



**Химикотехнологичен и металургичен
университет – София**

катедра „Инженерна химия”

маг. Владислав Параскевов Пасков

Автореферат

на ДИСЕРТАЦИЯ

**Българско кисело мляко – технологично и физикохимично
охарактеризиране в отговор на новите европейски изисквания
за функционални млечни продукти**

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност

5.10. „Химични технологии”
(Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология)

Научни ръководители:

Проф. д-р.инж. Иван Пенчев

Доц.д-р.инж. Мария Кършева

Научно жури: 1. Доц.д-р Нели Георгиева, катедра БТ, ХТМУ
2. Доц.д-р Мария Кършева, катедра ИХ, ХТМУ
3. Доц. д-р Светла Данова, ИМБ, БАН
4. Проф. д-тн Венко Бешков, ИИХ, БАН
5. Проф. д-тн Серафим Влаев, ИИХ, БАН

София, 2012

Дисертационният труд е изложен на 177 страници, включва 46 фигури и 42 таблици. Използвани са 93 литературни източника. Номерата на фигурите, таблиците, уравненията и схемите в автореферата съответстват на тези в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на катедра ‘ Инженерна Химия ‘ при ХТМУ –София на 11.04.2012 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 08.10 от 14 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.

АТФ- Аденозинтрифосфата
 БДС-Български държавен стандарт
 БКМ- Българско кисело мляко
 градус Целзий-° С
 градуси Тьорнер-° Т
 ДНК- Дезоксирибонуклеиновата киселина
 ДПП- Добрите Производствени Практики
 ЕВРАТОМ-Европейска общност за атомна енергия
 ЕИО-Европейска икономическа общност
 ЕС- Европейския Съюз
 ИПЗ- извънклетъчни полизахариди
 МЗ-Министерство на здравеопазването
 ННТ-Ненютонови течности
 ОБМ- Общ брой микроорганизми
 ОБСК- Общ брой соматични клетки
 ОСП-Обща селскостопанска политика
 РНК- Рибонуклеинова киселина
 СБО- Сух безмаслен остатък
 СМКБ- Стартерни млечно кисели бактерии
 УХТ(УНТ) – Ултрависока температурна обработка
 ФЕОГА- Европейски фонд за ориентиране и гарантиране на селското стопанство
L. brevis- Lactobacillus brevis
Lbul- L. bulgaricus - Lactobacillus Lsal delbrueckii ssp. Bulgaricus
Lsal- Lactobacillus salivarius
Str. Thermophilus- Streptococcus thermophilus
 НАССР-Анализ на Риска и Контролно Критични Точки
 рН- водородният показател е отрицателен десетичен логаритъм от концентрацията на водородните катиони (H⁺):
 RV2- Ротационен вискозиметър
 А-зависеща от продукта Pa/s,
 В,b - емпирични коефициенти: за първа зона 0.06 и 0.03, за втора зона 0,08 и 0,013
 Е- активираща енергия на течението, kJ/kmol
 Е – модульт на еластичност, N.s/m²
 F- силата , която предизвиква деформацията N
 К – коефициент на консистентност Pa.sⁿ
 n - реологичен индекс на течение, показва отклонението от закона на Нютон или колкото по-силно се различава от 1, толкова по-ненютонов е продукта.

R- универсална газова константа 8,32 kJ/kmol

T-абсолютната температура, K

t^* -относителна безразмерна температура равна на отношението t/t_1 , ($t_1=1^\circ \text{C}$).

V_s - обемната концентрация на дисперсната фаза в системата равна на отношението на дисперсната фаза с включен обем на обвивките към общият обем на системата.

$\gamma = dv/dx$ скорост на деформация, s^{-1}

ε – относителна деформация

μ_0 - вискозитет на дисперсната среда Pa.s,

μ - динамичен вискозитет, Pa.s

μ_p - пластичен вискозитет

σ_n – нормалното напрежение, Pa

τ - тангенциалното напрежение Pa

τ_0 – предел на течение

Въведение

По своя химичен състав, физикохимични и биологични свойства млякото е не само най-пълноценната, но и незаменима храна на новородения бозайник. Историческите проучвания показват, че човекът е започнал да използва млякото като храна след опитомяването на домашните животни, т.е. още в праисторически времена. Смята се, че първите млечни продукти са от групата на млечнокиселите, получени от самопрокиснало мляко.

Киселото мляко е национален български продукт. Още Херодот пише, че овчето кисело мляко е дар от траките. Понастоящем за българско кисело мляко се приема ферментирал млечен продукт под действието на закваска от *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*. Полученият продукт задължително съдържа живи бактерии. В някои страни ферментиралите млека освен *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* съдържат и други бактерии.

Освен бактериите от изключителна важност са и метаболитите, отделени от тях. Изследванията показват, че консумацията на кисело мляко оказва положително влияние върху баланса на микробната популация в човешкия тракт. Стимулира се имунната система и антитуморната активност, намалява се нивото на серумния холестерол. Богатото съдържание на калций и усвояемостта му правят киселото мляко незаменим източник на този елемент.

На 01.01.2007г. България и Румъния стават членове на Европейския Съюз. Наредба 30/20.11.2000г се хармонизира с Директива 92/46/ЕЕС за ветеринарно-санитарни изисквания за добива на сурово мляко, от една страна, и преработвателни предприятия - от друга. От 19.02.2008 г Наредба 30/20.11.2000 г се заменя от Наредба 4/19.02.2008 г, която окончателно хармонизира българските ветеринарно-санитарни изисквания с тези на ЕС.

Двете страни трябва да извървят дълъг път за пълното хармонизиране на млечната продукция с изискванията на ЕС.

Затова си поставихме за цел изследване качествата на българските млечни продукти и влиянието на качеството на суровото мляко и технологичните параметри върху крайните качества на продуктите в светлината на българските традиции и европейските изисквания.

За осъществяване на тази цел ще бъдат изпълнени следните конкретни задачи:

- Провеждане на критичен анализ на състоянието на българската млечна промишленост при приемането на България в ЕС и сравнение на българските и румънските основни показатели в отрасъла.
- Провеждане мониторинг на производствен процес в някое от водещите предприятия в млечната индустрия и определяне зависимостта на качествата на крайния продукт от работните параметри.
- Сравнение на основните качества на най-популярните марки български кисели млека, закупени от търговската мрежа и оценката им в рамките на срока на годност и след изтичането му.
- Провеждане на лабораторни опити по заквасяване на мляко с различни качества и оценка влиянието върху крайните качества на продукта на: хомогенизацията, вида на закваската и времето на съхранение.

1. Материали и методи

При експеримента е използвано мляко със следните физико-химични показатели: масленост 3.76 %, СБО(сух безмаслен остатък) 8.3, плътност 1.028 g/ml. и киселинност 16°Т. Това мляко е използвано за стандартно производство на кисело мляко с 3.6% масленост. Тук е спазено правилото масленост + СБО > 12. За производството на киселото мляко е използвано сурово мляко, отговарящо на изискванията на наредба №4 от 19.02.2008г. Тези изисквания са синхронизирани с изискванията на регламент 853/2004/ЕС . В таблицата са дадени изискванията за 1 качество сурово краве мляко. Млякото се събира в одобрени пунктове на ДВСК и се съхранява при температура 2-4 °С. Транспортира се в завода, където минава на термизация на 65°С за 15- 20 с и отново се съхранява при температура 2-4°С. Млякото се проверява за наличие на антибиотици и при отрицателния резултат се приема за преработка в завода. Млякото е заквасено със закваска комбинация от закваски А и Б в съотношение 1:1 закваска Б даваща влачеща структура и закваска А осигуряваща вискозна структура. Закваските съдържат различни съотношения на *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*

Проведени са експерименти за влиянието на вида на закваската, хомогенизацията на млякото и времето на съхранение. Млякото е заквасено по следната методика:

В реални производствени условия са заквасени проби от хомогенизирано и нехомогенизирано мляко с физикохимичните показатели, посочени по-горе. Млякото е заквасено с 2% закваска при температура 44-46 °С и е оставено за ферментация в термостат. Времето за ферментация е около 3 часа до достигане на 65-85° Т (рН 5,0-4,5). След достигане на необходимата киселинност млякото се охлажда двустепенно до температура 2-6°С, при която се съхранява.

На пробите са изследвани киселинността по Тьорнер, рН, реологичното поведение, съотношението на микроорганизмите. Методите за изследване са, физикохимични и микробиологични.

1.1 Методи за анализ

Входящият контрол на суровината при приемане и технологичният контрол се извършват съгласно БДС 12:2010 - приложения Б и В.

Приложение Б определя входящия контрол на суровината. Суровото мляко се приема и окачествява по следните показатели: температура, масленост, плътност, СБО, рН, киселинност, млечен белтък, съдържание на антибиотици и други инхибитори и/или ферментационна проба.

Технологичният контрол се определя от приложение В

Таблица 1 Технологичен контрол на млякото БДС 12:2010

Етапи на техн. процес	Наблюдавани параметри	Изисквания
Хомогенизация	1. Температура °C 2.Налягане МПа	55-65 14-20
Пастьоризация	1. Температура °C 2.Задръжка мин	93-95 15-30
Охлаждане	1. Температура °C	43-46
Приготвяне на закваска	1. Температура на закв. °C 2.Киселинност ° Т 3. Температура на охл. °C	45-46 70-80 4-6
Заквасяване	1. Количество закваска % 2.Температура °C 3.Продължителност h а)производствена закваска б)култура за директно	1-3 (производствена или култури за директно влагане) 42-46 2,5-3,5 4-6

	влагане	
Охлаждане в хладилни камери	1. Температура °C 2. Киселинност ° T	2-6 90-110

1. Вземане на проби (наредба № 2 на МЗ)

Проба за изледване се взема от всяка еднородна партида .

Под еднородна партида се разбира:

- а) **В предприятието-производител-** партида, получена от мляко, предварително стандартизирано в една вана или танк преди разливането му в съдове.
- б) **при приемане –предаване и продажба-** готовата продукция от един вид мляко, произведено в един ден, с едно качество, в еднакви опаковки, придружено от един документ.

Проби се вземат по следния начин :

- а) от партида до 50 опаковки – от 10% от общия брой опаковки се вземат около 100 g.
- б) от партиди с над 50 опаковки- от 5% от опаковките се взема проба, но не по-малко от 4 опаковки.
- в) При брой на опаковките над 1000 се вземат няколко броя „първична проба” и се съставя крайна-средна проба, която се получава чрез хомогенизиране. Тя е предназначена за лабораторен анализ.

Пробите се вземат от горния и долния край на вертикалната ос на опаковката. Те се смесват добре и по метода на квартуването се довеждат до 0.5 kg.

Анализи :

1. **Температура.** Измерва се с помощта на термометър. Отчита се в градуси Целзий.

2. **Киселинност:** Един от показателите, по който се прави хигиенната оценка е титруемата киселинност. Титруемата киселинност на млякото се определя от киселите соли и белтъчини. Тя се установява чрез титруване с 0,1n разтвор на натриева (калиева) основа при индикатор фенолфталеин и се изразява в градуси Тьорнер(°T). Под градуси Тьорнер(°T) се разбира количеството 0,1n разтвор на натриева (калиева) основа в ml , необходимо за неутрализирането на 100 ml или 100 g. млечен продукт. Титруемата киселинност може да се изрази и в процент млечна киселина.

Начин на работа: В ерленмайерова колба или чаша от 150 ml се отмерват с пипета 10 ml мляко, 20 ml вода, три капки фенолфталеин и се разклаща. Пробата се титрува до появата на слабо розово оцветяване, което се запазва в продължение на 1 min.

Изчисление: Титруемата киселинност, изразена в градуси Тьорнер(° T), се изчислява по следната формула:

$$K = V.F.10$$

Където K е киселинността в градуси Тьорнер(° T), V количеството 0,1n разтвор на натриева (калиева) основа в ml , изразходвано при титруване на пробата, F- фактор на основата.

3. **Определяне на активна киселинност(pH).** Активната киселинност (pH) се определя от концентрацията на водородни йони. Измерването се извършва с помощта на pH-метър.

Измерване: Пробата, темперирана на стайна температура, се налива в чашка и се потапят електродите. Апаратът се включва на съответния обхват на измерването. Отчита се по скала с точност до 0,05 рН.

4. Масленост. Принцип на метода. Лецитиновата обвивка на маслените кълбца в млякото се разрушава под действието на концентрирана сярна киселина. Масленият слой се отделя посредством прибавен изоамилов алкохол и центрофугиране. Отчитането на масленото съдържание в проценти става по скалата на бутирометъра.

Начин на работа. С пипета се наливат 10 ml сярна киселина с отн. плътност 1,82 в бутирометъра. Внимателно се наплъстяват по стените му 11 ml мляко, като пипетата се задържа до пълното изцеждане. След това се прибавя 1 ml изоамилов алкохол, като се внимава да не се потопи краят на пипетата. Бутирометърът се затваря с гумена запушалка и се поставя със запушалката надолу във водна баня с температура 65-70°C. Чрез въртене и придвижване на запушалката се нагласява масленият стълб така, че да попадне в градуираната част на бутирометъра. След това последният се избърсва добре, поставя се в гилзата на центрофугата и се центрофугира за 5 min при честота на въртене 1500 min⁻¹. След това се изважда от центрофугата и се поставя във водната баня така, че водата да покрие масления стълб. Бутирометърът се изважда от банята и се избърсва. Посредством запушалката се изравнява долната граница на масления стълб с нулевото деление. Отчита се броят на деленията. При отчитането бутирометърът се държи вертикално на височината на очите. За горна граница се взема делението, което изравнява най-ниската част на менискуса. В случай, че масленият стълб не е бистър, процедурата се повтаря.

5. Определяне на плътност. Плътността на млякото се определя с помощта на ареометър при 20 °С. При тази температура плътността на млякото е равна на плътността на водата при 4 °С.

Начин на работа. В мерителен цилиндър от 500 ml се налива темпериранията и разбъркана проба. Ареометърът се поставя в млякото и се изчаква около минута да престане да се движи. Отчитането става по долното деление което изравнява минискуса на млякото

6. Определяне на СБО. Под сухо вещество на мляко и млечни продукти се разбира остатъкът, изразен в масови проценти, който се получава след изсушаване на пробата при температура 102 °С в сушилен шкаф.

Начин на работа. В предварително приготвено тегловно стъкло се прибавят пет грама от пробата. Пробата се поставя в сушилния шкаф и се суши 3 h., след това се вади и се поставя в ексикатор за 40 min, за да се темперира. След темперирането се измерва и отново се суши 1 h. Отново се темперира и мери. Ако има разлика в теглото на пробата процедурата се повтаря до постигането на постоянно тегло.

Изчисление. От получената стойност се изважда теглото на тегловното стъкло и се получава теглото на изсушената проба. Масовата част на СБО се получава, като от теглото на изсушената проба се извади процентът мазнина.

$$C = D - B$$

където С е сухият безмаслен остатък в % , Д масовата част на сухия остатък в %, Б масовата част на мазнината в %.

7. Определяне на белтъчно съдържание по метода на Келдал

Принцип: Определено количество проба се минерализира с конц. сярна киселина в присъствието на катализатор, при което органичният азот преминава в амониеви йони. Последните образуват със сярната киселина

амониев сулфат. След прибавяне на натриева основа в излишък се отделя амоняк, който при дестилиране се абсорбира от разтвора на борна киселина. Количеството на амоняка се определя чрез титруване със сярна киселина с определен титър.

8. Определяне на инхибитори. Най-често срещаните инхибитори в млеката са антибиотиците, използвани за лечението на животните. Наличието на антибиотици се доказва с помощта на бързи тестове посредством цветна реакция.

9. Определяне на ИПЗ. Високомолекулните ИПЗ в пробите кисели млека бяха определени по метод описан по-рано с някои модификации. Пробите бяха депотеинизирани чрез прибавянето на 0.17 обема 80%-на трихлорооцетна киселина и центрофугирани при 6000 g за 10 min. Извънклетъчните полизахариди в супернатантата бяха утаени с три обема ледено-студен етанол, събрани с центрофугиране и ресуспендирани в 5 ml гореща дестилирана вода. Съдържанието на високомолекулни ИПЗ беше определено чрез нанасяне на 0,5 ml от пробата на 20 cm-ова колона от Saphacryl S-400 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) и елуиране с 50 mM фосфатен буфер (pH 6.0), съдържащ 150 mM NaCl при дебит 1.0 ml/min. Съдържанието на въглехидрати във фракциите, съответстващи на ИПЗ с молекулна маса над 500 kDa беше определено по сярно-фенолния метод. Колоната беше калибрирана с декстранови стандарти (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) с молекулна маса 1800, 750, 410, и 150 kDa

Мляко заквасено само със стартерна култура (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricus*) бе използвано като контрола Е. След инокулиране, мляко бе разпределено в стерилни 100-g пластмасови контейнери, като последните бяха инкубирани на 37°C, докато pH на контролната проба достигна 4.6. След

края на ферментацията млеката бяха бързо охладени и прибрани на студено (4°C) за 28 дена. За периода на съхранение бяха проведени микробиологичен, физикохимичен, реологичен анализи на 1, 7, 14, 21 и 28 ден от съхранението..

10. Заквасяване.

Един грам от стартерната култура бе реактивиран в 100 ml стерилно обезмаслено мляко (10 % w/v) при температура 37°C за 30 min. Използваните лактобацилни култури, предварително съхранявани на -20°C бяха двукратно пресяти в MRS бульон (Merck, Germany), биомасата бе събрана и също реактивирана в 50 ml стерилно обезмаслено мляко при 37°C за 30 min. За инокулиране на млякото бе използван по 2 % инокулум от така активираните култури. Първоначалният брой на *Str. thermophilus* и *L. bulgaricus* бе 10^6 cfu/ml, а за лактобацилната добавка 10^7 cfu/ml. Мляко заквасено само със стартерна култура (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricus*) бе използвано като контрола Е. След инокулиране, мляко бе разпределено в стерилни 100-g пластмасови контейнери, като последните бяха инкубирани на 37°C, докато рН на контролната проба достигна 4.6. След края на ферментацията млеката бяха бързо охладени и прибрани на студено (4°C) за 28 дена. За периода на съхранение бяха проведени микробиологичен, физикохимичен, реологичен анализи на 1, 7, 14, 21 и 28 ден от съхранението..

11. Използвани микробни култури

За ферментиране на млякото бяха използвани лиофилизирана стартерна култура ELBI 37-18 (ELBI Bulgaricum, Sofia, Bulgaria), съдържаща *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и свежо концентрирана култура, в качеството си на пробиотична добавка. Последната включваше един от четири щама лактобацили, предварително подбрани на основата на техните функционални характеристики- антибактериална активност, устойчивост в условията на ГИТ и антибиотична резистентност. Три от щамове бяха

първоначално изолирани от домашно приготвени млечни продукти (*L. plantarum* RL34- от бяло саламурено сирене, *L. brevis* KR3- катък, *L. bulgaricus* PAN4- кисело мляко) и един с човешки произход (*L. salivarius* LS16- УГТ).

12. Подготовка на микробните култури за инокулиране

Един грам от стартерната култура бе реактивиран в 100 ml стерилно обезмаслено мляко (10 % w/v) при температура 37°C за 30 min. Използваните лактобацилни култури, предварително съхранявани на -20°C бяха двукратно пресяти в MRS бульон (Merck, Germany), биомасата бе събрана и също реактивирана в 50 ml стерилно обезмаслено мляко при 37°C за 30 min. За инокулиране на млякото бе използван по 2 % инокулум от така активираните култури. Първоначалният брой на *Str. thermophilus* и *L. bulgaricus* бе 10^6 cfu/ml, а за лактобацилната добавка 10^7 cfu/ml.

13. Производство на ферментирано мляко

За производството на кисело мляко бе използвано хомогенизирано, бито краве мляко със следните физикохимични параметри: pH - 6.77, киселинност - 15°T, мазнини -0.8, белтък - 3.62, лактоза - 4.24, цитрат - 0.125, сухо вещество (TS) - 9.04, плътност - 1034.4 (Foss Electric Milkoscan 50, FT120, Дания). Преди заквасяване млякото бе пастьоризирано на 90°C за 15 min, бързо охладено и инокулирано със стартерната култура и една от избраните пробиотични лактобацилни култури. Мляко заквасено само със стартерна култура (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricus*) бе използвано като контрола. След инокулиране, мляко бе разпределено в стерилни 100-g пластмасови контейнери, като последните бяха инкубирани на 37°C, докато pH на контролната проба достигна 4.6. След края на ферментацията млеката бяха бързо охладени и прибрани на студено (4°C) за 28 дена. За периода на

съхранение бяха проведени микробиологичен, физикохимичен, реологичен анализи на 1, 7, 14, 21 и 28 ден от съхранението.

14.Микробиологичен анализ

Преди ферментацията и по време на съхранение на ферментираното мляко бе определен общия брой клетки на стартерната култура (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. termophilus*) и на съответната пробиотична добавка чрез посяване на подходящи десетични разреждания от съответната проба. За целта бяха използвани следните селективни среди: MRS agar (повърхностен посев) за *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis* и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, Nutrien agar (Difco) за *L. plantarum*; MRS agar pH 5.4 (дълбочинен посев) за *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, M17 agar (Sharlau) за *Str. termophilus* и LS Differentiation agar (Sharlau) за *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Str. termophilus*. Всички петрита бяха инкубирани на 37°C за 72 ч в аеробни или анаеробни условия (MRS - дълбочинен посев; BBL® Gas Pak Anaerobic System Envelopes, Becton Dickinson). На среда MRS и LS agar *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* образуват различни по морфотип колонии от тези на пробиотичните щамове (*L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis*) и *Str. termophilus*, което позволява диференцирането на отделните видове, растящи на едно и също петри. В допълнение, отнасянето на единичните колонии беше потвърдено чрез микроскопско наблюдение морфологията на клетките. Резултатите бяха изразени като колонии-образуващи единици на милилитър (cfu/ml) проба.

15.Физикохимичен анализ

Определена бе промяната в pH и киселинността (в градуси по Тьорнер, °T) на млеката по време на съхранение. Процентът на образуваната млечна киселина бе изчислен по Tamime & Robinson (2003). Допълнително бяха

определени физико-химичните параметри (мазнини, белтъци и сухо вещество) на готовия продукт в хода на съхранението (Foss Electric Milkoscan 50, FT120, Дания).

16. Реологични измервания.

Реологичните измервания са провеждани с ротационен вискозиметър с коаксиални цилиндри Реотест РВ2 (Германия) с цилиндър S1. Обемът на пробите е 25 ml. Единични експерименти с цилиндър S2 не показаха приплъзване на стената. Преди измерване пробите се разбъркваха за 1 минута на най-високата скорост на деформация, 1312 s^{-1} с цел хомогенизиране и получаване на надеждни резултати. Бяха снемани възходяща и визходяща криви на течение с цел проверка наличието на тиксотропия.

Проведен бе и пенетрационен тест за анализ на текстурата на гела с използване на A-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, Англия) при температура 10°C . Сондата представлява акрилен цилиндър (с диаметър 2.5 cm), движещ се с претестова скорост 5 mm/s и тестова скорост 10 mm/s и навлиза 15 mm през пробата. Плътността бе изчислена като максимална сила на проникване, в g.

17. Сензорен анализ. Описателният сензорен анализ бе извършен, за да се опишат сензорно няколко заваски с добавки на други лактобацили. Оценката бе извършена по 10-бална система в граници на висока и ниска интензивност на описваните параметри. За анализа бяха подбрани 10 човека с опит в оценяването. Предварително членовете подготвиха начина на описването и определиха правилата на оценките. На оценка бяха подложени 5 кисели млека (1 – от стандартно производство и 4 с добавки на лактобацили). Млеката бяха съхранявани в продължение на 21 дена при 4°C . В таблица 2 са представени параметрите за сензорна оценка на млеката.

Таблица 2 Параметри за сензорна оценка на млеката

Признаци	Определение
Външен вид	
Въздушни мехурчета	Мехурчета в коагулума
Отделяне на суроватка	Количество на освободената суроватка на повърхността на киселото мляко
Тяло/текстура	
Твърда	Продуктът се прочвява като „полутечлив” или твърде течноподобен
Слаба	
Зърниста	Степен на зърнистост, оценявана визуално и след дегустация
Гладка	Степен на хомогенност оценявана визуално
Вискозна	Видимата плътност при разбъркване на пробата 3 пъти в кофичката
Провлачлива	Продуктът има „хлъзгаво” усещане в устата
Аромат/вкус	
Ферментиран	Аромат свързан с киселото мляко
Кисел	Вкусово усещане свързано с млечна киселина
Сладък	Вкусово усещане свързано със захар
Горчив	Вкусово усещане свързано с кафеин и алкалоиди
Неестествен	Детектиран аромат, който не е в познатите аромати
Нетипичен	Този дефект се характеризира с аромат на „мръсни чорапи” и празен (блудкав) вкус в устата.

18. Статистически анализ

Статистическият анализ на данните бе осъществен използвайки двустранно симетричен Student's t-test анализ и програмата GraphPad Prism 4.0. Р-стойности по-малки от 0.05 бяха приемани като статистически достоверни

1.2 Технология за производство на БКМ

Класическата технология за производство на БКМ е следната: приемане, почистване и съхранение на млякото, стандартизация по показатели (масленост и сухо вещество), хомогенизация, пастьоризация, заквасяване, ферментация, охлаждане и съхранение. При производството на млечни продукти процесът на хомогенизация се използва за постигането на много цели. Една от тях е предпазване от масленото разслояване. Хомогенизацията

е процес на механична обработка на дадена емулсия, при която се увеличава дисперсността на системата и се намалява разликата в размерите между най-едрите и най-дребните частици. Диаметърът на маслените кълбца варира от 1 до 10 μm . Хомогенизацията подпомага образуването на новите обвивки на маслените кълбца, състоящи се отчасти от казеин. Комбинацията от нагриване, денатуриране на сурватъчните белтъчини, хомогенизация и избор на закваска е най-добрият начин за получаването на качествен продукт.

При проведените експерименти хомогенизирано и нехомогенизирано краве мляко е заквасено с производствена и дива закваска. Хомогенизирано мляко е заквасено с производствена закваска. Производствената закваска е комбинация от две закваски А и В. Инкубирането продължава 2 h и 45 min при 43°C. След това пробите се охлаждат и съхраняват при 4°C, докато бъдат анализирани.

Млеката се различават единствено по закваските. Закваската В е по богата на *Streptococcus thermophilus* а закваска А на *Lactobacillus bulgaricus*. Закваската С е съвкупност от А и В в съотношение 1:1. По-високата плътност на Закваска С се обяснява с по-голямото количество на *Lactobacillus bulgaricus*.

Дива закваска. Дивата закваска е получена от промишлена след двукратно заквасяване на мляко в домашни условия.

За ферментиране на млякото при вторият експеримент бе използвана леофилизирана стартерна култура ELBI 37-18 (ELBI *Bulgaricum* Sofia Bulgaria) съдържаща *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, и свежо концентрирана култура в качеството на добавка. Последната включваше един от двата щама предварително подбрани по техни функционални характеристики. Един от щамовете е изолиран от домашно

приготвен млечен продукт (*Lactobacillus bulgaricus* PAN4-кисело мляко) и един е с човешки произход (*L. salivarius* LS16- УГТ).

При третия експеримент мляко бе заквасено с три закваски А, В, С. Закваските са избрани от колекциите на ELBI *Bulgaricum Sofia Bulgaria*. Закваска С служи за контрол, закваска А дава плътна кремообразна вискозна структура, закваска В дава кремообразна структура с умерена вискозност.

2. Резултати и дискусия

1. Изследване качествата на кисели млека от търговската мрежа

В продължение на 1 месец са купувани 5 марки кисели млека на петте най-големи производители в страната, намиращи се търговската мрежа с цел да се провери реалното състояние и качество на киселите млека от търговската мрежа.

Проведени бяха анализи на техните свойства по време на срока на годност и след изтичането му. Съхраняването на млеката беше, според указанията на съответният търговски продукт, на студено (до 10 °С), като имитирахме съхранението им в хладилните витрини на търговската мрежа. Пробите са изследвани в деня на закупуването им и след изтичане срока на годност, като са отчетени следните параметри: вискозитет, рН, киселинност, Т° (градус Тьорнер). От всяка марка е направена по една контролна проба за масленост. Не е отчетена по-ниска масленост от обявената на етикетите. Вискозитетът е измерван с реометър на фирмата Anton Paar, произведен в Германия. С помощта на рН-метър е измерено рН на пробите. Киселинността в градус Тьорнер е измерена чрез титруване. (Градус Тьорнер - количеството 0,1 N NaOH, необходимо за неутрализация на 100g продукт). Измерени са и показателите на опаковките с помощта на електронен шублер. Резултатите от проведените изследвания са представени в таблици 1 и 2.

Таблица 3. Показатели на 5 марки кисели млека преди и след изтичане на срока на годност

Марка мляко	μ , Pa.s	pH	T°
Баланс 1,5% преди	8,76 – 11,74	4,05 - 4,18	88 - 94
Баланс 1,5% след	10,42 – 11,96	3,98 -4,05	94 - 108
Елена 2% преди	7,07 - 9,0	3,9 – 4,0	110 - 120
Елена 2% след	7,2 – 9,0	3,7 -4,0	105 -136
Верея 2,9% преди	7,22 – 10,18	4,03 – 4,7	78 -117
Верея 2,9% след	4,65 -10,0	3,83 – 4,59	86 -130
Пършевица 2% преди	4,04 -7,76	3,88 - 4,07	100 -120
Пършевица 2% след	4,98 - 8,41	3,77 -3,86	110 -126
Елби 2% преди	4,01 – 6,05	4,01 -4,04	92 -94
Елби 2% след	5,64 – 6,48	3,84 -4,1	90 -106

От табл.3 става ясно че продукти напълно покрива изискванията на БДС.

Таблица 4.Показатели на опаковките

Производител	Обем, ml	Диаметър на дъното, mm.	Височина на кофичката, mm.	Тегло на кофичката, g.
Елена	400	59,09	120,04	10,79
Елби	400	59,65	116,20	9,71
Верея	400	59,88	118,41	10,41
Пършевица	400	59,64	116,19	10,37
Баланс	400	59,23	119,76	10,88

Забележка: Теглото на кофичката е без алуминиевото фолио!

Вижда се, че по отношение на опаковките няма съществени разлики между основните търговски марки кисели млека. Установено беше, че съхраняването на млеката след изтичане срока на годност води до повишаване на тяхната киселинност, а заедно с това, и на вискозитета им и то значително – виж табл.3. При това има пряка зависимост между двата показателя. Подобни резултати са получени и от други изследователи, изучавали влиянието на киселинността върху реологичните отнасяния на млеката . От литературата е известно, че киселинността на киселото мляко, съхранявано при температура 8-10°C нараства непрекъснато до тридесетия

ден. Разликата между двадесет и четвъртия час и тридесетия ден може да достигне до 38° Тьорнер. Това се потвърждава и от направените от нас изследвания. За изследвания период киселинността на изследваните млека по Тьорнер се е повишила между 12 и 16⁰Т. Тъй като са използвани закупени от мрежата млека, не е било възможно изследването им 24 часа след производството. Има и разлика в ° Тьорнер при млека, съхранявани при 4°C и млека, съхранявани при 8-10°C.

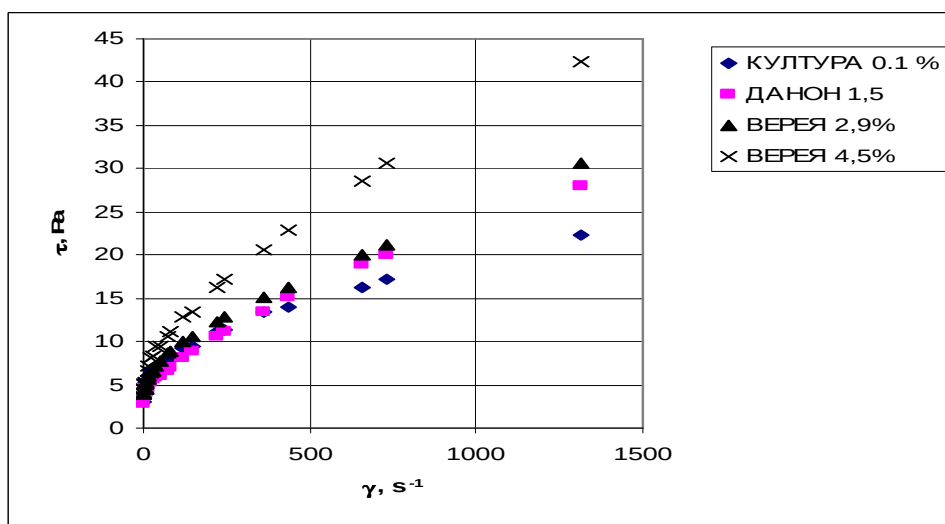
В България са правени епизодични изследвания на зависимостите на реологичните показатели на млечните продукти – кисели млека и йогурти от другите физикохимични параметри, като температура, вид на закваската, условия на ферментация, киселинност, добавяне на допълнителни съставки, като плодове или витамини. Информацията, обаче, е недостатъчна и разпръсната. Вискозитетът все още не е стандартизиран параметър при определяне качеството на млеката, въпреки пряката си зависимост от другите технологични параметри. От друга страна в други държави, като Русия, например, той отдавна е включен в стандартите за качество и програмите за обучение на специалисти по хранително-вкусова промишленост задължително се включва инженерната реология. Ето защо е важно да се обърне внимание на проучването на вискозитета на млечните продукти и неговата връзка с другите работни параметри, което би дало възможност на производителите да следят качеството на продукцията по един сравнително лесен и евтин начин.

Бяха проведени изследвания на реологичното поведение на закупени от търговската мрежа кисели млека и сметана с цел да се проследи влиянието на маслеността върху реологичното им поведение. На фиг.1 са представени типични криви на течение на изследваните продукти. Вижда се, че те са

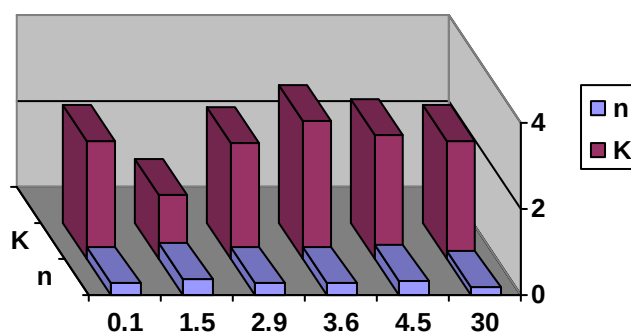
криволинейни без отрез и могат да бъдат описани със степенния реологичен модел на Оствалд-де Вееле:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n$$

където τ е напрежението на деформация, Pa, $\dot{\gamma}$ е скоростта на деформация, K е индексът на консистентност, който характеризира гъстотата на продукта, Pa.sⁿ, а n е реологичният индекс на течение, който показва степента на отклонение на изследвания продукт от нютонovo поведение (колкото той е по-различен от единица, толкова по-ненютонov е продуктът).



Фиг.1. Типични криви на течение на някои от изследваните кисели млека



Фиг.2. Влияние на маслеността върху реологичните параметри

По методите на стандартната статистика с използване на Excel бяха намерени стойностите на реологичните параметри на степенния модел и на модела на Хершел-Бълкли. Техните стойности са представени в таблица 5. Установено е, че моделът на Хершел-Бълкли осигурява по-висока точност на описанието. Вижда се, че всички измерени стойности на реологичния индекс на течение са много по-ниски от единица, т.е. млеката проявяват силно псевдопластичен характер. Варирането на маслеността не оказва много значимо влияние върху индекса на консистентност и реологичния индекс на течение. Пределът на течение в модела на Хершел, обаче, нараства линейно с повишаване на маслеността. Това е обяснимо, тъй като неговото наличие говори за структуриране на системата, а то нараства заедно с повишаване на маслеността.(Steventon, Parkinson,Fryer, & Bottomley, 1990). На фиг.2 са представени измененията в реологичните параметри на степенния модел в зависимост от маслеността на изследваните продукти. Зависимостите на реологичните параметри на модела на Хершел от маслеността на киселите млека е представена на фиг.3 а и в. Наблюдава се повишаване на консистентността на продуктите при масленост 3.6 %, в степенния модел то е от порядъка на 16 %, но това не може да се счита за съществено влияние,

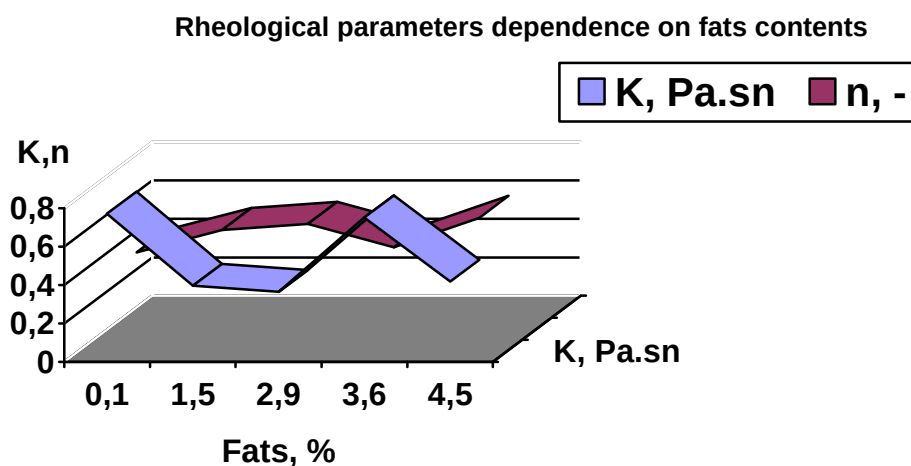
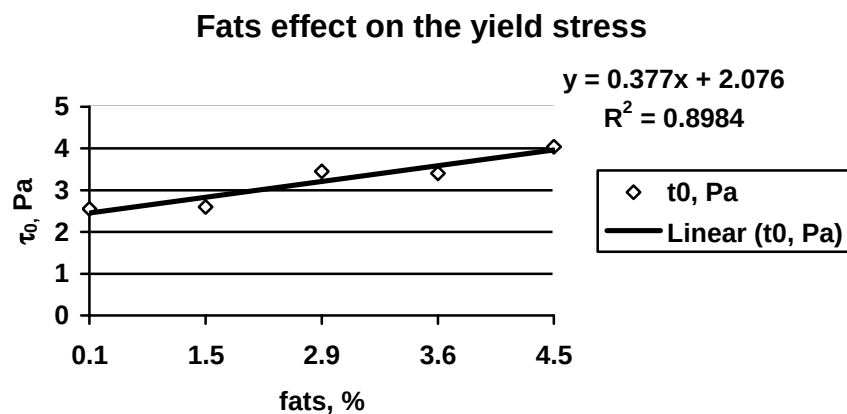
докато при модела на Хершел-Бълкли индексът на консистентност при тази масленост нараства повече от два пъти. Както е известно, реологичните модели не са физически закони, а само начин за описание поведението на продуктите при течение. Затова е необходимо реологичните параметри в тях да се разглеждат съвкупно, а при описание на реологичното поведение да се избира моделът осигуряващ възможно висока точност на описание при възможно по-висока простота.

Таблица 5. Стойности на реологичните параметри на изследваните продукти

Продукт, масленост	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
Култура, 0.1 %	2.55	0.7718	0.4565	0.9525	6.88
Данон, 1.5 %	2.6	0.3965	0.572	0.9526	5.031
Верея, 2.9 %	3.45	0.3652	0.6032	0.9763	5.5
Герма, 3.6 %	3.4	0.7523	0.4821	0.9715	5.45
Верея, 4.5 %	4.035	0.4181	0.6358	0.9783	5.46

Таблица 6. Стойности на реологичните параметри на изследваните продукти

Продукт	Масленост, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$
Култура	0.1	2.7242	0.2695
Данон	1.5	1.4693	0.3827
Верея	2.9	2.695	0.2948
Герма	3.6	3.2101	0.2707
Верея	4.5	2.8574	0.3383
Сметана	30	2.7362	0.2174



Фиг.3 а,в. Зависимости на реологичните параметри от маслеността на киселите млека

От така проведените изследвания на показателите на различни марки кисели млека от търговската мрежа могат да се направят следните изводи:

1. Качеството на киселото мляко зависи от качеството на суровината и технологията на производство.
2. Температурата на съхранение на продукта оказва силно влияние върху качествата му при съхранение.

3. При всички изследвани млека след изтичане срока на годност е установено повишение на титруемата киселинност в °Тьорнер с около 25%, което резултира в повишаване стойностите на привидния вискозитет.
4. Установено е понижение стойностите на рН с около 5-6% веднага след изтичане срока на годност на изследваните продукти.
5. При изследване реологичното поведение на различни кисели млека е установено, че всички те могат с задоволителна точност да се опишат с реологичния модел на Хершел-Бълкли и не проявяват тиксотропия. Възможно е също да се опишат със степенния реологичен модел, но точността на описание пада.
7. Намерени са стойностите на реологичните параметри на степенния модел и на модела на Хершел.
8. Установено е влияние на маслеността на изследваните продукти върху реологичните параметри: пределът на течение нараства линейно с маслеността, при масленост от 3.6 % консистентността на млеката силно нараства, реологичният индекс на течение се влияе сравнително по-слабо от масленото съдържание.

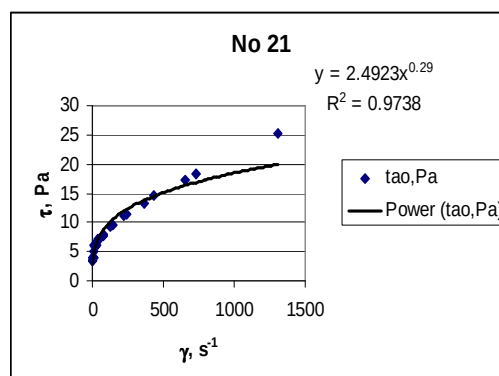
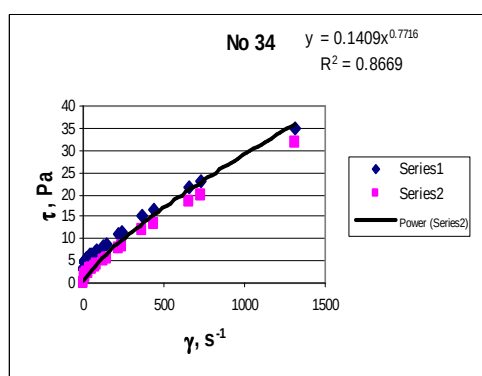
2. Изследване влиянието на технологичните условия и стартерната култура върху реологичното поведение на крайния продукт

В реални промишлени условия са проведени експерименти по заквасяване на една и съща партида мляко с различни закваски, резултиращи в различна структура на киселото мляко: закваска В, даваща влачеща структура и закваска А, осигуряваща вискозна структура. Проведени са експерименти, при които хомогенизирано и нехомогенизирано краве мляко е заквасено с производствена и дива закваска. Хомогенизирано мляко е заквасено с производствена закваска. Производствената закваска С е

комбинация от две закваски А и В. Инкубирането продължава 2 h 45 min при 43°C. След това пробите се охлаждат и съхраняват при 4°C, докато бъдат анализирани. Използваната при експериментите закваска В е по-богата на *Streptococcus thermophilus* а закваска А - на *Lactobacillus bulgaricus* Закваската С е съвкупност от А и В в съотношение 1:1. По-високата плътност на закваска С се обяснява с по-голямото количество на *Lactobacillus bulgaricus*. Дивата закваска е получена от промишлена след двукратно заквасяване на мляко в домашни условия.

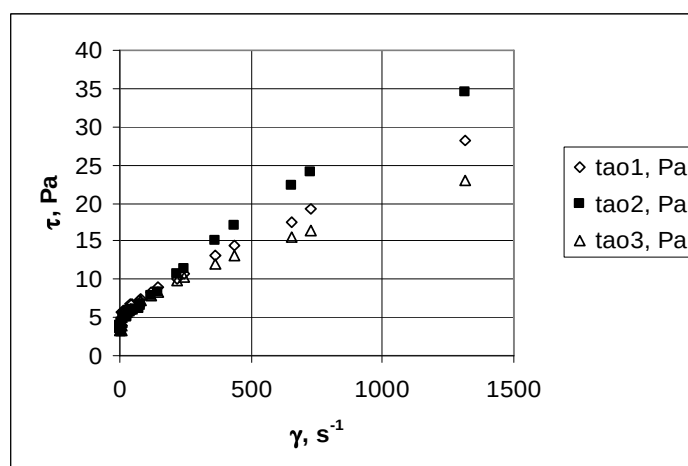
Един от важните параметри, по които може да се следи качеството на млечнокиселите продукти, е техният вискозитет. Проведени са експерименти по изследване реологичното поведение заквасените, както е описано по-горе, продукти. За целта е използван ротационен вискозиметър с коаксиални цилиндри Реотест РВ2 (Германия) с цилиндър S1. Единични експерименти с цилиндър S2 не показаха приплъзване на стената. Кривите на течение са снемани след разбъркване на пробите при максимални обороти на цилиндъра за 1 минута.

На фиг.4а,в,с са представени единичните криви на течение на двете индивидуални закваски, както и сравнение на кривите на течение на трите използвани при експериментите стартерни култури.



Фиг.4а Закваска С(В) влаеща структура. **Фиг.4в** Закваска С(А) вискозна структура

Преобладаващото количество на *S. Thermophilus* резултира във вискозна структура на млякото, а по-голямото количество на *Lactobacillus bulgaricus* води до влачеща се структура, като реологичното описание е по-точно чрез модела на Хершел-Бълкли, съдържащ предел на течение. При това трябва да се има пред вид, че и двата реологични модела не са физически закони, а само математически най-добро описание на реологичното поведение на съответния продукт. Често точността им е доста близка. Затова, в този случай изборът на реологичен модел зависи по-скоро от простотата му.



Фиг.4с. Криви на течение при 20⁰C: tao1 - A:B = 1:1; tao2 – стартерна култура A; tao3 – стартерна култура B.

На фиг.4 са показани типични криви на течение на киселите млека. Както беше посочено, реологичните криви на течение са снемани в права и обратна посока с цел проверка за наличието на тиксотропия. В частта за материали и методи беше посочено, че това става, след като пробите са подложени на деформация около 1 min най-високата скорост на деформация на уреда, за да се избегнат грешки от различната предистория. В хода на експеримента не беше наблюдавана тиксотропия. Всички резултати са

правени по три пъти с цел проверка на възпроизводимостта. Не беше установено отклонение, надвишаващо грешката на експеримента. Вижда се, че кривите на течение са криволинейни без отрез или със сравнително малък отрез. Затова, за описание на данните са тествани два реологични модела: на Хершел-Бъкли (ур.1) и степенния реологичен модел на Оствалд де Вееле (ур.2).

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

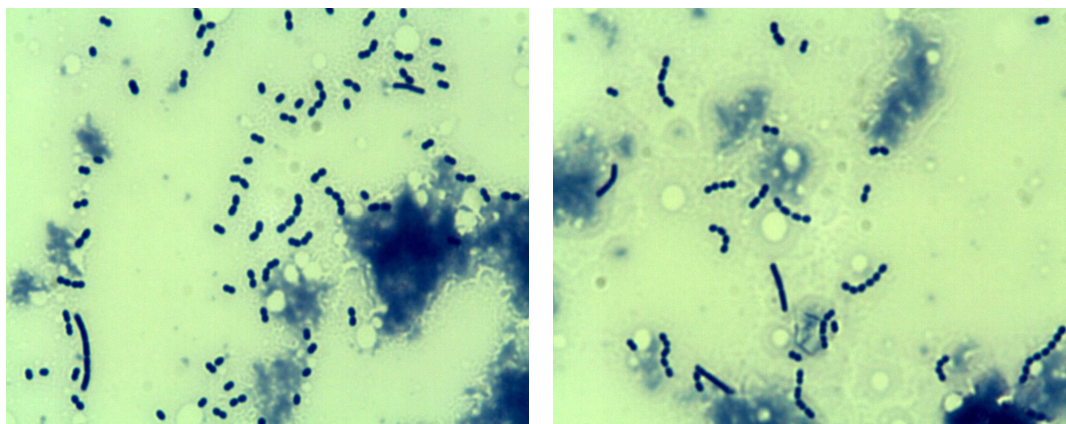
където τ_0 е предел на течение, τ_0 , до надвишаването му течността има поведение на твърдо тяло, след това има поведението на вискозна течност; K - индекс на консистентност, $Pa.s^n$, характеризиращ гъстотата на пробата, n - реологичен индекс на течение, показващ отклонението на пробата от нютонново поведение (колкото той е по различен от единица, толкова по-ненютоннова е течността), а за случая на хершелови течности, определящ кривината на кривата на течение.

В табл.7 са представени стойностите на реологичните параметри на двата модела за изследваните проби, заедно с точността на описание.

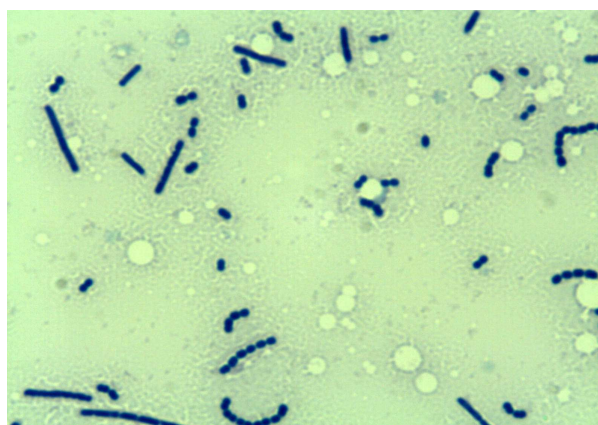
Табл.7. Стойности на параметрите на двата реологични модела и точност на описанието

No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2
1	2.85	0.5756	0.4983	0.9441	2.5986	0.2775	0.9345
2	3.3	0.1093	0.7898	0.9074	2.0934	0.324	0.8846
3	3.0	0.3979	0.5388	0.9405	2.5598	0.2626	0.9445

С помощта на електронен микроскоп и камера 'Olympus' са направени електронни снимки. Те са представени на фиг.5a,b,c.



Фиг.5а. Микроскопски снимки на хом. мл., ферментирано със starter В. Фиг.5b. Микроскопски снимки на хом. мл., ферментирано със starter А.



Фиг.5с. Микроскопски снимки на хомогенизирано мляко, ферментирано с индустриален щам (А:В = 1:1)

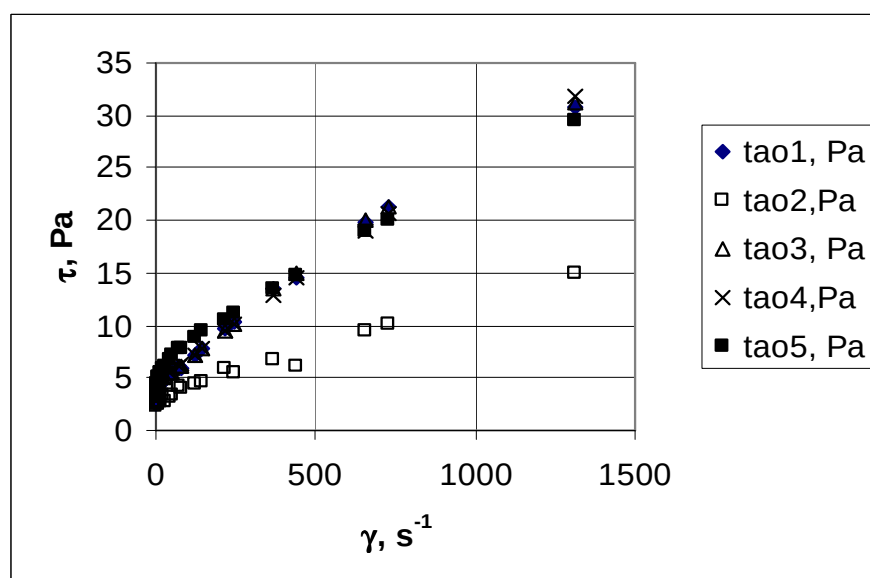
Като се има пред вид, че всички проби са приготвени от хомогенизирано мляко, единствената разлика в този случай, е starterната култура. Вижда се, че starterната култура В е по-богата на St, starterната култура А – на Lb. На фиг. 4с са представени микроскопски снимки на промишлен щам, съдържащ щамове А и В в съотношение 1:1. Тогава, като се направи връзка на микроскопската картина с кривите на течение от фиг.1, може да се каже, че по-високите вискозитети могат да се обяснят с

присъствието на по-голямо количество от щама Lb, който формира мрежести структури.

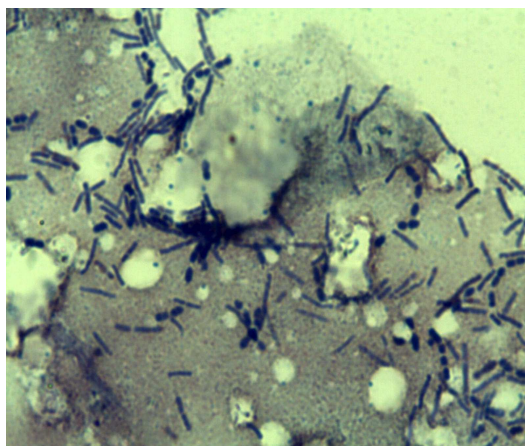
Влияние на хомогенизацията

На Фиг.6 е показана ролята на процеса хомогенизация. Показани са криви на течение на млека, хомогенизирани (1,3,4,5) и нехомогенизирани (2), заквасени с домашна и промишлена закваска. Хомогенизацията образува стабилна емулсия с малки по размери маслени клъбца, което, теоретически, трябва да води до получаването на по-вискозно мляко. Данните го потвърждават: кривата на течение на домашно заквасено мляко се намира най-ниско, докато кривите на течение на всички други хомогенизирани млека, независимо от закваската, почти се припокриват. На същата фигура е показано сравнението между три цикъла на ферментация (криви 1,3 и 4) с цел демонстрация възпроизводимостта на експерименталните резултати. Вижда се, че въпреки известния факт за по-трудното поставяне на биотехнологичен експеримент със задоволителна възпроизводимост, тук може да се твърди за възпроизводимост на данните в рамките на 5 %. Вижда се, че намиращата се най-ниско крива на течение е тази на домашно нехомогенизирано мляко, заквасено с домашна закваска. Микроскопската картина на хомогенизирано и нехомогенизирано мляко, заквасено с домашна закваска е представена на фиг.7а и 7в. От съпоставянето на реологичните отнасяния на млеката с микроскопските снимки може да се каже, че водеща роля за реологичното поведение на изследваните проби има хомогенизацията на суровото мляко. Това е обяснимо, тъй като при хомогенизиране се намалява размерът на масните клъбца, формира се устойчива емулсия, която е логично да бъде по-вискозна от тази на нехомогенизираното мляко. Освен това, от микроскопските снимки може да се види, че домашното мляко,

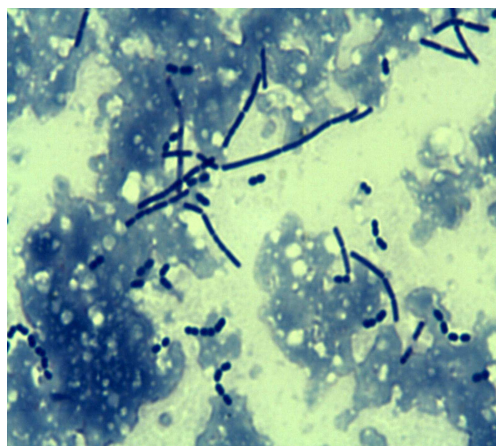
ферментирано с домашна закваска има по-къси Lb пръчки. Този факт, заедно с вече изтъкнатата роля на хомогенизацията могат да обяснят твърде ниските стойности на привидните вискозитети за този случай. Обратно, хомогенизирано мляко, ферментирано със същата домашна закваска (фиг.7в), образува значително по-дълги пръчковидни Lb, които са склонни да формират мрежести структури. St глобулите в този случай са в по-голямо количество. Всички тези факти обясняват значително по-високите вискозитети на хомогенизираното мляко с домашна, а и с промишлена закваска.



Фиг.6. 1 – хомогенизирано мляко с домашна закваска-1; 2 – нехомогенизирано мляко с домашна закваска; 3 – хомогенизирано мляко с домашна закваска-2; 4 – хомогенизирано мляко с домашна закваска-3; 5 – нормално



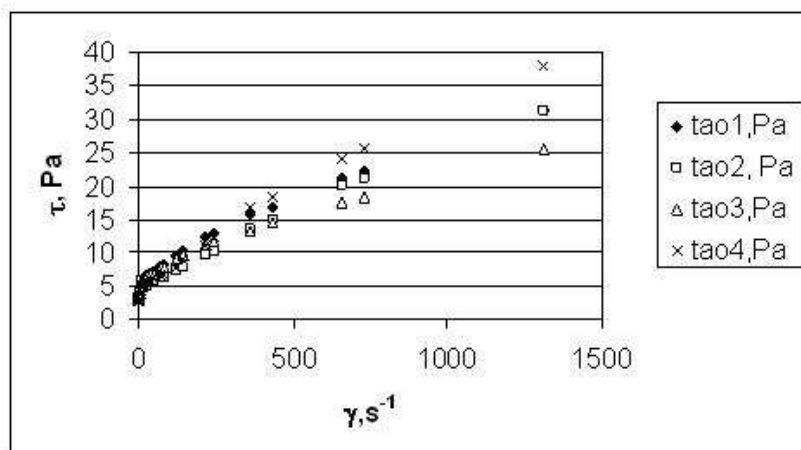
Фиг.7а. Домашно мляко, заквасено с домашна закваска



Фиг.7б. Хомогенизирано с домашна закваска

На фиг.8 е представено сравнение на реологичното поведение на хомогенизирано мляко, заквасено с индустриален starter (крива 1), с домашна закваска (крива 2), със закваска В (крива 3) и със закваска А (крива 4). В таблица 8 са събрани стойностите на реологичните параметри на кривите на течение от фиг.8, описани с модела на Herchell-Bulkley, заедно с точността на описание. Вижда се, че няма почти никаква разлика в реологичното поведение на хомогенизирано мляко, заквасено с промишлена и с домашна закваска. Наблюдават се по-високи стойности на напрежението на деформация за заквасеното със starter А мляко – тази крива на течение се намира най-високо на представената фигура. От друга страна, обаче, стойностите на реологичния индекс на течение n за тази крива са най-високи, т.е. тя е по-линейна от другите. Най-ниски стойности на напрежението на деформация са измерени за ферментираните със starter В млека. Вижда се също, че няма голяма разлика в индексите на течение на криви 1,2 и 3. Разликите при тях са по-скоро в стойностите на предела на течение и индекса на консистентност. Ферментираното с индустриална закваска мляко – крива 1 показва най-високи стойности на тези параметри. Всички проби

демонстрират плътна текстура, не са влачеци се, което съответства на вкусовите предпочитания на българските потребители.



Фиг.8. Криви на течение на хомогенизирано мляко, заквасено с: 1 – промишлена закваска; 2 – домашна закваска; 3 – закваска В; 4 – закваска А.

Таблица 8. Реологични параметри на ферментациите, представени на фиг.8.

No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
1	3.1	0.5518	0.5337	0.9739	5.155
2	2.2	0.4998	0.5303	0.9473	10.83
3	3.0	0.4603	0.5456	0.9405	7.026
4	2.5	0.3493	0.6221	0.9074	11.13

Възможно обяснение на това реологично поведение на изследваните проби е повишеното количество на St в стартерните култури с по-високи вискозитети. Това съответства с наблюденията на други автори. Според A.Skriver, мляко, заквасено със St щам има по-висок вискозитет от заквасеното с Lb. При заквасеното с комбинирана симбиотична закваска от St и Lb не само намалява скоростта на ферментация, тя придава на млякото

характерен вкус и аромат, а вискозитетът на млякото нараства, което е предпочитано за много от киселомлечните продукти. В работата е доказано, че мляко, заквасено с комбинация от St и Lb има по-високо напрежение на деформация (съответно и привиден вискозитет) от мляко, заквасено с единичните щамове. Това означава, че симбиозата между двата щама преминава в краен продукт със значително по-висок вискозитет от тези, произведени при заквасяване с единични щамове.

Изводите, които логично следват от тази серия експерименти са:

- Качеството на йогуртите зависи силно от качеството на суровото мляко, от стартерната култура и от условията на провеждане на експеримента;
- Сензорните качества на крайния продукт зависят най-вече от вида на стартера. Някои от щамове дават краен продукт с влачеща се текстура, други – плътен коагулум; върху вкуса на крайния продукт оказва влияние и наличието на щамове, продуциращи екзополisahариди.
- Използването на “дива” закваска дава краен продукт със силно различаващи се качества от тези, получени при използването на промишлена. Това се дължи на мутациите на микроорганизмите.
- Хомогенизацията на млякото силно влияе върху консистенцията на крайния продукт.
- Използването на различни стартери в различни съотношения между тях може да бъде един от инструментите за регулиране консистенцията и сензорните качества на крайния продукт.

Влияние на закваската

Закваската за кисело мляко, предназначено за консумация, се състои от *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, изолирани в България и неподлагани на генетична модификация. Бактериално съдържание на *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*. в закваските би трябвало да бъде приблизително в съотношение 1:2 и 1:4 през лятото. Това е по старото БДС

Основните изисквания, на които трябва да отговаря една висококачествена закваска за българско кисело мляко, са следните : а) време за коагулация; б) коагулум-плътен с блестящ лом; в) консистенция - еднородна без зърненост или слизестост; г) вкус-строго специфичен, чист, млечнокисел; д) аромат-мек, приятен, подчертан при киселинност от 95-105⁰ Т (4,7-4,5 рН); е) способност да натрупва свободни аминокиселини; ж) микроскопска картина; з) съотношение на двата микроорганизма. От 1:10 до 1:100 в полза на *Streptococcus thermophilus*

Активната производствена закваска трябва да отговаря на следните характеристики: максимално количество жизнеспособни клетки; отсъствие на замърсители, например коли-форми, дрожди или плесен; съхранение на активностите на микроорганизмите при култивиране в млякото в процеса на заквасяване. Недостатъците на закваската се предават и на киселомлечния продукт .

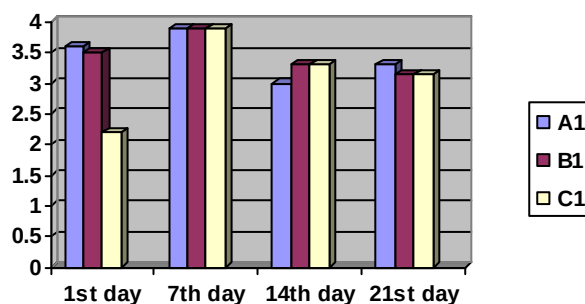
Изследване на закваски с различни структури, съдържащи микроорганизми, произвеждащи ЕПЗ

Бяха произведени кисели млека от краве мляко (3,6% масленост), инокулирано с 3% от една от трите течни закваски А1, В1 или С1. Трите закваски бяха избрани от LBB колекцията за млечнокисели организми и стартерни култури (ЕЛБИ Булгарикум ЕАД, София, България) заради

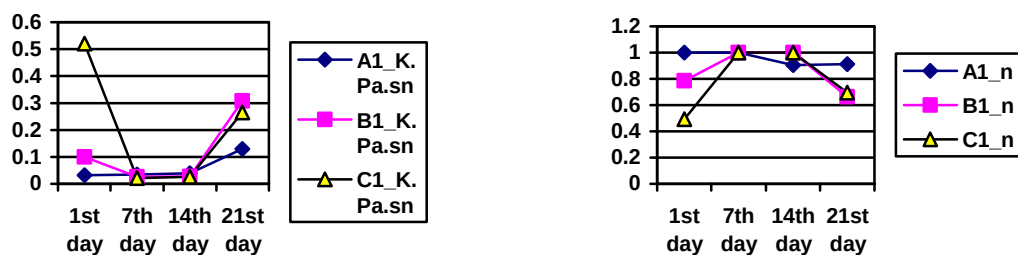
възможността с тях да се получаат кисели млека с различна структура. Киселото мляко, получено със закваска А1 е с плътна вискозна кремообразна структура; продуктът, получен със закваска В1, е с кремообразна структура с умерена вискозност; закваска С1 послужи като контрола, защото с нея се получава типичното българско кисело мляко с плътен коагулум, който никога не е провлачен. Закваска С1 е комбинация от две закваски. Тя съвпада със закваска С от предишната серия експерименти и е промишлената закваска, с която се получава киселото мляко ЕЛБИ.

Инкубирането продължава 2 часа и 45 минути при 43°C. След това пробите се охлаждат и съхраняват при 4°C, докато бъдат анализирани. Проби от продуктите бяха тествани, 24 часа след заквасяването и след това на дни 7, 14 и 21 от периода на съхранение за съдържание на живи бактерии, киселинност, концентрация на високомолекулни ИПЗ и реологично поведение. На фиг.9а,в,с е представено изменение на реологичните параметри на модела на Хершел-Бълкли с времето на съхранение, а в таблица 9 са събрани техните стойности за трите изследвани закваски, както и точността на описание на експерименталните данни. Наблюдава се интересен факт, че на седмия ден от началото на процеса и трите изследвани закваски имат стойност на реологичния индекс на течение единица, т.е. реологичният модел на Хершел преминава в този на Бингам, като кривата на течение е права с отрез. На 14 и 21 ден от съхранение на пробите индексите на течение и на трите млека се понижават, като най-ясно е изразено това при млеката, заквасени със стартерна култура В1 следвана от С1. Заквасените с А1 млека остават близки до бингамово поведение. Най-ниски стойности на реологичния индекс на течение се наблюдават на 21 ден от началото на процеса. Евентуално обяснение на това явление може да се търси в достигане на най-ниско рН, дължащо се на нарастване относителния дял на

Lactobacillus bulgaricus спрямо *Streptococcus thermophilus*. При това се вижда, че кривата на течение на киселото мляко, получено със закваска А1 е разположена най-високо. То е с плътна вискозна кремообразна структура; индексът му на течение е единица или близък до единица, т.е. реологичното му поведение може да бъде описано с реологичния модел на Бингам на първия и седмия ден от заквасяването и с този на Хершел – на 14 и 21 ден. Продуктът, получен със закваска В1, е с кремообразна структура с умерена вискозност; като кривата му на течение е много близка до контролата - закваска С1.



Фиг.9а. Изменение на предела на течение с времето



Фиг.9в,с. Изменение на индекса на консистентност, К и реологичния индекс на течение с времето

Вижда се, също че времето на съхранение най-силно влияе върху индекса на консистентност, като това влияние е най-изявено за закваска С1.

Трябва да се отбележи също, че реологичните параметри на млеката, заквасени със закваска А1 най-слабо са повлияни от времето на съхранение. От табл.9А се вижда, че тя най-съществено се различава от другите два стартера по количеството произвеждани ЕПЗ, както и по близо 200 пъти по-високото съотношение между St и LB . Освено това, още от първия ден на съхранение ферментираните с тази закваска млека проявяват бингамово реологично поведение, т.е. праволинейни криви на течение с отрез. Пределите на течение и на трите ферментирани млека са близки и сравнително слабо се влияят от времето на съхранение. Както беше споменато по-горе, при модела на Хершел-Бълкли за точното описание е най-важна комбинацията от трите параметъра, не само разглеждането им един по един. От таблица 9 се вижда и добрата точност на описание на експерименталните данни с реологичните модели с изброените в нея параметри.

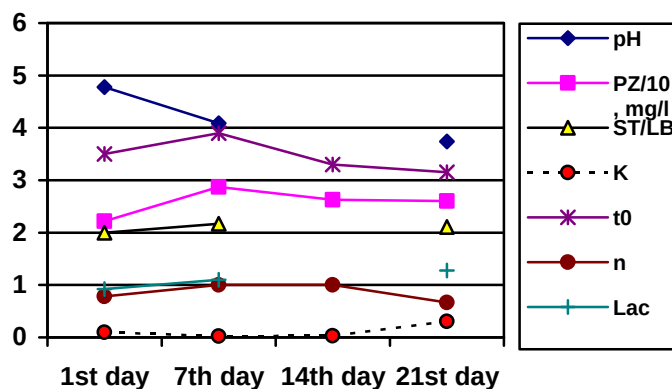
Таблица 9 Промяна на реологичните показатели по време на съхранение

No	day	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
A1	1	3.6	0.0324	1	0.9994	2.27
	7	3.9	0.034	1	0.9975	5.72
	14	3.0	0.0389	0.9045	0.9846	11.09
	21	3.3	0.1292	0.9116	0.8992	10.16
B1	1	3.5	0.1001	0.7846	0.9696	5.09
	7	3.9	0.0259	1	0.996	5.29
	14	3.3	0.0453	0.9589	0.9117	9.50
	21	3.15	0.3077	0.664	0.9356	6.91
C1	1	2.2	0.5203	0.4935	0.9768	6.3
	7	3.9	0.0209	1	0.9658	11.79
	14	3.3	0.0695	0.9173	0.8424	18.48
	21	3.15	0.2645	0.6951	0.9069	12.96

Таблица 9А Динамика на параметрите по време на съхранение на млеката

Проба No.	Ден	Активна киселинност, pH	Високомолекулен полизахарид, mg/l	Брой <i>Lactobacillus bugarius</i>	Брой <i>Streptococcus thermophilus</i>	St/LB
A13	1	4.92	32.4	3.9×10^6	8.1×10^8	207.7
	7	4.35	32.6	2.4×10^6	7.8×10^8	325
	14	-	37.1	-	-	
	21	4.03	31.5	1.6×10^6	7.1×10^8	443.75
B14	1	4.78	22.2	2.5×10^8	5.0×10^8	2
	7	4.09	28.7	2.3×10^8	5.0×10^8	2.17
	14	-	26.3	-	-	
	21	3.74	26.0	1.9×10^8	4.0×10^8	2.105
C18	1	4.76	9.7	1.8×10^8	1.3×10^9	7.22
	7	4.21	11.2	1.2×10^8	1.1×10^9	9.167
	14	-	12.0	-	-	
	21	3.93	14.3	1.6×10^8	1.3×10^9	8.125

В таблица 9А и на фиг.10 е обобщена динамиката на параметрите на процеса по време на съхранение. От фигурата личи, че към края на изследвания период, 21 ден, киселинността на продукта се понижава, като за продукта, заквасен с А1 тя достига pH 4,03, за В1 – 3,74, а за С1 – 3,93. Наблюдава се сходство в поведението на продуктите В1 и С1, за разлика от А1, който се отличава с близо двойно по-високо съдържание на високомолекулен полизахарид в сравнение с контролата, както и с най-високо съдържание на *Streptococcus thermophilus*.



Фиг.10. Изменение на физикохимичните, микробиологичните и реологичните параметри на мляко, получено със закваска В в зависимост от времето на съхранение

3 Изследване на качествата на кисели млека, заквасени с промишлена закваска с добавка на пробиотичен щам.

Комбинирането на индустриални закваски с биологично-активни култури е утвърден подход в разработката на нови функционални млечни продукти. Затова заключителен етап в настоящия дисертационен труд бе оценката приложимостта на подбрани щамове лактобацили като пробиотични добавки при производството на кисело мляко в комбинация с комерсиална индустриална закваска. За лабораторното производство на кисело мляко бе използвано хомогенизирано, бито краве мляко със следните физикохимични параметри: рН-6.77, киселинност- 15°Т, мазнини-0.8, белтък- 3.62, лактоза- 4.24, цитрат- 0.125, сухо вещество (TS)- 9.04, плътност- 1034.4 (Foss Electric Milkoscan 50, FT120, Дания). За ферментиране на млякото при експеримента бе използвана леофилизирана стартерна култура ELBI 37-18 (ELBI Bulgaricum Sofia Bulgaria) съдържаща *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, и свежо концентрирана култура в качеството на добавка. Преди заквасяване млякото бе пастеризирано на 90°C за 15 мин, бързо охладено и инокулирано със стартерната култура и една от

подбраните пробиотични лактобацилни култури *Lactobacillus salivarius* (проба С) и *Lactobacillus bulgaricus* (проба F). Щамовете са с различен произход (materiali I Metodi) и са подбрани по различни критерии за селекция на пробиотични култури *in vitro*. Резултатите от тестовете проведени в динамика 0-7-14-21 ден са обобщени. Двата щама са предварително подбрани по техни функционални характеристики.

Мляко заквасено само със стартерна култура (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricus*) бе използвано като контрола Е. След инокулиране, мляко бе разпределено в стерилни 100-g пластмасови контейнери, като последните бяха инкубирани на 37°C, докато рН на контролната проба достигна 4.6. След края на ферментацията млеката бяха бързо охладени и прибрани на студено (4°C) за 28 дена. За периода на съхранение бяха проведени микробиологичен, физикохимичен, реологичен анализи на 1, 7, 14, 21 и 28 ден от съхранението..

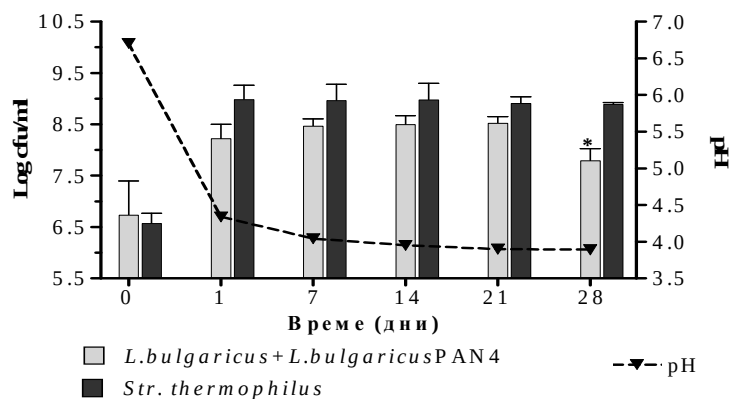
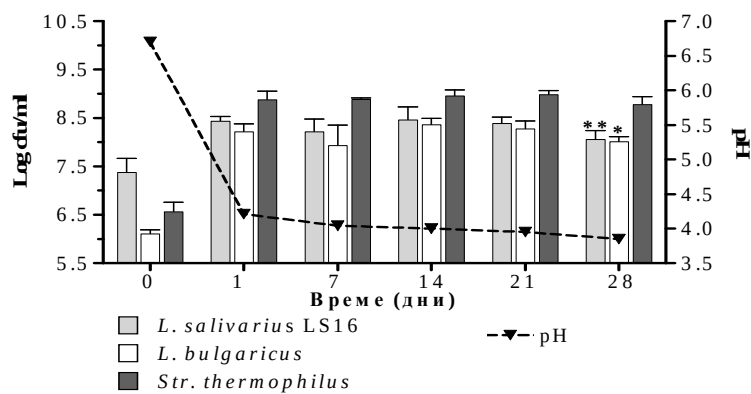
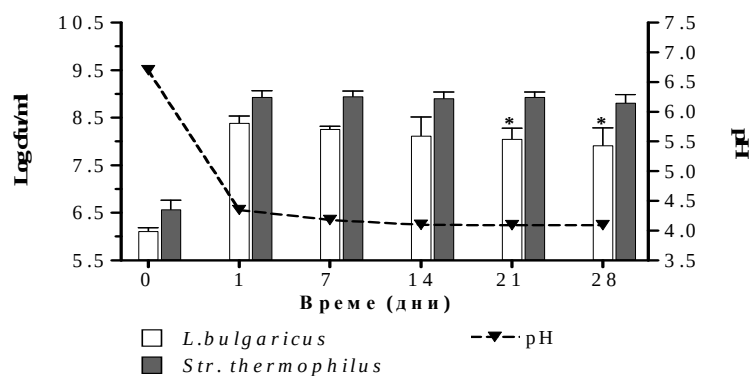
Един грам от стартерната култура бе реактивиран в 100 ml стерилно обезмаслено мляко (10 % w/v) при температура 37°C за 30 min. Използваните лактобацилни култури, предварително съхранявани на -20°C бяха двукратно пресяти в MRS бульон (Merck, Germany), биомасата бе събрана и също реактивирана в 50 ml стерилно обезмаслено мляко при 37°C за 30 min. За инокулиране на млякото бе използван по 2 % инокулум от така активираните култури. Първоначалният брой на *Str. thermophilus* и *L. bulgaricus* бе 10^6 cfu/ml, а за лактобацилната добавка 10^7 cfu/ml.

Експеримент 2 За настоящия експеримент бе подбрана стандартна закваска за кисело мляко, закупена от търговската мрежа и включваща видовете *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Опитът бе проведен в лаборатория, но в съответствие с технологичните условия за получаване и оценка на ферментационни млечни продукти. Предпочетен бе вариантът с едновременно добавяне на пробиотичния щам и стартерната култура.

Ферментационният процес бе проведен при температура 37°C, оптимална за развитието на лактобацилната добавка и, следователно, позволяваща нейния допълнителен растеж. Независимо, че не бе приложена индустриалната температура от 42°C, не се наблюдаваше значително удължаване на времето за заквасяване на пробите, а именно 5-6 ч, както е заложено и технологично.

За получаване на ферментирани продукти (контрола StLb - заквасена само със стартерните култури и проби LsalStLb и Lbul StLb - с добавка на пробиотични щамове Lsal (*L. salivarius* LS16) и Lbul (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4) към стартерната култура) обезмасленото мляко бе инокулирано с 2 % (v/v) инокулум от стартерната закваска (вкл. *Str. thermophilus* и *L. bulgaricus*) и 2 % инокулум от концентрирана култура *L. salivarius* LS16 и *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4.

На фиг.11 е представена динамиката на изменение на броя микроорганизми и на pH на трите ферментирани млека с времето на съхранение. Вижда се, че най-значима промяна в броя на лактобацилите се наблюдава през първите часове след заквасяването, като особено силна е тя за стартерната култура. Промените в броя микроорганизми след 21 ден са по-незначителни. Затова, основните сравнения са правени на 21 ден от съхранението. На фиг.12 е представена микроскопската картина на трите проби на 21ия ден от съхранението, а на фиг.13 – външният вид, синерезисът и тестът за здравина.

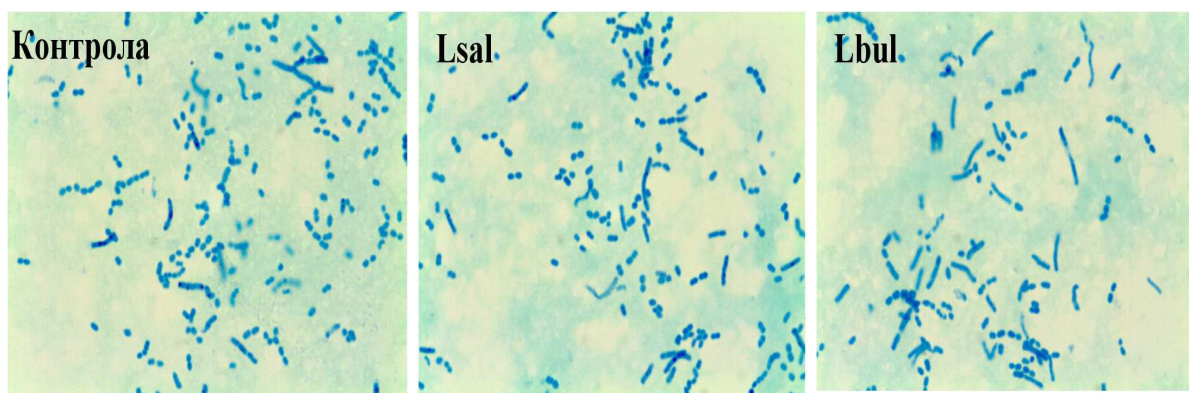


Фиг.11. Промяна в рН и общия брой живи клетки на обезмаслено ферментирано мляко по време на съхранение при 4°C. Резултатите са показани като средна стойност ($\pm$ SD).

В момента на инокулиране средният първоначален брой отчетен за *L. salivarius* LS16 бе $3.1 \pm 0.5 \times 10^7$ cfu/ml, докато за щамовете от стартерната закваска с един логаритъм по-нисък $\sim 10^6$ cfu/ml и в съотношение 2:1 ($4 \pm 1.7 \times 10^6$ cfu/ml *Str. thermophilus* и $1.3 \pm 0.3 \times 10^6$ cfu/ml *L. bulgaricus*). По-високият първоначален инокулум за пробиотичната добавка бе съобразен с по-слабия растеж на *L. salivarius* LS16 в мляко и сравнително ниската протеолитична активност. За времето на ферментация (5-6 ч) бе отчетено слабо повишение в броя клетки на *L. salivarius* LS16 (0.81 log), докато за щамовете на стартерната култура бе наблюдаван значителен растеж от порядъка на 2 log (фиг.11).

Установено е, че по време на целия период на съхранение (до 28 ден) и четирите щама (*L. salivarius* LS16, *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4 и *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*, LsalStLb и Lbul StLb) запазват стабилна численост (фиг.11). По брой клетки *Str. thermophilus* доминира над *L. salivarius* и *L. bulgaricus*, като първоначалното съотношение между двете стартерни култури се запазва до края на съхранението. На 28 ден за *L. salivarius* бе отчетена популация варираща в границите $1.25 \pm 1.1 \times 10^8$ cfu/ml с известна редукция в броя клетки от 1 ден на съхранението (0.4 log). Това определи ферментираното мляко като подходяща форма за приемане на щама *L. salivarius* LS16.

В хода на ферментацията бе наблюдавано стабилно понижение на pH и покачване на титруемата киселинност (табл.11).



Фиг.12 Микроскопска картина на експериментални кисели млека на 21 ден от съхранението

Легенда: Контрола (мляко с комерсиална стартерна култура- *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и експериментални варианти приготвени със стартерна култура и с добавка на нестартерни лактобацили, както следва: Lsal (*L. salivarius* LS16), и Lbul (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4).

В литературата са докладвани различни ефекти на стартерната закваска върху популацията на пробиотика. От една страна стартерите могат да имат стимулиращ ефект върху пробиотика чрез продукцията на субстанции благоприятстващи растежа или чрез редуциране налягането на кислорода (Ishibashi & Shimamura, 1993; Saarela *et al.*, 2000). Много по-често обаче се докладват случаи на понижаване в числеността на пробиотика от метаболити образувани от стартерната култура, такива като млечна киселина, водороден пероксид и бактериоцини. За *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* е известно, че е отговорен за производството на млечна киселина по време на ферментацията и съхранението на студено. Последният процес е известен в индустрията като процес на „вторично подкисляване” и е основният фактор предизвикващ загуба жизнеспособността на пробиотичните бактерии (Shah *et al.*, 1995; Shah, 2000; Vinderola *et al.*, 2000a). Влиянието на D-лактата върху пробиотика варира от щам до щам (Dave & Shah, 1997; Kailasapathy & Rybka, 1997). В случаите на включване на *L. salivarius* LS16 и *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus*

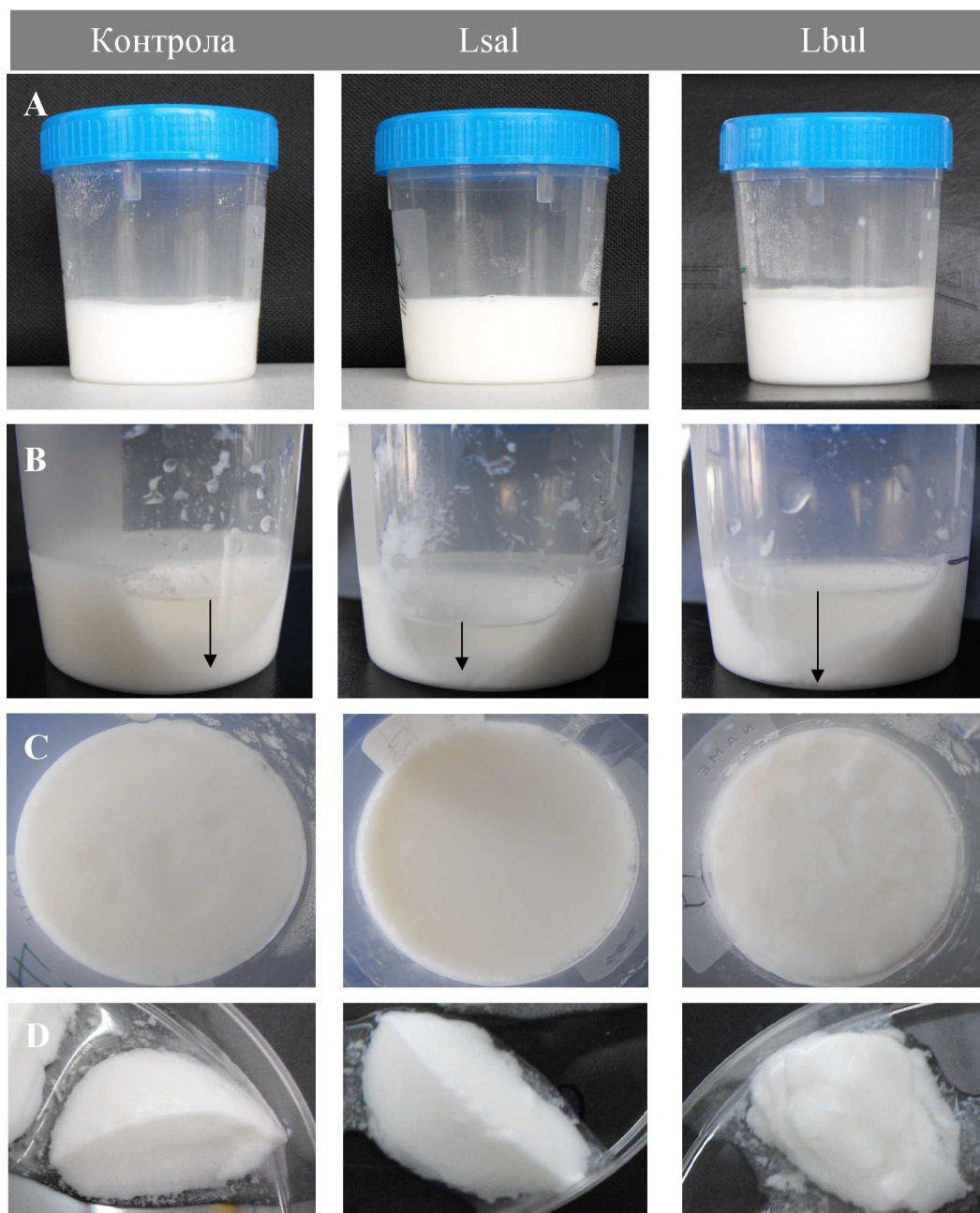
PAN4, като добавка към starterите за кисело мляко не бе отчетено понижаване в числеността. Напротив щамовете демонстрираха способност да преживяват и да се адаптират добре в присъствие на starterната закваска за целия период на съхранение, без да се повлияват от ниските стойности на рН. Доказано е, че симбиозата между щамовете в закваските за млечнокисели продукти е щамово специфична и може да повлияе времето за коагулация, растежа и съотношението между щамовете в състава на закваските (Денкова и др., 2009, Янакиева & Мургов, 2009). Затова, комбинациите Lsal StLb и Lbul StLb биха могли да се използват в производствения процес за скъсяване времето на ферментация. Наличието на такава възможност е била докладвана от Damin *et al.* (2006) и напоследък е често използвана практика при производството на пробиотични млека. Освен използвания starter влицие върху преживяемостта на пробиотика може да има и типа кисело мляко. Така например Vinderola *et al.*, (2000a) докладват по-добра преживяемост на пробиотичните бактерии в обезмаслено, в сравнение с пълномасленото мляко.

За да бъде един продукт годен за консумация той трябва да има добър външен вид и сензорни свойства. Затова допълнително бяха анализирани някои реологични параметри на ферментираното мляко, характеризиращи неговата плътност и консистенция (плътност на гела, индекс на консистентност). Оценени бяха и някои органолептични качества, като бе направен сравнителен анализ между млеката с Lsal StLb, Lbul StLb и това само със starterна закваска StLb.

При анализ на ферментираните млека като готов продукт, параметрите масленост (0.1%), белтъчно съдържание (3.42-3.44) и сухо вещество (8.39-8.43) останаха стабилни в хода на съхранението до 28 ден. С всяка следваща времева точка плътността на гела и консистентността се увеличиха и за трите

варианта млека (Lsal StLb, Lbul StLb и StLb) (табл. 8,9). Подобно уплътняване би могло да се дължи на формирането на връзки между белтъчните частици (Sodini *et al.*, 2004). Като независими контроли за отчитаните параметри бяха използвани търговски марки кисели млека, които по физико-химични параметри са еднакви с анализиранияте проби. За кисело мляко Верея (0.1 % масленост) бе отчетен индекс на консистентност 3.099 на 14 ден от съхранението и за кисело мляко Родопея (0.1 % масленост) с индекс на консистентност 3.187 в последния ден от срока на годност. При сравнение с данните от табл.3 се вижда, че кисело мляко Култура с 0.1 % масленост има коефициент на консистентност 2.7242 на 14 ден от съхранението. Както беше установено в предишната глава, маслеността на млеката оказва незначително влияние върху реологичното им поведение. Пробите Lsal StLb и Lbul StLb показаха съизмерим коефициент на консистентност с изследваните търговски продукти (виж.табл.3 и табл.9). Освен това, добавянето на пробиотичния шам показва положителен ефект върху текстурата на ферментирания продукт, както и уплътняване на структурата в хода на съхранението. Подобряване структурата на киселото мляко при добавка на пробиотик и при по-дълго съхранение е било описано и за други пробиотични млека (Kristo *et al.*, 2003; Damin *et al.*, 2006).

На фиг.13 е представен външният вид, структурата на лома, образуването на суроватка и повърхността на коагулума за изследваните видове млека.



Фиг.13. Външен вид, структура на лома, образуване на суроватка и повърхност на коагулума за изследваните видове млека.

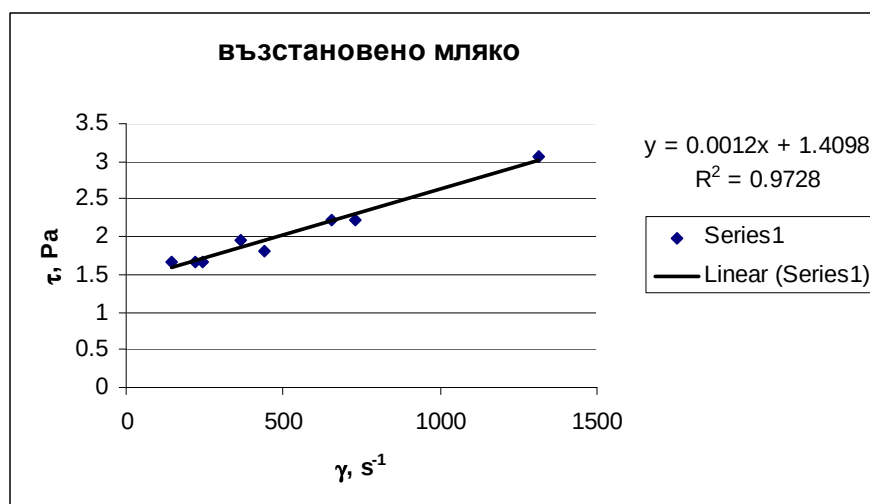
Легенда: Контрола (мляко с комерсиална стартерна култура- *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и експериментални варианти приготвени със стартерна култура и с добавка на нестартерни лактобацили,

както следва: Lsal (*L. salivarius* LS16), и Lbul (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4).

А - общ външен вид на ферментираното мляко; *В* - количество на суроватката в ломната падина; *С* - Повърхност на коагулума; *Д*- Структура на лома.

Влияние на времето на съхранение върху реологичните отнасяние и физикохимичните свойства на киселите млека с и без добавка на пробиотични щамове

На фиг 14 е представена кривата на течение на възстановеното мляко, което е подлагано на ферментация с изброените щамове. Вижда се, че тя е права с отрез, т.е. може да се опише с реологичния модел на Бингам-Шведов.

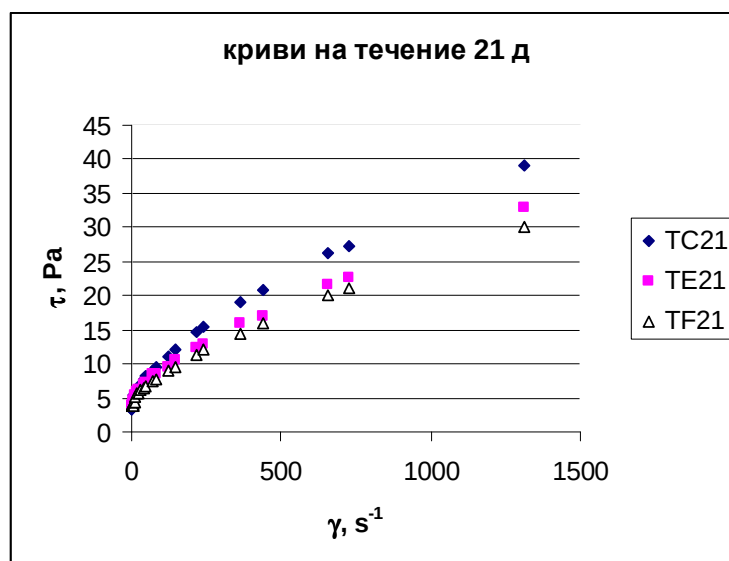


Фиг.14. Криви на течение на изходната суповина – възстановено мляко.

Определени са стойностите на реологичните му параметри, като уравнението на кривата на течение на възстановеното мляко е:

$$\tau = 1.4098 + 0.0012 \gamma$$

След заквасяването кривите на течение придобиват криволинеен характер, а отрезът се увеличава. На фиг.15 са показани примерни криви на течение на 21 ден на съхранение.



Фиг.15. Криви на течение на ферментирания мляк на 21 ден от съхранението

Легенда: Е - Контрола (мляко с комерсиална стартерна култура- *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и експериментални варианти приготвени със стартерна култура и с добавка на нестартерни лактобацили, както следва С: Lsal (*L. salivarius* LS16), и F: Lbul (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4).

Вижда се, че и трите ферментирани млека имат криволинейни криви на течение с отрез, т.е. реологичното им поведение може да се опише с реологичния модел на Хершел-Бъкли. Най-високо е разположена кривата на течение на проба С, съдържаща стандартна стартерна закваска и Lsal, под нея е контролата, ферментирана със стартер и най-ниско е разположена кривата на течение на пробата с добавка на Lbul (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* PAN4).

В таблица 11 и на фиг.16 до 19 е показано влиянието на времето на съхранение върху киселинността и здравината на коагулума на изследваните ферментирани млека. При всички изследвани проби се наблюдава понижаване на рН, респ. повишаване на титруемата киселинност, T° от първия до 28 ден. В хода на съхранението на 4°C рН се понижава от 4.34 до 3.69 за Lbul StLb, от 4.21 до 3.85 – за LsalStLb и от 4.6 до 4.1 за контролата-

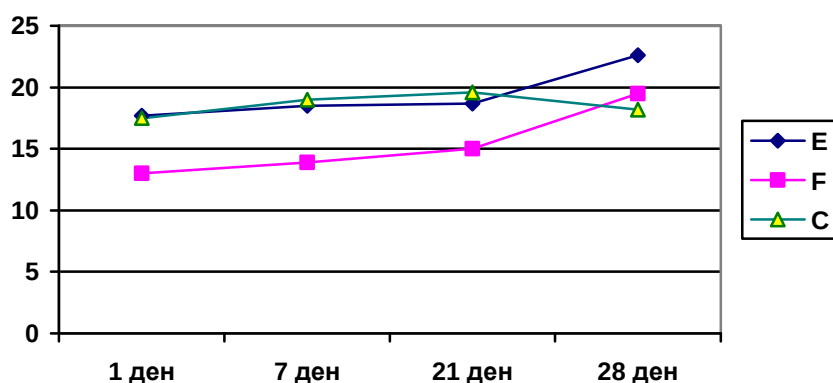
StLb. Най-силно понижение на рН и съответно повишение на титруемата киселинност бе отчетено през първите 24 ч от съхранението. Между 21 и 28 ден рН остава стабилно, но бе отчетено повишаване на общата титруема киселинност (ОТК в °Т) и, съответно, по-висок процент млечна киселина (табл.8). Независимо от този факт, до последния ден от съхранението ОТК бе в границите, препоръчани за българско кисело мляко (по БДС 12-82, 1982). Както се вижда, най-висока киселинност се наблюдава при киселите млека, ферментирани със смесена закваска от Lbul StLb, следвана от тази със LsalStLb, рН на 28ия ден, съответно 3.69 и 3.85, титруема киселинност, съотв. 142 и 130. Това е обяснимо, поради по-високото съдържание на Lbul в две разновидности. Както е известно [41], той придава по-висока киселинност на заквасените с него млека. Най-ниска киселинност се наблюдава при контролата, заквасена само със St:Lb=1:1. При това, при контролата понижаването на рН практически спира на 21 ден от съхранението, докато при другите две проби, то продължава и през следващите 7 дни. Здравината на коагулума, от друга страна, е най-висока при контролата, и най-ниска при Lbul StLb, като тенденцията е нарастване здравината на коагулума по време на съхранението, което се обяснява логично със запазване броя на микроорганизмите, които структурират млякото, от една страна и повишаване на киселинността, която, както вече беше посочено повишава привидния вискозитет на йогуртите – фиг.10,11.

Таблица 11. Динамика на промяната на параметрите на киселите млека по време на съхранение.

Proba C <i>L. salivarius</i> LS	рН	Т°	Здравина, г	% млечна к-на
1 ден	4.21	92	17.5	0.83
7 ден	4.04	110	19	1.01
21 ден	3.95	115	19.6	1.04
28 ден	3.85	130	18.2	1.17

Proba E контрола	pH	T°	Здравина, г	% млечна к-на
1 ден	4.35	84	17.7	0.76
7 ден	4.18	96	18.5	0.87
21 ден	4.09	109	18.7	1.013
28 ден	4.09	105	22.6	0.97

Proba F <i>L. bulgaricus</i> 4	pH	T°	Здравина, г	% млечна к-на
1 ден	4.34	83	13	0.74
7 ден	4.04	106	13.9	0.97
21 ден	3.90	122	15	1.103
28 ден	3.69	142	19.5	1.28



Фиг.16. Здравина на коагулума по време на съхранението.

От фиг.16 се вижда, че ходът на промяна здравината на коагулума по време на съхранението е сходен при пробата, заквасена с Lbul StLb, но стойностите се различават с близо 25 %. Проба C, заквасена с LsalStLb има коренно различен ход на параметъра, единствено при тази проба се наблюдава понижаване здравината след 21 ден, а и промяната му за 28 дни

съхранение е много по-незначителна. Пенетрационните тестове, характеризиращи здравината на коагулума пряко се корелират с реологичното поведение на изследваните проби. Както вече беше посочено то е определяно с помощта на ротационен вискозиметър с коаксиални цилиндри, описан в частта за материали и методи. Както и в предишната глава, бяха тествани два реологични модела за описание на реологичното поведение на продуктите – степенният модел на Оствалд се Вееле и реологичният модел на Хершел-Бъкли.

Стойностите на реологичните параметри на изследваните ферментирани млечни продукти на 21ия ден от съхранението, заедно с точността на описанието са представени в таблица 12. В приложение са представени същите стойности за всички други изследвани времена – в момента на заквасяване, след 24 часа, на 7, 14 и 28ия ден от съхранението.

Таблица 12. Стойности на реологичните параметри на изследваните ферментирани млечни продукти на 21ия ден от съхранението.

No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	3.2	0.2569	0.718	0.928	9.6	2.306	0.3544	0.9711	9.609
E	3.45	0.3048	0.6363	0.9802	4.06	2.5279	0.3083	0.9347	10.62
F	3.701	0.1385	0.753	0.9559	5.98	2.4805	0.2971	0.9347	11.94

24 часа

No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	2.5	0.3602	0.6163	0.9375	5.23	1.9434	0.3502	0.9524	11.74
E	2.5	0.1806	0.687	0.86	9.43	1.9105	0.315	0.903	14.67
F	2.2	0.2273	0.6458	0.84	7.4	1.7106	0.3244	0.9444	12.43

14 ден

No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	2.54	0.4354	0.6046	0.9605	6.99	2.0851	0.3537	0.9655	10.44
E	2.5	0.4883	0.5454	0.956	7.33	2.2173	0.3116	0.9588	10.11
F	2.1	0.1671	0.6937	0.9055	11.6	1.5928	0.3243	0.9565	10.54

28 ден

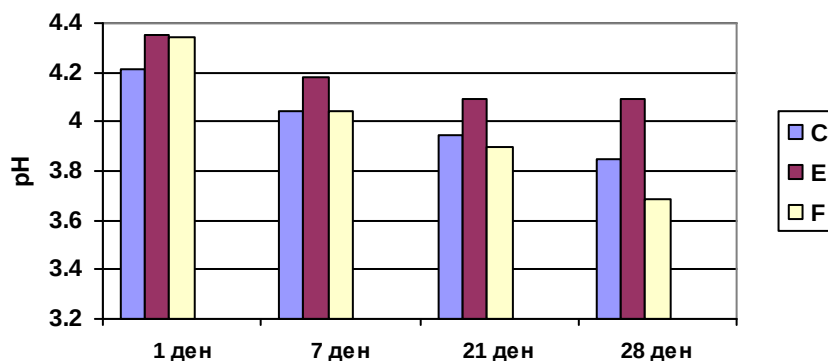
No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	3.5	0.3581	0.6755	0.9681	6.26	2.5327	0.3584	0.9663	10.62
E	3.75	0.1379	0.7948	0.9323	10.65	2.5263	0.3179	0.9567	10.17
F	2.7	0.5073	0.5606	0.9825	4.49	2.2761	0.3291	0.9635	9.76

7 ден

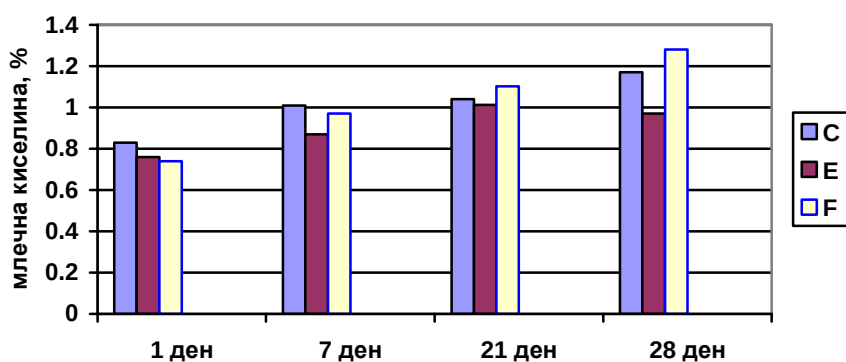
No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	3.40	0.2705	0.6786	0.9794	3.56	2.3158	0.341	0.9415	12.99
E	3.13	0.2421	0.6797	0.9442	7.43	2.2908	0.3189	0.9584	10.25
F	3.13	0.4003	0.5717	0.9557	5.08	2.4663	0.298	0.9215	14.43

Контрола

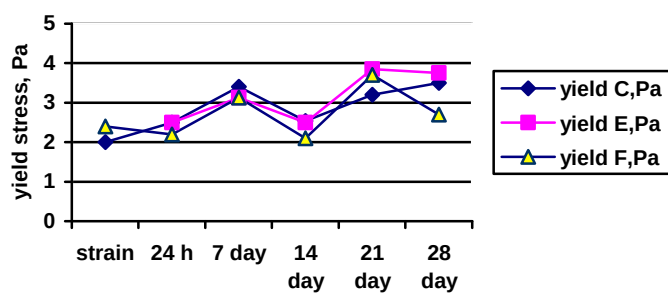
No	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %	$K, Pa.s^n$	$n, -$	R^2	Mean error, %
C	2.0	0.1375	0.6019	0.871	6.7	1.456	0.2644	0.8718	15.31
F	2.4	0.3258	0.5539	0.9566	4.67	1.9862	0.2827	0.9576	8.96



Фиг.17. Динамика на изменението на рН на изследваните проби по време на съхранението

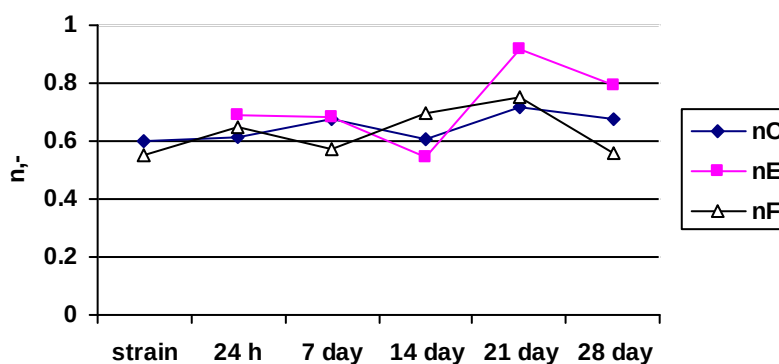


Фиг.18. Динамика на изменението на съдържанието на млечна киселина в изследваните проби по време на съхранението.

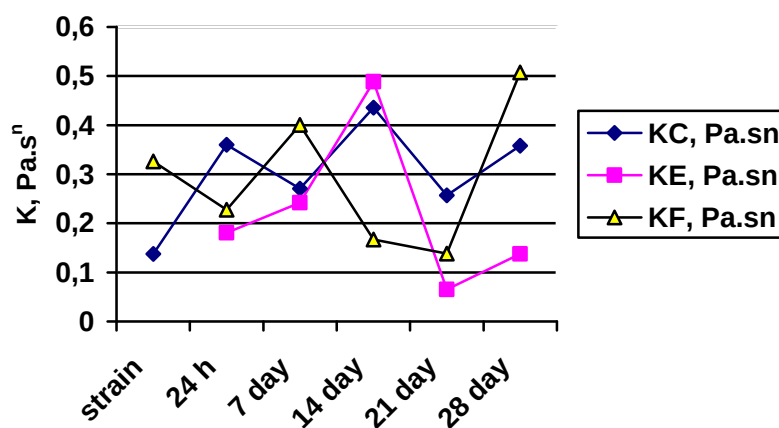


Фиг.19. Динамика на изменението на предела на течение на изследваните проби по време на съхранението

От сравнението на данните на фиг.10 и 18 се вижда, че динамиката на изменение предела на течение доста точно се корелира с промяната на броя микроорганизми по време на съхранението. Съществуващите различия могат да се обяснят с индиректното определяне предела на течението (чрез екстраполация и статистическа обработка), тъй като директното му експериментално определяне и досега представлява трудност.



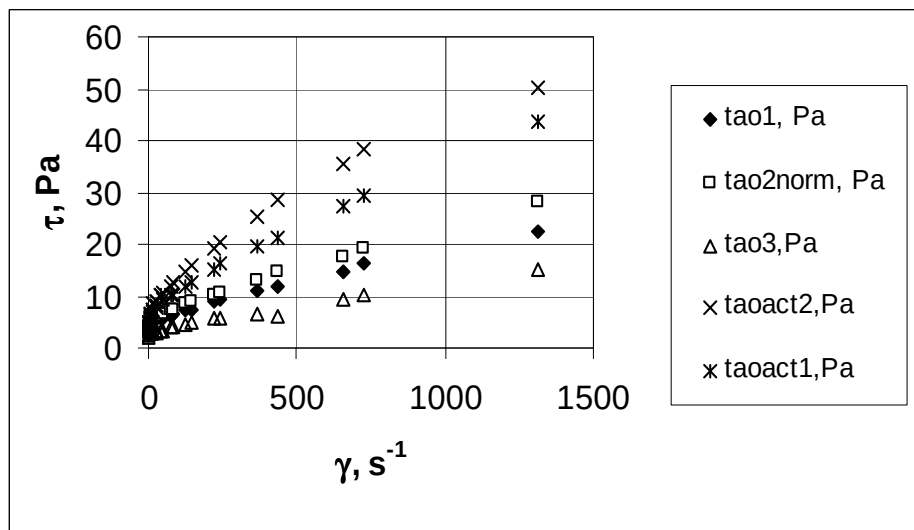
Фиг.20. Динамика на изменението на реологичния индекс на течение на изследваните проби по време на съхранението



Фиг.21. Динамика на изменението на индекса на консистентност на изследваните проби по време на съхранението.

На фиг. 20 и 21 е представена динамиката на изменение на индекса на консистентност K и на реологичния индекс на течение. Принципно, промяната им е в противоположни посоки – нараства консистентността, понижава се реологичният индекс на течение и обратното. Това е факт, наблюдаван при повечето хранителни продукти. Ходът на изменение на двата реологични параметъра е сходен при пробите, заквасени с Ls и St и контролата – с St . Доста различна е динамиката на изменение на реологичните параметри за пробите, заквасени с Lb и St . Това има своето обяснение в значително по-високото съдържание на Lb , водещи до по-висока киселинност, от една страна. Тя, както вече посочихме води до повишаване консистентността на продуктите. От друга страна, по-ниското относително съдържание на St действа в обратната посока. Това конкурентно влияние на двата параметъра, по всяка вероятност може да обясни различната динамика на реологичните параметри за млеката, ферментирани с тази закваска.

На фиг.22 са представени кривите на течение на нахомогенизирано мляко с дива закваска, домашно мляко с дива закваска, хомогенизирано мляко с индустриална закваска – контрола и закупени от търговската мрежа млека, обогатени с пробиотичен щам – Активия. Вижда се, че кривите на течение на обогатените на пробиотик млека са разположени най-високо, т.е. те показват най-висок привиден вискозитет или най-висока консистентност. Те са следвани от хомогенизираното мляко с индустриална закваска. Най-ниско са разположени кривите на течение на нехомогенизираното и домашното прясно мляко, заквасено с дива закваска. И при това сравнение се вижда, че добавката на пробиотичен щам към индустриалната закваска увеличава консистентността на млеката.



Фиг.22. Криви на течение на изследвани проби: tao1 – нехомогенизирано мляко с дива закваска; 2 – контрола – индустриална закваска, 3 – домашно мляко с дива закваска, act1 – activia1; act2 – activia2

В табл.13 са представени стойностите на реологичните параметри на пробите от фиг.22. Тук № 4 и 5 отговарят на двете пробиотични проби – Активия 1 и 2.

Таблица13. Реологични параметри на пробите от фиг.22 и грешка на модела

	τ_0, Pa	$K, Pa.s^n$	n	R^2	Mean error, %
1	3.85	0.1409	0.6975	0.7646	11.2
2	2.9	0.5425	0.5082	0.9409	7.78
3	2.0	0.3143	0.4522	0.8546	10.73
4*	4.2	0.4624	0.6052	0.9684	6.33
5*	3.8	0.3804	0.7053	0.917	10.26

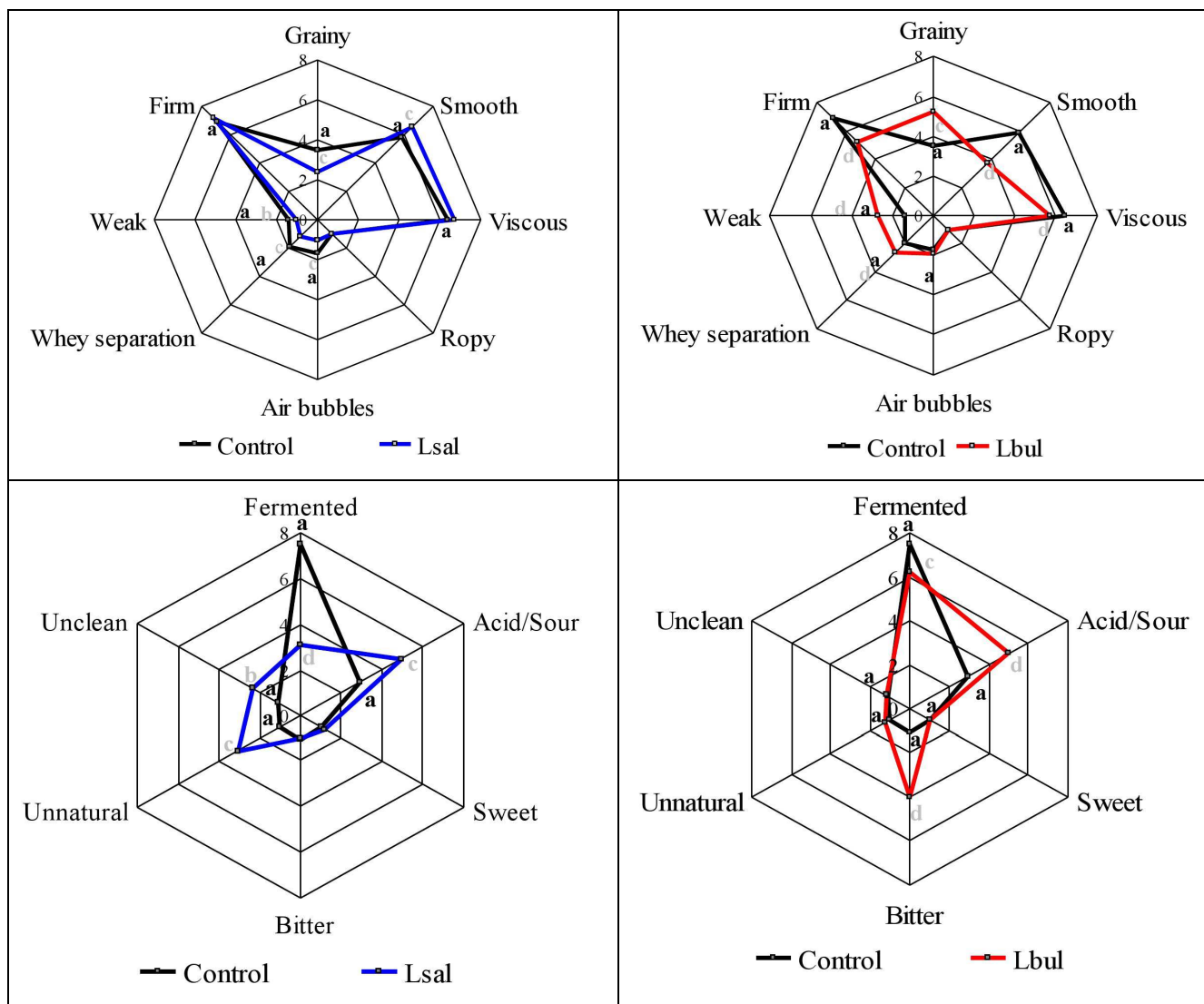
16. Сензорен анализ

Комбинацията от стартерна култура със специфични бактерии е доказан подход за развитие на нови пробиотични млечни продукти. Това, обаче, предполага оценка на влиянието на различните пробиотични щамове върху сензорните характеристики на продукта, в който са включени. Затова бяха проведени експерименти за оценка възможността за използване на различни *Lactobacillus* щамове като пробиотична добавка към българско кисело мляко и тяхното влияние върху сензорните характеристики на млеката. Сензорната оценка беше проведена на 21-ия ден след заквасяването, защото се предполага, че към края на този период допълнителните щамове биха имали най-силно влияние върху сензорните характеристики на киселите млека.

Резултатите от сензорния анализ на така получените ферментирани млека са обобщени на фиг.23А (профил по вид и текстура) и В (профил по аромат и вкус). От фигурата се вижда, че, най-общо влиянието на избраните допълнителни щамове върху вида и текстурата на млеката е сходно с контролата за случая на млека, обогатени с *L. salivarius* LS като пробиотична добавка.. Следователно, в този аспект използването на допълнителни щамове като пробиотични добавки към българско кисело мляко оказва положително влияние върху вида и текстурата на крайните ферментирани млека.

Подобряване структурата на йогуртите след добавяне на пробиотични лактобацили е описано и за случаите на други пробиотични млека [84]. Установено е, че влиянието на щам *L. bulgaricus* 4 върху вида и структурата на млеката се различава от вече описаните – някои от панелистите оценяват ферментирания с него продукт като имащ по-слаб коагулум, зърниста структура и отделяне на серум върху повърхността на киселото мляко. Зърнистата текстура е характеристика, наблюдавана, макар и в по-малка

степен, в някои търговски марки български кисели млека. Обикновено това се оценява като нежелателна характеристика на търговските продукти. Причина за това нежелателно свойство може да бъде твърде бързото развитие на киселинността по време на ферментацията или неподходящо разбъркване на стартерната култура [85]. Обикновено *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* се представя като типична стартерна култура на киселите млека. Този щам притежава висока протеолитична активност и е основна причина за ацидификацията на млякото по време на ферментацията. Стандартният стартер за индустриално производство на българско кисело мляко е смес от *S. thermophilus* и *L. bulgaricus* в съотношение 1:1 [86]. Добавянето на допълнително високо съдържание от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в инокулума може да наруши това съотношение, като това, от своя страна, оказва влияние върху крайния вид и структура на ферментираня с такава закваска продукт. Това се вижда и от разликите в реологичното му поведение. Значителна разлика се бележи с малка буква а – контрола, b ($p < 0.05$), c ($p < 0.01$) и d ($p < 0.001$).



Фиг.23. Сензорен профил на експериментални кисели млека с добавка на различни лактобацили като пробиотична добавъчна култура на 21 ден от съхранението. Нива на вариране между 1 (не се отчита) и 10 (изключително силно): А) Профил по външен вид и текстура; В) Профил по аромат и вкус.

Легенда: Контрола (мляко с комерсиална стартерна култура- *Str. thermophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и експериментални варианти, приготвени със стартерна култура и с добавка на нестартерни лактобацили, както следва: ; *L. salivarius* LS (Lsal); and *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* 4 (Lbul).

Значителна разлика се бележи с малка буква а – контрола, b ($p < 0.05$), c ($p < 0.01$) и d ($p < 0.001$).

Установено е, че никой от изследваните продукти няма влачеща се структура. Това свойство обикновено се свързва с бактериите, произвеждащи екзополisahариди. Ароматът и вкусът са други важни характеристики за възприемането от потребителите на млечнокиселите продукти, съдържащи пробиотици. Ароматът на йогуртите зависи от присъствието на млечна киселина и други ароматни съединения, като ацеталдехид, ацетон, ацетоноин, диацетил и др., продуцирани от щамове по време на ферментацията [89].. По-високата киселинност е основен проблем на ферментирани млека. Основна причина за нея са високите нива на инокулума, което определя по-интензивната ферментация и развитие на киселинността [90]. Същият ефект на повишена киселинност е отчетен при *L. salivarius* LS и *L. bulgaricus* 4. Пробата с добавка *Lactobacillus bulgaricus* имаше характерния аромат за киселото мляко, но имаше леко горчив вкус. Това се дължи на синтезираните от протеолитичната активност на *Lactobacillus bulgaricus* горчиви пептиди или ферментация при ниска температура [91].

. Други изследователи описват ферментирани само с *L. salivarius* LS млека като неприемливи за потребителите. Включването им, обаче като пробиотични добавки към стандартна закваска не е установено да води до неприемливи за потребителите промени в сензорните свойства на крайния продукт [92,93].

. Развитието на допълнителен несвойствен аромат при използване на *L. salivarius* LS го прави неподходящ за добавка към типичното българско кисело мляко. Това, обаче не изключва използването му като пробиотични добавки в други ферментирани млечни продукти. Установено е, също, че *L.*

bulgaricus 4 може да се използва като стартерна култура за производство на натурални кисели млека.

Характеризирането на оригинални български щамове като пробиотици може да послужи за създаването на нови здравословни продукти, които да разнообразят българския пазар.

3. Изводи от дисертационния труд

1. Проведен е критичен анализ на състоянието на българската и румънската млечна промишленост при влизането им в ЕС, като е наблегнато на необходимостта от промени на някои параметри на млечните продукти във връзка с европейските изисквания.
2. Анализирани са параметрите на млечнокисели продукти от водещи български фирми по време и след изтичане срока на годност.
3. Установено е, че реологичното поведение на киселите млека е основен параметър при описание на техните физикохимични свойства. Той за сега не фигурира в стандартите за охарактеризиране на млеката. Препоръчва се да бъде включен в тях.
4. Всички изследвани киселомлечни продукти проявяват ненютоново поведение и могат да бъдат описани с най-голяма точност – грешка под 8 % с реологичния модел на Хершел-Бълкли.
5. Върху параметрите на реологичния модел оказват влияние маслеността на млеката (най-изявено – върху предела на течение), рН на пробите и вида на закваската.
6. Проведени са лабораторни експерименти по заквасяване на млека с различни промишлени, домашни и пробиотични щамове. Установено е, че върху реологичните параметри на така заквасените млека най-силно влияние оказва хомогенизацията на млякото, както и вида на закваската.
7. Нехомогенизираното мляко дава ферментирани продукти с най-ниска консистентност.
8. Добавката на пробиотичен щам към индустриалната закваска увеличава консистентността на млеката.

9. Проведен е сензорен анализ на различни видове киселомлечни продукти. От проведената оценка на сензорните свойства на изследваните щамове може да се заключи, че най-добро възприемане от потребителите по отношение външния вид, вкуса и аромата се постигат при използване като пробиотичен щам на *L. plantarum* RL.
10. Развитието на допълнителен несвойствен аромат при използване на *L. salivarius* LS го прави неподходящ за добавка към типичното българско кисело мляко. Това, обаче не изключва използването им като пробиотични добавки в други ферментирани млечни продукти. Установено е, също, че *L. bulgaricus* 4 може да се използва като стартерна култура за производство на натурални кисели млека.
11. Характеризирането на оригинални български щамове като пробиотици може да послужи за създаването на нови здравословни продукти, които да разнообразят българския пазар.
12. Проведен е двуседмичен мониторинг на промишлен процес за производство на кисели млека и е установено влиянието на параметрите на предпроцеса върху крайните качества на киселомлечните продукти.
13. Изследвано е влиянието на времето на съхранение на киселите млека върху техните физикохимични и микробиологични параметри. Изследвани са броят микроорганизми, киселинността, съдържанието на млечна киселина, плътността на гела и реологичните отнасяния на продуктите.
14. Установено е, че до 28ия ден на съхранение се повишава киселинността на млеката, заедно с това и плътността на гела и консистенцията на продуктите.

4. Приноси

1. Проведен е критичен икономически анализ на състоянието на българската и румънската млечна промишленост преди и след приемането им в ЕС и се анализирани параметрите, оказващи основно влияние върху потребителските качества на млечните продукти.
2. Предложен е практически пример за приложението на системата за анализ и оценка на контролно-критичните точки в млечната промишленост.
3. Проведен е промишлен мониторинг във водещо предприятие от млечната индустрия за оценка влиянието на работните параметри на предпроцеса върху крайните качества на киселите млека.
4. Проведена е експериментална оценка на свойствата на българските кисели млека, продавани в магазинната мрежа преди и след изтичане на срока им на годност, като освен параметрите, обикновено оценявани в промишлената практика, е проведено и реологично изследване на продуктите.
5. Проведени са експерименти по заквасяване на домашно, хомогенизирано и възстановено мляко с промишлена закваска, дива закваска и закваски със съдържание на пробиотични щамове и щамове, произвеждащи екзополизахаради.
6. На получените млека са изследвани физико-химичните и микробиологични показатели, реологичните отнасяния и влиянието на времето на съхранение върху същите показатели. Проведен е сензорен анализ на така посочените продукти.
7. Получените данни обхващат широк периметър от млечнокисели продукти и могат да намерят приложение в практиката.
8. Препоръчва се реологичните отнасяния да бъдат включени в БДС за охарактеризиране качествата на българските кисели млека.

5. ПУБЛИКАЦИИ по дисертацията:

1. М.Кършева, В.Пасков, И.Пенчев, Въвеждане на НАССР в българската и румънската млекопреработвателна промишленост, Стандартизация, метрология, сертификация, юни 2007, № 6, 8 – 12.

2.М.Кършева, В.Пасков, И.Пенчев, Молочную индустрию ждут перемены, Переработка молока, № 5, (115), 2009, 60-61.

3.Vl.Paskov, M.Karsheva, I.Pentchev, Effect of starter culture and homogenization on the rheological properties of yoghurts, J.of the UCTM, v.45, 1 (2010), 59-66.

4. М.Кършева, Вл.Пасков, З.Уршев, К.Пашова-Балтова, И.Пенчев, Реологично поведение на кисели млека, заквасени със стартерни култури от колекцията на ЕЛБИ "Булгарикум", Докладвана на Научна конференция с международно участие, "Хранителна наука, техника и технологии 2011", Пловдив, 14-15 октомври 2011, публикувана в пълен текст под ред. на проф. К.Василев, т. LVIII, св.1, 49-54.