне на β -галактозидазната активност на МКБ

13.1.3. Протеолитична (казеинолитична) активност на МКБ

13.1.4. Коагулационна способност на МКБ

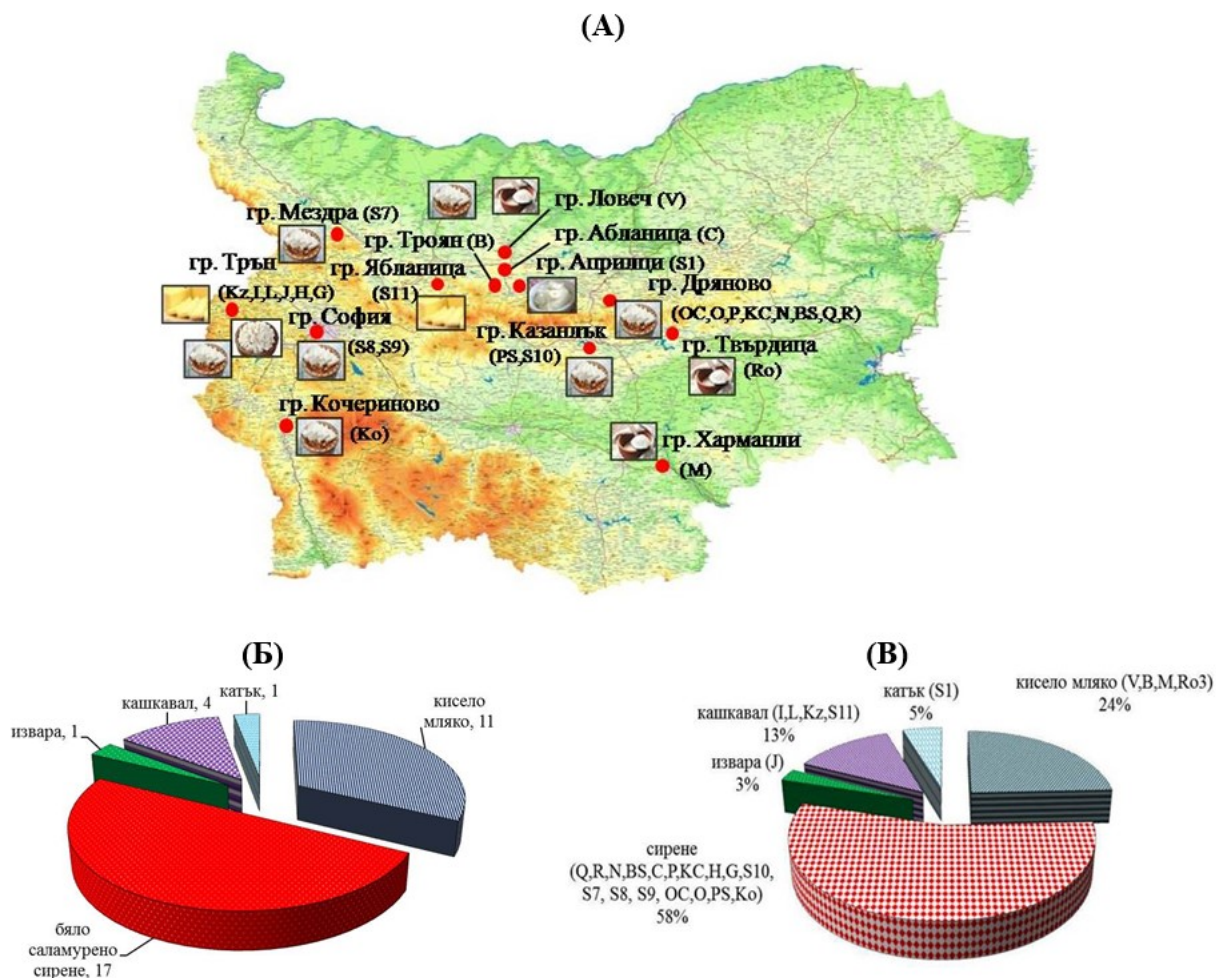
13.1.5. *In situ* тестове по охарактеризиране коагулационната способност на МКБ и оценка на приложимостта им като закваски/добавки за кисело мляко

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

A. Изолиране и идентификация на МКБ

1. Събиране на домашни проби от български млечнокисели продукти от различни региони на страната

В настоящия дисертационен труд е проучена микрофлората на 5 традиционни за Балканите млечнокисели продукти – катък, кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара (Фиг.1А). При избора на проби се насочихме към такива, получени в домашни условия или в малки ферми от сурово мляко, последвано от продуктите на основата на пастеризирано мляко.



Фиг.1. (А) Произход на пробите от различни региони на България със запазени традиции в млекарството и млечните технологии, (Б) Брой събрани проби от домашни ферментирани продукти и (В) МКБ изолати от отделните продукти.

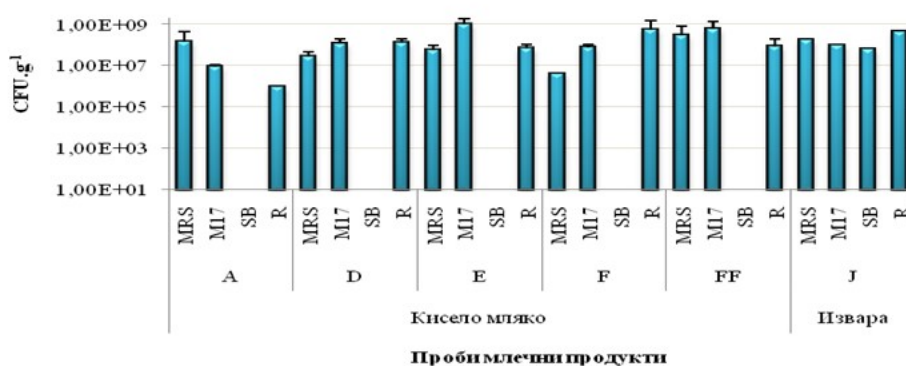
Събрани са общо 34 проби от различни географски региони на България (Фиг.1А) като стремежът е насочен към включването на достатъчна по брой представителна извадка от всеки от петте продукта (Фиг.1Б). Те са приготвени в съответствие с традициите за съответния географски регион и не съдържат индустриални закваски,

констатирано от направените анкети в домашните ферми. Единадесет от домашно приготвените кисели млека са събрани (от планинските райони над градовете Харманли, Ловеч, Троян, Твърдица и Трън) и приготвени от пастеризирано биволско, краве, козе и овче мляко. В същото време пробите от бяло саламурено сирене (района до София и Перник – Люлин планина, Велико Търново, Ловеч, Враца, Стара Загора и Кюстендил) са приготвени от сурово биволско, козе, краве и овче мляко (**Табл.1**). Киселото мляко, бялото саламурено сирене и кашкавалът са най-консумираните продукти в България и по тази причина са събрани, и изследвани проби предимно от тези три продукта (**Фиг.1B**).

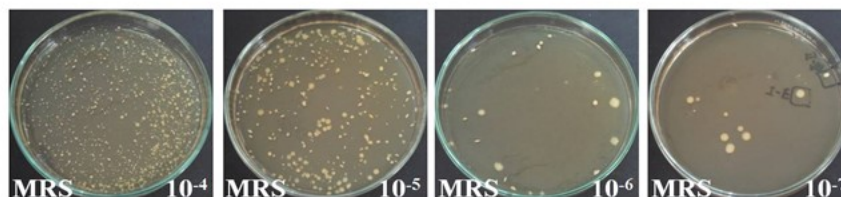
2. Изолиране и охарактеризиране на щамове МКБ

За първоначалната характеристика на разнообразната млечнокисела микробиота са приложени класически микробиологични методи, които използват селективни агарови среди: за различните МКБ (среда MRS), за лактобацили (среда Rogosa), за стрептококи (среда M17) и за ентерококи (среда Slanetz-Bartley). Количественият микробиологичен анализ на съответните хранителни среди показва висока жизненост на автохтонната млечнокисела микробиота при почти всички изпитвани проби – с численост $\geq 10^6$ CFU.g⁻¹ след over-night набогатяване в хранителен бульон на изходните проби млечни продукти (**Фиг.2**, **Фиг.3** и **Фиг.4**). Това обяснява вероятно отчетеното сходство в числените характеристики на събраните проби (**Фиг.4A**). Най-висок общ брой МКБ ($\sim 3.7 \times 10^{10}$ CFU.g⁻¹) е отчетен в пробата от тип бяло саламурено сирене (**Фиг.3B**), условно обозначена с „P”, приготвена от пастеризирано биволско мляко в семейна ферма в близост до гр. Дряново (**Табл.1**). Този резултат може да се дължи на допълнителната стъпка на набогатяване при пробите тип сирене и кашкавал, но също така създава и равностойни условия за размножаване на минорно представените МКБ групи. Микробиологичните анализи показват, че пробите тип извара и кисело мляко притежават по-ниска жизненост в граници $10^6 \div 10^9$ CFU.g⁻¹ (**Фиг.2A**), докато в пробите тип сирене жизнеспособната микробиота е в от порядъка на $10^7 \div 10^{10}$ CFU.g⁻¹ (**Фиг.3A**).

(A)



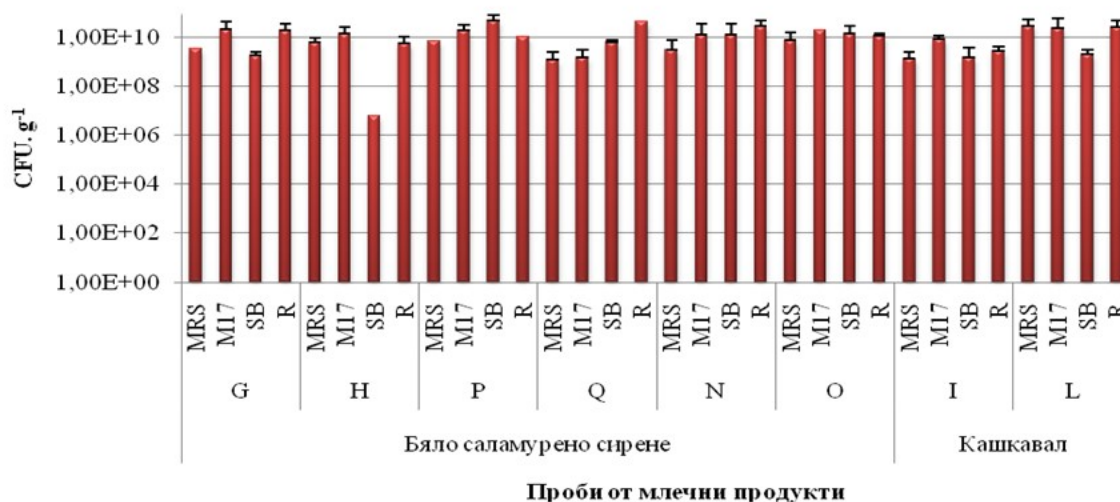
(Б)



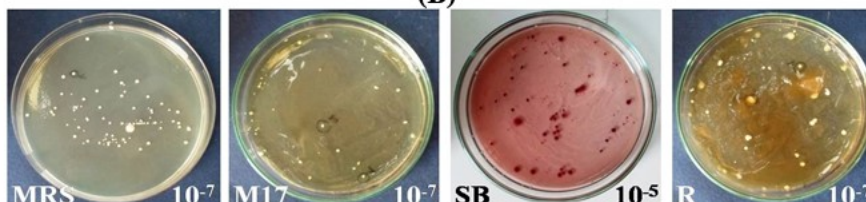
Фиг.2.(А) Количествен микробиологичен анализ на жизнеспособната микрофлора на проби тип кисело мляко и извара, и (Б) петрита с десетични разреждания (10^{-4} ÷ 10^{-7}) на проба тип овче мляко FF, култивирана в агарова среда MRS за 48 h при анаеробни условия.

Легенда: Млечни продукти: тип кисело мляко: от козе мляко - A; от краве мляко - D, E; от овче мляко - F, FF; тип извара от козе мляко: J;

(А)



(Б)



Фиг.3.(А) Количествен микробиологичен анализ на жизнеспособната микрофлора на проби тип бяло саламурено сирене и кашкавал от различни региони, и (Б) петрита с десетични разреждания (10^{-4} ÷ 10^{-7}) на проба тип бяло саламурено сирене N, култивирана в агарова среда MRS, M17, Slanetz-Bartley (SB) и Rogosa (R) за 48 h при анаеробни условия.

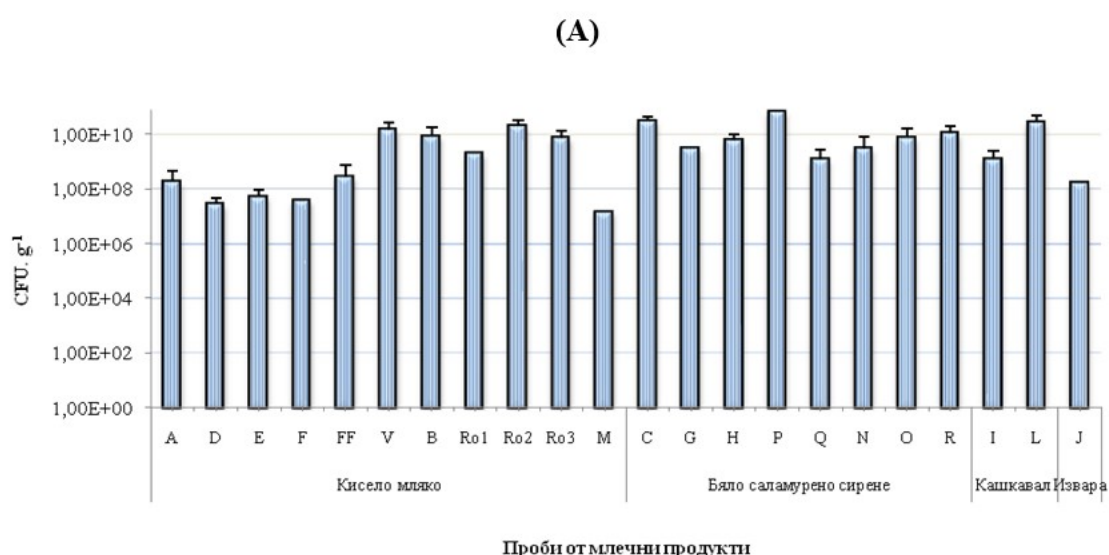
Легенда: Млечни продукти: тип бяло саламурено сирене: от краве мляко – G, H, P; от биволско мляко – Q; от смесено: биволско и краве мляко – N; от овче мляко – O; тип кашкавал от козе мляко: I, L;

Най-вероятната причина за разнообразието и високата жизнеспособност на МКБ в някои проби е използването на сурово мляко при производството им. Основното предимство на суровото пред пастеризираното мляко е в съдържанието на комплексна и разнообразна, неизследвана досега микрофлора от различни родове МКБ: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* и *Pediococcus*. Освен тях са

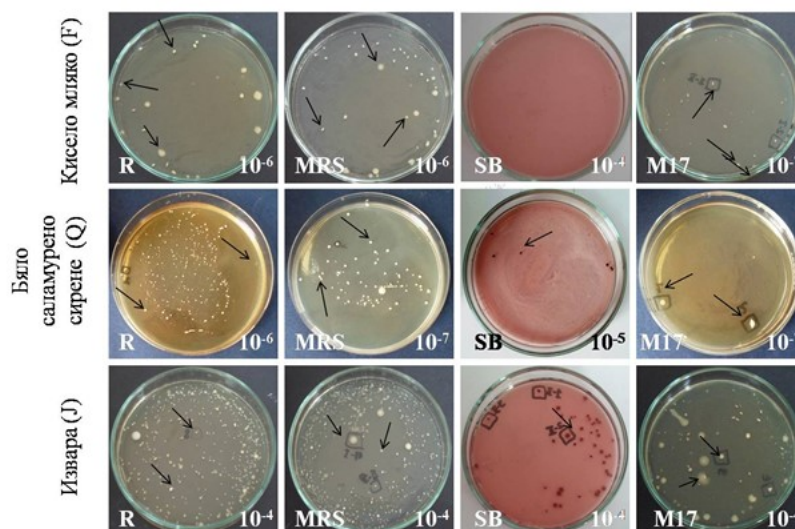
докладвани и щамове от родове като: *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, различни видове дрожди, плесени и др. (Coppola et al., 2008). В нашите проби от домашни млечни продукти от сурово мляко (щамове от S5 до S12) не е установено наличие на *E. coli* и плесени.

Вторичната микрофлора, която попада в млякото от животните, фермите или мандрите, придава специфичния вкус и аромат на произвежданите продукти, и именно затова нейната идентификация е от изключителна важност, особено при сирената. Ентерококи са открити основно в изследваните проби от сирена в ранен етап на зреене (проби G, H, P, Q, N, O), докато в зрели сирена преобладават представители на род *Lactobacillus*, отчетени на агарова среда Rogosa (Фиг.3Б). Получените резултати се потвърждават от Franciosi et al., (2015), които наблюдават превес на млечнокиселата микрофлора и по-специално на видове *Lb. paracasei*, *Str. thermophilus* и *L. mesenteroides*, в сирена, приготвени от сурово краве мляко. В нашите проби тип бяло саламурено сирене, кашкавал и кисело мляко също се наблюдава преобладаване на групата на лактобацилите (Фиг.2А, Фиг.3А и Фиг.4А), често в комбинация с ентерококи, растящи на среда Slanetz-Bartley и стрептококи – на среда M17 (Фиг.3Б и Фиг.4Б).

Търсенето на млечнокисели бактерии с технологично значими свойства, биологична активност и пробиотичен потенциал е дългосрочна задача в нашите изследвания. За изолирането на представители от род *Lactobacillus* са използвани селективните среди MRS и Rogosa. Получените резултати са показани на Фиг.4:



Б)



Фиг.4.(А) Сравнителен микробиологичен анализ на жизнеспособната МКБ микрофлора на проби тип кисело мляко, бяло саламурено сирене и извара, култивирани (след десетични разреждания $10^{-4} \div 10^{-7}$) в агарова среда MRS, и **(Б)** петрира с десетични разреждания ($10^{-4} \div 10^{-7}$) на проби тип козя извара J, биволско сирене Q и краве кисело мляко F в агарова среда MRS, M17, Slanetz-Bartley (SB) и Rogosa (R).

Макроскопският анализ на колонии в петриевите стъкла от различните проби (**фиг.2Б и 3Б**) показва голямо морфологично разнообразие във формата и размерите на клетките при използването на среда MRS и Rogosa, и ограничено – на среда M17 и Slanetz-Bartley. Както се очакваше, са наблюдавани различни морфотипове колонии от петте вида изследвани кисели млека (**Фиг.2Б**), в сравнение с тези от извара и сирена (**Фиг.4Б**). От единичните колонии, прораснали на петриевите стъкла (**Фиг.2Б, Фиг.3Б и Фиг.4Б**), са изолирани 78 чисти култури (**Табл. 1**). Те са Грам-положителни, каталазо-отрицателни, пръчковидни бактерии с полиморфизъм на клетките. Биват анаеробни или аеротолерантни и се развиват добре в MRS бульон (с pH 5.4÷6.5) при 37°C и 42°C, като активно подкисляват средата. Следователно тези 78 чисти култури притежават характеристики на МКБ.

След допълнителен микроскопски контрол за чистота, 78-те изолата са подложени на фенотипно охарактеризиране чрез класически микробиологични тестове, подходящи за хетерогенната група на МКБ (Holt et al., 1984) и впоследствие 45 от тях – за род *Lactobacillus*. Най-многобройна е групата изолати от бяло саламурено сирене (22 щам от краве, овче, биволско, козе и смес от краве и биволско мляко), следвана от изолатите от кисело мляко (14 щам от краве, овче и биволско мляко), 1 щам от извара (от козе мляко), 4 щам от катък (от овче мляко) и 4 щам от кашкавал (от козе и краве мляко).

Фенотипна характеристика на новоизолираните лактобацили

Всички 45 МКБ щама са Грам-положителни, каталазо-отрицателни, с пръчковидна морфология като понякога се наблюдава полиморфизъм. Те са неподвижни и неспоро-образуващи. Освен това са разположени поединично или във верижки, понякога са склонни да образуват агрегати (Табл. 3).

Табл.3. Морфологични характеристики на новоизолираните лактобацили от домашни млечни продукти.

<i>Изолати</i>	<i>Оцветяване по Грам</i>	<i>Морфология на колонии</i>	<i>Морфология на клетки</i>
S3,S5,S6,S7,S8,S9,S10, S12,1V,2V,3V,7V,8V, 10V,OC1,BS32,Kz1, BS41,Kz2,Kz3,Ko1, Ko2, Ko3	G+	Точковидни, кръгли, бели, изпъкнали, с цялостен контур	Къси пръчки със заоблени крайща, единични, по двойки или в къси верижки
Ro33, S2,S1	G+	Кръгли, бели, лъскави, изпъкнали, с вълнист контур	Средно дълги, правилни пръчки, събрани в дълги верижки
S4, 9V, G7D, BS31	G+	Точковидни, кръгли, сиво-бели, изпъкнали, с цялостен контур	Къси единични пръчки, със заоблени крайща
Ro34, Ro304, Ro32, J6B	G+	Кремообразни, сивкави, с кръгла или неправилна форма	Дълги прави пръчки със заоблени крайща, единични или по-къси пръчки
6V	G+	Малки, кръгли или лодковидни, с кремав цвят, блестящи	Къси и дълги пръчки със заоблени крайща, единични, по двойки или рядко в къси верижки
S11	G+	Малки, кръгли, кремаво-жълти колонии, изпъкнали, гладки, с цялостен контур	Средно дълги пръчки, леко извити, със заоблени крайща, единични или в къси верижки
BS42, KC1, KC2, OC2, H2A, H3D, H4D	G+	Бели, кръгли, изпъкнали, с цялостен контур, блестящи	Къси пръчки, единични, рядко по двойки
4V	G+	Точковидни, кръгли, бели, изпъкнали, с цялостен контур	Средно големи пръчки със заоблени крайща, единични, по двойки или в къси верижки
5V	G+	Точковидни, кръгли, бели, изпъкнали, с цялостен контур	Къси пръчки със заоблени крайща, единични, по двойки, рядко в къси верижки

Легенда: G+ – Грам-положителен щам с Грам(+) тип клетъчна стена;

Впоследствие всички новоизолирани лактобацили са подложени на тест за усвояване на глюкоза като единствен въглероден източник в средата (Табл.4).

Табл.4. Биохимична характеристика на новоизолирани лактобацили от млечни продукти.

Продукт	Изолати	Каталазна реакция	Газ от глюкоза
Кисело мляко	Ro34	-	-
	1V,2V,3V,4V,5V,6V,7V,8V,9V,10V,Ro33, Ro304, Ro32	-	+
Бяло саламурено сирене	S5,S6,S7,S8,S9,S10,S12,OC1,OC2,BS31,KC1,H2A BS32,BS41,BS42,Ko1,Ko2,Ko3,H3D,H4D,G7D KC2	-	+
		-	-
Кашкавал	S11, Kz1, Kz2, Kz3	-	+
Катък	S1, S2, S3, S4	-	+
Извара	J6B	-	+

Легенда: Каталазна реакция: (+) - положителна; (-) - отрицателна; и тест за определяне на газ от глюкоза: (+) – отделяне на газ, (-) – липса на газ;

От получените резултати на **Табл.4** се наблюдава преобладаване на газообразуващите щамове по време на растежа на модифицирана MRS среда (с глюкоза като единствен въглероден източник и при липса на месен екстракт). Лактобацилите с хетероферментативен тип метаболизъм са посочени като нестартерна микробиота при някои видове сирена със значителен принос за техния аромат и вкус (Lindner et al., 2008). Единствено два от щамове – Ro34 и KC2, изолирани от кисело мляко и сирене, не произвеждат газ и са идентифицирани като членове на групата на хомоферментативните лактобацили.

3. Биохимична характеристика на МКБ със система Biolog

За идентификацията на 6 от новоизолираните МКБ щамове е използвана системата за бърза идентификация Biolog. Тя се основава на провеждането на 96 тест-реакции за усвояването на голям набор от въглеродни източници, което позволява прецизното разграничаване на изследваните бактерии с висока степен на точност (74÷99.9%, Moraes et al., 2013), сравнима с тази при молекулярните методи.

При сравняване на биохимичния профил на изследваните микроорганизми се установява, че всеки от тях усвоява типичните за род *Lactobacillus* въглеродни източници: декстрин, D-фруктоза, α-D-глюкоза, малтоза, малтотриоза, D-маноза, 3-метил-D-глюкоза, палатиноза, α-хидроксимаслена киселина, D,L-млечна киселина, L-млечна киселина, инозин и уридин. По отношение на останалите субстрати, щамове показват различна способност за усвояване в резултат на вътревидови различия.

Въз основа на способността за усвояване на различни субстрати, включени в системата Biolog, е определена видовата принадлежност на 6 от изследваните МКБ изолати (щамове 4V, 9V, S4, OC2, BS41 и KC2). Получените резултати със съответния процент на достоверност са представени на **Табл. 5**:

Табл. 5. Идентификация на МКБ с помощта на система Biolog.

№	Щам	Микроорганизъм	Вид на продукта	Сходство, [%]
1.	4V	<i>Lactobacillus hamsteri</i>	Кисело мляко	99.4
2.	9V	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Кисело мляко	97.5
3.	S4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Катък	99.7
4.	OC2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Сирене	99.8
5.	BS41	<i>Lactobacillus hamsteri</i>	Сирене	80.5
6.	KC2	<i>Lactobacillus salivarius</i> ssp. <i>salicinus</i>	Сирене	99.1

От получените резултати може да се заключи, че щамовете са идентифицирани до вид, с висок процент на вероятност като при четири от тях (щамове 4V, S4, OC2 и KC2) той е над 99%. Руар & Рех, (2014) също използват системата Biolog за идентификацията на *Lb. acidophilus* от комерсиално мляко, но при тях се наблюдава доста по-нисък процент на съвпадение (около 61%).

Съгласно изследването на Moraes et al., (2013) системата Biolog не е особено чувствителна при идентификацията на щамове от вида *Lb. plantarum*, които обикновено са доминираща микрофлора в изследваните от нас млечнокисели продукти. Това наложи използването на молекулярни методи, с цел потвърждение идентификацията на изследваните щамове.

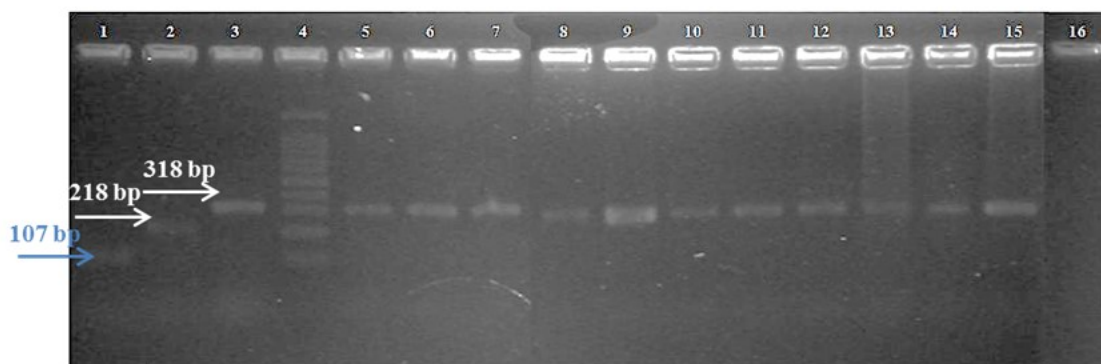
4. Молекулярно-таксономична характеристика на МКБ

Щамово-специфичният характер на пробиотичните свойства налага изследването на бактериалния геном и използването на молекулярни методи, които могат да открият и най-малките различия в отделните видове и дори между отделните щамове (Adeyemo & Onilude, 2014). По тази причина, паралелно с проведените класически морфологични, физиологични и биохимични изследвания, са използвани модерни молекулярни методи за идентифициране на групата от 45 МКБ изолати до вид. За целта е получена геномна ДНК от всеки щам по метода на Dellay et al., (1990), модифициран от Danova et al., (2005). След проверка за нативността на ДНК, с помощта на агарозна гел-електрофореза, геномните ДНК са използвани за провеждане на Multiplex PCR анализ.

4.1. Multiplex PCR за идентификация на групата на *Lb. plantarum*

За разграничаване на видовете от групата на *Lb. plantarum* (*Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* и *Lb. pentosus*), които са тясно свързани по своя генотип (99.6% сходство на ниво 16S рДНК от рибозомалния оперон) и притежават високо фенотипно сходство, е използван Multiplex PCR. Анализът е проведен с помощта на видово-специфични праймери, основаващи на *recA*-гена, съгласно метода на Torriani et al., (2001). В качеството на контроли са използвани ДНК препарати, изолирани от трите типови

култури: *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T, *Lb. pentosus* ATCC 8041^T, *Lb. plantarum* ATCC 14917^T. Получените PCR продукти, със специфичен за конкретния вид размер, са визуализирани в 1.5% (w/v) агарозен гел (**Фиг.5**).



Фиг.5. Multiplex PCR анализ на щамове от вида *Lb. plantarum* с праймери на основата на *recA*-гена (съгласно Torriani et al., 2001).

Щамове: 1 – *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T; 2 – *Lb. pentosus* ATCC 8041^T; 3 – *Lb. plantarum* ATCC 14917^T; 4 – Молекулен маркер 100 bp; 5 – *Lb. plantarum* Kz3; 6 – *Lb. plantarum* BS32; 7 – *Lb. plantarum* OC1; 8 – *Lb. plantarum* 3V; 9 – *Lb. plantarum* 10V; 10 – *Lb. plantarum* S9; 11 – *Lb. plantarum* 2V; 12 – *Lb. plantarum* S8; 13 – *Lb. plantarum* 1V; 14 – *Lb. plantarum* 7V; 15 – *Lb. plantarum* 8V; 16 – Отрицателна контрола.

С помощта на Multiplex PCR щамове S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S12, 1V, 2V, 3V, 7V, 8V, 10V, OC1, BS32, BS41, Kz1, Kz2, Kz3, Ko1, Ko2, Ko3 са идентифицирани като представители на вида *Lactobacillus plantarum*, съгласно тяхната идентичност с типова култура *Lb. plantarum* ATCC 14917^T (**Фиг.5**). Броят на МКБ щамове, принадлежащи към вида *Lb. plantarum*, е около 49% от всички изследвани изолати, което показва стабилното присъствие на вида в различни домашни млечни продукти, консумирани в България.

При сравняване на получените резултати между системата Biolog и Multiplex PCR анализа, се установява, че щам BS41, първоначално определен като най-вероятен представител на вида *Lb. hamsteri* (с 80.5% вероятност), впоследствие се идентифицира като *Lb. plantarum*. Подобни случаи на несъответствие при идентификацията са докладвани и от други автори (Paveljšek et al., 2014; Moraes et al., 2013). Вероятно причината се дължи на факта, че не винаги близки по фенотип МКБ имат сходен или слабо свързан генотип.

4.2. 16S рДНК PCR на МКБ

16S рДНК PCR е стандартен метод за идентификация на бактерии и установяване на разнообразието в рамките на дадена микробна група или извън нея, и е широко приложим за род *Lactobacillus*. Това се дължи на високата консервативност на 16S рДНК гена, заедно с наличието на силно променливи региони, които предоставят видово-специфични последователности, полезни за изследване филогенетичното разнообразие на

бактериите (Pereira et al., 2010; Kolbert et al., 1999). В резултат на това, тоталните ДНК-и на 9 от новоизолираните МКБ са използвани като матрица за извършване на PCR амплификации с праймери: fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') и rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'), съгласно метода, описан в т. 5.2 от Материали и методи. Продуктите от амплификацията са секвенирани с помощта на 3730xl ДНК анализатор (Thermo Fisher Scientific, САЩ) от Macrogen Inc. (Холандия) и получените секвенции са анализирани по-подробно с програма Chromas 2.3 (Technelysium Pty Ltd., Австралия), за да се изключат местата, където са били захванати праймерите. След BLASTN анализ на секвенциите в GenBank, е извършена идентификацията на щамове като получените резултати са обобщени в **Табл. 6**:

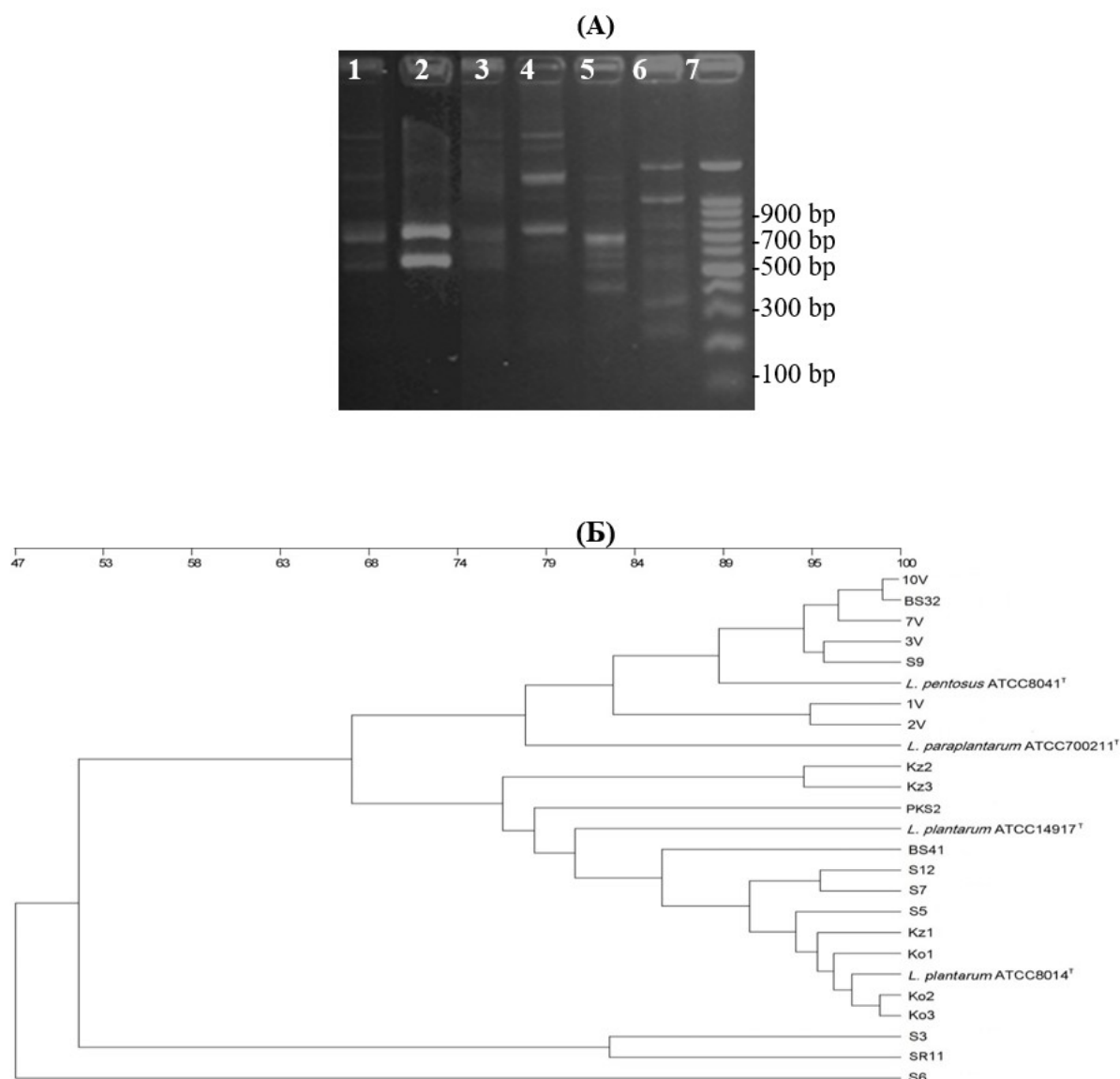
Табл.6. Идентификация на новоизолирани лактобацили от кисело мляко, катък, бяло саламурено сирене и кашкавал чрез 16S рДНК секвенционен анализ.

№	Означение на изолатите	Произход	Най-близко сходство (използвайки 16S рРНК секвениране)	Сходство, [%]
1.	Ro33	Овче кисело мляко	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	94
2.	Ro34	Овче кисело мляко	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	95
3.	8V	Биволско кисело мляко	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95
4.	S2	Овчи катък	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	95
5.	S4	Овчи катък	<i>Lactobacillus fermentum</i>	95
6.	BS31	Смес: биволско-краве сирене	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98
7.	G7D	Краве сирене	<i>Lactobacillus fermentum</i>	92
8.	S11	Кашкавал от краве мляко	<i>Lactobacillus paracasei</i>	95
9.	Ko2	Овче сирене	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95

В резултат на комбинацията от различни методи и след секвениране на 16S рДНК гена, 9-те щамове, изолирани от различни млечни продукти, са идентифицирани като: *Lb. fermentum* (3 щамове), *Lb. rhamnosus* (2 щамове), *Lb. plantarum* (2 щамове), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (1 щам) и *Lb. paracasei* (1 щам). Получените резултати за двата щамове от катък са едни от първите данни от молекулярно-генетични анализи за установяване на млечнокиселата микрофлора на катък.

4.3. RAPD PCR за разграничаване на представителите от групата на *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum*

Първото условие за прилагане на един новоизолиран щам при производството на млечни продукти е неговата видова идентификация и щамово генотипиране. По тази причина всички щамове от групата на *Lb. plantarum* са подложени допълнително на RAPD PCR анализ, използвайки праймер M13V. Получените резултати са представени на **Фиг. 6**:



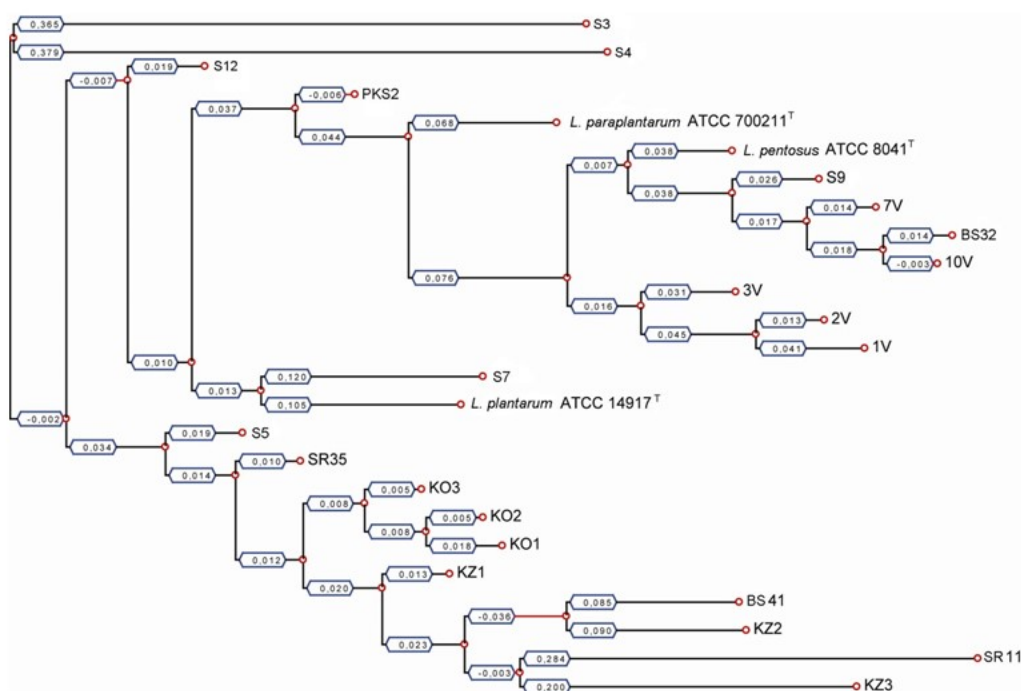
Фиг.6. (А) Агарозна (2% w/v) гел-електрофореза на получените RAPD PCR продукти от анализа на щамове от катък, кисело мляко и бяло саламурено сирене и типови култури на щамове *Lb. plantarum* ATCC14917^T, *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T и *Lb. pentosus* ATCC 8041^T с праймер M13V (съгласно Ehrmann et al., 2003); (Б) UPGMA анализ и дендрограма на получените RAPD-профили от *Lb. plantarum*, с програма MVSP, UK.

Легенда: *Lb. plantarum* ATCC 14917^T; *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T; 6 - *Lb. pentosus* ATCC 8041^T – типови култури; PKS2, SR11 – щамове, идентифицирани при предишни изследвания (Danova et al., 2005).

Стрмове: 1 – *Lb. plantarum* S12; 2 – *Lb. plantarum* S6; 3 – *Lb. plantarum* S7; 4 – *Lb. plantarum* ATCC 14917^T; 5 – *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T; 6 – *Lb. pentosus* ATCC 8041^T; 7 – Молекулен маркер 100 bp.

Всички изолати са идентифицирани като представители на вида *Lb. plantarum*. Получените резултати, представени на **Фиг. 6**, показват разнообразие от щамово-специфични различия с типовите култури и висока степен на генетично подобие между изолатите. От една страна, голяма част от щамовете, изолирани от различни видове бели саламурени сирена (щамове Ko1, Ko2, Ko3, S12 от овче мляко, щам S7 от козе мляко и

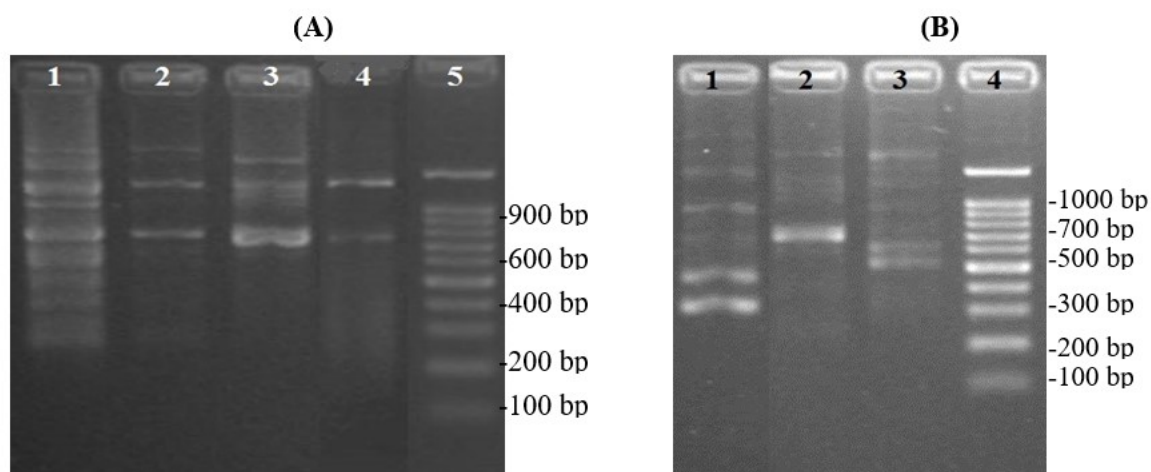
щам BS41 от биволско мляко), кашкавал от козе мляко (щам Kz1) и катък от овче мляко (щам S3) са групирани към типова култура на щам *Lb. plantarum* ATCC 14917^T с висока степен на генетично сходство (около 90%). От друга страна, само една малка група от щамове (щамове 1V и 2V), изолирани от биволско кисело мляко, показват характеристики на генетично сходство (около 80%) с типов щам *Lb. paraplantarum* ATCC 700211^T. Една част от щамове също показва около 95% генетично сходство с типова култура *Lb. pentosus* ATCC 8041^T. В резултат на PCR анализите е построено филогенетично дърво (Фиг.7) и новоизолираните лактобацили са отнесени към типовите култури *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* и *Lb. pentosus*.



Фиг.7. Филогенетично дърво на новоидентифицираните видове от групата на *Lb. plantarum* от кисело мляко, катък и бяло саламурено сирене.

Щамове, спадащи към групата на *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum*, също са подложени на RAPD PCR анализ за установяване на генетичното им сходство с типови култури съответно *Lb. rhamnosus* ATCC 7946^T и *Lb. fermentum* ATCC 14931^T. Получените резултати са представени на **Фиг. 8**.

Визуалният анализ на полиморфните профили на 3-те щам, идентифицирани като *Lb. fermentum* показват съществено различие от типовата култура. Същото се отнася и за изолатите, отнесени към вида *Lb. rhamnosus*. Това показва, че са изолирани оригинални щамове, а не колекционни и представлява една значима вътревидова диференциация. Следователно RAPD PCR анализът с единичен праймер M13V е високо-дискриминативен и може да се използва за целите на щамовото типизиране и паспортизиране, необходимо при биотехнологично приложение на щамове.



Фиг.8. (A) RAPD PCR анализ с праймер M13V (съгласно Ehrmann et al., 2003) на идентифицирани до вид щамове от катък, кисело мляко, бяло саламурено сирене и типова култура *Lb. fermentum* ATCC 14931^T, B) RAPD PCR анализ на щамове от катък и кашкавал и типова култура *Lb. rhamnosus* ATCC 7946^T.

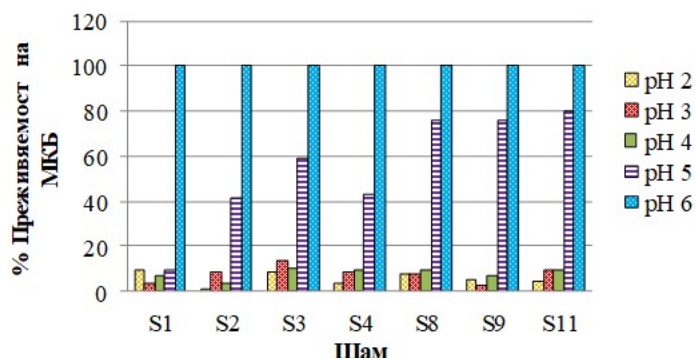
Съответствие: (A) 1 – *Lb. fermentum* ATCC 14931^T; 2 – *Lb. fermentum* 9V; 3 – *Lb. fermentum* S4; 4 – *Lb. fermentum* BS31; 5 – Молекулен маркер 100 bp; B) 1 – *Lb. rhamnosus* ATCC 7946^T; 2 – *Lb. rhamnosus* S2; 3 – *Lb. paracasei* S11; 4 – Молекулен маркер 100 bp.

Б. Функционални свойства на новоизолираните МКБ

1. *In vitro* жизнеспособност и транзитна толерантност на МКБ при симулирани условия на стомашно-чревния тракт

1.1. *In vitro* устойчивост на МКБ към различни стойности на рН

За установяване на устойчивостта на 7 от МКБ изолатите към променливите стойности на рН в стомашно-чревния тракт, е разработена моделна система, характеризираща се с вариращи стойности на рН (mMRS среда с рН 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 и 6.0) и по-голяма продължителност на действие (24 h инкубиране). Преживяемостта на лактобацилите при различни стойности на рН за 24 h е представена на **Фиг. 9**:



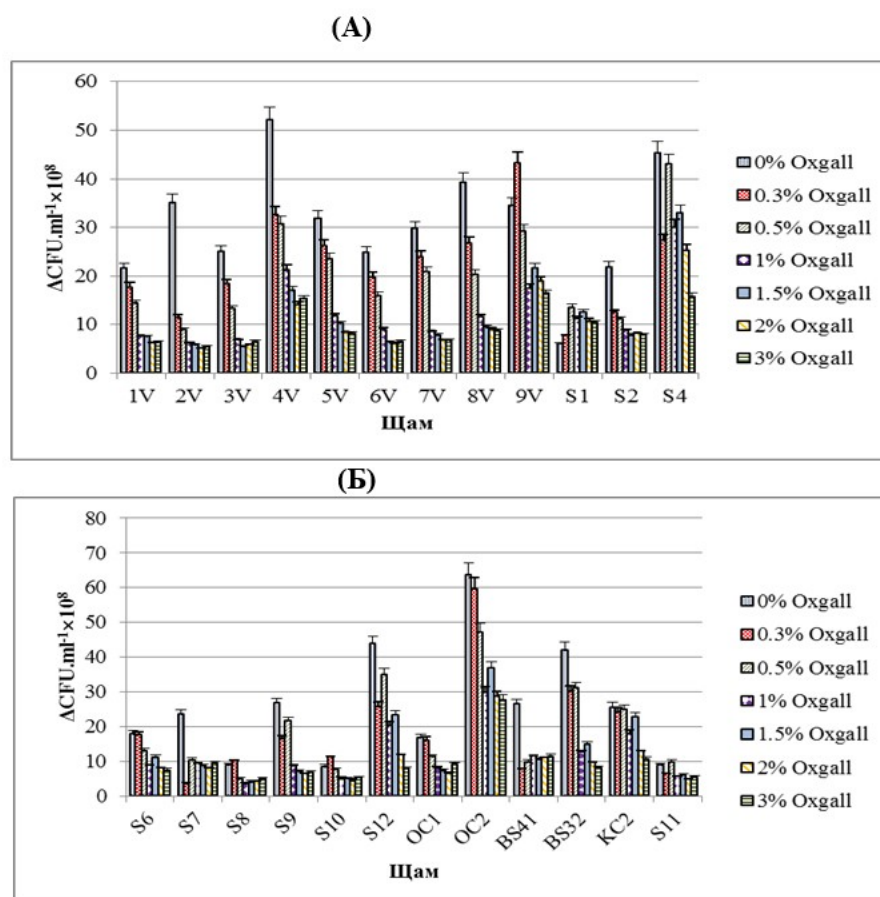
Фиг. 9. Процент преживяемост на изследваните лактобацили при различни рН стойности след 24 h култивиране в mMRS среда при 37°C.

При по-ниските стойности на рН, преживяемостта намалява значително в граници от 1.2 до 13.3%. В среда с рН 3.0 и 4.0, най-висока преживяемост проявява щам *Lb.*

plantarum S3, съответно 13.3% и 10.1%, а най-ниска – щамове *Lb. plantarum* S9 (2.5%) и *Lb. rhamnosus* S2 (3.1%). Добра преживяемост при ниско рН на щамове от вида *Lb. plantarum* е наблюдавана и от други автори. (Peres et al., 2014; Yelnetty et al., 2014). Halder & Mandal, (2015) установяват, че изолати от извара (*Lb. fermentum* и *Lb. casei*) проявяват толерантност при рН стойности 3.0 и 4.0 дори след 24 h на инкубация. При рН 2.0 в средата най-висока толерантност проявява щам *Lactobacillus* ssp. S1, а най-ниска отново се наблюдава при щам *Lb. rhamnosus* S2. Резултатите показват, че с увеличаване на продължителността на инкубация при рН 2.0, растежът на щамове от вида *Lb. plantarum* намалява, което се потвърждава и от изследванията на Hassanzadazar et al., (2012).

1.2. *In vitro* устойчивост на МКБ към жлъчни соли

За да бъде установен прагът на устойчивост на 24-те МКБ щам, е разработена моделна система, характеризираща се с вариращи стойности на жлъчка (0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 3% жлъчни соли) и по-голяма продължителност на действие (9 h инкубиране). Преживяемостта на лактобацилите в условията на симулиран жлъчен сок на 3 h е представена на **Фиг. 10**:

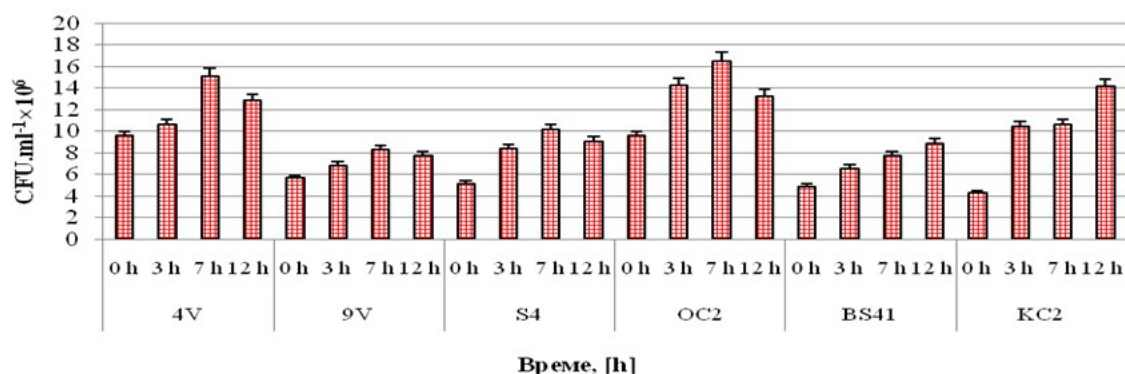


Фиг. 10. Преживяемост на избрани лактобацили, изолирани от кисело мляко, катък, сирене, кашкавал в условия на симулиран жлъчен сок след 3 h инкубиране в mMRS среда.

През първия час от инкубацията в mMRS среда с различните концентрации на жлъчни соли, болшинството от щамове показват сходни стойности на преживяемост (5 до 10×10^8 CFU.ml⁻¹). Изключение правят щамове *Lb. hamsteri* 4V, *Lb. fermentum* S4, *Lb. plantarum* S12 и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, изолирани съответно от кисело мляко, катък и сирене, които показват по-висока жизнеспособност при посочените условия (15 до 27×10^8 CFU.ml⁻¹). На третия час се наблюдават видими различия между щамове, като към горепосочената група от щамове с най-висока жизненост се добавят щамове *Lb. plantarum* BS32 и *Lb. salivarius* KC2. При сравняване с контролата за всеки щам, се наблюдава най-висока толерантност към 0.3 и 0.5 % (w/v) концентрация на жлъчни соли, докато при концентрации от 1 до 3 % (w/v) жлъчни соли жизнеспособността на щамове постепенно намалява. Устойчивост на изследваните лактобацили към 0.3% (w/v) жлъчни соли е потвърдена при аналогични изследвания с *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, изолирани от ферментирани наденички (Erkkila & Petaja, 2000; Klingberg et al., 2006; Pennacchia et al., 2004). След 5-тия час най-висока жизнеспособност имат щамове *Lb. hamsteri* 4V, *Lb. fermentum* 9V и S4 и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, която се запазва до края на експеримента. Съгласно класификацията, използвана от Ashraf & Smith, (2016), тези щамове могат да бъдат определени като толерантни към жлъчка (с преживяемост >60% за 9 h).

1.3. *In vitro* устойчивост на МКБ при преминаване през червата

Симулирането на физиологичните условия в тънките черва е осъществено чрез инкубиране на шесте лактобацили, показали най-висок пробиотичен потенциал под действието на жлъчни соли, със синтетичен чревен сок (mMRS среда с 0.1% (w/v) трипсин и рН 8.0) в продължение на 12 h. Броят на преживелите и съответно мъртвите клетки е отчитан на 0, 3, 7 и 12 h с помощта на анализатор за заснемане на клетъчна жизненост Vi-CELL XR, Beckman Coulter (САЩ). Резултатите са изчислени и осреднени за 1 ml култура и са представени на **Фиг. 11**:



Фиг.11. Преживяемост на изследваните лактобацили в условия на синтетичен чревен сок.

От получените резултати на **Фиг. 11** може да се заключи, че изследваните 6 лактобацили могат да растат и да се развиват в условия на симулиран чревен сок. При всички щамове се наблюдава тенденция за постепенен растеж и достигане на максимален брой живи клетки до 7 h от инкубацията, след което тяхната жизненост започва да намалява. Изключение правят щамове *Lb. plantarum* BS41 и *Lb. salivarius* KC2, при които броят на жизнените клетки продължава да се увеличава до края на експеримента (12 h). При щамове *Lb. hamsteri* 4V и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2 се наблюдава най-висок брой живи клетки (съответно 15.1 и 16.5×10^6 CFU.ml⁻¹) до 7 h, а най-нисък – при щамове *Lb. fermentum* 9V и *Lb. plantarum* BS41 (съответно 8.24 и 7.74×10^6 CFU.ml⁻¹). Преживяемостта на щам *Lb. plantarum* BS41 (около 53% на 7 h от инкубирането) в условия на симулиран чревен сок е по-ниска от отчетената при други автори (Zhai et al., 2015). Висока толерантност на лактобацили в условия на симулиран чревен сок е докладвана при щамове *Lb. plantarum* (87.56÷92.98%), *Lb. casei* CCFM30 (93.98%), *Lb. rhamnosus* CCFM311 (85.59%) и *Lb. rhamnosus* GG (90.93%), *Lb. gasseri* CCFM15 (79.37%) (Zhai et al., 2015).

2. Адхезионна способност на МКБ

Хидрофобността и авто-агрегацията са два независими показателя, чиито стойности дават съществена информация за способността за адхезия на бактериалните клетки към гостоприемника. За целта е извършено *in vitro* определяне на микробна адхезия на 6 МКБ щамове към неполярен разтворител n-хексадекан. Паралелно е извършен и анализ за способността за авто-агрегация на изследваните лактобацили. На **Табл.7** са представени резултатите от адхезионната способност на щамове:

Табл. 7. Агрегационни и адхезионни свойства на МКБ щамове в лабораторни условия.

Щам	Авто-агрегация, [%]	Хидрофобност, [%]
<i>Lb. hamsteri</i> 4V	2.86	6.34
<i>Lb. fermentum</i> 9V	9.88	0.4
<i>Lb. fermentum</i> S4	23.01	12.8
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> OC2	10.1	7.32
<i>Lb. plantarum</i> BS41	16.17	10.17
<i>Lb. salivarius</i> KC2	18.47	4.94

Получените стойности за хидрофобността на изследваните 6 лактобацили варира в граници от 0.4% до 12.8%. Щам *Lb. fermentum* 9V показва под 1% способност за задържане към n-хексадекан, което е белег за ниска, почти липсваща хидрофобност, докато щам *Lb. fermentum* S4 притежава най-добра хидрофобност – 12.8%. От изследваните щамове единствено щамове S4 и BS41 проявяват хидрофобност над 10%.

При сравнение с докладваното от Perez et al., (2006) изискване за не по-малко от 85% способност за хидрофобност, може да се заключи, че всички изследвани МКБ щамове притежават ниска способност за придържане към епителните клетки.

Авто-агрегационната способност на изследваните лактобацили варира в граници от 2.86% (щам *Lb. fermentum* S4) до 23.01% (щам *Lb. hamsteri* 4V) (Табл. 15). Wang et al., (2010) класифицират бактериалните щамове с 40% агрегация като такива с добри авто-агрегационни свойства, докато щамове с под 10% агрегация, се определят като такива с ниска авто-агрегация. Следователно, всички изследвани МКБ щамове в настоящия дисертационен труд могат да бъдат считани като притежатели на ниска (щам *Lb. hamsteri* 4V и *Lb. fermentum* 9V) или умерена авто-агрегационна способност (всички останали щамове).

3. Антимикробна активност на МКБ

3.1. Антибактериална активност на МКБ

Друг важен критерий при подбора на пробиотични щамове е тяхната способност да подобряват естествената защита на гостоприемника срещу хранителните патогени чрез синтеза на антимикробни вещества. За целта е изследван антибактериалният ефект на супернатанти (неутрализирани и кисели) и млека, ферментирани с 5 групи лактобацили, изолирани от кисело мляко, катък, извара, бяло саламурено сирене и кашкавал, срещу *E. coli* K12, *B. subtilis* ATCC 6633 и *Str. mutans* 20523. Получените резултати са представени на Табл. 8.

Киселите супернатанти и млека от изследваните лактобацили показват по-висока антимикробна активност срещу *E. coli* K12 в сравнение с *B. subtilis* ATCC 6633. Висока инхибиторна активност спрямо *E. coli* K12 се наблюдава при почти всички 24-часови КБФС (с изключение на щамове *Lb. plantarum* S5 и S9, *Lactobacillus* ssp. 5V и *Lb. fermentum* G7D, които показват равностойна активност и към двата щам), докато спрямо *B. subtilis* ATCC 6633 по-ефективни са супернатантите на щамове *Lactobacillus* ssp. S1, KC1, H3D, H2A и J6B. Полученият резултат е в противоречие с изследванията на други автори, според които лактобацилите проявяват по-висока антимикробна активност към Грам-положителни, отколкото спрямо Грам-отрицателни бактерии (Sadrani et al., 2014; Jose et al., 2015). Освен това изследваните лактобацили инхибират двата индикаторни щам в различна степен. Разликите в инхибиторния потенциал на изследваните лактобацили може да се дължат на различни вътрешни фактори, предизвикани от техния произход (Klayraung et al., 2008). Изследваните на мляко МКБ щамове запазват своята антимикробна активност, което дава възможност за приложението им като биопротективни култури при производството на млечнокисели продукти.

Табл. 8. Сравняване на антимикробната активност на щамове МКБ, изолирани от различни млечни продукти, с/у щам *E. coli* K12, *B. subtilis* ATCC 6633 и *Str. mutans* 20523.

Продукт	Щам	Антимикробна активност [стерилна зона, mm] с/у					
		<i>E. coli</i> K12			<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		
		КБФС	КМ	НБФС	КБФС	КМ	НБФС
Катък	<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	17*	14	С	13;16*	14	0
	<i>Lb. rhamnosus</i> S2	16	13.5	0	10	13;15*	10
	<i>Lb. plantarum</i> S3	17	14*	0	12	10	10
	<i>Lb. fermentum</i> S4	13	13.5	0	9	11	11*
Кисело мляко	<i>Lb. plantarum</i> 1V	14*	12; 14*	0	10	10*	12
	<i>Lb. plantarum</i> 2V	13.5	13*	nd	11.5	10	13*
	<i>Lb. plantarum</i> 3V	15; 18*	14*	nd	15	11*	11
	<i>Lb. hamsteri</i> 4V	12*	14*	nd	11*	10.5	12*
	<i>Lactobacillus</i> ssp. 5V	0	12.5*	nd	11*	11	11*
	<i>Lactobacillus</i> ssp. 6V	15.5*	12.5*	nd	13	10*	12
	<i>Lb. plantarum</i> 7V	17*	13.5*	nd	10	11*	11*
	<i>Lb. plantarum</i> 8V	15	13*	nd	12.3	11*	11
	<i>Lb. fermentum</i> 9V	13	13*	nd	11	12	11
	<i>Lb. plantarum</i> 10V	13.5	14*	nd	12	12	12*
Бяло саламурено сирене	<i>Lactobacillus</i> ssp. M1A	16*	12*	nd	12*	10	12*
	<i>Lb. plantarum</i> S5	12	13.5	nd	12*	11	12
	<i>Lb. plantarum</i> S6	13	13	0	11	13	13
	<i>Lb. plantarum</i> S7	13.5*	13*	11.5*	10	9	10.5*
	<i>Lb. plantarum</i> S8	15*	12*	0	10	13*	10.5*
	<i>Lb. plantarum</i> S9	12	13*	0	12	10.5	10.5*
	<i>Lb. plantarum</i> S10	13*	13	0	10	13	12*
	<i>Lb. plantarum</i> S12	16*	12.5	0	14*	13	nd
	<i>Lactobacillus</i> ssp. KC1	17	12.5	0	15*	10	nd
	<i>Lb. salivarius</i> KC2	13	12.5	nd	10	11.5*	13
	<i>Lb. plantarum</i> OC1	15.5	13	nd	10	10*	10*
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> OC2	13.5	14	nd	nd	nd	12*
	<i>Lb. plantarum</i> BS32	12	12;13*	nd	11	10	11
Кашкавал	<i>Lb. plantarum</i> BS41	15	14	nd	10	11*	11
	<i>Lactobacillus</i> ssp. BS42	20	12	nd	12	nd	nd
	<i>Lb. fermentum</i> G7D	14.5*	12	nd	14.5*	10	nd
	<i>Lactobacillus</i> ssp. H2A	16*	13.5	nd	14	10	nd
	<i>Lactobacillus</i> ssp. H3D	17*	14	nd	15.5*	10	nd
	<i>Lactobacillus</i> ssp. H4D	nd	nd	nd	15*	11	nd
	<i>Lb. plantarum</i> Kz1	12	13.5*	nd	10	10*	13*
Извара	<i>Lb. plantarum</i> Kz2	12	13.5*	nd	10.5	10.5*	12*
	<i>Lb. plantarum</i> Kz3	12	12*	nd	10	11;15*	12*
	<i>Lb. paracasei</i> S11	12.5;18*	13*	nd	13	12.5	12
	<i>Lactobacillus</i> ssp. J6B	12; 18*	12.5*	0	17*	11	nd

Легенда: КБФС – кисели безклетъчно филтрувани супернатанти; НБФС – неутрализирани безклетъчно филтрувани супернатанти; КМ – коагулирало мляко със съот. 24h-култура; „*“ – бактериостатичен ефект;

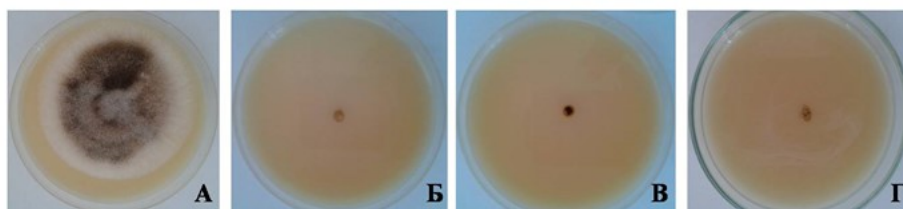
3.2. Антигъбична активност на МКБ

Антигъбична активност на МКБ срещу *Candida albicans* 72, *Candida albicans* 74 и *Candida albicans* 78

Антикандидозната активност на 33 КБФС от експоненциални култури на лактобацили е изследвана с помощта на агар-дифузионния метод. След 24 h култивиране при 37°C, единствените щамове, които проявяват антикандидозна активност, са *Lb. plantarum* BS31 - срещу *Candida albicans* 72, и щамове *Lb. plantarum* 3V и *Lactobacillus* ssp. 5V - срещу *Candida albicans* 74. Нито един от изследваните щамове не проявява активност спрямо *Candida albicans* 78. Сравнени с контролната проба (фунгостатин, инхибиторна зона = 14.5 mm), трите щама се характеризират с по-малки инхибиторни зони – съответно 10.5 mm за *Lb. plantarum* BS31, 8.5 mm за *Lb. plantarum* 3V и слаба зона на просветляване при *Lactobacillus* ssp. 5V. Антикандидозната активност на щамове *Lb. plantarum* е потвърдена от изследванията на Adeniyi et al., (2011). Те докладват за най-голяма инхибиторна зона (25 mm), продуцирана от *Lb. plantarum*, изолиран от зеленчуци, срещу *C. albicans* ATCC 90029. Активност срещу *C. albicans* е наблюдавана и при други МКБ като *Lb. cellebiosis*, *Lb. delbrueckii*, *L. mesenteroides* от зеленчуци (Adeniyi et al., 2011), *Lb. paracasei* от отпадъчни води от млечната промишленост (Sungsri et al., 2012) и др.

Антигъбична активност на МКБ щамове срещу *Aspergillus niger*

Началният скрийнинг на антигъбичната активност на МКБ срещу щам *Aspergillus niger* MIC05 е осъществен чрез модифицирания протокол на агар-дифузионния метод (Tropcheva et al., 2014). Степента на инхибиране е отчетена по диаметъра на единична плесенна колония, изразен в % (Фиг.12).



Фиг. 12. *In vitro* тест за антигъбична активност на МКБ щамове в модифициран PDA агар: А) контрола – без добавена МКБ култура; Б) щам *Lb. plantarum* S8; В) щам *Lb. plantarum* S10; Г) смес от щамове *Lb. plantarum* S8 и S10 срещу *Aspergillus niger* MIC05.

От получените резултати (Фиг. 12) може да се заключи, че за разлика от контролата, където щам *Aspergillus niger* MIC05 расте и спорулира, в пробите с включени култури на щамове *Lb. plantarum* S10, щам *Lb. plantarum* S8 и смес от двата щама няма растеж. Индексът на инхибиране на трите проби (Фиг. 12 Б, В и Г) срещу *Aspergillus niger*

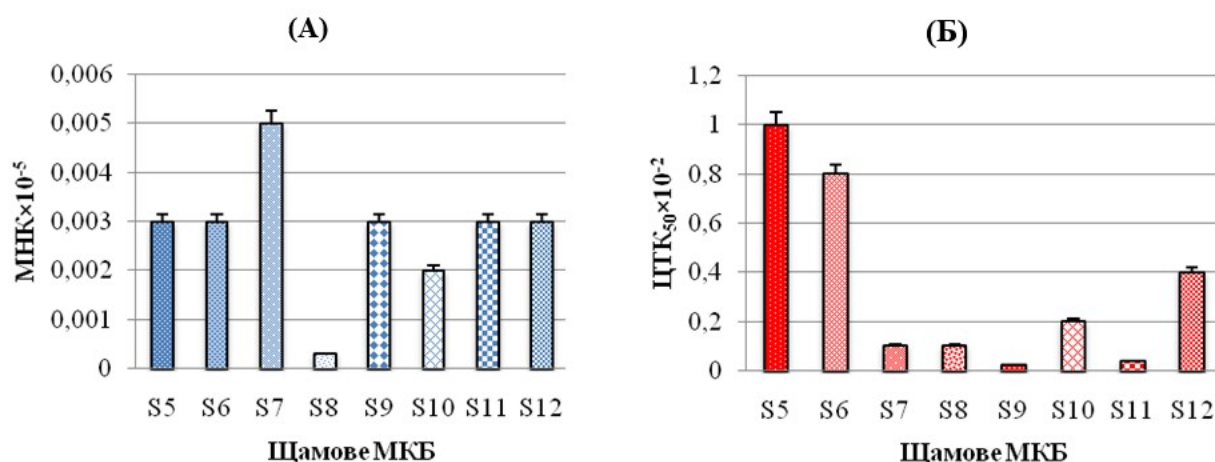
MIC05 е 92.5%. Антигъбичната активност на *Lactobacillus plantarum* е потвърдена и от други автори (Sathe et al., 2007; Delavenne et al., 2012, Laref & Guessas, 2013).

3.3. Антивирусна активност на МКБ

Определяне на клетъчна преживяемост, МНК и ЦТК₅₀ на изследваните МКБ

Анализите са проведени в различен концентрационен диапазон на изследваните проби от МКБ с цел да се проследи динамиката на формиране на клетъчния монослой от линия RD64 и преживяемостта му чрез колориметричен метод с използване на МТТ багрило.

При микроскопското проследяване на морфологията на монослоевите на 72 h от въздействието с различни концентрации на НБФС от тестваните щамове не са регистрирани съществени промени в морфологията на клетките в сравнение с тези в нетретираната клетъчна контрола. Налице е ясна зависимост „доза (концентрация)-клетъчен отговор“, която се изразява в това, че с намаляване на концентрацията на съответния щам, преживяемостта на клетките прогресивно се увеличава. От построените криви са определени стойностите на МНК и ЦТК₅₀ за отделните щамове (Фиг. 13А и Б).



Фиг. 13. Определяне на МНК (А) и ЦТК₅₀ (Б) на изследваните щамове МКБ чрез МТТ анализ.

Изхождайки от данните за ЦТК₅₀ на изследваните щамове (S5 до S12), те могат да бъдат разделени в три групи: (1) цитотоксични (с най-ниски стойности на ЦТК₅₀) - тук се отнасят щамове *Lb. plantarum* S9 (изолиран от овче сирене) и щам *Lb. paracasei* S11 (изолиран от кашкавал). При сравнение със стойностите на ЦТК₅₀ за останалите щамове МКБ, се наблюдава тенденция за повишаване на цитотоксичността до 40 пъти; (2) средно токсични – щамове *Lb. plantarum* S7, S8 и S10 (изолирани от сирене); (3) ниско цитотоксични – щамове *Lb. plantarum* S5, S6 и S12 (изолирани от сирене). Тяхната

токсичност е до 40 пъти по-ниска от тази на щамове *Lb. plantarum* S9 и *Lb. paracasei* S11, както и до 10 пъти спрямо средно токсичната група МКБ щамове.

Определяне на директно антивирусно действие *in vitro* чрез инхибиране на цитопатичния ефект на херпесните вируси

Директното антивирусно действие на изследваните лактобацили е определено чрез заразяване на клетъчна линия RD64, формирала монослой в 96-ямкови плаки, с вирусна суспензия на щамове HSV-1 щам TM и HSV-2 щам Bja (с вирусни титри в 1 g н.е./0.1 ml съответно 10^5 и 10^4) в десетократни разреждания. На **Табл. 9** са представени данните относно промените във вирусните титри под въздействие на изследваните щамове МКБ в концентрационен диапазон 2xМНК, МНК и ½МНК.

Табл. 9. Ефект на различни щамове МКБ върху HSV-1 и HSV-2 инфекцията в клетки от клетъчна линия RD64.

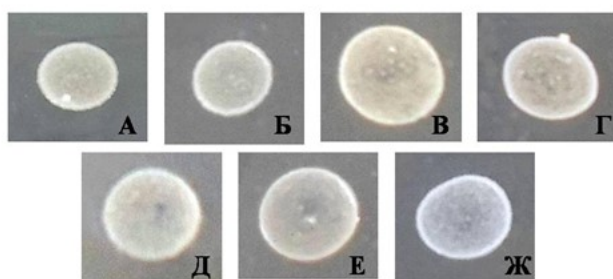
Проби от МКБ	Разреждания	$\Delta \log$ HSV-1 щам TM	$\Delta \log$ HSV-2 щам Bja
<i>Lb. plantarum</i> S5	0.03×10^{-5}	0.3	0.5
	0.003×10^{-5}	0	0
	0.0003×10^{-5}	0	0
<i>Lb. plantarum</i> S6	0.03×10^{-5}	0.5	0
	0.003×10^{-5}	0.3	0
	0.0003×10^{-5}	0	0
<i>Lb. plantarum</i> S7	0.05×10^{-5}	1.0	0.8
	0.005×10^{-5}	0.5	0.8
	0.0005×10^{-5}	0.3	0.3
<i>Lb. plantarum</i> S8	0.003×10^{-5}	1.0	0
	0.0003×10^{-5}	0.3	0
	0.00003×10^{-5}	0	0
<i>Lb. plantarum</i> S9	0.0003×10^{-5}	0.8	0.3
	0.003×10^{-5}	0.3	0.3
	0.03×10^{-5}	0	0.8
<i>Lb. plantarum</i> S10	0.0002×10^{-5}	0.5	0
	0.002×10^{-5}	0.5	0
	0.02×10^{-5}	0.8	0
<i>Lb. paracasei</i> S11	0.0003×10^{-5}	0	0
	0.003×10^{-5}	0	0
	0.03×10^{-5}	0	0
<i>Lb. plantarum</i> S12	0.0003×10^{-5}	0	0
	0.003×10^{-5}	0	0
	0.03×10^{-5}	0	0
Контрола (ACV)	0.02 μ M	1.8	0.5
	0.002 μ M	1.3	0.3
	0.0002 μ M	0.3	0
	0.00002 μ M	0	0

Според експерименталните данни на **Табл. 9** са определени две групи проби: 1) НБФС от щамове, които не повлияват вирусната репликация, респ. добива на инфекциозно вирусно потомство (щамове *Lb. plantarum* S5, S6, S12) – доказателство е

липсата на съществени промени в инфекциозните вирусни титри спрямо тези във вирусната контрола; и (2) НБФС от щамове, които инхибират вирусната репликация по дозо-зависим начин (щамове *Lb. plantarum* S7 и S8 срещу HSV-1 и щамове *Lb. plantarum* S7 и S9 срещу HSV-2). Антивирусното действие на тези щамове, приложени в МНК и ½МНК, е по-силно спрямо HSV-1, отколкото спрямо HSV 2. За това говори фактът, че при въздействие с 5×10^{-8} разреждане (за щам *Lb. plantarum* S7) и 0.003×10^{-5} (за щам *Lb. plantarum* S8), инфекциозният титър на HSV 1 се понижава до $\Delta \log 1.0$ в сравнение с вирусната контрола.

4. Оценка за възможна продукция на екзополизахариди от МКБ

Определянето на възможната продукция на ЕПЗ е проведено при култивиране на изследваните МКБ в присъствие на 30% (w/v) захароза в средата при 37°C в продължение на 24 h.



Фиг. 14. Щамове, способни да продуцират екзополизахариди при тест на агарова среда със захароза.

Легенда: А – щам *Lactobacillus* spp. S1, Б – *Lb. rhamnosus* S2, В – *Lb. plantarum* S3, Г – *Lb. fermentum* S4, Д – *Lb. plantarum* S8, Е – *Lb. plantarum* S9, Ж – *Lb. paracasei* S11;

От изследваните новоизолати 7 щамове произвеждат ЕПЗ (представени на **Фиг. 14**): щам *Lactobacillus* ssp. S1, *Lb. rhamnosus* S2, *Lb. plantarum* S3 и *Lb. fermentum* S4 (изолирани от катък), *Lb. plantarum* S8 и S9 (изолирани от сирене) и *Lb. paracasei* S11 (изолиран от домашен кашкавал). За наличието на ЕПЗ се установява по наблюдаваните макроскопски слизести колонии, прораснали на повърхността на агарова среда MRS с 30% (w/v) съдържание на захароза, след култивиране в продължение на 24 h. Способността на лактобацилите да синтезират екзополизахариди е докладвана и от други автори.

5. Способност за усвояване на пребиотици

За да се установи кои въглехидрати биха могли да се използват като пребиотици и хранителен субстрат за изследваните от нас щамове, последните са култивирани на моделна система с микроплаки в mMRS, в която като единствен въглероден източник е добавен съответно GLOS, GOS и FOS. В качеството си на контроли са използвани глюкоза

(Glu – най-лесно усвояемия монозахарид), малтоза (MAL, дизахарид с $\alpha(1-4)$ -връзки), и трудно разградим въглероден източник - нишесте (STR). Способността да усвояват съответния олигозахарид е определена с помощта на индикаторното багрило бромкрезол пурпур, което може да променя цвета си от тъмновиолетов в жълт при промяна на рН. Резултатите, отчетени на 24 и 48 h от култивирането в термостат при 37°C, са отразени в Табл. 10:

Табл. 10. Характеризиране на способността на лактобацилите да усвояват пребиотици.

Щам	Олигозахариди						Други въглехидрати					
	GOS		GLOS		FOS		MAL		Glu		STR	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
S1	+	++	++/-	++/-	-	-	+	++	nd	nd	nd	nd
S2	+	++	++/-	++/-	-	-	+	++	nd	nd	nd	nd
S3	+	++	++/-	++/-	-	-	+	++	nd	nd	nd	nd
S4	+	++	++/-	++/-	-	-	+	++	nd	nd	nd	nd
S5	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S6	+	++	++/-	++/-	+	+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S7	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S8	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	+	++	+	++	-/+	-/+
S9	+	++	++/-	++/-	+	+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S10	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S12	+	++	++/-	++/-	+	+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
OC1	+	++	++/-	++/-	++/-	++/-	nd	nd	+	+	-/+	-/+
OC2	+	++	++/-	++/-	+	++	nd	nd	+	++	-/+	-/+
KC2	+	++	++/-	++/-	+	++	nd	nd	+	++	-/+	-/+
BC32	+	++	++/-	++/-	+	++	nd	nd	+	++	-/+	-/+
BC41	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
Kz1	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
Kz2	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+
Kz3	+	++	++/-	++/-	+	++	nd	nd	+	++	-/+	-/+
S11	+	++	++/-	++/-	-/+	-/+	nd	nd	+	++	-/+	-/+

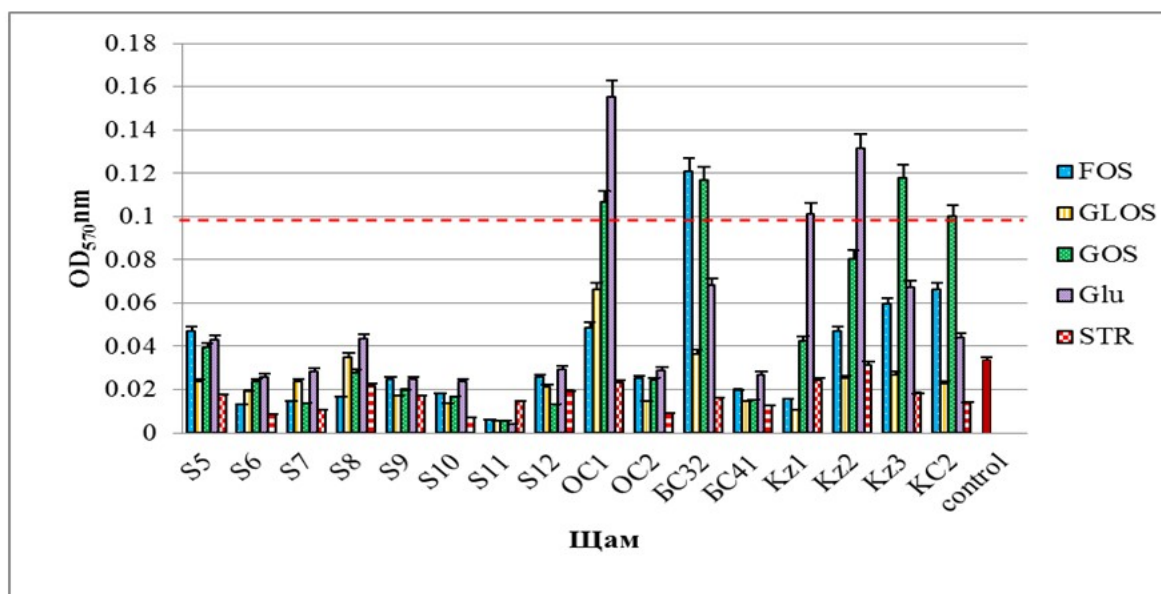
Легенда: „++” – усвояват напълно; „+” – усвояват непълно; „-/+” и „+/-” – усвояват частично; „-” – не усвояват олигозахарида; GOS – галактоолигозахарид; GLOS – глюкоолигозахарид; FOS – фруктоолигозахарид; MAL – малтоза; STR – нишесте; nd – не е определяно;

Всички изследвани щамове усвояват добре GOS, MAL и Glu още през първите 24 h от култивирането, а до 48 h ги усвояват напълно. В присъствието на GLOS и STR щамовете частично променят цвета на средата, което е индикатор за слабо метаболизиране през първите 24 h, запазващо се непроменено до 48 h. GLOS се усвоява значително по-добре от изследваните новоизолирани МКБ, сравнено с резултатите, получени за среда с STR (Табл. 10). По отношение на усвояването на FOS, изследваните лактобацили показват голяма вариабилност. В сравнение с GAL и GLOS, FOS е най-слабо усвояваният олигозахарид, като 20% от тестваните лактобацили не го усвояват в рамките на експеримента (48 h). Отчетлива способност да усвояват FOS се наблюдава при щамове *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, *Lb. salivarius* KC2 и *Lb. plantarum* BS32 и Kz3, непълна е при *Lb. plantarum* S6, S9 и S12 (непълно усвояване), а при 45% от тях има гранично или частично усвояване (щамове *Lb. plantarum* S5, S7, S8, S10, OC1, BS41, Kz1, Kz2 и *Lb.*

paracasei S11). Получените резултати се потвърждават и от данните на Tropcheva et al., (2013) за усвояването на олигозахариди от млечни лактобацили.

Способност на МКБ щамове да формират биофилм при усвояването на различни въглехидрати

Освен способността да усвояват различни въглехидрати, е определено и свойството на изследваните МКБ щамове да формират биофилм. Получените резултати са представени на **Фиг.15**:



Фиг. 15. Способност на МКБ щамове да формират биофилм при усвояване на различни въглехидрати.

От изследваните лактобацили добра биофилм-формираща способност показват щамовете, изолирани от сирене (*Lb. plantarum* OC1 и BS32 и *Lb. salivarius* KC2) и кашкавал (*Lb. plantarum* Kz1, Kz2 и Kz3), в присъствието на Glu и GOS като единствени източници на въглерод. При щам *Lb. plantarum* BS32 биофилм се образува и в присъствието на FOS, което показва, че този олигозахарид също може да бъде успешно използван като пребиотик за този щам.

6. Антибиотична чувствителност на МКБ

Оценката на антибиотичната чувствителност на всеки кандидат пробиотичен щам е важен критерий при подбора на функционални щамове (EFSA, 2012). За определяне антибиотичната чувствителност на изследваните щамове МКБ са избрани 19 често употребявани в клиничната практика антибиотици с различен механизъм на действие. Резултатите, получени по стандартния диск-дифузионен метод на Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), са обобщени на **Табл. 11 (А, Б, В, Г)**.

Табл.11. Антибиотична чувствителност на МКБ щамове от различни млечнокисели продукти.

А) МКБ, изолирани от катък

Шам	a* Антибиотици																		
	b* Инхибитори на синтеза на клетъчната стена									b** Инхибитори на синтеза на белтъци						b*** Инхибитори на синтеза на НК			
	P	A	O	Cfz	Cm	Ct	Ce	Mer	V	G	D	T	C	E	L	R	Pf	Le	ST
K	SS	nd	S	nd	nd	nd	SS	SS	S	nd	SS	SS	S	SS	SS	SS	nd	nd	nd
S1	SS	SS	R	S	MS	S	SS	SS	R	S	SS	MS	S	S	SS	SS	R	R	S
S2	SS	SS	R	S	R	R	SS	SS	R	MS	SS	S	SS	SS	SS	SS	R	R	S
S3	SS	SS	R	S	R	R	SS	SS	R	MS	SS	SS	SS	S	S	SS	S	R	S
S4	S	SS	MS	S	R	R	SS	SS	R	S	S	MS	S	SS	SS	S	MS	R	S

K – контролна проба от *St. aureus* ATCC 25923.

Б) МКБ, изолирани от кисело мляко

Шам	a* Антибиотици																		
	b* Инхибитори на синтеза на клетъчната стена									b** Инхибитори на синтеза на белтъци						b*** Инхибитори на синтеза на НК			
	P	A	O	Cfz	Cm	Ct	Ce	Mer	V	G	D	T	C	E	L	R	Pf	Le	ST
1V	R	S	R	S	nd	MS	S	S	R	R	MS	S	S	S	S	MS	R	S	nd
2V	MS	S	R	MS	MS	S	S	MS	R	R	MS	S	S	SS	S	MS	R	S	nd
3V	R	S	R	MS	MS	MS	S	MS	R	R	MS	S	S	S	S	MS	R	S	nd
4V	MS	S	R	MS	R	nd	S	MS	R	R	MS	S	S	SS	S	MS	-	S	MS
5V	R	SS	R	S	nd	S	SS	S	R	R	S	SS	S	SS	SS	MS	R	SS	nd
6V	R	S	MS	S	nd	S	S	MS	R	R	MS	S	S	SS	S	MS	R	S	nd
7V	S	SS	R	S	MS	S	S	S	R	nd	nd	S	MS	SS	S	MS	nd	S	R
8V	MS	S	R	S	MS	R	MS	MS	R	nd	nd	S	R	S	S	MS	nd	S	MS
9V	MS	S	R	S	MS	R	MS	MS	R	nd	nd	S	MS	S	S	MS	nd	S	R
10V	MS	S	R	S	MS	R	MS	S	R	nd	nd	S	MS	S	S	MS	nd	S	MS
M1A	MS	S	S	S	MS	S	S	S	R	nd	MS	nd	R	S	S	R	nd	S	S

В) МКБ, изолирани от бяло саламурено сирене

Шам	a Антибиотици																		
	b Инхибитори на синтеза на клетъчната стена									b**Инхибитори на синтеза на белтъци						b***Инхибитори на синтеза на НК			
	P	A	O	Cfz	Cm	Ct	Ce	Mer	V	G	D	T	C	E	L	R	Pf	Le	ST
S5	S	SS	R	SS	MS	S	S	S	R	R	S	MS	S	S	SS	SS	R	R	R
S6	MS	SS	MS	SS	MS	S	SS	S	R	R	SS	S	SS	SS	MS	S	R	R	MS
S7	MS	SS	R	S	MS	SS	SS	S	R	MS	SS	S	SS	SS	MS	SS	R	MS	-
S8	S	SS	R	S	MS	R	SS	SS	R	MS	SS	S	SS	SS	S	SS	R	R	S
S9	SS	SS	R	SS	MS	MS	SS	SS	R	MS	SS	S	S	S	S	SS	R	R	S
S10	S	SS	R	S	MS	S	S	SS	R	MS	S	MS	S	S	MS	S	R	MS	S
S12	S	SS	R	S	MS	S	SS	S	R	MS	S	MS	SS	S	SS	SS	R	R	S
OC1	MS	MS	R	S	MS	MS	R	MS	R	MS	S	MS	S	S	MS	S	R	R	S
OC2	R	S	R	S	MS	MS	R	MS	R	MS	S	MS	MS	S	MS	S	R	R	S
BC32	MS	S	-	R	MS	nd	R	nd	R	MS	S	nd	S	S	MS	-	-	-	-
BC41	MS	MS	R	S	R	R	R	MS	R	MS	S	MS	MS	S	MS	S	R	R	S
KC2	MS	S	R	S	MS	MS	MS	MS	R	MS	MS	MS	S	S	MS	S	MS	MS	S
G7D	S	S	R	SS	R	S	MS	MS	R	MS	S	MS	S	S	S	SS	R	R	R
H2A	S	S	MS	S	MS	MS	MS	S	R	nd	MS	nd	S	SS	MS	S	MS	S	nd
H3D	MS	S	R	S	R	MS	MS	MS	R	nd	R	nd	S	S	MS	SS	MS	MS	nd
H4D	S	S	MS	S	MS	MS	R	MS	R	nd	MS	nd	S	S	S	SS	MS	MS	nd

Г) МКБ, изолирани от кашкавал и извара

Щам	a* Антибиотици																		
	b* Инхибитори на синтеза на клетъчната стена									b** Инхибитори на синтеза на белтъци							b*** Инхибитори на синтеза на НК		
	P	A	O	Cfz	Cm	Ct	Ce	Mer	V	G	D	T	C	E	L	R	Pf	Le	ST
S11	SS	SS	R	S	R	R	S	S	R	MS	S	SS	SS	MS	S	S	S	R	MS
Kz1	MS	MS	R	MS	MS	MS	MS	S	R	MS	MS	MS	S	MS	MS	S	R	MS	S
Kz2	S	S	R	S	MS	S	R	MS	R	MS	MS	MS	S	S	MS	S	R	MS	MS
Kz3	MS	S	R	MS	MS	MS	MS	S	R	MS	MS	S	S	S	MS	S	R	MS	S
J6B	MS	MS	R	MS	R	S	R	R	R	R	nd	MS	MS	S	MS	MS	R	R	nd

Легенда: „a*“: R-устойчиви, MS – умерено чувствителни (зона: 7-16 mm), S – чувствителни (зона: 16-25 mm), SS – силно чувствителни (>25 mm); K – контролна проба от *S. aureus* ATCC 25923.

„b*“: P-пеницилин; A-ампицилин; O-оксацилин; Cfz-цефазолин; Cm-цефамандол; Ct-цефотаксим; Mer-меропенем; Ce – цефепим; V-ванкомицин;

„b**“: G-гентамицин; D-доксциклин; T-тетрациклин; C-хлорамфеникол; E-еритромицин; L-линкомицин;

„b***“: R-рифампин; Pf-пекфлоксацин; ST-сулфаметоксазол триметоприм; Le-левофлоксацин;

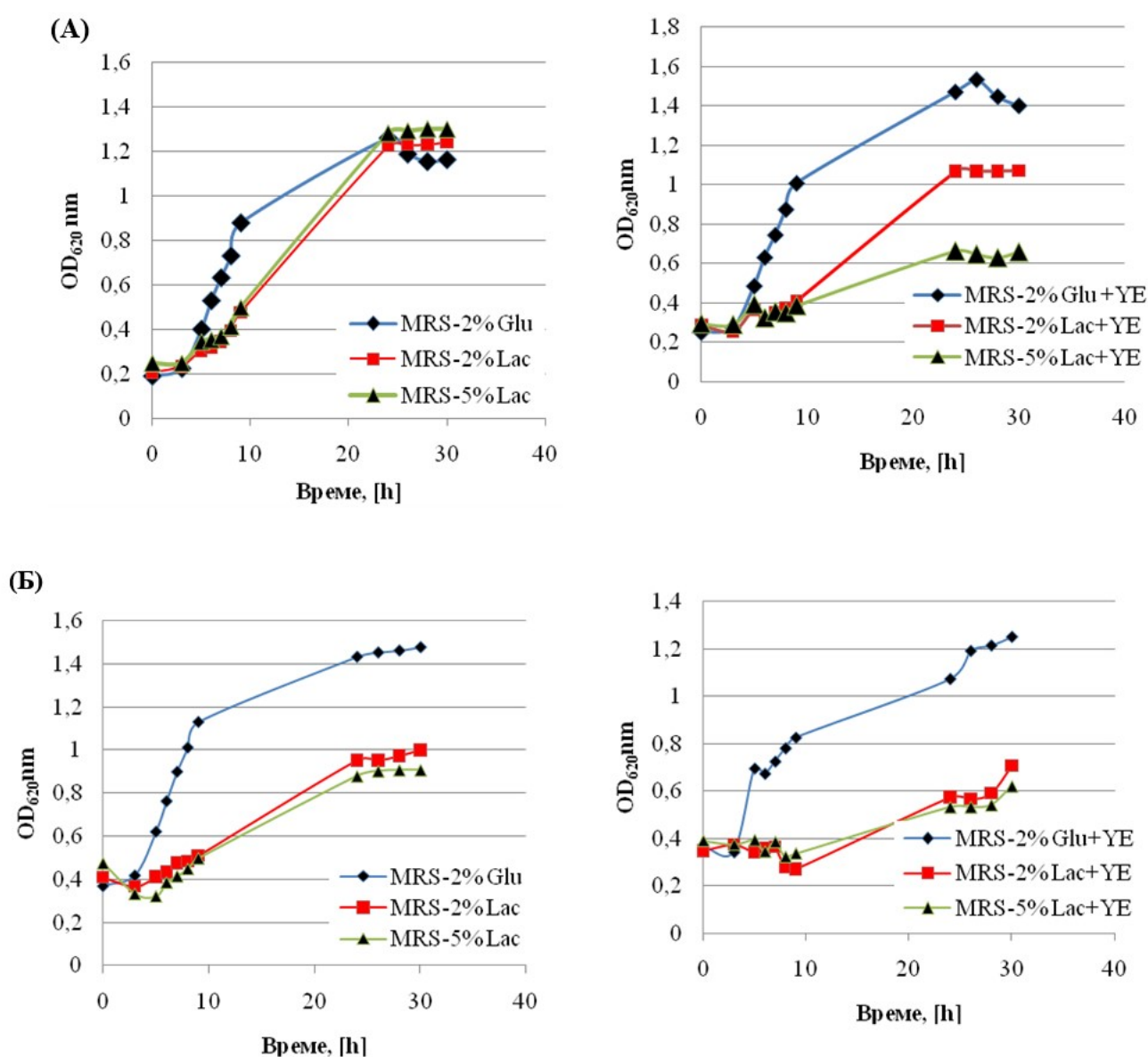
Сравнявайки щамовете в отделните групи (изолирани от катък, кисело мляко, сирене, кашкавал и извара) се наблюдава щамово-специфичен спектър на антибиотична чувствителност. Повечето МКБ проявяват резистентност към оксацилин, ванкомицин, пекфлоксацин и левофлоксацин в изпитваните концентрации, докато ампицилинът, еритромицинът, рифампинът и цефепимът се явяват ефективни инхибитори.

Получените резултати са в съответствие с публикувани данни за лактобацилите. Те са чувствителни към антибиотици с Грам-положителен тип спектър на действие, като еритромицин и сулфаметоксазол триметоприм, широкоспектрни антибиотици като тетрациклин и хлорамфеникол и β -лактамни антибиотици като ампицилин и пеницилин (Georgieva et al., 2015; Ammor et al., 2007). Това изключва възможността за трансфер на най-често срещаните гени, кодиращи резистентността спрямо тетрациклин, еритромицин и хлорамфеникол (Cataloluk & Gogebakan, 2004; Lin et al., 1996). За разлика от тях, устойчивостта срещу антибиотици с Грам-отрицателен тип спектър на действие (левофлоксацин, пекфлоксацин) е често наблюдавана при лактобацилите (Klare et al., 2007; Ammor et al., 2007; Danielsen and Wind, 2003). Това може да се обясни с високия процент на спонтанни хромозомни мутации, предаващи резистентност към тези антибиотици (Danielsen and Wind, 2003; Curragh et al., 1992). Щамове с такъв тип придобита резистентност имат нисък потенциал за хоризонтален трансфер и могат да се използват като фуражни добавки (EFSA, 2012).

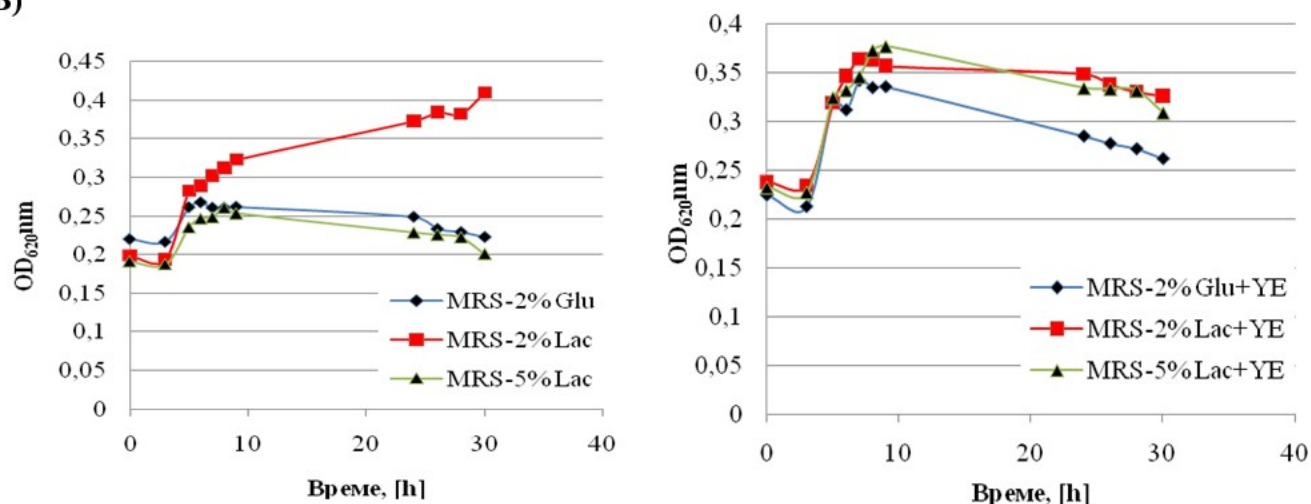
В. Технологични свойства и приложимост на МКБ

1. Растеж и развитие на МКБ в среда с различни въглеродни източници

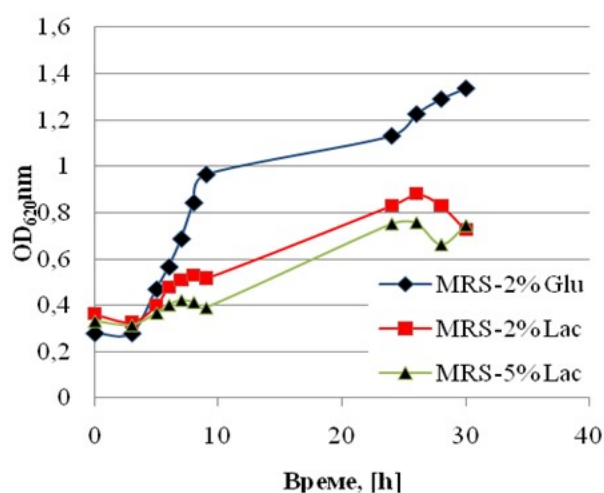
Изборът на подходяща среда играе централна роля в опитите за подобряване добива на биомаса от МКБ и свързаните с нея продукти при процеса на ферментация. Ето защо, в настоящия дисертационен труд е разгледана способността на три от изследваните щамове да растат в среда с различен въглероден източник: 2% (w/v) лактоза, 5% (w/v) лактоза, с и без наличие на добавка от лабораторен екстракт от хлебни дрожди (богат на витамини и растежни фактори от дрожди) и 2% (w/v) глюкоза – като контрола за лесно и бързо усвояем въглехидрат. Получените резултати са обобщени на **Фиг. 16**.



(B)



(Г)



Фиг. 16. Растежни криви на микробни култури от щамове: (А) *Lb. plantarum* S8, (Б) *Lb. plantarum* S10, (В) *Lb. bulgaricus* Ro34 и (Г) смес от трите щам (1:1:1) в модифицирана хранителна среда MRS, отчетени спектрофотометрично (OD_{620nm}) в 3-кратно повторени тестове.

Легенда: среда MRS с глюкоза, с лактоза (2.0 и 5.0% лактоза) и с добавка на дрождев екстракт

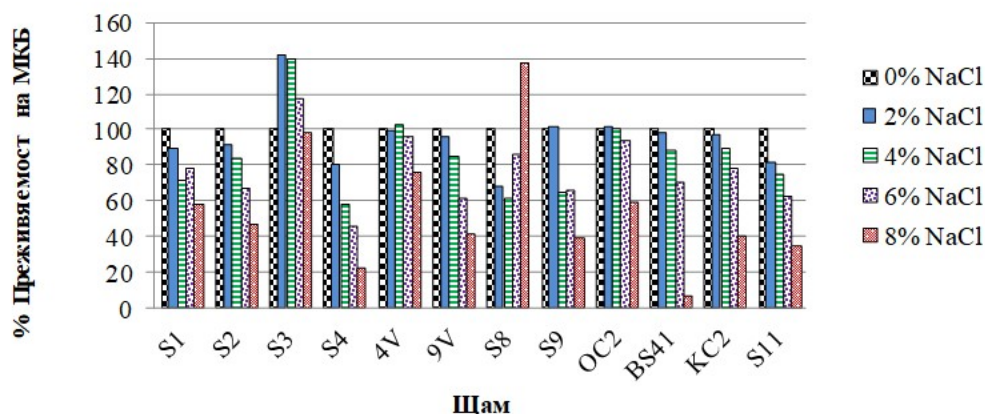
Двата щам от вида *Lb. plantarum* – S8 и S10 показват сходна кинетика на растеж при култивиране в шесте варианта на модифицирана среда MRS (Фиг. 16А и Б). Най-добър растеж е отчетен в среда MRS-2% Glu с добавка на експериментален дрождев екстракт, следван от растеж в среда MRS-2% Glu, MRS-5% Lac, MRS-2% Lac и MRS-2% Lac-YE. Най-слаб растеж се наблюдава в среда MRS-5% Lac-YE. На бързо усвояемия субстрат глюкоза се наблюдава кратка фаза на адаптация с продължителност до 2-3^{-я} h, а при лактоза – времето за приспособяване е по-дълго (до 10^{-я} h), вследствие на което има постоянен растеж и не така отчетлива лог-фаза (Фиг. 16А и Б). Това вероятно се дължи на необходимостта от индуциране на ензимите, отговорни за катаболизма на лактозата.

Интересен е наблюдаваният ефект на добавения дрождев екстракт при щам *Lb. plantarum* S8 (Фиг. 16А). В негово присъствие растежът на щама се забавя в среда с 2% (w/v) лактоза, и още по-отчетливо при наличие на 5% (w/v) лактоза. Вероятно има ефект на инхибиране на част от катаболитните процеси на лактозата в присъствие на груб клетъчен екстракт от дрождеви клетки, под чиято форма е получен екстрактът.

Най-слаб растеж в така проведените експериментални условия се наблюдава при *Lb. bulgaricus* Ro34 (Фиг. 16В). Неговата клетъчна плътност, съпоставена с тази при двата щама от вида *Lb. plantarum*, е около 2 пъти по-малка. Освен това за разлика от *Lb. plantarum*, *Lb. bulgaricus* усвоява по-добре лактоза (2% и 5% w/v), отколкото глюкоза. Лаг-фазата и в трите среди продължава приблизително еднакво време, докато при усвояването на глюкоза с добавка на витамини, се постига по-добър растеж. Друга причина за по-слабия растеж на *Lb. bulgaricus* Ro34 се дължи на това, че именно като изолат от кисело мляко от вида *Lb. bulgaricus*, той вероятно изисква по-висока температура за растеж и развитие (например 42°C). Освен това видът е филогенетично адаптиран към растеж на мляко, което се потвърждава и от получените резултати от Carvahlo et al., (2004). *Lb. bulgaricus* оцелява по-добре по време на съхранение, когато клетките се развиват в присъствието на фруктоза, лактоза или маноза, отколкото на глюкоза.

2. *In vitro* устойчивост на МКБ към различни концентрации на натриев хлорид

Прагът на устойчивост на изследваните лактобацили спрямо NaCl е установен с помощта на моделна система, характеризираща се с вариращи стойности на NaCl (mMRS среда с 0, 2, 4, 6 и 8% (w/v) NaCl) и по-голяма продължителност на действие (24 h инкубиране). Преживяемостта на лактобацилите в условия на различни концентрации на NaCl е представена на Фиг. 17:



Фиг. 17. Процент преживяемост на изследваните МКБ щамове при различни концентрации NaCl на 24 h от инкубирането.

Получените на **Фиг. 17** резултати показват преживяемост при всички МКБ щамове, като с повишаване на концентрацията на NaCl, жизнеността на клетките им постепенно намалява. При най-високата концентрация от 8% (w/v) NaCl преживяемостта на повечето лактобацилни щамове е под 60%, с изключение на щамове *Lb. plantarum* S8 и S3 и *Lb. hamsteri* 4V, които се характеризират с най-висока преживяемост, съответно 136.6%, 98.2% и 75.7%. Щамове *Lactobacillus* ssp. S1 (57.4%) и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2 (58.5%) имат умерена преживяемост, а при останалите щамове тя се намира в граници 22-47%. Най-ниска преживяемост се наблюдава при щам *Lb. plantarum* BS41 (5.4%). При концентрация от 6% (w/v) NaCl най-високи стойности се получават при щам *Lb. plantarum* S3 (117.1%), следван от щамове *Lb. hamsteri* 4V (95%) и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2 (93.7%). Останалите щамове се характеризират с преживяемост в граници от 60.7 до 85.4% като най-ниски стойности се наблюдават при щам *Lb. fermentum* S4 (44.7%). При концентрация от 4% (w/v) NaCl най-високи стойности се получават отново при щамовете, показали най-висока преживяемост при 6% (w/v) NaCl - *Lb. plantarum* S3, *Lb. hamsteri* 4V и *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, съответно 139%, 102% и 99.6%. При най-ниската концентрация от 2% (w/v) NaCl около 75% от щамовете проявяват преживяемост $\geq 90\%$. Други автори отчитат растеж в присъствието на 2% (w/v) NaCl при всички изследвани лактобацили (Hadler & Mandal, 2015; Reale et al., 2015; Sadrani et al., 2014).

3. Ензимна активност на МКБ

3.1. Ензимен профил на МКБ

С помощта на използваната API ZYM система е извършено изследване на ензимните активности, участващи в липидния, въглехидратния, белтъчния и фосфатния метаболизъм на 15 МКБ щамове. Получените резултати са отразени в **Табл. 12** с помощта на 5-степенна скала.

Болшинството от МКБ щамовете показват висока пептидазна активност (левцин и валин аминопептидазна) и ниска цистеин аминопептидазна активност, слаба естеразо-липазна и естеразна, и липса на липазна активност (с изключение на щам *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2). В допълнение е отчетена ниска активност спрямо кисела фосфатаза и липсваща такава спрямо алкална фосфатаза (с изключение на щамове *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2 и *Lb. plantarum* BS41). Наблюдава се и ниска фосфохидролазна активност, а при щамове *Lb. rhamnosus* S2 и *Lb. plantarum* S6 - тя дори отсъства (**Табл. 12**).

Табл. 12. Ензимен профил на изследваните МКБ щамове.

Ензими	Щамове МКБ														
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S12	OC2	S10	KC2	S11	BS41	S7
Контрола	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Алкална фосфатаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0.5	0
Естераза (C4)	2	0.5	2.5	2.5	0	2	0	0.5	0	1.5	0	0	1.5	1	0
Естеразо-липаза (C8)	1	1	0.5	0.5	0	0	0	0	0	1	0	0	0.5	0	0
Липаза (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Левцин аминопептидаза	5	5	4	4	5	0	4	4	3	3	3	4	2.5	3	1.5
Валин аминопептидаза	4	0	3	3	5	0	4	4	2	2	2	3	3	3	1
Цистеин аминопептидаза	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	1	0.5	2	0	2	1	1	0
Трипсин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
α -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0
Кисела фосфатаза	1	2	2	2	2	1	2	2	0.5	2	2	2	2	2	0.5
Фосфохидролаза	1	0	2	2	0.5	0	1	2	1	1	0.5	2	1	1	0.5
α -галактозидаза	5	5	4	4	0	1	0	0	0	0	0	0.5	4	0	0
β -галактозидаза	5	5	4	4	5	2	5	5	3	2	4	3	5	2	4
β -глюкуронидаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
α -глюкозидаза	3	3	3	3	4	2	4	4	0	3	3	3	4	2	2
β -глюкозидаза	0.5	0	1	1	2	0	1	2	1	4	0.5	2.5	2.5	3	0.5
N-ацетил- β -глюкозаминидаза	0	0	1	1	0.5	0	0.5	0.5	0.5	2	0.5	1	1	2	0
α -манозидаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0
α -фукозидаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.5	0	2	0

Легенда: Оценката на активността е направена съгласно 5-степенна скала (0 - отрицателна реакция, 5 – реакция с максимална наситеност като стойности 3, 4 и 5 отговарят на положителна реакция) в зависимост от наситеността на оцветяването.

По отношение на въглехидратния метаболизъм почти всички щамове показват висока β -галактозидазна и α -глюкозидазна, но слаба β -глюкозидазна активност, с изключение на щамове *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2 и *Lb. plantarum* BS41. Висока α -галактозидазна активност проявяват единствено щамове, изолирани от катък (*Lactobacillus* ssp. S1, *Lb. rhamnosus* S2, *Lb. plantarum* S3, *Lb. fermentum* S4) и щам *Lb. paracasei* S11, докато при останалите тя е много ниска или липсва (табл. 12). За всички щамове е наблюдавана липса или много ниска активност по отношение на ензимите α -манозидаза и α -фукозидаза. От разглежданите щамове единствено щамове *Lb. plantarum* S6 и S7 притежават доста ниски стойности за изследваните ензими.

Нито един от лактобацилите не притежава ензимите с увреждащо действие: трипсин, β -глюкуронидаза и N-ацетил- β -глюкозаминидаза (González et al., 2015). От изследваните щамове единствено *Lb. salivarius* KC2 притежава много ниска β -глюкуронидазна активност (около 2). Установено е, че МКБ с такава активност инхибират растежа на β -глюкуронидаза-положителните патогени или вредни бактерии (*E. coli* и *Clostridium* ssp.)

в червата чрез образуване на антимикробни вещества или посредством конкуренция с други микроорганизми за адхезионни места и хранителни вещества (Honi et al., 2013). Така изследваните лактобацили могат да имат терапевтичен потенциал в чревния тракт, когато са използвани като пробиотични добавки в млечни продукти.

3.2. β -Галактозидазна активност на МКБ

В допълнение към резултатите от системата API ZYM са и данните от анализа за β -галактозидазната активност на 30 лактобацилни щама, изолирани от 5 традиционни за България млечнокисели продукти – катък, извара, кисело мляко, бяло саламурено сирене и кашкавал. За целта е използван комерсиален кит с ONPG дискове, който е бърз и лесен за изпълнение и дава качествен отговор за възможно наличие на МКБ с добра β -галактозидазна активност. Резултатите са представени на **Табл. 13**:

Табл. 13. β -Галактозидазна активност на изследваните МКБ щамове.

Продукт	Щам	β -Галактозидазна активност, определяна през интервал от време, [h]			
		1 h	2 h	3 h	24 h
	Контрола (<i>E. coli</i> K12)	+	+	+	++
Катък	<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	-	-	-	+/-
	<i>Lb. rhamnosus</i> S2	-	-	+/-	++
	<i>Lb. plantarum</i> S3	-	-	-	-
Извара	<i>Lactobacillus</i> ssp. J6B	-	+/-	+/-	+/-
Кисело мляко	<i>Lb. fermentum</i> 9V	-	-	-	-
	<i>Lb. rhamnosus</i> Ro33	-	+/-	+	++
	<i>Lb. bulgaricus</i> Ro34	-	-	-	+
Бяло саламурено сирене	<i>Lb. plantarum</i> S5	+	+	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> S6	-	+/-	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> S7	-	-	-	+
	<i>Lb. plantarum</i> S8	-	+	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> S9	-	-	-	++
	<i>Lb. plantarum</i> S10	-	+	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> S12	+	+	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> OC1	-	-	-	-
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> OC2	-	-	-	-
	<i>Lb. salivarius</i> KC2	-	-	-	-
	<i>Lb. plantarum</i> BS32	-	-	-	-
	<i>Lb. plantarum</i> BS41	-	-	-	+/-
	<i>Lactobacillus</i> ssp. H4D	-	-	-	-
	<i>Lactobacillus</i> ssp. H3D	-	-	-	-
	<i>Lb. fermentum</i> G7D	-	-	-	-
	<i>Lb. fermentum</i> BS31	-	-	-	-
	<i>Lactobacillus</i> ssp. BS42	-	-	-	-
	<i>Lactobacillus</i> ssp. KC1	-	-	-	-
	Смес: S8:S10:Ro34	-	+/-	+	++
Кашкавал	<i>Lb. paracasei</i> S11	+	+	+	++
	<i>Lb. plantarum</i> Kz1	-	-	-	-
	<i>Lb. plantarum</i> Kz2	-	-	-	+/-
	<i>Lb. plantarum</i> Kz3	-	-	-	+/-

Легенда: (-) – липса на активност; (+/-) – слаба активност; (+) – добра активност; (++) – висока активност;

От получените резултати може да се заключи, че до 3 h от култивирането едва 34% от щамовете могат да бъдат определени като бързо-ферментиращи, т.е. притежават ензимите β -галактозидаза и пермеаза, 23% от тях са късно-ферментиращи (притежават само β -галактозидаза) и 43% - изобщо не ферментират лактоза. Най-висока β -галактозидазна активност, съизмерима с контролния щам *E. coli* K12, проявяват 33% от щамовете, по-ниска активност се наблюдава при щамове *Lb. bulgaricus* Ro34 и *Lb. plantarum* S7, а 17% от щамовете са с ясно изразена ниска ензимна активност.

3.3. Протеолитична (казеинолитична) активност на МКБ

Способността на лактобацилите да участват в протеолизата на млечни белтъци е видово- и щамово-специфичен белег и налага изучаването на протеолитичната активност на всеки новоизолиран щам. Интересът в тази посока е предизвикан и от значението на протеолитичната система на МКБ при зреенето на сиренето, бързият растеж в мляко по време на ферментацията, както и подобряването на преживяемостта по време на съхранение (Donkor et al., 2007). В тази връзка е осъществен първичен скрийнинг за наличието на протеолитична активност и за способността на 19 МКБ щама да хидролизират казеин. При култивиране на МКБ в продължение на 48 h при 37°C на Са-казеинат агар, нито един от щамовете не формира зона на просветляване около ямките, което наложи провеждането на експеримента на среда Млечен агар. Получените резултати за общата протеолитична активност на изследваните МКБ щамове са представени на **Табл. 14**:

Табл. 14. Обща протеолитична активност на МКБ, изолирани от различни млечни продукти.

Щам	Зона на просветляване в агара, [mm]	
	при 24 h МКБ култури	при 72 h МКБ култури
<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	12.5	14
<i>Lb. rhamnosus</i> S2	13	13.5
<i>Lb. plantarum</i> S3	nd	13.5
<i>Lb. fermentum</i> S4	nd	13
<i>Lactobacillus</i> ssp. 4V	nd	13
<i>Lactobacillus</i> ssp. 5V	nd	15
<i>Lactobacillus</i> ssp. 6V	nd	15.5
<i>Lb. plantarum</i> 7V	nd	12.5
<i>Lb. plantarum</i> 8V	nd	15
<i>Lb. fermentum</i> 9V	nd	14.5
<i>Lb. plantarum</i> 10V	nd	13
<i>Lb. plantarum</i> S5	11	14.5
<i>Lb. plantarum</i> S6	12	12
<i>Lb. plantarum</i> S7	11	12
<i>Lb. plantarum</i> S8	13	13.5
<i>Lb. plantarum</i> S9	12.5	13
<i>Lb. plantarum</i> S10	11	13
<i>Lb. plantarum</i> S12	12.5	15.5
<i>Lb. paracasei</i> S11	12	12

***Легенда:** nd – не е определено;

Всички щамове от род *Lactobacillus* показват много чисти зони на млечен агар в началото на култивирането, докато на среда Са-казеинат агар не се наблюдава никаква активност. Липсата на отчетливи зони на среда Са-казеинат агар, вероятно се дължи на по-слабата протеолитична и по-висока пептидазна активност, която е установена при болшинството от щамове, а също така и от факта, че щамове заквасват по-бавно пълномаслено и сухо мляко (съгласно т. 3.4 от подраздел „Технологични свойства и приложимост на МКБ” в Резултати и дискусия и табл. 12).

На среда Млечен агар най-висока протеолитична активност се наблюдава при щамове от кисело мляко (*Lactobacillus* ssp. 5V и 6V и *Lb. plantarum* 8V) и бяло саламурено сирене (*Lb. plantarum* S12). Съгласно класификация на Kunduhoglu et al., (2012), те се определят като щамове с умерена протеолитична активност (диаметър на зоната 13-20 mm). Всички останали щамове, които са с диаметър на зоната по-малък от 13 mm, се определят като щамове с ниска протеолитична активност. Получените резултати на млечен агар показват още, че 72-часовите МКБ култури притежават по-добра протеолитична активност, отколкото тези в експоненциална фаза. От това може да се заключи, че протеолитичната активност нараства с времето, в резултат на първоначалния клетъчен лизис в края на ферментацията.

3.4. Коагулационна способност на МКБ

За по-пълно охарактеризиране на протеолитичната активност на някои от анализираниите щамове МКБ е проведено допълнително изследване, изясняващо влиянието на различни азотни източници върху степента на коагулация и характеристиките на коагулума при приготвяне на кисело мляко. Сред подбраните за изследване щамове са: *Lactobacillus* ssp. S1, *Lb. rhamnosus* S2, *Lb. plantarum* S3, *Lb. fermentum* S4, *Lb. plantarum* S8, *Lb. plantarum* S9 и *Lb. paracasei* S11, изолирани съответно от катък, сирене и кашкавал. След провеждане на млечнокиселата ферментация, пробите са прибрани в хладилник при температура 4°C за период на съхранение от 21 дни.

Проведеният тест в сухо мляко (без добавка) също дава основание да потвърдим изследваните щамове МКБ като бавно-коагулиращи. При допълнителното обогатяване на пробите с дрождев екстракт и пептон, се наблюдава значително по-бързо протичане на коагулацията, но повечето щамове не заквасват млякото по-рано от 6 h. На 24 h от коагулацията пробите от кисело мляко се характеризират с плътен коагулум, с малко количество отделена суроватка, като не се наблюдават съществени различия между отделните щамове. Наблюдаваните характеристики се запазват непроменени до 14-я ден от съхранението, когато настъпват някои изменения. Плътноста на коагулума се запазва, но

количеството на отделената суроватка се увеличава при всички проби ферментирало мляко с добавка на дрождев екстракт (изкл. щамове *Lb. plantarum* S9 и *Lb. paracasei* S11), при пробите с добавка на казеинов пептон (изкл. щамове *Lb. plantarum* S3 и S8, *Lb. fermentum* S4 и *Lb. paracasei* S11) и при контролната проба, заквасена с щам *Lb. fermentum* S4, без добавки. Плътният коагулум и консистенция, заедно с голямото количество отделена суроватка, се запазват до 21 ден.

Друг много важен показател е активната киселинност на готовия продукт при процеса на ферментация. За времето на съхранение киселинността на млеката намалява от рН 7.6, измерено преди ферментацията, до рН 4.26 на 21 ден – най-ниска стойност, отчетена при проби с щам *Lactobacillus* ssp. S1 и *Lb. plantarum* S8 (Табл. 15).

Табл. 15. Изменение на рН на ферментираните млека за периода на съхранение (21 дни).

Закваска	Активна киселинност		
	Контрола (10% w/v ОСМ)	10% w/v ОСМ с добавка 5% КП	10% w/v ОСМ с добавка 1% ДЕ
<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	4.55	4.40	4.26
<i>Lb. rhamnosus</i> S2	4.52	4.53	4.58
<i>Lb. plantarum</i> S3	4.71	4.47	4.59
<i>Lb. fermentum</i> S4	4.65	4.69	4.97
<i>Lb. plantarum</i> S8	4.48	4.26	4.33
<i>Lb. plantarum</i> S9	4.62	4.67	4.59
<i>Lb. paracasei</i> S11	4.81	4.36	4.55

Легенда: ОСМ – обезмаслено сухо мляко (Нитана, Германия); ДЕ – дрождев екстракт; КП – пептон от казеин;

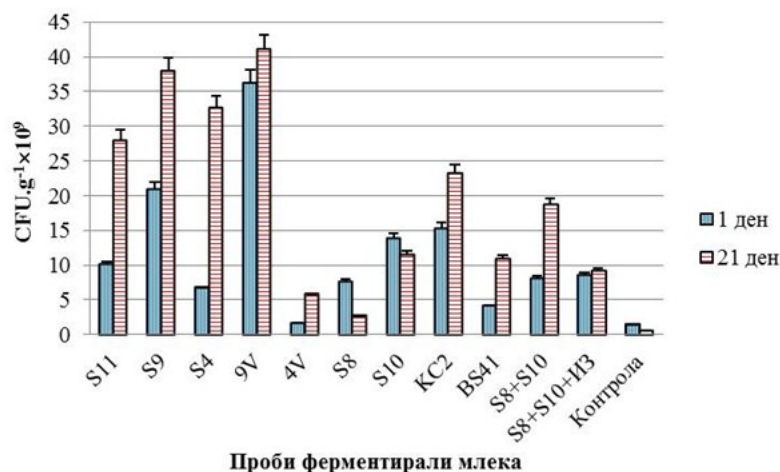
Наличието на протеолитична активност се характеризира с намаляване на стойността на рН в среда от обезмаслено мляко по време на процеса на ферментация. Получените стойности за рН се потвърждават и от изследванията на Yelnetty et al., (2014), които също в края на ферментацията получават рН стойности 4.48 и 4.72 за щамове *Lb. plantarum* YN 1.3 и YN 1.1.

4. Оценка на приложимостта на новохарактеризирани щамове МКБ при производството на ферментирани млека

Заклучителен етап в настоящия дисертационен труд е включването на част от лактобацилите, доказали своята безопасност и показали добри функционални характеристики, самостоятелно или като добавки при приготвянето на традиционния за българската кухня млечнокисел продукт – кисело мляко.

За целта в първата група експерименти е изследвано влиянието на закваските, включващи видовете *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* и *Lb. salivarius* от различ-

ни източници, върху киселинността, вискозитета и общото микробно число на получените ферментирани млека за период на съхранение от 21 дни. За получаване на ферментирани млека е инокулирано пастеризирано краве мляко с 10% (v/v) инокулум от съответните за всяка проба концентрирани МКБ култури в мляко. Отчитания на общия брой МКБ в отделните проби са извършени в края на ферментационния процес и на 21 ден от съхранението на млеката, като резултатите са обобщени на **Фиг. 18**.



Фиг. 18. Количествен микробиологичен анализ на жизнеспособната микрофлора на проби ферментирали млека на 1-ви и 21-ви ден от съхранението. *Легенда:* ИЗ – индустриална закваска.

Жизнеспособността на МКБ във ферментирани продукти е от особено значение, за да могат да окажат здравословен ефект. Получените резултати показват висока клетъчна преживяемост на използваните закваски в млеката, в граници от 0.55×10^9 до 41.16×10^9 CFU.g⁻¹ за периода от 21 дни на съхранение. Сравнени с контролата (мляко, инокулирано с индустриална закваска), всички ферментирани млека запазват висока жизненост до края на срока на годност. Освен това при всички щамове е наблюдаван сравнителен растеж за времето на ферментация на млякото, единствено при млякото, заквасено с щам *Lb. plantarum* S8, има известно намаляване на жизнеността на клетките, но като цяло общият брой живи клетки се запазва висок (2.65×10^9 CFU.g⁻¹).

При сравняване на пробите със закваска от щамове *Lb. plantarum* S8 и S10 с и без добавка на индустриална закваска, се наблюдава едно задържане на растежа на щамовете в присъствието на стартерната култура. Това може да се обясни с факта, че често стартерните култури синтезират метаболити, като: млечна киселина, водороден пероксид и бактериоцини, които могат да доведат до редукция в числеността на пробиотика. Жизнеспособността на пробиотичните бактерии в готовия продукт може да се повлияе и от други фактори като: рН и киселинност на млякото, температурата, присъствието на кислород в продукта и др. (Shah, 2000). Съгласно БДС 12:2010, който предполага броят на

жизнеспособните клетки да бъде над 10^6 CFU.g⁻¹, получените млека се характеризират с висок брой живи клетки в крайния продукт и предлагат ферментираното мляко, като подходяща форма за приемане на изследваните кандидат-пробиотични щамове.

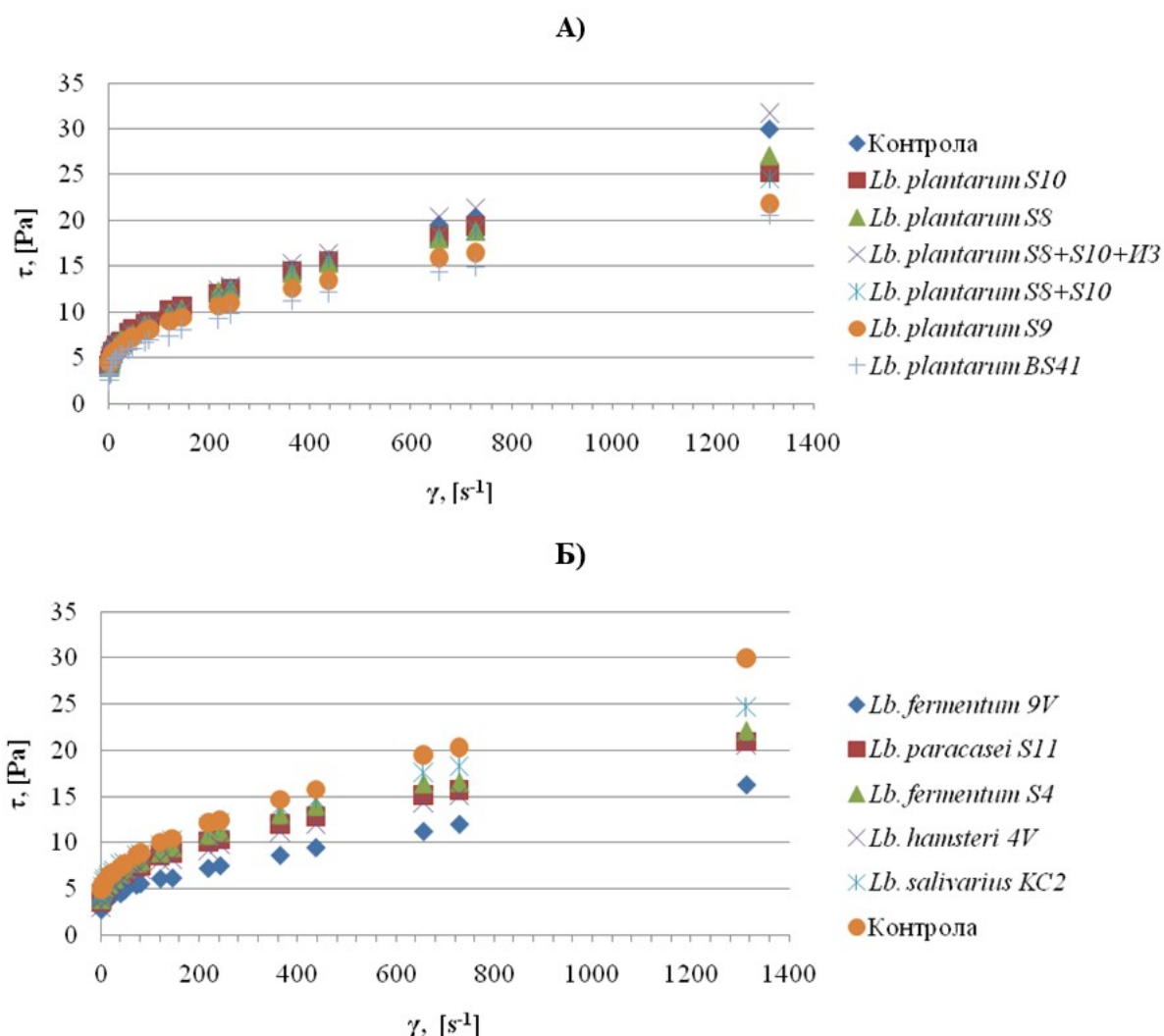
Друг важен показател при производството на ферментирани продукти е тяхната киселинност. Способността на всяка закваска да понижава рН в млякото е измерена в края на ферментацията и на 21-я ден от съхранението на млеката, като паралелно са проведени експерименти за определяне на титруемата киселинност и процентното съдържание на млечна киселина (Табл. 16).

За млеката, ферментирани с *Lb. fermentum* S4, *Lb. plantarum* S10, *Lb. paracasei* S11 и смес от *Lb. plantarum* S8, S10 и индустриална закваска, се наблюдава малко по-силно подкисляване в сравнение с контролната проба (индустриална закваска). Най-висока подкисляваща способност в края на ферментацията има закваската, съдържаща смес от *Lb. plantarum* S8, S10 и индустриална закваска (рН 3.74), а най-ниска – при закваска от *Lb. plantarum* S8 (рН 4.28). От друга страна закваската от *Lb. plantarum* S8, S10 и индустриална закваска (рН 3.74) почти не променя киселинността си след 21 дни (рН 3.75). По време на съхранението болшинството от пробите показват незначително понижение на рН, като единствено при млеката, получени със закваска от *Lb. hamsteri* 4V и *Lb. plantarum* S8, се наблюдава повишение на рН, съответно 4.66 и 4.38. Най-бързо и значимо понижение на рН и съответно на титруемата киселинност е отчетено през първите 24 h, след което физикохимичните параметри остават сравнително стабилни. Изключение прави пробата с щам *Lb. plantarum* BS41, при която са отчетени по-значителни промени, съответно понижение на рН от 4.26 до 3.85 и титруема киселинност от 103 до 173°T.

Табл.16. Физикохимична характеристика на кисели млека, приготвени с различни МКБ закваски за периода на съхранение.

Проба	Физикохимични параметри					
	рН		Киселинност, [°T]		% Млечна киселина	
	1 ден	21 ден	1 ден	21 ден	1 ден	21 ден
Контрола (ИЗ)	3.93	3.80	149	169	1.34	1.52
Смес от <i>Lb. plantarum</i> S8, S10 и ИЗ	3.74	3.75	177	170	1.59	1.53
Смес от <i>Lb. plantarum</i> S8 и S10	4.10	3.86	140	168	1.26	1.51
<i>Lb. hamsteri</i> 4V	4.22	4.66	115	105	1.03	0.94
<i>Lb. fermentum</i> 9V	4.06	3.76	139	181	1.25	1.63
<i>Lb. fermentum</i> S4	3.80	3.68	167	198	1.50	1.78
<i>Lb. plantarum</i> S8	4.28	4.38	101	98	0.91	0.88
<i>Lb. plantarum</i> S9	3.95	3.77	150	184	1.35	1.66
<i>Lb. plantarum</i> S10	3.80	3.73	133	178	1.20	1.60
<i>Lb. paracasei</i> S11	3.82	3.80	131	186	1.18	1.67
<i>Lb. salivarius</i> KC2	3.94	3.80	151	181	1.36	1.63
<i>Lb. plantarum</i> BS41	4.26	3.85	103	173	0.93	1.56

Освен микробиологичен и физикохимичен е извършен и реологичен анализ на ферментирания мляк поради факта, че вискозитетът е един от важните параметри, по който може да се следи качеството на млечнокиселите продукти. За целта са проведени експерименти по изследване реологичното поведение на описаните по-горе млека, на 1^{ви} и 21^{ви} ден от съхранението им, използвайки ротационен вискозиметър с коаксиални цилиндри Rheotest RV2 (Medingen, Германия) с цилиндър S1. На **Фиг. 19 (А, Б)** са показани типичните криви на течение на изследваните проби в края на ферментацията:



Фиг.19. Типични криви на течение на изследваните ферментирани млека в края на ферментацията.

Получените реологични криви на течение са криволинейни, с отрез и могат да бъдат описани с реологичния модел на Herschel-Bulkley:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n,$$

където τ е напрежението на деформация, [Pa], $\dot{\gamma}$ е скоростта на деформация [s^{-1}], K е индексът на консистентност, характеризиращ гъстотата на продукта, [$Pa \cdot s^n$], а n е

реологичният индекс на течение, показващ отклонението на пробата от нютоновото поведение (колкото той е по-различен от единица, толкова по-ненютонова е течността).

От **Фиг.19** се вижда, че най-високо разположени са кривите на течение на млеката със закваска от *Lb. plantarum* S8, *Lb. plantarum* S10 и ИЗ, а най-ниско – тези на *Lb. fermentum* 9V.

По методите на стандартната статистика са намерени стойностите на реологичните параметри на 1-я и 21-я ден от съхранението на пробите, съгласно модела на Herschel-Bulkley. Техните стойности, заедно с точността на описание, са представени на **Табл. 17**:

Табл. 17. Стойности на реологичните параметри на изследваните ферментирани млека.

Проба	τ_0 , [Pa]		K , [Pa.s ⁿ]		n , [-]		R^2		Mean error, %	
	1ден	21ден	1 ден	21 ден	1 ден	21 ден	1 ден	21 ден	1ден	21ден
Контрола (ИЗ)	4.70	3.49	0.2352	0.2980	0.6469	0.6232	0.9915	0.8405	2.24	6.99
<i>Lb. plantarum</i> S8, <i>Lb. plantarum</i> S10 и ИЗ	3.50	4.25	0.6266	0.5510	0.5059	0.5381	0.9847	0.9737	3.59	4.10
<i>Lb. plantarum</i> S8 и <i>Lb. plantarum</i> S10	3.35	4.00	0.5153	0.6668	0.5269	0.4854	0.9711	0.9821	4.30	3.04
<i>Lb. hamsteri</i> 4V	3.00	4.10	0.3865	0.4470	0.5386	0.5492	0.8480	0.9809	4.32	3.84
<i>Lb. fermentum</i> 9V	2.50	4.20	0.3701	0.301	0.4871	0.6269	0.9827	0.9837	3.41	3.97
<i>Lb. fermentum</i> S4	3.55	4.10	0.4812	0.4794	0.5126	0.5280	0.9452	0.9821	3.51	2.85
<i>Lb. plantarum</i> S8	3.60	3.10	0.4268	0.6714	0.5636	0.5193	0.9605	0.9732	6.26	5.80
<i>Lb. plantarum</i> S9	4.10	4.60	0.3158	0.2731	0.5695	0.6087	0.9742	0.9198	3.67	3.58
<i>Lb. plantarum</i> S10	3.80	3.55	0.4470	0.6133	0.5492	0.5390	0.9861	0.9726	5.99	7.68
<i>Lb. paracasei</i> S11	3.49	4.75	0.3805	0.2766	0.5395	0.6145	0.9649	0.9903	5.67	3.46
<i>Lb. salivarius</i> KC2	3.90	4.06	0.4257	0.6226	0.5523	0.4879	0.9518	0.9896	5.55	3.20
<i>Lb. plantarum</i> BS41	2.22	3.40	0.5700	0.6173	0.4828	0.5081	0.9390	0.9802	5.92	3.44

Стойностите на реологичните параметри на цитираните млека за 1-ви ден от таблицата потвърждават резултатите от **Фиг.19**. Трябва да се подчертае, че стойностите на реологичните параметри трябва да се разглеждат съвместно, тъй като реологичният модел не представлява физически закон, а по-скоро математическо описание. При сравнение на данните от **Фиг.19** и **Табл.16** и **17** може да се каже, че повишаването на броя на жизнеспособните микроорганизми и понижението на стойностите на рН води до повишение в стойностите на предела на течение. Това е обяснимо, тъй като наличието му се свързва с образуването на структури в изследваната система. Тези промени в предела на течение в повечето случаи са свързани с повишаване консистентността и понижаване на реологичния индекс на течение в края на съхранението.

За всички изследвани млека стойностите на реологичния индекс на течение са по-ниски от единица, следователно млеката проявяват псевдопластичен характер. Пределите

на течение на изследваните млека са близки и в почти всички случаи нарастват с времето на съхранение. Подобни резултати са наблюдавани и от Karsheva et al., (2011) при изследване на реологичните параметри на ферментирани млека, заквасени с щамове *Lb. bulgaricus* и *Str. thermophilus*. Преобладаващото количество на *Str. thermophilus* резултира във вискозна структура на млякото, а по-голямото количество на *Lb. bulgaricus* води до влачеща се структура, като реологичното описание е по-точно чрез модела на Herschel-Bulkley, съдържащ предел на течение. По време на съхранението на пробите, индексите на течение на пет от пробите се понижават, като това е най-ясно изразено при млеката, заквасени с щамове *Lb. plantarum* S8 и *Lb. salivarius* KC2. Причината за това вероятно се дължи на ниските стойности на рН, както и на нарастването на общия брой МКБ в млеката. По-съществени разлики, по отношение на реологичния индекс на течение n и индекса на консистентност K , са наблюдавани в пробите със закваски *Lb. plantarum* S10 и *Lb. salivarius* KC2 (Табл. 17).

Както беше споменато в т.4 от Технологични свойства и приложимост на МКБ, процесът на ферментация при изследваните МКБ щамове протича доста по-дълго (около 16 h), което ги направи неподходящи за стартерни култури. Това наложи изследването на възможността за използването им като пробиотични добавки при производството на ферментирани млека. За целта е проследено въздействието на 12 от изследваните МКБ щамове върху процеса на ферментация на проби ферментирани млека в комбинация с индустриална закваска. Подкисляващата им способност е определена на 24 h от инкубацията при 37°C, като получените резултати са обобщени в Табл. 18:

Табл.18. Влияние на изолатите от катък, бяло саламурено сирене и кашкавал върху подкисляването и коагулацията на киселите млека^{a,b}.

Произход на изолатите	Щам	Коагулация на млякото (37°C) ^a
Катък	Контрола (ИЗ)	+ (3.82) ^{b*}
	<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	+ (4.06)
	<i>Lb. rhamnosus</i> S2	+ (3.89)
	<i>Lb. plantarum</i> S3	+ (4.08)
	<i>Lb. fermentum</i> S4	+ (4.06)
Бяло саламурено сирене	<i>Lb. plantarum</i> S5	+ (4.30) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S6	+ (4.57) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S7	+ (4.08) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S8	+ (4.58) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S9	+ (4.27) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S10	+ (3.98) ^b
	<i>Lb. plantarum</i> S12	+ (3.48) ^b
Кашкавал	<i>Lb. paracasei</i> S11	+ (3.66) ^b

^a - Стойностите в скоби представят стойностите на рН.

^b – Коагулацията протича между 4 и 5 h; ^{b*}, коагулацията протича между 5 и 6 h.

Прибавянето на 12 от изследваните лактобацили като добавка към индустриалната закваска спомага за ускоряване процеса на ферментация на пробите кисело мляко (с 1 h по-рано) и има щамово-специфично влияние върху тяхната активна киселинност. Съгласно БДС 12:2010, желаните стойности за рН на киселото мляко са между 4.5 и 4.7. Повечето от щамовете показват подкисляваща способност в граници от 3.89 до 4.58, която е по-ниска от тази на контролата – мляко, съдържащо само индустриална закваска (рН 3.82). Потвърждение на получените резултати се наблюдава при изследване на микрофлората на спонтанно ферментирало индонезийско козе мляко, където Yelnetty et al., (2014) докладват за активна киселинност от 4.48 на щам *Lb. plantarum* YN 1.3. Изключение правят щамове *Lb. plantarum* S12 и *Lb. paracasei* S11, характеризиращи се с най-висока подкисляваща способност, съответно рН 3.48 и рН 3.66.

Изискванията на потребителите за добър външен вид и сетивни свойства правят органолептичната оценка един от най-важните тестове в хранително-вкусовата промишленост. По тази причина паралелно с проведените експерименти е извършена и органолептична оценка на качествата на млеката, съгласно показателите, съблюдавани от БДС 12:2010. Получените резултати са представени в **Табл. 19**:

Табл. 19. Органолептични параметри на ферментирани млека, получени с 2.5% (v/v) индустриална закваска и активна култура в мляко от съответния щам МКБ (1:1).

Проби	Органолептични параметри			
	Цвят и външен вид	Вкус и аромат	Лом на коагулума и консистенция	Цялостна оценка
	(макс. 5 т.) ср. арум. $\pm$ sd	(макс. 35 т.) ср. арум. $\pm$ sd	(макс. 30 т.) ср. арум. $\pm$ sd	(макс. 5 т.) ср. арум. $\pm$ sd
Контрола (ИЗ)	2.4 $\pm$ 0.55	33.5 $\pm$ 0.1	24.2 $\pm$ 0.4	2.75 $\pm$ 0.71
<i>Lactobacillus</i> ssp. S1	3 $\pm$ 0.1	31.2 $\pm$ 0.55	22 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.45
<i>Lb. rhamnosus</i> S2	3.2 $\pm$ 0.45	33.0 $\pm$ 0.45	27.5 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.1
<i>Lb. plantarum</i> S3	3.3 $\pm$ 0.1	33.1 $\pm$ 0.1	27.5 $\pm$ 0.45	4.8 $\pm$ 0.55
<i>Lb. fermentum</i> S4	3 $\pm$ 0.1	33.0 $\pm$ 0.71	26.5 $\pm$ 0.85	4.55 $\pm$ 0.1
<i>Lb. plantarum</i> S5	3.6 $\pm$ 0.55	33.6 $\pm$ 0.55	26 $\pm$ 0.71	4.6 $\pm$ 0.55
<i>Lb. plantarum</i> S6	3.2 $\pm$ 0.45	34.2 $\pm$ 0.84	25.2 $\pm$ 0.84	3.6 $\pm$ 0.55
<i>Lb. plantarum</i> S7	3 $\pm$ 0.71	33 $\pm$ 0.71	29.6 $\pm$ 0.55	4.6 $\pm$ 0.55
<i>Lb. plantarum</i> S8	1.4 $\pm$ 0.55	32.4 $\pm$ 0.89	29.2 $\pm$ 0.84	4.2 $\pm$ 0.45
<i>Lb. plantarum</i> S9	2.4 $\pm$ 0.55	33 $\pm$ 1.00	29.6 $\pm$ 0.55	4.8 $\pm$ 0.45
<i>Lb. plantarum</i> S10	1.8 $\pm$ 0.45	32.8 $\pm$ 0.45	14.8 $\pm$ 0.84	3.2 $\pm$ 0.84
<i>Lb. paracasei</i> S11	3.2 $\pm$ 0.45	33 $\pm$ 0.71	29.8 $\pm$ 0.45	4.6 $\pm$ 0.55
<i>Lb. plantarum</i> S12	2.8 $\pm$ 0.45	34.2 $\pm$ 0.84	29.4 $\pm$ 0.55	4.6 $\pm$ 0.55

Добавените потенциални пробиотични щамове оказват по-голямо влияние върху външния вид, лома на коагулума и консистенцията на млеката в сравнение с другите изследвани параметри. Ферментираните млека се характеризират с бял цвят и гладка повърхност и различни нива на синерезис в зависимост от използваните закваски. При

сравняване на получените резултати с контролата (мляко, инокулирано единствено с индустриална закваска), се наблюдава подобряване на показателите цвят и външен вид на млеката, като най-високи резултати са получени при мляко с щам *Lb. plantarum* S5, а ниски – при млека с щамове *Lb. plantarum* S8 и S10, които се характеризират и с най-високи нива на синерезис.

Добавянето на потенциални пробиотични щамове показва положителен ефект и върху лома на коагулума и консистенцията на млеката. Според тези органолептични параметри резултатите са сходни и показват по-високи стойности от контролата, с изключение на щам *Lb. plantarum* S10, който показва най-ниски резултати. Млеката се характеризират с плътен коагулум, хомогенна, сметано-подобна консистенция, блестящ до матов лом и бавно отделяне на суроватка. Подобрения в структурата на киселото мляко с прибавянето на пробиотици, са описани и за други ферментирани млека (Kristo et al., 2003). Този тип положително влияние върху реологичните параметри може да бъде добра алтернатива на добавките, оказващи отрицателно въздействие върху консистенцията, вкуса и аромата на киселото мляко (Marshall & Rawson, 1999). Съгласно другите две характеристики – вкус и цялостна оценка, всички щамове показват много добри резултати. Млеката имат изразен приятен млечнокисел вкус и аромат, като най-високи резултати са отчетени за млеката с щамове *Lb. plantarum* S6 и *Lb. plantarum* S12.

Въпреки откритите разлики между експерименталните ферментирани млека, повечето от тях показват високо сходство с контролата, което показва, че те отговарят на БДС 12:2010, а отчетените подобрения на изследваните органолептични параметри само потвърждават възможността за използването на изследваните лактобацили като хранителни добавки.

IV. ОБОБЩЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд успешно са изолирани 78 щама МКБ от 5 традиционни за България, домашно приготвени млечнокисели продукти (катък, кисело мляко, сирене, кашкавал, извара). От новосформираната колекция са избрани 45 щам, които са подложени на по-пълно охарактеризиране и изследване на техния пробиотичен потенциал. Въз основа на класическите микробиологични и физиолого-биохимични методи, новоизолираните щамове са охарактеризирани като представители на род *Lactobacillus*. Основното изискване за приложението на МКБ като пробиотици или закваски/добавки, е те да бъдат идентифицирани на ниво вид/щам, с подходите на съвременната полифазна таксономия. Това определи етапите на фенотипна оценка с класически микробиологични методи и с помощта на полуавтоматизираната система Biolog. Получените резултати са потвърдени допълнително с използването на молекулярно-генетични методи (Multiplex PCR и 16S рДНК секвенционен анализ). Благодарение на този полифазен подход е доказано присъствието на представители от групата на *Lb. delbrueckii*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* и *Lb. casei* като част от автохтонната микрофлора на изследваните млечнокисели продукти. В допълнение щамовете са генотипирани с високо дискриминативния RAPD PCR и е характеризирана вътревидовата хетерогенност сред представителите на *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum*. Получените щамово-специфични RAPD PCR ДНК профили с успех могат да се използват за генетично паспортизиране на оригиналните щамове при последваща тяхна разработка и внедряване.

В съответствие с основните критерии за *in vitro* подбор на пробиотици (WHO, 2002) са определени функционалните характеристики на изследваните лактобацили. В условия, симулиращи преминаването през различните отдели на стомашно-чревния тракт, е определена *in vitro* високата устойчивост на 6 от щамовете (*Lb. hamsteri* 4V, *Lb. fermentum* 9V и S4, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, *Lb. salivarius* KC2, *Lb. plantarum* BS41) към жлъчни соли – една от основните бариери по пътя към адхезиране и колонизация на дебелото черво. Освен това активното киселинообразуване и вероятната синтеза на вещества с антагонистично действие са причината за високата антимикробна активност на тези щамове срещу редица патогенни и развалящи храните микроорганизми, което дава възможност те да бъдат използвани като биопротективни добавки към стартерни култури. Повечето от изолатите от сирене, които усвояват почти напълно GOS, GLOS и FOS, също успешно могат да допълват ограничените метаболитни характеристики на някои от

използваните днес стартерни култури и да участват при разработването на нови синбиотици. Това е подкрепено и от липсата на антибиотична резистентност към важни за клиничната практика антибиотици, в комбинация с висока устойчивост към осмотичен стрес. В допълнение богатият ензимен профил, заедно с установените технологично-значими характеристики (преживяемост по време на съхранение на 4°C в мляко, липса на резки промени във физикохимичните показатели, добри реологични и органолептични свойства, доказва възможността за използването на изследваните лактобацили като пробиотични добавки при производството на различни млечнокисели продукти. Получените резултати са основа за бъдещи разработки на оригинални български щамове МКБ. Те доказват, че изследването на традиционните млечни продукти, приготвени в домашни условия по запазени от дедите ни рецепти, са обещаващ източник на полезни МКБ, активно търсени за растящия сегмент на пазара за функционални храни и пробиотици.

V. ИЗВОДИ

Въз основа на проведените експерименти могат да бъдат направени следните изводи:

1. Традиционните български млечни продукти (катък, кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара) са с жизнеспособна млечнокисела микрофлора, доказано присъствие на род *Lactobacillus* и могат да служат като перспективен източник на нови щамове МКБ с ценни пробиотични/технологични характеристики.

2. В състава на автохтонната млечнокисела микрофлора на катъка за първи път са доказани видовете *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum*, съгласно съвременната полифазна таксономия.

3. Изолатите от групата на *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum* се характеризират с вътревидова хетерогенност, доказана чрез високо-специфичните разделителни анализи RAPD PCR.

4. Устойчивостта на МКБ към ниско рН и жлъчни соли е щамово-специфичен белег и сред изолатите от млечни продукти са охарактеризирани 6 щама (*Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* OC2, *Lb. hamsteri* 4V, *Lb. fermentum* 9V и S4, *Lb. salivarius* KC2 и *Lb. plantarum* BS41), притежаващи висока транзитна толерантност.

5. Новоизолираните лактобацилите от катък, кисело мляко и сирене притежават широк спектър на антимикробна активност срещу HSV вируси, Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии и микромицети, което ги прави перспективни кандидат-пробиотици.

6. Щамовете *Lb. plantarum* S8, S10, BS41 и 3V, способни да потискат развитието на представители от родовете *Aspergillus* и *Candida*, са перспективни за разработка като биопротективни добавки към стартерни култури за млечни продукти.

7. В изследваната група щамове преобладават лактобацили, показващи умерена авто-агрегация, в комбинация с щамово-специфична способност за адхезия и за биофилм-формиране, което способства колонизирането и оцеляването при неблагоприятни условия.

8. Способността на изследваните лактобацилите да усвояват различни пребиотици е видово- и щамово-специфично свойство и не зависи от техния произход. Изолатите от сирене, които усвояват GOS, GLOS и FOS, успешно могат да допълват ограничените метаболитни характеристики на някои от използваните стартерни култури и да служат за разработката на синбиотици.

9. Изследваните лактобацили притежават спектър на антибиотична чувствителност към важни за клиничната практика антибиотици, който ги определя като безопасни като пробиотици и за прилагане в хранително-вкусовата промишленост.

10. Новоизолираните щамове *Lactobacillus* ssp. (*Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei* и *Lb. salivarius*), се отличават с уникална комбинация от технологично значима висока пептидазна и галактозидазна активност, при отсъствието на ензими с увреждащо действие – трипсин, β -глюкуронидаза и N-ацетил- β -глюкозаминидаза, и могат да се използват за разработването на функционални храни и пробиотични продукти за потребители със специфични потребности.

11. Щамове от вида *Lb. plantarum* (щам S5, S6, S7, S8, S9, S10, S12) и *Lb. paracasei* S11, в комбинация с индустриална закваска за българско кисело мляко по БДС 12:2010, проявяват синергичен ефект и ускоряват ферментационния процес, което ги прави подходящи добавки с технологична значимост.

12. Високата жизнеспособност по време на съхранение, липсата на резки промени във физикохимичните показатели, добрите реологични и органолептични свойства, доказват възможността за използването на изследваните лактобацили като пробиотични добавки за производството и диверсификацията на ферментирани млечни продукти.

VI. ПРИНОСИ

1. Разработен е комбиниран подход за охарактеризиране на автохтонната млечнокисела микробиота на традиционните български млечни продукти и е доказано присъствието на жизнеспособни представители на род *Lactobacillus* с важни функционални и технологични характеристики, което да допринесе за бъдещото използване на тези полезни микроорганизми.
2. Получени са нови данни за традиционните български млечнокисели продукти (катък, кисело мляко, сирене, кашкавал, извара) и е допълнена информацията за състава на автохтонната микробиота на сирена, типична за Югоизточна Европа.
3. За първи път са идентифицирани видовете *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* и *Lb. fermentum* в уникалния за България млечен продукт катък.
4. Охарактеризираните като естествени антагонисти на родовете *Candida* и *Aspergillus*, на патогенни и развалящите храните микроорганизми, щамове *Lb. plantarum* S8, S10, BS41 и 3V могат да бъдат предложени като биопротективни/пробиотични добавки към стартерни култури за кисело мляко и/или други млечни продукти.
5. За първи път е докладван щам от вида *Lb. plantarum* (*Lb. plantarum* S8), изолиран от бяло саламурено сирене, който потиска развитието на HSV-1 и едновременно с това притежава антибактериално и антигъбично действие.
6. Комплексната оценка на щамово-специфични функционални и технологично значими характеристики при български лактобацили, с благоприятен ефект върху вкусовите и ароматни качества, позволява те да бъдат използвани като пробиотични добавки при производството на кисело мляко/сирене.
7. Получените ферментирани млека със закваска от изследваните лактобацили, характеризиращи се с добри микробиологични, физикохимични, реологични и органолептични показатели, доказва възможността за използването им като пробиотични добавки при производството на ферментирани млека с мека и кремообразна консистенция.

Публикации във връзка с дисертацията:

1. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Evaluation of technological parameters of newly isolated lactobacilli from traditional dairy products. Scientific works of University of Ruse, Proceedings, 54 (10.2), 2015, 7-12.

2. **V. Nemska**, N. Lazarova, N. Georgieva, S. Danova. *Lactobacillus* spp. from traditional Bulgarian dairy products. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 51 (6), 2016, 693-704.

3. **V. P. Nemska**, N. L. Bashkova, P. D. Genova-Kalou, S. T. Danova, N. V. Georgieva. Antiviral Activity of Lactobacilli against Herpes Simplex Viruses. Food processing industry magazine 4, 2017, 29-34.

Участия в международни и национални научни форуми:

1. N. Lazarova, **V. Nemska**, D. Peshev, N. Georgieva. Equilibrium studies of biosorption of chromium and cadmium ions using filamentous yeast *Tr. cutaneum* R57. Jubilee scientific conference 50 years Department of Chemical Engineering, 2013.

2. **V. Nemska**, D. Peshev, G. Chernev, R. Tzoneva, N. Georgieva. Cell adhesive behavior of PMMA based hybrid materials and removal of chromium ions from wastewater. XI poster session for young students, doctoral and full-time students, HTMU-Sofia, 2014, p. 88.

3. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Coagulation activity of lactic acid bacteria from traditional dairy products. 1st National Conference of Biotechnology - 30 years Biotechnology in Bulgaria, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", 2014, p. 46.

4. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Isolation and initial characterization of lactic acid bacteria from traditional dairy products. 2nd National Food Conference, Department of Natural sciences, NBU, 2015.

5. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* strains isolated from traditional dairy products. Scientific symposium "Beneficial and pathogenic microbes for healthier life and safety foods", The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 2015.

6. **V. Nemska**, S. Danova, N. Georgieva. Enzyme activity of *Lactobacillus* strains isolated from traditional dairy products. XII poster session for young students, doctoral and full-time students, HTMU, 2015, p. 63.

7. **V. Nemska**, J. Miteva-Staleva, E. Krumova, N. Georgieva, S. Danova. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains isolated from traditional dairy products. Scientific and Practical Conference "New Moments in the Field of Science and Production of Milk and Milk Products", 2015.
8. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Evaluation of technological parameters of newly isolated lactobacilli from traditional dairy products. Scientific conference with international participation „Traditions and innovations in chemical, food and biotechnologies”, University of Ruse „Angel Kantchev”- branch Razgrad, 2015, p. 9-14.
9. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Initial characterization and antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products. 62nd Scientific conference with international participation „Food science, Engineering and Technology”, UHT-Plovdiv, 2015, p. 45.
10. **Veronica Nemska**, Nelly Georgieva, Rositsa Tropcheva, Svetla Danova. Characterization of lactobacilli from home-made probes of katak. Interdisciplinary Doctoral Forum, BAS, 2016, p. 52.
11. **V. Nemska**, S. Danova, N. Georgieva. *Lactobacillus* spp. from traditional Bulgarian dairy products. XIII poster session for young students, doctoral and full-time students, HTMU-Sofia, 2016, p. 73.
12. **V. Nemska**, N. Georgieva, S. Danova. Molecular identification of *lactobacilli* from traditional Bulgarian dairy products. Workshop on Food-borne pathogens and food safety, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 2016, p. 33.
13. **V. Nemska**, J. Miteva-Staleva, V. Dishlijska, E. Krumova, S. Danova. Estimation of bio-protective potential of dairy *lactobacilli*. Workshop on Food-borne pathogens and food safety, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 2016, p. 34.
14. S. Danova, **V. Nemska**, P. Andreeva, R. Georgieva, N. Georgieva. Bulgarian dairy lactobacilli for functional and safety food. Workshop on Food-borne pathogens and food safety, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 2016, p. 18.