

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“



SOFIA UNIVERSITY
ST. KLIMENT OHRIDSKI

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

FACULTY OF BIOLOGY



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ“

РАМИЗЕ ХОДЖА

ФУНКЦИОНАЛНИ И ТЕХНОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА
НОВОИЗОЛИРАНИ ЦАМОВЕ МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ
ТРАДИЦИОННИ ХРАНИ

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
В ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ
5.11. Биотехнологии
ДП ТЕХНОЛОГИЯ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИТЕ ВЕЩЕСТВА

Научен ръководител: доц. д-р Диляна Николова

София
2024 година

БЛАГОДАРНОСТИ

*Настоящия дисертационен труд е разработен в катедра „Биотехнология“,
Биологически Факултет,
Софийски Университет „Св. Климент Охридски“.*

*Бих искала да изкажа искрени благодарности
на научния ми ръководител доц. д-р Диляна Николова,
за професионализма, ясните и целенасочени напътствия,
както и за търпението, неоценимата подкрепа през целия период на работа и за
огромната помощ при разработването на дисертационния труд.*

*Изказвам благодарност и към доц. д-р Яна Евстатиева
за подкрепата, компетентата помощ, научните консултации
и за топлото отношение.*

*Благодаря и на целия екип на катедра “Биотехнология”
на БФ при СУ “Св. Климент Охридски”
за приемането, съдействието и насърчаването.*

*Благодаря на колегите от лаборатория Вирусология и катедра Биохимия на БФ,
от Център по ЯМР Спектроскопия към ИОХЦФ -БАН, с чиято помощ и
сътрудничество са реализирани части от изследванията, както и на всички
колеги, които подкрепиха разработването на дисертационния ми труд.*

*Специални благодарности за семейството ми за неоценимата подкрепа,
кураж и мотивация.*

Дисертационният труд съдържа общо 143 страници на формат А4, 21 таблици и 27 фигури от които 18 таблици и 22 фигури са в Резултати и Обсъждания.

В литературната справка са включени 323 литературни източника, от които 4 са на български език и 319 на английски език.

Изследвателската работа по дисертационния труд е финансирана чрез:

1. Проект „Функционални характеристики на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии от традиционни храни“, договора:80-10-143/23.04.2020 г.
2. Проект „Изолиране на нови щамове млечнокисели бактерии от традиционни храни и оценка на антагонистично им действие срещу нежелани и патогенни микроорганизми.“, договор № 80-10-3/ 09.04.2019 г.
3. Национална научна програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“ 2018-2023 г. , одобрена с Решение на МС № 577/17.08.2018 г.

Дисертационният труд е насрочен за защита със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ и защитта ще се проведе на г. от ч. пред Научно жури в състав:

1.;
2.;
3.;
4.;
5.

СЪКРАЩЕНИЯ

МКБ – млечнокисели бактерии
GRAS – Общопризнати като безопасни
QPS – Квалифицирана презумпция за безопасност
FDA – Агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ
EFSA – Европейският орган за безопасност на храните
ГИТ – гастроинтестинален тракт
SM – 10%-но стерилно обезмаслено мляко
MRS – среда на De Man, Rogosa & Sharpe
КДА - картофено-декстрозен агар
МЕА - Малц екстракт – агар
ВНІ – среда инфузия на мозъка и сърцето (Brain Heart Infusion)
PBS - фосфатно буфериран физиологичен разтвор
BSA - говежди серумен албумин
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
PCR – полимеразна верижна реакция
МАР – мултиантибиотична резистентност
NCBI – Национален център за биотехнологична информация (The National Center for Biotechnology Information)
CLSI – Институт по клинични лабораторни стандарти (Clinical Laboratory Standard Institute)
БДС - български държавен стандарт
CFS – безклетъчна супернатанта
NCFS – неутрализирана безклетъчна супернатанта
HHV – човешки херпес вирус
МТК – максималната толерантна концентрация
MDBK – клетъчна линия Madin–Darby bovine kidney
МОІ – множествена инфекция
СС – цитотоксична концентрация
ЕС (ІС) – ефективна концентрация
SI – селективен индекс
VC – вирусна суспензия
OD – оптична плътност
SD – стандартно отклонение
РІІ – редокс потенциал
TK – титруема киселиност
WHC – капацитет за задържане на вода (water holding capacity)
ЯМР – ядрено магнитен резонанс или NMR – nuclear magnetic resonance
OPLS-DA – ортогонален дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати

ЕДИНИЦИ:

CFU/ml or CFU/g – Colony forming unit per milliliter (ml) or gram (g); колония образуващи единици за ml или g
mV – millivolt
cP – центипоаз ($1\text{cP} = 1\text{ mPa} \cdot \text{S}$)

УВОД

Традиционните храни са от голямо значение за потребителите. Тези храни привличат също вниманието на изследователите, тъй като са богат източник на хранителни вещества и тяхната микробиота, представлява интерес за научните изследвания. Изучаването на техните характеристики и постигането на производство на продукти с подобни характеристики е основно предизвикателство в днешно време, особено при храни с ползи за здравето.

Ферментиралите храни се считат за храни с ползи за здравето основно поради наличието на млечнокисели бактерии (МКБ). МКБ са обещаващи източници за разработване на нови продукти, особено такива, които могат да отговорят на нарастващите нужди на потребителите от естествени продукти и функционални храни. Органите на FDA и EFSA са им дали статут, посочен като GRAS (Общопризнати като безопасни) и QPS (Квалифицирана презумпция за безопасност). МКБ имат широк спектър от местообитания, включващи растения, плодове, млечни и месни среди, сокове, ферментирани напитки, зърнени култури и зърнени продукти. Използването на МКБ при приготвянето на различни групи ферментирани храни датира от дълбока древност. В днешно време тези микроорганизми се използват в млечната промишленост, като стартерни култури при производството на различни млечни продукти, но също така участват в процесите на ферментация, протичащи при консервиране на плодове и зеленчуци, производство на хляб, месо, алкохолни напитки, силажирането на фуражи и други продукти. Те се прилагат като стартерни култури при ферментирани храни и напитки, тъй допринасят за контролиране на процесите на ферментация, подобряване на хранителните, органолептичните, технологичните характеристики и срока на годност. В следствие на ферментативната активност на МКБ се придават допълнителни вкусови и ароматни качества на ферментиралите продукти и се продуцират биологично активни вещества с антимикробни свойства (млечна киселина, оцетна киселина, бактериоцини и др.), допринасящи при консервирането на храните.

С развитието на технологиите широка гама от щамове от семействата *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae* и *Streptococcaceae* намират разнообразни приложения, както в производството на ферментирани храни, така и като пробиотици с установени характеристики и доказана безопасност. За да могат новоизолираните щамове МКБ да бъдат включени в стартерни култури и/или пробиотични продукти и да станат търговски достъпни, те трябва да бъдат проучени по отношение на спектър от функционални характеристики, ползи за здравето, безопасност и технологични характеристики. Изборът на щамове трябва да премине през стъпката на правилна идентификация, да продължи със следващите стъпки на изследване, свързани както с осигуряване на характеристиките на продукта, като аромат, вкус, текстура, така и със здравни ползи за потребителите. Щамовете, използвани в хранителните технологии и в различни видове препарати трябва да се адаптират към среда, в която се внасят и да могат преживяват и да запазват своята активност при различни условия. Около 70% от имунната система при човека е свързаната с чревната лимфоидна тъкан на гастроинтестиналния тракт (ГИТ). Специфични щамове с пробиотични свойства, внесени като компонент на функционални храни или под формата на добавки и препарати, могат да повлияят на широк спектър от имунни функции и могат да бъдат ефективно използвани за оптимизиране на човешкото здраве.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

През последните три десетилетия е постигнат огромен изследователски напредък в проучванията на млечнокиселите бактерии и техния спектър от функционални и пробиотични характеристики. Разработени са и са въведени в практиката голямо разнообразие от продукти, включващи пробиотични бактерии от тази група. Въпреки тези постижения интересът към изследване на млечнокиселите бактерии продължава да нараства, като се изолират и характеризират нови щамове от разнообразни източници и се разработват нови функционални продукти със здравни ползи за потребителите.

Целта на настоящата дисертационна работа е свързана с:

Изолиране на нови щамове млечнокисели бактерии от микробиотата на традиционно подготвени млечни, месни и спонтанно ферментирани продукти и проучването на техните функционални и технологични свойства за приложение в нови хранителни продукти с подобрени функционални характеристики и здравословни ефекти.

За постигането на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Изолиране на нови щамове МКБ от микробиотата на традиционни ферментирани хранителни продукти:

- *Събиране на проби от ферментирани продукти, приготвени по традиционна технология и изолиране на нови щамове МКБ;*
- *Определяне на фенотипни и биохимични характеристики на получените изолати;*
- *Идентификация на новоизолираните щамове.*

2. Изследване на функционални и пробиотични свойства на новоизолираните щамове МКБ:

- *Изследване на антимикробна активност срещу тест-патогенни бактерии и дрожди, и срещу хранително асоциирани плесенни и дрождеви контаминанти;*
- *Скрининг за антивирусна активност на новоизолираните щамове;*
- *Определяне на ензимния профил на изследваните щамове;*
- *Оценка за антибиотична резистентност при изследваните щамове;*
- *Изследване на автоагрегационен, коагрегационен потенциал, хидрофобност и адхезивни способности на новоизолираните щамове;*
- *Определяне способността на новоизолираните щамове да преживяват в условия, симулиращи различни отдели на ГИТ.*

3. Определяне на основни технологични характеристики на изследваните щамове:

- *Определяне на обща киселинообразуваща способност;*
- *Оценка за устойчивост при технологичен процес на лиофилизация и подбор на подходящи протекторни среди.*

4. Включване на избрани щамове от новите изолати в моделен продукт и определяне на основни характеристики на продукта:

- *Избор на щамове и получаване на моделен продукт;*
- *Изследване на основни физикохимични характеристики и метаболитен профил на получените млечнокисели продукти по време на процеса на ферментация и за период на съхранение;*
- *Оценка на жизнеспособността на включените в продукт щамове за период на съхранение и на техния биопротективен потенциал чрез кокултивиране с хранително асоциирани патогени;*
- *Оценка и анализ на сензорни характеристики на моделните продукти с включени избрани щамове.*

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Тест-микроорганизми

Escherichia coli ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Candida albicans* ATCC 18204, *Aspergillus niger* A3, *Aspergillus flavus* NBIMCC 916, *Fusarium proliferatum* BT 140, *Penicillium claviforme* BT 136, *Kluyveromyces lactis* 1470, *Kluyveromyces marxianus* var t3 и *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 537.

2. Хранителни среди и разтвори

Среди: MRS – бульон, MRS – агар (среда на De Man, Rogosa & Sharpe) (Merck; Oxoid); 10% стерилно обезмаслено мляко (SM) (HiMedia); Картофено-декстрозен агар (КДА) (Oxoid); Малц екстракт – бульон, Малц екстракт – агар (МЕА) (Oxoid); Mueller-Hinton агар (Sigma-Aldrich); ВНІ агар (Sigma-Aldrich); HiCrome *E. coli* агар (HiMedia). Използвани са готови сухи/гранулирани хранителни среди, приготвени съгласно указанията на производителя; *Разтвори*: Физиологичен разтвор (ФР); PBS - фосфатно буфериран физиологичен разтвор.

3. Изолиране, култивиране и съхранение на микроорганизмите

Изолиране на чисти култури млечнокисели бактерии; *Култивиране на получените изолати* - на течни хранителни среди MRS-бульон и SM или на твърда среда MRS-агар при подходящ за всеки изолат температурен режим. *Съхранение на получените изолати* - в замразено състояние при -80 °C и в лиофилизирана форма.

4. Физиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи

Оцветяване по грам; *Определяне на каталазна активност*; *Определяне на оксидазна активност*; *Определяне на пероксидазна активност*; *Определяне на коагулираща способност*; *Определяне на биохимичен профил* - със системата API 50CHL (bioMérieux);

Изолиране на геномна ДНК - с кит Zymo Research Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit; *Секвенционен анализ на гена за 16S rDNA* - амплификация с универсални праймери 27F и 1492R, секвениране на PCR продуктите от MacroGen Inc., Холандия. Генерираните последователности са анализирани чрез BLASTN в базата данни на NCBI;

Определяне на ензимния профил на изследваните щамове - с тест кит API ZYM Kit (bioMérieux); *Скрининг за генетични детерминанти за пептидази* - PCR анализ с праймери за гени за пептидази perO, perN, perQ, perR, perT, perX и визуализация чрез 1% агарозна гел електрофореза.

5. Определяне на профила за антибиотична резистентност при изследваните щамове

Тест за чувствителност към антибиотици - дисков дифузионен метод на Kirby – Bauer, данните са интерпретирани съгласно CLSI 2020; *Скрининг за гени за антибиотична резистентност* - PCR анализ с 28 двойки специфични праймери за 12 различни антибиотика и визуализация чрез 1% агарозна гел електрофореза.

6. Определяне на автоагрегация и коагрегационни свойства и хидрофобност – измерване на оптична плътност (OD).

7. **Определяне на способност за адхезия към муцин при *in vitro* условия** – определяне на CFU/ml адхезирали клетки.

8. **Определяне *in vitro* способността на изследваните щамове да преживяват в условия, симулиращи различни отдели на ГИТ**

In vitro оценка на способността за растеж на изследваните щамове при симулирани условия на различни отдели на ГИТ- при pH2 и пепсин, панкреатични ензими и различни концентрации на жлъчни соли. Изчислен е коефициент на инхибиране (C_{inh}), като $C_{inh} \leq 0,40$ се счита за значим критерий за определяне на изследваните щамове като потенциални пробиотични кандидати; *Определяне на преживяемост на изолирани щамове при pH 2 и пепсин и при 0,3% жлъчни соли* – CFU/ml, изчислен е процентът на преживяемост на бактериите.

9. **Определяне на антимикробна активност**

Антибактериална активност - използвани са пет тест-патогена *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*; *Антимикробна активност срещу дрождев тест-патоген C. albicans*; *Антагонистична активност срещу хранително асоциирани плесенни контаминанти* - метод на директния антагонизъм срещу *A.niger*, *A.flavus*, *F. proliferatum* и *P. claviforme*; *Антагонистична активност срещу хранително асоциирани дрождеви контаминанти* – *K. lactis*, *K. marxianus* и *S. cerevisiae*, определен е процентът на инхибиране на растежа.

10. **Изследване за антивирусна активност**

Подготовка на безклетъчна супернатанта (CFS); *Тест за цитотоксичност* - колориметричен МТТ анализ. CC_{50} се изчислява чрез регресионен анализ на построените доза-зависими криви; *Антивирусна активност* - срещу вирусните модели на човешки херпесни вируси HHV-1 и HHV-2 по МТТ-базиран колориметричен анализ за откриване на инхибиране на HHV репликация. EC_{50} се изчислява чрез регресионен анализ на кривите доза-отговор, генерирани от данните. Селективният индекс (SI) се изчислява като: CC_{50}/EC_{50} ; *Вируцидна активност* - чрез директен контактен анализ.

11. **Методи за определяне на основни технологични характеристики на изследваните щамове**

Определяне на обща титруема киселинност; *Процеси на лиофилизация* – при два вида протекторните среди, преди, след лиофилизация и след съхраняване на проби при 4°C на 3^{-ти} месец и на 6^{-ти} месец се определя CFU/ml.

12. **Получаване на моделни продукти кисело мляко с подобрени щамове**

Моделни продукти кисело мляко – един контролен вариант и три експериментални варианта. Пробите са съхранявани при 4°C и анализирани на 0, 7, 14, 21 и 28 ден.

Таблица IV.2. Варианти на приготвени проби кисело мляко.

Варианти кисело мляко	Стартерна култура (LB Bulgaricum))	Концентрация, %	
		<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KZM 2-11-3	<i>L. plantarum</i> KC 5-12
1	1	-	-
2	0.1	5	-
3	0.1	-	5
4	0.1	2.5	2.5

13. Определяне на основни физикохимични и органолептични характеристики на приготвените моделни продукти кисело мляко

Определяне на рН, редокс потенциал и титруема киселинност; Определяне на капацитет за задържане на вода (WNC) и синерезис; Определяне на вискозитет; Сензорен анализ - 15 доброволци, по седем сензорни показателя, които са сравнени с БДС 12:2010. Условиата за провеждане на сензорния анализ са в съответствие с БДС 15612:1983;

Определяне на общ брой млечнокисели бактерии в продукт за период на съхранение - CFU/g; Определяне на преживяемост на тест-патоген E.coli при кокултивиране с изследвани щамове в модел на продукт - CFU/ml с HiCrome E. coli Agar (HiMedia) селективна среда за E. Coli, преди, след ферментация и на 5^{ти} ден.

14. ЯМР спектроскопски анализи на получените моделни продукти кисело мляко

Анализите са проведени в Център по ЯМР Спектроскопия към ИОХЦФ на 600,18 MHz Bruker Avance NEO спектрометър. Количествените NMR данните са обработени статистически чрез ортогонален дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати (OPLS-DA) за разграничаване между четирите вида проби кисело мляко.

Всички анализите са проведени в трикратни повторения и резултатите са представени като средни стойности \pm SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на пробите кисело мляко и за периода на съхранение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране на нови щамове МКБ от микробиотата на традиционни ферментирани хранителни продукти

1.1. Събиране на проби от ферментирани продукти, приготвени по традиционна технология и изолиране на нови щамове МКБ

Функционалните ферментирани храни, освен че предоставят ценни хранителни компоненти проявяват и полезни за потребителите свойства (del Castillo et al., 2018). Тъй като ферментиралите храни се получават с участието на микроорганизми, основно от групата на млечнокиселите бактерии, съществува силно изразен и траен интерес за изследване на тези бактерии. В основата на тези изследвания е включено изучаване на разнообразието на микробиотата в хранителните продукти, изолиране на нови щамове, определяне на техните характеристики и на техните полезни свойства. Изследванията показват, че млечнокиселите бактерии не само проявяват полезни свойства за потребителите, но и осигуряват промени в крайните продукти, водещи до повишаване на тяхното качество (Colombo et al., 2018; Darkevicius, 2022).

Ферментиралите храни се произвеждат и консумират от хората от хилядолетия, в резултат на което се е формирало огромно разнообразие от такива продукти с характерни регионални и културни специфики. В значима степен микробиотата на традиционните ферментирани храни се определя от географските и екологичните особености на конкретните региони и от запазените традиции при тяхното получаване.

При съвременната индустриализация и при нарастващите изисквания към производствата на ферментирани храни, основните продукти от такъв тип се приготвят с добре проучени и стандартизирани стартерни култури в промишлени условия. Събирането на проби, приготвени изцяло по традиционни методи, в домашни условия и без използване на индустриални стартерни култури е все по-затруднено. Много рядко се намират производители, които могат да потвърдят произхода на домашните си закваски. Домашни закваски с доказан произход и продължителност на приложение са ценен източник на щамове млечнокисели бактерии, които са характерни за местната екосистема и имат интересни и полезни функционални характеристики при ферментиралите храни.

За целите на настоящата изследователска работа са подбрани различни типове традиционни ферментирани храни от регион Гора, Албания. Регион Гора в Албания се определя като планински, с екстензивно земеделие и отлично запазени традиции за приготвяне на разнообразни ферментирани храни. Както е описано и в раздел Литературен обзор, богатото разнообразие от традиционни ферментирани храни за този регион е отлична база за подбор на разнообразни продукти, от микробиотата, на които да се изолират нови щамове млечнокисели бактерии.

Проби от продуктите, които са подбрани в настоящата изследователска работа включват традиционно приготвени: краве кисело мляко, козе кисело мляко, краве сирене, козе сирене, овчи кашкавал, местен суджук и спонтанно ферментирани плодове. За всички подбрани продукти е проучена традиционната технология за тяхното получаване и е установено, че не са използвани комерсиални стартерни култури:

- ✓ Проба от краве кисело мляко – от домашно приготвено кисело мляко по традиционен метод, съхранен и предаван в семейството на производител от село Орешек, регион Гора. Изполваната закваска е поддържана в домашни условия,

като сведенията за нейното съхранение и приложение са от две поколения. Според семейната традиция на производителя, в миналото закваската се е получавала при използване на лескови клонки с обелена кора, които са се внасяли в предварително загрято и темперирано до около 60 °C прясно мляко. Така полученият ферментирал продукт се е използвал за приготвяне в следващ цикъл и след 3 до 4 последователни процеса на презаквасване полученото кисело мляко се е считало за годно за консумация.

- ✓ Проба от козе кисело мляко – приготвено в домашни условия по традиционна технология, подобна на описната в т. 1, от производител от село Пакиша, регион Гора.
- ✓ Проба от козе сирене – козе сирене, приготвено в домашни условия по традиционна технология с използването само на сирищна мая (сирищен ензим) от производител от село Пакиша, регион Гора. При производството на този тип продукти местното население е имало традиция да се използва сирищен материал от стомаха на млади животни, но в днешно време се използва сирищна мая – търговски продукт. Ценността на тези проби се състои в естествената микрофлора, която попада в продуктите, както с изходните суровини, така и по време на процесите на зреене.
- ✓ Проба от краве сирене – приготвено по традиционна домашна технология от производител от село Шищеец, регион Гора.
- ✓ Проба от кашкавал от овче мляко - приготвен по традиционна домашна технология от производител от село Шищеец, регион Гора.
- ✓ Проба от Шищеечки суджук – традиционен месен продукт, който местното население произвежда от смляно говеждо месо с добавки от растителни подправки и напълнено в предварително подготвени животински черва. Продуктът е приготвен по традиционна технология от производител в село Шищеец, регион Гора. Този тип продукт се суши при естествени условия и във вътрешността на месната маса протичат спонтанни ферментационни процеси с участие на постъпилите с изходните суровини микроорганизми.
- ✓ Проба от ферментирал плодов продукт - ферментирали круши, приготвени в домашни условия от производител от село Орешек, регион Гора. Продуктът се произвежда традиционно от местното население и е получен в резултат от спонтанен ферментационен процес на плодовете във водна среда и без достъп на кислород. При тези условия с участието на микрофлората, най-вече от самите плодове, протича процес на ферментация и този продукт е интересен източник за изолиране на млечнокисели бактерии.

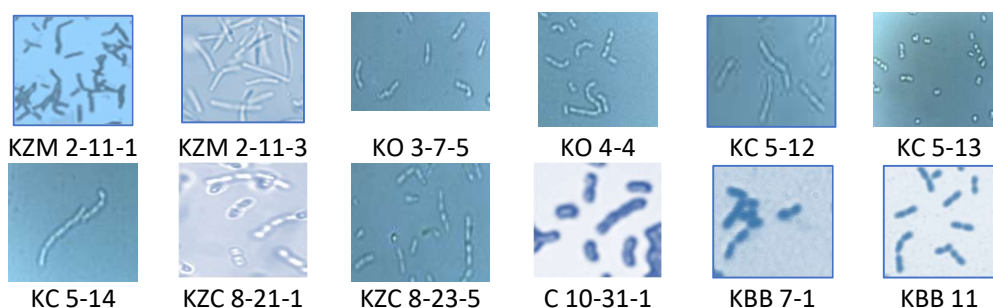
Първоначално от избраните продукти са получени набогатени култури, от които са приготвени десетократни разреждания и посев до единични колонии. Подбрани са единични колонии с характерна морфология, от които са изолирани 12 чисти култури. Те са обозначени с наименования: KZM 2-11-1, KZM 2-11-3, КО 3-7-5, КО 4-4, КС 5-12, КС 5-13, КС 5-14, KZC 8-21-1, KZC 8-23-5, С 10-31-3, КВВ 7-1, КВВ 11. Всички изолати се развиват добре в среда MRS, при термофилен или мезофилен температурен режим (Таблица V.1). От пробата краве кисело мляко не са изолирани чисти култури при избраните експериментални условия.

1.2. Определяне на фенотипни и биохимични характеристики на получените изолати

За доказване на принадлежността на новите изолати към групата на млечнокиселите бактерии са проведени серия от анализи за определяне на основни морфологични и физиолого-биохимични характеристики. За определяне на тези основни характеристики са приготвени свежи микроскопски препарати, трайни микроскопски препарати с оцветяване по Грам, тестове за определяне на оксидазна, каталазна и пероксидазна активност и за коагулация. От новоизолираните щамове 11 се характеризират с пръчковидна клетъчна морфология, а един КС 5-13 е със сферична форма на клетките по двойки. Двата щама KZM 2-11-1 и KZM 2-11-3 са характеризирани като дълги пръчки, щамове КС 5-12 и КС5-14 са средно дълги пръчки, КО 3-7-5, КО 4-4, KZC 8-21-1 и KZC 8-23-5 са къси пръчки, а щамове С 10-31-1, КВВ 7-1 и КВВ 11 се характеризират като много къси пръчки (Фигура V.1).

Таблица V.1. Новоизолирани чисти култури и техния произход от традиционно приготвени продукти

Новоизолирани чисти култури	Температурен режим на култивиране	Произход
KZM 2-11-1	41°C	Козе кисело мляко
KZM 2-11-3	41°C	Козе кисело мляко
КО 3-7-5	41°C	Овчи кашкавал
КО 4-4	30°C	Овчи кашкавал
КС 5-12	41°C	Краве сирене
КС 5-13	41°C	Краве сирене
КС 5-14	30°C	Краве сирене
KZC 8-21-1	37°C	Козе сирене
KZC 8-23-5	30°C	Козе сирене
С 10-31-3	30°C	Суджук
КВВ 7-1	30°C	Спонтанно ферментирали плодове
КВВ 11	30°C	Спонтанно ферментирали плодове



Фигура V.1. Морфология на новоизолираните щамове

Получените резултати за оцветяване по Грам, скринингов тест за оксидазна, каталазна и пероксидазна активност и коагулираща способност на новоизолираните щамове са представени в таблица V.2. Всички щамове са грам-положителни, каталазо- и оксидазо-отрицателни, което съответства за принадлежност към групата на млечнокиселите бактерии. Пероксидазна активност е установена при два щама KZM 2-11-1 и KZM 2-11-3, само при култивиране в среда SM. Коагулиращата способност на новоизолираните щамове е определена в среда SM, като коагулация се наблюдава до 16-ия час от инкубацията при 11

от новоизолираните щамове, но при щам С 10-31-1 не се наблюдава коагулация, дори след 24 часа.

Таблица V.2. Характеристиките на новоизолираните щамове

Щамове	Клетъчна морфология	Оцветяване по Грам	Каталаза	Оксидаза	Пероксидаза		Коагулация	
					MRS	SM	16ч.	24ч.
KZM 2-11-1	Пръчковидни	+	-	-	-	+	+	+
KZM 2-11-3	Пръчковидни	+	-	-	-	+	+	+
КО 3-7-5	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
КО 4-4	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
КС 5-12	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
КС 5-13	Коки по двойки	+	-	-	-	-	+	+
КС 5-14	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
KZC 8-21-1	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
KZC 8-23-5	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
С 10-31-3	Пръчковидни	+	-	-	-	-	-	-
KBB 7-1	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+
KBB 11	Пръчковидни	+	-	-	-	-	+	+

1.3. Идентификация на новоизолираните щамове

Точната и достоверна идентификация на новоизолирани щамове е основен и много важен етап от процеса на тяхното изследване, особено когато ще се определят техни функционални характеристики и потенциал за приложения в различни продукти. За идентифициране на новоизолираните щамове МКБ до вид е използван полифазен таксономичен подход, чрез определяне на биохимичен профил с тест китовете API® 50CHL (bioMérieux, Франция) и секвенционен анализ на гена за 16S rDNA (Таблица V.3). Получените резултати, от определяне на биохимичния профил, показват че от 12 щамове 9 са идентифицирани до вид с процент на достоверност над 98,8% (Приложение 1). Два щамове са идентифицирани като принадлежащи към вида *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, като при тях се наблюдава характерния биохимичен профил за този вид. Един щам е определен като принадлежащ към вида *Pediococcus pentosaceus* 1, а 6 щамове към вида *Lactobacillus plantarum* 1. Щам КО 4-4 е идентифициран като *Lactobacillus plantarum* 1, но с ниска достоверност от 58,9% и тъй като има нисък процент на достоверност го приемаме като неидентифициран. Два от щамовете КО 3-7-5 и С 10-31-3 не са идентифицирани по биохимичен профил.

Таблица V.3. Идентификация на новоизолираните щамове

Щам	По биохимичен профил, чрез API WEB™	Секвенционен анализ по гена за 16S rDNA
KZM 2-11-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
KZM 2-11-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
КО 3-7-5	Не е идентифициран	<i>Loigolactibacillus coryniformis</i>
КО 4-4	Не е идентифициран	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
КС 5-12	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
КС 5-13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
КС 5-14	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KZC 8-21-1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KZC 8-23-5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
С 10-31-3	Не е идентифициран	<i>Latilactobacillus sakei</i>
KBB 7-1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KBB 11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

През 2020 г. е въведена нова класификация на семейство *Lactobacillaceae*. В новата класификация са актуализирани родове *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* и на базата на видовете, включени в предишния род *Lactobacillus*, са формирани 25 нови рода (Zheng, J. et al., 2020). Съгласно новата класификация и в резултат на проведения секвенционен анализ по гена за 16S rDNA (Таблица V.3), 7 от новоизолираните щамове принадлежат към вида *Lactiplantibacillus plantarum* с щамова идентификация КО 4-4, КС 5-12, КС 5-14, КЗС 8-21-1, КЗС 8-23-5, КВВ 7-1 и КВВ 11. Присъствието на щамове от вида *Lactiplantibacillus plantarum* в такъв тип ферментирани продукти е очакван резултат (Behera et al., 2018).

Щамовете KZM 2-11-1 и KZM 2-11-3, са идентифицирани като *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Тези два щамове са изолирани от традиционно приготвено кисело мляко, което е също очакван резултат. Присъствието на такива щамове в храни допринасят за специфични свойства, като развитие на аромата, специфичен вкус и цвят, включително текстурата и консистенцията на получаваните продукти (Glusac et al., 2015).

Щамът КО 3-7-5 е идентифициран като *Loigolactobacillus coryniformis*. Този щам е изолиран от кашкавал. Щамове от този вид се откриват с ниска честота във ферментирани храни, но има доказателства, че са изолирани в козе мляко, какъвто е примерът с щам с пробиотичен потенциал *L. coryniformis* СЕСТ 5711 (Martin et al., 2005).

Щамове от вид *Pediococcus pentosaceus* са изолирани от различни ферментирани храни и често се използват за производство на месни продукти и някои видове сирена като част от стартерните култури (Gurira et al., 2005; Vidhyasagar et al., 2013; Zommiti et al., 2018; Zhang et al., 2020). От новоизолираните щамове КС 5-13 е идентифициран като *Pediococcus pentosaceus*.

От месния традиционен продукт суджук е изолиран един щам С 10-31-3, идентифициран като *Latilactobacillus sakei*. Щамове от такъв вид са изолирани от други изследователи от ферментирани месни и рибни продукти и от оризово вино (Tsuji et al., 2018; Najjari et al., 2008) и се използват като стартерни култури за сурово сушени и пушени продукти (Najjari et al., 2020; Kobylyatsky et al., 2021).

2. Изследване на функционални и пробиотични свойства на новоизолираните щамове МКБ

2.1. Антимикробна активност срещу тест-патогени бактерии и дрожди

Много добре позната и важна е ролята на различните щамове МКБ при използването им за защита срещу различни микроорганизми, включително развалящи храните. Този древен, но модерен подход позволява запазването на храната по естествен начин и възпрепятства развитието на спектър от хранително асоциирани патогени. Използването на МКБ като биоконсерванти осигурява срока на годност на храните и гарантира безопасността и качеството им. МКБ могат да продуцират антимикробни съединения като органични киселини (млечна киселина, оцетна киселина), бактериоцини и други метаболити, предотвратявайки развалянето на храната и развитието на патогени (Tsuji et al., 2018; Najjari et al., 2008; Najjari et al., 2020; Kobylyatsky et al., 2021; Bartkiene et al., 2020).

Антимикробната активност на новоизолираните щамове е тествана при използване на безклетъчни супернатанти от 24 часови култури срещу грам-положителни и грам-отрицателни бактериални тест-патогени и патогенни дрожди по метод на дифузия в агар (Таблица V.4). При изследваните щамове се установява инхибиращ ефект, както срещу

грам-положителни, така и срещу грам-отрицателни бактерии. Всички щамове инхибират растежа на *E. coli* и *B. subtilis*, като най-добре изразен ефект се наблюдава при щамовете *L. plantarum* КВВ 7-1 и КВВ 11, следвани от *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* КЗМ 2-11-1 и КЗМ 2-11-3. При всички щамове, които принадлежат към *L. plantarum* - КО 4-4, КС 5-12, КС 5-14, КЗС 8-21-1, КЗС 8-23-5, КВВ 7-1, КВВ 11 и щам *P. pentosaceus* КС 5 -13 се наблюдава ефект срещу *B. cereus*, а три от щамовете от вида *L. plantarum* – КО 4-4, КВВ 7-1 и КВВ 11 е отчетена активност срещу *P. aeruginosa*. В научната литература са описани много подобни резултати, където различни щамове МКБ включително и от изследваните видове, проявяват много добре изразена антибактериална активност срещу различни тест-патогенни бактерии (Gurira et al., 2005; Zommiti et al., 2018; Bartkiene et al., 2020; Ricci et al., 2019; Jatmiko et al., 2017; Alebiosu et al., 2017; Unban et al., 2021).

При проведените тестове с неутрализираната безклетъчна супернатанта (NCFS) от 24 часовите култури на изследваните щамове не е установена антибактериална активност. На базата на тези резултати може да се обобщи, че новоизолираните щамове проявяват добър биопротективен потенциал срещу бактериални патогени и установената активността при нативните безклетъчни супернатанти (CFS) се дължи главно на продуцираните нискомолекулни органични киселини (Unban et al., 2021; Nes et al., 2012). При проведените тестове за антигъбна активност с CFS срещу *C. albicans* такава не е установена.

Таблица V.4. Антимикробна активност на CFS от новоизолираните щамове МКБ срещу бактериални и дрождеви тест-патогени.

Щамове	Тест-патогени					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
КЗМ 2-11-1	12.5±0.50	-	12.5±0.01	-	-	-
КЗМ 2-11-3	13.3±0.25	-	13.0±0.00	-	-	-
КО 3-7-5	12.3±0.75	-	11.3±0.03	-	-	-
КО 4-4	11.5±0.25	18.0±0.82	11.0±0.00	16.0±0.82	-	-
КС 5-12	12.3±0.25	-	12.0±0.02	12.3±0.47	-	-
КС 5-13	12.5±0.50	-	11.8±0.25	13.5±0.50	-	-
КС 5-14	11.0±0.01	-	12.0±0.00	15.7±0.47	-	-
КЗС 8-21-1	12.3±0.25	-	11.3±0.25	15.0±0.82	-	-
КЗС 8-23-5	12.3±0.75	-	12.0±0.00	15.3±1.24	-	-
С 10-31-3	11.5±0.04	-	11.0±0.00	-	-	-
КВВ 7-1	17.5±0.25	16.5±0.50	18.5±0.50	12.75±0.25	-	-
КВВ 11	17.0±0.01	16.5±0.50	19.0±0.02	14.25±0.25	-	-

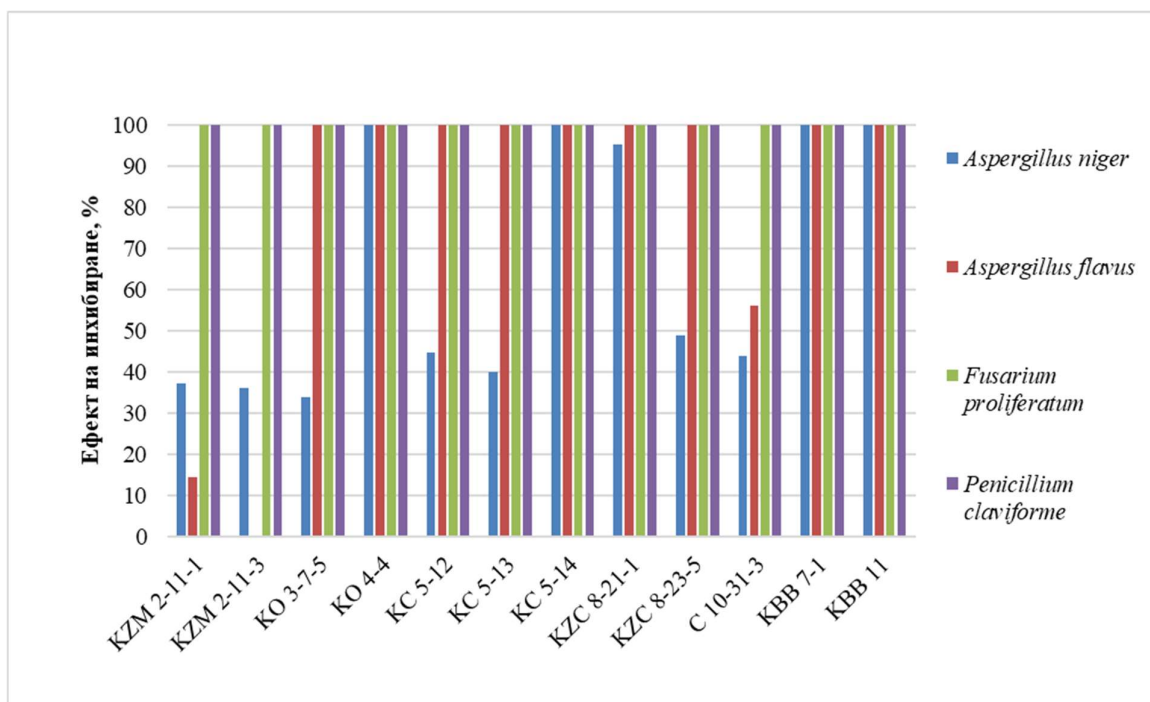
Стойностите са средни от трикратни повторения ± SD.

2.2. Антагонистична активност срещу хранително асоциирани плесенни контаминанти

Въпреки повишената киселинност, ферментиралите млечни продукти, както и други ферментирани храни, са изложени на риск от заразяване с патогенни, токсигенни, развалящи или алергизиращи плесени от родове като *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (Tropcheva et al., 2014). Включените в анализите хранително асоциирани плесенни контаминанти са свързани със замърсяване на храните и могат да причиняват здравословни проблеми при потребителите.

Резултатите от проведените изследвания за оценка на антигъбната активност на щамовете МКБ са представени на Фигура V.2 и в Таблица V.5. Растежът на използваните тест-плесени от видовете *F. proliferatum* и *P. claviforme* напълно се инхибира от всички изследвани щамове. Повечето от щамовете от род *L. plantarum* имат добре изразен

инхибращ ефект срещу тест-плесените от род *Aspergillus*, като *A. niger* е напълно подтиснат от 4 щама *L. plantarum* – КО 4-4, КС 5-14, КВВ 7-1 и КВВ 11, а останалите щамове инхибират *A. niger* до 50%. Растежът на *A. flavus* се потиска напълно от всичките щамове от видовете *L. plantarum*, *L. coryniformis* и *P. pentosaceus*. При щамовете *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 и *L. sakei* С 10-31-3 се наблюдава по-нисък процент на инхибиране на *A. flavus*, а *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 не проявява ефект. Важно е да се отбележи, че щамовете от вида *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* инхибират развитието на плесенните видове от родовете *Penicillium* и *Fusarium*. Антигъбната активност на изследваните щамове е обещаващо предимство, което предполага потенциалните им приложения като естествени хранителни консерванти в различни хранителни технологии (Salas et al., 2017). Други изследвания показват, че различни щамове от видовете *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. coryniformis* и *P. pentosaceus* проявяват инхибращ ефект срещу широк спектър патогени, включително и *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и *Fusarium* sp. (Bartkiene et al., 2020; Russo et al., 2017; Syrokou et al., 2021; Tropcheva et al., 2014).




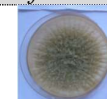
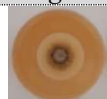
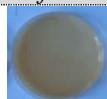
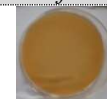
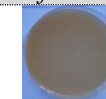

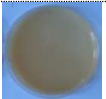

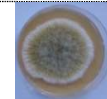

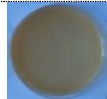

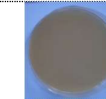

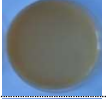



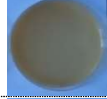

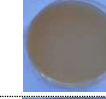
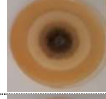
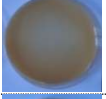

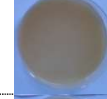
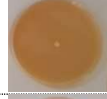
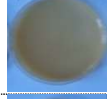

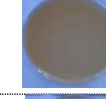



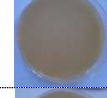

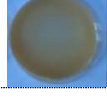
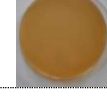
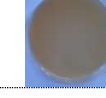

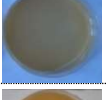

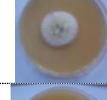



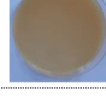






Фигура V.2. Антигъбна активност на новоизолирани щамове срещу хранително асоциирани плесени, представена като ефект на инхибиране, %.

2.3. Антагонистична активност срещу хранително асоциирани дрождеви контаминанти

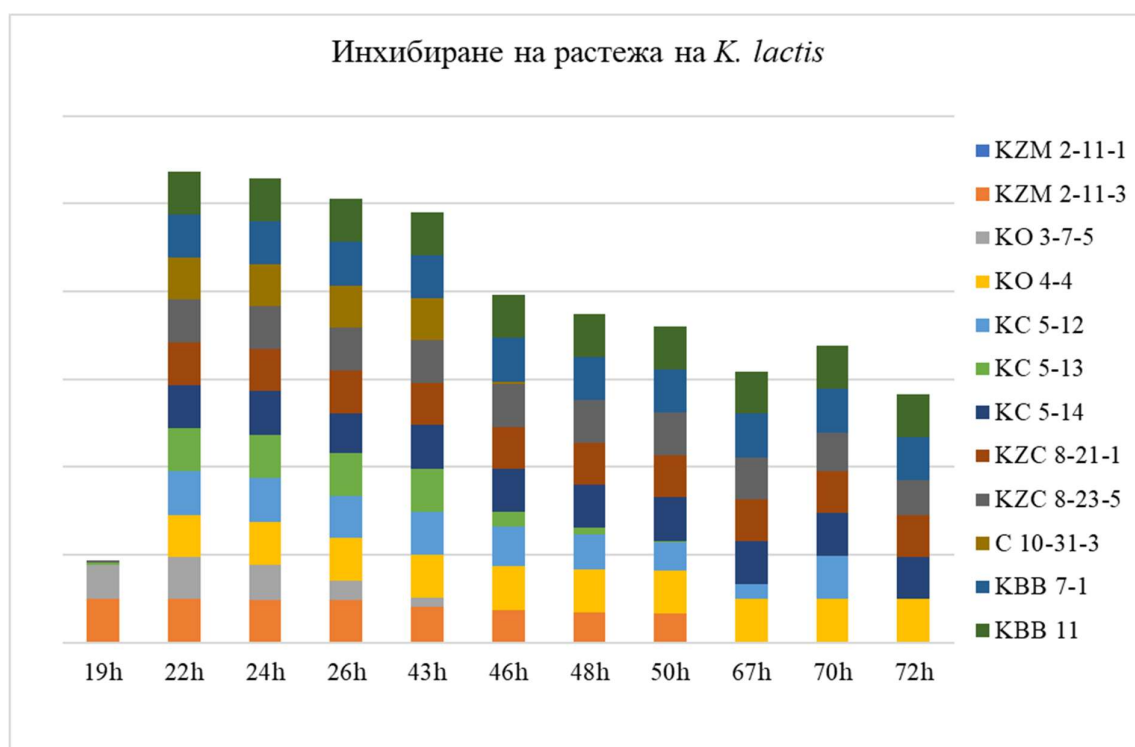
В млечните продукти, включително прясно сирене и кисело мляко, често присъстват дрожди от видовете *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* или *Saccharomyces cerevisiae* (Merchán et al., 2022; Galli et al., 2022; Mañworé et al., 2019).

Таблица V.5. Антигъбна активност на новоизолираните щамове МКБ срещу хранително асоциирани плесени, представена чрез инхибиране на растежа на колонииите

Щам МКБ	Тест плесени				Щам МКБ	Тест плесени			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
контрола					КС 5-12				
KZM 2-11-1					КС 5-13				
KZM 2-11-3					КС 5-14				
КО 3-7-5					KZC 8-21-1				
КО 4-4					KZC 8-23-5				
С 10-31-3									
KBB 7-1					KBB 11				

Дрождите имат способността да метаболизират млечните компоненти като лактоза, протеини и мазнини. Те използват лактозата като източник на въглерод, конкурирайки се с МКБ за хранителни вещества (Belloch et al., 2011; Kurniawati et al., 2022). Дрождите повлияват характеристиките на продуктите, в които присъстват, поради способността си да произвеждат различни ароматни съединения, което води до промени в крайния продукт. МКБ са особено важни при процесите на ферментацията, тъй като в допълнение към продуцирането на желани киселини и ароматни съединения, те имат способността да инхибират растежа на нежелани организми (Faria-Oliveira et al., 2015). Наличието на дрожди придава различни сензорни характеристики на крайните продукти и следователно е необходимо да се проучи активността на млечнокисели бактерии за инхибиране на растежа на нежеланите дрождеви контаминанти.

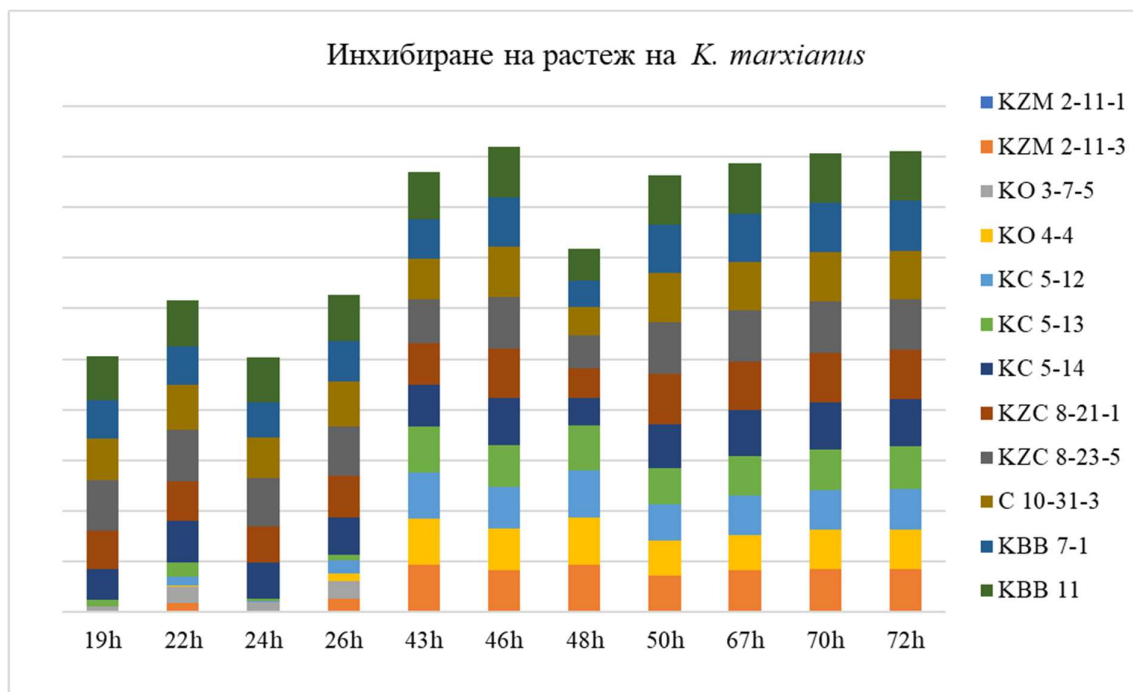
На Фигури V.3, V.4 и V.5 са представени резултатите в % от ефекта на инхибиране на растеж на тестваните дрожди *Kluyveromyces lactis* 1470, *Kluyveromyces marxianus* var t3 и *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 537 в присъствие на CFS от новоизолираните щамове. И при трите дрожеви вида се наблюдава инхибиране на растежа в зависимост от вида на дрождите и приложената CFS от съответния щам МКБ. При *Kluyveromyces lactis* повечето щамове МКБ инхибират растежа между 22^{-ти} час и 43^{-ти} час, след което този ефект намалява като процент или напълно изчезва (фиг. V.3). При щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 не се наблюдава антидрождева активност срещу *Kluyveromyces lactis*.



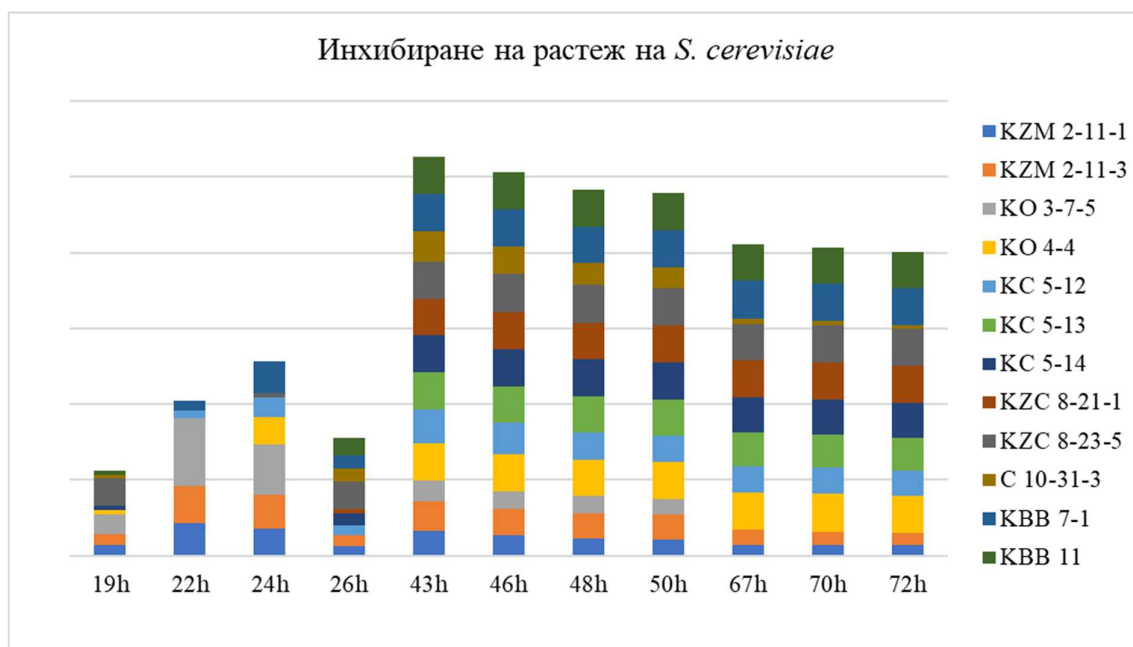
Фигура V.3. Ефект на инхибиране на растежа на *K. lactis* в присъствие на CFS от новоизолираните щамове МКБ

При *Kluyveromyces marxianus*, по-добре изразен ефект на инхибиране се наблюдава след 43^{-ти} час (фиг. V.4). Щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 не проявява активност и срещу *Kluyveromyces marxianus*. При щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 отчетлив ефект на инхибиране се проявява към 26^{-ти} час и се повишава в следващите

часове. При щам *L. corniformis* КО 3-7-5 се наблюдава слаба активност в първите 26 часа, след което се губи в следващите часове. Останалите щамове поддържат добре изразена активност до 72^{ри} час на инкубиране.



Фигура V.4. Ефект на инхибиране на растежа на *K. marxianus* в присъствие на CFS от новоизолираните щамове МКБ



Фигура V.5. Ефект на инхибиране на растежа на *S. cerevisiae* в присъствие на CFS от новоизолираните щамове МКБ

Исследваните шамове МКБ инхибират растежа и на *S. cerevisiae* за 72 часа, като при някои шамове отчетения ефект намалява или се загубва в по-късните часове, а при други активността се проявява като добре изразен ефект от 43-ти час (фиг. V.5).

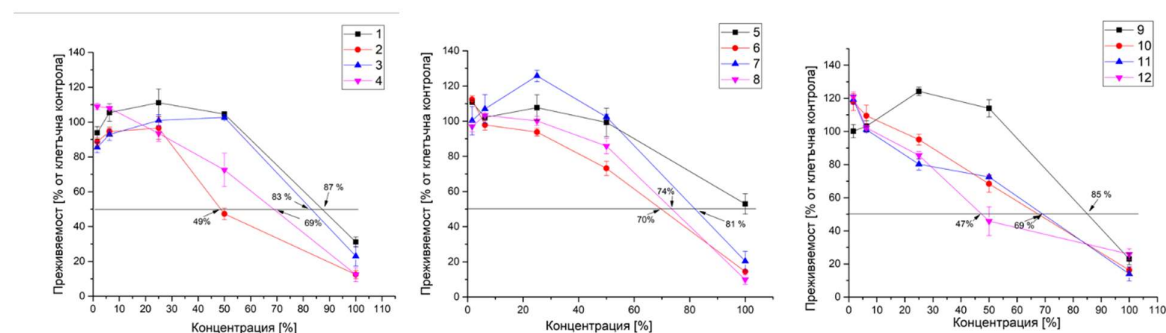
Щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1, при който не е отчетен инхибиращ ефект при другите два дрождеви вида, проявява активност срещу *S. cerevisiae* до 72 часа. По отношение на ефекта на инхибиране на растежа на *S. cerevisiae* може да се отбележи, че е по-добре изразен от 43-ти час при повечето изследвани шамове МКБ.

В други изследвания са представени данни за изявата на антагонистична активност на шамове от вида *L. plantarum* срещу *K. marxianus*, *K. Lactis*, *S. cerevisiae* и други видове дрожди (Afzali et al., 2020; Ström et al., 20002). Но тъй като често хранително асоциираните дрожди имат симбиотични връзки с МКБ (Huang et al., 2020; Hu et al., 2023; Chan et al., 2019), изследователите се фокусират повече към изследване на антимикробна активност срещу патогенни дрожди като *Candida* sp. (Lipinska-Zubrycka et al., 2020).

2.4. Скрининг за антивирусна активност на новоизолираните шамове МКБ

Редица автори докладват в свои публикации за антивирусни ефекти на метаболитни продукти от МКБ, включително от пробиотични бактерии, върху вируси с обвивка и без обвивка (Zhou et al., 2019; Carver & Naficy 1962; Cliver & Herrmann 1972; Deng & Cliver 1992; Deng & Cliver 1995; Munoz et al., 2011). В различни проучвания е установено, че шамове, изолирани както от ферментирани храни, така и с човешки произход, проявяват антивирусна активност главно срещу грипни вируси и ентеровируси (Muhialdin et al., 2021).

За изследване на антивирусната активност трябва да се определи концентрацията на безклетъчната супернатанта, получена при 24-часово култивиране на изследваните МКБ, която не е цитотоксична спрямо използваната клетъчна култура MDBK. Безклетъчните супернатанти от дванадесет проби са приложени с концентрации от 100% до 1,5% (Фигура V.6) върху клетъчната линия MDBK. Максималната толерантна концентрация (МТК) е определена въз основа на морфологични промени в монослоя. Всички изследвани безклетъчни супернатанти нямат видим морфологичен ефект върху MDBK при концентрация под 25%.



Фигура V.6. Цитотоксичността на безклетъчните супернатанти от МКБ

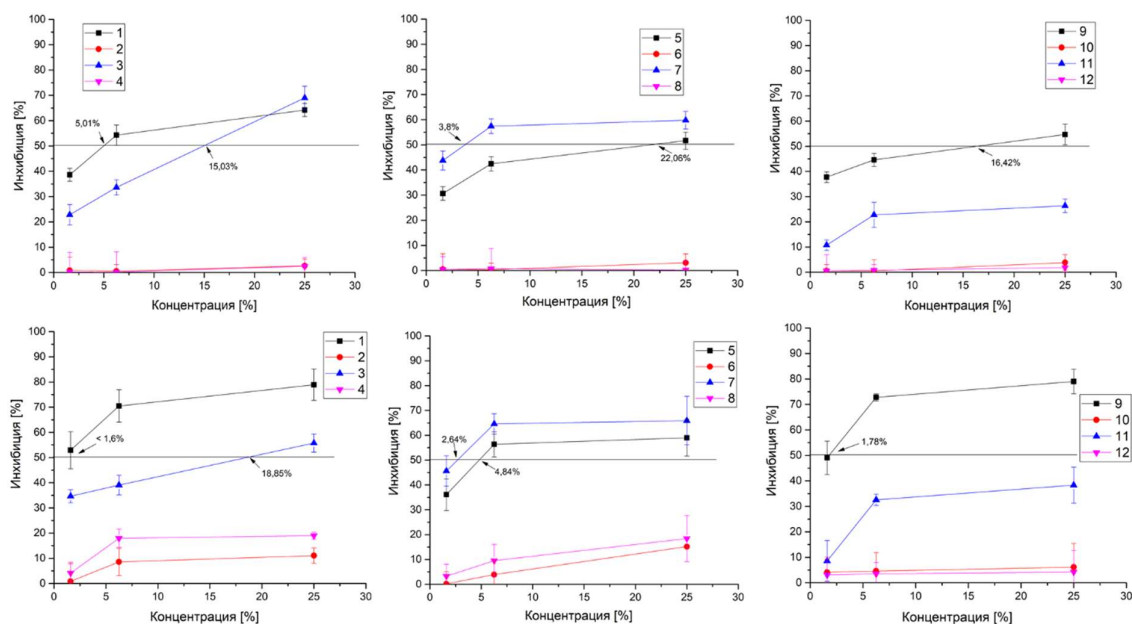
1. КС 5-12, 2. КС 5-13, 3. КС 5-14, 4. КЗС 8-21-1, 5. КЗС 8-23 -5, 6. С 10-31-3, 7. КО 4-4, 8. КО 3-7-5, 9. КЗМ 2-11-3, 10. КЗМ 2-11-1, 11. КЗМ 2 -11-3 (SM), 12. КЗМ 2-11-1 (SM) на MDBK клетъчна линия.

Стойността на цитотоксична концентрация 50 (CC₅₀) е между 47% и 85% при всички безклетъчните супернатанти на изследваните шамове МКБ. Супернатантите с най-висока токсичност са *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 (SM) с CC₅₀ от 47% и *Pediococcus*

pentosaceus KC 5-13 с 49%. Повечето безклетъчни супернатанти имат CC_{50} около 70% - *L. plantarum* KZC 8-21-1, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – KZM 2-11-1 и KZM 2-11-3 (SM среда) (69%), *L. sakei* C 10-31-3 (70%) и *L. coryniformis* KO 3 -7-5 (74%). С по-ниска токсичност са CFS от щамове *L. plantarum* KO 4-4 (81%), *L. plantarum* KC 5-14 (83%), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 (85%) и *L. plantarum* KC 5-12 (87%). При щам *L. plantarum* KZC 8-23-5 не се постига 50% от CC_{50} дори при нативна концентрация. При пробите, получени след култивиране на два от щамовете на среда SM се наблюдават разлики при определяне на CC_{50} в сравнение с култивираните на среда MRS, като за *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 е 47%, а за *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 е 69%. Тези разлики може да се дължат предимно на метаболити, продуцирани в следствие на състава на средата, на която са култивирани изследваните щамове. Според Mani-Lopez et al., (2022), един от основните факторите, които допринасят за компонентния състав на безклетъчните супернатанти, е изходната среда за култивиране. В зависимост от нея един и същи щам продуцира различни метаболити. Като цяло всички изследвани безклетъчни супернатанти имат относително ниска цитотоксичност спрямо използваната в анализите клетъчна линия (Фигура V.6). Подобни резултати, свързани с определяне на CC_{50} , се потвърждават и от други проучвания, в които са използвани подобни клетъчни линии – Vero и MDCK (Choi et al., 2009).

Оценка на инхибирането на репликацията на HHV от бактериални безклетъчни супернатанти и определяне на Селективен индекс (SI)

За оценка на инхибирането на репликацията на HHV от изследваните бактериални безклетъчни супернатанти, клетъчния монослой е третиран последователно с вирусна проба и бактериална безклетъчна супернатанта. Безклетъчни супернатанти са използвани в нетоксични концентрации от 25%, 6,25% и 1,6% и е изчислена 50% ефективна концентрация (IC_{50}) (фигура V.7).



Фигура V.7. Антивирусна активност на безклетъчните супернатанти от изследваните щамове 1. KC 5-12, 2. KC 5-13, 3. KC 5-14, 4. KZC 8-21-1, 5. KZC 8-23-5, 6. C 10-31-3, 7. KO 4-4, 8. KO 3-7-5, 9. KZM 2-11-3, 10. KZM 2-11-1, 11. KZM 2-11-3 (SM), 12. KZM 2-11-1 (SM) срещу А) HHV-1 и Б) HHV-2

Безклетъчните супернатанти, при които е отчетена антивирусна активност срещу двата вирусни типа HHV-1 и HHV-2, са от щамове *L. plantarum* – КО 4-4, КС 5-12, КС 5-14, КЗС 8-23-5, и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* КЗМ 2-11-3. При щам *L. plantarum* КС 5-12 има IC₅₀ от 5% срещу HHV-1 и под 1,6% срещу HHV-2, което го прави най-ефективният агент от всичките дванадесет тествани проби със SI над 54 (Таблица V.6). При щам *L. plantarum* КС 5-14 е определена по-ниска ефективност, съответно с IC₅₀ от 15% и 19%, но се отчита най-висок антивирусен капацитет с близо 70% инхибиране на вирусната репликация и много ясно изразен доза-зависим ефект. При HHV-1 най-добра ефективност е отчетена за безклетъчната супернатанта от *L. plantarum* КО 4-4 с IC₅₀ от 3,8%, което определя SI над 21. За безклетъчните супернатанти на щамове, които проявяват антивирусна активност при репликация на двата типа вируси е определен селективният индекс (SI) въз основа на тяхната цитотоксичност (50% цитотоксична концентрация, CC₅₀) и инхибиране (50% ефективна концентрация, IC₅₀) срещу двата вирусни щамове (Таблица V.6).

Наблюдаваният ефект на антивирусна активност може да се определи основно като въздействие върху цикъла на репликация на вируса вътре в клетките гостоприемници, тъй като резултатите са отчетени след един час инкубация и не могат да се свържат с влиянието върху вирусната адсорбция или проникване (Conti et al., 2009; Vilhelmova - Pieva et al., 2022). Според други автори, доза-зависимият антивирусен ефект се наблюдава при подобни продукти (Mastromarino et al., 2011; Vilhelmova - Pieva et al., 2022; Möller et al., 2008), като се посочва, че се дължи на комплекса от съединения, продуцирани от МКБ.

Таблица V.6. Определяне на селективен индекс на безклетъчните супернатанти на щамове МКБ, които показват антивирусна активност HHV-1 и HHV-2.

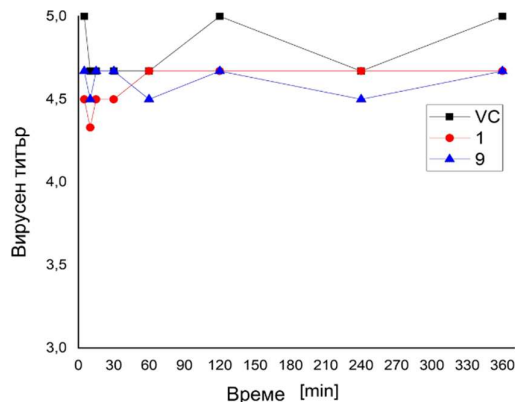
Проба No	CFS от щамове МКБ	HHV-1			HHV-2	
		CC ₅₀	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
1	КС 5-12	87	5.01	17.37	<1.6	>54
3	КС 5-14	83	15.03	5.52	18.85	4.40
5	КЗС 8-23-5	>100	22.06	4.53	4.84	20.66
7	КО 4-4	81	3.8	21.32	2.64	30.68
9	КЗМ 2-11-3	85	16.42	5.18	1.78	47.75

При безклетъчните супернатанти от щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* КЗМ 2-11-3, *L. plantarum* – КО 4-4, КС 5-12 и КЗС 8-23-5 е определен селективен индекс над 15 срещу един или и двата вирусни модела. Въпреки че отчетените SI са значимо по-ниски от стандартно прилагани продукти, като ацикловир със SI 560 (определени в паралелен анализ по описания метод), те могат да имат важно практическо значение.

Определяне на вирусоцидна активност

CFS от два от изследваните щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* КЗМ 2-11-3 и *L. plantarum* КС 5-12, които са показали най-висока активност срещу HHV-2 са подбрани за изследване на техния вирусоциден потенциал срещу този вирусен модел. След 6 часов експеримент на директна инактивация и двете проби показват много слаба активност срещу вирионите на HHV-2. Разлика между вирусната контрола и пробите, третирани със супернатантите е по-малка от 0,5 log (фигура V.8). Определянето на вирусоцидния ефект се прилага за оценка на активността по време на ранните етапи от жизнения цикъл на вируса

(адсорбция или проникване) или директно върху вириона и обикновено се основава на активността на такива метаболити като водороден пероксид или киселини, продуцирани от щамове МКБ (Conti et al., 2009; Khani et al., 2012). Липсата на вирусоциден ефект при двете избрани проби подкрепя тезата, че установената антивирусна активност по време на репликацията на използваните вирусни модели се определя от други молекулярни механизми и от комплекса от продуцирани биологично активни вещества.



Фигура V.8. Вирусоцидна активност на безклетъчна супернатанта от KC5-12 и KZM2-11-3 срещу HHV-2

2.5. Определяне на ензимния профил на изследваните щамове

Изявата на комплекс от ензимни активности при млечнокиселите бактерии е важен фактор за формирането на характеристиките на хранителните продукти, в които те се включват. Специфичните качества на ферментиралите хранителните продукти се определят от характеристиките на суровините, от характерната микробиота и от прилаганата технология. Щамове с различни ензимни профили могат да допринесат за получаването на различни продукти (Stojanovski et al., 2013). Гликозидазите (α -галактозидаза, α -глюкозидаза и β -галактозидаза) са важни ензими за процеса на ферментацията. β -галактозидазата е ензимът, който хидролизира дизахаридна лактоза до глюкоза и галактоза. β -глюкозидазите освобождават широк спектър от вторични метаболити, които подобряват вкуса или аромата на ферментиралите продукти (Trojanova & Rada 2005; Michlmayr & Kneifel 2014). В този аспект са проведени анализи за оценка на основни ензимни активности при изследваните щамове чрез използване на тест-кит API ZYM, а получените резултати са представени в таблица V.7. Всички изследвани щамове са положителни за левцин ариламидазна, валин ариламидазна, кисела фосфатазна, нафтол-AS-BI-фосфохидролазна и β -галактозидазна активности и са отрицателни за трипсин, α -химотрипсин, β -глюкуронидаза, α -манозидаза и α -фукозидаза. Пет щама проявяват α -галактозидазна активност и седем - β -глюкозидазна активност.

2.6. Скрининг за генетични детерминанти за пептидази при изследваните щамове

При различните видове МКБ са установени различни протеазни активности и сложна система от ендо- и екзопептидази. Протеолитичните системи на МКБ превръщат протеините до пептиди и аминокиселини, които са важни не само за развитието на самите бактерии, но и за формиране на аромата и текстурата на ферментиралите храни. Стартерните култури, използвани при производството на ферментирани млечни продукти притежават протеолитична активност, позволяваща им бързото развитие в млякото. По

време на ферментацията млечните протеини, основно казеина, претърпяват протеолитична деградация, в резултат на която се получават биоактивни пептиди (Kieliszek et al., 2021; Besharati & Lackner 2023). Някои от продуцираните пептиди, резултат от пептидазната активност при МКБ, проявяват положителните здравни ефекти като антимикробни, антиоксидантни, антихипертензивни или имуномодулаторни (Kieliszek et al., 2021).

Таблица V.7. Ензимен профил на изследваните щамове млечнокисели бактерии, определен с API ZYM кит

Ензими	KZM 2-11-1	KZM 2-11-3	KO 3-7-5	KO 4-4	KC 5-12	KC 5-13	KC 5-14	KZC 8-21-1	KZC 8-23-5	C 10-31-3	KBB 7-1	KBB 11
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaline Phosphatase	-	-	-	-	1	-	2	1	2	3	1	1
Esterase (C4)	1	2	2	-	1	-	1	2	1	1	1	-
Esterase Lipase (C8)	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Valine arylamidase	1	1	5	3	2	5	3	5	4	5	3	4
Cystine arylamidase	-	-	1	1	1	1	2	4	4	1	3	3
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	2	3	3	1	3	3	4	3	4	4	3	3
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolydrolase	1	4	1	1	1	1	2	1	4	1	1	2
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	1	-	4	3	2	2
β -galactosidase	5	5	5	5	4	1	5	5	5	1	5	5
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucuronidase	-	-	4	-	4	-	5	5	5	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	4	5	-	4	4	5	-	4	5
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	3	4	-	3	3	3	-	2	3
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1, 2, 3, 4 и 5 - скала за оценка на ензимната активност според интензитета на оцветяването, съгласно инструкциите за приложение на тест-кита; - не е отчетена ензимна активност.

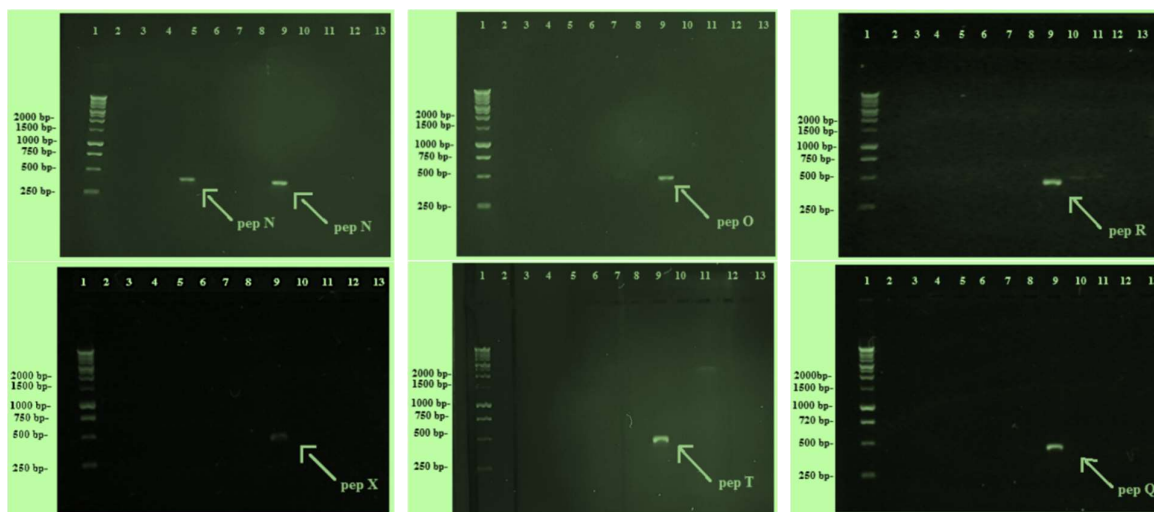
При МКБ са установени спектър от пептидази и са идентифицирани редица гени, отговорни за тяхната синтеза (Liu et al., 2010; Qi et al., 2021). За да се провери наличието на генетични детерминанти за пептидази при изследваните щамове са подбрани праймери за 6 гена, установени при МКБ и свързвани с генерирането на биоактивни пептиди.

Новоизолираните щамове са изследвани за наличието на генетични детерминанти за пептидазите Aminopeptidase N (per N), Endopeptidase (per O), Prolyl aminopeptidase (per R), X- prolyl dipeptidyl- aminopeptidase (per X), Tripeptide aminopeptidase (per T) и Proline dipeptidase (per Q) (съгласно описаните в таблица IV.1) и резултатите са представени на таблица V.8 и фигура V.9.

Таблица V.8. Наличие на генетични детерминанти за пептидази при изследваните щамове

щам	KZM 2-11-3	KZC 8-21-1	KO 4-4	KC 5-12	KZM 2-11-1	KZC 8-23-5	C 10-31-3	KC 5-14	KC 5-13	KO 3-7-5
Пореден номер (фиг. V.9)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Per N	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Per R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Per O	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Per T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Per X	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Per Q	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Гени за изследваните пептидази са установени при щамове *L. sakei* С 10-31-3 за всичките изследвани пептидази и при *L. plantarum* КО 4-4, където се открива наличието на перN. При останалите изследвани щамове не е установено наличие на гени за търсените 6 пептидази с използваните праймери. Пептидазните активности при различните видове МКБ и в частност при лактобацилите са обект на обширни изследвания, включващи анализи, както на физиологично, така и на генетично ниво.



Фигура V.9. Наличие на генетични детерминанти за пептидазите пер N, пер O, пер R, пер X, пер T и пер Q при изследваните щамове МКБ.

За установяване на гени за различни пептидази са конструирани много голямо разнообразие от праймери, за които се установява, че в повечето случаи са видово специфични (Freiding, S., et al., 2011). Получените резултати за наличие на гени за всички шест тествани пептидази при щам *L. sakei* С 10-31-3 съответстват на получените резултати от Freiding, S., et al., (2011) и подкрепят хипотезата за видовата специфичност при конструиране на праймери за скрининг на гени за пептидази при МКБ.

2.7. Оценка за антибиотична резистентност при изследваните щамове

Определяне на профила за антибиотична резистентност

При МКБ с приложимост при производството на храни и с пробиотичен потенциал, е важно да се изследва резистентността към различни групи антибиотични вещества. Особено при оценка на пробиотичен потенциал на МКБ, един от важните критерии е определяне на профил за антибиотичната резистентност. От едната страна, поради възможността за провеждане на комбинирана терапия с антибиотик и пробиотик, с цел възстановяване на нормалната микрофлора на стомашно-чревния или урогениталния тракт, пробиотиците трябва да са резистентни към антибиотика, с който ще се ползва в комбинация – такъв тип са комбинираните терапии при диария (Ouweland et al., 2016). Използването на пробиотични щамове може да помогне за инхибиране на развитието на резистентни към антибиотици патогенни щамове (Varankovich et al., 2015). От друга страна, е много важно да се определи профилът на резистентност на щамове, особено използваните във ферментирани храни, за да се намали възможността за хоризонтален трансфер на гени за антибиотична резистентност.

За определяне на профила за резистентност при изследваните щамове са използвани 13 различни антибиотични субстанции. Използваните антибиотици са от основните групи с различен механизъм на действие: инхибитори на синтеза на ДНК – ципрофлоксацин, триметоприм и рифампицин; инхибитори на синтеза на клетъчната стена – еритромицин, ванкомицин и ампицилин; инхибитори на протеиновия синтез – хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, канамицин, неомицин, клиндамицин и гентамицин (Sharma et al., 2017).

Получените резултати са представени в Таблица V.9 и показват, че антибиотичната чувствителност при изследваните антибиотици варира при отделните щамове, като при някои антибиотици се наблюдава пълна резистентност при всичките изследвани щамове. Щамове *L. plantarum* КО 4-4, *L. plantarum* KZC 8-23-5 и *L. sakei* С 10-31-3 имат най-широк спектър на антибиотична резистентност. Всички щамове показват пълна резистентност към канамицин, неомицин и ципрофлоксацин. Всички изследвани щамове са чувствителни или междинно чувствителни към ампицилин. Само щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 е чувствителен към ванкомицин, а щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 е с междинна чувствителност спрямо ванкомицин. Двата щамове са междинни към стрептомицин. Само един щам е междинно чувствителен към гентамицин, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3. Един щам е резистентен към еритромицин – *L. plantarum* KZC 8-23-5 и един към рифампицин – *L. sakei* С 10-31-3.

Таблица V.9. Профил за антибиотична резистентност на новоизолираните щамове МКБ

Антибиотици	µg / диск	KZM 2-11-1	KZM 2-11-3	KO 3-7-5	KO 4-4	KC 5-12	KC 5-13	KC 5-14	KZC 8-21-1	KZC 8-23-5	C 10-31-3	KBB 7-1	KBB 11
Vancomycin (VA)	5	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin (AMP)	10	SS	SS	SS	I	SS	I	S	SS	I	I	I	I
Streptomycin (S)	10	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetracycline (TE)	30	SS	SS	S	R	S	R	R	I	R	I	I	I
Chloramphenicol (C)	30	SS	SS	S	R	SS	S	I	I	I	S	I	I
Clindamycin (CD)	2	R	R	SS	R	SS	S	I	I	R	I	I	I
Gentamicin (GEN)	10	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycin (K)	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomycin (N)	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Trimethoprim (TR)	5	R	R	SS	S	S	R	I	S	S	R	S	S
Erythromycin (E)	15	SS	SS	I	I	I	I	I	I	R	I	I	I
Ciprofloxacin (CIP)	5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin (RD)	5	SS	SS	S	I	I	I	S	S	I	R	I	I
Индекс на Мултиантибиотична резистентност (МАР индекс)		0,46	0,39	0,46	0,69	0,46	0,62	0,54	0,46	0,69	0,62	0,46	0,46

Съгласно CLSI, 2020 при диаметър на зоната на инхибиране: R – резистентен, ≤ 14 mm; I – междинен, 15-19 mm; S, SS – чувствителен, ≥20 mm.

Други изследвания показват подобни резултати като всички тествани щамове МКБ и *Bifidobacterium* spp., изолирани от млечни продукти са чувствителни към клиндамицин, ампицилин, пеницилин G, еритромицин, рифампицин, а относно чувствителността към хлорамфеникол, неомицин, гентамицин, ванкомицин, стрептомицин и тетрациклин са наблюдавани разлики в зависимост от вида (D'Aimmo et al., 2007). МКБ от ферментирали

хранителни продукти са чувствителни към ампицилин и присъщо резистентни към канамицин и ванкомицин, с изключение на щамове от видовете *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* и *S. thermophilus*, които са чувствителни към ванкомицин (Blandino et al., 2008; Nawaz, M. et al., 2011).

Скрининг за гени, обуславящи резистентност към антибиотици при изследваните щамове

Един от важните критерии за оценка на технологично значими и пробиотични щамове е, че те не трябва да носят преносими гени за резистентност към антибиотици. Редица автори посочват, че бактериите от нормалната микробиота, включително и лактобацилите, могат да служат като източник за прехвърляне на гени, отговарящи за антибиотична резистентност към различни патогенни микроорганизми (Imperial & Ibanez 2016). Тъй като МКБ могат да действат като резервоар на преносими гени за антибиотична резистентност, е важно да се наблюдава тяхната безопасност (Stefańska et al., 2021). Преносимите генетични детерминанти са често срещани при микробните съобщества и се наблюдават включително и при МКБ, което прави тези бактерии потенциални за трансфер на такива гени за резистентност. Това повишава риска за прехвърляне на гени към патогенни бактерии, които се намират, както в хранителните матрици, така и в ГИТ (Devirgiliis et al., 2011, Devirgiliis et al., 2013). МКБ, които се ползват широко в хранителната промишленост и имат придобита резистентност са, както облигатни хомоферментативни, така и облигатни и факултативни хетероферментативни. Някои от тях са от род *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*), род *Limosilactobacillus* (*L. reuteri*, *L. fermentum*), род *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*), род *Lacticaseibacillus* (*L. rhamnosus*, *L. paracasei*), *Lactococcus lactis*, *Pediococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc* spp. и *Enterococcus* spp. (Gueimonde et al., 2013; Álvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira 2018).

Характеризирането на профила на антибиотична резистентност и оценката на възможността за прехвърляне на съответните гени към други бактерии са анализирани от много изследователи. Някои автори посочват, че антибиотичната резистентност не може да се прехвърли от МКБ към патогени като *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* и *Escherichia coli* (Anisimova and Yarullina, 2018; Guo et al., 2019). Подобни проучвания показват, че възможността да бъдат прехвърлени към други бактерии гени за резистентност, открити в МКБ, е относително ниска, което прави тези бактерии още по-безопасни за различни употреби, включително при производство на храни (Anisimova and Yarullina, 2018; Guo et al., 2019).

Новоизолираните щамове МКБ са тествани за наличие на спектър от гени за антибиотична резистентност в хромозомната ДНК и резултатите са представени в Таблица V.10. Праймерите за гените за резистентност към определени антибиотици са избрани съгласно Guo et al., (2019). Целевите гени варират по дължина от 169 bp. до 1429 bp. Резултатите показват, че само пет от осем ванкомицин-резистентни щамове имат ген за резистентност към ванкомицин в хромозомната ДНК. Не е получен продукт при нито един от останалите използвани праймери за гени, свързани с антибиотична резистентност (Таблица V.10).

Като цяло при лактобацилите се наблюдава висока естествена резистентност към ванкомицин, бацитрацин, цефокситин, метронидазол, нитрофурантоин и сулфадиазин,

както и към антибиотици, които инхибират синтеза на протеини като хлорамфеникол, еритромицин, линкомицин, клиндамицин и тетрациклини (Abriouel H, et al., 2015). Двата най-често срещани гена за антибиотична резистентност при МКБ, които могат да бъдат трансферирани от и към други микроорганизми, са към тетрациклин tet(M) и еритромицин erm(B), следвани от cat гените, кодиращи резистентност към хлорамфеникол (Moračanin SV, et al., 2017). Но един от алтернативните установени механизми на мултирезистентност към антибиотици при МКБ се свързва с ефлуксни помпи, участващи в изключването на структурно несвързани съединения (Gueimonde M, et al., 2013; Mazurkiewicz P, et al., 2005).

Таблица V.10. Генетичен профил на резистентност към антибиотици на новоизолираните щамове МКБ.

Антибиотици	Праймери	KZM 2-11-1	KZM 2-11-3	KO 3-7-5	KO 4-4	KC 5-12	KC 5-13	KC 5-14	KZC 8-21-1	KZC 8-23-5	C 10-31-3
VA	vanE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	vanX	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
AMP	blaZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	bla	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mecA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	aadA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	aadE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ant(6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TE	tet(M)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	tet(K)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	tet(W)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	catA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	catA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD	Inu(A)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inu(B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	aac(6)-aph(2")	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	aac(6)Ie-aph(2")Ia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	aph(3")-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ant(2")-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	aph(3")-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	aph(3")-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TR	dfrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	dfrD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	erm(B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	erm(B-1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	erm(C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIP	gyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	parC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

При изследваните щамове се наблюдава мултирезистентност с коефициент между 0,39 и 0.69 (таблица V.9), но не е установено наличие на tet(M), erm(B) и cat гените. Съгласно Квалифицираната презумпция за безопасност (QPS) на EFSA, всички изследвани щамове принадлежат към видове, включени в актуализирания списък на безопасни видове (<https://zenodo.org/records/10534041>) с единствена квалификация, че „не трябва да съдържат гени за придобита антимикуробна резистентност към клинично значими антимикуробни средства“.

2.8. Автоагрегационен, коагрегационен потенциал и хидрофобност при изследваните щамове МКБ

МКБ могат да образуват агрегати чрез, т.нар. процес на автоагрегация и чрез процеса на коагрегация с различни видове бактерии. При селекцията на пробиотичните бактерии способността за авто- и/или коагрегация е един от значимите критерии и е предпоставка за постигане на желаните ползи (Osaña & Nader-Macias, 2002). Автоагрегацията е един механизъм, чрез който МКБ предпазват гостоприемника от колонизация на патогени, чрез

формиране на бариерна популация. Други механизми са коагрегация и адхезия към епителните клетки в ГИТ и други органи и системи (Kadyan & Pradhan, 2020).

Всички новоизолирани щамове са тествани за тяхната способност за автоагрегация и коагрегация и за хидрофобност. В таблица V.11 са представени резултатите, от където е видно, че автоагрегационната способност и хидрофобността са щамово специфични характеристики.

Таблица V.11. Способност на новоизолираните щамове за автоагрегация, коагрегация и хидрофобност.

Щамове	Автоагрегация		Коагрегация	Хидрофобност
	3ч.	5ч.	4ч.	1ч.
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-1	42.9±8.3	68.0±4.9	13.8±0.8	35.5±5.3
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-3	44.2±15.0	70.1±7.3	11.9±4.4	29.7±8.0
<i>L. coryniformis</i> KO 3-7-5	22.6±1.6	44.2±6.1	6.4±1.0	15.6±0.4
<i>L. plantarum</i> KO 4-4	11.3±0.5	17.5±3.0	7.4±0.7	1.2±0.1
<i>L. plantarum</i> KC 5-12	37.3±1.5	60.6±4.4	9.9±0.2	9.9±4.9
<i>P. pentosaceus</i> KC 5-13	17.5±1.9	35.1±3.9	8.7±1.1	16.8±5.8
<i>L. plantarum</i> KC 5-14	19.6±0.3	29.0±5.5	7.8±1.7	29.5±0.7
<i>L. plantarum</i> KZC 8-21-1	16.3±1.4	29.0±7.0	11.5±1.0	5.1±2.6
<i>L. plantarum</i> KZC 8-23-5	12.1±0.4	18.5±1.9	7.2±0.7	6.9±2.8
<i>L. sakei</i> C 10-31-3	21.2±0.2	32.9±3.5	14.4±0.8	2.7±0.0
<i>L. plantarum</i> KBB 7-1	9.0±0.5	11.1±0.1	10.6±0.1	3.2±2.4
<i>L. plantarum</i> KBB 11	16.2±0.7	18.6±0.4	15.9±0.2	0.8±0.6

Данните са представени като проценти на автоагрегация (измерена след 3 и 5 часа инкубация), коагрегация (след 4 часа инкубация) и хидрофобност (след 1 час инкубация). Стойностите са средни от трикратни измервания ± SD.

При 3 h инкубация при стайна температура всички изолирани щамове проявяват автоагрегация от 9 % до 44,2 %, която се увеличава с времето и след 5 h инкубация достига 11,1 % - 70,1 %. Най-добре изразен автоагрегационен потенциал показват щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 (68,0%), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 (70,1%), и *L. plantarum* KC 5-12 (60,6%), което определя тези щамове като интересни кандидати с потенциал за пробиотични приложения. Добра способност за автоагрегация при щамове от род *Lactobacillus* и *Lactiplantibacillus* като *L. plantarum* и *L. delbrueckii* са описани и в други проучвания (Kadyan & Pradhan, 2020; Darmastuti et al., 2021).

Способността на бактериите да образуват агрегати с генетично различни щамове (коагрегация) се обсъжда като противоречива характеристика. От една страна, бактериите трябва да имат ниски коагрегационни способности, за да сведат до минимум вероятността за колонизацията на патогени в стомашно-чревния тракт, а от друга страна, те трябва да имат изразени коагрегационни способности, тъй като това е един от възможните механизми за елиминиране на патогени от ГИТ (Osaña & Nader-Macias, 2020).

Новоизолираните щамове МКБ са тествани за коагрегационна способност с *E. coli* при инкубация на стайна температура за 4 часа. Щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 (13,8 %), *L. sakei* C 10-31-1 (14,4 %) и *L. plantarum* KBB 11 (15,9 %) показват най-добре изразен коагрегационен потенциал. Други изследвания описват, че щамове от тези родове имат различна способност за коагрегация, която се определя като щамово специфична (Kadyan & Pradhan, 2020; Janković et al., 2012; Abushelaibi et al., 2017).

Изразената хидрофобност при пробиотичните щамове, се свързва със способността им за взаимодействие с епителните клетки на ГИТ и вследствие на това за по-ефективно

изключване на патогени (Narendranath et al., 2001; Simões et al., 2022). Щамове с най-изразена хидрофобност са *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 (35,5%) и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 (29,7%) при инкубиране на стайна температура за 1 час. Повечето щамове от род *Lactiplantibacillus*, с изключение на КС 5-14, показват относително ниска степен на хидрофобност. При други проучвания са представени подобни резултати за по-висока хидрофобност при щамове от вида *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и за по-ниска при щамове от вида *L. plantarum* (Kadyan & Pradhan, 2020; Ibhaze et al., 2022; Samet & Icen, 2022).

2.9. Оценка на адхезивните способности на новоизолираните щамове МКБ към муцин (мукоадхезивност)

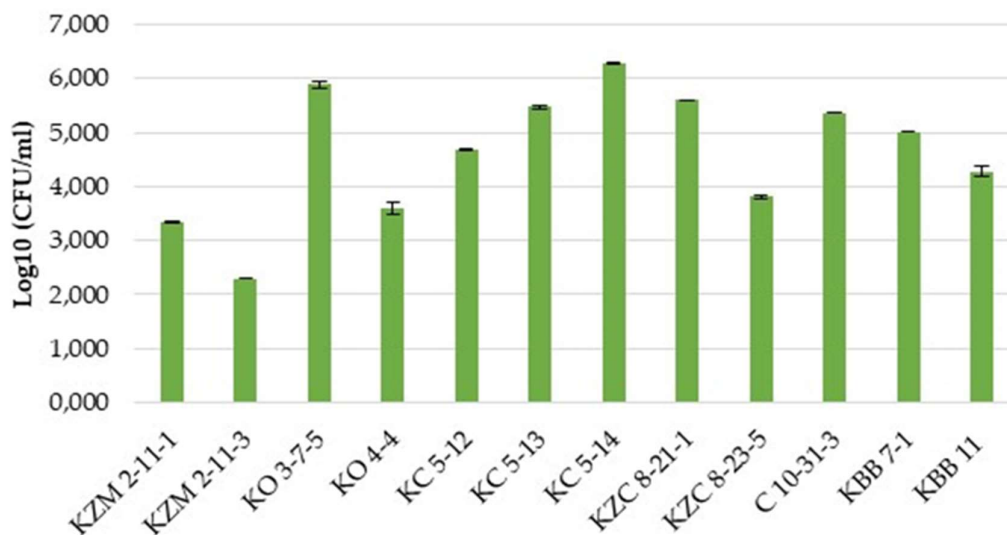
Мукозният слой, който се намира в ГИТ, защитава епителните клетки от токсини, коменсиални микроорганизми, патогени и други дразнители на околната среда. Един от защитните механизми се основава на клетъчните сигнални пътища. В структурата на мукозния слой са включени протеини, т.нар. муцини. Муцините имат важна роля във физическата защита, за образуване на химическите бариери, при клетъчното сигнализиране и регулирането на чревната абсорбция на елементи и имунни медиатори, като имуноглобулин-А (IgA) и антимикробни пептиди (Grondin et al., 2020). Един от основните критерии за оценка на пробиотичните свойства при кандидат пробиотични щамове е оценката на тяхната адхезионна способност. Във връзка с този критерий, адхезията на МКБ към муцин често се прилага като един от факторите за доказване на пробиотичните свойства на бактериите (Mukai et al., 2016).

По повърхността на бактериалните клетки присъстват протеини, които се свързват с муцинови протеини (Singh et al., 2017). Редица изследвания оценяват адхезионните способности на МКБ към мукозните протеини, като са установени адхезионни и агрегационни свойства при щам *L. reuteri* (MacKenzie et al., 2010) и при щам *Lactococcus lactis* (TIL448), който проявява висока адхезионна способност към свински стомашен муцин (Le et al., 2013). *L. fermentum* VCS87 експресира върху клетъчна повърхност протеини, които имат способност да се свързват с муцин (Macias-Rodriguez et al., 2009). Присъствието на *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* или *Lactobacillus* GG повишава два пъти адхезията на *Bifidobacterium lactis* Bb12 към модел на мукозна тъкан, въпреки че не е установено, че самият *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* може да се свързва с муцин (Ouweland et al., 2000).

Определена е адхезионната способност на новоизолираните щамове към муцин и получените резултати са представени на Фигура V.10. Мукоадхезивността на новоизолираните щамове варира и подобно на агрегационната способност може да се отбележи, че се наблюдава щамова специфичност и по отношение на тази характеристика. Най-добре изразена адхезивна способност към муцин показват щамовете *L. coryniformis* КО 3-7-5, *P. pentosaceus* КС 5-13, *L. plantarum* КС 5-14 и *L. plantarum* KZC 8-21-1 над 10^5 - 10^6 CFU/ml. Относително по-ниска адхезивност се наблюдава при щамовете *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 - 10^2 - 10^3 CFU/mL. Въпреки по-ниските отчетени стойности на свързване с муцин, тези два щамове проявяват тази специфична характеристика, която обикновено не се описва при други щамове от този вид.

Щамовете, принадлежащи към вида *L. plantarum* показват различна способност на свързване с муцин, специфична за всеки щам, като с висока мукоадхезивност 10^6 - 10^5

CFU/mL се характеризират шамове КС 5-14, КЗС 8-21-1, КВВ 7-1, средна мукоадхезивна способност с около 10^4 CFU/mL се отчита при шамове КС 5-12, КВВ 11, а по-ниска способност за адхезия под 10^4 CFU/mL е определена при шамове КО 4-4 и КЗС 8-23-5. Други автори също установяват, че шамове от видовете *L. coryniformis* и *L. plantarum* проявяват добре изразени адхезивни свойства (Singh et al., 2-17; Jatmiko et al., 2017). При проучване в научната литература не са открити данни за шамове от вида *L. sakei*, които да посочват наличие на мукоадхезивност, но получените резултати при настоящото изследване показват, че при шам *L. sakei* С 10-31-3 имат висока способност за свързване с муцин над 10^5 CFU/mL.



Фигура V.10. Адхезивна способност на изследваните шамове към муцин. Данните са представени като Log10 (CFU/ml) \pm SD.

Получените резултати за определяне на способностите за агрегиране, за хидрофобността (Таблица V.11) и адхезивните способности към муцин (Фигура V.10) са сравнени за установяване на корелация между тях, използвайки корелация на Pearson (двустранна). Установена е положителна корелация между автоагрегацията и хидрофобността при ниво $p < 0.01$. Други изследвания показват различни корелации при използване на корелационния коефициент на Spearman при шамове *Lactobacillus*, откъдето се твърди, че тяхната адхезионна способност има положителна корелация с автоагрегацията и хидрофобността (Valeriano et al., 2014), и способностите за автоагрегация при лактобацилите са силно свързани с техния коагрегационен потенциал с различни патогени (García-Cayueta et al., 2014).

2.10. Определяне способността на изследваните шамове млечнокиселите бактерии да преживяват в условия, симулиращи различни отдели на ГИТ

In vitro оценка на способността за растеж на изследваните шамове при въздействие на стресови фактори, характерни за различните отдели на ГИТ

Ниското рН в стомаха, присъствието на стомашните ензими и жлъчните соли са основните бариери на ГИТ, през които пробиотичните бактерии трябва да преминат и да запазят своята жизнеспособност и активност, за да проявят благоприятните ефекти в долните отдели на ГИТ при гостоприемника (Menconi et al., 2014). Времето за преминаване

на храната заедно с микробиотата през стомаха е от 15 минути до 4 часа, при което клетките на бактериите са изложени на агресивни условия, като рН около 1,5 – 2 и присъствие на ензими, като пепсин. Пепсинът е един от основните храносмилателни ензими, който разгражда протеините на пептиди и е активен при ниско рН между 1,5-2. След стомаха храната преминава към тънките черва, където рН на панкреатичните секрети е 7,8 – 8,4, а след това към дебелото черво. Времето за преминаване на храната през червата е около 12-24 часа, като панкреатичните ензими, разграждат различните компоненти (Sensoy, 2021). Жлъчният секрет се отделя в дуоденума и също участва в храносмилателните процеси, основно на липидите. Жлъчните соли от жлъчния секрет могат да се използват от чревните бактерии като сигнал от околната среда или в някои случаи като рецептори на електрони, или като хранителни вещества. Жлъчните соли също така могат да разрушат бактериалните мембрани, да денатурират протеини и да причинят увреждане на ДНК (Urdaneta & Casadesús, 2017).

С цел да се оцени способността на изследваните щамове за растеж при стресови фактори, те са култивирани при въздействието на различни фактори, характерни за горните и долните отдели на ГИТ и са определени коефициенти на инхибиране. Резултатите са представени в таблица V.12, като щамовете показват различни коефициенти на инхибиране при киселинни условия и присъствие на пепсин.

Таблица V.12. Коефициент на инхибиране на новоизолираните щамове при култивиране с въздействие на киселинни условия, панкреатични ензими и жлъчни соли.

Щамове	3h		24h		
	Пепсин (1 mg/ml) +pH2	Панкреатин (1 mg/ml)	Жлъчни соли 0.1%	Жлъчни соли 0.3%	Жлъчни соли 1.0%
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-1	0.70±0.19	0.17±0.12	0.72±0.33	1.09±0.09	1.12±0.08
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-3	0.60±0.23	-1.12±0.36	1.04±0.06	1.26±0.04	1.20±0.08
<i>L. coryniformis</i> КО 3-7-5	0.97±0.03	0.17±0.05	0.68±0.04	1.04±0.07	1.11±0.06
<i>L. plantarum</i> КО 4-4	0.93±0.59	-0.04±0.02	0.10±0.06	0.69±0.09	0.94±0.37
<i>L. plantarum</i> КС 5-12	0.93±0.32	-0.01±0.01	-0.05±0.29	0.31±0.13	0.45±0.30
<i>P. pentosaceus</i> КС 5-13	1.01±0.05	0.001±0.07	0.14±0.09	0.18±0.05	0.69±0.06
<i>L. plantarum</i> КС 5-14	1.02±0.12	0.51±0.02	0.61±0.05	0.60±0.04	0.52±0.02
<i>L. plantarum</i> KZC 8-21-1	0.97±0.29	0.20±0.04	0.11±0.01	0.58±0.13	0.81±0.49
<i>L. plantarum</i> KZC 8-23-5	0.94±0.05	0.07±0.01	0.11±0.04	0.39±0.11	0.85±0.31
<i>L. sakei</i> С 10-31-3	1.20±0.12	-0.26±0.18	0.46±0.09	1.04±0.04	1.06±0.04
<i>L. plantarum</i> КВВ 7-1	1.20±0.11	0.16±0.01	0.43±0.04	0.95±0.03	1.04±0.07
<i>L. plantarum</i> КВВ 11	1.02±0.03	0.26±0.05	0.50±0.06	0.83±0.02	0.97±0.04

Стойностите на коефициента на инхибиране са средни стойности от трикратни измервания ± SD.

При щамовете *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 са определени най-ниски коефициенти на инхибиране в присъствие на пепсин и рН 2. Присъствието на панкреатичните ензими не оказва влияние или се наблюдава много слабо инхибиране при всички щамове. При въздействие на жлъчните соли в различни концентрации (0,1%, 0,3%, 1,0%), се наблюдава, че с повишаване на концентрацията, се повишават и коефициентите на инхибиране, определени за различните щамове. При концентрация на жлъчните соли 0,1%, при пет щама (КО 4-4, КС 5-12, КС 5-13, KZC 8-21-1 и KZC 8-23 -5) е определен много нисък коефициент на инхибиране. При концентрация от 0,3% жлъчни соли само при три щама (КС 5-12, КС 5-13 и KZC 8-23-5) коефициентът на инхибиране е по-малко от 0,4, докато при концентрации 1,0% само при щамът КС 5-12 коефициентът на инхибиране е близо до 0,4. Щамове, при които коефициентът на

инхибиране е до 0,4 при концентрация на жлъчни соли от 0,3%, могат да се приемат като подходящи пробиотични кандидати според Salehizadeh et al., (2020).

МКБ са ацидофилни и толерантни към ниско рН, обаче високата концентрация на свободни (H⁺) могат да причинят инхибиране на растежа (Menconi et al., 2014). Промените във външната среда като повишена концентрация на жлъчните соли и ниско рН могат да причинят метаболитни нарушения, водещи дори до клетъчна смърт. Присъствието на постоянен стресов фактор при микроорганизмите е предпоставка за развиване на механизми за устойчивост за оцеляване в такива условия.

Вътреклетъчното рН намалява с увеличаване на киселинността в околната среда, което води до потребление на енергия от клетките, за да поддържат метаболитната си активност под контрол. Когато рН спадне твърде ниско, хомеостазата на рН се нарушава, причинявайки увреждане на протеините и ДНК както и структурни нарушения в клетките (Urdaneta & Casadesús, 2017; Guan & Liu, 2020). С цел да се определи дали излагането на стресови фактори повлиява способността на клетките за растеж и справяне с метаболитните изменения е направена оценка на растежа на изследваните щамове при измерване на оптичната плътност (OD) на бактериалната култура при 600 nm и съгласно Missotten et al., (2009) резултатите са представени като: 1) „+“, растеж ≤ 0,2 OD; 2) „++“, 0,2 < растеж ≤ 0,5 OD; 3) „+++“, растеж > 0,5 OD (таблица V.13).

Таблица V.13. Оценка на растежа на бактериите при въздействие на рН2 и пепсин, панкреатични ензими и жлъчни соли в концентрации от 0,1%, 0,3% и 1%.

Щамове	Растеж на бактерии				
	Пепсин (1 mg/ml) +рН2	Панкреатин (1 mg/ml)	Жлъчни соли 0.1%	Жлъчни соли 0.3%	Жлъчни соли 1.0%
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-1	+	++	+	n.d.	n.d.
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-3	+	+++	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. coryniformis</i> КО 3-7-5	n.d.	+++	++	n.d.	n.d.
<i>L. plantarum</i> КО 4-4	n.d.	+++	+++	++	+
<i>L. plantarum</i> КС 5-12	+	+++	+++	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> КС 5-13	n.d.	+++	+++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> КС 5-14	n.d.	+++	+++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> KZC 8-21-1	+	+++	+++	+++	++
<i>L. plantarum</i> KZC 8-23-5	+	+++	+++	+++	++
<i>L. sakei</i> C 10-31-3	n.d.	+++	+++	n.d.	n.d.
<i>L. plantarum</i> KBB 7-1	n.d.	+++	+++	+	n.d.
<i>L. plantarum</i> KBB 11	n.d.	+++	+++	++	+

Растеж на бактерии: +, растеж ≤ 0,2; ++, 0,2 < растеж ≤ 0,5; +++, растеж > 0,5. n.d.- не е измерено изменение в OD.

Резултатите показват, че някои от щамове могат да запазват способност за растеж при рН 2 и в присъствие на пепсин. При всичките щамове се наблюдава много добър растеж в присъствие на панкреатин. При различните концентрации на жлъчни соли се наблюдават промени по отношение на растежа на бактериите, дори и липса на растеж при някои от щамове, отчетен като липса на изменение в измерваната оптична плътност (таблица V.13).

Оценка за преживяемост на изследваните щамове при пряко въздействие на стресови фактори, характерни за различни отдели на ГИТ

Повечето микроорганизми могат да се адаптират към промените във външните условия, за да преживеят при тези условия и да имат възможност да се развиват и

размножават. Например, за да се адаптират микроорганизмите към киселинни среди, те развиват подобрена киселинна толерантност чрез различни метаболитни регулаторни механизми. Микроорганизмите могат да защитават или възстановяват макромолекули като ДНК и протеини чрез специфични протеини (ДНК полимераза, ДНК лигаза, шаперони), които се индуцират например при киселинен стрес. Микроорганизмите имат способност да подобряват метаболизма, редокс факторите за оцеляване и растеж, чрез регулиране на гликолитичния път. Отговорът на стресови фактори може да включва различни елементи от клетъчния метаболизъм и да е видово, дори шамово специфичен (Guan & Liu, 2020).

За оценка на способността за преживяване, новоизолираните шамове МКБ са поставени под прякото въздействие на стресови фактори, характерни за ГИТ, чрез инкубиране с пепсин при ниско рН и с жлъчни соли с концентрация 0,3%. Резултатите за преживяемост при изследваните шамове като log₁₀ CFU/ml и в проценти са представени в таблица V.14. В присъствието на пепсин и ниско рН, при повечето шамове се наблюдава преживяемост над 50%. При шамовете *L. bulgaricus* KZM 2-11-1, *L. bulgaricus* KZM 2-11-3, не е отчетена способност за преживяване при директно въздействие на пепсин и рН 2 в рамките на 3 часа. За шам *L. sakei* C 10-31-3 също не е отчетена способност да преживява в такива условия. В присъствието на жлъчни соли с концентрация 0,3%, при всички шамове е отчетена преживяемост над 45% като % на преживяемост достига до 94%. В други проучвания се посочва, че шамове от видовете *L. plantarum* и *P. pentosaceus* имат най-добре изразена способност за преживяване при въздействия на различните фактори в ГИТ (Singh et al., 2017; Pinto et al., 2020; Sharifi Yazdi et al., 2017; Salehizadeh et al., 2020).

Таблица V.14. Преживяемост на новоизолираните шамове при пряко въздействие на киселинни условия и жлъчни соли.

Щамовете МКБ	рН на шамова култура	Пепсин (1 mg/ml) + рН2			Жлъчни соли 0.3%		
		Контрола 3ч.	Пепсин+ рН2 3ч.	Преживяемост (%)	Контрола 24ч.	Жлъчни соли 24ч.	Преживяемост (%)
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-1	3.48	7.73±0.05	n.d.	-	5.50±0.01	2.48±0.35	45
<i>L. bulgaricus</i> KZM 2-11-3	3.50	8.13±0.02	n.d.	-	4.40±0.09	2.56±0.18	58
<i>L. coryniformis</i> КО 3-7-5	3.52	8.25±0.04	5.13±0.01	62	7.91±0.04	4.21±0.00	53
<i>L. plantarum</i> КО 4-4	3.02	8.84±0.03	8.05±0.01	91	8.02±0.02	6.94±0.00	87
<i>L. plantarum</i> КС 5-12	3.19	7.53±0.05	6.09±0.01	81	8.30±0.16	6.91±0.00	83
<i>P. pentosaceus</i> КС 5-13	3.20	8.71±0.01	4.31±0.02	50	8.18±0.06	7.24±0.01	88
<i>L. plantarum</i> КС 5-14	3.03	8.64±0.04	8.09±0.01	94	8.81±0.03	5.74±0.04	65
<i>L. plantarum</i> КЗС 8-21-1	2.91	8.33±0.01	7.95±0.00	95	8.39±0.01	6.56±0.07	78
<i>L. plantarum</i> КЗС 8-23-5	2.96	8.72±0.02	8.34±0.00	96	8.81±0.10	6.73±0.01	76
<i>L. sakei</i> C 10-31-3	3.84	8.15±0.03	n.d.	-	7.56±0.03	7.12±0.00	94
<i>L. plantarum</i> КВВ 7-1	3.84	8.89±0.02	6.22±0.08	70	8.44±0.01	7.13±0.01	84
<i>L. plantarum</i> КВВ 11	3.81	8.83±0.01	6.59±0.05	75	8.15±0.07	7.04±0.02	86

Стойностите на log₁₀ CFU/ml са средни стойности на измерванията ±SD. Способността за оцеляване е изразена като % от средните стойности. n.d.- не са отчетени cfu/ml.

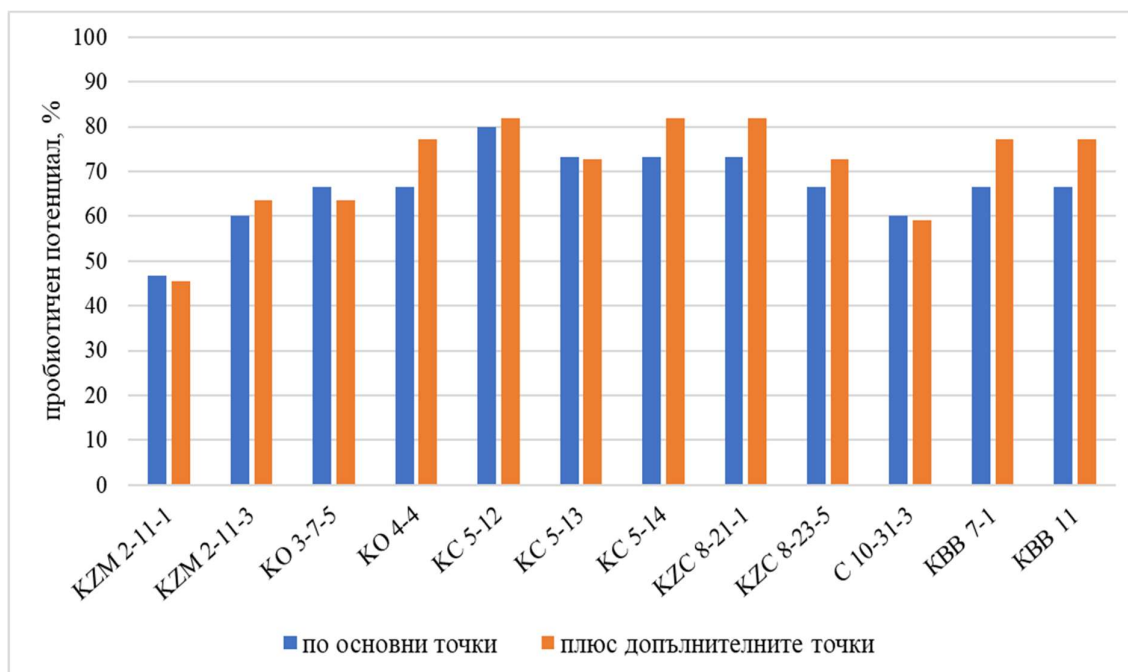
За да се определи със статистическа достоверност дали има връзка между способността на изследваните шамове да преживяват в киселинни условия, при наличие на жлъчни соли и постигнатото ниво на рН, при култивиране на всеки шам, е направен корелационен анализ на Pearson. Между нивото на рН на културата и преживяемостта в присъствие на пепсин и ниско рН, беше установена положителна корелация с корелационен коефициент на Pearson със значимост p<0,01. Това показва, че шамовете, които продуцират по-големи количества киселини (предимно млечна киселина) и се наблюдава по-ниско рН при тяхното култивиране, могат по-успешно да преживеят при киселинни условия.

Относителната толерантност към киселинни условия е щамово специфична и преживяемостта на конкретния щам се свързва с контролните механизми на вътреклетъчното рН и H^+ , а АТФазите играят основна роля (Hutkins & Nannen, 1993). Това показва, че щамовете, при чието култивиране намалява извънклетъчното рН, са способни да оцелеят при киселинните условия на стомаха, в следствие на по-сложни механизми за защита и възстановяване на клетките си при такива условия.

2.11. Оценка на пробиотичния потенциал на новоизолираните щамове МКБ

За да се направи сравнение и количествена оценка на пробиотичния потенциал на изследваните щамове е приложена точкова система на оценяване за всеки щам по изследваните свойства и определяне в проценти от максималния възможен сбор като пробиотичен потенциал (Gökmen, G.G., et al., 2024). В таблица V.15 са представени точките за оценяване по отделните изследвани свойства, а пробиотичния потенциал в проценти е представен на фигура V.11.

При направената оценка за пробиотичния потенциал на изследваните щамове е определено, че най-добре изразен потенциал се отчита при щам *L. plantarum* КС 5-12, при който по основните характеристики е определен потенциал 80%. Следващите два щам КС 5-14 и КЗС 8-21-1 с оценка за пробиотичен потенциал над 70% също са от вида *L. plantarum*. При щам *P. pentosaceus* КС 5-13 също е отчетен над 70% пробиотичен потенциал. Важно е да се отбележи, че при двата щам *L. bulgaricus* КЗМ 2-11-1 и *L. bulgaricus* КЗМ 2-11-3 също е определен значим пробиотичен потенциал, който при щам КЗМ 2-11-3 е 60% по основните характеристики и над 60% с допълнителните характеристики. Щамове от вида *L. bulgaricus* традиционно са част от стартерните култури за производство на ферментирани млечни продукти, а двата щам от този вид, които са включени в настоящото изследване са изолати от традиционно приготвено кисело мляко. Подобни щамове с пробиотичен потенциал са обект на интерес за включване в производствени стартерни култури, с цел повишане на функционалните характеристики на крайните продукти.



Фигура V.11. Пробиотичен потенциал на изследваните щамове, %

Таблица V.15. Количествена оценка на пробиотичния потенциал на изследваните щамове по точкова система

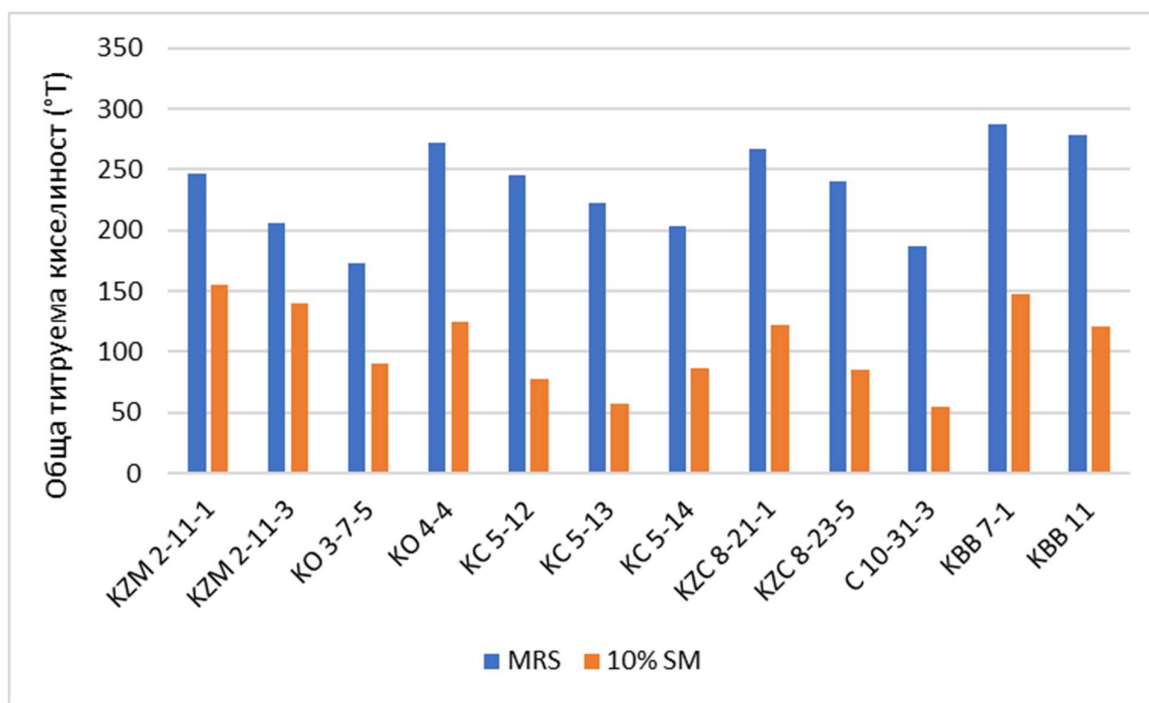
Пробиотични и функционални характеристика			Оценки по изследвани щамове											
	оценяване		KZM	KZM	KO	KO	KC	KC	KC	KZC	KZC	C	KBB	KBB
	индикатор	точки	2-11-1	2-11-3	3-7-5	4-4	5-12	5-13	5-14	8-21-1	8-23-5	10-31-3	7-1	11
Активност с/у бактериални и дрождеви тест патогени	Няма	0	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3
	до 3 тест МО	2												
	Повече от 3 тест МО	3												
Антивирусна активност	Няма	0	0	2	0	2	2	0	1	0	2	0	0	0
	SI индекс ≤ 15	1												
	SI индекс > 15	2												
МАП индекс	< 0.2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	≥ 0,2	1												
Агрегационен потенциал	< 20	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
	≥ 20	1												
коагрегация	няма	0	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2
	< 10%	1												
	≥ 10	2												
мукоадхезивност	няма	0	1	1	3	1	2	3	3	3	1	3	2	2
	До 10 ⁴ CFU/ml	1												
	10 ⁴ - 10 ⁵	2												
	Над 10 ⁵	3												
Преживяемост при симулирани условия в ГИТ	Пепсин + рН2		0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2
	няма	0												
	До 40 %	1												
	Над 40 %	2												
Коефициент на инхибиране при 0,3 % жлъчни соли	До 0,4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
	Над 0,4	0												
ОБЩО ТОЧКИ		Max 15	7	9	10	10	12	11	11	11	10	9	10	10
Допълнителни свойства														
Инхибиране на хранително асоциирани контаминанти	Плесени 100% инхибиране		2	2	3	4	3	3	4	4	3	2	4	4
	<i>A. niger</i>		1											
	<i>F.proliferatum</i>		1											
	<i>P. claviforme</i>		1											
	<i>A. flavus</i>		1											
	Дрожди над 48 h		1	3	1	3	3	2	3	3	3	2	3	3
	<i>K. lactis</i>		1											
	<i>K. marxianus</i>		1											
	<i>S. cerevisiae</i>		1											
ОБЩ БРОЙ ТОЧКИ		Max 22	10	14	14	17	18	16	18	18	16	13	17	17

3. Определяне на основни технологични характеристики на изследваните щамове

3.1. Определяне на обща киселинообразуваща способност

Органичните киселини, като млечна, оцетна и др., са едни от основните метаболити, произведени от МКБ при ферментация. Продуцираните органични киселини могат да подобрят вкуса на ферментиралите храни и да предотвратят развалянето им, следствие от което е по-доброто приемане от страна на потребителите. Най-важните характеристики при ферментиралите храни, които се определят от продуцираните органични киселини са свързани с вкуса и аромата, както и с антимикуробни и антиоксидантни ефекти (de Souza, E.L., et al., 2023). Това е основната причина, поради която една от основните технологични характеристики при подбор на щамове МКБ е свързана с определяне на тяхната киселинообразуваща способност.

За оценяване на киселинообразуващата способност при изследваните щамове, е определена общата титруема киселинност (ТК) при култивиране на среда MRS бульон и на среда SM (фигура V.12). Общата титруема киселинност при всички изследвани щамове е по-ниска при среда SM в сравнение със среда MRS бульон. Щамовете, при които се наблюдава най-ниска титруема киселинност при среда SM са *L. sakei* C 10-31-3 и *P. pentosaceus* KC 5-13, а при среда MRS бульон са *L. coryniformis* KO 3-7-5 и *L. sakei* C 10-31-3. При двата щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и при щам *L. plantarum* KBB 7-1 се наблюдава ТК до 150 °Т при 24 часово култивиране на среда SM, а при останалите изследвани щамове този показател е по-нисък.



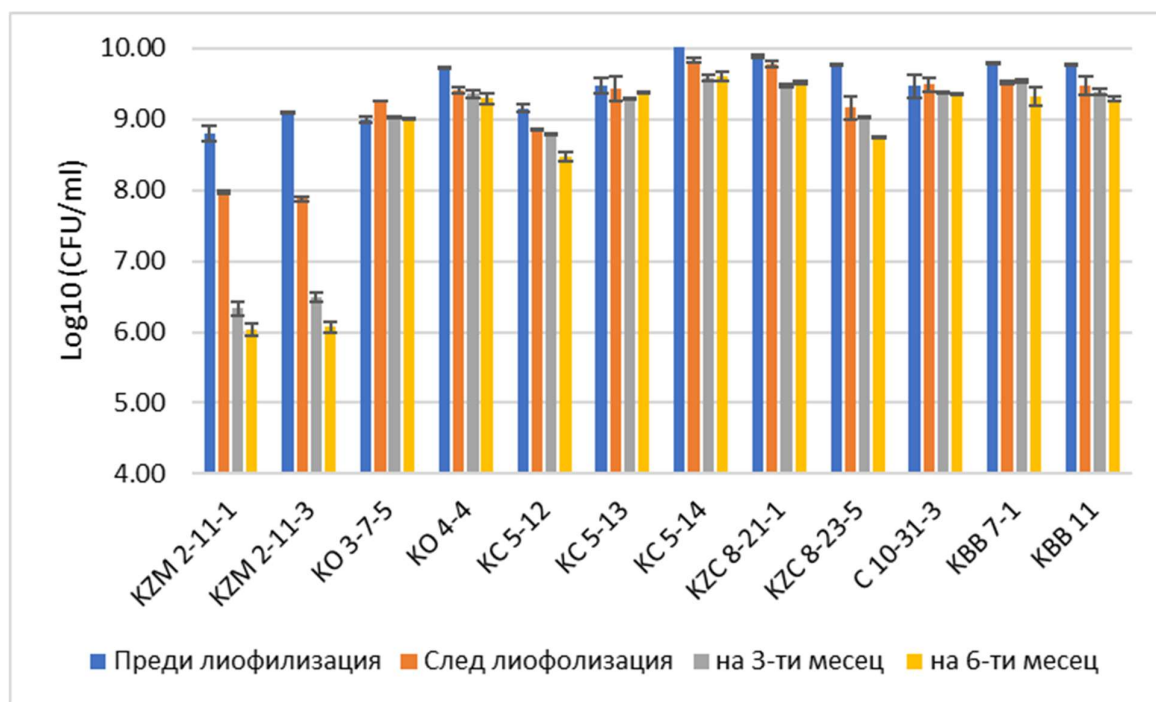
Фигура V.12. Обща титруема киселинност при култивиране на изследваните щамове МКБ на среда MRS бульон и среда SM, (°Т)

3.2. Устойчивост при технологични процеси – определяне на преживяемост при процес на лиофилизация и подбор на подходящи протекторни среди.

Сублимационното сушене (лиофилизация) е един от основните технологични етапи, които са част от производствата на стартерни култури и на пробиотични препарати.

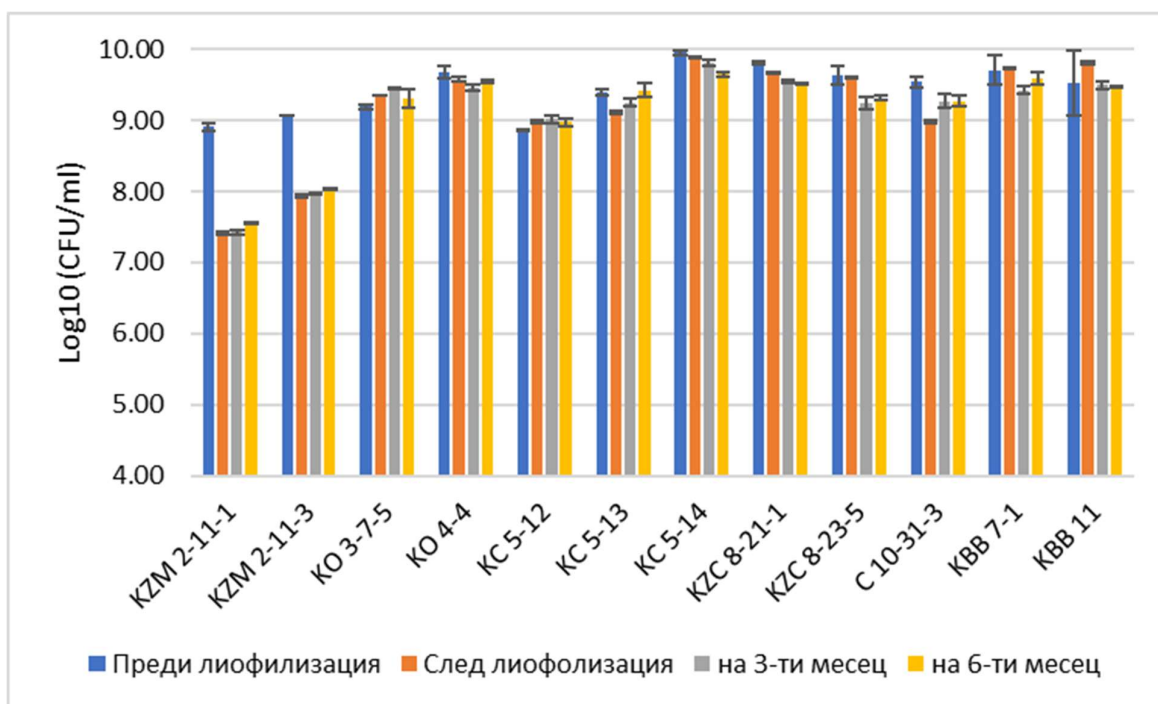
Установяването на добра технологична устойчивост и подходящи условия за провеждане на основни процеси при запазване на жизнеността и активността на потенциално значими щамове МКБ са важен етап от тяхната цялостна оценка за включване в нови продукти.

При новоизолираните щамове МКБ е проведено изследване за оценка на преживяемост при процес на лиофилизация при два вида протекторни среди и след период на съхранение при 4°C. При използването на свежа среда 10% обезмаслено мляко като възможно най-икономически изгоден лиопротектор се установи, че при някои от щамовете се наблюдава значима редукция при CFU, както непосредствено след процеса на лиофилизация, така и в периода на съхранение. При двата щама *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* се наблюдава по-значително редуциране на CFU, с до 1 логаритмичен порядък след края на процеса и до 3 порядъка за 6 месечен период на съхранение. При другите изследвани щамове се наблюдава с до 1 порядък намаляване при CFU (фигура V.13).



Фигура V.13. Преживяемост на изследваните щамове при процес на лиофилизация и последващо съхранение при протекторна среда 10% обезмаслено мляко. Представени са средни стойности на трикратни измервания \pm SD.

Получените резултати наложиха конструиране на по-подходяща лиопротекторна среда, в следствие на проучване в научната литература (Teng et al., 2017; Stefanello et al., 2018; Gul et al., 2020), включваща 10% обезмаслено мляко, 5% лактоза и 2 % аскорбинова киселина (витамин С). При този вариант на протекторна среда се наблюдава значително по-добра преживяемост, включително и при двата щама KZM 2-11-1 и KZM 2-11-3, при които се запазва порядъка на CFU 10^7 до 10^8 за периода на съхранение, което определя тази протекторна среда като по-подходяща за приложение (фигура V.14).



Фигура V.14. Преживяемост на изследваните щамове при процес на лиофилизация и последващо съхранение при протекторна среда 10% обезмаслено мляко + 5% лактоза + 2% витамин С. Представени са средни стойности на трикратни измервания \pm SD.

Получените резултати за влиянието на компонентния състав на протекторните среди при процес на лиофилизация са много добра основа за разработване на технологично решение за получаване в изсушена форма и съхранение при запазване на жизнеспособността и активността на потенциално пробиотични и/или технологично значими щамове МКБ.

4. Включване на подобрени щамове от изследваните нови изолати МКБ в моделен продукт и определяне на основни характеристики

4.1. Подбор на щамове и получаване на моделен продукт

За целите на последващата експериментална работа са избрани два щамове от групата нови изолати, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3, *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12. Щам KC 5-12 е избран поради определения най-висок пробиотичен потенциал от групата изследвани щамове, а също така той е изолат от краве сирене. Щам KZM 2-11-3 е избран, поради принадлежността си към вида *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, който е задължително присъстващ в симбионтните стартерни култури за кисело мляко, но също така показва значим за щамове от този вид пробиотичен потенциал (фигура V.11), като проявява добре изразени агрегационни свойства, мукоадхезивност, антивирусна активност и способност за инхибиране на хранително асоциирани контаминанти. Подбраните щамове са включени при получаването на моделни продукти – кисело мляко, самостоятелно и в комбинация. Като контролни варианти са приготвени проби на кисело мляко с комерсиална стартерна култура, използвана за производство на кисело мляко по БДС 12:2010. Подробно описание на четирите варианта на приготвени проби кисело мляко са описани в т. 12. на раздел Материали и методи.

4.2. Изследване на основни физикохимични характеристики на четирите варианта моделен продукт по време на процеса на ферментация и за период на съхранение

Всеки хранителен продукт има съответните норми и определени изисквания за качество, на които трябва да отговаря. Някои от основните показатели, които се проследяват по време на процеса на ферментация и за оценка на качеството на продукта са рН, редокс потенциал (РП) и титруема киселинност (ТК) (Lee W. & Lucey J., 2010; Martin et al., 2011; Garcia & Cisneros, 2013). В настоящото изследване характеристиките на четирите варианта киселото мляко се определят чрез анализиране на различни параметри по време на процеса на ферментация и по време на период на съхранение до 28 денонощия. На фигура V.15 е представена снимка на 4-те варианта на кисело мляко, подготвени съгласно описанието в раздел Материали и методи.

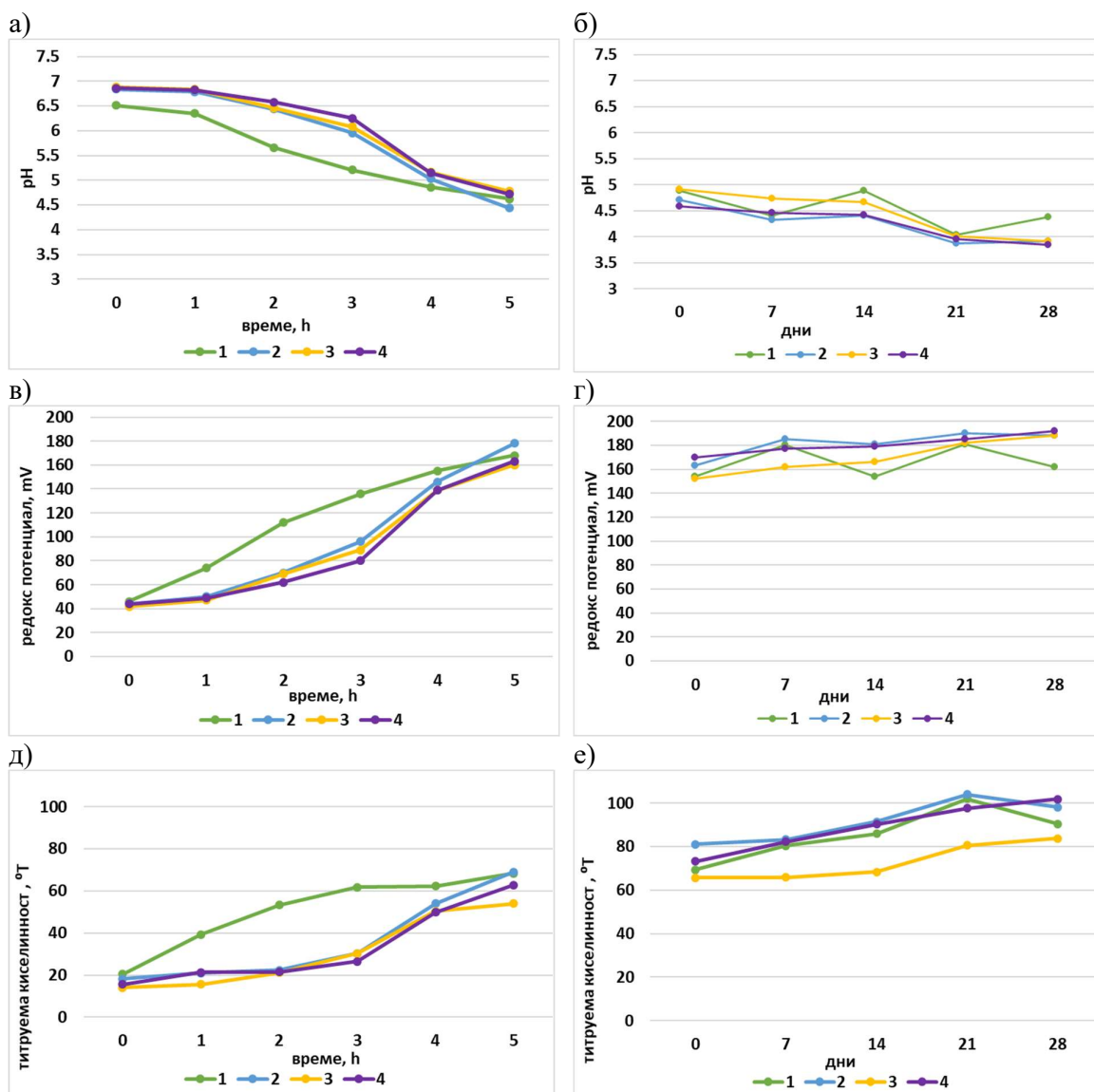


Фигура V.15. Пригответни варианти на кисело мляко на 0 ден на съхранение при 4°C

Проследяване на рН, редокс потенциал и титруема киселинност при четирите варианта моделен продукт кисело мляко

На фигура V.16 са представени резултатите от проследяване на динамиката на трите основни параметъра рН, РП и ТК по време на процеса на ферментация и за периода на съхранение при 4 °С за четири варианта проби кисели млека. Развитието на всеки от подбраните щамове в пригответните проби води до натрупване на млечна киселина и други органични киселини, в следствие на което хранителната матрица се подкислява и рН постепенно намалява, а концентрацията на водородни йони (H⁺) се увеличава (Ito et al., 2003). Продуцирането на млечна киселина е важен механизъм за оформяне на характеристиките на крайния продукт кисело мляко, като определя намаляването на рН и последващата киселинна коагулация на млечните протеини, за да образуват гел структурата на киселото мляко (Kwasi Kpodo et al., 2014).

По време на процеса на ферментация за получаване на моделните продукти кисело мляко се наблюдават два етапа (фигура V.16). През първият етап, до около 4-ти час, се забелязва, че кривите на изменение на измерваните параметри рН и ТК, при пробите кисело мляко с включените поотделно или в комбинация два щам, продължават да се различават от тези на контролната проба кисело мляко (вариант 1). Вторият етап включва последният час от процеса на ферментация, при който кривите на измерваните параметри при всички проби са подобни и рН в края на процеса на ферментация във всички проби кисело мляко е сходно с това в контролния вариант, и е в границите 4,4–4,8. Кривите по отношение на рН на пробите от кисело мляко са сходни за периода на съхранение и рН е в границите 3,8–4,8 до 28-ми ден.



Фигура V.16. Параметри на моделните продукти кисело мляко а) рН, в) РП и д) ТК по време на ферментация и б) рН, г) РП и е) ТК по време на съхранение.

Редокс потенциалът (РП) е един от най-важните параметри при процесите на ферментация. Според Martin et al., (2011) изменението в РП стимулира производството на ароматни съединения, които определят характеристиките на крайните продукти. ТК също е важен параметър, свързан с качеството на крайния продукт. И при двата параметъра РП и ТК не се наблюдават големи вариации в сравнение с контролния вариант, както на етапа на ферментация, така и по време на съхранение. В края на процеса на ферментация РП е в диапазона 160–180 (mV), а по време на съхранение леко варира в диапазона 150–190 (mV). ТК в края на процеса на ферментация е подобна на тази в контролния вариант, 50–70 (°T). Леки вариации се отчитат при ТК по време на съхранение, като в сравнение с контролния вариант при проба 3 ТК се задържа най-ниска, а при проби 2 и 4 стойностите са подобни на контролния вариант 1. Подобни резултати по трите основни физикохимични параметъра на киселото мляко по време на процеса на ферментация са описани и от други автори (Pargareti et al., 2021) и такива леки вариации в параметрите по време на съхранение също са отчетени при подобни експерименти (Fayyaz et al., 2020).

Проледяване на капацитета за задържане на вода (WNC) и синерезис в периода на съхранение на четирите варианта моделен продукт кисело мляко

Основните компоненти в състава на киселото мляко са вода, протеини, мазнини, полизахариди, като то е и богат източник на витамини от групата В, калций, магнезий и др. (Lee W. & Lucey J., 2010; Hadjimbei et al., 2022). Намалването на рН по време на ферментацията и денатуриране на млечните протеини води до образуването на гелобразната структура при киселото мляко. Хидрофилната част от молекулата на казеина има способност да свързва водни молекули и това взаимодействие протеин-вода влияе върху цвета, структурата, емулгирането и сензорните свойства на крайния продукт. Водното съдържание на продукта зависи от състава на млякото, аминокиселинния състав на протеините, тяхното молекулно тегло, свойствата на съставните аминокиселини, други фактори на околната среда като рН, температура, йонна сила и видовия състав на бактериалните стартерни култури. Водното съдържание в продукта има съществено значение за микробния растеж (Hole, 2003; Hayes et al., 2007; Mok et al., 2008; Naque et al., 2017). Zayas, (1997) дефинира капацитета за задържане на вода (WNC) при храните като способността да задържат собствената си и добавената вода по време на прилагане на сили, т.е. пресоване, центрофугиране или нагриване. WNC на протеиновия гел при киселото мляко е много важна характеристика, свързана с вискозитета и синерезиса (Zayas, 1997). Този параметър при киселото мляко влияе върху текстурата на продукта и е важен параметър при изследване на качеството.

Резултатите за WNC на пробите кисело мляко са представени в Таблица V.16. Пробата с най-висок WNC в казеиновата мицеларна структура, подобна на контролния вариант кисело мляко, е вариант 3, макар че не са отчетени значими различия между отделните проби. Не се наблюдава и статистически значима разлика в WNC по време на съхранение на пробите кисело мляко. Проучванията и на други автори показват, че стойностите за процентите WNC са приблизително подобни на получените при този експеримент (Dan et al., 2012; Parvarei et al., 2021).

Таблица V.16. Капацитета за задържане на вода (WNC) при четирите варианта проби на киселото мляко

Съхранение	WNC, %			
	Проби киселото мляко			
	1	2	3	4
0 ден	36.7±0.02	35.1±2.60	37.7±3.37	35.5±0.20
7 дни	35.8±0.96	33.3±0.13	35.3±0.74	34.3±0.12
14 дни	38.2±0.92	36.5±1.26	36.7±0.96	35.8±1.15
21 дни	36.4±0.89	34.3±0.24	34.9±0.94	34.3±0.52
28 дни	36.7±2.44	35.1±2.17	37.7±2.13	35.5±2.11

Процентите на капацитета за задържане на вода се изразяват като средна стойност ± SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на проби от кисело мляко за периода на съхранение ($p > 0,05$).

Нестабилността на структурата на храните се илюстрира чрез отделянето на водата, която се губи от геловите, в случая от гела на киселото мляко, особено по време на съхранение при ниска температура (Hole, 2003). Матрицата от казеинови мицели в киселото мляко може да се преструктурира поради различни причини, включително вследствие на метаболитната активност на щамовете от стартерната култура, подкисляването и обработката след етапа на ферментация, в резултат на което се наблюдава отделяне на водна

фаза. Синерезисът представлява феномен на загуба на водно съдържание и е нежелан при киселото мляко. Синерезисът се счита за дефект на текстурата на киселото мляко (Plaune et al., 2003).

Резултатите от определяне на синерезиса при изследваните варианти кисело мляко са представени в таблица V.17, като най-общо се наблюдава слабо намаляване на синерезиса от първия ден до 28-ия ден на съхранение на продукта, като този показател слабо варира при различните периоди на отчитане. Пробите от кисело мляко с най-ниско количество отделена водна фаза, т.е. подобно на контролното кисело мляко, са проби 3 и 4. След първите 7 дни на съхранение, при проба 4 е отчетен най-нисък % синерезис, а 14-ия ден, най-ниски са стойностите при проба 3. След статистическата обработка на данните на синерезиса не се наблюдават значими разлики между пробите в сравнение с контролния вариант. Подобни резултати на синерезис са установени и при други проучвания (Benezech T. & Maingonnat J.F., 1994; Soni et al., 2020).

Таблица V.17. Синерезис при тестваните варианти на моделен продукт кисело мляко

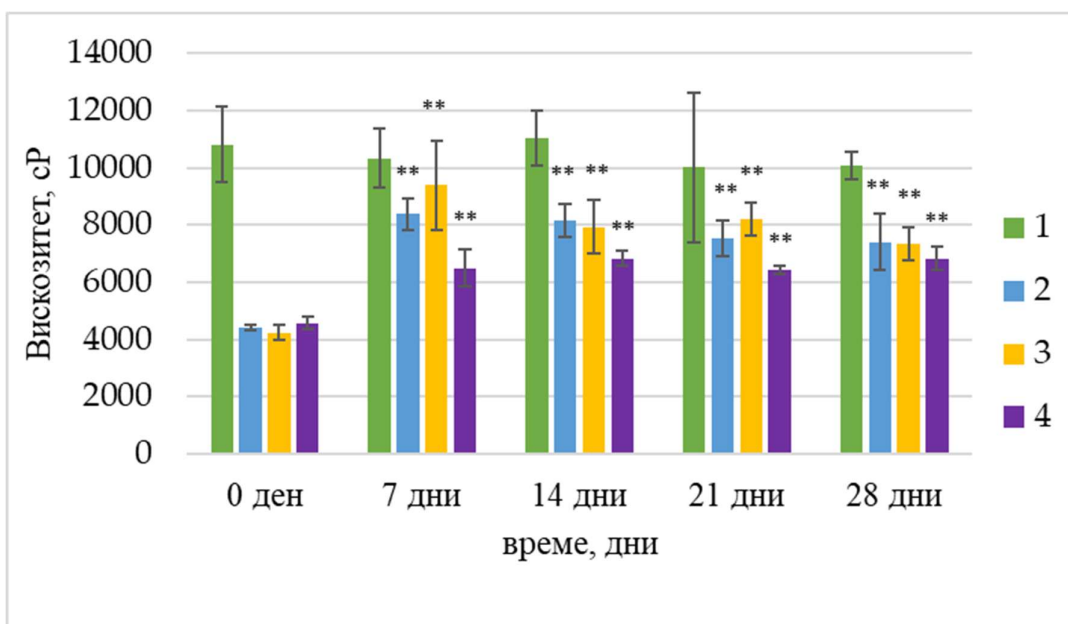
Съхранение	Синерезис, %			
	Проби кисело мляко			
	1	2	3	4
0 ден	8.6±1.50	12.6±0.50	10.0±3.25	9.4±0.80
7 дни	7.6±0.80	12.9±2.70	10.2±0.70	7.8±0.68
14 дни	7.3±0.95	10.0±0.30	8.4±0.00	9.6±1.44
21 дни	8.6±1.80	8.8±1.10	8.3±1.20	10.3±0.78
28 дни	6.7±1.05	9.9±0.85	6.7±0.00	6.9±3.44

Процентите на синерезис се изразяват като средна стойност ± SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на проби от кисело мляко за периода на съхранение ($p > 0,05$).

В обобщение може да се посочи, че при вариантите на моделния продукт кисело мляко с включените два щама поотделно и в комбинация, не са определени съществени разлики по основните физикохимични параметри, които значително се доближават до контролния вариант. Това е добра предпоставка за включване на тези два щама с пробиотичен потенциал в състава на стартерни култури.

Проследяване изменението на вискозитета на пробите кисело мляко по време на съхранение

Реологичните свойства имат особено значение за качеството на продуктите, като по-важните фактори, които влияят на вискозитета са видовият състав на използваните щамове в стартерната култура, както и температурата на инкубация. Стартерната култура е основен фактор за промени при вискозитета на киселото мляко. Ниска температура на инкубация при получаване на продукта на етапа на ферментация води до по-нисък вискозитет. Намаляването на синерезиса води до увеличаване на вискозитета (Nambiar et al., 2018). Когато се следи качеството на продукта вискозитетът е от важните параметри, за които е необходимо да се изследва продукта. Според Mok et al., (2008), когато се образува протеиновия гел, вискозитетът нараства бързо и след това достига плато, когато се формира крайната мрежовидна структура, улавяща масните глобули и водната фаза. Счита се, че увеличаването на структурната здравина на протеиновата мрежа увеличава привидния вискозитет. Резултатите за проследяване на вискозитета на четирите изследвани проби са представени на фигура V.17.



Фигура V.17. Изменение на вискозитета на пробите моделен продукт кисело мляко по време на съхранение, centipoise (cP).

Данните са представени като средна стойност \pm SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на проби от кисело мляко за периода на съхранение (** $p < 0,01$).

На 0^{ев} ден от съхранението, пробите кисело мляко показват по-нисък вискозитет сравнително с контролния вариант. Той се увеличава значително след 7-ми ден на съхранение, доближавайки се до стойността на контролния вариант. Проба 3 с инокулиран щам *L. plantarum* КС 5-12 показва вискозитет, който най-силно се приближава до контролната проба. Щамове от вида *L. plantarum* притежават способност да продуцират екзополisahарид с висока термична стабилност. Присъствието на такива екзополisahариди може да доведе до подобряване на структурата на киселото мляко чрез увеличаване на вискозитета (Yang & Yoon, 2022). Yan et al., (2019) посочват, че при гръцкото кисело мляко, съдържащо *L. plantarum* се отчита висок вискозитет, а киселото мляко с по-нисък се получава при включване на *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

При настоящото изследване най-нисък вискозитет е отчетен при проба 4, инокулирана със смес на два щамове в съотношение 1:1 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* КС 5-12. Тези специфични разлики в резултатите могат да бъдат обосновани, вследствие на взаимодействия между щамовете в комбинирани стартерни култури. При контролната проба на киселото мляко не е установена статистически значима разлика при определения вискозитет в периода на съхранение, докато при проба 2, 3 и 4 вискозитетът се повишава на 7-ми ден от съхранението със статистически значима разлика, запазвайки относителна стабилност до 28-ия ден на съхранението.

Вискозитетът е важна характеристика, която определя текстурата на продукта, но е свързана и с капацитета за задържане на вода и синерезиса (Zayas, 1997). Вискозитетът на крайния продукт може съществено да се повлияе по време на процеса на ферментация. Един от факторите, които влияят на процеса на ферментацията, следователно на вискозитета на продукта, е наличието на различни щамове в използваната стартерна култура. Присъствието на различни щамове води до производството на киселини с различна скорост и концентрация, което определя и зависимостта на вискозитета на крайния продукт от

стартерната културата (Oktavia et al., 2016). За да се определи връзката между параметрите капацитет за задържане на вода, синерезис, рН, ТК и вискозитет, е направен корелационен анализ на Pearson. Обработените резултати показват, че между всички параметри има много силна положителна корелация, с коефициент на корелация на Pearson (r) > 0,5.

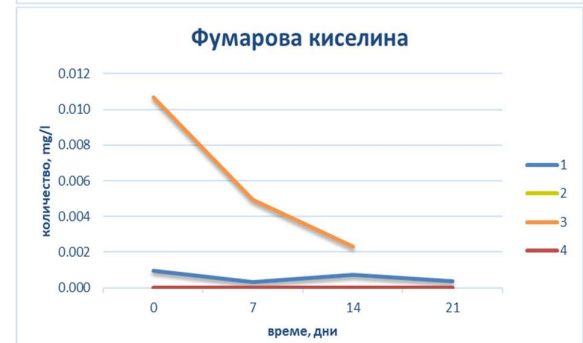
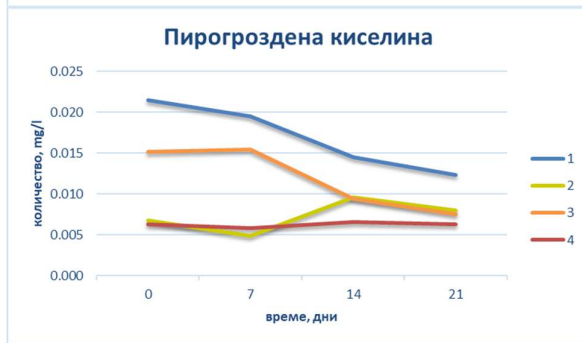
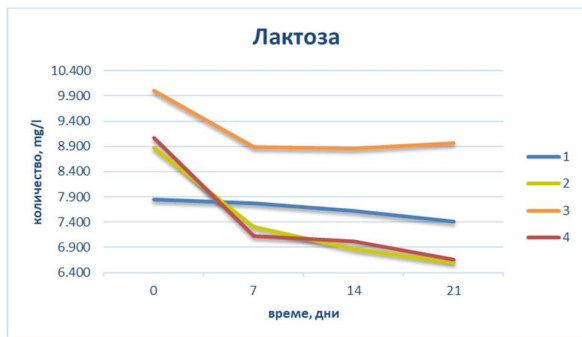
4.3. Изследване на метаболитния профил на получените млечнокисели продукти чрез ЯМР спектроскопия.

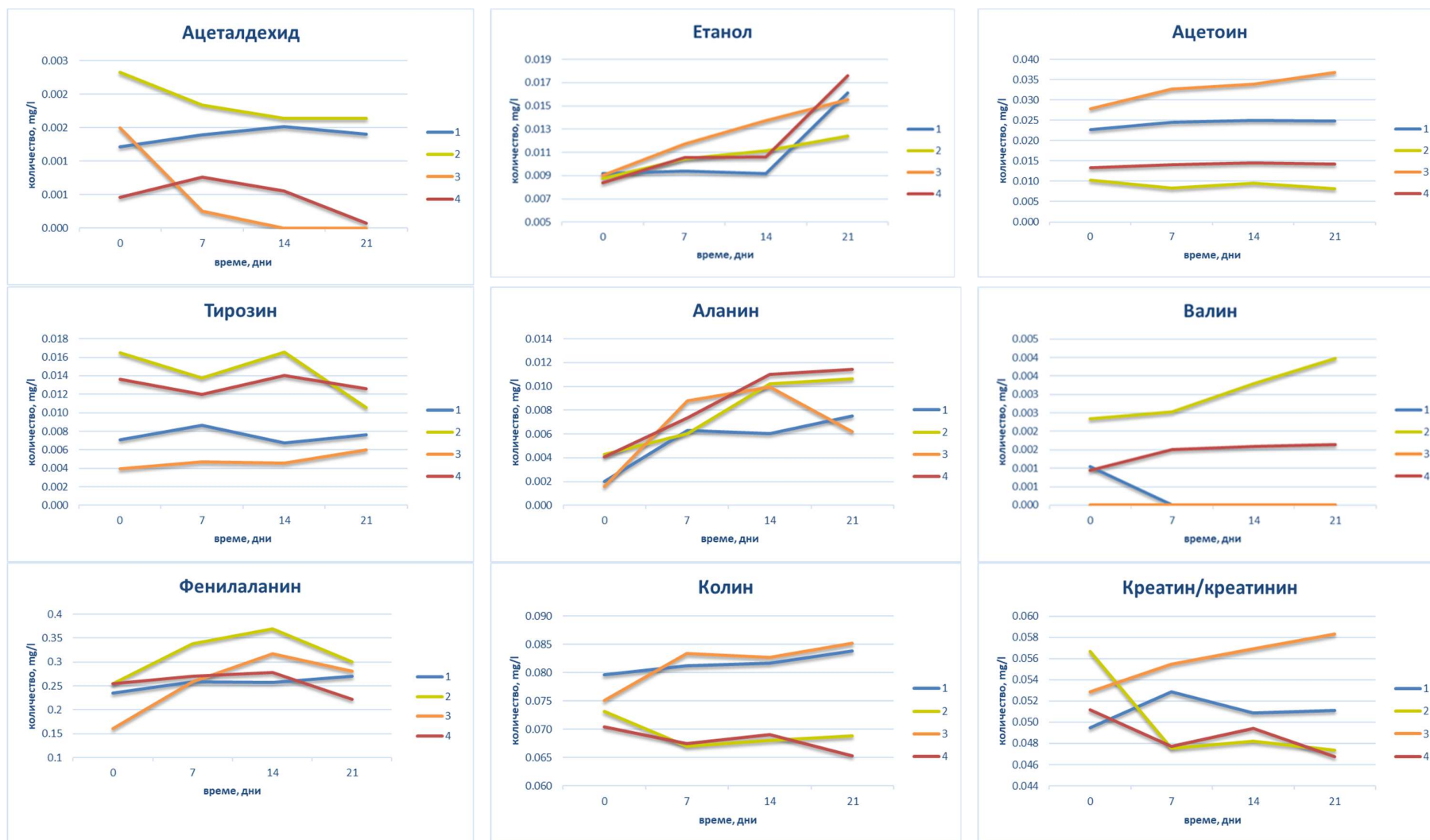
ЯМР е техника, която все по-често намира приложение за анализ на химическите компоненти в хранителни матрици. Тази техника се използва за анализи и на кисело мляко, за да се установи какви компоненти присъстват в продукта, както и за да се отчетат разликите в случаите, когато продуктите са приготвени при различни условия, като например използваната стартерна култура, условията на ферментация, съставът на млякото и др. (Trimigno et al., 2020; Lu et al., 2016).

Супернатанти от приготвените четири варианта проби на кисело мляко при общо 4 точки за периода на съхранение са анализирани по еднодименсионален ^1H NMR спектър и двуменсионален ^1H - ^{13}C NMR спектър.

На фигура V.18 са представени количествени данни за метаболитите, открити в 4-те проби кисело мляко при различните времеви точки. При всичките проби се наблюдава присъствие на едни и същи метаболити, но се отчитат разлики в количествата и в динамиката на изменение във времето на съхранение. Разлика се наблюдава също и по отношение на някои конкретни метаболити като валин, който отсъства при проба 3 при всички времеви точки, а в контролната проба не е отчетен след 7-ми ден на съхранение. Фумарова киселина се отчита само в проба 3.

От продуцираните нискомолекулни органични киселини с най-висока концентрация очаквано е млечната киселина, като в контролния вариант се отчита по-висока продукция, което може да се обясни с използваната симбионтна стартерна култура. При вариант 2 се наблюдава най-висока концентрация на ацеталдехид, обуславящ ароматни характеристики в продукт. Чрез ЯМР анализа са установени и аминокиселините аланин, тирозин, фенилаланин и валин. Произходът на тези аминокиселини в крайните продукти може да се свърже с изходната млечна суровина, но поради наблюдаваните разлики в техните концентрации, по-вероятно е да е резултат от протеолитичната активност на самите щамове, използвани при получаване на различните варианти кисело мляко. Наличието на такива аминокиселини в продуктите има значение за тяхната функционалност и здравни ползи за потребителите. Важно е да се отбележи, че с най-високи концентрации е отчетена аминокиселината фенилаланин и то при вариантите с включени двата изследвани щама. Тази аминокиселина е важен прекурсор за синтезата на меланинов пигмент и невротрансмитери с антидепресивен потенциал (National Research Council, 1989; Lopez & Mohiuddin, 2023; Akram et al., 2020). При ЯМР анализа са определени и други компоненти, нискомолекулни органични киселини като млечна, лимонена, мравчена, янтарна киселина, които обуславят антибактериалната активност на щамовете и имат значение за качеството на продуктите (Nes et al., 2012), тяхната функционалност и здравни ползи (Jung et al., 2022).

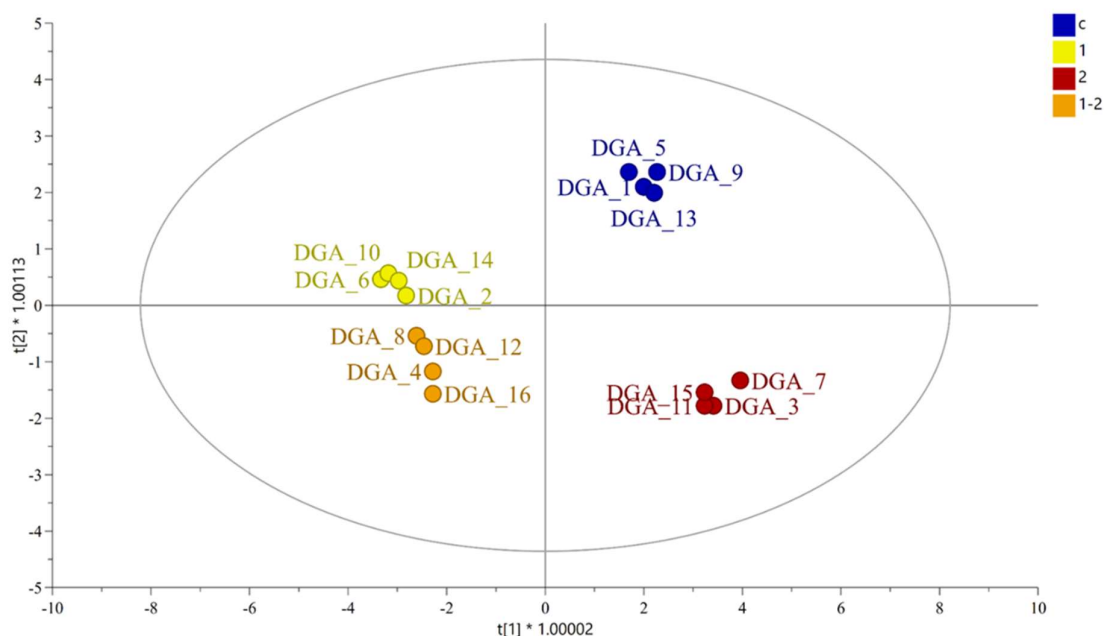




Фигура V.18. Количествени данни на метаболитите, открити в 4-те проби кисело мляко, при различните времеви точки при ЯМР анализи

При други подобни изследвания чрез ЯМР спектроскопия, в кисело мляко са открити подобни компоненти, вкл. млечна киселина, лимонена киселина, лактоза, галактоза, аланин, креатин (Lu et al., 2016), фенилаланин, тирозин, валин, фумарати и формиати (Trimigno et al., 2020). Важно е също да се отбележи, че в процеса на съхранение на пробите се наблюдава повишаване, дори и в много ниски концентрации, на етанола, който също има отношение за запазване качеството на продуктите.

За да се определят по-ясно разликите между отделните варианти на моделните продукти кисело мляко, данните са обработени статистически чрез ортогонален дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати (OPLS-DA), който идентифицира вариации, свързани с предварително дефинирана класификация, и са представени чрез двумерна диаграма на фигура V.19. Резултатите показват, че отделните варианти на пробите кисело мляко ясно се диференцират, но при всеки отделен вариант не са установени съществени разлики в отделните времеви точки, което определя запазването на специфичните характеристики за всеки от вариантите.



Фигура V.19. Двумерна диаграма на резултатите към приложения OPLS-DA анализ, позволяващ разграничаване на пробите кисело мляко при различните периоди на съхранение.

Легенда: в синьо – проба 1, контролен вариант с комерсиална статтерна култура; в жълто – проба 2, кисело мляко с инокулиран шам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3; в червено – проба 3, кисело мляко с инокулиран шам *L. plantarum* KC 5-12; в оранжево – проба 4, кисело мляко с инокулирани двата щама *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* KC 5-12 в съотношение 1:1. DGA_1 - проба 1 на 0^{ев} ден на съхранение; DGA_2 - проба 2 на 0^{ев} ден на съхранение; DGA_3 - проба 3 на 0^{ев} ден на съхранение; DGA_4 - проба 4 на 0^{ев} ден на съхранение; DGA_5 - проба 1 на 7^{ми} ден на съхранение; DGA_6 - проба 2 на 7^{ми} ден на съхранение; DGA_7 - проба 3 на 7^{ми} ден на съхранение; DGA_8 - проба 4 на 7^{ми} ден на съхранение; DGA_9 - проба 1 на 14^{ти} ден на съхранение; DGA_10 - проба 2 на 14^{ти} ден на съхранение; DGA_11 - проба 3 на 14^{ти} ден на съхранение; DGA_12 - проба 4 на 14^{ти} ден на съхранение; DGA_13 - проба 1 на 21^{ви} ден на съхранение; DGA_14 - проба 2 на 21^{ви} ден на съхранение; DGA_15 - проба 3 на 21^{ви} ден на съхранение; DGA_16 - проба 4 на 21^{ви} ден на съхранение. Отрицателните стойности означават "по-ниски от средните" резултати на компонента, въпреки че стойностите са положителни.

Изследването на различни проби от кисело мляко чрез ЯМР спектроскопия е един обещаващ метод, както за оценка на потенциала за включване на нови щамове с функционални свойства към стартерните култури, така и за определяне и проследяване качествените характеристики на този продукт. Чрез прилагането на ЯМР анализа се определи значението на включените нови щамове при получаване на моделните продукти кисело мляко, най-вече по отношение на продуцирането и разликите в концентрациите на отделни метаболити, които могат да играят роля за определяне на специфични характеристики при всеки от вариантите.

4.4. Проследяване на общия брой МКБ в четирите варианта на моделен продукт за периода на съхранение

МКБ, присъстващи в млякото го обогатяват с хранителни стойности като млечна киселина, пептиди и аминокиселини с антимикробни (Ivanov et al., 2021) и антиоксидантни активности (Şanlıdere Aloğlu, H. & Öner, Z, 2011). Микроорганизмите от стартерните култури разграждат млечните мазнини до свободни мастни киселини (Nguyen & Hwang, 2016) и произвеждат съединения в матрицата на киселото мляко, които допринасят за аромата и вкуса на продукта (Krastanov et al., 2023; Tian et al., 2020). Най-разпространената закваска за производство на кисело мляко е комбинацията от два вида бактерии *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Ivanov et al., 2021; Simova et al., 2008). Щамове от вида *L. bulgaricus*, освен че се използват като съставна част от стартерни култури, притежават и пробиотични свойства, показвайки ползи за здравето на гостоприемниците (Oyeniran et al., 2020). Други видове също могат да се използват като компоненти на стартерни култури с пробиотични свойства и пример за това са щамове от вида *Lactiplantibacillus plantarum*, които обогатяват киселото мляко с аминокиселини, летливи ароматни съединения и ненаситени мастни киселини (Lang, F., et al., 2022; Li, C., et al., 2017). Едно от предизвикателствата на продуктите с включени пробиотични щамове е да осигурят достатъчен брой жизнеспособни клетки до момента на консумация (Mani-López et al., 2014).

За да се проследи преживяемостта на включените щамове в изследваните варианти на моделните продукти кисело мляко са направени анализи за определяне на общия брой МКБ по време на периода на съхранение при 4°C. Резултатите (таблица V.18) показват стабилност на бактериалната култура, тъй като отчетения брой живи МО на елективна среда MRS се запазва 10^8 CFU/g до края на периода на съхранение. При контролната проба 1 се наблюдава повишаване на броя на жизнеспособните клетки на 7-ми и 14-ти ден на съхранение, а при проба 2 се наблюдава повишение на 7-ми ден от съхранението, последвано от намаляване на 28-ми ден. Броят на жизнеспособните клетки в проба 3 също намалява на 28-ми ден. Въпреки, че са отчетени някои статистически значими промени в броя жизнеспособни клетки при отделните проби за целия период на съхранение, то е важно да се отбележи, че при всичките варианти включените като стартерни култури щамове се запазват живи и активни (10^8 CFU/g) и могат да проявят своя функционален и пробиотичен потенциал до 28-и ден включително. Подобни резултати за стабилността на бактериите в продуктите от кисело мляко са установени и в много други проучвания (Fayyaz et al., 2020; Dan et al., 2012; Yan et al., 2019; Mani-López et al., 2014). Shori et al., (2022) съобщават, че при всичките варианти на мляко, ферментирало с *Lactobacillus* spp. се установява най-висок брой жизнеспособни клетки на 7-ми ден от съхранение и че няма значителни промени в

броя на жизнеспособните клетки към 21 ден. Dimitrellou et al., (2019) също съобщават, че пробиотичните щамове във ферментирало мляко се развиват добре и запазват жизнеспособността си по време на четириседмично съхранение.

Таблица V.18. Общ брой жизнеспособни клетки при четирите варианта на моделен продукт кисело мляко за периода на съхранение

Проби на киселото мляко	Log10 CFU/g				
	0 ден	7 ден	14 ден	21 ден	28 ден
1	8.55±0.05	8.75±0.02**	8.77±0.04**	8.59±0.07	8.47±0.10
2	8.62±0.09	8.78±0.07*	8.69±0.05	8.52±0.04	8.41±0.06*
3	8.81±0.12	8.84±0.06	8.79±0.05	8.71±0.04	8.50±0.04*
4	8.54±0.05	8.58±0.22	8.61±0.10	8.58±0.03	8.20±0.08

Стойностите на log10 CFU/g са средните стойности на трикратни измервания ± SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на проби от кисело мляко за периода на съхранение (** p <0,01 и * p <0,05).

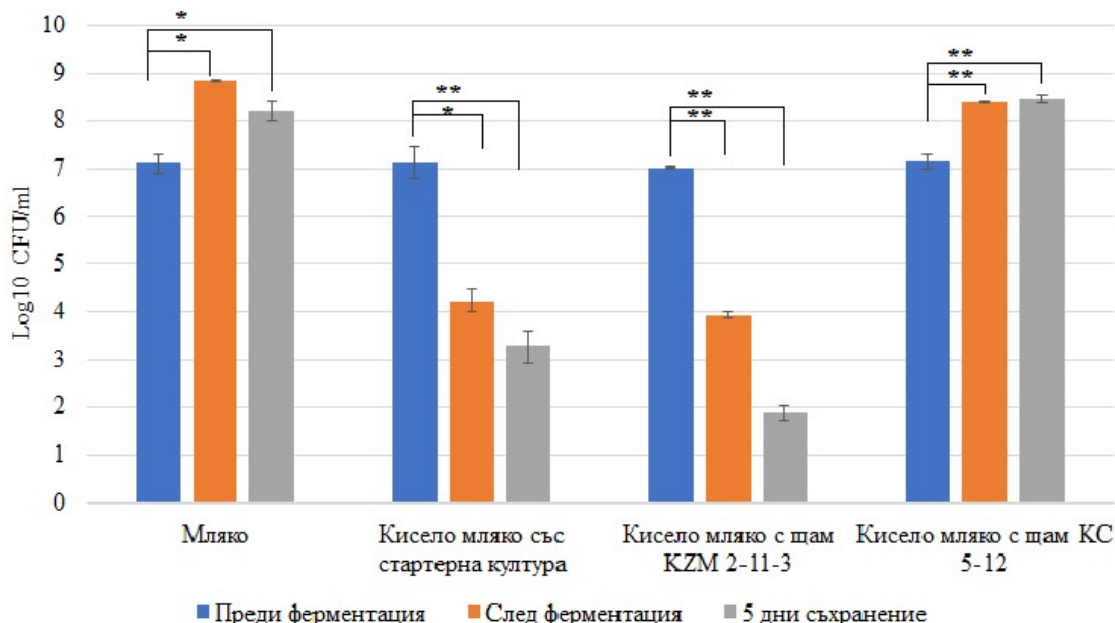
4.5. Оценка на биопротективния потенциал на щамовете млечнокисели бактерии чрез кокултивиране с хранително асоциирани патогени.

E. coli е патогенна бактерия, която обикновено колонизира червата на топлокръвни организми. Първичните източници за възникване на заразяване са сурови или недостатъчно термично обработени месни продукти, сурово мляко и растително замърсяване. Някои щамове на *E. coli* могат да причинят сериозни заболявания (WHO, 2018). МКБ, които се намират в хранителни продукти имат способност да инхибират растежа на други микроорганизми, включително и на потагенни бактерии (Ojo et al., 2017). За да се оцени биопротективния потенциал на двата избрани щам за включване в продукт, то те са изследвани чрез директно кокултивиране с тест-патогена *E. coli* в условията на моделните продукти.

На фигура V.20 са представени резултатите за оценка на развитието на тест-щам *E. coli* в мляко без присъствие на МКБ като контрола и в мляко, инокулирано с комерсиална стартерна култура и подбраните щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* KC 5-12.

Щамът *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 инхибира растежа на *E. coli*, като се наблюдават почти 5 порядъка намаление във ферментирания млечен продукт. След 5 дни съхранение на продукта намалението на *E. coli* е с повече от 6 порядъка. При пробата с щам *L. plantarum* KC 5-12 не се наблюдава инхибиращ ефект на *E. coli* при тези експериментални условия. Ojo et al., (2017) съобщават, че щамове МКБ инхибират диарогенна *E. coli* по време на кокултивиране в кисело мляко. Fijan et al., (2018), доказват, че при кокултивиране на пробиотични щамове с *E. coli*, щамовете самостоятелно имат по-голям ефект при инхибирането на патогена. Намаляването на рН в киселото мляко е един от основните фактори за антибактериалният ефект (Fitratullah et al., 2019), като той може да зависи от количеството млечна киселина и други органични киселини в продукта, и от други вещества с антиминобен ефект като H₂O₂ (Ito et al., 2003). Ortiz-Rivera et al., (2017) съобщават, че продуцирането на реутерин във ферментирал млечен продукт от *L. reuteri* инхибира патогени и развалящи храните микроорганизми, като *E. coli* и други патогени. Изследваният щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 има положителна пероксидазна активност при

култивиране в млечна среда (Таблица V.2), което може да бъде един от факторите за неговата инхибиторна активност срещу *E. coli* при кокултивиране в кисело мляко.



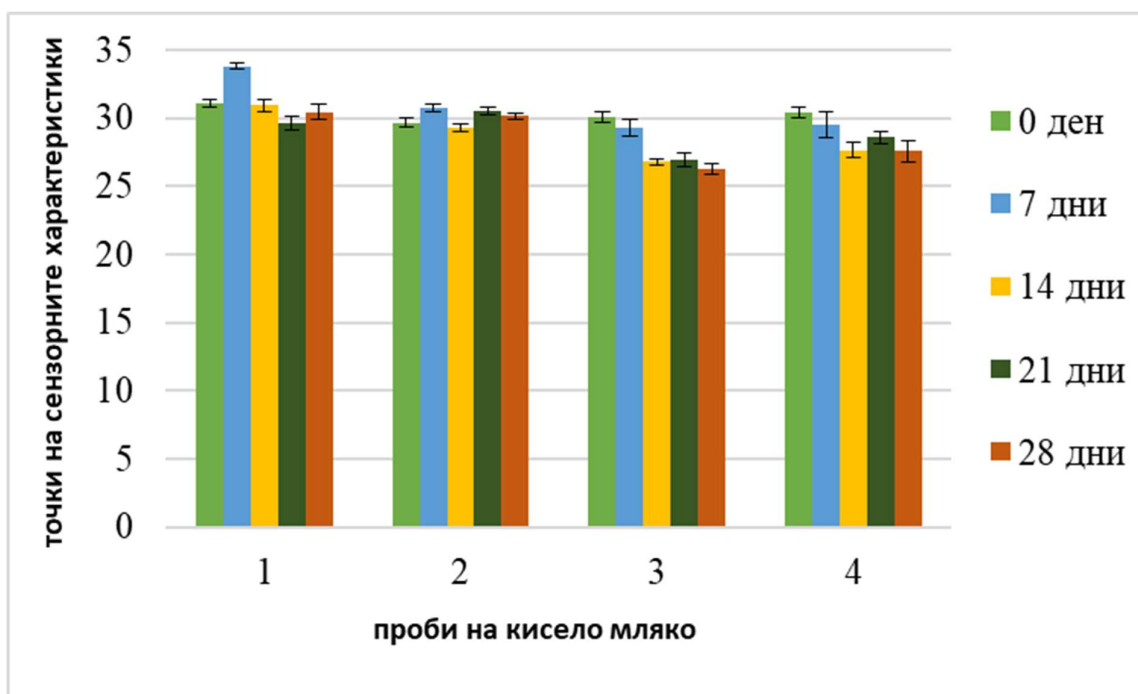
Фигура V.20. Инхибиране на растежа на *E. coli* при кокултивиране с избраните щамове МКБ в мляко.

Резултатите са представени като средни стойности \pm SD. One-way ANOVA анализ с последващ Tukey test е приложен за сравнение на средните стойности на растеж на *E. coli*, във пробите преди, след ферментация и 5 дни съхранение (** $p < 0,01$ и * $p < 0,05$).

При статистическата обработка на резултатите за броя на жизнеспособните клетки на *E. coli* след ферментация и 5 дни съхранение, в сравнение с инокулирания брой преди ферментация, при пробите с шам KZM 2-11-3 и със стартерната култура са установени статистически значими разлики, което потвърждава значителен ефект на инхибиране на растежа на *E. coli* (Фигура V.20).

4.6. Сензорни характеристики на вариантите на моделни продукти кисело мляко

Сензорният анализ се прилага за оценяване на характеристики на продукта като цвят, повърхност, наличие на течност над повърхността, хомогенност, структура, аромат и вкус. Сензорният анализ на четирите варианта на моделен продукт кисело мляко за целия период на съхранение до 28 дни е извършен от група от 15 доброволци, които предварително са запознати със сензорните характеристики на киселото мляко, съгласно Националния стандарт за Българско кисело мляко (БДС 12:2010) и оценяването е съобразно съответствие към тези характеристики. Резултатите от получените оценки са представени на фигура V.21 и фигура V.22. Средните общи точки от оценката на пробите по времеви точки през 7 денонощия за периода на съхранение са представени на фигура V.21, като при проби 2 и 4 се наблюдава относително по-стабилни оценки, с по-малко отклонение във времето и общата оценка е близка до оценката на контролния вариант (проба 1). Докато при проба 3 се наблюдава известно понижаване в общия брой точки от 14-ия ден на съхранение.

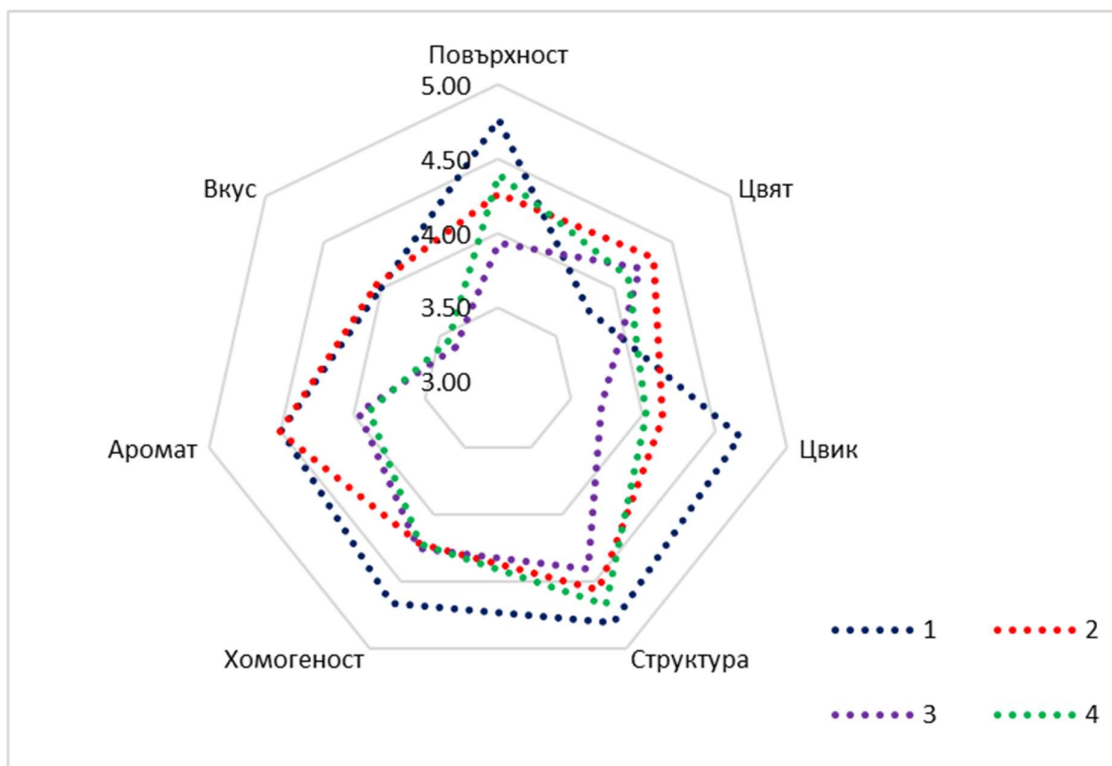


Фигура V.21. Средни общи точки от оценката на четирите варианта моделни продукти кисело мляко по време на съхранение \pm SD.

Според Coggins et al. (2008), вкусът и текстурата са едни от най-важните характеристики, които определят разликите в предпочитанията към киселото мляко. Аромат, сладост, киселинност, варовито усещане в устата и вискозитет също са идентифицирани като значими характеристики при киселомлечните продукти (Allgeyer et al., 2010).

По всяка отделна характеристика на продуктите, оценени по време на съхранение, т.е. 0 ден, 7 ден, 14 ден, 21 ден и 28 ден, е изчислена средната стойност и резултатите са представени на Фигура V.22. При проба 2 с инокулиран щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3, се наблюдава най-равномерно разпределение по получени оценки за отделните характеристики, като те са най-близки до тези на контролния вариант кисело мляко. Групата от оценители определи проба 2 като варианта с най-добър цвят, аромат и вкус от трите експериментални проби, като този резултат съответства и на метаболитния профил на този вариант, включващ ароматоопределящи компоненти (фигура V.18). Проба 3, с инокулиран щам *L. plantarum* KC 5-12, е оценена с най-добра оценка за хомогенност. Проба 4, с двата инокулирани щама, като цяло е оценена с междинни сензорни характеристики от тези на проби 2 и 3, като тя се отличава с най-високи оценки по гладка и лъскава повърхност и структура.

Изборът на два щама *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* KC 5-12 за включване в моделен продукт кисело мляко е направен въз основа на техните характеристики, показващи, че двата щама имат пробиотичен потенциал и биопротективни свойства.



Фигура V.22. Оценка на сензорните показатели на пробите от кисело мляко.

При анализиране на серия от показатели при приготвените варианти на продукти кисело мляко, пробите с изследваните щамове не се различават по повечето физикохимични параметри от контролната проба, особено в края на процеса на ферментация и по време на периода на съхранение. Важно е да се подчертае, че при щам *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* KZM 2-11-3 се наблюдава силно изразен ефект при инхибиране на растежа на *E. coli* в продукта, а също така този щам проявява инхибиторна активност и срещу хранителни контаминанти като дрождите *K. marxianus*, *K. lactis* и *S. cerevisiae*, чието присъствие в продуктите може да допринесе за съществени изменения в качеството и сензорните характеристики. При щам *L. plantarum* КС 5-12 е определен най-висок пробиотичен потенциал от цялата група изследвани щамове и паралелно с това проявява добре дефиниран ефект върху инхибирането на растежа на дрождеви и плесенни контаминанти (повече от 60%) – един от най-често срещаните в този тип продукт.

В заключение може да се обобщи, че използването на *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* КС 5-12 като щамове с биопротективен и пробиотичен потенциал, включени в състава на производствени стартерни култури, е много перспективно. С обогатените стартерни култури могат да се произвеждат нови хранителни продукти с повишена функционалност, здравни ползи за потребителите и със запазено качество за целия период на съхранение.

ИЗВОДИ

1. От естествената микробиота на традиционно приготвени ферментирани храни са изолирани 12 нови щами, като 7 щами са от вида *Lactiplantibacillus plantarum*, 2 щами са от вида *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 1 щам е от вида *Loigolactobacillus coryniformis*, 1 щам е определен като *Latilactobacillus sakei* и 1 щам е от вида *Pediococcus pentosaceus*.
2. Новоизолираните щамове се характеризират с антимикробна активност срещу Грам (+) и Грам (-) тест-патогенни бактерии и много добре изразен инхибиращ ефект срещу дрождеви и плесенни хранително асоциирани контаминанти. Пет от тях проявяват и антивирусна активност срещу ННV, като при двата щами *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12 е определен селективен индекс (SI) над 45 срещу вирусния модел ННV-2.
3. Новоизолираните щамове се характеризират с добре изразен аминоклеветазен ензимен профил, но генетични детерминанти за изследваните пептидази са установени само при щам *Latilactobacillus sakei* C 10-31-3, което подкрепя хипотезата за видовата специфичност при конструиране на праймери за скрининг за пептидазни гени при МКБ.
4. При изследваните щамове се наблюдава антибиотична мултирезистентност, но не е установено наличие на tet(M), erm(B) и cat гените, посочени като най-контролирани за оценка на потенциала за трансфер на антибиотична резистентност съгласно Квалифицираната презумпция за безопасност (QPS) на EFSA.
5. С изразени авто- и ко-агрегационни способности се отличават щамовете *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-1, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3, *L. plantarum* KC 5-12, и *L. sakei* C 10-31-1. Най-добре изразена адхезивна способност показват щамовете *L. coryniformis* KO 3-7-5, *P. pentosaceus* KC 5-13, *L. plantarum* KC 5-14 и *L. plantarum* KZC 8-21-1. Важно е да се подчертае, че двата щами от вида *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* също проявяват адхезивни свойства, каквито обикновено не се описват при други щамове от този вид.
6. При повечето от изследваните щамове се отчита ниво на преживяемост над 50% при пряко въздействие на характерните за горните отдели на ГИТ стресови фактори. Всички щамове запазват способност за растеж в присъствие на панкреатин и имат добра способност за преживяване при директно въздействие с жлъчни соли, като при три щами *L. plantarum* KC 5-12, *P. pentosaceus* KC 5-13 и *L. plantarum* KZC 8-23-5 коефициентът на инхибиране е по-малко от 0,4.
7. Най-добре изразен пробиотичен потенциал е определен при щам *L. plantarum* KC 5-12, следван от щамовете *L. plantarum* KC 5-14, *L. plantarum* KZC 8-21-1 и *P. pentosaceus* KC 5-13. При щам *L. bulgaricus* KZM 2-11-3 също е определен значим пробиотичен потенциал.
8. Изследваните щамове проявяват много добра степен на преживяемост при технологичен процес на лиофилизация и последващо съхранение при подходящо подобрена протекторна среда.
9. Не са установени съществени разлики с контролния вариант при получените моделни продукти кисело мляко с двата избрани щами *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 и *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12 по основните физикохимични

параметри, докато вискозитетът на пробите се повишава на 7-ми ден от съхранението със статистическа значима разлика, запазвайки относителна стабилност до 28-ия ден на съхранение.

10. Включените шамове в моделните продукти кисело мляко обуславят различия по отношение на продуцирането и концентрациите на отделни метаболити, които допринасят за специфичните характеристики при всеки от вариантите. По метаболитен профил вариантите се диференцират един от друг, като за всеки от тях не са установени съществени разлики за периода на съхранение.
11. Приложените като стартерни култури шамове при моделните продукти кисело мляко се запазват живи и активни и могат да проявят своя функционален и пробиотичен потенциал до края на периода на съхранение.
12. Щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 проявява изразен биопротективен ефект като инхибира растежа на *E. coli*, с почти 5 порядъка във ферментирания млечен продукт и с повече от 6 порядъка след 5 дни съхранение на продукта.
13. При моделен продукт кисело мляко с инокулиран щам *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KZM 2-11-3 се наблюдава най-равномерно разпределение по оценките на отделните сензорни характеристики, като те са най-близки до тези на контролния вариант, и е оценен с най-добър цвят, аромат и вкус, което съответства на метаболитния профил, включващ ароматоопределящи компоненти.

ПРИНОСИ

1. Формирана е колекцията от 12 новоизолирани щама млечнокисели бактерии от проби традиционно приготвени ферментирани храни, за които са определени видова принадлежност и основни физиологични, функционални и технологични характеристики.
2. Приложен е комплексен подход за оценяване на пробиотичния потенциал и биопротективните характеристики на новоизолираните щамове.
3. За първи път е установена антивирусна активност срещу човешки херпес вирус при щам от вид *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.
4. Разработен е моделен продукт кисело мляко с два подбрани и успешно приложени щама и е потвърдено тяхното значение и роля за формиране на специфичен метаболитен профил и сензорни характеристики.
5. Потвърдена е приложимостта на ЯМР спектроскопията като високотехнологичен метод за ясно диференциране на различни видове кисели млека според специфичния им метаболитен профил, който се обуславя от щамовете в състава на стартерните култури.
6. Доказана е приложимостта на щамовете *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* KZM 2-11-3 и *L. plantarum* КС 5-12 с биопротективен и пробиотичен потенциал за включване в стартерни култури за производство на нови функционални хранителни продукти със здравни ползи за потребителите и запазено качество за целия период на съхранение.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Ramize Hoxha, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, New lactic acid bacterial strains from traditional fermented foods - bioprotective and probiotic potential, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, vol:58, issue:2, 2023, pages:252-269, ISSN (print):1314-7471, ISSN (online):1314-7471, SCOPUS, SJR (0.196 - 2022), SCOPUS Quartile: Q3 (2022),

Цитирана в:

Perveen, I., Bukhari, B., Sarwar, A., Aziz, T., Koser, N., Younis, H., Ahmad, Q.U.A., Sabahat, S., Tzora, A. and Skoufos, I., 2023. Applications and efficacy of traditional to emerging trends in lacto-fermentation and submerged cultivation of edible mushrooms. Biomass Conversion and Biorefinery, pp.1-20. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04694-9> , Реферирано в WOS / SCOPUS

Nasr, N.M., Abd-Alhalim, L.R. Characterization and identification of Lactobacillus rhamnosus and Enterococcus durans as probiotic potential isolated from selected dairy products in Egypt. J. Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci. (2023). <https://doi.org/10.1007/s43994-023-00090-1> , Реферирано в WOS / SCOPUS

2. Ramize Hoxha, Daniel Todorov, Anton Hinkov, Kalina Shishkova, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, In Vitro Screening of Antiviral Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods, Microbiology Research, vol:14, issue:1, 2023, pages:333-342, ISSN (online):2036-7481, <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010026> , IF (1.5 - 2022)

Цитирана в:

Khan, A.; Li, X.; Weidong, W. Probiotic Fermented Food Inhibits Viral Infection; a Concept of Modern Era. Preprints 2024, 2024010203. <https://doi.org/10.20944/preprints202401.0203.v1>

3. Ramize Hoxha, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, Physicochemical, Rheological, and Sensory Characteristics of Yogurt Fermented by Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential and Bioprotective Properties, Foods, vol:12, issue:13, 2023, pages:2552-0, ISSN (print):2304-8158, <https://doi.org/10.3390/foods12132552> , IF (5.2 - 2022), Web of Science Quartile: Q1 (2022), SCOPUS, SJR (0.771 - 2022), SCOPUS Quartile: Q1 (2022)

Цитирана в:

Gomaa, M.A., Allam, M.G., Mokhtar, E., Ayad, E.H., Darwish, S.M. and Darwish, A.M., 2023. Nano casein-pectin complex: exploring physicochemical, organoleptic properties, and LAB viability in skimmed milk and low-fat yoghurt. Frontiers in Nutrition, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1288202> , Реферирано в WOS / SCOPUS

Younas, S., Murtaza, M.A., Manzoor, M.S., Arqam, U., Ali, Z., Hafiz, I., Anees Ur Rehman, M. and Imran, M., 2024. Effect of probiotic incorporation on physicochemical attributes of yogurt during storage and influence on cholesterol assimilation. Journal of Food Science. ISSN 00221147 <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16898>, Реферирано в WOS / SCOPUS

Mittal, A., Benjakul, S., Palamae, S., Saetang, J. and Singh, A., Milk fortified with chitoooligosaccharide-gallic acid conjugate and its liposome: Characterisation, storage stability and in vitro digestibility. International Journal of Food Science & Technology. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16895> , Реферирано в WOS / SCOPUS

4. Ramize Hoxha, Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva, Antibiotic resistance profile of the newly isolated lactic acid bacteria strains from traditional fermented foods, Current Trends in Natural Sciences, vol:11, issue:21, 2022, pages:247-253, ISSN (print):2284-9521, ISSN (online):2284-953X, <https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i21.027>

Цитирана в:

ENCU, Ş. B., ACAR SOYKUT, E., & ÇAKIR, İ. (2022). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI TOF MS Biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. Gıda, 47(6), 1059-1082. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22088> .