

КАТЯ ПЕТКОВА ДИМИТРОВА

**ПОЛУЧАВАНЕ НА СТАРТЕРНИ
КУЛТУРИ ЗА КИСЕЛО МЛЯКО
С ПЕКТИН**

**София
2021**

**ПОЛУЧАВАНЕ НА СТАРТЕРНИ КУЛТУРИ ЗА КИСЕЛО
МЛЯКО С ПЕКТИН
© КАТЯ ПЕТКОВА ДИМИТРОВА**

**Рецензенти: ст.н.с. I ст. д-мн Георги Славчев
ст.н.с. II ст. д-р Цонка Христозова**

Настоящата книга е на база на защитен дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ в 5. Технически науки, Професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност 02.11.04. „Технология на млякото и млечните продукти“, защитен през 2006 г. под ръководството проф. д.с.н. Йорданка Кузманова и Чл. кор. проф. д.т.н.Мария Балтаджиева.

Българска, първо издание
Формат 70x100/16, печатни коли: 10,375
Авторски коли (8 стр./1800 зн./стр.): 19,25

ISBN: 978-619-7554-73-1

Издателство: Интел Ентранс
Отпечатване: Интел Ентранс
София, 2021

Всички права запазени. Нито една част от тази книга не може да бъде размножавана или предавана под никаква форма или начин, електронен или механичен, включително фотокопиране, записване или чрез каквито и да е системи за съхранение на информация, без предварителното писмено разрешение на автора.

СЪДЪРЖАНИЕ

OBTAINING STARTER CULTURES FOR YOGURT PREPARATION WITH PECTIN (ABSTRACT)	7
Списък на таблиците.....	8
Списък на фигурите	11
ВЪВЕДЕНИЕ	13
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	14
1.1. Млечнокиселите бактерии в технологиите за производство на млечни продукти	14
1.1.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	15
1.1.2. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	18
1.2. Киселото мляко–биологичен продукт с важно значение за здравословното хранене	20
1.2.1. Изследвания относно микробиологията на киселото мляко	21
1.2.2. Основни аспекти в технологията за получаването на кисело мляко.....	24
1.2.3. Киселото мляко като функционална храна	28
1.3. Съвременно схващане за пробиотици	29
1.4. Пектинът като пребиотик.....	34
1.5. Получаване на синбиотик	35
1.6. Хидроколоидите и тяхното значение за хранителните продукти	35
1.6.1. Общи свойства на хидроколоидите.....	36
1.6.2. Изследвания на пектина относно приложението му в хранителната индустрия.....	38
1.6.3. Структура и свойства на пектина	39
1.6.4. Приложение на пектина в млечните продукти	41
2. ФОРМУЛИРАНЕ НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ	45
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	46
3.1. Материали за изследователската работа	46
3.1.1. Микробиологични среди	46

3.1.2.	Обезмаслено сухо краве мляко	46
3.1.3.	Пектин	47
3.1.4.	Тест за идентификация на млечнокисели бактерии API 50 СН на БиоМерио (BioMerieux, Франция)	48
3.2.	Използвани методи:	48
3.2.1.	Изолиране на чисти култури.....	48
3.2.2.	Идентифициране на щамовете.....	49
3.2.3.	Определяне времето на коагулация, минути и час (h)	49
3.2.4.	Определяне на активната киселинност (pH)	49
3.2.5.	Определяне на обща титруема киселинност (°Т).....	50
3.2.6.	Определяне на общ брой микроорганизми (CFU/ml).....	50
3.3.	Създаване на симбиотични двойки	50
3.4.	Определяне киселиноустойчивостта на щамове <i>L. bulgaricus</i>	51
3.5.	Органолептична оценка.....	51
3.6.	Статистическа обработка на резултатите	51
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ	53
4.1.	Изследване на щамове <i>Streptococcus thermophilus</i>	53
4.1.1.	Идентифициране на щамовете:.....	53
4.1.2.	Изследване на щамове <i>St. thermophilus</i> , по основни технологични показатели	54
4.1.3.	Органолептична оценка на щамове <i>St. thermophilus</i>	69
4.1.4.	Изводи	70
4.2.	Изследване на щамове <i>Lactobacillus delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i>	71
4.2.1.	Идентифициране на щамовете.....	71
4.2.2.	Изследване на щамове <i>L. bulgaricus</i> по основни технологични показатели	72
4.2.3.	Органолептична оценка на щамове <i>L. bulgaricus</i>	92
4.2.4.	Изводи	92
4.3.	Изследване на стартерни култури – тип симбиотични двойки за получаването на кисело мляко	93
4.3.1.	Получаване на симбиотични двойки от избрани щамове <i>St. thermophilus</i> и <i>L. bulgaricus</i>	93

4.3.2. Изследване на комбинации <i>St. thermophilus/L. bulgaricus</i> по основни технологични показатели.....	95
4.3.3. Органолептична оценка на киселото мляко, получено при ферментацията от създадените стартерни култури	126
4.4. Изследване влиянието на пектин върху основни технологични показатели при получаването на кисело мляко	127
4.4.1. Определяне на оптималната концентрация пектин за получаване на кисело мляко	128
4.4.2. Органолептична оценка на кисело мляко с пектин	134
4.4.3. Изследване на основни технологични показатели на кисело мляко с 0.20 % и 0.40 % пектин	136
4.4.4. Изводи	143
5. ОСНОВНИ ИЗВОДИ.....	146
6. СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНАТА ЛИТЕРАТУРА	149

**OBTAINING STARTER CULTURES FOR YOGURT
PREPARATION WITH PECTIN
ABSTRACT**

The dissertation thesis thematically concerns the obtaining of active strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* for the production of yogurt with the addition of pectin. The selected strains have been tested for the following characteristics features: time for lowering of the active acidity of milk up to pH 4.7, the maximum acid formation at $43^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, post-acidification at 4°C , resistance to low acid condition at pH 3.0.

Symbiotic pairs of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* have been obtained on the basis of selection by application of specific methods. The starter cultures have been tested according the following specific features: time for lowering the active acidity of milk up to pH 4.7, post-acidification at 4°C , survival of lactic bacteria during cold storage.

Starter cultures have been selected from the obtained symbiotic pairs, which are suitable for the production of yogurt with pectin.

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 4.1.	Изменение на активната киселинност (рН) на мляко при дейността на щамове <i>St. thermophilus</i> (S8 и S10), инкубирани при температура 43°C ±2 за период от 5 часа.	54
Таблица 4.2.	Изменение на активната киселинност (рН) на мляко при действието на щамове <i>St. thermophilus</i> (S17, S19, S22 и S23) инкубирани при температура 43°C ±2 за период от 4 часа.	56
Таблица 4.3.	Изменение на активната киселинност (рН) на мляко, при действието на щамове <i>St. thermophilus</i> (S17, S19, S22 S23), инкубирани при температура 43 ±2°C за срок от 21 дни.....	63
Таблица 4.4.	Изменение на активната киселинност (рН) при щамове <i>St. thermophilus</i> (S17, S19, S22 S23) при температура на съхранение 4°C за срок от 21 дни.	66
Таблица 4.5.	Органолептична оценка на краве мляко, инокулирано с култури <i>St. thermophilus</i> , при условия на ферментация – температура 43±2°C и условия на съхранение – 24h, при хладилни условия (4°C).	70
Таблица 4.6.	Условия на експеримента при киселинно третиране на ферментирало мляко.	74
Таблица 4.7.	Изменение в изходния общия брой микроорганизми (CFU/ml) в киселинно третирано мляко при култури <i>L. bulgaricus</i>	76
Таблица 4.8.	Изменение на активната киселинност (рН) на мляко под действието на щамове <i>L. bulgaricus</i> (L3, L5, L6, L7, L11 и L14), при температура 43°C ±2 за 21 дни.....	79
Таблица 4.9.	Изменение на активната киселинност (рН) на мляко под действието на щамове <i>L. bulgaricus</i> (L3, L5, L6, L7, L11 и L14), инкубирани при температура 4°C за срок от 21 дни.....	87
Таблица 4.10.	Комбинации <i>St. thermophilus</i> / <i>L. bulgaricus</i>	94
Таблица 4.11.	Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам <i>St. thermophilus</i> S17 (група 1).	95

Таблица 4.12.	Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам <i>St. thermophilus</i> S19 (група 2).....	100
Таблица 4.13.	Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам <i>St. thermophilus</i> S22 (група 3).....	104
Таблица 4.14.	Изменение на активната киселинност на средата под действието на симбиотични двойки в състава на които участва щам <i>St. thermophilus</i> S23 (група 4).....	109
Таблица 4.15.	Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S17 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.....	114
Таблица 4.16.	Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S19 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.....	115
Таблица 4.17.	Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S22 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.....	116
Таблица 4.18.	Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S23 при хладилно съхранение (4°C) за 21 дни.....	117
Таблица 4.19.	Изменение на броя на активните клетки на <i>St. thermophilus</i> в стартерните култури при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко до 7 дни.....	124
Таблица 4.20.	Изменение на броя на активните клетки на <i>L. bulgaricus</i> в стартерните култури при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко до 7 дни.....	125
Таблица 4.21.	Изменение на активната киселинност (pH) на мляко с пектин, при действието на симбиотична двойка S19L14.....	129
Таблица 4.22.	Общ брой на компонентите на стартерната култура в кисело мляко на 3-я час от термостатирането.....	134

Таблица 4.23. Органолептични показатели на кисело мляко с различни концентрации пектин.	135
Таблица 4.24. Изменение на активната киселинност, (pH) при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин.	138
Таблица 4.25. Изменение на броя на <i>St. thermophilus</i> в кисело мляко с 0.20% и 0.40% пектин при хладилно съхранение (4°C).	142
Таблица 4.26. Изменение на броя на <i>L. bulgaricus</i> в кисело мляко с 0.20% и 0.40% пектин при хладилно съхранение (4°C). .	142

СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

Фиг. 1.1.	Технологична схема за получаване на три вида кисело мляко в зависимост от съдържанието на сух безмаслен остатък, нормализиран с добавяне на сухо обезмаслено мляко (по Heller, 2001).	25
Фиг. 1.2.	Неразклонени вериги от частично метилирани поли- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови киселинни остатъци	39
Фиг. 1.3.	Разклонени α -(1 \rightarrow 2)-L-рамнозил- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови участъци	39
Фиг. 4.1.	Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}$ T), при щамове <i>St. thermophilus</i> , при температура на инкубиране $43 \pm 2^{\circ}\text{C}$ за 5 часа	59
Фиг. 4.2.	Време на коагулация на щамове <i>St. thermophilus</i>	62
Фиг. 4.3.	Изменение на общата титруема киселинност, при щамове <i>St. thermophilus</i> (S17, S19, S22 и S23), при температура на инкубиране $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за период от 21 дни (час, h и дни, d).	65
Фиг. 4.4.	Изменение на общата титруема киселинност, при щамове <i>St. thermophilus</i> (S17, S19, S22 и S23), при температура на съхранение 4°C за период от 21 дни (час, h и дни, d).	68
Фиг. 4.5.	Време на коагулация на щамове <i>L. bulgaricus</i> (L3, L5, L6, L7, L11 и L14).	73
Фиг. 4.6.	Преживяемост (%) на <i>L. bulgaricus</i> при условия: активна киселинност на млякото pH=3.0, продължителност на третирането 120 min, температура 37°C	77
Фиг. 4.7.	Изменение на общата титруема киселинност, при щамове <i>L. bulgaricus</i> (L3, L5, L6, L7, L11 и L14), при температура на инкубиране $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за период от 21 дни (час, h и дни, d).	83
Фиг. 4.8.	Изменение на общата титруема киселинност, при щамове <i>L. bulgaricus</i> (L3, L5, L6, L7, L11 и L14) за 21 дни (час, h и дни, d) при температура на съхранение 4°C	90
Фиг. 4.9.	Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}$ T) в мляко за 3 часа при дейността на симбиотични двойки, с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S17.	97

Фиг. 4.10.	Изменение на общата титруема киселинност (°Т) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S19.....	101
Фиг. 4.11.	Изменение на общата титруема киселинност (°Т) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S22.....	106
Фиг. 4.12.	Изменение на общата титруема киселинност (°Т) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам <i>St. thermophilus</i> S23.....	111
Фиг. 4.13.	Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам <i>St. thermophilus</i> S17, при съхранение 4°С за 21 дни.	118
Фиг. 4.14.	Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам <i>St. thermophilus</i> S19, при съхранение 4°С за 21 дни.	119
Фиг. 4.15.	Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам <i>St. thermophilus</i> S22, при съхранение 4°С за 21 дни.	120
Фиг. 4.16.	Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам <i>St. thermophilus</i> S23, при съхранение 4°С за 21 дни.	121
Фиг. 4.17.	Изменение на титруемата киселинност на мляко с пектин при действието на стартерна култура S19L14 за период от 3 часа (h).....	131
Фиг. 4.18.	Време на видима коагулация на мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин при дейността на симбиотични двойки S17L6 и S19L14.....	137
Фиг. 4.19.	Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, което съдържа 0.20 % и 0.40 % пектин при съхранение 4°С за 14 дни.	140

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременните тенденции на здравословното хранене обуславят повишения интерес към ферментиралите млечни продукти. Асортиментната листа на тези продукти непрекъснато нараства. Тя включва киселото мляко с плътен или разбит коагулум и разнообразните млечнокисели напитки. Някои асортименти съдържат различни адитиви: оцветители, подсладители, емулгатори, подобрители, плодове и фибри. Тези асортименти в много случаи се създават в практиката спонтанно и по необходимост, в резултат на което качеството им е нестабилно и тяхното предназначение не е специализирано. Съществува необходимост от насочване усилията на изследователите в направление към изучаване на тези продукти и разкриване на възможностите за тяхното усъвършенстване.

Основните усилия за постигане на тази цел следва да са насочени към търсене, изолиране и характеризиране на щамове, сред онези видове микроорганизми, за които е доказана важната роля при ферментационните процеси. Така практическо приложение следва да намират такива стартерни култури, които определят в най-голяма степен биологичните качества и хранителна стойност на млечнокиселите продукти.

Доказаните свойства на *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* дават основание на много изследователи да търсят в широката палитра на техните щамове онези, които имат най-добри качествени показатели. Така е възможно получаването на търсените хранителни и биологични свойства на произведените млечнокисели продукти и удовлетворяване интересите на различни възрастови и специализирани групи.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. МЛЕЧНОКИСЕЛИТЕ БАКТЕРИИ В ТЕХНОЛОГИИТЕ ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ

Схващането за млечнокиселите бактерии като специфична група микроорганизми се появява като резултат от научно новаторство и техническо усъвършенстване през втората половина на 19-ти век. Ролята на млечнокиселите бактерии привлича вниманието на учените особено след откриването на млечнокиселата ферментация от Пастър (1857) и първото изолиране на чиста бактериална култура от Листер (1873). Използването на стартерни култури за сирене и кисело мляко се въвежда почти едновременно през 1890 в Кил (Германия) и Копенхаген (Дания). Това разкрива възможността за индустриализирането на ферментацията при хранителните продукти (Stiles and Holzapfel, 1997).

Установено е, че млечнокиселите бактерии се отнасят към т. нар. кlostридиален клон на грам-положителните бактерии и обединяват родове, които съдържат значителен брой видове. Млечнокиселите бактерии са каталазо-отрицателни, развиват се при микроаерофилни или строго анаеробни условия. Върху хранителни среди които съдържат хематин или сходни вещества някои видове формират каталаза или цитохроми. При такива условия някои лактобацили отделят т. нар. псевдо-каталаза, която не съдържа хем. Това според Holzapfel (2001) може да доведе до неправилното им идентифициране.

В зависимост от крайните продукти на обмяната млечнокиселите бактерии се делят на две групи. Според Christensen (1958) при хомоферментативните бактерии отделената млечна киселина съставя 90 – 95% от крайните метаболитни продукти. Изследователски данни показват, че на 1 мол разградена глюкоза хомоферментативните бактерии отделят 2 мола лактат, а хетероферментативните отделят по 1 мол лактат, етанол и CO₂ (Thornhill and Cogan, 1984).

При определени условия млечнокиселите бактерии са преобладаващата естествена микрофлора на млякото, месото, зеленчуците и зърнените храни, храносмилателния тракт на животните и човека. Традиционно им приложение е при консервирането на различни хранителни продукти (Soomro *et al.*, 2002), но в някои случаи са нежелана микрофлора и могат да са причина за влошаване на качеството на продукта (Lyhs, 2002; Koort *et al.*, 2005).

Първоначалното определение на млечнокиселите бактерии като група се основава на способността им да ферментират и коагулират млякото, което ги обединява в обща група с коли-формите. През 1901 година Beijerinck характеризира лактобацилите като грам-положителни и разграничава коли-формите от млечнокиселите бактерии. Съвременната наука отнася към групата на млечнокиселите бактерии видове, които принадлежат към родовете *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weissella* (Vendamme *et al.*, 1996; Jay, 1996; Holzapfel, 2001).

1.1.1. *Streptococcus thermophilus*

Стрептококите са сред най-ранно изучените от микробиолозите бактерии, поради откриването им като причинители на редица заболявания при човека и животните. Името *streptococcus* е използвано за първи път от Rosenbach (1884), за да опише овални, верижно разположени бактерии, открити в инфектирана рана. Род *Streptococcus* е първоначално характеризирани въз основа на морфологични, серологични, физиологични и биохимични характеристики. Родът обхваща широк кръг от микроорганизми: силно патогенни бактерии (*St. pneumoniae*, *St. pyogenes* и *St. agalacticae*); т.нар. чревна група D стрептококи (*St. faecalis* и *St. jitecium*); и икономически важната група N стартерни бактерии (*St. cremoris* и *St. lactis*). При първоначалното характеризирание на *St. thermophilus* видът обединява стрептококи, които са нехемолитични, необлигатни термофили, устойчиви на сол и със строго ферментативен профил по отношение на някои захари. Опитите на Guss и Delwiche (1953) да култивират *St. thermophilus* върху различни хранителни среди показват високите му изисквания към хранителните вещества, които по мнението на експериментаторите превишават дори изискванията на *St. pyogenes*.

Според Sherman (1937) видовете в род *Streptococcus* включват патогенни и орални стрептококи, а *St. thermophilus* се отнася към групата Viridans, но не реагира на антигенните тестове от групите на Lancefield (1933). Според Jones (1978) таксономичното определяне на *St. thermophilus* е представено в литературата твърде противоречиво. Той преразглежда съставът и диференцирането на рода и предлага разделянето му на седем групи, които едновременно включват строги анаероби и пневмококи. При диференцирането на представителите на рода Jones (1987) използва критерии като патогенност, местообитание и поносимост към кислорода.

С използването на молекулярните методи родът *Streptococcus* претърпява значителни преустройства. Изследването на Kilpper-Balz и сътр. (1982) върху хомология при 23s рибозомна РНК-а при серологичните групи N и D стрептококи показва съществуването на три подгрупи. Към едната група се отнасят представители на N стрептококите (*St. lactis*, *St. cremoris* и др.), а към другата спадат D стрептококите с две подгрупи: към едната са *St. faecium*, *St. durans*, *St. faecalis* и подвидовете им, а към втората – *St. bovis*, *St. equinus*, *St. thermophilus* и *St. salivarius*. Според Farrow и Collins (1984) *St. thermophilus* трябва да се отнесе към оралните стрептококи и да се преименува като подвид на *St. salivarius*. По-нови изследвания с използването на ДНК хибридизация показаха, че има достатъчно основания видовете *St. salivarius* и *St. vestibularis* да се определят към оралните коки, но е необходимо *St. thermophilus* да запази статута си на самостоятелен вид (Schleifer *et al.*, 1991). Според съвременните схващания това е единственият микроорганизъм, който все още принадлежи към род *Streptococcus*, но намира приложение като стартерна култура (Oberg и Broadbent 1993; Amiel *et al.*, 2001).

Изследванията на Guss и Delwiche (1953) проведени върху 50 щамове *St. thermophilus* показват, че нито един от изследваните щамове не ферментира малтоза и не се развива при 2% NaCl. Sherman (1938) установява, че по правило щамовете разграждат по-бързо дизахаридите захароза и лактоза отколкото глюкоза и повечето култури показват бавна ферментация на галактозата. Изследваните от Guss и Delwiche (1953) щамове не се развиват в полусинтетична среда, която съдържа киселинно хидролизиран казеин, освен ако хидролизата не е протекла под действието на трипсин. Културите показват необходимост от наличие на пантотенова киселина и рибофлавин, а някои и на тиамин. При продължителното отглеждане на културите върху полусинтетични среди те се развиват само при наличие на биотин, никотинамид или никотинова киселина. Пиридоксина и производните му са сходни по отношение стимулирането на бързото им развитие. Изследователите смятат, че изследваните щамове *St. thermophilus* притежават значителна хомогенност по отношение на изискванията си към хранителната среда (Guss and Delwiche, 1953).

Друга особеност на *St. thermophilus*, която го отличава от останалите млечни стрептококи е, че повечето естествени щамове са галактозо-отрицателни, а изолирането на галактозо-положителни щамове изисква допълнителна селекция (Thomas and Crow, 1984; Mukherjee and Hutkins, 1994).

Установено е, че лактозният метаболизъм протича чрез хидролитичното действие на β -галактозидазата, ферментация на глюкозата и първоначално разграждане на галактозата чрез пътя на Leloir. Повечето щамове на *St. thermophilus*, които се използват като стартерни култури не усвояват галактозата, което се дължи на факта, че галактокиназната им активност е ниска. Експериментални данни показват, че когато културите се развиват в среда, която съдържа лактоза, те усвояват само глюкозната част на молекулата и освобождават галактоза във външната среда. Неспособността им да усвояват галактозата се свързва с липсата на един или повече катаболитни ензими, липсата на специфична галактозо-транспортна система или и двете от споменатите (Hutkins *et al.*, 1985b). За разлика от *L. lactis St. thermophilus* не притежава способността да деаминира аргинина и по този начин да продуцира АТФ, поради което зависи изключително от ферментацията на въглехидрати за осигуряване на енергиен източник (Hutkins *et al.*, 1985a).

Изследванията върху физиологията на *St. thermophilus* са установили, че минималната температура за развитието му е 22°C, максималната 52°C, а оптималната – 40°C. Някои автори посочват като оптимална температура за развитието на *St. thermophilus* 35 – 42°C, а температурата необходима за максимално киселинообразуване е с 2 до 8°C над оптималната за растежа (Radke-Mitchel and Sandine, 1986). *St. thermophilus* отделя в средата до 0.6 – 0.8 % млечна киселина и понижава активната киселинност (pH) до 4.5 (Heller, 2001).

Върху твърди хранителни среди *St. thermophilus* образува разнообразни по форма, големина и цвят колонии, което зависи от състава на средата и условията на инкубиране (Moon *et al.*, 1974). Върху агар с хидролизирано мляко при аеробни и анаеробни условия *St. thermophilus* образува типични, дребни колонии с бял цвят, с кръгла или елипсовидна форма. Някои щамове, но при по-нисък от реалния брой, формират дребни колонии и върху MRS агар (Tharmaraj and Shah, 2003). Върху някои диференциални среди щамове *St. thermophilus* образуват както типичните бели и кръгли колонии, така и колонии със зелен, червен или оранжево-розов цвят с жълт или бял ореол (Vinderola and Reinheimer, 1999).

Оптималното приложение на *St. thermophilus* е в „смесените“ стартерни култури със селектирани щамове *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Те се използват в производството на кисело мляко и различни видове сирена (Moreira *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2000; Champagne *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Frohlich-Wyder *et al.*, 2002; Garde *et al.*, 2003; Ji

et al., 2004). Други направления при използването на *St. thermophilus* включват участието му в модифицирани млечнокисели култури в комбинации с *Lactobacillus lactis* за лечение на лактозната непоносимост (Montes *et al.*, 1995), с *Lactobacillus acidophilus* при приготвянето на ацидофилен йогурт (Akalin, 1997) и с бифидобактерии при създаването на пробиотични продукти (Gilliland *et al.*, 2002; Saavedra, 2001; Varga *et al.*, 2002).

1.1.2. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Представители на род *Lactobacillus* са широко разпространени: откриват се в различни хранителни продукти, естествена микрофлора са на растенията, животните и човека (Holzapfel, 2001; Tannock, 2004; Михайлова *и сътр.*, 2003).

Установено е, че родът *Lactobacillus* е един от най-хетерогенните сред млечнокиселите бактерии, като съдържанието на G+C варира от 33 до 55 mol%. Родът се състои от над 60 вида като поне една трета от включените видове са облигатно хетероферментативни. Представителите са непоробразуващи, правилни по форма пръчковидните бактерии или кокобацили. Лактобацилите са аеротолерантни или анаеробни; развиват се до максимално рН 7.2, въпреки че съществуват изключения в зависимост от използваната среда и щам. Развиват се в присъствието на различни органични киселини и имат комплексни изисквания към хранителните вещества. При развитието си лактобацилите се нуждаят от въглехидрати, аминокиселини, пептиди, естери на мастни киселини, различни соли и производни на нуклеиновите киселини; използват глюкозата като въглероден източник (McRorie and Williams, 1951; Cogan *et al.*, 1968). При наличие на усвоими въглехидрати се развиват добре и в кисели среди като понижават рН до 4.00 и възпрепятстват развитието на други бактерии (Wong, 1988).

Класификацията на лактобацилите, аналогично на използваната при класифицирането на млечнокиселите бактерии се основава на вида на крайните продукти от дейността им. Според Tannock (2004) лактобацилите се делят на хомоферментативни, когато млечна киселина съставлява повече от 85 % от продуктите на ферментация и хетероферментативни, при които крайните продукти от ферментацията съдържат млечна киселина, въглероден диоксид, етанол и оцетна киселина. Stiles и Holzapfel (1997) отбелязват, че хетероферментативните лактобацили от своя страна са факултативно- и облигатно хетероферментативни. Повечето от представителите на хомоферментативните лактобацилите и някои видове от факултативно

хетероферментативните се използват при промишленото производство на ферментирани храни, докато представители на облигатните хетероферментативни лактобацили се посочват като главна причина за влошеното качество на продуктите. Към факултативно хетероферментативните се отнасят *L. acetotolerance*, *L. alimentarius*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. sake* и др. Към групата на облигатно хетероферментативните се отнасят представители на видовете *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. kefir* и др. (Stiles and Holzapfel, 1997).

Изследванията върху хомоферментативните лактобацили показват, че те разграждат глюкозата до основен продукт – млечна киселина и не метаболизират пентози или глюконат. Тези лактобацили представляват термобактериите по класификацията на Orla-Jensen и обединяват важни видове като *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. mali* и др. Видът *L. delbrueckii* обединява няколко подвида, които в миналото са имали статут на самостоятелни видове, а именно *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* и *L. leichmanii*. Установената от Weiss и сътр. (1983) 80 % хомология на ДНК налага отнасянето им като подвидове, при което *L. delbrueckii* се характеризира с два подвида: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *L. delbrueckii subsp. lactis*. *L. leichmanii* отпада като самостоятелен вид и се определя като подвид – *L. delbrueckii subsp. lactis*. Споменатите видове се използват в промишленото производство на хранителни продукти, като характерното е, че процесът на ферментация протича при висока (45 – 50°C) температура (Stiles и Holzapfel, 1997).

Установено е, че бързото развитие на *L. bulgaricus* започва само когато източник на въглерод е млечната захар (Rutter и Hansen, 1952). При млечнокиселите бактерии са установени два механизма за транспорт и метаболизъм на лактозата. Единият механизъм е чрез използването на трансферазна система, която зависи от присъствието на фосфоенолпируват. Чрез тази система лактозата прониква в клетката като активирана молекула лактозо–6–фосфат, който под действието на ензима β -D–фосфогалактозидаза се разгражда на глюкоза и галактозо–6–фосфат (Postma и Lengeler, 1985). При втория механизъм се използва активен транспорт. Той се осъществява от протон-зависима транспортна система, чрез която лактозата прониква в клетката като свободна захар. При действието на β -галактозидазата в цитоплазмата лактозата се хидролизира до глюкоза и галактоза. За типичните млечнокисели бактерии *St. thermophilus* и *L. delbrueckii spp. bulgaricus* е ус-

тановено, че използват втория механизъм (Poolman *et al.*, 1989). Лактобацилите усвояват лактозата в средата чрез ензимите β -галактозидаза и β -D-фосфогалактозил-галактохидролаза. Някои изследвания показват, че двата ензима имат сходна молекулна маса и аминокиселинна последователност в първичната си структура (Premi *et al.*, 1972).

По отношение усвояването на захари в условия на излишък на лактоза в средата *L. helveticus* метаболизира галактозната част на лактозата, докато *L. bulgaricus*, *L. lactis* и *L. acidophilus* освобождават галактозата в средата. Nickey и сътр. (1986) наблюдават, че при ограниченото количество лактоза в средата някои щамове могат значително да увеличат количеството на галактозата, която усвояват.

Експериментите с *L. bulgaricus* разкриват, че минимална температура при която се развива е 22°C, а оптималната – 45°. При температура 55°C не се наблюдава развитието на *L. bulgaricus* в мляко (Balasubramanyam и Varadaraj, 1998). *L. bulgaricus* отделя в средата от 1.5 до 1.8 % млечна киселина и понижава активната киселинност до 3.8 (Heller, 2001).

В зависимост от състава на средата и условията на култивиране *L. bulgaricus* формира различни по форма и цвят колонии. Върху агар с обезмаслено мляко формира големи, бели колонии с неправилна форма, а върху някои селективни среди и анаеробно култивиране – неправилни зелени колонии с жълт ореол, както и типични бели колонии, но с тъмно розов до червен център (Vinderola и Reinheimer, 1999). Установено е, че се развива добре върху MRS агар, но способността за формиране на колонии намалява със същественото понижаване рН на средата (Dave and Shah, 1996)

Известно е, че *L. bulgaricus* е основен компонент на стартерни култури за получаването на кисело мляко, а комбинациите му с *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus* и *St. thermophilus* се използват при получаването на различни сирена (Katsiari *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 1998). При разнообразните приложения на *L. bulgaricus* се използва както високата му киселинообразуваща способност (Neviani *et al.*, 1995), така и богатата му ензимна система (Khalid и Marth, 1990).

1.2. КИСЕЛОТО МЛЯКО–БИОЛОГИЧЕН ПРОДУКТ С ВАЖНО ЗНАЧЕНИЕ ЗА ЗДРАВΟΣЛОВНОТО ХРАНЕНЕ

През последните години консумацията на кисело мляко постоянно нараства в САЩ (The Economic Research Service, 2000), Канада (Agri-Food

Canada, 2002) и редица Европейски страни (European Dairy Association, 2002).

Киселото мляко е млечен продукт, който е резултат от осъществена под действието на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* млечнокисела ферментация (Champagne *et al.*, 1994). При получаването на кисело мляко се използват самостоятелно или в комбинация една или повече изходни суровини: пълномаслено, частично или напълно обезмаслено мляко и сметана, както и рехидратирани форми на същите продукти. По време на производствения процес и при подходящи условия на транспорт и съхранение киселото мляко съдържа активна микрофлора, която се състои от не по-малко от 10^7 – 10^6 CFU/g жизнеспособни клетки до указания срок на годност (IDF, 1988). Използването на подходящи за консумация млечни производни при производството на кисело мляко има определена технологична или функционална цел.

При производството на кисело мляко се изисква изходната суровина да съдържа не по-малко от 8.25 % сух безмаслен остатък (СБО) преди добавянето на млечни производни. След приключване на ферментационния процес киселото мляко трябва да има активна киселинност рН=4.6 или по-ниска. Хомогенизацията на изходните суровини при получаването на кисело мляко е препоръчителна, докато пастьоризация или ултра-пастьоризация са задължителни процедури преди внасянето на стартерните култури (FDA, 2003). В зависимост от масленото си съдържание киселото мляко е пълномаслено, ниско маслено и безмаслено.

По данни на Lee и сътр. (1990) киселото мляко съдържа 56 ± 2 mg/g лактоза и 34.2 ± 2.1 mg/g глюкоза и лактоза, но не се установяват рафиноза или стахиоза, които са характерни например за соевото кисело мляко. Киселото мляко е богато на глутаминова киселина (5.98g/100g), левцин (3.14g/100g), аспаргинова киселина (2.69g/100g), пролин (2.51g/100g) и лизин (2.46g/100g); съдържа 1-2g/100g треонин, серин, аланин, валин, изолевцин, тирозин фенилаланин и около 1g/100g глицин, цистин, метионин и хистидин.

1.2.1. Изследвания относно микробиологията на киселото мляко

Опитни данни показват, че при съвместното си развитие млечнокиселите бактерии взаимодействат помежду си по разнообразни начини. Като

резултат се наблюдава взаимна неутралност, стимулиране на растежа, забавяне в скоростта на развитие или пълно възпрепятстване на растежа (Vinderola *et al.*, 2002). Киселото мляко е резултат от специфично стимулиране между *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* (Oberg и Broadbent, 1993). Активиране чрез отделянето на белтъчни вещества е наблюдавано и при съвместното развитие на други млечнокисели бактерии (Branen и Keenan, 1970). Ефектът на стимулиране обаче е краткотраен и е установяван сравнително късно (16-24 часа) от инкубирането на микроорганизмите (Branen и Keenan, 1969).

Експериментите със смесени култури *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* показват, че в по-голяма степен се подпомага развитието на *St. thermophilus* отколкото на *L. bulgaricus* (Beal *et al.*, 1994; Beal and Corrieu, 1998; Courtin *et al.*, 2002; Courtin and Rul, 2004). Установено е, че броят на клетките на *St. thermophilus* обикновено е по-голям и съотношението между *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* може да варира от 1:1 до 21.8:1, като зависи предимно от активната киселинност при преустановяване на ферментационния процес (Knifel *et al.*, 1993; Beal *et al.*, 1999).

Отношенията, които съществуват между двата вида са наречени от някои автори *протокооперативни* (Beal *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000), а от други *протосимбиотични* (Heller, 2001) и се дължат на освобождаването на определени съединения. Независимо, че при *L. bulgaricus* протеолитичната активност зависи от щама, като цяло вида се определя като по-активен от *St. thermophilus* (Oberg *et al.*, 1991b; Guzel-Seydim *et al.*, 2005; Courtin and Rul, 2004). Установено е, че протеолитичните ензими на *L. bulgaricus* разграждат частично казеина и освобождават ниско молекулни пептиди и аминокиселини. В средата се появява аминен азот, който е идентифициран като растежен фактор за развитието на *St. thermophilus* (Dave и Shah, 1998). От своя страна лактобацилите се стимулират от въглеродния диоксид и мравчената киселина отделени в средата от *St. thermophilus* (Perez *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1991; Ascon-Reyes *et al.*, 1995).

Характерът на взаимодействие между двата микроорганизма е обект на редица изследвания. Получените данни показват, че в сравнение с индивидуалните щамове смесените култури *St. thermophiles* и *L. bulgaricus* имат по-висок брой микроорганизми (Beal *et al.*, 1994; Beal и Corrieu, 1998), по-добра протеолитична активност (Rajagopal и Suine, 1990), по-добра преживяемост при съхранение (Lopez *et al.*, 1998), съвместния продукт има по-добра консистенция и по-слаб синерезис (Moreira *et al.*, 2000).

Експерименталните резултати показват, че при култивирането на смесени култури *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* се наблюдават три фази, които имат отражение върху киселинообразуването (Courtin and Rul, 2004). През първата фаза, почти веднага след инокулацията на млякото, *St. thermophilus* започва да се размножава и докато развитието на *L. bulgaricus* е по-бавно *St. thermophilus* достига експоненциален растеж и е доминиращият организъм. На този етап *St. thermophilus* показва по-висока киселинообразуваща способност спрямо *L. bulgaricus* и осъществява началното киселинообразуване в млякото (O'Leary and Woychik, 1976; Perez *et al.*, 1991; Fonseca *et al.*, 2000). Втората фаза се характеризира с определена пауза в развитието на *St. thermophilus*, но с размножаване и активност на *L. bulgaricus*, което се изразява със стабилизирането на рН. През третата фаза *L. bulgaricus* продължава развитието си, а при *St. thermophilus* започва втора растежна фаза. Двухазното развитие на *St. thermophilus* е наблюдавано, както от Letort и сътр. (2002) при самостоятелното му развитие, така и от Courtin и Rul (2004) в смесена култура.

При култивирането си в мляко *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* усвояват лактозата до млечна киселина и понижават рН от неутралните му стойности 6.6 – 6.7 до 4.5 – 4.2. Според Adhikari и сътр. (2003) отделената млечна киселина е основния фактор за получаването на типичния, приятен кисел вкус на ферментиралото мляко. Чиста култура от единия или от другия вид също дава кисело мляко, но то има различни характеристики по отношение на вкуса и аромата. При развитието на *St. thermophilus* се получава кисело мляко с по-слабо изразен кисел вкус и маслен аромат. При дейността на *L. bulgaricus* стойностите на рН са по-ниски и киселото мляко притежава в значително по-голяма степен типичния аромат, резултат от отделения ацеталдехид, ацетоин и диацетил (Vuyst, 2000). Оптималните условия за развитието на *St. thermophilus* са: активна киселинност – 6.5 и температура 40°C, а за *L. bulgaricus* съответно – 5.8 и 44°C. За разлика от оптималните условия за растежа максимално киселинообразуване се установява при по-високи стойности на активната киселинност на средата и температура на култивиране (Beal *et al.*, 1989).

Един от най-важните етапи в производството на кисело мляко е изборът на специфични щамове за осъществяване на ферментацията на изходната суровина и осигуряване на подходящи условия за получаването на продукт с определени характеристики. Според Mollet (1999, 2001) технологиите за производство на хранителните продукти са се развивали чрез

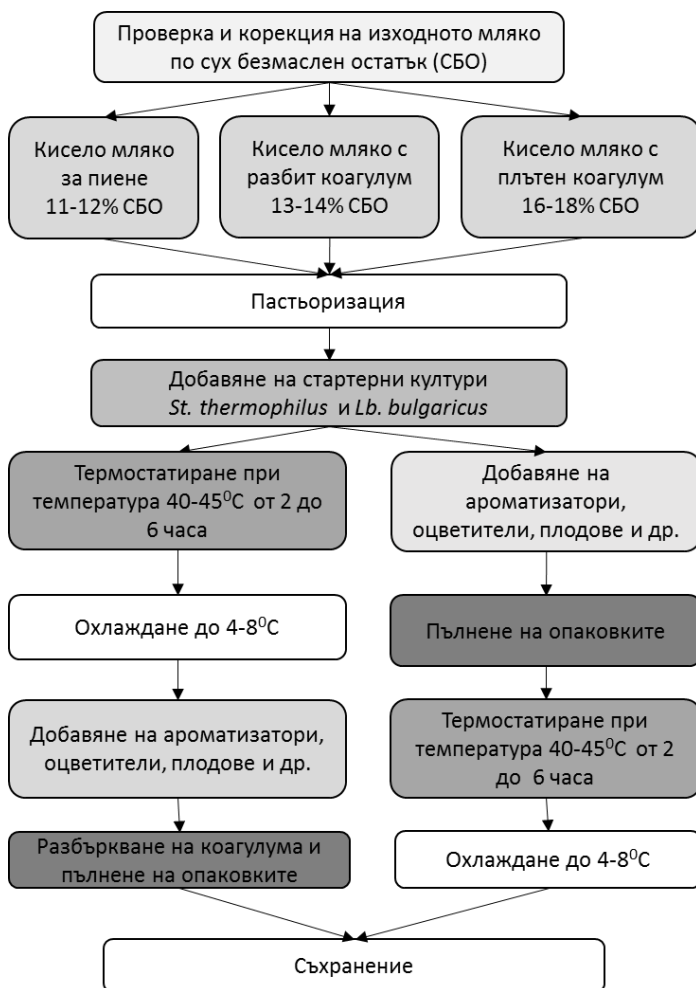
подбор на стартерни култури. За усъвършенстването на ферментационните процеси, подобряването на добива и качеството на получаваните продукти се разчита изцяло на естествените качества, които притежават изолираните щамове. Според авторът генетично модифицираните култури са обещаваща перспектива, въпреки някои ограничения при използването им. Според Knifel и сътр. (1993) независимо, че биотехнологиите предлагат някои възможности относно “конструирането” на стартерни култури чрез генно инженерство, все още традиционната селекция на микроорганизмите има значителна роля. С разработването на разнообразни комбинации от стартерни култури успешно се реализира нарастване на броя и повишаване на качеството на получените асортименти (Stiles и Holzapfel, 1997, Coeuret *et al.*, 2003).

1.2.2. Основни аспекти в технологията за получаването на кисело мляко.

В зависимост от широк набор фактори съществуват и различни технологични схеми за получаването на кисело мляко. На фиг. 1.1 е представено получаването на три вида кисело мляко в зависимост от съдържанието на сух безмаслен остатък. Трябва да се отбележи, че в приложената схема не е споменат вида на млякото, което се използва, не са отбелязани и някои технологични операции като хомогенизацията на изходната суровина и охлаждането на млякото преди инокулирането със стартерните култури. Прави впечатление, че в цитираната схема и трите типа кисело мляко съдържат оцветители, ароматизатори и плодови добавки. Това всъщност отразява изискванията на широка група потребители в Западна Европа и Америка (Guinard *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1991, Harper *et al.*, 1991; Brennan *et al.*, 2002). Различията при получаването на трите вида кисело мляко се състоят в специфичната последователност на технологичните операции: разбъркване, пълнене на опаковките, охлаждане и влагане на допълнителните съставки. В представената от Duboc и Mollet (2001) схема пастъризацията и хомогенизацията са отбелязани като задължителни технологични операции при производството на кисело мляко с плътен или разбит коагулум.

Според фигура 1.1. при получаването на кисело мляко с плътен коагулум пълненето на опаковките се осъществява преди провеждането на ферментацията, а при киселото мляко с разбит коагулум опаковките се пълнят

с вече готовия, разбъркан и охладен ферментирал продукт. Според технологичната схема показана от Dubos и Mollet (2001) ферментацията на млякото се осъществява при температура 40 – 42°C и приключва за 3 до 6 часа независимо дали става въпрос за инкубиране в обща маса или в индивидуални опаковки. Според Heller (2001) ферментацията при използването на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* може да приключи за 2.50 часа, ако се използват симбиотични култури. Ферментационния процес се смята за успешно реализиран при наличието на 1.2 – 1.4 % млечна киселина. С последващото охлаждане на продукта се предотвратява, в определена степен, допълнителното отделяне на млечна киселина (Dubos и Mollet, 2001).



Фиг. 1.1. Технологична схема за получаване на три вида кисело мляко в зависимост от съдържанието на сух безмаслен остатък, нормализиран с добавяне на сухо обезмаслено мляко (по Heller, 2001).

Кондратенко и сътр. (1985) дават изчерпателно описание на съоръженията и линиите за производство на кисело мляко в нашите условия. Подробно са представени параметрите и последователността на технологичните операции при използването на различни видове мляко, методи и стартерни култури. Посочени са особеностите при получаването на различни асортименти.

Установено е, че върху реологичните свойства на киселото мляко влияят редица фактори. Сред тях най-важните са: състав на млякото, съдържание на сухо вещество, количеството на инокулума, който се използва, температурата за термостатиране и времето на съхранение (Keogh and O'Kennedy, 1998; Penna *et al.*, 1997; Lalignant *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1999a; Минкова, 2001; Уршев и сътр., 2003).

Подробно е изследвано както самостоятелното влияние на различни фактори върху реологията на киселото мляко, така и комбинираният им ефект. С повишаването на сухото вещество на млякото се получава по-плътен коагулум, а повишаването на температурата на термостатиране ускорява образуването на млечния гел. Установен е отрицателен ефект при взаимодействието на температурата на ферментация и използвания инокулум: при високи или ниски нива на двата фактора, скоростта на коагулация е ниска. При ниска ферментационна температура коагулацията се забавя дори при повишаване на сухото вещество и количеството на инокулума (Kristo *et al.*, 2003). Максимално киселинообразуване се постига когато ферментацията протича при температура от 42 до 44°C, в комбинация: с инокулум от 2.5% (v/v) и съдържание на сухо вещество 11–12 % (w/v) (Kristo *et al.*, 2003). Експериментални данни показват, че най-кратко е времето за достигането на максимално киселинообразуване в два случая: 1) когато се използва мляко с високо съдържание на сухо вещество (14–15 % w/v) и средно количество на инокулума (2.5 % v/v) и 2) когато се използва мляко с ниско съдържание на сухо вещество (11–12% w/v), но с по-голямо количество инокулум – 3.5 %. Времето за което ферментацията приключва зависи главно от ферментационната температура. Ферментационният процес се ускорява с повишаването на температурата, което е свързано с увеличаването на метаболитната активност на бактериите (Kristo *et al.*, 2003; Beal *et al.*, 1999).

Термичната обработка на изходната суровина при производството на кисело мляко има ясно определен резултат. Доказано е, че пастеризацията убива или инактивира бактерии и вирусни причинители на заболявания

при животните, попаднали по различни начини в млякото (Creamer, 2002; Pearce, 2001). Освен санитарен ефект пастьоризацията има и важна технологична роля. Установено е, че тя благоприятства денатурацията на суроватъчните протеини (основно β -лактоглобулина и α -лактоалбумина) и тяхното взаимодействие чрез дисулфидни връзки с κ -казеина разположен върху повърхността на казеиновите мицели.

Nabhan (2004) установява, че комбинираният ефект на налягането, което се прилага при хомогенизацията и температурната обработка влияят върху млечните протеини като водят до структурни промени, които се изразяват в образуването на полимери. Влиянието на термичната обработка се отразява най-силно върху β -лактоглобулина като почти половината от молекулите на β -лактоглобулина формират еднородни полимери помежду си. Останалата част от молекулите участват в образуването на общи структури с κ -казеина. Чрез междумолекулни дисулфидни връзки β -лактоглобулина изгражда комплекси с α -лактоалбумина, а агрегирането с α s1-казеина се дължи на физикохимични взаимодействия. Малките суроватъчни протеини (серумен албумин, имуноглобулини и лактоферин) също участват във формирането на полимерите, но в по-малка степен (Nabhan, 2004).

Според Harte и сътр. (2003) при киселинната коагулация на термично обработвано мляко се образува фина мрежа с умерена твърдост и значителна способност да задържа във вътрешността си млечния серум. Това се дължи на суроватъчните протеини, които създават обвивка на казеиновите мицели и предотвратяват хаотичното им струпване в процеса на ферментация, когато активната киселинност се понижи под изоелектричната точка на казеина. При киселинната коагулация на казеина в суровото мляко се наблюдава гел със слабо организирана структура и наличие на пресечки, а задържането на млечния серум е минимално (Harte *et al.*, 2003).

Установено е, че млечнокиселите напитки имат структура, сходна на киселото мляко. И двата продукта се изградени от протеинова мрежа, състояща се от разклонени частици казеин, които формират групи и верижки, като изграждат еднородна фаза, прекъсвана от малки по размер пори. Млечнокиселите бактерии не само коагулират млякото, но техните клетки са част от структурата на продукта. Електронно микроскопски снимки показват, че мицелните вериги не винаги формират непрекъсната мрежа и свободните краища на казеиновите мицели се „залавят“ за повърхността на бактериалните клетки, образувайки непрекъсната структура (Oliveira *et al.*, 2002).

Усвояването на лактозата от млечнокиселите бактерии, които участват в стартерната култура е основно свойство при продуцирането на млечна киселина по време на ранните стадии от подкиселяването на млякото (Olasupo *et al.*, 2001). Затова скоростта на киселинообразуването се явява критичен фактор при ферментацията на млякото. Бързото подкиселяване на суровото мляко предотвратява развитието на нежелани микроорганизми и е важно за аромата и текстурата на крайния продукт (Vuyst, 2000).

При съхранението на кисело мляко обикновено се наблюдава понижаване на активната киселинност и нарастване на титруемата киселинност в зависимост от температурата на инкубиране и съхранение, свойствата на използваната култура и други фактори (Martin *et al.*, 1999b). При температури на съхранение от 4°C до 12°C се наблюдава понижаване на рН млякото до 4.0 (Mollet, 1996; Birollo *et al.*, 2000). Процесът на постепенното понижаване на активната киселинност през периода на съхраняването на продукта е известен като *пост-киселинообразуване* (Shah, 2000) и обикновено се изследва на 7-я и 21-я ден от съхранението (Beal *et al.*, 1999). Като резултат от пост-киселинообразуването на културите през периода на съхранение от 21 дни Martin и сътр. (1999) отбелязват, че киселото мляко се характеризира с по-кисел вкус, но текстурата му е по-вискозна и коагулума е с по-голяма плътност. Според някои автори по-добро структуриране на коагулума на киселото мляко се получава при по-висока температура на ферментация (45°C). Обяснението се свързва от една страна с по-доброто хидратиране на млечните протеини при температура 45°C, а от друга страна със запазването на ниска, но реална пост-метаболична активност на културите. Тази активност е съпроводена с усвояването на лактозата при условията на съхранение на продукта, отделянето на допълнителни количества млечна киселина и натрупването на галактоза в средата (Beal *et al.*, 1999; Guzel-Seydim *et al.*, 2005).

1.2.3 Киселото мляко като функционална храна

Основната роля на храненето е снабдяването на организма с веществата, които са необходими за неговият растеж и развитие. Най-новите научни открития поддържат хипотезата, че някои храни освен в общоприетото си значение влияят върху разнообразни телесни функции (Stanton *et al.*, 2001). Доказано е, че съществува връзка между консумацията на някои храни и предотвратяване или намаляването на появата на някои заболявания: диабет, остеопороза, рак, сърдечно-съдови болести и др. (Go *et al.*,

2004; Donaldson, 2004). Такива храни, групи храни или определени вещества се дефинират като *функционални* и за тях е характерно, че влияят върху физиологичните процеси на организма и в частност върху мукозата на храносмилателния тракт (Roberfroid, 2000; Ross, 2000). При други автори се открива известно противоречие по отношение на основния смисъл, който е вложен в използването на термина *функционални*. Така например Wit (1998) и Korhonen и сътр. (1998) определят като такива съединения, чиито присъствие в даден продукт повлиява върху качествата му. Според тях функционални са вещества, които могат да емулгират, стабилизират, повишават вискозитета, подобряват цвета, вкуса или консистенцията, свързват мазнини или вода в продукта.

Според Halsted (2003) към функционалните храни, освен всеобщо приетите и популярни в последно време про- и пребиотици, се отнасят и много други вещества: полифеноли, флавоноиди, соеви изофлаволи, каротеноиди, рибни масла, моно- и полиненаситени мастни киселини.

Редица автори споделят мнението, че първата функционална храна, която организма приема след раждането си е млякото, което съдържа редица съединения с разнообразни свойства. Поради това млякото е традиционната суровина за получаване на про- и пребиотични продукти (Horton, 1995; Huffman and Harper, 1999; Gomes and Malcata, 1999; Vuyst, 2000). В технологичен аспект пробиотиците трябва да комбинират позитивната характеристика на микроорганизми, които не само осъществяват ферментация на млякото, но имат благоприятен ефект върху здравето. Киселото мляко и сходни на него продукти представляват най-значителната част от създадените и продавани пробиотични продукти по редица причини. Отдавна е известно, че киселото мляко има значение за доброто здраве и дълголетието и съдържа активни микроорганизми, а продължителната му консумация няма никакви вредни последствия (Heller, 2001).

1.3. СЪВРЕМЕННО СХВАЩАНЕ ЗА ПРОБИОТИЦИ

Пробиотиците се дефинират като живи микробни добавки към храната, които благоприятстват гостоприемника чрез подобряване на чревните микробни обитатели (Dunne *et al.*, 2001). Те могат да бъдат единични или смесени култури от микроорганизми и трябва да отговарят на редица изисквания (Simmering and Blaut, 2001). За да отговарят на изискванията пробиотиците трябва да притежават редица технологични свойства, а медико-научните им свойства да бъдат потвърдени в *in vitro* и *in vivo* условия

(Charteris *et al.*, 1998). Meydani and Ha (2000) подчертават необходимостта от провеждането на добре контролирани, с достатъчна продължителност и адекватно анализирани експерименти.

Сред основните изисквания към пробиотиците са: високо съдържание на живи клетки, независимо дали са в свежи или ферментирани продукти или са под формата на лиофилизирани клетки; способност да подобряват здравословното състояние на човека или на животните (вкл. да стимулират растежа при животните); да влияят на мукозни повърхности към които са приложени: устната кухина и храносмилателния тракт (под формата на хранителни продукти, таблетки или капсули), горните отдели на дихателната система (аерозолни форми) или урогениталния тракт (Stanton *et al.*, 2001). Според Isolauri и сътр. (2001) пробиотиците влияят на чревния имунитет чрез стимулиране синтеза на протеини, които поддържат нормалната имунна бариера на червата и намаляват пропускливостта към екзогенни антигени.

Проведени са редица клинични изследвания относно приложението на пробиотиците. Документирани са следните обещаващи ефекти: по-ниска честота и продължителност на диарии (продължителното използване на антибиотици води до появата на дисбактериоза и на свързаната с нея диария, която се асоциира с развитието на патогенни микроорганизми като *Clostridium difficile*); намаляват тежестта на симптоматиката при инфекциите, които са провокирани от ротавируси; редуцират страничните ефекти след химиотерапия. Пробиотиците стимулират хуморалния и клетъчен имунитет, намаляват количеството на нежелани метаболити (напр. амоняк) и потискат действието на прокарциногенни ензими в дебелото черво. Установено е още, че пробиотиците намаляват честотата на инфекциите причинени от *Helicobacter pylori*, намаляват алергични симптоми; имат лаксативен ефект, влияят благоприятно върху минералния метаболизъм, използват се в профилактиката на рака и понижават плазменото съдържание на холестерола и триглицеридите (Schezenmeir and de Vrese, 2001).

Според Schezenmeir и de Vrese (2001) не е възможно споменатите разнобразни свойства да бъдат обяснени чрез една единствена хипотеза, която да се основава на единично качество или механизъм и да остава вярна и валидна за всички микроорганизми, които показват един или друг от изброените по-горе ефекти. Поради това се смята, че точният механизъм, чрез който млечнокиселите бактерии инхибират нежеланите микроорга-

низмите, е доста комплексен и все още не е напълно изяснен. Млечнокиселите бактерии създават неблагоприятна среда за развитието на попаднали в хранителните продукти патогенни и други микроорганизми, които влошават качествата на продукта и го правят негоден за консумация. Вероятните механизми които осъществяват инхибицията обединяват продуцирането на органични киселини (млечна киселина и др.), отделянето на водороден пероксид, създаване на конкурентни взаимоотношения чрез съревнование за наличните в средата хранителни вещества, изменение на окислително-редукционния потенциал, синтез на бактериоцини и антибиотици. Предполага се, че наличието на инхибиторната активност е свързано с промяната на съвкупност от различни свойства (Shah, 2000).

За да се прояви желаният терапевтичен ефект от използването на пробиотичните бактерии е необходимо те да бъдат в достатъчно количество. При клинични изпитания често се посочва сравнително широк интервал на дневната доза приети бактерии – от 10^6 до 10^9 CFU (Saavedra, 2001). Според *Австралийският Стандарт за Храните* (Australian Food Standards Code) киселото мляко трябва да е с $pH \leq 4.5$ и да е произведено с култура на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* или с други подходящи млечнокисели бактерии, но в аспекта брой на бактериите Австралийският стандарт не определя никакви изисквания към ферментиралите продукти (Shah, 2000). В някои страни има разработени стандарти с изисквания към броя на пробиотичните бактерии. *Асоциацията за Ферментирани млека и Напитки с Млечнокисели Бактерии* (Fermented Milks и Lactic Acid Bacteria Beverages Association) в Япония е разработила стандарт, според който в млечните продукти се изискват минимум 10^7 CFU клетки (Shah, 2000; Vuyst, 2000). За да са спазени критериите на *Национална-та Асоциацията на Киселото мляко* (National Yogurt Association) в САЩ е необходимо наличието на 10^8 CFU/g в продукта при производството му (Sanders, 2000). Ферментиралите млека, които съдържат пробиотични бактерии трябва не само да притежават определения със стандарта брой бактериални клетки в момента на производството си, но и да запазват необходимия минимален брой бактерии до края на указания срок за годност на продукта (Vuyst, 2000; Adolfsson *et al.*, 2004). Вероятно минималната терапевтична доза на ден е около 10^8 – 10^9 CFU, което съответства на консумацията на 100g биопродукт, който съдържа между 10^6 и 10^7 пробиотични бактериални клетки в милилитър или грам.

Относно пробиотичните свойства на киселото мляко са проведени редица експерименти, които са обстойно дискутирани и резюмирани (Gilliland, 1990; Adolfsson *et al.*, 2004).

Смята се, че *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* имат ниска преживяемост в храносмилателния тракт (Conway и Goldin, 1987; Pedrosa, 1995), но други изследвания оспорват тази представа (Pochart *et al.*, 1989; Lick *et al.*, 2001; Dilmi-Bouras и Sadoun, 2002). Според някои изследователи способността на млечнокиселите бактерии да преживяват неблагоприятните условия в храносмилателния тракт и да проявяват влияние *in vivo* зависи от щамовите комбинации в изследвания продукт (Djouzi *et al.*, 1997; Guerin-Danan *et al.*, 1998). Според Marteau и сътр. (1997) преживяемостта на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* е по-ниска в сравнение с тази на *L. acidophilus* и *Bifidobacterium bifidum*, но може да се подобри с намаляване времето за експозиция на *St. thermophilus* и на *L. bulgaricus* на ниските стойности на рН на стомаха. Преживяемостта на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* при ниско рН, запазването на интактна клетъчна стена е свързано със съхраняване активността на β -галактозидазата. Това води до облекчаване на лактозната непоносимост (de Vrese *et al.*, 2001). Drouault и сътр. (2002), установяват че *St. thermophilus* отделя активна β -галактозидаза в храносмилателния тракт на мишки, а Burton и Tannock (1997), установяват че, че β -галактозидазната активност на *L. bulgaricus* е по-висока от установената при *Lactobacillus* ssp. изолирани от животни. Drouault и сътр. (2002) изказват хипотезата, че в храносмилателния тракт бактериите на киселото мляко в отговор на външни стимули извършват *de novo* белтъчен синтез и се адаптират към условията на средата. Един от най-добре обоснованите и всеобщо приети ефекти на киселото мляко е относно облекчаване симптомите на лактозната непоносимост (Gilliland, 1990; Adolfsson *et al.*, 2004).

Установено е, че *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* не притежават хидролазна активност спрямо жлъчните киселини или активността им е много ниска (Tanaka *et al.*, 1999), както и че не се прикрепят към чревната мукоза в значителна степен (Plant *et al.*, 2001). Експериментите на Ouwehand и сътр. (2002) с използването на изрязване на части от чревния тракт показват, че адхезията на *L. bulgaricus* към чревната мукоза е 24.5%, а на *L. casei* Shirota е 0.8%. Способността за имплантиране в чревния тракт на *L. bulgaricus* е сравнима с адхезията на пробиотични щамове като *Lactobacillus* GG и *Bifidobacterium lactis* Bb12, но е различна в отделните части на храносмилателния тракт. Авторите предполагат, че адхезията на

пробиотичните микроорганизми е различна в отделните части на храносмилателната система и имплантирането в отделните дялове зависи от количеството и вида на нормалната микрофлора, както и от взаимодействието с нея. Опити с животни показват, че във фекалиите се откриват както клетки на *L. bulgaricus*, така и на *St. thermophilus*, но установяването им се влияе от комбинациите им в стартерната култура, използвана за получаването на изследвания млечнокисел продукт (Djouzi *et al.*, 1997).

Изследване на Нернер и сътр. (1979) показва, че консумация на кисело мляко понижава холестерола, без да влияе на серумните триглицериди и телесната маса. Аналогични резултати относно понижените нива на холестерола получават Akalin и сътр. (1997) при продължителната консумация на кисело мляко. Резултатите на Pigeon и сътр. (2002) показват, че *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* могат да свързват жлъчни киселини и да повлияят на серумния холестерол. Изследователите предполагат, че *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* са активни в храносмилателния тракт и вероятно пробиотичните организми влияят на нивото на холестерола чрез различни механизми.

Редица експерименти доказват имуностимулиращата, антикарциногенна и антиоксидантна активност на *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* (Perdigon *et al.*, 1995; Hosoda *et al.*, 1992; Lin and Yen, 1999; Perdigon *et al.*, 1999; Wollowski *et al.*, 1999). Vodana и сътр. (1990), Nadathur и сътр. (1994) и Wollowski и сътр. (1999) допускат, че *L. bulgaricus* е с по-високи антимутагенни свойства в сравнение с *St. thermophilus*, като активността му вероятно се дължи както на някои специфични продукти от протеолизата на протеини така и на синтеза на хидрофобни съединения. Според резултатите на Pessi и сътр. (1999) *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* притежават свойства, които са сходни със свойствата на естествената микрофлора при човек, защото не предизвикват реакция на свръхчувствителност и хомогенизираните клетъчни компоненти не се разпознават като антигени.

Van de Water и сътр. (1999) установяват, че киселото мляко значително намалява проявата на симптомите на различни алергии. Boudraa и сътр. (1996, непубликувани данни) показват, че консумацията на кисело мляко значително облекчава симптомите и намалява продължителността на диария, причинена от ротавируси (Marteau *et al.*, 2001).

1.4. ПЕКТИНЪТ КАТО ПРЕБИОТИК

Според Simmering and Blaut (2001) терминът *пребиотик* е въведен от Gibson and Roberfroid (1995). Пребиотиците са несмилаеми хранителни съставки, които имат благоприятен ефект за консуматора чрез селективното стимулиране на растежа и/или на активността на един или на ограничен брой бактериални видове, които се естествена микрофлора на чревния тракт. Съдържанието на тази дефиниция, в по-малка или в по-голяма степен, е сходно с определението за хранителни фибри, с изключение на аспекта, който засяга селективното стимулиране на някои бактериални видове (Schezenmeir and de Vrese, 2001).

Пектинът се разглежда като вид хранителни фибри в групата на пречистените полимери (Spiller, 1991). Понятието хранителни фибри е обект на дискусии, претърпяло е различни промени и е трудно да се дефинира. Причината е, че фибрите се изследват от ботаници, химици, физиолози, гастроентеролози и специалисти от други области, които разглеждат фибрите от различен аспект в различните научни направления (Heaton, 1979).

Доказано е, че хранителните фибри имат важна роля върху чревната функция, оказват влияние върху холестерола и метаболизма на жлъчните киселини, влияят върху метаболизма и абсорбцията на въглехидратите (Spiller and Kay, 1979).

Резултатите на Holloway и сътр. (1983) показват, че по-голямата част от пектина приет с храната преминава през тънките черва и се метаболизира в крайните отдели на храносмилателния тракт. Установено е, че при ферментацията на ябълков пектин уроновите киселини се разграждат по-бързо в сравнение с неутралните захари – глюкоза, рамноза и ксилоза, които пектина съдържа до 13.1% от сухото си вещество. Ферментацията на пектина в *in vitro* условия при действието на чревни бактерии приключва за около 12 часа и като резултат се отделя главно ацетат (Titgemeyer *et al.*, 1991). Според Eastwood and Kay (1979) благоприятния ефект на пектина се дължи на два типа свойства: към пасивните свойства се отнасят стабилизиране, формиране на гел и водозадържаща способност, а към активните свойства – обмяна на катиони, абсорбиране на жлъчни киселини и антиоксидантна активност. Fernandez (1995) установява, че пектина влияе върху абсорбцията на холестерола и води до изменение в ентеро-чернодробната циркулация на жлъчните киселини, но предполага в регулативната му дейност участието на допълнителни механизми, които се нуждаят от изследвания за доизясняването им.

1.5. ПОЛУЧАВАНЕ НА СИНБИОТИК

Според Simmering and Blaut (2001) синбиотиците представляват комбинация от пробиотични микроорганизми и пребиотични съединения. Синбиотиците оказват благоприятен ефект като подобряват преживяването и имплантирането на живи микробни хранителни добавки в стомашночревния тракт и селективно стимулират растежа и/или активират метаболизма на един или на ограничен брой благоприятни за здравето бактерии.

Поради това, че терминът *синбиотик* се асоциира с определен синергизъм между съставлящите го компонентите, при използването на понятието се налагат някои уточнения. В най-тясна рамка терминът би трябвало да е специфичен само за продукти, в които пребиотичните съставки селективно благоприятстват пробиотичните бактерии, с които са в комбинация. В този строго определен смисъл, продукт който съдържа олигофруктоза и пробиотични бифидобактерии ще отговаря напълно на дефиницията, докато продукт който съдържа олигофруктоза и пробиотичен щам *Lactobacillus casei* няма да може да се нарече синбиотик. Освен това обаче, при съставянето на един синбиотик може да се има предвид синергизъм от друг порядък. В използваният пример пробиотичния компонент – лактобацилите ще имат ефект *in vivo*, а пребиотичния компонент ще стимулира бифидобактериите, които се естествените обитатели на храносмилателния тракт на гостоприемника. И при такава комбинация, полученият синбиотик няма да се отдалечава от определението си и също ще отговаря на изискванията (Schezenmeir and de Vrese, 2001).

1.6. ХИДРОКОЛОИДИТЕ И ТЯХНОТО ЗНАЧЕНИЕ ЗА ХРАНИТЕЛНИТЕ ПРОДУКТИ

Установено е, че хидроколоидите са полимери от растителен, животински, микробен или синтетичен произход, които обикновено съдържат много хидроксилни групи и могат да се проявяват като полиелектролити. Те са естествено присъствие или са допълнително добавени към различни хранителни продукти, за да контролират функционалните им свойства. Най-важните сред тези свойства са повишаването на вискозитета чрез сгъстяване и способността да свързват водата и желират. Тези свойства се използват при стабилизирането на емулсии, предотвратяването на повторното образуване на ледени кристали и подобряване на органолептичната

характеристика на продукта. По-специализираното приложения на хидроколоидите е насочено към адхезиране, суспендиране, флокулация, стабилизиране на пяна и образуването на филм (Philips and Williams, 2000).

Хранителните продукти са сложни комплексни материали и при комбинирането им с многофункционалните хидроколоиди се налага специфичен избор сред определени хидроколоиди. Най-широко използвани в практиката са: агар, алгинат, арабиноксилан, карагенан, карбоксиметилцелулоза, целулоза, курдлан, желатин, гелан, β -глюкан, гуар гума, гума арабика, пектин и нишесте.

Всеки от изброените хидроколоиди се състои от смес от сходни, но не идентични молекули с различен произход; има специфичен метод на приготвяне, термична обработка и условия към хранителния продукт, при който се използва. Съответното приложение на хидроколоидите зависи от съдържание на соли, рН и температура, защото изброените фактори влияят върху физичните им свойства (Chaplin, 2006).

1.6.1. Общи свойства на хидроколоидите

Всички хидроколоиди взаимодействат с водата като ограничават свободната ѝ дифузия. По правило по-слабо се разтварят неутралните хидроколоиди, а полиелектролитите са по-лесно разтворими като хидратационната кинетика зависи от редица фактори. Така например ксантанът, гуарът и карбоксиметилцелулозата са разтворими в студена вода, докато повечето алгинати, за цялостното си хидратиране, изискват разтваряне в гореща вода. В тези случаи водата се задържа чрез директни водородни връзки или попада в свободните вътрешни и междумолекулни пространства на формираната от хидроколоидите структура. Образуването на повече междумолекулни водородни връзки е причина хидроколоидите да стават по-хидрофобни и разпределението на водата в отделните зони да се променя. Създаването на водородни връзки между хидроколоидите и водата се влияе от температурата и налягането по начина, по който се влияе и образуването на водните агрегати (Giannouli и Morris, 2003).

В разтвор хидроколоидите се разполагат по различни начини в предоставеното им пространство, тъй като връзките между отделните вериги могат да се завъртат сравнително свободно в обкръжаващата ги среда в зависимост от потенциалната енергия. Хидроколоидите с конформационно

големи и инертни структури могат да се разглеждат като статични повърхности, които благоприятстват по-доброто „структуриране“ на заобикалящата ги вода (Giannouli и Morris, 2003).

Chaplin (2006) също отбелязва, че свойствата на хидроколоидите се дължат, както в частност така и в съвкупност, от една страна на техните структурни характеристики, а от друга с начина им на взаимодействие с водата. При взаимодействие с водата хидроколоидите желират когато се благоприятства в по-голяма степен не създаването на водородни връзки, а в някои случаи и йонни взаимодействия, а възникването на между- или вътрешно молекулни водородни връзки (вкл. образуването на соли). Често се наблюдава деликатен баланс между хидрофобността и хидрофилността на хидроколоидите. Разгънатите хидроколоиди показват склонност към оплитане при по-високи концентрации и сходните молекули могат да се увиват една спрямо друга, като формират свързани спираловидни зони. Особеното при тези пространствени реорганизации е, че протича без загуба на водородни връзки, но намалява конформационната хетерогенност и хидрофобните повърхности, които контактуват с водата. Така водата се освобождава за енергетично по-благоприятно взаимодействие на друго място. При описаните обстоятелства вероятно са необходими съвсем малък на брой взаимодействия, за да се преодолее ефекта на ентропията и връзките да се стабилизируют. Постепенното нарастване на зоните на съединяване във времето може да има и обратен ефект – освобождаване на водата и появата на синерезис (Chaplin, 2006).

Хидроколоидите с полизахаридна природа стабилизират емулсии главно чрез повишаването на вискозитета и като забавят термодинамично обусловеното разрушаване на емулсията. Емулгаторните свойства на такъв тип хидроколоиди са свързани основно с участието на белтъчни частици, които могат да бъдат както присъщи на средата, така и допълнителни съставки (Dickinson, 2003). Електростатичните взаимодействия, които зависят от рН и йонни сили, влияят на йоните на хидроколоидите и протеините и са причина за високата им емулгационна способност, съпроводена със значителна стабилност. В някои случаи денатурирането на белтъка води до подобрена емулгаторна способност и стабилност. Хидроколоидите могат да взаимодействат и с други компоненти на хранителния продукт като благоприятстват емулгирането на мазнини, стабилизират мицелите на млечните протеини или влияят на прилепването на глутена.

Смесването на структурно хетерогенни хидроколоиди предотвратява наблюдаването при високи концентрации само-агрегиране, като се възпрепятства кристализирането им и се подобрява разтворимостта. Размерът на частиците на хидроколоидите и разпределението им са важни параметри относно нивото им на хидратиране и емулгаторна способност. Отрицателно заредените хидроколоиди променят структурните си характеристики при промяна на рН и йонните сили като при висока киселинност зарядите изчезват и молекулата намалява разтегливостта си.

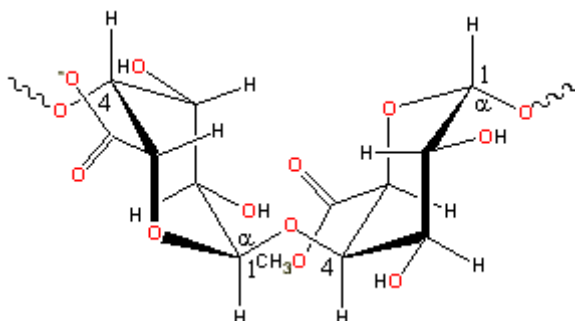
Приложението на хидроколоидите се определя от специфичните им свойства да свързват водата, да предотвратяват синерезиса, да влияят върху текстурата и технологичните характеристики, което според Giannouli и Morris, (2003) е свързано със значителни икономически ползи. Хидроколоидите намират приложение още в химическата, нефтопреработващата и козметичната индустрия (Chaplin, 2006).

1.6.2. Изследвания на пектина относно приложението му в хранителната индустрия

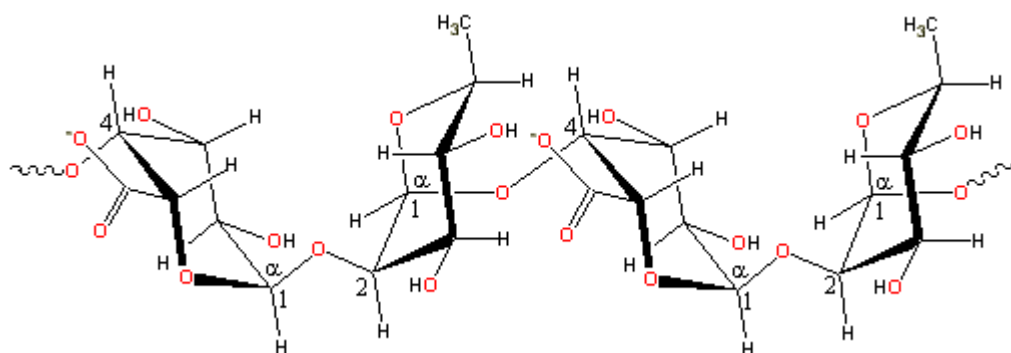
Известно е, че пектина е хетерогенна група от кисели полизахариди, които се откриват в плодове и зеленчуци и се извличат главно от “отпадъчни” цитрусови кори и ябълково кюспе. Получаването му се състои от редица етапи, които зависят от изходния материал и методът на екстракция. Известно е, че екстракцията с търговска цел води до значително разрушаване на субверигите, които съдържат неутрални захари. За преодоляване на този нежелан ефект са разработени и някои алтернативни методи за получаването на пектин. Sakai и Okushima (1980) разработват метод за извличането на пектин от цитрусови кори с използването на протопектин-разтварящи ензими на *Trichosporon penicillatum*. Най-подходящите условия за получаването на пектин при този метод включват: суспендирането на цитрусовите кори във вода (1:2, wt/vol), инокулиране с подобрения микроорганизъм и провеждане на ферментационен процес при 30°C с продължителност от 15 до 20 часа. По време на ферментационния процес пектинът се извлича почти напълно без мацерирание на плодовата кора. Чрез разработения метод се получават между 20 и 25g пектин на килограм изходна суровина. Важното предимство на разработения метод е, че получения пектин има високо съдържание на неутрални захари и е подходящ за практически цели.

1.6.3. Структура и свойства на пектина

Пространствената организация на пектина е изследвана от Perez и сътр. (2003). Основната част на структурата се състои от хомополимерни, частично метилирани поли- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови киселинни остатъци т.нар. гладки или неразклонени вериги (фиг.1.2). Пектиновата структура съдържа също разклонени алтернативни α -(1 \rightarrow 2)-L-рамнозил- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови участъци (фиг.1.3), които не желират. Те се състоят от разклонени, неутрални странични вериги, със съдържание на от 1 до 20 L- арабиноза и D-галактоза (рамногалактуронан I). Пектините могат да съдържат втори тип странични вериги: тип рамногалактуронан II. Те съдържат D-ксилоза, L-фукоза, D-глюкоронова киселина, D-апиоза и др.



Фиг. 1.2. Неразклонени вериги от частично метилирани поли- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови киселинни остатъци



Фиг. 1.3. Разклонени α -(1 \rightarrow 2)-L-рамнозил- α -(1 \rightarrow 4)-D-галактуронови участъци

Молекулна структура на пектините не е строго организирана (Perez *et al.*, 2000). Повечето от разклонените и неразклонени участъци са свързани помежду си от D-галактуроновите киселинни остатъци. Свързаните по

този начин молекули не получават строго определена конформация в разтвор, имат голяма степен на гъвкавост, могат да се разтягат и увиват. Разклонените участъци на пектина, които имат странично разположени арабиногалактани са дори още по-флексибилни. Карбоксилните групи имат склонност да разтягат структурата на пектина, което се дължи на заряда им, освен в случаите когато взаимодействат с двувалентни катиони, защото тяхното pK_a е около 2.9, което в повечето случаи осигурява значителен отрицателен заряд (Ralet *et al.*, 2001). Метилирането на тези карбоксилни групи води до получаването на метиловите им естери, които заемат еднакво пространство, но са по-хидрофобни и поради това имат различно влияние върху структурата на заобикалящата ги вода.

Данните на Ralet и сътр. (2001) показват, че степента на естерификация на пектините е обикновено около 70 % и при промяна на тази степен свойствата им се променят. Ниско метилираните (с по-малко от 40 % естерификация) пектини например, желират чрез дву-катионно калциево свързване между близко разположени вериги с оформянето на двойни бримки. Така се образуват структури, в които участват не по-малко от 14 до 20 остатъка.

Здравината на гела се увеличава с повишаването концентрацията на калциевите йони и намалява с увеличаване на температурата и киселинността ($pH < 3$). Това се наблюдава когато карбоксилните групи взаимодействат с освобождаването на свързаната към калциевите йони вода. За да се реализират зоните на съединяване е необходимо получаването на соли.

Пектинът желира при взаимодействие с двувалентни катиони по начин, сходен с действието на други алгинати. Пектинът желира по-добре при наличие на калциеви йони в сравнение с магнезиеви и по-добре с бариеви йони в сравнение със стронциеви. В присъствието на натриеви и калиеви йони пектина изобщо не желира. Контролираното отстраняване на метилираните групи чрез използването на метил-естерази превръща високо метилирания пектин във ниско метилиран докато провеждането на противоположния процес е трудно изпълнимо.

Tsoga и сътр. (2004) установяват, че високо метилираните пектини, с повече от 43 % естерификация и обикновено около 67 %, образуват гел чрез формирането на водородни връзки и хидрофобни взаимодействия в присъствието на киселини, pH около 3.0 и наличието на захари. От своя страна Kjoniksen (2004) определя, че в отсъствие на катиони ниско метилирания (35 % естерификация) пектин, дава прозрачни гелове, които се получават чрез формирането на подобни на цип комплекси при температура по-ниска

от 10°C. Реологичните свойства на нискометилираните пектини силно зависят от наличието и концентрацията на катиони на различни соли и рН.

1.6.4. Приложение на пектина в млечните продукти

През последните 10 години потребителите предпочитат търговските марки кисело мляко, които са с ниско маслено съдържание, но с по-сладък вкус и с по-плътна консистенция. Съдържание на мазнина в млякото има значение за коагулума, който се получава. За да се запази типичния коагулум на киселото мляко с намалено съдържание на мазнина се налага допълнително сгъстяване чрез използването на различни добавки (Mollet, 1996). В технологичен аспект основното приложение на пектините е като желиращи компоненти, водосвързващи вещества и стабилизатори. Ниско метилираните пектини (естерификация под 50 %) формират термообратими гелове в присъствие на калциеви йони и ниско рН 3 – 4.5. Високо метилираните пектини сравнително бързо формират, топлинно необратими гелове в присъствие на достатъчно количество (65%) захари напр. захароза при ниско рН (под 3.5). Колкото по-малко са метилираните групи в структурата на пектина толкова формирането на гел е по-бавно. Чрез използването на метил-естерази при търговските форми пектин степента на естерификация може частично да се намали, което води до по-висок вискозитет и по-здрав гел в присъствие на калциеви йони. Високо ацетилираните пектини (2-*O*- или 3-*O*-галактуронови киселинни остатъци) от захарно цвекло слабо формират гел, но притежават значителна емулгаторна способност, която се отдава на по-хидрофобната им структура, но също така може да се дължи на белтъчни примеси (Crowe, 2002). Подобно на други вискозни полианиони като карагенан пектинът може да има защитна роля при млечните колоиди, освен това повишава свойствата на суроватъчните протеини (стабилност, желиране и емулгиране), защото ги използва като източник на калций (Dickinson, 2003).

От направения литературен обзор е видно, че науката разполага със значителна информация относно видовете *St. thermophilus* и *L. bulgaricus*. Известно е присъствието им в основни хранителни суровини и ролята им като стартерни култури в редица ферментационни процеси, чрез които се получават продукти със значителен дял в дневното меню на хората (Vuyst, 2000). Морфологичните характеристики, физиологията и биохимията на *St.*

thermophilus и *L. bulgaricus* са интензивно изучавани. Използвани са съвременни методи за разграничаването им от сходни микроорганизми, разработени са методики за правилното им идентифициране и са проведени редица опити за уточняване на мястото им в общото филогенетично дърво. Интерес за систематиката представлява не само характеризирането на *L. bulgaricus* като подвид на *L. delbrueckii*, но това в особена степен важи за *St. thermophilus*. След разграничаването на родовете *Lactococcus* и *Enterococcus* от *Streptococcus* *St. thermophilus* се оказва единственият представител в групата си, който не е патогенен и взема участие във ферментационни процеси. При проучванията на *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* са установени основните им видови характеристики, но изследователите отделят специално внимание на щамовата специфичност, която е често наблюдавано явление при работата с различни изолати.

Получаването на нови данни относно стартерните микроорганизми, от една страна, е в направление към разширяване на информацията за вече изолираните щамове, допълнителното им характеризиране в светлината на нови аспекти и опити за нови приложения, както самостоятелно така и в различни комбинации. От друга страна експерименталната работа продължава с непрекъснатото изолиране на нови щамове, което е необходимо за разнообразяването и допълването на общото познание за дадения вид. Изолирането на нови щамове и откриването на специфичните свойства при съответните култури във всички случаи е свързано със значителна по обем, ресурси и време работа. Това налага изследването на ново изолираните култури да се съсредоточи в няколко основни направления, които да дадат база за разбирането и приложението на съответните култури. При откриването на перспективни култури работата върху тях се разширява и задълбочава.

Експерименталните данни на Vinderola и сътр (2002) показват многообразието от взаимодействия, които се наблюдават при съвместното развитие на различни видове микроорганизми. Известно е, че за получаването на киселото мляко значение имат не само специфичните характеристики на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus*, но и взаимодействието им в щамовите комбинации. При подходящи условия симбиозата между щамовете оптимизира получаването на продукта, а използването на такива естествено формиранни асоциации е целесъобразно и улеснява изследователската работа. Експерименталното създаване на такива комбинации има съответната методика и в идеалния случай води до получаването на симбиотични

двойки. Разкриването на особеностите на вече създадените култури ще осигури възможност за приложението им в специфично формулирана среда и конкретните условия на даден ферментационен процес.

Киселото мляко и специфичната му микрофлора са в основата на разработването на концепцията за пробиотиците. По дефиниция пробиотиците трябва да притежават редица свойства, а изследването на всички възможности не би могло да приключи в рамките на един експеримент. При това трябва да се отбележи, че за да се използва даден пробиотичен щам не винаги е необходимо цялостното и изчерпателно му във всички възможни аспекти характеризирание. Понастоящем определението за пробиотик налага сред основните си изисквания пробиотичните бактерии да са изолирани от човек или животно и да се прилагат точно за вида от който са изолирани. Това обаче създава редица, в някои случаи непреодолими затруднение при технологичното използване на такива щамове. Освен това е необходимо да се установи пълната им безопасност за консуматора. Предполага се, че всяка промяна на микрофлората на гостоприемника с използването на недостатъчно характеризирани щамове е свързано с висок риск от непредвидими и неблагоприятни ефекти. В този смисъл използването на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* се основава на категоричните доказателства относно отличните им технологични характеристики, не само по време на производствените операции, но и в условията на съхранение на продукта. Няма данни, че двата вида са патогенни и не са изолирани като причинител на заболявания дори при пациенти с компрометиран имунитет. Безопасността на продукти с участието на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* е безспорна, а дълготрайната им роля за дълголетието и здравето непрекъснато получава нови потвърждения.

За удовлетворяването на технологичните и пробиотични изисквания към продукти с *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* е важно запазването на микрофлората в достатъчно голям брой, физиологично активни клетки. Функционирането на бактериалните клетки в млякото осигурява получаването на разнообразни метаболити. Те обединяват различни органични киселини, от които лактата се посочва като съединение с пробиотичен ефект и вещества с инхибиторно, антикарциногенно, имономодулиращо и имуностимулиращо действие.

При производството на кисело мляко се използват особеностите в последователността на развитието на щамовете, киселинообразователната им способност по време на инкубирането, взема се под внимание поведението

им след охлаждането и съхранението на продукта. За успешното осъществяване на производствения процес освен използването на щамовете и комбинациите им много често се прилагат и различни добавки, за да се оптимизират качествата на продукта. В повечето случаи използването на добавки в киселото мляко удовлетворява строго определена цел. Обикновено интензивно изследваната технологична роля на съставката е за сметка на проучванията върху биологичната ѝ роля или обратното, ако акцента е поставен върху изследванията за здравословните ползи вероятно по-малко се знае за поведението в хода на технологичните операции. По-цялостно изследване може да се проведе като се използват получени в други научни области данни за адитива и информацията се допълни с изясняване на влиянието му върху свойствата на средата и микрофлората на киселото мляко. В по-новите изследвания съществува значително разграничаване между добавките използвани в технологично отношение и тези със здравословен ефект. Оптималната комбинация се постига чрез използването на добавки, които имат благоприятен за здравето ефект, но в същото време достатъчно добре удовлетворяват и редица технологични свойства. Такъв пример на добавка е пектинът при получаването на кисело мляко. Чрез водозадържащата си способност и формирането на гел той добре взаимодейства с млякото като среда и в същото време има благотворно влияние върху чревната функция. Използването на пектина запазва естествените качества на киселото мляко като продукт и отговаря на търсенето на природосъобразен начин на хранене.

Изследванията върху пектина са насочени в по-голяма степен към изясняване на структурата му, взаимодействието с водата, изискванията при образуването на гел и др. Известно е, че претърпява незначителни изменения при действието на стомашните ензими и се разгражда от бактериите в крайните отдели на чревния тракт (Holloway *et al.*, 1983). Поради това много малко изследвания се занимават с влиянието на пектина върху типичната микрофлора на киселото мляко. Значението на киселото мляко като част от дневната хранителната дажба и ролята му в здравословния статус на организма, обуславя усилията в посока към изясняване на такъв тип взаимодействие и отразява актуалните търсенията в една непрекъсната обновяваща се област.

2. ФОРМУЛИРАНЕ НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Представеният литературен обзор показва, че киселото мляко е обект на засилен интерес поради хранителните и биологичните си качества. Независимо, че са изяснени значителна част от микробиологичните и технологични му особености, търсенето на нови щамове и изясняването на взаимодействието им е необходимо за развитието на технологията на киселото мляко. В отговор на изискванията на потребителите се търсят нови формули за комбиниране на микрофлората и обогатяването на киселото мляко с различни функционални съставки. Влиянието на такива съставки върху свойствата и качеството на киселото мляко, в повечето случаи, е обект на доизясняване. Все още малко е известно за влиянието, което оказва пектина върху микрофлората и качеството на киселото мляко.

Целта на дисертационния труд е изолиране на активни щамове *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и изследване на технологичните им свойства при получаването на млечнокисели продукти с пектин.

За постигане на целта са поставени за изпълнение следните задачи:

1. Изолиране, идентифициране и характеризиране по основни технологични показатели на щамове *Streptococcus thermophilus*, подходящи за получаване на млечнокисели продукти.
2. Изолиране, идентифициране и характеризиране по основни технологични показатели на щамове *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, подходящи за получаване на млечнокисели продукти
3. Създаване и характеризиране по основни технологични показатели на симбиотични двойки от избрани щамове *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за получаването на кисело мляко.
4. Изследване на влиянието на определени концентрации пектин върху активността на избрани симбиотични двойки от *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за качеството на киселото мляко.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ ЗА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА РАБОТА

3.1.1. *Микробиологични среди*

3.1.1.a. *M17-бульон и агар.*

M17-бульон със следния състав: триптон – 2.5, месен пептон – 2.5, соев пептон – 5, дрождев екстракт – 2.5, месен екстракт – 5, натриев глицерофосфат – 19, магнезиев сулфат – 0.25, аскорбинова киселина – 0.5, лактоза – 5. Всички съставки са изразени в количество g/l.

M17-агар е с аналогичен на M17-бульон състав, но с 15g/l прибавен агар.

3.1.1б. *MRS-бульон и агар.*

MRS бульон е със състав в g/l: протеозо-пептон – 10, месен екстракт – 8, дрождев екстракт – 4, D(+) глюкоза – 20, натриев ацетат – 5, триамониев цитрат – 2, магнезиев сулфат – 0.2, манганов сулфат – 0.05, дикалиев фосфат – 2, полисорбат 80 – 1.

MRS-агар е със състав аналогичен на MRS-бульона с добавка от 14 g/l агар.

Използваните микробиологични среди са произведени от Scharlau Chemie, Испания.

При използване на микробиологичните среди е спазвана следната процедура: според указанията на производителя определено количество прахообразна хранителна среда се поставя в предварително измити, изплакнати с дестилирана вода, подсушени и надписани колби. В колбите мерително се налива необходимото количество дестилирана вода, която заема не повече от 2/3 от обема. Средата се нагрива до пълното ѝ разтваряне и избистряне на разтвора. Стерилизира се в автоклав при температура 121°C за 15 min. Средите се съхраняват при стайна температура без достъп на пряка слънчева светлина. Преди използването си средите се разтопяват и охлаждат до 45-50°C.

3.1.2. *Обезмаслено сухо краве мляко*

В експериментите е използвано сухо обезмаслено краве мляко, производител Humana Milchunion eG (Германия). Основният състав на млякото е протеин – 36 %, лактоза – 51 %, пепелно съдържание – 8.1 %, водно съ-

държание – 4–5%. Според производителя, микробиологичния контрол обхваща анализа на: колиформи, *Staphiloccocus aureus* и *Clostridium perfringens*, които не се установяват на грам от продукта. Бактериални клетки на *Salmonella* subsp. не се установяват при 25 грама от продукта.

Подготовката на млякото включва претеглянето на прахообразното мляко на техническа везна с точност до 0.1g. Използва се определено количество суха субстанция според крайния обем на течността, за да се постигне във възстановеното мляко концентрация от 10% сухо вещество. Сухото мляко се разтваря във питейна вода при непрекъснато разбъркване и след пълното разтваряне се прецежда. Възстановеното мляко се налива количествено, като е не повече от 2/3 от обема на съда. Млякото се стерилизира в автоклав при режим: температура 121°C за 13 min. До използването си млякото се съхранява при 4°C. Преди всеки експеримент се проверява стерилността му чрез загряване в кипяща водна баня за 1 min.

3.1.3. Пектин

В експериментите е използван ябълков пектин. Приложението на продукта е насочено към удовлетворяването на терапевтични и медицински цели. Описанието на продукта според данните на производителя е както следва:

Физични свойства: външен вид – свободно сипещ се прах, цвят– сиво кремав до светлокафяв, гранулометрия – > 250 микрометра %: макс.1.0, < 75 микрометра %, макс. 25.0.

Химични свойства: степен на естерификация в %- мин. 69, галактуронова киселина- > 65%, активна киселинност на разтвор1% – рН=2.8-3.5, неразтворима в киселина пепел, % – макс. 1.5.

Замърсявания: тежки метали ppm: макс.20.0.

Микробиология: *Salmonella* ssp.: липсва в 30/g, дрожди и плесени: макс. 100/g, колиформни бактерии: липсват в 10/g.

Използването на пектина е под формата на 10%-тен воден разтвор. Прахообразният пектин, претеглен на аналитична везна с точност до 0.001g се хомогенизира в хапан до еднородна маса чрез постепенното прибавяне на дестилирана вода със стайна температура. Приготвения разтвор се стерилизира чрез автоклавиране при температура 121°C за 15 min. До използването си разтворът се съхранява при 4°C.

3.1.4. Тест за идентификация на млечнокисели бактерии API 50 CH на БиоМерио (BioMerieux, Франция)

Стандартната система API 50 CH се състои от 50 биохимични теста за изследване на въглехидратния метаболизъм и в комбинация със среда API 50 CHL се използва за идентификацията на представители на род *Lactobacillus* и някои родствени микроорганизми. Тестът API 50 CH съдържа 50 микротубички, които съдържат въглехидратни субстрати и техни производни (хетерозиди, полиалкохоли, уронови киселини). Съдържанието на стандартният тест е: 10 ампули среда API 50 CHL, комплект от 10 субстратни галерии и 10 кутии с капак.

Среда API 50 CHL има следния състав в 1000 ml дестилирана вода: полипептон – 10g, дрождев екстракт – 5 g, Tween 80 – 1 ml, дикалиев фосфат-2 g, натриев ацетат – 5 g, диамониев цитрат – 2 g, магнезиев сулфат – 0.20 g, манганов сулфат – 0.05 g, бром-крезолпурпур – 0.17 g, рН=6.7-7.1. До използването си теста е съхраняван при 4°C според изискванията на производителя.

Тестът е използван за определянето на способността за ферментацията на субстратите по време на инкубацията. Инокулирани са само тубичките, като капачетата са оставени свободни. Избегнато е образуването на въздушни мехурчета в тубичките. Резултатът е отчетен по промяна на цвета на инокулираната с изследвания микроорганизъм среда в тубичките. В случаите когато микроорганизма е способен да усвоява специфичният субстрат, в резултат от действието му се отделя киселина, която предизвиква промяна в цвета на рН индикатора.

3.2. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ:

3.2.1. Изолиране на чисти култури

Изолирането и подборът на щамовете е извършен от колекцията млечнокисели култури, собственост на научно-приложна лаборатория LbLact. Пробите кисело мляко се препосаяват няколко пъти в обезмаслено стерилно мляко, при количество на инокулума 2% с цел активиране на микрофлората. От активираната закваска се приготвят разреждания в стерилна вода. От разреждания 10^6 , 10^7 и 10^8 се правят дълбочинни посеви в M17-агар и MRS агар. Посетите петриевы блюда се термостатират при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ в продължение на 48 часа. Прорасналите типични колонии, пред-

варително наблюдавани и отбелязани под микроскоп, се изолират със стерилна игла и се внасят в стерилно обезмаслено мляко. Посевките се термостатират при температура $43^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. От епруветките където млякото коагулира се приготвят препарати, които се оцветяват и наблюдават под микроскоп. Пробите с най-типична за *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* микроскопска картина се препосяват отново. От тях се правят нови разреждания и посеви. Прорасналите колонии отново се проверяват под микроскоп, най-характерните се отделят и посяват в стерилно мляко. Описаните операции се повтарят още 2-3 пъти.

3.2.2. Идентифициране на щамовете

При идентифицирането на щамовете е използвана методиката на IDF 146:1991.

За определяне на биохимичния профил на щамовете те се активират двукратно чрез препосяването им в стерилно мляко до коагулацията му. Активираните щамове се посяват върху полегат агар на съответната селективна среда и се инкубират за 48h при температура $43^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Прорасналите колонии се суспендират в среда CHL 50. Инокулирането на въглехидратните субстрати е съгласно инструкциите на производителя, без да е използвано минерално масло за покриването им. Тестовете се инкубират при температура 37°C за 48 часа. Резултатът е отчетен по включената в комплекта идентификационна таблица.

3.2.3. Определяне времето на коагулация, минути и час (h)

За време на коагулация се отчита времето в минути от термостатирането на пробите при $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ до коагулация. За време на коагулация се приема понижаването на рН на стерилното мляко до стойност 4.7.

3.2.4. Определяне на активната киселинност (рН)

Подготовката на пробите при измерване на активната киселинност включва темперирането им до 20°C . Активната киселинност се определя потенциометрично с рН-метър с комбиниран електрод, модел РНТ003 (производител EON trading USA- Vulteh Bulgaria). При калибрирането на рН-метъра са използвани буфери с рН=7.00 и рН=4.01.

3.2.5. Определяне на обща титруема киселинност (°Т)

Общата титруема киселинност е определяна по методиката на БДС 1111-80 и е представена в градуси Тьорнер (°Т). При сравняването с данните на други автори общата титруема киселинност е преизчислявана в процент млечна киселина по формулата $^{\circ}\text{T} \times 0.009 = \% \text{ млечна киселина}$.

3.2.6. Определяне на общ брой микроорганизми (CFU/ml)

Общият брой микроорганизми в колонообразуващи единици на ml е определян с използването на съответни селективни среди – M17-агар за изброяване на клетки на *St. thermophilus* и MRS-агар за клетки на *L. bulgaricus*. Условието на инкубиране на петриевите блюда са аеробна атмосфера, температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ и продължителност – 72 часа. Обект на внимание са петриеви блюда, в които броя на колонии е от 30 до 300. Петрита, в които е нарушена стерилността и има външно замърсяване са изключвани от експерименталните резултати. Броят на микроорганизмите е изчисляван съгласно *IDF стандарт 117B:199* по формулата:

$$CFU / ml = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$$

където $\sum C$ е сумата от всички изброени колонии в двете последователни разреждания, V е количеството на посевния материал, n_1 е броя използваните петрита за първото разреждане, n_2 е броя на използваните петрита за второто разреждане и d е числото 10 повдигнато на степенния показател на по-ниското разреждане. Изчисляването броя на микроорганизмите е съгласно *IDF-117B:199*.

3.3. СЪЗДАВАНЕ НА СИМБИОТИЧНИ ДВОЙКИ

Получаването на симбиотични двойки е по модифицирана методика възприета от Централна експериментално-производствена лаборатория – София (ЦЕПЛ, София). Стерилно краве мляко се инокулира с общо 2% закваска чрез посяването на 1% активирани щамове *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* и се термостатира при $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ до видима коагулация. Определя се времето за коагулацията и на микроскопски препарати се наблюдава морфологията на двата вида и съотношението между тях. Комбинираните щамове ежедневно се препосвят в стерилно мляко от една и съща партида

в продължение на 1 месец, като се следи времето на коагулация да не превишава 2-2.30 часа, съотношението между *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* да е от 3:1 до 5:1 без промяна в типичната морфология на компонентите. Комбинациите които показват стабилни стойности на времето за коагулация и имат добра морфологична характеристика се приемат за симбиотични. Симбиотичните двойки са поддържани чрез ежеседмично препосвяване в стерилно мляко и са наблюдавани микроскопски в продължение на две години.

3.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ КИСЕЛИНОУСТОЙЧИВОСТТА НА ЩАМОВЕ *L. BULGARICUS*

За определяне на толерантността на културите към ниско рН, което имитира условията на стомаха е използвана методиката на Shah and Jelen (1990) и Berrada и сътр. (1991). Пробите коагулират под действието на изследвания щам, съхраняват се 24 часа при хладилни условия, след което се подкисляват с използването на 1.25N HCl до рН=3.0. Третирането се осъществява на тъмно, при температура 37°C за 120 min. Пробите се неутрализират с 1.25N NaOH до изходното си рН. От културата се правят подходящи разреждания на изходната среда и след киселинното третиране. С 1 ml от направените разреждания дълбочинно се посяват петрита със среда MRS и се термостатират за 72h при 43°±2C. Колониите се изброяват и броя микроорганизми се изчислява според възприетата методика (IDF-117B:199).

3.5. ОРГАНОЛЕПТИЧНА ОЦЕНКА

За органолептичната оценка на щамовете и симбиотичните двойки е използвано натурално краве мляко, хомогенизирано на 180atm при 60°C и пастьоризация при 90°C със задръжка 25 min. Млякото се охлажда до 45°C, посява се с 1% от изследваната култура и се термостатира при 43°C ±2 до достигане на киселинност 68 – 70°T. Съдовете се оставят на стайна температура за 30 min след което се съхраняват при хладилни условия за 16-18 часа до дегустация. Органолептичната оценка е извършена съгласно БДС 15612-83.

3.6. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Повторяемостта на експериментите е четирикратна, което позволява математико-статистическа обработка. Графиките са създадени с програма

SigmaPlot-2001. Статистическата обработка на данните е получена с прилагане на ANOVA с критерия на Fisher и t-тест с използването на програма SPSS 11.0. При определяне киселиноустойчивост на щамове *L. bulgaricus* е използвана и статистическата обработка с t-тест в програма Excel за Windows XP. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от експерименталната работа са представени съгласно методичния ход на изследователския план.

4.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЩАМОВЕ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Изолирани и изследвани са щамове, които принадлежат на вида *St. thermophilus*. Щамовете са селектирани от колекцията на Лаборатория за мляко и млечни продукти LbLact.

4.1.1. Идентифициране на щамовете

4.1.1.а. Оцветяване по Грам:

Оцветяването на клетки на *S8*, *S10*, *S17*, *S19*, *S22* и *S23*, инкубирани 24h в M17-бульон показва грам-положителност.

4.1.1.б. Морфология на клетките:

Микроскопското наблюдение на щамове *S8*, *S10*, *S17*, *S19*, *S22* и *S23* установява кръгли до овални единични клетки, групирани по двойки или в къси верижки. При щамове *S8* и *S10* преобладават дълги верижки от клетки. При щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* се наблюдават предимно диплококи и къси верижки.

Върху M17-агар след инкубиране от 48 – 72 часа, при аеробни условия и температура $43 \pm 2^\circ\text{C}$ щамовете формират типични за вида колонии. Колониите са добре оформени, с млечно бял цвят и гладки краища, на повърхността на агара са овални по форма, във вътрешността на агара – лещо-видни.

4.1.1.в. Физиология:

Щамовете се развиват в мляко при два температурни режима 37°C и $43 \pm 2^\circ\text{C}$, като предизвикват коагулация за определено време. Щамовете се развиват при инокулиране в M17 бульон и инкубиране за 7 дни при температура $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Щамовете не се развиват при инокулиране в M17 бульон и инкубиране за 7 дни при температура 10°C .

4.1.1.г. Биохимична характеристика:

Резултатите от API-50-CHL теста показват, че изследваните щамове *S8*, *S10*, *S17*, *S19*, *S22* и *S23* имат сходна ферментационна активност. От изследваните 49 въглехидрати и техни производни проучваните щамове

разграждат единствено глюкоза, захароза и лактоза. Усвояването на глюкоза, захароза и лактоза е характерно за 100% от представителите на вида *St. thermophilus*. Получените резултати дават основание изследваните щамове да се определят като типични представители на вида *St. thermophilus*.

4.1.2. Изследване на щамове *St. thermophilus*, по основни технологични показатели

4.1.2.a. Определяне ферментационната активност на щамове *St. thermophilus*

При изолираните и подбрани за изпитване щамове се наблюдава отчетлива разлика във времето на видимата коагулация на млякото. Два от наблюдаваните щамове (*S8* и *S10*) показват по-бавна коагулация в сравнение с останалите четири (*S17*, *S19*, *S22* и *S23*).

Данните в таблица 4.1 и 4.2 показват промените в активната киселинност (рН) на средата при действието на щамове *St. thermophilus*. Активната киселинност на средата при инокулация с щам *S10* е 6.57 ± 0.17 , а при щам *S8* – 6.55 ± 0.19 . Както се вижда от таблица 4.1 стойностите на изходната киселинност на средата при *S8* и *S10*, осигуряват еднакви условия за начало на процеса и добра сравнимост на резултатите в хода на изследването.

На първия час активната киселинност при *S10* е 6.40 ± 0.27 и при *S8* – 6.43 ± 0.17 . Изменението на активната киселинност от инокулация до 1-я час е сходно при двата щамове, като при *S10* е 0.15 и при *S8* – 0.14. Обработката на данните показва, че при двата щамове, не се отчита съществена разлика между инокулация и 1-я час, което е резултат от по-бавното развитие на щамове.

Таблица 4.1. Изменение на активната киселинност (рН) на мляко при дейността на щамове *St. thermophilus* (*S8* и *S10*), инкубирани при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за период от 5 часа.

Щам <i>Streptococcus thermophilus</i>	Активна киселинност, рН					
	0h	1h	2h	3h	4h	5h
<i>S8</i>	6.57 ± 0.17	6.43 ± 0.17	6.26 ± 0.04	5.20 ± 0.07	4.84 ± 0.09	4.66 ± 0.13
<i>S10</i>	6.55 ± 0.19	6.40 ± 0.27	6.21 ± 0.4	5.25 ± 0.16	4.80 ± 0.17	4.63 ± 0.23

На втория час култура *S10* с $\text{pH}=6.21 \pm 0.4$ показва по-ниска активна киселинност в сравнение с *S8* – $\text{pH}=6.26 \pm 0.04$. Понижението на активната киселинност на 2-я час е 0.19 при щам *S10* и 0.17 при *S8*. От инокулирането на млякото до втория час двата щама показват аналогичен ход на понижаване на активната киселинност (с 0.1 – 0.2 единици на всеки едночасов интервал). Независимо от това данните доказват, че докато при култура *S8* изменението на активната киселинност е несъществено само в рамките на първия час, то при *S10* процеса на киселинообразуване е забавен до 2-я час.

На 3-я час изменението на активната киселинност при *S8* и *S10* е 6 – 7 пъти по-голямо от средното изменение за предходните два етапа. На 3-я час щам *S8* достига $\text{pH}=5.20 \pm 0.07$ (понижение от 2-я час с 1.06), а щам *S10* – $\text{pH}=5.25 \pm 0.16$, с понижение спрямо предходния етап 0.96.

На 4-я час двете култури имат сходно pH като по-ниска стойност се установява при *S10* с 4.80 ± 0.17 , а при *S8* – 4.84 ± 0.09 . Очевидно е, че от 3-я до 4-я час изменението на активната киселинност при *S8* и *S10* е по-малко в сравнение с изменението между 2-я до 3-я час.

В интервала от 4-я до 5-я час културите понижават pH със забавено темпо. На 5-я час от изследването млякото с култура *S10* има по-ниско $\text{pH}=4.63 \pm 0.23$ в сравнение с щам *S8* – 4.66 ± 0.13 . В интервала от 4-я до 5-я час изменението на pH , което се наблюдава при щам *S10* е статистически несъществено, което се дължи на намаляването на активността на щамата през последния етап от култивирането му.

Представените в таблица 4.1 данни показват, че за период от 5 часа при избраната хранителна среда, в условията на стационарно термостатно развитие, при оптимална температура за култивиране изследваните култури *St. thermophilus* (*S8* и *S10*) могат да понижат активната киселинност до 4.63 – 4.66. Стойността на pH е показателна за реализирана ферментация в рамките на изследвания период и получената активната киселинност е подходяща за получаването на млечнокисел продукт. Nassan и сътр. (2002) обясняват причината за ранната коагулация на млякото със способността на щамовете да отделят капсулни полизахариди в средата. Ранното формиране на гел по време на ферментацията на млякото има важно влияние върху коагулума, защото позволява реорганизиране на гела при последващото понижаване на pH и създаването на по-добре композирана и компактна структура.

Наблюдаваната обща закономерност при развитието на щамове *St. thermophilus* се подчинява на установена по-рано тенденция. Според Guss

и Delwiche (1954) при култивирането на *St. thermophilus* в мляко, което не съдържа допълнителни ситмулатори на растежа, в края на инкубационния период развитието на културите се забавя. Това е резултат от изчерпването на хранителните вещества в средата и отделянето на органични киселини, съпроводено с понижаването на рН през периода на ферментацията. При създадените условия размножаването на бактериалните клетки се забавя и натрупаната биомаса, без допълнително да нараства, запазва определена ферментационна активност (Guss и Delwiche, 1954).

В таблица 4.2, по аналогичен начин, са представени резултатите относно изменението на активната киселинност при щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23*. Стерилното мляко, което е използвано при експериментите, проведени с щам *S17*, се характеризира с по-ниска средна киселинност 6.54 ± 0.19 , следван от щам *S23* с рН 6.57 ± 0.17 , при *S19* и *S22* изходна активна киселинност е еднаква – 6.58 ± 0.17 . Обработката на данните показва, че наблюдаваното вариране в стойностите на изходната киселинност на средата е статистически не значимо, при което се осигуряват еднаквите изходни условия за провеждане на експеримента.

Таблица 4.2. Изменение на активната киселинност (рН) на мляко при действието на щамове *St. thermophilus* (*S17*, *S19*, *S22* и *S23*) инкубирани при температура 43°C ± 2 за период от 4 часа.

Щам <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	Активна киселинност, рН				
	0h	1h	2h	3h	4h
<i>S17</i>	6.55 ± 0.19	6.22 ± 0.27	5.17 ± 0.15	4.67 ± 0.23	4.55 ± 0.16
<i>S19</i>	6.58 ± 0.17	6.26 ± 0.16	5.19 ± 0.16	4.80 ± 0.15	4.58 ± 0.18
<i>S22</i>	6.58 ± 0.17	6.26 ± 0.18	5.20 ± 0.23	4.80 ± 0.16	4.59 ± 0.17
<i>S23</i>	6.57 ± 0.18	6.23 ± 0.2	5.21 ± 0.17	4.78 ± 0.14	4.57 ± 0.17

На първия час с най-ниска стойност на активната киселинност е щам *S17* с рН 6.22 ± 0.27 , следван от *S23* – рН= 6.23 ± 0.2 . С по-слабо изменение на активна киселинност и с еднаква стойност се характеризира млякото с *S19* – рН= 6.26 ± 0.16 и *S22* – рН= 6.26 ± 0.18 . При щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* понижението на активната киселинност на млякото от инокулация до 1-я час е 0.32 – 0.34 единици. Това изменение не е в съответствие с титруемата

киселинност, която през първия час от инкубирането се запазва без промяна или се изменя незначително. За сравнение трябва да се отбележи, че на 1-я час щамове *St. thermophilus* S8 и S10 изменят активната киселинност с не повече от 0.1 – 0.2 единици. Статистическа значима разлика на 1-я час се открива между S8 и S17, което се обяснява с различния темп на развитие им.

На 2-я час щам S17 е с най-ниска стойност на активната киселинност – 5.17 ± 0.15 , следван от S19 с $pH=5.19 \pm 0.16$. При щамове S22 и S23 активната киселинност се понижава съответно с 1.06 и 1.02, но тяхната активната киселинност е по-висока от S17 и S19: при S22 $pH=5.20 \pm 0.23$ и при S23 – $pH=5.21 \pm 0.17$. Понижението на активната киселинност от 1-я до 2-я час при S17, S19, S22 и S23 е аналогично на наблюдаваното при S8 и S10 от 2-я до 3-я час.

При сравняване на стойностите на активната киселинност на 2-я час при S17, S19, S22 и S23, с получените на същия час при S8 и S10 се открива статистическа значима разлика, а между щамове S17, S19, S22 и S23 няма съществена разлика. Статистическа разлика има при сравняването на средните стойности на активната киселинност, измерени при всеки един етап от развитието на щамовете S17, S19, S22 и S23 в млякото, от инокулирането до 3-я час.

На третия час млякото с щам S17 има най-ниско pH – 4.67 ± 0.23 , следван от щам S23 с $pH=4.78 \pm 0.14$. Изменението спрямо втория час при щамове S19 и S22 е със сходни стойности и активната киселинност при тях е еднаква – 4.80, а грешката на средната е съответно ± 0.15 и ± 0.16 .

През четвъртия час с най-ниска активна киселинност е средата с щамове S17 – 4.55 ± 0.16 , а S23 – 5.57 ± 0.16 . Щамове S19 и S22 имат сходни стойности на активната киселинност, съответно 4.58 ± 0.18 и 4.59 ± 0.17 .

Щамове S17, S19, S22 и S23 се подчиняват на закономерността, установена при S8 и S10 относно забавянето на процеса в края на инкубирането, но при развитието на S17, S19, S22 и S23 забавянето се наблюдава в интервала от 3-я до 4-я час.

Един от основните критерии за активността на стартерните култури е времето, което им е необходимо, за да понижат pH на средата. Изследваните щамове коагулират млякото като понижават активната киселинност от неутрални стойности до pH 4.6 – 4.5 за 4 – 5 часа. Данните са в съответствие с резултатите на Moreira и сътр. (2000), които докладват способността на щамове *St. thermophilus* да понижат pH до 4.71 – 4.40 за период

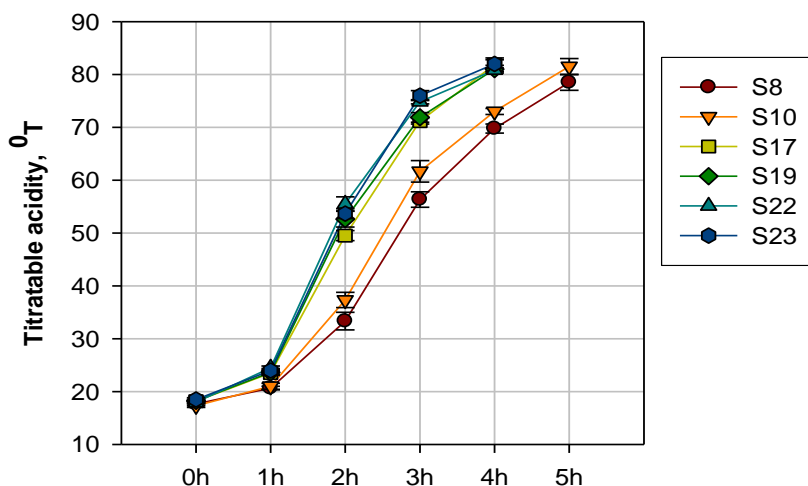
от 6 часа. Щамове S17, S19, S22 и S23 могат да се характеризират като активни киселинообразуватели в съответствие с критериите на Vaningelgem и сътр. (2003). Изследователите определят щамове *St. thermophilus* като активни, при понижаване на рН до 4.46 – 4.29, за 12 часа култивиране в мляко с 10% сухо вещество.

Интерес представляват резултатите на Chaves и сътр. (2002), които установяват, че активно киселинообразуващите щамове *St. thermophilus* отделят и по-големи количества ацеталдехид. Предполага се, че високата киселинообразуваща активност на щамовете *St. thermophilus*, в монокултура може да е свързана с наличието на определена протеолитичната способност. Активно киселинообразуващите щамове с протеолитична способност могат да си доставят самостоятелно необходимите аминокиселини или нискомолекулни пептиди от хранителна среда, в която не присъстват допълнителни стимулатори на растежа например продукти от хидролиза на казеина (Kothari and Nambudripad, 1973; Pearce *et al.*, 1974). Изказаното предположение се потвърждава от изследване, което установява съществуването на определена връзка между способността за ускорено киселинообразуване в мляко и наличието на протеинази (PrtS), асоциирани с клетъчната стена (Levander *et al.*, 2001). Наличието на тези ензими е сигурен показател за високата адаптация на щамовете към млякото като среда за развитие. Това мнение споделят Courtin и сътр. (2002), които установяват, че основни за развитието на *St. thermophilus* в мляко са протеиназните ензими (тип PrtS). Самостоятелното развитие на културите може да не се ограничава само до активността на PrtS, а да се свърже още и със скоростта на транспортирането на продуктите от протеолизата (Letort *et al.*, 2002, Garault *et al.*, 2002, Kunji *et al.*, 1995, Yu *et al.*, 1996). Установено е още, че протеолитичната активност на щамове *St. thermophilus* засяга преимуществено β - казеина и в по-малка степен α_{s1} -казеина. По данни на Shahbal и сътр. (1993) протеолизата е най-изразена в края на експоненциалната фаза, а през време на стационарната фаза може да се запази стабилна или бързо да намалява.

Резултатите показват, че за изследваните 6 щама *St. thermophilus* в условията на избраната хранителна среда и температура на инкубиране, съществен и логичен фактор за протичането на ферментацията е времето, което е необходимо за понижаването на активната киселинност до изискваните при такъв тип млечнокисел продукт стойности. От една страна, при щам S8 изменението на рН за изследвания период от 5 часа е аналогично

на установеното при *S10*, а от друга страна аналогично е сравнението между щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* за интервал от 4 часа. Статистическата разлика между двете групи щамове е установена с използването на t-тест. Щамове *S8* и *S10* достигат активна киселинност 4.5 – 4.6 средно около 1 час по-късно в сравнение с другите четири щама. Щамове *St. thermophilus* *S17*, *S19*, *S22* и *S23* получават по-добра технологичната оценка поради удълженото време за киселинообразуване при *S8* и *S10*.

На фигура 4.1 са представени обобщените резултати за изменение на общата титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) при ферментацията на средата с действието на изследваните щамове (*S8*, *S10*, *S17*, *S19*, *S22* и *S23*). Средата има малко по-ниска киселинност при инокулирането на *S8* – $17.7^{\circ}\text{T} \pm 1.4$ и *S10* – $17.3^{\circ}\text{T} \pm 1.4$, а при останалите четири култури средната киселинност на средата е с 1°T повече. Титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) е еднаква при *S17* с $18.4^{\circ}\text{T} \pm 0.51$ и *S23* с $18.4^{\circ}\text{T} \pm 0.7$ и малко по-ниска при *S19* – $18.3^{\circ}\text{T} \pm 0.3$ и *S22* – $18^{\circ}\text{T} \pm 0.3$. Статистическа разлика се открива само в изходната киселинност на млякото използвано в експериментите с култура *S10* спрямо *S17* и *S23*.



Фиг. 4.1. Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$), при щамове *St. thermophilus*, при температура на инкубиране $43 \pm 2^{\circ}\text{C}$ за 5 часа.

На 1-я час с най-висока титруема киселинност е млякото с щам *S22* – $24.2^{\circ}\text{T} \pm 0.5$, а с незначително по-ниска стойност са *S23* – $23.9^{\circ}\text{T} \pm 0.14$, *S19* – $23.8^{\circ}\text{T} \pm 0.7$ и *S17* – $23.6^{\circ}\text{T} \pm 0.6$. С най-ниска титруема киселинност на първия час е млякото инокулирано с *S10* – $21^{\circ}\text{T} \pm 2.5$ и *S8* – $20.7^{\circ}\text{T} \pm 1.5$. Най-

голямо е изменението при шам *S22* – 6.2°Т, а най-слабо при *S8* – 3°Т. Изменението при останалите култури е в споменатите граници като при култури *S19* и *S23* изменението има еднаква числена стойност – 5.5°Т, малко по-слабо при *S17* – 5.2°Т и при *S10* – 3.7°Т. Наблюдаваните разлики са статистически значими при съпоставянето на шамове *S8* и в *S10* спрямо *S17*, *S19*, *S22* и *S23*. На 1-я час няма статистическа разлика между *S8* и *S10*.

Разликата в хода на ферментация при *S8* и *S10* спрямо останалите четири шаме се запазва и през втория час от термостатирането им. На 2-я час средата с *S10* с 37.3°Т ± 6.3 има по-висока титруема киселинност спрямо *S8* – 33.3°Т ± 7.2. При сравняването трябва се посочи, че на същия етап при останалите четири шаме най-ниската установена титруема киселинност е при шам *S17* – 51.2°Т ± 2.7. Тази стойност превъзхожда с 13.9°Т титруемата киселинност при шам *S10* и с 17.9°Т при *S8*. В допълнение трябва да се отбележи, че изменението при *S17* спрямо първия час е 27.6°Т, докато при *S10* е 16.3°Т, а при *S8* – 12.6°Т. Сред активните шамове с най-висока титруема киселинност е *S22* – 53.5°Т ± 2.7, следван от *S23* – 52.7°Т ± 2 и с незначително по-ниска стойност е шам *S19* – 52.5°Т ± 3.1. Изменението на титруемата киселинност спрямо втория час при *S22*, *S23* и *S19* е съответно 29.3°Т, 28.8°Т и 28.7°Т.

На третия час млякото инокулирано с шам *S23* е с най-висока титруема киселинност – 74.2°Т ± 1.9 и с най-голямо увеличение от предходното измерване – 21.5°Т, следван от шам *S22* – 73.3°Т ± 1.1 и нарастване от 20.2°Т. С еднакво изменение са *S19* с 19.6°Т и *S17* с 19.4°Т със съответни стойности на титруемата киселинност 72.1°Т ± 0.1.7 и 70.6°Т ± 2. Сред изследваните шамове с най-ниска титруема киселинност отново са култури *S8* – 56.3°Т ± 6.3 и *S10* – 61.6°Т ± 8.7. Трябва да се отбележи, че на 3-я час нарастването на титруемата киселинност при по-слабо активните шамове *S8* и *S10* превъзхожда с 2 – 3°Т увеличението при *S17*, *S19*, *S22* и *S23*. При *S10* киселинността нараства с 24.3°Т, а при *S8* с 23°Т. Независимо от характера на изменението при *S8* и *S10* по-слабото киселинообразуване през първия и втория час се отразява на получените данни и средната стойност на титруемата им киселинност е по-ниска с 14°Т в сравнение с *S17*, *S19*, *S22* и *S23*.

На четвъртия час при дейността на *S17* титруемата киселинност на млякото е нараства с 11.7°Т до 82.3°Т ± 2.3, следван от *S19* с изменение от 9.2°Т и киселинност – 81.3°Т ± 1.4. При култивирането на шамове *S22* и *S23* титруемата киселинност се повишава с 8°Т и достига съответно 81.7°Т и 82.2°Т ± 1.1. Култури *S8* и *S10* показват по-голямо нарастване на титруемата

си киселинност на четвъртия час в сравнение с останалите култури: при *S8* нарастване с 13.7°T , а при *S10* с 11.4°T . Стойностите на титруемата киселинност при *S8* е $70^{\circ}\text{T} \pm 4.9$ и при *S10* – $73^{\circ}\text{T} \pm 2.5$, като киселинността им е по-ниска с 10°T в сравнение с най-високата измерена. За да достигнат стойност на титруемата киселинност, която отговаря на изискванията към продукта култури *S8* и *S10* трябва да се инкубират още 1 час. Така докато при култури *S17*, *S19*, *S22* и *S23* след четвъртия час може да се пристъпи към постепенно охлаждане на получения продукт, то при *S8* и *S10* термостатирането продължава. На 5-я час млякото с щам *S8* има титруема киселинност $77.3^{\circ}\text{T} \pm 6.2$ с нарастване от 7.3°T спрямо 4-я час, а *S10* – $81.3^{\circ}\text{T} \pm 3.8$ с нарастване от 8.3°T .

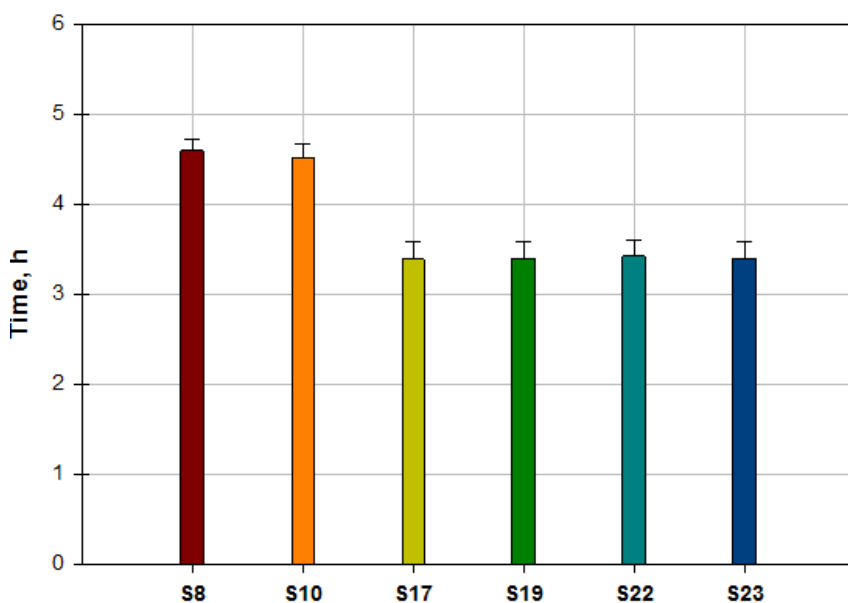
Статистическата обработка на данните за активната киселинност показва значима разлика между всяко едно измерване при отделните етапи от инокулация до 4-я час при култури *S17*, *S19*, *S22* *S23*, включително и изменението от 3-я до 4-я час. Забавяне в изменението на титруемата киселинност се установява при култури *S8* и *S10* от инокулацията до първия час.

Резултатите, представени на фигура 4.1 показват, че щам *S8* има ход на ферментация, който го отличава от останалите щамове, защото при култивирането му отделянето на млечна киселина е по-бавно. Щам *S10* също показва по-бавно развитие при сравнение с *S17*, *S19*, *S22* и *S23*. Щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* формират еднородна група, която се характеризира с кратка адаптационна фаза, последвана от етап на активно киселинообразуване и като резултат добро технологично време на коагулация на средата. Изброените особености са предпоставка за по нататъшното изследване на щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23*, тяхното по-пълно охарактеризиране и включването им в опити по съставянето на симбиотични двойки.

4.1.2.б. Определяне времето на коагулация

На фигура 4.2 е показано времето за което културите понижат активната киселинност на средата, при количество на инокулума 1%, стационарно термостатно култивиране и температура $43^{\circ} \pm 2\text{C}$. От получените данни се установява че, средното време за коагулация на млякото при действието на културите е най-кратко при щам *S19* с време (час, h) $3.37\text{h} \pm 0.51$ и *S17* с $3.38\text{h} \pm 0.60$. Незначителна разлика от тях показват щамове *S23* с $3.39\text{h} \pm 0.50$ и *S22* с $3.42\text{h} \pm 0.48$. Коагулацията на млякото се наблюдава при *S8* за $4.59\text{h} \pm 0.33$ и при *S10* за $4.52\text{h} \pm 0.40$. При сравняването на времето на

коагулация се установява статистическа значима разлика при щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* в сравнение с *S8* и *S10*.



Фиг. 4.2. Време на коагулация на щамове *St. thermophilus*

4.1.2.в. Пределното киселинообразуване на щамове *St.thermophilus*

Проследяването на пределното киселинообразуване на щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* е чрез термостатиране при температура $43^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ за срок от 21 дни.

След установяването на времето, за което културите достигат $\text{pH}=4.7$, термостатирането им продължава, с цел установяване периода през които те запазват способността си да отделят млечна киселина. В таблица 4.3 са представени данните за изменение на активната киселинност на ферментирал продукт при дейността на щамовете за период от 21 дни. При изследване на ферментационната активност стойностите на pH са регистрирани на точно определени интервали, при което непосредственото време за коагулация не е строго фиксирано. При установяването на пределното киселинообразуване културите показват видима коагулация на средата още на третия час, но достигането на изискваното pH се установява по различно време. За последващо охарактеризиране и сравнение за изходен момент е

възприето достигането на еднакво рН. В началния етап на експеримента, щамове имат рН=4.7 при статистически несъществени колебания.

Таблица 4.3. Изменение на активната киселинност (рН) на мляко, при действието на щамове *St. thermophilus* (S17, S19, S22 S23), инкубирани при температура $43 \pm 2^\circ\text{C}$ за срок от 21 дни.

Щам <i>Streptococcus thermophilus</i>	Време, час (h) и дни (d)					
	При коагулация	24h	48h	7d	14d	21d
S17	4.7	4.11	4.12	4.11	4.10	4.23
	± 0.08	± 0.14	± 0.14	± 0.2	± 0.43	± 0.8
S19	4.7	4.12	4.14	4.13	4.19	4.23
	± 0.1	± 0.14	± 0.08	± 0.17	± 0.18	± 0.34
S22	4.7	4.19	4.19	4.18	4.12	4.20
	± 0.2	± 0.04	± 0.04	± 0.33	± 0.33	± 0.5
S23	4.7	4.15	4.15	4.16	4.11	4.22
	± 0.1	± 0.12	± 0.13	± 0.24	± 0.29	± 0.56

На 24-я час с най-ниско рН е щам S17 с 4.11 ± 0.14 , следван от S19 с 4.12 ± 0.14 , S23 – 4.15 ± 0.12 и S22 – 4.19 ± 0.04 . Изменението спрямо коагулация е 0.59 – 0.51 единици. Активната киселинност на 24-я час при изследваните щамове S17, S19, S22 и S23 е в съответствие с данните на Xanthopoulos и сътр. (2001). Изследователите докладват рН_{24h} в граници от 4.15 до 4.45 при щамове *St. thermophilus*, изолирани от кисело мляко.

На 48-я час активната киселинност на млякото с културите не се изменя: S17 – рН= 4.12 ± 0.14 , S19 – 4.14 ± 0.08 , S22 – 4.19 ± 0.04 и S23 – 4.15 ± 0.13 .

На 7-я ден при щам S23 се забелязват незначителни изменения в рН и стойността е 4.16 ± 0.16 . При останалите щамове понижение е сходно като щам S17 има активна киселинност 4.11 ± 0.2 , S19 – 4.13 ± 0.17 и S22 – рН= 4.18 ± 0.33 .

На 14-я ден не настъпват никакви съществени изменения в активната киселинност. С най-ниско рН е S17 с 4.10 ± 0.43 , следван от S23 с 4.11 ± 0.29 , S22 с 4.12 ± 0.33 и S19 с 4.19 ± 0.18 .

На 21-я ден при всички култури се наблюдава слабо повишаване на рН. При S17 – рН= 4.23 ± 0.8 и изменението е – 0.13. Щам S19 запазва стой-

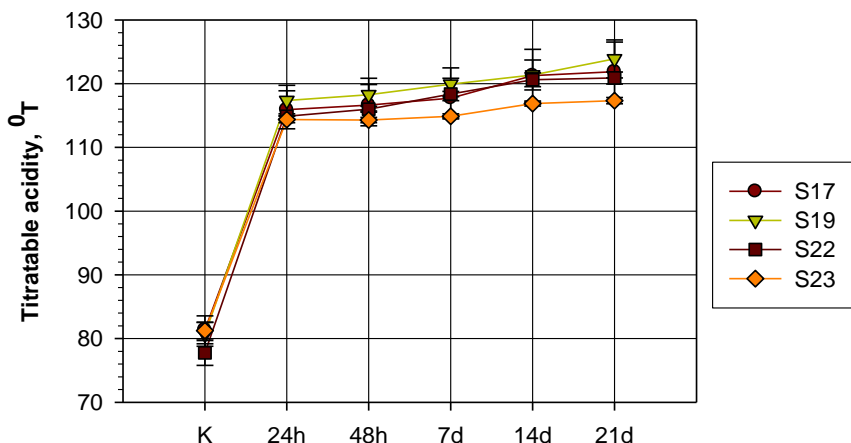
ността на рН – 4.23 ± 0.34 . Аналогични са стойностите на активната киселинност при S22 – рН= 4.20 ± 0.5 и S23 – рН= 4.22 ± 0.56 и съответно изменение 0.08 и 0.11.

Незначителното повишаване на киселинността в края на изследвания период може да се обясни с известна уреазна активност на *St. thermophilus*. Pernoud и сътр. (2004) установяват, повишаване на рН на средата при хидролизата на урея. Реакцията протича под действието на уреаза като се отделят амоняк и въглероден диоксид, които в присъствие на вода образуват въглеродна киселина, която бързо се разлага отново до вода и CO_2 . Авторите отбелязват, че този ефект е значително по-голям при ниска концентрация на млечната киселина (т.е. условия които отговарят на началото на развитието), отколкото при по-високи концентрации на лактата (т.е при условия отговарящи на крайните етапи от развитието).

Повишаването на рН може да се дължи на освобождаването на екзоензими вследствие нарастване на броя на лизиралите клетки, независимо че спонтанното лизиране засяга много по-малко бактериални клетки отколкото провокираното чрез външни фактори (Husson-Kao *et al.*, 1999). Възможно е още протичането на различни биохимични реакции, които изчерпват част от водородните йони при температура на инкубиране – $43^\circ \pm 2\text{C}$.

Получените резултати показват, че статистически значимо изменение в стойността на рН се установява само за периода от момента на коагулация до 24-я час. След този интервал стойностите на активната киселинност се изменят несъществено. Сравнението между изследваните култури не установява значима разлика в киселинността през периода от 21 дни.

На фигура 4.3 е показано изменението на общата титруема киселинност при термостатиране за период от 21 дни. При рН на средата 4.7 титруемата киселинност варира статистически несъществено от 78°T до 81°T . Средата коагулира при по-ниска титруема киселинност с щам S22 – $77.8^\circ\text{T} \pm 4.6$ и при по-висока с щамове S17 – $81.4^\circ\text{T} \pm 5.2$, S23 – $81.3^\circ\text{T} \pm 3$ и S19 – $80.7^\circ\text{T} \pm 4.3$. Както се вижда от фигура 4.3 активно киселинообразуване на щамовете се наблюдава през първите 24 часа от термостатирането и данните съответстват на изменението на активната киселинност. На 24-я час най-висока е титруемата киселинност на млякото, инокулирано с S19 – $117.4^\circ\text{T} \pm 5.3$ (нарастване от 36.7°T), следван от S17 – $115.9^\circ\text{T} \pm 6.6$ (нарастване – 34.5°T), S22 – $114.9^\circ\text{T} \pm 0.9$ (нарастване от 37.1°T) и S23 – $114.4^\circ\text{T} \pm 1.2$ (нарастване от 33.1°T).



Фиг. 4.3. Изменение на общата титруема киселинност, при щамове *St. thermophilus* (S17, S19, S22 и S23), при температура на инкубиране $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за период от 21 дни (час, h и дни, d).

Статистически несъществено е изменението на титруемата киселинност от 24-я час до 48-я час. Нарастването на титруемата киселинност не надвишава 2°T , което недвусмислено показва силно забавяне на киселинообразуването. На 48-я час щам S19 запазва най-висока стойност на титруемата киселинност – $118.3^{\circ}\text{T} \pm 5.7$, при S17 и S22 се наблюдават сходни стойности $116.6^{\circ}\text{T} \pm 7.2$ и $116^{\circ}\text{T} \pm 1.1$ и при S23 – $114.3^{\circ}\text{T} \pm 1$.

Титруемата киселинност на млякото инокулирано с щам S23 не се изменя за периода от 24-я час до 7-я ден. На 7-я ден киселинността е малко по-висока при S19 – $119.9^{\circ}\text{T} \pm 5.7$, следван от S22 – $118.4^{\circ}\text{T} \pm 0.9$ и S17 – $117.7^{\circ}\text{T} \pm 6.9$.

На 14-я ден всички култури показват слабо увеличение на титруемата киселинност. С по-висока стойност е S19 – $121.4^{\circ}\text{T} \pm 5.2$, със сходни стойности са култури S17 – $121.3^{\circ}\text{T} \pm 9.8$ и S22 – $120.6^{\circ}\text{T} \pm 2.6$. Най-ниска е титруемата киселинност на млякото с култура S23 – $116.9^{\circ}\text{T} \pm 0.9$.

На 21-я ден при S19 титруема киселинност е $123.9^{\circ}\text{T} \pm 6.9$, при S23 има незначително изменение до $117.3^{\circ}\text{T} \pm 1.2$, а при останалите два щама промяна не се наблюдава. Млякото с щам S17 има титруема киселинност – $121.8^{\circ}\text{T} \pm 10.7$ и с S22 – $120.8^{\circ}\text{T} \pm 2.2$.

Резултатите от експеримента показват, че при изследваните култури *St. thermophilus* значително числово и статистически съществено изменение в общата титруема киселинност се наблюдава през първите 24 часа от

термостатирането. За периода от 24-я час до 21-я ден промяната е статистически несъществена при щамове *S17* и *S19*. При развитието на щамове *S22* и *S23* статистическа разлика има при сравняването на стойностите на 24-я час спрямо последните етапи от изследвания период – 14-я и 21-я ден. При изследваните култури (*S17*, *S19*, *S22* и *S23*) не се открива статистическа разлика между установените на 21-я ден стойности на титруемата киселинност.

4.1.2.в. Пост-киселинообразуване на щамове *St. thermophilus*

Изследването на пост-киселинообразуването на щамове *St. thermophilus* е извършено при хладилно съхранение (4°C) за период от 21 дни. В таблица 4.4 е показано пост-киселинообразуването на щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23*. Според предварителното условие на експеримента термостатирането на щамове се преустановява след като активна киселинност на средата се понижи до рН=4.7, което се приема за коагулация.

На 24-я час изменението в стойността на активната киселинност при изследваните щамове *S17*, *S19*, *S22* и *S23* е в интервала от 0.08 до 0.19. Най-висока е активната киселинност на млякото с щам *S17* – 4.62 ± 0.16 (изменение – 0.08), а най-ниска е стойността с *S23* – 4.53 ± 0.11 (изменение 0.19). Средата с щам *S19* е с активната киселинност 4.56 ± 0.14 и при *S23* – 4.54 ± 0.13 . Статистическа разлика между активната киселинност при коагулация и установената на 24-я час има при щамове *S22* и *S23*. Това предполага, че те понижават по-рязко активната киселинност през първите часове от съхранението при 4°C.

Таблица 4.4. Изменение на активната киселинност (рН) при щамове *St. thermophilus* (*S17*, *S19*, *S22* *S23*) при температура на съхранение 4°C за срок от 21 дни.

Щам <i>Streptococcus thermophilus</i>	Време, час (h) и дни (d)					
	коагулация	24h	48h	7d	14d	21d
<i>S17</i>	4.7	4.62	4.53	4.41	4.36	4.34
	± 0.01	± 0.16	± 0.19	± 0.24	± 0.17	± 0.15
<i>S19</i>	4.7	4.56	4.50	4.37	4.33	4.32
		± 0.14	± 0.2	± 0.24	± 0.16	± 0.14
<i>S22</i>	4.7	4.54	4.51	4.43	4.37	4.32
	± 0.01	± 0.04	± 0.13	± 0.11	± 0.15	± 0.09
<i>S23</i>	4.7	4.53	4.48	4.44	4.37	4.36
	± 0.05	± 0.12	± 0.19	± 0.19	± 0.17	± 0.13

На 48-я час отново с най-ниска активна киселинност е млякото с $S23 - 4.48 \pm 0.19$, а с най-висока $S17 - 4.53 \pm 0.19$. Щам $S19$ с $pH=4.5 \pm 0.2$ се различава незначително от щам $S22$ с $pH=4.51 \pm 0.13$. Понижението на активната киселинност от 24-я до 48-я час при четирите щамове няма статистическа значимост. Това показва, че охлаждането на средата и установяването на постоянна температура от $4^{\circ}C$ намалява киселинообразуващата способност на културите.

На 7-я ден с най-ниска активна киселинност е млякото с $S19 - 4.37 \pm 0.24$ и изменение с 0.13 спрямо 48-я час. При останалите щамове активната киселинност има сходна стойност. По-ниско е pH на млякото с щам $S17 - 4.41 \pm 0.24$, а при $S22$ и $S23$ понижението е най-слабо и активна киселинност е най-висока: $S22 - 4.43 \pm 0.11$ и $S23 - 4.44 \pm 0.19$. Според t -теста между 24-я час и 7-я ден от хладилното съхранение няма статистически значима разлика в активната киселинност. Понижението на активната киселинност за този период е най-голямо при щам $S17 - 0.21$, изменение при щам $S19 - 0.19$ и $S22 - 0.11$ е сходно и най-слабо $- 0.09$ при $S23$.

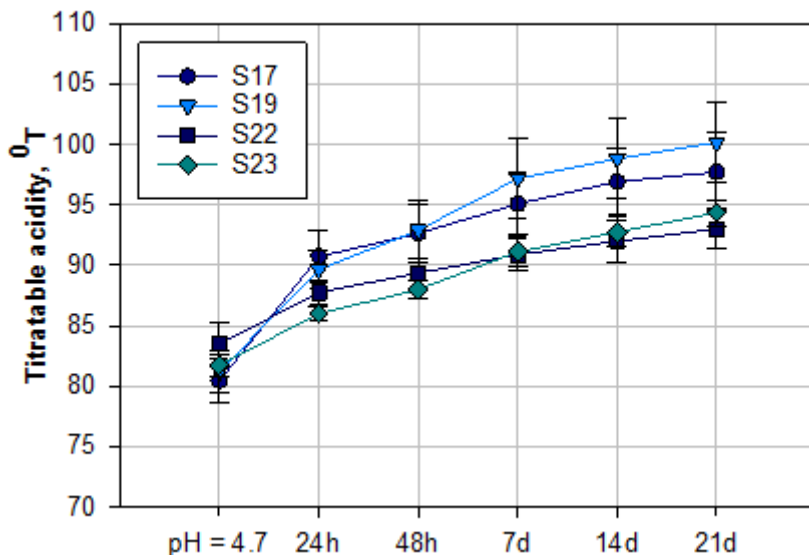
На 14-я ден с най-ниска активна киселинност, аналогично на 7-я ден, е щам $S19 - 4.33 \pm 0.16$, по-висока е стойността при $S17 - pH=4.36 \pm 0.17$, а при $S22$ и $S23$ pH е 4.37. Средното изменение на pH от 7-я до 14-я ден не превишава 0.07 и няма статистическа значимост.

На 21-я ден щамове имат сходно pH , а изменението спрямо 14-я ден е незначително. Млечнокиселия продукт, получен от дейността на $S19$ и $S22$ има по-ниска активна киселинност при еднаква средна стойност $- 4.32$, при $S17$ pH е 4.34 ± 0.15 и при $S23 - 4.36 \pm 0.13$.

Статистическата обработка на данните показва по-изразено понижаване на активната киселинност на 24-я час при $S22$ и $S23$. Това може да се обясни с по-бавната реакция на тези щамове към температура на съхранение или с частично запазена активност, като пост ефект от термостатирането. Пълното охлаждане на средата и трайното установяване на температура $4^{\circ}C$ през 48-я час силно забавя метаболитните функции при изследваните култури.

Поведението на щамове при хладилно съхранение е допълнено с изследване изменението на общата титруема киселинност ($^{\circ}T$), което е показано на фигура 4.4. Титруемата киселинност в момента на коагулация е обвързана с предварителното условие на експеримента ($pH=4.7$) и варира в

статистически несъществени граници. При коагулация най-висока е титруемата киселинност на млякото с щам *S22* – $83.5^{\circ}\text{T} \pm 4.2$, с *S19* и *S23* е съответно $81.4^{\circ}\text{T} \pm 4.4$ и $81.8^{\circ}\text{T} \pm 2.2$, а най-ниска е с *S17* – $80.4^{\circ}\text{T} \pm 4.2$.



Фиг. 4.4. Изменение на общата титруема киселинност, при щамове *St. thermophilus* (*S17*, *S19*, *S22* и *S23*), при температура на съхранение 4°C за период от 21 дни (час, h и дни, d).

На 24-я час титруемата киселинност се повишава по-изразено (с 10.3°T) при щам *S17* – $90.7^{\circ}\text{T} \pm 4.8$. Млякото с щамове *S19* и *S17* има сходна титруема киселинност – $89.7^{\circ}\text{T} \pm 4.6$, следвани от *S22* – $87.8^{\circ}\text{T} \pm 2.2$ и *S23* – $86^{\circ}\text{T} \pm 1.4$.

При щамове *S22* и *S23* повишение на титруемата киселинност е по-слабо в сравнение с *S17* и е съответно 4.3 и 4.2°T . Статистически значима разлика в стойностите на титруемата киселинност между коагулация и 24-я час се наблюдава при *S23* и *S22*, но не и при *S17* и *S19*. Това най-вероятно е свързано с границите на вариране на получените данни.

За периода от 24-я час до 48-я час при всички култури изменението на титруемата киселинност е числено и статистически незначимо. Щам *S19* има най-висока титруема киселинност – $93.5^{\circ}\text{T} \pm 6$, следван от *S17* – $92.6^{\circ}\text{T} \pm 5.5$. На 48-я час най-ниска е титруема киселинност на млякото с *S22* – $89.4^{\circ}\text{T} \pm 3$ и *S23* – $88^{\circ}\text{T} \pm 1.6$.

На 7-я ден *S19* има най-висока титруема киселинност – $98.1^{\circ}\text{T} \pm 8.1$ и изменение 4.6°T . Другите три щамове изменят по-слабо титруемата киселинност. Щам *S17* има титруема киселинност 94.8°T и повишение спрямо 48-я час – 2.2°T , следван от *S23* с $91.1^{\circ}\text{T} \pm 3.1$ и изменение – 3.1°T и *S22* с $90.9^{\circ}\text{T} \pm 3.2$ и нарастване – 1.5°T . Статистически значима разлика от 48-я час до 7-я ден се открива единствено при щам *S23*.

От 7-я ден до края на изследвания период всички култури показват изменение на титруемата киселинност, което не надвишава 2°T за всеки един от етапите. Анализът на данните показва, че няма съществено изменение на титруемата киселинност от 48-и час до 7-я ден и от 7-я ден до 14-я ден. Статистически съществени разлики се откриват при сравняването на 14-я ден с коагулация и 24-я час.

На 21-я ден, при незначително изменение на стойността спрямо 14-я ден, с най-висока титруема киселинност са *S19* – $98.3^{\circ}\text{T} \pm 9.3$ и *S17* – $97.8^{\circ}\text{T} \pm 6.5$. Млякото с щамове *S22* и *S23* има по-ниска титруема киселинност, съответно $93^{\circ}\text{T} \pm 3.9$ и $94.4^{\circ}\text{T} \pm 2.6$. Анализът на дънните показва, че статистическа значимост при хладилното съхранение се открива при сравняването на 14-я и 21-я ден с 24-я час. При *S17* и *S19*, от 24-я час до 21-я ден, изменението на титруемата киселинност е – 17°T , при *S22* е 10°T и при *S23* – 13°T .

По отношение изменението на общата титруемата киселинност в хода на хладилното съхранение (4°C), за изследваните култури е характерно, че установената при коагулация титруема киселинност се различава статистически от всеки един по-следващ етап. Това показва, че при температура на съхранение 4°C културите запазват определена активност. Съществено изменение на титруемата киселинност се установява между по-отдалечените във времето измервания: титруемата киселинност на 24-я час чувствително се различава след едно- и двуседмичното съхранение или при сравняването с 21-я ден. При интервалите от 7-я до 14-я ден и от 14-я до 21-я ден статистически значима разлика не се установява.

4.1.3. Органолептична оценка на щамове *St. thermophilus*

При органолептична оценка на щамовете (*S17*, *S19*, *S22* и *S23*) се анализират основните характеристики на млечнокиселия продукт: вид на коагулума, вкус и аромат (таблица 4.5). При развитието си в пастьоризирано, натурално краве мляко, щамовете образуват плътен, гладък коагулум, с еднородна консистенция. Не се установява провлачване, ослизвяване, наличие

на зърна или пресечки. Вкусът е млечнокисел, приятен, мек, със слабо изразена киселинност, без страничен привкус. Ароматът на ферментиралото мляко е приятен, сравнително слабо изразен, с маслен оттенък. По-изразен аромат се установява единствено при култури *S17* и *S19*. При изследваните щамове *St. thermophilus* не се установяват съществени различия по отношение основните органолептични характеристики на продукта.

Таблица 4.5. Органолептична оценка на краве мляко, инокулирано с култури *St. thermophilus*, при условия на ферментация – температура $43\pm 2^\circ\text{C}$ и условия на съхранение – 24h, при хладилни условия (4°C).

Щам <i>St. thermophilus</i>	Показатели		
	вкус	аромат	коагулум
<i>S17</i>	b	a	a
<i>S19</i>	b	a	a
<i>S22</i>	b	b	a
<i>S23</i>	b	b	a

Легенда: а – много добро качество; b – средно качество; с – незадоволително качество

4.1.4. Изводи

В резултат на проведените с щамове *St. thermophilus* изследвания могат да се направят следните изводи:

- Идентифицирането на щамове *S8*, *S10*, *S17*, *S19*, *S22* и *S23* показва, че те са типични представители на вида *St. thermophilus*.
- За период от 4-5 часа, в стерилно мляко при температура на инкубиране $43^\circ\text{C} \pm 2$ изследваните щамове *St. thermophilus* понижават активната киселинност до рН 4.55-4.66. Съществува статистически съществена разлика между щамове *S8* и *S10* спрямо *S17*, *S19*, *S22* и *S23* по отношение изменението на активната и титруемата киселинност при развитието им в мляко през период от 3 часа.
- Времето за коагулация на млякото е най-кратко с щамове *S19* с време $3.37\text{h} \pm 0.51$, *S17* – $3.38\text{h} \pm 0.60$, *S23* – $3.39\text{h} \pm 0.50$ и *S22* – $3.42\text{h} \pm 0.48$. Удължено е времето за коагулацията на млякото, инокулирано с *S8* – $4.59\text{h} \pm 0.33$ и *S10* – $4.52\text{h} \pm 0.40$. Статистически съществена е разликата във времето на коагулация при щамове *St. thermophilus* *S17*, *S19*, *S22* и *S23* в сравнение с щамове *S8* и *S10*.

- Пределното киселинообразуването на изследваните щамове *St. thermophilus* при температура $43^{\circ}\text{C}\pm 2$ за период от 21 дни е активна киселинност на млякото, инокулирано с *S17* – 4.23 ± 0.8 , с *S19* – 4.23 ± 0.34 , с *S22* – 4.20 ± 0.5 и с *S23* – 4.22 ± 0.56 . Титруемата киселинност на млякото с щам *S17* е $121.8^{\circ}\text{T}\pm 10.7$, с *S19* – $123.9^{\circ}\text{T}\pm 6.9$, с *S22* – $120.8^{\circ}\text{T}\pm 2.2$ и с *S23* – $117.3^{\circ}\text{T}\pm 1.2$.
- Пост-киселинообразуването на изследваните щамове *St. thermophilus* при температура 4°C за период от 21 дни е активна киселинност на млякото с *S17* – 4.34 ± 0.15 , с *S19* – 4.32 ± 0.14 и *S22* – 4.32 ± 0.09 и при *S23* – 4.36 ± 0.13 . Установената на 21-я ден титруема киселинност е съответно: *S17* – $97.8^{\circ}\text{T}\pm 6.5$, *S19* – $98.3^{\circ}\text{T}\pm 9.3$, *S22* – $93^{\circ}\text{T}\pm 3.9$ и *S23* – $94.4^{\circ}\text{T}\pm 2.6$.

При изследваните щамове *St. thermophilus* не се установяват съществени различия по отношение основните органолептични характеристики.

4.2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЩАМОВЕ LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS

Обект на изследването са чисти култури, които принадлежат към вида *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. В направеното изложение видът е изписван с краткото си наименование – *L. bulgaricus*.

4.2.1. Идентифициране на щамовете

4.2.1.а. Оцветяване по Грам:

Оцветяването на клетки на *L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*, термостатирани 24h в MRS-бульон показва грам-положителност.

4.2.1.б. Морфология на клетките:

Микроскопското наблюдение на щамове *L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14* установява пръчковидни клетки със заоблени краища, разположени поединично или групирани по двойки или в различни по дължина верижки. Оцветяването на клетките на изследваните щамове с метиленово-синьо показва наличие на волутинови зърна.

Върху MRS агар след инкубиране 48 – 72 часа, при аеробни условия и температура $43\pm 2^{\circ}\text{C}$ щамовете формират типични колонии. Колониите са с млечно бял цвят, плътен, добре оформен център и рехава периферия.

4.2.1.в. Физиология:

Щамове се развиват в мляко при два температурни режима 37°C и 43 ±2°C, като предизвикват коагулация за определено време. Щамове се развиват в MRS бульон при температура 43 ±2°C при термостатиране 7 дни. Щамове не се развиват в MRS бульон при температура 15°C при термостатиране 7 дни.

4.2.1.г. Биохимична характеристика:

Резултатите от API-50-CHL теста показват, че изследваните щамове L3, L5, L6, L7, L11 и L14 имат сходна ферментационна активност. Те разграждат глюкоза, фруктоза, маноза и лактоза. Разграждането на глюкоза, фруктоза и лактоза е характерно за 98% от представителите на вида *L. bulgaricus*. Усвояването на маноза е характерно за 25% от щамове на *L. bulgaricus*. Получените резултати дават основанието изследваните щамове да се идентифицират като представители на вида *L. bulgaricus*.

4.2.2. Изследване на щамове *L. bulgaricus* по основни технологични показатели

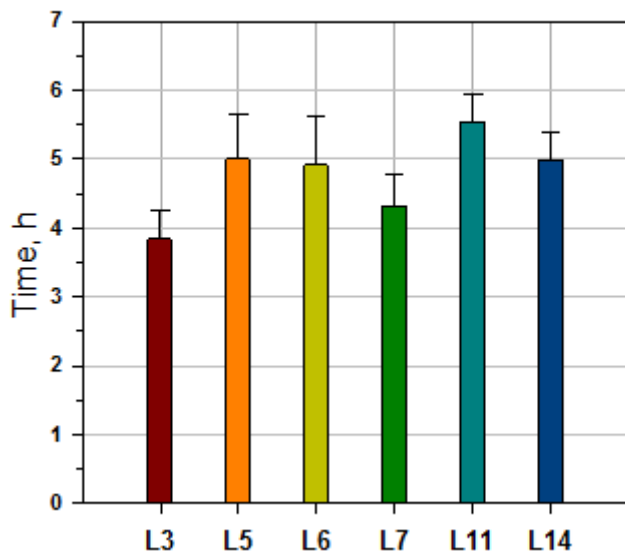
4.2.2.а. Определяне времето на коагулация

Чистите култури *L. bulgaricus*, за разлика от изследваните щамове *St. thermophilus*, показаха разнородност във времето за видима коагулация на млякото и понижаване на активната киселинност до pH=4.7. Наблюдавахме, че обема на средата значително влияеше върху времето на коагулация при използването на 1% инокулум от активирани щамове *L. bulgaricus*. Подобна чувствителност към изходния обем на средата е установена при рехидратирането на лиофилизирани млечнокисели бактерии. Директното въвеждане на лиофилизирани клетки в първоначален обем, който не е съобразен със специфичните им изисквания е причина за значително намаляване на преживяемостта им. Все още липсва научно обяснение на същността на наблюдаваното явление, но вероятната причина е увреждането на клетките вследствие възникването на осмотичен шок (*Champagne et al.*, 1991). Също така е установено, че киселинообразуващата активност е пропорционална на клетъчната концентрация, а в сравнение с *St. thermophilus* *L. bulgaricus* има по-големи клетки (*Fonseca et al.*, 2000). Така в едно и също количество инокулум е логично да се очаква по-малък брой клетки на *L. bulgaricus*. Експериментални данни са показали, че най-висока продуктивност на биомаса се получава при разреждане на култура на *L. bulgaricus*

близо до определено критично ниво, но киселинообразуването е по-бързо и протеолитичната активност е по-висока при ниски нива на разреждане (Ragout and Sineriz, 1994). При изследваните щамове увеличаването на изходния обем води до увеличаване на времето на коагулация и за по-точното представяне на коагулацията са представени обобщените данни след математико-статистическа обработка.

Както се вижда от фигура 4.5 най-кратко е времето на коагулация на млякото, инокулирано с щам *L3* – 4 часа и 24 минути ± 1.03 , следван от *L7* – $4.32\text{h} \pm 1.29$ и *L6* – $5.31\text{h} \pm 2.10$. Щамове *L5* и *L14* коагулират млякото за еднакво време – 5.39h , но с различни грешки на средната: $\pm 1.59\text{h}$ и $\pm 1.31\text{h}$. Най-продължително е термостатирането на щам *L11* – $5.54\text{h} \pm 1.36$.

В сравнение с *L11* щамове *L3* и *L7* коагулират млякото по-бързо, съответно за 1.30h и 1.22h . Щам *L3* изпреварва във времето си на коагулация по-бавните щамове *L6* с 1.07h , а *L5* и *L14* с 1.15h . По аналогичен начин щам *L7* изпреварва във времето си на коагулация култури *L5* и *L14* с 1.07h и *L6* с 59 min . Щамове *L5* и *L14* коагулират млякото по-бързо от *L11* с 15 min .



Фиг. 4.5. Време на коагулация на щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*).

Изследваните щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*) отговарят на предварително поставените условия, защото времето за което коагулират млякото не превишава 8 часа и статистическата обработка показва разлика във времето на коагулация само между щамове *L3* и *L11*.

4.2.2.б. *Определяне киселиноустойчивостта на щамове L. bulgaricus*

В таблица 4.6 е представена активната киселинност, която има мляко, ферментирало под действието на щамове *L. bulgaricus* и съхранявано 24 часа при хладилни условия (4°C).

Както се вижда от таблица 4.6 активната киселинност на млякото варира от 4.28 до 4.85. Най-ниска е стойността на активната киселинност при щам *L5* с $\text{pH}=4.28 \pm 0.22$, млякото е с еднаква киселинност – 4.75 с *L3* и *L6* и грешка на средната ± 0.84 и ± 0.66 , с *L7* – 4.7 ± 1.4 и с *L11* – 4.65 ± 0.6 . Най-висока е активна киселинност на млякото с щам *L14* – $\text{pH}=4.85 \pm 0.76$. Наблюдаваните разлики не са статистически съществени и се дължат от една страна на факта, че термостатирането на културите е преустановено след настъпването на видимата коагулация на млякото и от друга на различното понижение на активната киселинност при хладилното съхранение.

Таблица 4.6. Условия на експеримента при киселинно третиране на ферментирало мляко.

Щам <i>Lb. bulgaricus</i>	Параметри на експеримента		
	Активна киселинност на млякото	Количество (ml) на изразходваната 1.25N HCl	Количество (ml) на изразходваната 1.25N NaOH
<i>L3</i>	4.75 ± 0.84	6.7 ± 1	6.8 ± 0.4
<i>L5</i>	4.28 ± 0.22	6.0 ± 0.4	6.5 ± 0.9
<i>L6</i>	4.75 ± 0.66	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.4
<i>L7</i>	4.7 ± 1.4	6.6 ± 1.5	6.6 ± 1.5
<i>L11</i>	4.65 ± 0.6	6.5 ± 1.12	7.0 ± 1.3
<i>L14</i>	4.85 ± 0.76	6.8 ± 0.7	6.9 ± 0.6

За целите на експеримента активната киселинност на млякото допълнително се понижава. Количеството на изразходваната 1.25N HCl зависи от началната активна киселинност на средата и варира в тесни граници 6 – 7.1 ml. Най-голямо количество солна киселина е изразходвано за понижаване активната киселинност при мляко ферментирало под действие на щам *L6* – 7.1 ml ± 0.3 , а най-малко при *L5* – 6 ml ± 0.4 , а при останалите култури е

както следва: *L11* – 6.5 ml \pm 1.2, *L7* – 6.6 ml \pm 1.5, *L3* – 6.7 ml \pm 1 и *L14* – 6.8 ml \pm 0.7.

За възстановяване на изходната активна киселинност на млякото са използвани от 6.5 до 7 ml натриева основа. При *L6* и *L7* количеството на изразходваната основа е еднакво с използваната киселина и е съответно 7.1 ml \pm 0.3 и 6.6 ml \pm 1.5. При останалите култури най-голямо е количеството на изразходвана основа при *L11* с 7 ml \pm 1.3, следван от *L14* с 6.9 ml \pm 0.6, *L3* с 6.8 ml \pm 0.4 и *L5* с 6.5 ml \pm 0.9. Статистическа разлика съществува единствено по отношение изразходваната солна киселина при млякото с *L5* в сравнение с *L6* и *L14*. В случая обяснението се открива във факта, че активна киселинност при *L5* е по-ниска от установената при *L6* и *L14* (с 0.47 и 0.57 единици). Поради това при млякото с *L6* и *L14* се налага използването на по-голямо количество киселина (1.1 и 0.8 ml) за понижаване на рН до 3.00. Между *L3*, *L5*, *L7* и *L11* не се открива съществена статистическа разлика по отношение количеството изразходвана натриева основа.

В таблица 4.7 е показан изходния брой жизнеспособни клетки на изследваните лактобацили и броя на клетките, след третиране при рН=3.0 за 120 минути. Първоначално с най-висок брой колонообразуващи единици са култури *L6* с $2.9 \times 10^{12} \pm 34.3$ CFU/ml (log 12.02 \pm 9.1), *L7* – $1.5 \times 10^{12} \pm 3$ CFU/ml (log 12.03 \pm 1.2) и *L14* – $1.1 \times 10^{12} \pm 3.8$ CFU/ml (log 12.03 \pm 1.5). Между изходния брой микроорганизми при *L6*, *L7* и *L14* няма статистически значима разлика. Щам *L3* има $1.8 \times 10^{11} \pm 7.6$ CFU/ml (log 11.23 \pm 1.9) и показва с 0.8 log по-малко колонообразуващи единици спрямо *L6*, *L7* и *L14* и средно с 0.73 log повече от *L5* и *L11*. Сравнението показва, че щам *L3* заема междинно място спрямо щамове с по-висок и по-нисък брой микроорганизми и статистическата обработка показва, че той не се различава съществено от нито един щам. С най-нисък изходен брой микроорганизми са *L11* с $5.7 \times 10^{10} \pm 1.8$ CFU/ml (log 10.75 \pm 0.1) и *L5* – $2.6 \times 10^{10} \pm 27.4$ CFU/ml (log 10.25 \pm 5.1) и разликата помежду им не е статистически значима.

Таблица 4.7. Изменение в изходния общия брой микроорганизми (CFU/ml) в киселинно третирано мляко при култури *L. bulgaricus*.

Щам <i>L. bulgaricus</i>	Общ брой микроорганизми			
	изходен		краен	
	CFU/ml	log CFU/ml	CFU/ml	log CFU/ml
<i>L3</i>	1.8x10 ¹¹ ±7.6	11.23 ±1.9	3.5x10 ⁸ ±39	8.2* ±7.8
<i>L5</i>	2.6x10 ¹⁰ ±27.4	10.25 ±5.1	4.1x10 ⁷ ±32	7.5 ±3.9
<i>L6</i>	2.9x10 ¹² ±34.3	12.02 ±9.1	1.8x10 ¹¹ ±18	11.05 ±5.7
<i>L7</i>	1.5x10 ¹² ±3	12.03 ±1.2	6.4x10 ⁸ ±2.3	8.45*** ±1.8
<i>L11</i>	5.7x10 ¹⁰ ±1.8	10.75 ±0.1	4.5x10 ⁹ ±8.5	9.48* ±1.4
<i>L14</i>	1.1x10 ¹² ±3.8	12.03 ±1.5	4.7x10 ¹⁰ ±36	10.57 ±3.9

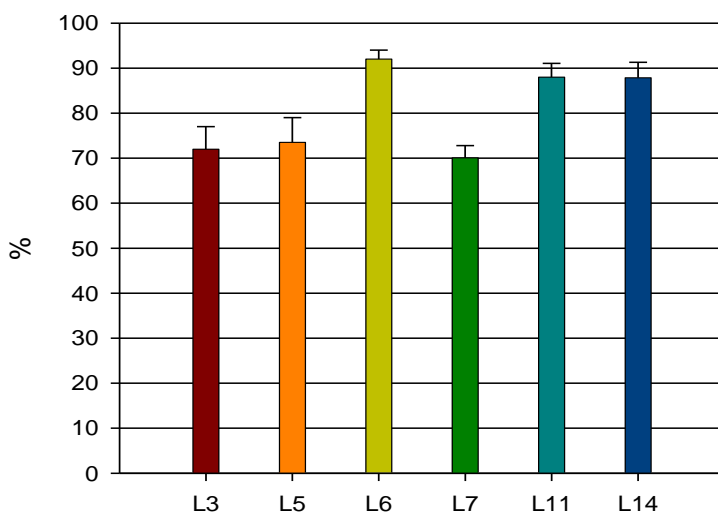
Легенда: *- t-тест за статистическа значимост между изходния и краен брой микроорганизми при едностранна критична област; **- t-тест за статистическа значимост между изходния и краен брой микроорганизми при двустранна критична област

Според F-теста статистически значима разлика в изходния брой микроорганизми съществува при всяка една от култури *L6*, *L7* и *L14* спрямо щам *L11* и щам *L5*. Числената стойност на средната разлика между общия брой колонообразуващи единици при културите с най-висок брой микроорганизми (*L6*, *L7* и *L14*) и тези с най-нисък брой (*L11* и *L5*) е 1.53 log.

След киселинното третиране на млякото с най-висок брой микроорганизми са култури *L6* с 1.8x10¹¹ ±18 CFU/ml (log 11.05 ±5.7) и *L14* – 4.7x10¹⁰ ±36 CFU/ml (log 10.57±3.9). Числената разликата между двете култури е 0.48 log без статистическа значимост. Статистически значима разлика между *L6* според t-теста има спрямо *L5*, *L3* и *L7* съответно с 3.55 log, 2.85 log и 2.6 log, а f-теста показва такава и при сравняването на *L6* с *L11* с разлика 1.57 log. При култура *L14* статистическа значимост между полученият краен брой микроорганизми според t-теста съществува само спрямо щам *L5* с разлика от 3.07 log, а според F-теста и спрямо *L3* с 2.37 log и с *L7* с 2.12 log. Няма съществена разлика между *L14* и *L11*. Щам *L11* е с по-нисък краен брой микроорганизми – 4.5x10⁹ ±8.5 CFU/ml (log 9.48 ±1.47), следват

я култури $L7 - 6.4 \times 10^8 \pm 2.3$ CFU/ml ($\log 8.45 \pm 1.8$) и $L3 - 3.5 \times 10^8 \pm 39$ CFU/ml ($\log 8.2 \pm 7.8$). С най-нисък брой микроорганизми в третирано мляко е щам $L5$ с $4.1 \times 10^7 \pm 32$ ($\log 7.5 \pm 3.9$). Статистически значима разлика между $L5$ според t-теста има спрямо $L6$ и $L14$, а F-теста открива разлика и спрямо щам $L11$. Не се открива съществена разлика между щам $L5$ спрямо $L3$ и $L7$.

Установяването на изходния и краен брой микроорганизми позволява да се изчисли преживяемостта (в %) на клетките на щамове *L. bulgaricus* в киселинно третирано мляко (фиг. 4.6). Данните представени на фигура 4.6 показват, че щам $L6$ има най-висока преживяемост – 92%, $L11$ и $L14$ преживяемост показват еднаква преживяемост – 88%, а с по-ниска преживяемост са $L5$ – 74%, $L3$ – 72% и $L7$ – 70%.



Фиг. 4.6. Преживяемост (%) на *L. bulgaricus* при условия: активна киселинност на млякото $pH=3.0$, продължителност на третирането 120 min, температура $37^{\circ}C$.

Преживяемостта на щамове $L11$ и $L14$ е по-ниска с 4 % спрямо $L6$ и между $L6$, $L11$ и $L14$ няма статистическа значима разлика. Щам $L3$ има с 16-20% по-ниска преживяемост спрямо $L6$, $L11$ и $L14$ и F-теста отбелязва разликата като статистически съществена. Аналогичен е резултата на F-теста при $L5$ и $L7$, защото и двата щамове имат по-ниска преживяемост в сравнение с $L6$, $L11$ и $L14$: $L5$ с 14 – 18%, а $L7$ с 18 – 22%. Не се открива статистически значима разлика на преживяемостта при култури $L3$, $L5$ и $L7$.

В сравнение с данните получени от Shah and Jelen (1990) изследваните щамове *L. bulgaricus* показват с $2 - 4 \log_{10}$ по-висок начален брой микроорганизим. Получените резултати са в несъответствие още с Conway и сътр. (1987), защото изследователите установяват по-малко от $1 \log_{10}$ CFU/ml преживели клетки на *L. bulgaricus*. Преживяемостта на изследваните щамове е в съгласие с данните на Gotcheva и сътр. (2002) и с получените при изследване на бифидобактерии, чийто брой не се изменя съществено за 3 часа при рН=3 и за 1 час при рН=2 (Pochart, *et al.*, 1992). Charteris и сътр. (1998) също докладват средна преживяемост на щамове *Lactobacillus* от 53 % до 78 %. При способност от 93 % преживяемост на клетките авторите определят щама като силно устойчив. Изследването на Pereira и Gibson (2002) установява почти 100% преживяемост при рН=2.0 за 120 min на изолиран от мляко щам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* JCM 1002.

Сравнително високата преживяемост на щамове *L3, L5, L6, L7, L11* и *L14* може да се обясни както със специфичните им свойства така и със защитното действие, което имат млечните белтъци. Така например Charteris и сътр. (1998) установяват, че присъствието на млечни протеини подобрява преживяемостта на млечнокисели бактерии в условия на стомаха и панкреаса. Vinderola и сътр. (2000) установяват значително защитно действие на сиренна маса при преживяването на бактериални клетки при рН 3. Изследване на Drouault и сътр. (1999) установява нарастване на преживяемостта на клетки *Lactococcus lactis* в стомаха от незначителните 6 % до 91 %, при приемането им с храна.

Редица изследвания посочват по-високата способността на щамове *L. acidophilus* да преживяват при условия на ниско рН в сравнение с *L. bulgaricus* (Marteau *et al.*, 1997; Sanders and Klaenhammer, 2001; Azcarate-Peril *et al.*, 2004). Изследването на Robins-Browne и сътр. (1981) установява, че когато се консумират с мляко *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* са еднакво способни да преживеят условията на стомаха. Установено е, че киселото мляко има висок буферен капацитет, който според изследователите се дължи не само на казеиновите мицели и калциевия фосфат, но и на млечната киселина (Savaiano and Livitt, 1987). Буферните свойства на киселото мляко влияят върху рН, в резултат на което активната киселинност на стомаха е по-висока от рН 3.4 за около 4 часа или над рН 2.7 за първите 1–3 часа (Martini *et al.*, 1987).

4.2.2.в. Пределно киселинообразуване на щамове *L. bulgaricus*

Проследяване на пределното киселинообразуване на щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*) е при температура $43^{\circ} \pm 2\text{C}$ за 21 дни.

Данните относно изменението на активната киселинност (рН) са представени в таблица 4.8. Изменението на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$) е представено на фигура 4.8. За коагулация е прието понижаването на активна киселинност на млякото до 4.7.

Таблица 4.8. Изменение на активната киселинност (рН) на мляко под действието на щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*), при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за 21 дни.

Щам <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Време, час (h) и дни (d)					
	коагулация	24h	48h	7d	14d	21d
<i>L3</i>	4.73 ± 0.44	3.59 ± 0.06	3.59 ± 0.13	3.58 ± 0.19	3.57 ± 0.32	3.57 ± 0.38
<i>L5</i>	4.71 ± 0.13	3.82 ± 1.08	3.72 ± 0.19	3.71 ± 0.13	3.71 ± 0.07	3.71 ± 0.06
<i>L6</i>	4.74 ± 0.5	3.73 ± 0.95	3.68 ± 0.32	3.67 ± 0.38	3.66 ± 0.57	3.66 ± 0.57
<i>L7</i>	4.74 ± 0.44	3.73 ± 0.76	3.73 ± 0.67	3.72 ± 0.83	3.72 ± 0.83	3.68 ± 0.57
<i>L11</i>	4.72 ± 0.19	3.87 ± 1.6	3.78 ± 1.4	3.77 ± 1.33	3.74 ± 1.08	3.74 ± 1.08
<i>L14</i>	4.71 ± 0.04	3.86 ± 0.55	3.80 ± 0.42	3.78 ± 0.39	3.75 ± 0.33	3.74 ± 0.31

На 24-я час с най-ниска активна киселинност е щам *L3* с 3.59 ± 0.06 и изменение спрямо коагулация – 1.14. Най-висока е стойността на активната киселинност на млякото, инокулирано с *L11* – 3.78 ± 1.4 и *L14* – 3.86 ± 0.55 при средно изменение – 0.85, следвани от щам *L5* – 3.82 ± 1.08 и понижение – 0.89. Култури *L6* и *L7*, при изменение от 1.01, имат еднаква средна стойност на активната киселинност – 3.73. При всички щамове статистическата обработка на резултатите показва, че преходът от коагулация към 24-я час се характеризира със значимо изменение в стойностите на активната киселинност, в резултат от активното киселинообразуване.

Данните получени на 24-я час са в съответствие с резултатите на Turner и Martley (1983), защото те показват, че щамове *L. bulgaricus* пони-

жават активната киселинност до рН 3.59 – 3.90 и са в несъответствие с данните на Xanthopoulos и сътр. (2001), които докладват по-високи стойности на рН_{24h} – от 3.94 до 4.65.

На 48-я час най-ниска активна киселинност има млякото с *L3* – 3.59 ± 0.13 , независимо, че не настъпва изменение спрямо 24-я час. Следват *L6* с рН= 3.68 ± 0.32 и изменение спрямо 24-я час 0.05, *L5* – 3.72 ± 0.19 (изменение 0.1) и *L7* – 3.73 ± 0.76 , без изменение от предходното измерване. С по-висока активна киселинност са *L11* – 3.78 ± 1.4 и *L14* – 3.80 ± 0.42 .

Получените на 48-я час данни са в съответствие с изследване на Balasuramanyam и Varadaraj (1998). Авторите установяват понижаване на изходното рН 6.6 до 3.7 при инкубирането на щам *L. bulgaricus*. Освен това показват значително нарастване на броя на клетките на изследвания щам *L. bulgaricus* през първите 24 часа (от 2 до $11 \log_{10}$ CFU/m) и по-слабо увеличаване до 48-я час (от 11 до $<14 \log_{10}$ CFU/ml). Едновременно с нарастването на броя на клетките е наблюдавано повишаване на киселиноспособността и понижаване на рН, което се наблюдава и в настоящето изследване.

На 7-я ден с най-ниска стойност на активната киселинност е млякото с *L3* с рН 3.58 ± 0.19 , следван от *L6* – 3.67 ± 0.38 , *L5* – 3.71 ± 0.13 и *L7* – 3.72 ± 0.83 . Най-висока е активната киселинност на млякото с *L11* – 3.77 ± 1.33 и *L14* – 3.78 ± 0.39 . При всички култури изменението спрямо 48-я час е незначително.

На 14-я ден най-ниска е стойността на активната киселинност на млякото, инокулирано с *L3* – 3.57 ± 0.32 и *L6* – 3.66 ± 0.57 . Изменение в стойността на рН не се установява при култури *L5* – 3.71 ± 0.07 и *L7* – 3.72 ± 0.83 . По-висока е стойността на рН на млякото при култури *L11* – 3.74 ± 1.08 и *L14* – 3.75 ± 0.33 .

При изследваните щамове не се наблюдава съществено изменение на активната киселинност от 14-я до 21-я ден и стойността на рН на 21-я ден е сходна: при *L6* – 3.66 ± 0.57 , при *L7* – 3.68 ± 0.57 , при *L5* – 3.71 ± 0.06 , при *L11* и *L14* средната стойност е еднаква – 3.74, като грешката на средната при *L11* е по-голяма – ± 1.08 и с най-ниска стойност на рН е *L3* – 3.57 ± 0.38 .

Изменението на активната киселинност на млякото от момента на коагулация до 21-я ден при дейността на щамове варира от 0.97 до 1.16. Щам *L3* понижава най-много активната киселинност – 1.16, а най-слабо *L11* – 0.98 и *L14* – 0.97. При *L6* и *L7* изменението е еднакво – 1.06, а при *L5* малко по-ниско – 1.00. Активността на щам *L3*, която се проявява при крат-

кото времето за коагулация е в съответствие и с по-активното му киселинообразуване при съхранението. Статистическата обработка на данните не установява съществена разлика между стойностите на активната киселинност на 21-я ден при отделните култури.

Пределното киселинообразуване има за цел да проследи способността на щамовете да се развиват продължително време при дадените условия. Според Hutkins и сътр. (1993) за продължителното развитие в средата е необходимо: наличието на необходимите въглехидрати, аминокиселини и други хранителни вещества; разграждането или отстраняването на токсичните или инхибиторните компоненти; поддържането на определена концентрацията на водородни йони. Характерното при развитието на млечнокиселите бактерии и в частност на изследваните щамове е понижаването на рН на средата в резултат от отделянето на органични киселини, сред които основен дял има млечната киселина. Различните видове млечнокисели бактерии имат специфични изисквания към активната киселинност на средата, в която се развиват. Така например *St. thermophilus* и *L. lactis subsp. cremoris* се развиват оптимално при рН на средата (pH_{out}) от 6.5 до 7.5. Rushing и стр. (1956) предполагат, че лактобацилите са по-устойчиви към ниско рН, което намира експериментални доказателства в изследванията на Hugenholtz и сътр. (1987) и Nannen и Hutkins (1991), които установяват, че *L. helveticus* и *L. bulgaricus* се развиват успешно и при pH_{out} от 5.5 до 5.8. Способността на изследваните бактерии да се развиват при изменение на рН може да се обясни както със способността им да поддържат определено рН на клетъчното си съдържимо (pH_{in}), така и да генерират разлика между вътрешната и външна среда т.е. да формират рН градиент. За разлика от развитието на лактобацилите за развитието на лактококите и *St. thermophilus* е необходимо действието на два механизма: 1) поддържане на вътреклетъчното рН (pH_{in}) около неутрални стойности при определено изменение на pH_{out} и 2) поддържането на градиент $-\Delta pH$.

Установено е, че при понижаване на pH_{out} в интервала от 6.8 до 5.2 – 5.00 pH_{in} се поддържа около неутралните стойности и *L. lactis* и *L. cremoris* запазват стойност на $pH_{in}=7.5$ при понижаване на pH_{out} от 7.5 до 5.0 (Poolman, 1987). Когато стойността на pH_{in} достигне 5.0 – 5.5 развитието на *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris* и *St. thermophilus* се преустановява и рН градиента изчезва (Nannen и Hutkins, 1991). Преустановяването на рН градиента е свързано с увреждане на клетъчната жизненост. За разлика от лактококите и *St. thermophilus* при лактобацилите pH_{in} може да

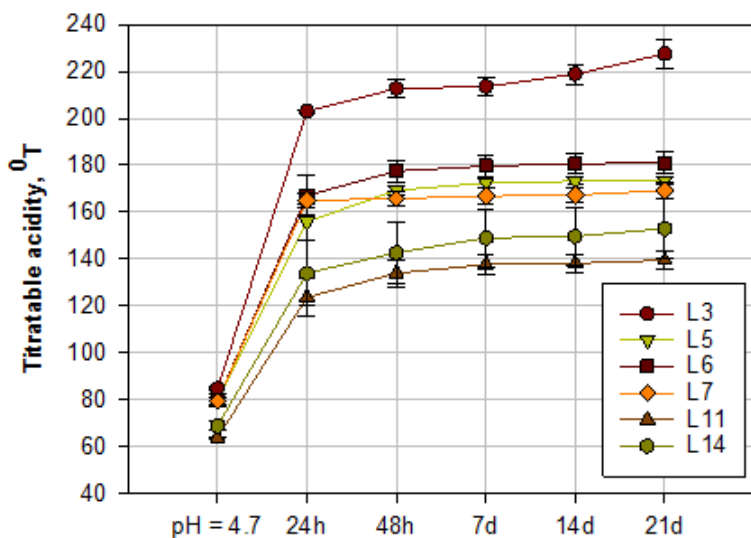
се понижава в по-голяма степен и клетката да запазва жизнеспособността си. McDonald и сътр. (1990) установяват, че *L. mesenteriodes* се развива аналогично на лактококите само при pH_{in} от 5.4 до 5.7, но *L. plantarum* се развива до pH_{in} от 4.6 до 4.8. При *L. casei* развитието на клетките продължава при pH_{out} по-ниско от 4.0 като се поддържа ΔpH по-висок от 1. Тези данни предполагат, че преустановяването на развитието съвпада както с понижаването на pH_{in} така и със загубата на pH градиента (McDonald 1990, Nannen и Hutkins, 1991). Независимо, че при щамове в настоящия експеримент не се изследва pH_{in} те се развиват до pH_{out} 3.57 – 3.74, което е в съответствие с данни, които са получени при киселиноустойчив щам *L. plantarum*. При развитието си в мляко без контролиране на pH изследваните щамове са под влиянието на полученото ниско pH , което по мнението на Jones и сътр. (1990) се отразява върху клетъчната жизненост и това се потвърждава от незначителното изменението на активната киселинност след 48-я час при щамове в настоящето изследване.

На фигура 4.7 е показано изменението на титруемата киселинност ($^{\circ}T$) при термостатно култивиране $43 \pm 2^{\circ}C$ за период от 21 дни. Най-ниска е титруемата киселинност при коагулацията на млякото с щам *L11* – $63.8^{\circ}T \pm 1.03$, следван от *L14* – $69.4^{\circ}T \pm 5.6$. Разликата в киселинността между двата щаме е $5.6^{\circ}T$ и е без статистическа значимост. При активна киселинност $pH=4.7$ щамове *L5* и *L6* показват еднаква обща титруема киселинност $79.7^{\circ}T (\pm 7.35 \text{ и } \pm 6.7)$ и с незначителна разлика от тях е щам *L7* със $79.5^{\circ}T \pm 4.5$. Разликите в титруемата киселинност между трите културите са статистически незначими. Със сравнително най-висока титруема киселинност в момента на коагулация се характеризира щам *L3* – $84.8^{\circ}T \pm 2.14$. Чрез получените данни щамове могат да се разделят на две групи: в първата попадат щамове *L11* и *L14*, които показват най-ниска титруема киселинност при $pH=4.7$, а при втората група, към която се отнасят останалите четири щаме *L3*, *L5*, *L6* и *L7*, е необходимо отделянето на повече млечна киселина. Аналогично на *L5*, *L6* и *L7* и при *L3* се установява наличието на статистически значима разлика с култури *L11* и *L14*. Различията в стойностите на титруемата киселинност в момента на коагулация могат да се обяснят както със специфични свойства на културите, така и с известно вариране в началните стойности на активната киселинност на средата, която не е обект на внимание при проведените експерименти.

В момента на коагулация на средата се установяват от 0.57 до 0.76 % млечна киселина, а на 24-я час количеството млечна киселина нараства до

1.11 – 1.83%. Получените данни са в несъответствие с получените от Smiley and Fryder (1978), което вероятно се дължи на изследването на различни видове. При термостатиране за 8 часа авторите установяват при щамове *L. helveticus spp. jugurti* отделянето на 1.5 – 2.4% млечна киселина. На щамове *L3, L5, L6* и *L7* е необходимо три пъти повече време, за да отделят 1.83 % млечна киселина.

На 24-я час най-висока е титруема киселинност на млякото с щам *L3* – $203^{\circ}\text{T} \pm 1.8$. Останали култури показват с $36^{\circ}\text{T} - 47^{\circ}\text{T}$ по-ниска титруема киселинност. Млякото с щам *L6* е с титруемата киселинност – 167.2°T , при *L7* – $165^{\circ}\text{T} \pm 7.4$ и при *L5* – $155.8^{\circ}\text{T} \pm 20.2$. Най-голяма 66°T и 79°T е разликата между култура *L3* спрямо *L14* – $137.4^{\circ}\text{T} \pm 36.2$ и *L11* – $123.7^{\circ}\text{T} \pm 20.3$. Според F-теста различията между *L3* и останалите култури имат статистическа значимост, а по-строгия t-тест установява разлика с *L5, L11* и *L14*. Разликата между *L6* и *L7* не е статистически значима, но е съществена спрямо *L11* и *L14*. Щам *L6* има по-висока титруема киселинност от *L11* с 44°T и от *L14* с 30°T . Сравнението на щам *L7* със същите култури е аналогично – по-висока титруема киселинност спрямо *L11* с 41°T и спрямо *L14* с 28°T . Статистически не значима е разликата между *L14* и *L11*.



Фиг. 4.7. Изменение на общата титруема киселинност, при щамове *L. bulgaricus* (*L3, L5, L6, L7, L11* и *L14*), при температура на инкубиране $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за период от 21 дни (час, h и дни, d).

На 48-я час с най-висока титруема киселинност отново е щам *L3* с $212.7^{\circ}\text{T} \pm 9.2$, следван от щам *L6* – $177.5^{\circ}\text{T} \pm 11.8$ и *L5* – $169.3^{\circ}\text{T} \pm 5.46$. Изменението в титруемата киселинност е най-голямо при *L5* с 13.5°T , следван от *L6* с 10.3°T и *L3* с 9.7°T . Щам *L3* има по-висока титруема киселинност от *L5* с 43°T и от *L6* с 35°T . Установените разлики са статистически значими според F-теста. Според t-теста статистически значима е разлика между *L3* и *L5*, но не и между *L3* и *L6*. Статистически съществено е изменението на титруемата киселинност при *L5* от 24-я час до 48-я час. На 48-я час с по-ниска титруема киселинност са култури *L7* с $165.8^{\circ}\text{T} \pm 7.9$, *L14* с $146.4^{\circ}\text{T} \pm 34.2$ и *L11* с $134^{\circ}\text{T} \pm 14.6$. Изменението спрямо 24-я час при култура *L11* е еднакво с полученото при щам *L6* – 10.3°T . Изменение аналогично на това при култура *L3* е установено при *L14* – 9°T , а без изменение е стойността при *L7*. Статистическия анализ и с двата критерия не показва статистически значима разлика в изменението на общата титруема киселинност от 24-я до 48-я час при щамове *L7*, *L11* и *L14*. Според приложените тестове статистически значима разлика на 48-я час съществува между *L3* и спрямо *L7*, *L11* и *L14*. Титруемата киселинност на щам *L3* превъзхожда значително установената при *L11* – 79°T , *L14* – 66°T и *L7* – 47°T . Според F-теста, без потвърждение от t-теста, статистически значима разлика се открива между култура *L5* в сравнение с *L11* и *L14*. Щам *L5* има по-висока титруема киселинност от *L11* с 35°T и от *L14* с 23°T . Аналогичен е резултата при *L6* спрямо *L11* и *L14*, от които има по-висока с 44°T и 31°T титруема киселинност. По-строгия тест открива разлика единствено между *L6* и *L11*.

На 7-я ден при всички култури се наблюдава незначително повишаване на титруемата киселинност. В изменението на титруемата киселинност не се установява статистическа значимост както при сравняването на 7-я ден с предходното измерване (48-я час) така и с последващите две измервания – на 14-я и на 21-я ден. Титруемата киселинност се запазва най-висока при култура *L3* с $213.5^{\circ}\text{T} \pm 9.4$, следвана отново от *L6* – $180.7^{\circ}\text{T} \pm 11.5$ и *L5* – $173.2^{\circ}\text{T} \pm 4.3$. С по-ниска титруема киселинност са *L7* – $166.8^{\circ}\text{T} \pm 8.2$ и *L14* – $152.2^{\circ}\text{T} \pm 31.7$. С най-ниска титруема киселинност е млякото с щам *L11* с $137.7^{\circ}\text{T} \pm 10.4$. Статистическия тест с F-критерия открива значима разлика между култура *L3* и всички останали щамове и вторият тест потвърждава същото с изключение на сравнението между *L3* и *L6* при числена разлика от 34°T . При сравняването на култура *L3* с останалите изследвани щамове най-голяма е числената разлика между *L3* и *L11* – 76°T При срав-

няването на *L3* с *L14* разликата е 61°T , а при сравняването с *L7* и *L5* е съответно 47°T и 41°T . Според F-теста съществена статистическа разлика се открива при *L5*, *L6* и *L7* спрямо *L11* като числената разлика между *L5* и *L11* е 35°T , а между *L7* и *L11* е 29°T . С t-теста се открива статистически значима разлика само между *L6* и *L11* при разлика от 42°T . Щам *L14* има с 14°T по-висока титруема киселинност от *L11*. Както става ясно от по-горе проведенния анализ според F-критерия щам *L11* се различава статистически от всички останали култури с изключение на *L14*. Според t-теста, на 7-я ден, съществена статистическа разлика има само при сравняването на *L11* с щамовете с най-висока титруема киселинност т.е. *L3* и *L6*. По отношение култура *L14* F-теста открива съществени различия с култури *L3* и *L6*, но t-теста открива такава само при сравняването на *L14* с *L3*.

През периода от 7-я до 21-я ден при културите се наблюдава слабо увеличение в стойностите на титруемата киселинност. Най-висока е титруема киселинността на средата с щам *L3*: на 14-я ден – $218.8^{\circ}\text{T} \pm 11$ и на 21-я ден – $227.5^{\circ}\text{T} \pm 15.5$. На 14-я ден с по-висока титруема киселинност са *L6* – $180.7^{\circ}\text{T} \pm 11.5$, *L5* – $173.2^{\circ}\text{T} \pm 4.2$, *L7* – $167.3^{\circ}\text{T} \pm 3$, следвани от *L14* с $152.7^{\circ}\text{T} \pm 31.6$ и *L11* – $138.2^{\circ}\text{T} \pm 9.8$.

На 21-я ден, аналогично на 14-я ден най-висока е титруемата киселинност на средата с *L3* – $227.5^{\circ}\text{T} \pm 15.5$, следван от *L6* – $181^{\circ}\text{T} \pm 11.9$, *L5* – $173.5^{\circ}\text{T} \pm 4.5$ и *L7* – $169.2^{\circ}\text{T} \pm 8.8$. По-ниска е титруема киселинност при *L14* с $156.5^{\circ}\text{T} \pm 32.3$ и *L11* – $139.5^{\circ}\text{T} \pm 9.1$. При сравнението на културите една спрямо друга и между отделните измервания във времето анализът е аналогичен за периодите: от 7-я до 14-я ден и от 14-я до 21-я ден, което се дължи на несъществените изменения в стойностите на титруемата киселинност. Приложените статистически тестове откриват съществена статистическа разлика между култура *L3* и останалите култури и за двата изследвани етапа. Титруемата киселинност на продукта с *L3* превъзхожда установената при *L11* с 81°T за периода 7-14-и ден и с 88°T за периода 14-21-и ден. Разликата между *L3* и *L14* за същите два етапа е съответно 66°T и 71°T . На 14-я ден *L3* има по-висока стойност на титруемата киселинност от *L7*, *L5* и *L6* съответно с 52°T , 45°T и 38°T , а на 21-я ден разликите в стойностите нарастват и са: 58°T , 54°T и 47°T .

Установява се определено съвпадение на статистически анализ по отношение култури *L5* и *L7*. При сравняването на титруемата киселинност на *L5* и *L7* статистическите тестове с F- и t-критерии откриват разлика спрямо

щам *L3* при измерванията на 14-я и 21-я ден. За тези етапи теста с използването на F-критерия открива разлика и при сравняването на *L5* и *L7* с култура *L11*. Числените разлики между тях са както следва: между *L5* и *L11* е 34 – 35°Т, а между култура *L7* и *L11* е 29 – 30°Т. Освен това за периода 7-21-и ден между самите щамове *L5* и *L7* от една страна и от друга страна при сравняването им с *L6* и *L14* не се открива статистическа значима разлика. Това се обяснява с малките разлики в средните стойности: *L5* има по-ниска титруема киселинност от *L6* с 8°Т, а *L7* по-ниска от *L6* с 13.4°Т на 14-я ден и 12°Т на 21-я ден.

При прилагането на статистическите тестове и двата критерия откриват статистически значима разлика на 14-я и 21-я ден при сравняването на *L6* с *L3* и *L11*. Според F-критерия разлика има между *L6* спрямо *L14*, но не и спрямо *L5* и *L7*. Щам *L6* има по-ниска титруема киселинност от *L3* и по-висока от *L11* и *L14*. Щам *L6* има по-висока титруема киселинност от *L11* с 42°Т за 14-я и 21-я ден и по-висока то *L14* с 28°Т на 14-я ден и 25°Т на 21-я ден.

Щам *L11* статистически се различава от всички култури както на 14-я така и на 21-я ден, с изключение на *L14*. Според t-теста разлика между *L11* има само спрямо *L3* и *L6*.

Щам *L14* статистически се различава спрямо *L3*, а F-теста открива разлика и с *L6* на 14-я на 21-я ден. Не се открива съществена статистическа разлика при сравняването на *L14* съответно с *L5*, *L7* и *L11*. На 14-я ден *L14* има по-ниска титруема киселинност от *L5* с 21°Т и от *L7* с 15°Т и по-висока от *L11* с 15°Т. На 21-я ден аналогичните данни са – по-ниска титруема киселинност от *L5* с 17°Т и от *L7* с 13°Т и по-висока от *L11* с 17°.

4.2.2.2. Пост-киселинообразуването на щамове *L. bulgaricus*

Изследването на пост-киселинообразуването на щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*) е извършено при хладилно съхранение (4°С) за период от 21 дни.

В таблица 4.9 и на фигура 4.8 са представени данните относно изменението на активната киселинност (рН) и общата титруема киселинност (°Т) при съхранението на млечнокиселия продукт от дейността на щамовете за 21 дни. Както се вижда от таблица 4.9 при коагулация млякото с изследваните култури има сходна активна киселинност. При коагулация най-висока е стойността на активната киселинност на млякото с *L11* – 4.77 ± 0.13, а най-ниска с *L5* – 4.73 ± 0.38. Култури *L6* и *L14* имат еднаква стойност – 4.75 и

грешки на средната, съответно ± 0.1 и ± 0.12 , аналогично на *L3* и *L7* с $pH=4.74$ и грешки на средната ± 0.51 и ± 0.52 .

На 24-я час активната киселинност при всички култури се понижава в с 0.26 до 0.35 единици. Щамове *L6* и *L7* имат най-ниска стойност на pH на 24-я час. Активната киселинност при *L6* се понижава най-значително – 0.35 и стойността на pH 4.40 ± 0.01 се изравнява с *L5* – 4.40 ± 1.27 . Изменението при шам *L7* е сходно с установеното при *L6* – 0.33. Еднаква средна стойност на pH има продукта с *L7* – 4.47 ± 0.57 и *L11* – 4.47 ± 0.13 . Култури *L14* с 4.49 ± 0.25 и *L3* с 4.48 ± 1.5 са с най-високо pH , а изменението спрямо 24-я час съвпада – 0.26.

На 48-я час с най-ниска стойност на pH е продуктът с щамове *L6* – 4.23 ± 0.52 и *L11* – 4.29 ± 0.06 , като изменение спрямо предходното измерване е 0.17 и 0.18. Най-висока е стойността при култури *L7* – 4.45 ± 0.45 и *L3* – 4.42 ± 2.3 . С еднаква стойност – 4.38 са *L5* и *L14* с грешка на средната ± 1.52 и ± 0.17 . Между културите не се откриват статистически значими разлики поради това, че средната разлика между най-ниските и най-високите стойности на активната киселинност на 48-я час при отделните щамове е 0.2 единици и от 24-я до 48-я час киселинността се изменя слабо.

Таблица 4.9. Изменение на активната киселинност (pH) на мляко под действието на щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*), инкубирани при температура $4^{\circ}C$ за срок от 21 дни.

Щам <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Време, час (h) и дни (d)					
	К	24h	48h	7d	14d	21d
<i>L3</i>	4.74	4.48	4.42	4.26	4.27	4.25
	± 0.51	± 1.5	± 2.3	± 0.73	± 4.1	± 4.4
<i>L5</i>	4.73	4.40	4.38	4.25	4.15	4.12
	± 0.38	± 1.27	± 1.52	± 0.64	± 0.64	± 1.08
<i>L6</i>	4.75	4.40	4.23	4.28	4.24	4.18
	± 0.1	± 0.01	± 0.52	± 0.4	± 0.37	± 0.5
<i>L7</i>	4.74	4.47	4.45	4.31	4.19	4.13
	± 0.52	± 0.57	± 0.45	± 0.08	± 0.5	± 0.64
<i>L11</i>	4.77	4.47	4.29	4.12	4.12	4.11
	± 0.13	± 0.13	± 0.06	± 0.09	± 0.32	± 0.45
<i>L14</i>	4.75	4.49	4.38	4.28	4.23	4.23
	± 0.12	± 0.25	± 0.17	± 0.26	± 0.16	± 0.16

На 7-я ден с най-ниска активна киселинност е щам *L11* с рН 4.12 ± 0.09 и понижение в стойността спрямо 48-я час – 0.17. При *L11* двата статистически теста показват съществена разлика както при сравняването на 7-я ден с 24-я час така и с 48-я час. Най-висока е активна киселинност на средата с щам *L7* – рН= 4.31 ± 0.08 . Изменението при щам *L7* от 48-я час до 7-я ден е 0.14 като според F-теста това е статистически значимо, но t-теста не открива разлика. Между *L7* и *L11* няма статистически разлика. На 7-я ден най-висока е активната киселинност на млечнокиселия продукт с щам *L7* – 4.31 ± 0.08 , сходна киселинност се отчита при *L3* – 4.26 ± 0.73 и *L5* – 4.28 ± 0.26 , а еднаква при култури *L6* и *L14* – 4.28 (съответна грешка на средната ± 0.4 и ± 0.26).

На 14-я ден с най-ниска активна киселинност отново се характеризира продуктът с щам *L11* – 4.12 ± 0.32 , без изменение на активната киселинност от предходното измерване. Аналогични са данните при *L7* – 4.19 ± 0.5 и *L5* – 4.15 ± 0.64 . От 7-я ден до 14-я ден F и t-теста откриват статистически значима разлика единствено при *L7*. С най-висока стойност на рН е щам *L3* със стойност 4.27 ± 4.1 , следван от *L6* – рН= 4.24 ± 0.37 и *L14* – рН= 4.23 ± 0.16 . Изменението при *L6* и *L14* спрямо 7-я ден е статистически не значимо.

На 21-я ден с най-ниска стойност на рН е отново продуктът с *L11* – 4.11 ± 0.45 без статистически значимо изменение спрямо 7-я и 14-я ден. Понижението на активната киселинност при *L11* е статистическо значимо според двата критерия на 21-я ден спрямо коагулация, 24-я и 48-я час като е съответно 0.7, 0.36 и 0.18. Аналогична на *L11* е стойността на активната киселинност при култури *L5* – 4.12 ± 1.08 , *L7* – 4.13 ± 0.64 и *L6* – 4.18 ± 0.5 . Понижението на рН спрямо 14-я ден при *L5*, *L6* и *L7* не е статистически значимо. При *L5* и *L7* понижението на рН за целия изследван период е еднакво – 0.61, а при *L6* – 0.57. По отношение статистическата значими разлики спрямо 21-я ден и предходни измервания между трите култури съществуват определени различия. Така например при култура *L6* и F- и t-критерия значима статистическа разлика при стойността на 21-я ден единствено спрямо коагулация. Това се обяснява с по-силното понижаване на рН до 24-я час. След този час изменение на активната киселинност на мялката с *L6* е слабо през целия изследван период. При щам *L5* статистически значима разлика и двата критерия откриват с коагулация, а F-критерия и с 24-я час, което е сходно с данните при *L6*. При щам *L7* двата критерия откриват разлика с коагулация, 24-я и 48-я час, а F-критерия и със 7-я ден.

Анализът показва по-значителното понижаване на активната киселинност през изследвания период при *L7*. При *L7* разликата между активната киселинност на 21-я ден и коагулация е 0.61, с 24-я час – 0.34, с 48-я час – 0.32 и със 7-я ден – 0.18.

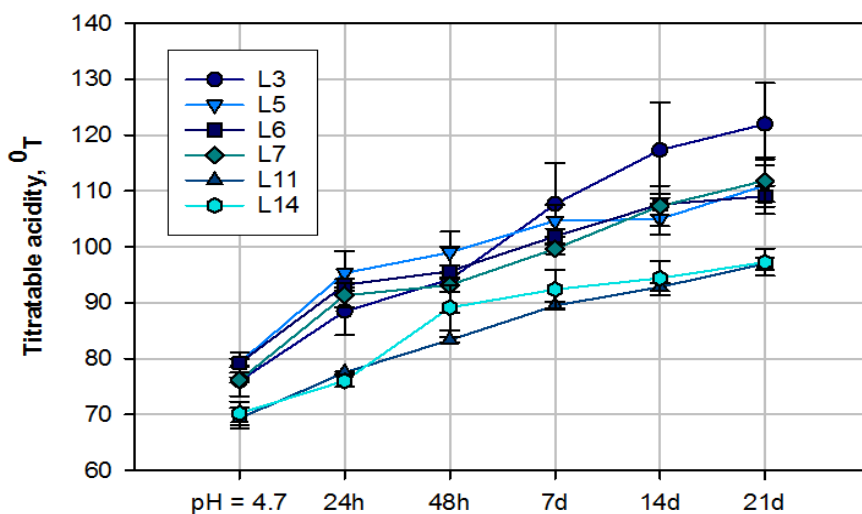
На 21-я ден най-висока е стойността на активната киселинност на продуктът с култури *L3* – 4.25 ± 4.4 и *L14* – 4.23 ± 0.16 . Изменението при шам *L3* спрямо 14-я ден е незначително, а при *L14* стойността се запазва без промяна. Поради характера на изменение при *L3* и *L14* не се открива статистически значима разлика за последната седмица от хладилното съхранение. При *L14* и двата теста откриват статистическа разлика на 21-я ден спрямо коагулация с разлика от 0.52, от 24-я час с 0.26, а F-критерия и спрямо 48-я с разлика от 0.15.

Приложените статистически тестове не откриват съществени разлики в установената на 21-я ден активна киселинност при изследваните щамове *L. bulgaricus* (*L3, L5, L6, L7, L11* и *L14*) за периода на хладилно съхранение (4°C).

На фигура 4.8 е показано нарастването на титруемата киселинност на млечнокиселия продукт с щамове *L. bulgaricus*. Ниска киселинност при коагулация има млякото с култури *L11* – 69.3 ± 4.7 и *L14* – 69 ± 4.2 . По-висока е титруемата киселинност при коагулация на млякото с *L5* – $80^\circ\text{T} \pm 4$, следван от *L6* – $79.3^\circ\text{T} \pm 1.7$, *L3* – $76^\circ\text{T} \pm 7$ и *L5* – $75.8^\circ\text{T} \pm 2$. Статистическите тестове откриват разлика в киселинността при коагулация с *L11* и *L14* спрямо *L3, L5, L6* и *L7*. Между *L11* и *L14* няма статистическа значимост, така както между *L3, L5, L6* и *L7*.

На 24-я час при всички култури се наблюдава нарастване на титруемата киселинност. Нарастването е най-значително при *L7* с $16^\circ\text{T} - 91.3^\circ\text{T} \pm 5.4$ и при *L5* с $15^\circ\text{T} - 95.3^\circ\text{T} \pm 10$. Аналогични са данните за култури *L6* с нарастване от 14°T и стойност $93.2^\circ\text{T} \pm 2.5$ и *L3* с 13°T и стойност $88.5^\circ\text{T} \pm 11$. Най-слабо с $6-8^\circ\text{T}$ е изменението при култури *L14* – $74.8^\circ\text{T} \pm 2.7$ и *L11* – $77.5^\circ\text{T} \pm 0.6$. Статистическата обработка на резултатите е аналогична на установената при коагулация. Между *L11* и *L14* и между *L3, L5, L6* и *L7* не се установява статистическа разлика. Разлика се открива при сравнението на *L11* и *L14* с всеки един от щамовете: *L3, L5, L6* и *L7*. Интерес представлява факта, че поради характера на данните при *L3* и *L14* изменението от коагулация до 24-я час няма съществена статистическа разлика, докато при останалите култури има.

На 48-я час, както на 24-я час, с изменение трикратно по-слабо, но отново с най-висока титруема киселинност е щам *L5* с $99^{\circ}\text{T} \pm 9.6$, следван от *L6* – $95.7^{\circ}\text{T} \pm 2.5$, *L3* – $94.2^{\circ}\text{T} \pm 15.2$ и *L7* – $93.2^{\circ}\text{T} \pm 2.9$. С най-ниски стойности са *L14* с $86.5^{\circ}\text{T} \pm 8.2$ и *L11* с $83.3^{\circ}\text{T} \pm 1.3$. При *L14* изменение е най-значително – 12°T , а при *L11* с изменение е същото като при *L3* – 6°T . С изключение на *L11* и *L14* при които има статистически значима разлика при прехода от 24-я към 48-я час при останалите щамове такава разлика не се открива. По отношение сравнението между самите щамове по-строгия статистически критерий открива разлика само между култури *L5* и *L11* (16°T разлика). Приложения с F-критерия тест посочва разлики както между *L5* и *L11*, така и между *L7* и *L11*. Според F-критерия *L5* и *L6*, се различават и спрямо *L14*



Фиг. 4.8. Изменение на общата титруема киселинност, при щамове *L. bulgaricus* (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*) за 21 дни (час, h и дни, d) при температура на съхранение 4°C .

На 7-я ден щам *L3* показва най-голямо повишение на титруемата киселинност – 14°T и млякото е с най-висока титруема киселинност – $107.7^{\circ}\text{T} \pm 18.8$. Продуктът с щам *L3* запазва по-висока титруема киселинност от другите до края на изследвания период. Със сходно изменение от 6 – 7°T спрямо 48-я час са щамове *L5* – $104.7^{\circ}\text{T} \pm 7.5$, *L6* – $101.9^{\circ}\text{T} \pm 3.2$ и *L7* – $99.7^{\circ}\text{T} \pm 2.4$. С най-ниска титруема киселинност са *L14* с $90.4^{\circ}\text{T} \pm 6.7$ и *L11* с $89.5^{\circ}\text{T} \pm 1.9$ (понижение от 48-я час $4 - 6^{\circ}\text{T}$). Щам *L3* се различава от *L11* и *L14*

като има по-висока титруема киселинност с $17 - 18^{\circ}\text{T}$. Анализа с F-критерия открива разлика между *L5*, *L6* и *L7* съответно с *L11* и *L14*, като *L11* те превъзхождат с 15°T , 12°T и 10°T , а *L14* с 14°T , 11°T и 9°T . Единствено при култура *L11*, според двата критерия, съществува статистическа разлика при сравняването на 48-я час с 7-я ден. Това вероятно е резултат от малкото варирането в получените средни стойности. При останалите щамове по-строгия критерий установява статистически значима разлика на 7-я ден спрямо 24-я час при култури *L6* и *L14*. При *L3*, *L5* и *L7* числените изменения не са обвързани със статистическа значимост.

На 14-я ден щам *L3*, със статистически не значимо повишение от 10°T , отново е с най-висока стойност – $117.3^{\circ}\text{T} \pm 22$. С по-ниска стойност е *L5* – $105^{\circ}\text{T} \pm 7.1$, а *L6* и *L7* имат сходна стойност – $107.8^{\circ}\text{T} \pm 4.6$ и $107.3^{\circ}\text{T} \pm 9.2$. В сравнение с *L3* щамове *L5*, *L6* и *L7* показват средно с 11°T по-ниска титруема киселинност. С най-ниска титруема киселинност отново са *L11* с $92.8^{\circ}\text{T} \pm 1.8$ и *L14* с $93.3^{\circ}\text{T} \pm 5.6$. Статистическата обработка на данните показва, че между *L11* и *L14* няма значима разлика, така както между *L5*, *L6* и *L7*. Според двата критерия разлика се открива между *L3* спрямо *L11* и *L14*, чийто продукт има с 24°T по-висока титруема киселинност. Според F-критерия съществено е различието и между *L3* и *L5*, като *L5* има с 12°T по-ниска киселинност. Съществено се различават още *L5*, *L6* и *L7* спрямо *L11* и *L14* като имат по-висока титруема киселинност от *L11* и *L14* средно с $12 - 15^{\circ}\text{T}$. Според F-критерия само при *L6*, *L7* и *L11* се открива статистическа разлика на стойностите на 7-я спрямо 14-я ден.

На 21-я ден нарастването на титруемата киселинност варира от 3 до 6°T , с изключение на *L6* – 1.2°T . С най-висока стойност отново е *L3* с $122^{\circ}\text{T} \pm 18.9$. Със сходни стойности и условно групирани в двойки са култури *L5* и *L7* с $111^{\circ}\text{T} \pm 13$ и $111.9^{\circ}\text{T} \pm 9.3$ и *L11* и *L14* със стойности $96.8^{\circ}\text{T} \pm 3$ и $96.4^{\circ}\text{T} \pm 4.5$. Щам *L6* заема междинно място с $109^{\circ}\text{T} \pm 4.4$. Според t -теста статистическа разлика съществува само между *L3* спрямо *L11* и *L14*, които превъзхожда с 25°T . Според F-критерия значима разлика съществува още между *L3* спрямо *L6* при разлика 13°T . Разлика има при *L5*, *L6* и *L7* спрямо *L11* и *L14*, с по-висока титруема киселинност средно с 14°T , 12°T и 15°T . При нито една култура t-теста не открива съществена разлика на 14-я спрямо 21-я ден. Според F-критерия *L11* е изключение по отношение съществена разлика на 21-я ден спрямо 14-я. При *L3* и *L14* F- и t-тестовите откриват разлика на титруемата киселинност на 21-я ден спрямо установената при коагулация и на 24-я час, а F-критерия разлика има и спрямо 48-я

час. При култура *L5* F-критерия открива разлика между 21-я ден спрямо коагулация, 24-я и 48-я час, но t-критерия открива такава само спрямо коагулация. При култура *L11* и двата критерия посочват разлика на 21-я ден с всички предходни измервания, а според t-критерия разлика липсва при сравнението между 14-я и 21-я ден. При култури *L6* и *L7* и двата критерия показват съществено изменение на 21-я ден спрямо всички измерванията от коагулация до 7-я ден.

Ако при анализът на данните се има в предвид само по-строгия критерия може да се направи заключението, че при култури *L3*, *L5* и *L14* характерът на изменението е такъв, че съществено статистическо изменение се установява при сравняването на 21-я ден с изходната титруема киселинност. При *L3* и *L14* разлики има и с 24-я час. При щамове *L6*, *L7* и *L11* съществено изменение има и при сравняването на 7-я с 14-я ден.

4.2.3. Органолептична оценка на щамове *L. bulgaricus*

Млякото, ферментирало под действието на изследваните щамове (*L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14*) има типичен, ясно изразен млечнокисел вкус и аромат; однородна, леко рехавява консистенция без провлачване, образуване на зърна или пресечки в общия обем. Синерезисът е умерен. Сравнението между млечнокиселия продукт, получен при ферментацията с изследваните културите не установява съществени различия.

4.2.4. Изводи

На базата на експерименталните резултати при щамовете *L. bulgaricus* *L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14* могат да се направят следните изводи:

- Идентифицирането на щамове *L3*, *L5*, *L6*, *L7*, *L11* и *L14* показва, че те са представители на вида *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.
- Времето на коагулация на млякото, инокулирано с изследваните щамове е най-кратко с щам *L3* – 4.24h ± 1.03, следван от *L7* – 4.32h ± 1.29 и *L6* – 5.31h ± 2.10. Щамове *L5* и *L14* коагулират млякото за еднакво време – 5.39h, но с различни грешки на средната: ± 1.59h и ± 1.31h. Най-продължително е термостатирането на щам *L11* – 5.54h ± 1.36. Статистическа значима разлика във времето на коагулация се установява само между щамове *L3* и *L11*.

- Изследването на киселиноустойчивостта на щамовете показва, че с най-висока преживяемост са клетките на щам L6 – 92%, следван от щамове L11 и L14 – 88%, L5 – 74%, L3 – 72% и L7 – 70%.
- Пределното киселинообразуване на изследваните щамове при температура 43°C ±2 за период от 21 дни е L3 – pH=3.57 ±0.38 (титруема киселинност – 227.5°Т ±15.5), L5 – 3.71 ±0.06 (173.5°Т ±4.5), L6 – 3.66 ±0.57 (181°Т ±11.9), L7 – 3.68 ±0.57 (169.2°Т ±8.8), L11 – 3.74 ±1.08 (139.5°Т ±9.1) и L14 – 3.74 (156.5°Т ±32.3).
- Пост-киселинообразуването на изследваните щамове при температура 4°C за период от 21 дни се определя чрез активна и титруема киселинност както следва: L3 – 4.25 ±4.4 (122°Т ±18.9), L5 – 4.12 ±1.08 (111°Т ±13), L6 – 4.18 ±0.5 (109°Т ±4.4), L7 – 4.13 ±0.64 (111.9°Т ±9.3), L11 – 4.11 ±0.45 (96.8°Т ±3) и L14 – 4.23 ±0.16 (96.4°Т ±4.5).
- При действието на щамове *L. bulgaricus* се получава ферментирал млечнокисел продукт с добра органолептичната оценка.

4.3. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТАРТЕРНИ КУЛТУРИ – ТИП СИМБИОТИЧНИ ДВОЙКИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО НА КИСЕЛО МЛЯКО

По предварително изготвения изследователски план след изолирането и изследването на щамове *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* се продължава с опитите за създаването на симбиотични двойки. В резултат на проведените изследвания щамове *St. thermophilus* S17, S19, S22 и S23 получиха по-добра технологична оценка в сравнение с S8 и S10, а щамовете *L. bulgaricus* – L3, L5, L6, L7, L11 и L14 отговаряха на поставените изисквания. Поради това усилията по създаването на стартерни култури се насочиха към комбинирането на щамове *St. thermophilus* S17, S19, S22 и S23 и *L. bulgaricus* – L3, L5, L6, L7, L11 и L14.

4.3.1. Получаване на симбиотични двойки от избрани щамове *St. thermophilus* и *L. bulgaricus*

Резултатите за получените симбиотични двойки (таблица 4.10) се основават на първоначален едномесечен микроскопски контрол на закваските и определяне времето на коагулация на млякото. Както се вижда от таблицата щамове S22 и S23 имат 100% съвместимост с изследваните щамове *L. bulgaricus*. Микроскопските препарати на стартерни култури S22L3, S22L5, S22L6, S22L7, S22L11, S22L14 и S23L3, S23L5, S23L6, S23L7,

S23L11 и *S23L14* показваха на видно поле повече клетки на *St. thermophilus* спрямо *L. bulgaricus* и времето на коагулация на млякото не превишава 3 часа.

Щамове *S17* и *S19* показаха 83% съвместимост с изследваните щамове *L. bulgaricus*. Успешните комбинации на *St. thermophilus S17* с щамове *L. bulgaricus* са следните: *S17L3*, *S17L5*, *S17L6*, *S17L7* и *S17L11*. Щам *S17* е несъвместим с *L. bulgaricus – L14*. При щам *S19* се получиха симбиотични двойки с щамове *L. bulgaricus* в следните комбинации: *S19L3*, *S19L5*, *S19L7*, *S19L11* и *S19L14*. Комбинирането на *St. thermophilus S19* с *L. bulgaricus L6* не доведе до получаването на симбиотична двойка. Микроскопските препарати на комбинации *S17L14* и *S19L6* показаха значително преобладаване на *St. thermophilus* и прогресивно намаляване на *L. bulgaricus* с всяко последващо препосяване на културите, като успоредно с това времето на коагулация на млякото се удължава над 3 часа.

Таблица 4.10. Комбинации *St. thermophilus/L. bulgaricus*.

Щам <i>St. thermophilus</i>	Щам <i>L. bulgaricus</i>					
	<i>L3</i>	<i>L5</i>	<i>L6</i>	<i>L7</i>	<i>L11</i>	<i>L14</i>
<i>S8</i>	*	○	○	○	○	○
<i>S10</i>	○	○	○	○	○	○
<i>S17</i>	+	+	+	+	+	–
<i>S19</i>	+	+	–	+	+	+
<i>S22</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S23</i>	+	+	+	+	+	+

Легенда: + успешна комбинация; – неуспешна комбинация; ○ неизследвана комбинация; * успешна, но неизследвана комбинация

Поради това, че сравнението между щамове *St. thermophilus S17*, *S19*, *S22* и *S23* не установи съществена статистическа разлика по показателите: време на коагулация, пост- и пределно киселинообразуване получените симбиотични двойки бяха разпределени в четири групи в зависимост от участието на съответния щам *St. thermophilus*. Това позволи сравняването между симбиотичните двойки да установи специфичните им свойства и да открие разликите между тях.

4.3.2. Изследване на комбинации *St. thermophilus/L. bulgaricus* по основни технологични показатели

4.3.2.a. Изследване на ферментационната активност

Микроскопското наблюдение върху получените 22 симбиотични култури е сравнително субективно и крайно недостатъчно за характеризирането на създадените комбинации. Допълнителна информация за стартерните култури се получава при изследването на ферментационната им активност.

Както се вижда от таблица 4.11 при инокулирането си млякото има активна киселинност от 6.57 до 6.67, като варирането няма статистическа значимост. При *S17L11* активната киселинност е най-ниска – 6.57 ± 0.13 , а при *S17L3* и *S17L6* най-висока – 6.67. При *S17L5* рН е 6.63 ± 0.23 и при *S17L7* – 6.58 ± 0.15 .

При всички култури, на 30-та минута от термостатирането, се наблюдава понижаване на активната киселинност. При *S17L7* изменението е най-слабо (0.09) и стойността на активната киселинност е най-висока – 6.49 ± 0.12 , следвана от *S17L5* – 6.43 ± 0.15 , докато при *S17L3*, *S17L6* и *S17L11* средната стойност на рН е еднаква – 6.40 с грешки на средната ± 1.3 , ± 0.5 и ± 0.16 . Статистическата обработка на резултатите на 30 минута показва, че изменението при *S17L3*, *S17L5* и *S17L7* няма статистическа значимост, а при *S17L6* и *S17L11* има статистическа значимост според F-, но не и според t-теста.

Таблица 4.11. Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам *St. thermophilus* S17 (група 1).

Култура	Активна киселинност, рН						
	При инокулиране	30min	1h	1.30h	2h	2.30h	3h
<i>S17L3</i>	6.67 ± 0.44	6.40 ± 1.3	6.24 ± 2	5.76 ± 4	5.21 ± 2.86	4.86 ± 2.54	4.55 ± 1.84
<i>S17L5</i>	6.63 ± 0.23	6.43 ± 0.15	6.19 ± 0.12	5.67 ± 0.32	5.06 ± 0.34	4.73 ± 0.28	4.50 ± 0.17
<i>S17L6</i>	6.67 ± 0.32	6.40 ± 0.5	6.23 ± 0.13	5.67 ± 1.14	5.09 ± 0.82	4.75 ± 0.76	4.45 ± 0.32
<i>S17L7</i>	6.58 ± 0.15	6.49 ± 0.12	6.26 ± 0.09	5.69 ± 0.13	5.04 ± 0.05	4.71 ± 0.09	4.48 ± 0.11
<i>S17L11</i>	6.57 ± 0.13	6.40 ± 0.16	6.16 ± 0.19	5.53 ± 0.2	5.01 ± 0.24	4.74 ± 0.18	4.59 ± 0.14

На 1-я час най-ниска е активна киселинност на млякото с *S17L5* – 6.19 ±0.12 и *S17L11* – 6.16 ±0.19, като изменението от 30 минута до 1-я час е статистически съществено и стойността му е еднаква – 0.24. По-висока е активната киселинност при *S17L3* – 6.24 ±2 и *S17L6* – 6.23 ±0.13, а изменението е съответно 0.16 и 0.17 и не е статистически съществено. С най-висока активна киселинност на 1-я час е млякото с *S17L7*–6.26 ±0.09 и статистически съществено изменение (0.23).

На първия час и половина от инокулирането с най-ниска активна киселинност е млякото с *S17L11* – 5.53 ±0.2 и изменение спрямо 1-я час–0.63. Култури *S17L5* и *S17L6* имат еднаква средна стойност – 5.67, съответни грешки на средната ±0.32 и ±1.14 и изменение спрямо 1-я час – 0.52 и 0.56. С по-висока активна киселинност са *S17L7* – 5.69 ±0.13 и *S17L3* – 5.76±4. При култури *S17L5*, *S17L6*, *S17L7* и *S17L11* стойностите на активната киселинност получени на 1.30h са със статистически значима разлика спрямо получените на 1-я час, но не и при *S17L3*.

На 2-я час с най-ниска активна киселинност е *S17L11* с 5.01 ±0.2 и със статистически значимо изменение спрямо 1.30h – 0.52. С най-висока активна киселинност е *S17L3* с 5.21 ±2.86 и поради грешката на средната със статистически несъществено изменение от 0.55. Сходна активна киселинност имат култури *S17L7* – 5.04 ±0.05, *S17L5* – 5.06 ±0.34 и *S17L6* – 5.09 ±0.82. Изменението на активната киселинност е най-голямо при *S17L7* с 0.65, следван от *S17L5* – 0.61 и *S17L6* – 0.58. И при трите култури изменението спрямо предходния час е статистически значимо.

На 2.30h най-ниска е активна киселинност на млякото инокулирано с *S17L7* – 4.71 ±0.09, следван от *S17L5* – 4.73 ±0.28 (със същото понижение 0.33), *S17L11* – 4.74 ±0.18 (с 0.34) и *S17L6* – 4.75 ±0.76 (с 0.27). Най-висока е активна киселинност с *S17L3* – 4.86 ±2.54 и понижение – 0.35. Според F-теста статистически съществено е изменението наблюдавано при *S17L5*, *S17L6*, *S17L7* и *S17L11*, но не и при *S17L3*, а според t-теста значимо е само при *S17L6* и *S17L7*. На 2.30h между стойността на рН при отделните култури няма съществена разлика.

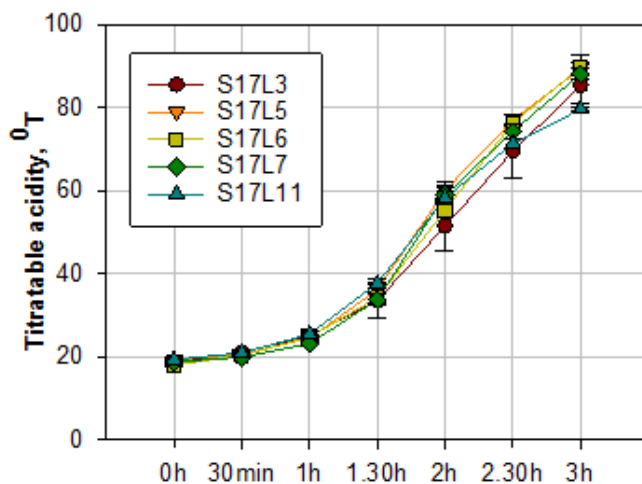
На 3-я час най-ниска е активната киселинност на средата с *S17L6* – 4.45 ±0.32, със статистически значимо изменение от 0.3, а най-висока при *S17L11* –4.59 ±0.14 и изменение–0.15. При останалите култури с по-високо рН е *S17L3* – 4.55 ±1.84, следвана от *S17L5* – 4.50 ±0.17 и *S17L7* – 4.48 ±0.11. Статистически значимо изменение в стойността на активната киселинност от 2.30h до 3-я час се установява при *S17L3* (0.31), но не и при *S17L5* и

S17L7 (0.23). Анализът на данните показва, че няма статистически съществена разлика в стойността на активната киселинност на млякото на 3-я час при изследваните култури.

На фигура 4.9 е показано изменението на титруемата киселинност на млякото при развитието на симбиотични двойки *S17L3*, *S17L5*, *S17L6*, *S17L7* и *S17L11*. При инокулация културите имат сходна титруема киселинност: *S17L11* – $19.3^{\circ}\text{T} \pm 1$, *S17L5* – $19.3^{\circ}\text{T} \pm 0.48$, *S17L7* – $18.7^{\circ}\text{T} \pm 0.97$, *S17L3* – $18.5^{\circ}\text{T} \pm 2.05$ и *S17L6* – $18^{\circ}\text{T} \pm 1.8$. Статистическият тест с F-критерия, но не и t-теста, открива съществена разлика между титруемата киселинност при инокулация само между *S17L5* и *S17L6*.

На 30-та минута при всички култури се наблюдава статистически незначимо увеличение на титруемата киселинност. По-висока е титруемата киселинност на млякото с култура *S17L3* – $21^{\circ}\text{T} \pm 1.8$, следвана от *S17L11* – $20.9^{\circ}\text{T} \pm 1.1$, *S17L5* – $20.5^{\circ}\text{T} \pm 1.09$, *S17L6* – $20.2^{\circ}\text{T} \pm 1.5$ и *S17L7* – $19.8^{\circ}\text{T} \pm 0.6$.

На 1-я час при всички култури изменението на титруемата киселинност е статистически значимо и тенденцията се запазва до 2.30h. На 1-я час с най-висока киселинност са симбиотични двойки *S17L11* с $25.4^{\circ}\text{T} \pm 1.2$ с повишение – 4.5°T и *S17L3* с $25^{\circ}\text{T} \pm 4.7$ и повишение – 4°T . С еднаква стойност на титруемата киселинност са *S17L6* – $24.7^{\circ}\text{T} \pm 0.8$ и *S17L5* – $24.5^{\circ}\text{T} \pm 1.7$, следвани от *S17L7* – $23.1^{\circ}\text{T} \pm 1.2$. Статистическият тест с F-критерия открива разлика между титруемата киселинност на 1-я час между *S17L7* и *S17L11*.



Фиг. 4.9. Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$) в мляко за 3 часа при дейността на симбиотични двойки, с участието на щам *St. thermophilus* S17.

На 1.30 h най-висока е титруема киселинност на млякото с *S17L11* – $37.6^{\circ}\text{T} \pm 2.8$ и *S17L5* – $36.1^{\circ}\text{T} \pm 2.9$, а изменението спрямо предходното измерване е $11^{\circ}\text{T} - 12^{\circ}\text{T}$. Малко по-ниска е титруемата киселинност при *S17L6* – $34.2^{\circ}\text{T} \pm 4.2$ и (изменение от 9°T), с еднаква киселинност са култури *S17L3* – $33.5^{\circ}\text{T} \pm 13.8$ и *S17L7* – $33.7^{\circ}\text{T} \pm 3$ при съответно изменение 8°T и 10°T . Между стойностите на титруемата киселинност при двойките не се установява статистически значима разлика. Статистическите тестове и с двата критерия откриват съществено изменение в титруемата киселинност при културите при прехода от първия до 1.30 часа с изключение на данните при *S17L3*.

На 2-я час най-висока е титруемата киселинност на млякото, инокулирано с *S17L5* – $60^{\circ}\text{T} \pm 4.6$ с повишение – 24°T , следван от *S17L7* с $58.9^{\circ}\text{T} \pm 4.1$ и *S17L11* с $58.2^{\circ}\text{T} \pm 3.3$ и изменение съответно 25°T и 21°T . С най-ниска титруема киселинност са *S17L6* с $55.2^{\circ}\text{T} \pm 6$ с повишение – 21°T и *S17L3* с $51.5^{\circ}\text{T} \pm 19.3$ с – 18°T . Изменението от 1.30 часа до 2-я час, при всички култури без изключение, е статистически значимо, а между отделните култури не съществува съществена разлика.

На 2.30h с най-висока титруема киселинност отново е *S17L5* – $77^{\circ}\text{T} \pm 3.5$, следван от *S17L6* – $76.2^{\circ}\text{T} \pm 6.5$. При *S17L5* изменението с 17°T за интервала 2.00-2.30h е малко по-слабо в сравнение с изменението от 1.30-2.00h, но се запазва без промяна при *S17L6* – 21°T . Култура *S17L3* с $69.5^{\circ}\text{T} \pm 20.2$ има най-ниска титруема киселинност на 2.30h, но също запазва без промяна изменението си – 18°T . Култури *S17L7* с $74.3^{\circ}\text{T} \pm 4.2$ и *S17L11* с $71.4^{\circ}\text{T} \pm 2.7$ имат с 40% по-слабо изменение спрямо предходния етап и титруемата им киселинност се повишава съответно с 15°T и 13°T . Независимо от по-слабото понижение на титруемата киселинност изменението е статистически значимо.

На 3-я час най-висока е титруемата киселинност на млякото с *S17L6* – $89.7^{\circ}\text{T} \pm 9.4$ и *S17L5* – $89.3^{\circ}\text{T} \pm 3.2$ (понижение от предходния етап с 13°T и 12°T). Култура *S17L11C* е с най-ниска титруема киселинност – $79.6^{\circ}\text{T} \pm 1.5$ и най-слабо изменение – 8°T . Със сходна титруема киселинност са *S17L7* с $88.1^{\circ}\text{T} \pm 3.3$ и *S17L3* с $85.2^{\circ}\text{T} \pm 13.6$. На 3-я час най-значително е изменение при *S17L7* с 14°T и при *S17L3* с 16°T . При всички култури от 2.30h до 3-я час изменението е статистически значимо, с изключение на *S17L3* според по-строгия тест.

Статистическата обработка на данните с използването на фактори време и култура показва, че при термостатирането си в мляко за период от

3 часа развитието на културите се подчинява на обща закономерност и между симбиотичните двойки, с участието на щам *St. thermophilus* S17 няма съществена разлика

В таблица 4.12 по аналогичен начин са представени данните за изменението на активната киселинност на млякото при термостатирането на симбиотични двойки, в състава на които участва *St. thermophilus* S19. При инокулация на млякото с изследваните култури активната киселинност варира статистически несъществено от 6.57 до 6.67.

Понижение на активната киселинност се наблюдава при всички култури след първите 30 минути от термостатирането. При развитието на S19L14 понижението е най-значително – 0.31 и рН е най-ниско – 6.36 ± 0.44 . Култура S19L7 е с най-висока стойност на рН – 6.46 ± 0.14 и изменение – 0.17. Стартерна култура S19L11 е със сходно на S19L7 изменение – 0.18, но с по-ниско рН – 6.39 ± 0.18 . Симбиотична двойка S19L3 има еднаква с S19L11 активна киселинност – 6.39 ± 0.2 , но по-значително изменение – 0.28. Култура S19L5 с 6.42 ± 0.18 има активна киселинност сходна с тази при S19L7, но изменение сходно на S19L3 – 0.23. Изменението на активната киселинност е статистически значимо според F-критерия при всички култури с изключение на S19L5, но t-теста не открива съществена разлика.

На 1-я час понижението на рН е статистически значимо при всички култури и варира от 0.21 до 0.25. С изключение на S19L7, която показва малко по-висока активна киселинност – 6.25 ± 0.15 при останалите култури активната киселинност е сходна: при S19L3 и S19L5 рН е еднакво – 6.18, със съответни грешки на средната ± 0.22 и ± 0.15 и малко по-ниско при S19L14 – 6.15 ± 0.19 и S19L11 – 6.14 ± 0.2 .

На 1.30h при S19L11 изменението е най-значително – 0.66 и рН има най-ниска стойност 5.48 ± 0.17 . При S19L14 изменението е най-слабо – 0.4 и рН е с най-висока стойност – 5.75 ± 1.14 . При останалите култури активната киселинност се изменя с 0.54 ± 0.01 и стойности на рН намаляват в реда: S19L7 – 5.71 ± 0.16 , S19L3 – 5.65 ± 0.43 и S19L5 – 5.63 ± 0.22 . Според двата статистически критерия, при всички култури изменението от 1h до 1.30h е значимо. На 1.30h F-критерия открива статистически значима разлика само между рН при култура S19L11 спрямо S19L7 и S19L14, от които има по-ниско рН с 0.23 и 0.27 единици.

Таблица 4.12. Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам *St. thermophilus* S19 (група 2).

Култура	Активна киселинност, рН						
	При инокулиране	30min	1h	1.30h	2h	2.30h	3h
<i>S19L3</i>	6.67 ±0.07	6.39 ±0.2	6.18 ±0.22	5.65 ±0.43	5.11 ±0.26	4.77 ±0.25	4.47 ±0.23
<i>S19L5</i>	6.65 ±0.25	6.42 ±0.18	6.18 ±0.15	5.63 ±0.22	4.97 ±0.53	4.73 ±0.21	4.52 ±0.09
<i>S19L7</i>	6.63 ±0.15	6.46 ±0.14	6.25 ±0.15	5.71 ±0.16	5.08 ±0.04	4.76 ±0.16	4.52 ±0.12
<i>S19L11</i>	6.57 ±0.13	6.39 ±0.18	6.14 ±0.2	5.48 ±0.17	5.00 ±0.21	4.77 ±0.18	4.64 ±0.15
<i>S19L14</i>	6.67 ±0.38	6.36 ±0.44	6.15 ±0.19	5.75 ±1.14	5.09 ±0.7	4.71 ±0.19	4.39 ±0.06

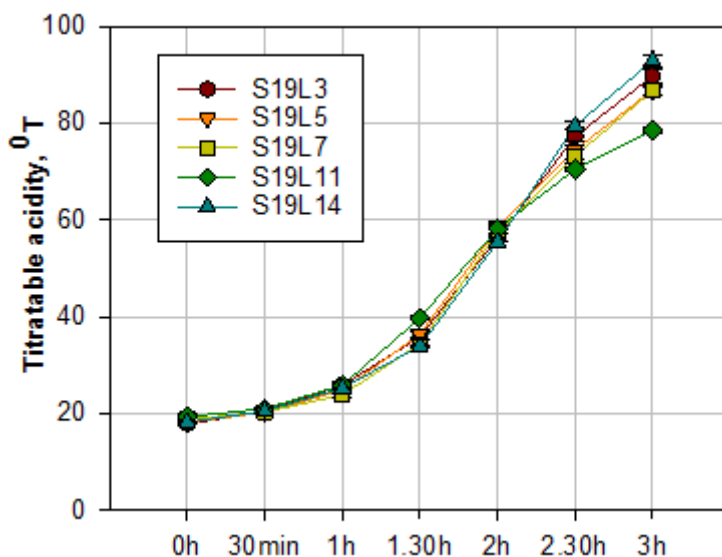
На 2-я час симбиотичните двойки имат сходна активна киселинност, изменението спрямо 1.30h е от 0.48 до 0.66 и е статистически значимо при всички култури. Най-ниска е стойността на активната киселинност с *S19L5* – 4.97 ± 0.53 , а при останалите култури реда по нарастването на стойността е както следва: *S19L11* – 5.00 ± 0.21 , *S19L7* – 5.08 ± 0.04 , *S19L14* – 5.09 ± 0.7 и *S19L3* – 5.11 ± 0.26 .

На 2.30h понижаването на активната киселинност е от 0.23 до 0.38. Интерес представлява култура *S19L3*, която в интервалите 1.30 – 2.00h и 2.00 – 2.30h запазва постоянен темпа на понижаване на активната киселинност. Другите симбиотични двойки от групата показват с около 50% по-слабо изменение на активната киселинност в сравнение с предходното измерване. На 2.30h, аналогично на 2-я час, изследваните културите имат сходни средни стойности на активната киселинност. С по-висока активна киселинност са *S19L3* с 4.77 ± 0.25 и *S19L11* – 4.77 ± 0.18 , а по-ниска е стойността на с *S19L7* – 4.76 ± 0.16 , *S19L5* – 4.73 ± 0.21 и *S19L14* – 4.71 ± 0.19 .

На 3-я час при всички култури понижаването на активната киселинност се забавя и варира от 0.13 до 0.32 единици. Статистически съществено според F-критерия е понижението при *S19L3*, *S19L7* и *S19L14*, а несъществено според двата теста при *S19L5* и *S19L11*. При *S19L11* изменението на рН е най-слабо – 0.13 и стойността на рН е една от най-високите – 4.64 ± 0.15 . С по-ниска стойност на рН е единствено *S19L3* с 4.47 ± 0.23 и изме-

нение от предходното измерване – 0.3. Култури *S19L5* и *S19L7* имат еднаква активна киселинност 4.52 и съответни грешки на средната ± 0.09 и ± 0.12 . С най-ниска активна киселинност е *S19L14* с 4.39 ± 0.06 . Според F-теста на 3-я час съществена статистическа разлика в стойността на рН има между *S19L11* и останалите двойки в групата, но според t-теста такава разлика има само между *S19L11* и *S19L14*.

Както се вижда от фигура 4.10 при термостатирането за периода от инокулирането на млякото до 2-я час между *S19L3*, *S19L5*, *S19L7*, *S19L11* и *S19L14* не се забелязват никакви съществени различия. При инокулирането на културите млякото има титруема киселинност с *S19L3* – $17.8^{\circ}\text{T} \pm 0.8$, а с *S19L11* – $19.3^{\circ}\text{T} \pm 1.3$. При останалите култури титруемата киселинност е еднаква: при *S19L7* – $18.7^{\circ}\text{T} \pm 0.9$, при *S19L5* и *S19L14* – 18.2°T , а съответните грешки са ± 1.07 и ± 1.5 .



Фиг. 4.10. Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам *St. thermophilus S19*.

Половин час след инокулацията се установява слабо, според t-теста статистически несъществено, изменение на титруемата киселинност на млякото и стойностите ѝ са сходни с отделните култури: с *S19L11* – $21^{\circ}\text{T} \pm 0.8$, с *S19L3* – $20.5^{\circ}\text{T} \pm 1.3$, с *S19L14* – $20.5^{\circ}\text{T} \pm 2.05$, с *S19L7* – $20.3^{\circ}\text{T} \pm 0.7$ и с *S19L5* 20.2 ± 1.4 .

Изменението от 30-та минута до 1-я час не превишава 5 – 6°Т, но е статистически значимо. На 1-я час по-ниска е титруемата киселинност на млякото с култури *S19L5* – 24.8°Т ±2.2 и *S19L7* – 23.8°Т ±0.98. При останалите култури титруемата киселинност е еднаква: *S19L3* и *S19L11* с 25.8°Т (±1.5 и ±0.62) и *S19L14* с 25.2°Т ±0.8.

На 1.30h увеличението на титруемата киселинност е по-голямо – 8°Т – 14°Т. Най-висока е титруемата киселинност на млякото, инокулирано с култура *S19L11* – 39.7°Т ±1.2, следвана от *S19L5* – 36.4°Т ±1.7, *S19L3* с 35.8°Т ±4.4, *S19L7* – 34.4°Т ±2.3 и *S19L14* – 34°Т ±3.7. Според F-теста *S19L11* се различава от останалите двойки в групата си, но според t-теста разлика има само с *S19L7* и *S19L14*.

На 2-я час нарастването на титруемата киселинност е почти двойно по-голямо от изменението при предходния час. Най-слабо титруемата киселинност нараства в млякото инокулирано с *S19L11* – 18°Т. За сравнение трябва да се посочи, че за предходния етап – 1h – 1.30h култура *S19L11* има най-високо изменение – 14°Т. При *S19L7* увеличението е най-значително – 23°Т, но титруемата киселинност не е най-високата – 57.5°Т ±4 като. По-висока е титруема киселинност при *S19L5* с 58.4°Т ±4 и *S19L11* с 58.2°Т ±1.9. Култури *S19L3* с 56.3°Т ±4.8 и *S19L14* с 55.5°Т ±2.7 са с по-ниска титруема киселинност спрямо останалите симбиотични двойки. На 2-я час между културите няма съществена статистическа разлика.

На 2.30h скоростта на нарастването на титруемата киселинност се запазва без промяна от предходния етап само при две от симбиотични двойки – *S19L3* и *S19L14*. По-значително е увеличението – 24°Т при *S19L14* и стойността на киселинността по-висока – 79.5°Т ±2.7. При *S19L3* титруемата киселинност нараства с 21°Т и достига 77.3°Т ±4.4. При *S19L11* нарастването с 12°Т е двукратно по-слабо и титруемата киселинност има най-ниска стойност – 70.5°Т ±1.1. При *S19L5* и *S19L7* нарастването на титруемата киселинност е 16°Т или с около 40% по-слабо в сравнение с *S19L3* и *S19L14*. Култура *S19L5* със 74.5°Т ±4.3 има сходна титруема киселинност с получената при *S19L7* – 73.3°Т ±3.7. На 2.30h изменението при всички култури е статистически значимо и между тях съществуват разлики. Тестът с F-критерия открива съществена статистическа разлика между култури *S19L14* и *S19L5*, както между *S19L7* и *S19L11*. На 2.30h симбиотична двойка *S19L14* има по-висока титруема киселинност от *S19L5* с 5°Т, от *S19L7* с 6°Т и от *S19L11* с 9°Т. Култура *S19L3*, според двата теста, значимо се различава само от *S19L11*, спрямо която има с 7°Т по-висока киселинност. Според F-

теста статистическа разлика съществува и между *S19L5* и *S19L11*. В анализът се забелязва, че според по-строгия тест симбиотични двойки *S19L3* и *S19L14* се отличават от *S19L11*.

На 3-я час по-висока е титруемата киселинност на млякото с *S19L14* – $93^{\circ}\text{T} \pm 4.1$ и *S19L3*– $89.8^{\circ}\text{T} \pm 4.1$. Изменението при *S19L3* и *S19L14* спрямо предходния час е наполовина по-малко – $12-14^{\circ}\text{T}$. Най-слабо, с 8°T , е нарастването при *S19L11* и титруемата киселинност има най-ниска стойност $-78.6^{\circ}\text{T} \pm 1.3$. Култури *S19L7* и *S19L5* с 13°T имат сходно с това на *S19L3* и *S19L14* изменение, но са с по-ниска крайна титруема киселинност. Титруемата киселинност при *S19L5* и *S19L7* е еднаква – 87°T и съответните грешки на средната са ± 2 и ± 2.13 . При всички двойки изменението на титруемата киселинност за последния половин час от термостатирането е статистически значимо и между културите има определени разлики. И F- и t-тестата са показват еднакъв резултат по отношение титруемата киселинност на 3-я час при *S19L14* спрямо *S19L5*, *S19L7* и *S19L11*, като *S19L14* има по-висока с 6°T титруема киселинност спрямо *S19L5* и *S19L7* и с 14°T по-висока спрямо *S19L11*. Според двата теста *S19L11* се различава от *S19L3*, *S19L5*, *S19L7* и *S19L14*. При сравнение на *S19L3* F-тестата открива разлики освен с *S19L11* още и с *S19L5*, *S19L7*. Между *S19L3* и *S19L14*, така както между *S19L5* и *S19L7* не се откриват съществени разлики.

В таблица 4.13 са представени данните за понижаването на активната киселинност в млякото, инокулирано със симбиотични двойки в състава на които участва щам *St. thermophilus S22*.

Активната киселинност на млякото при инокулацията варира статистически несъществено от 6.59 до 6.66. По-висока е титруема киселинност на млякото, използвано при експериментите с участието на *S22L5* -6.66 ± 0.18 , а най-ниска с *S22L3* и *S22L11*– $6.59 (\pm 0.08, \pm 0.16)$. При останалите култури рН по реда на нарастване е: *S22L6*– 6.60 ± 0.05 , *S22L14*– 6.61 ± 0.09 и *S22L7*– 6.63 ± 0.17 .

Таблица 4.13. Изменение на активната киселинност на мляко при действието на симбиотични двойки, в състава на които участва щам *St. thermophilus* S22 (група 3).

Култура	Активна киселинност, рН						
	При инокулиране	30min	1h	1.30h	2h	2.30h	3h
<i>S22L3</i>	6.59 ±0.08	6.40 ±0.06	6.17 ±0.22	5.56 ±0.38	4.72 ±0.71	4.66 ±0.2	4.39 ±0.17
<i>S22L5</i>	6.66 ±0.18	6.42 ±0.12	6.15 ±0.1	5.61 ±0.18	5.07 ±0.14	4.73 ±0.15	4.52 ±0.08
<i>S22L6</i>	6.60 ±0.05	6.39 ±0.11	6.19 ±0.06	5.59 ±0.12	5.01 ±0.09	4.68 ±0.04	4.42 ±0.04
<i>S22L7</i>	6.63 ±0.17	6.45 ±0.16	6.29 ±0.26	5.75 ±0.28	5.13 ±0.29	4.76 ±0.28	4.56 ±0.3
<i>S22L11</i>	6.59 ±0.16	6.41 ±0.15	6.17 ±0.18	5.53 ±0.16	5.04 ±0.11	4.80 ±0.1	4.66 ±0.11
<i>S22L14</i>	6.61 ±0.09	6.33 ±0.11	6.09 ±0.31	5.64 ±0.6	5.0 ±0.48	4.67 ±0.3	4.41 ±0.23

След 30 минути термостатиране всички култури понижават активната киселинност на млякото. Най-значително (с 0.28) се понижава рН на млякото с *S22L14* – рН=6.33 ±0.11. При другите симбиотични двойки понижаването на активната киселинност е от 0.18 до 0.24. Симбиотична двойка *S22L7* е с най-висока стойност на рН – 6.45 ±0.16, следвана от *S22L5*–6.42 ±0.12, *S22L11*–6.41 ±0.15, *S22L3* – 6.40 ±0.06 и *S22L6*–6.39 ±0.11. Тестът с F-критерия открива разлика само между *S22L14* и *S22L7*, а изменението от инокулация до 30 минута е статистически съществено при култури *S22L5*, *S22L6* и *S22L11*.

На 1-я час понижаването на активната киселинност е аналогично с предходния етап и варира от 0.16 до 0.27. При култура *S22L7* активната киселинност има по-висока стойност –6.29 ±0.26 при по-слабо понижение – 0.16. Млякото с култури *S22L3* и *S22L11* има еднаква активна киселинност – 6.17 и съответни грешки на средната: ±0.22 и ±0.18, следвани от *S22L6* – 6.19 ±0.06, *S22L5* – 6.15 ±0.1 и *S22L14* с 6.09 ±0.31. Статистическа разлика се открива само между културите с най-ниска (*S22L14*) и най-висока стойност на рН (*S22L7*), а изменението от 30min до 1-я час е статистически значимо при *S22L5*, *S22L6* и *S22L11*.

На 1.30h понижението на рН на млякото спрямо 1-я час е статистически съществено, по-значително е спрямо изменението от 30min до първия час и варира от 0.45 до 0.64. Активната киселинност на млякото с култура *S22L7* не е с най-слабото изменението – 0.54, но стойността на активната киселинност е най-висока – 5.75 ± 0.28 , докато при *S22L11* изменението е най-значително – 0.64 и стойността на рН е най-ниска – 5.53 ± 0.16 . При останалите култури активната киселинност по реда на нарастването е както следва: *S22L3* – 5.56 ± 0.38 , *S22L6* – рН= 5.59 ± 0.12 , *S22L5* – 5.61 ± 0.18 и *S22L14* – 5.64 ± 0.6 .

На 2-я час активната киселинност на млякото с култура *S22L3* се понижава с 0.84 единици и рН е най-ниско – 4.72 ± 0.71 . Изменението на рН от предходния час се запазва при култура *S22L5* – 0.54, нараства до 0.63 ± 0.01 при култури *S22L6*, *S22L7* и *S22L14* и намалява с 30% при *S22L11*. При *S22L7* активната киселинност е по-висока – 5.13 ± 0.29 в сравнение с другите култури: *S22L14* – 5.00 ± 0.48 , *S22L6* – 5.01 ± 0.09 , *S22L11* – 5.04 ± 0.11 и *S22L5* – 5.07 ± 0.14 . Статистическа разлика отново се открива единствено между културата с най-висока и най-ниска активна киселинност: *S22L7* и *S22L3*. Според F-теста изменението от 1.30h до 2-я час е статистически съществено.

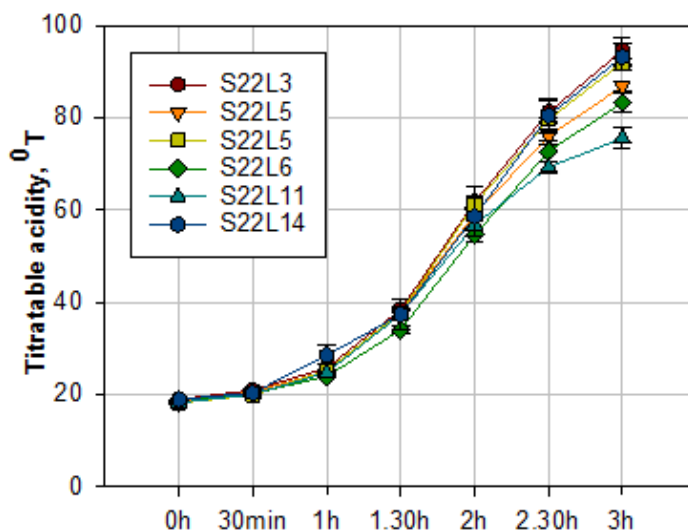
На 2.30h изменението при всички култури двукратно намалява. Прави впечатление, че при култура *S22L3* която на предходния етап се отличава със значително понижението на рН на следващия половин час изменя активната си киселинност само с 0.06. Култури *S22L6* с рН= 4.68 ± 0.04 и *S22L14* с 4.67 ± 0.3 , понижават активната си киселинност с 0.33 и достигат стойности на рН аналогични на *S22L3* – 4.66 ± 0.2 . Култура *S22L11* има най-висока стойност -4.80 ± 0.1 поради слабото понижаване на рН – 0.24. Култури *S22L5* с 4.73 ± 0.15 и *S22L7* с 4.76 ± 0.28 имат сходни стойности на активната киселинност, но с по-голямо понижението в сравнение *S22L11*. При всички култури изменението 2.00h до 2.30h е статистически значимо с изключение на *S22L3*, но между симбиотичните двойки на този час няма съществени различия.

През последния половин час от термостатирането културите понижават активната киселинност на млякото с по-бавно темпо и изменението е не повече от 20-40% от максимално измереното. Най-ниска е активната киселинност с култура *S22L3* – 4.39 ± 0.17 , следвана от *S22L14* – 4.41 ± 0.23 и *S22L6* с 4.42 ± 0.04 . По-висока е активната киселинност при *S22L5* – $4.52 \pm$

0.08, $S22L7 - 4.56 \pm 0.3$, $S22L11 - 4.66 \pm 0.11$. Изменението спрямо предходното измерване е статистически съществено според F-теста при $S22L5$, $S22L6$ и $S22L11$, но не и при $S22L3$, $S22L7$ и $S22L11$. При сравнението на културите разлика се открива между $S22L11$ и $S22L3$, $S22L6$ и $S22L14$, спрямо които има по-ниска средна стойност на активната киселинност съответно с 0.24 – 0.27, а според F теста и между $S22L3$ и $S22L7$.

На фигура 4.11 е показано изменението на общата титруема киселинност при развитието на симбиотичните двойки. При инокулирането на млякото, с изключение на $S22L3$ с $19^{\circ}\text{T} \pm 0.7$, симбиотични двойки имат еднаква киселинност: $S22L14 - 18.9^{\circ}\text{T} \pm 0.7$, $S22L7 - 18.7^{\circ}\text{T} \pm 1.07$, $S22L5 - 18.3^{\circ}\text{T} \pm 0.76$, $S22L6 - 18.2^{\circ}\text{T} \pm 0.8$ и $S22L11 - 18.1^{\circ}\text{T} \pm 0.64$.

След тридесет минути термостатиране всички култури повишават слабо киселинността на млякото. Млечната среда с култура $S22L6$ има по-ниска киселинност – $19.8^{\circ}\text{T} \pm 0.8$, следвана от $S22L5 - 20.5^{\circ}\text{T} \pm 0.6$, $S22L14 - 20.2^{\circ}\text{T} \pm 0.6$, $S22L7 - 20.1^{\circ}\text{T} \pm 0.83$, $S22L11 - 20^{\circ}\text{T} \pm 0.63$ и $S22L3 - 21.1^{\circ}\text{T} \pm 0.97$. Между културите няма разлика и изменението през първия половин час е статистически несъществено.



Фиг. 4.11. Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам *St. thermophilus* S22.

На първия час се наблюдава постепенно увеличаване на титруемата киселинност. При $S22L14$ нарастването е с 8°T и стойността е най-висока –

28.5°Т ±4.9. Малко по-ниска е киселинността при *S22L3* – 26.1°Т ±1.8. Култури *S22L5* с 25°Т ±0.63 и *S22L6* с 25.2°Т ±0.8 са със сходна киселинност. Титруемата киселинност е най-ниска при *S22L11* с 24.7°Т ±0.9 и *S22L7* с 23.9°Т ±0.7. Статистическата обработка на данните с F-теста показва съществено изменение на титруемата киселинност от 30min до 1h при *S22L5* и *S22L6*, *S22L7*, *S22L11* и *S22L14*, но не и при *S22L3*. А според t-теста изменението е съществено само при *S22L5* и *S22L6*. При сравняването на културите F-тестът показва съществена разлика между *S22L14* спрямо *S22L5*, *S22L6*, *S22L7* и *S22L11*, но според t-теста статистическа значима е само разликата между *S22L14* и *S22L7*.

На 1.30h най-слабо – 9°Т е нарастването на титруемата киселинност на млякото с *S22L14*, при останалите варира от 10 до 13°Т. При всички култури повишението на титруемата киселинност е статистически значимо. По-висока е титруемата киселинност на млякото със симбиотична двойка *S22L3* – 39.3°Т ±5.3, а най-ниска е с *S22L7* с 34°Т ±1.6. Останалите стартерни култури имат сходна киселинност и по реда на нарастването на стойността са както следва: *S22L14* – 37.4°Т ±7.5, *S22L11* – 37.4°Т ±1.1, *S22L6* – 37.7°Т ±1.7 и *S22L5* – 37.9°Т ±2.2. Статистическа разлика се открива само между *S22L3* и *S22L7*.

На 2-я час от термостатирането изменението при всички култури е статистически значимо и достига максималните си стойности. Най-голямо – 24°Т е изменението и най-висока е стойността на титруемата киселинност при *S22L3* – 63°Т ±7 и *S22L6* – 61.3°Т ±1.8. Нарастване от 21°Т се отчита при *S22L5* с 59.1°Т ±2.2 и *S22L14* с 58.6°Т ±10. Повишение от 19-20°Т при титруемата киселинност има при *S22L7* и *S22L11*, които имат и най-ниска стойност на титруемата киселинност. Култура *S22L11* с 56.7°Т ±2.6 има по-висока титруема киселинност от *S22L7* – 54.6°Т ±3.1. Според t-теста между културите няма разлика, а според F-критерия има само между *S22L3* и *S22L7*.

На 2.30h понижаването на активната киселинност се запазва без промяна единствено при *S22L14*, а при останалите култури намалява с 20% до 40%, но изменението при всички култури е статистически значимо. Най-слабо – 12°Т е изменението при *S22L11* и културата има най-ниска стойност – 69.2°Т ±3.1. Най-висока е стойността на титруемата киселинност при *S22L3* – 82.3°Т ±5.7, *S22L14* – 80.5°Т ±8.7 и *S22L6* – 79.6°Т ±1.3. Изменение от 17-18°Т се наблюдава при културите с по-ниска титруема киселинност:

S22L5 – $76^{\circ}\text{T} \pm 3.8$ и *S22L7* – $72.7^{\circ}\text{T} \pm 5.4$. Култура *S22L11* се различава статистически от *S22L5*, *S22L6*, *S22L14* и *S22L3*, от които има по-ниска титруема киселинност съответно със 7°T , 10°T , 11°T и 13°T . Разлика се открива още между *S22L3* спрямо *S22L5* и *S22L7* и между *S22L14* спрямо *S22L7*.

На 3-я час при повечето култури нарастването на титруемата киселинност намалява до 50% от максимално измереното, но изменението е статистически значимо при всички култури и варира от 6°T до 14°T . Най-висока е титруемата киселинност на млякото с двойка *S22L3* – $96^{\circ}\text{T} \pm 6.6$, следвана от *S22L14* – $93.2^{\circ}\text{T} \pm 7.3$ и *S22L6* – $92^{\circ}\text{T} \pm 2.5$. Култури *S22L5* с $86.7^{\circ}\text{T} \pm 2$ и *S22L7* с $83.3^{\circ}\text{T} \pm 4.4$ се характеризират с повишаване на титруемата киселинност с 10°T . При *S22L11* изменението е най-слабо – 6°T и титруемата киселинност е с най-ниска стойност – $75.6^{\circ}\text{T} \pm 5.2$. Статистическа разлика се открива между *S22L11* и всички останали култури в групата, поради сравнително по-ниската титруема киселинност която има. Култура *S22L7* се различава от *S22L3*, *S22L6*, *S22L11* и *S22L14*. Култури *S22L3* и *S22L14* без да се различават помежду си се отличават от *S22L5* и *S22L7*.

В таблица 4.14 е показано понижаването на активната киселинност на млякото при развитието на симбиотични двойки в състава на които участва *St. thermophilus* S23. Както се вижда от таблицата активната киселинност на млякото непрекъснато намалява при действието на стартерните култури. Началната киселинност на млякото варира от 6.49 до 6.62, но разликата не е статистически съществена като е удовлетворено условието за еднакви начални условия на процеса. Най-ниска е активната киселинност при *S23L3* с $\text{pH}=6.49 \pm 0.24$ и най-висока при *S23L7* с $\text{pH}=6.62 \pm 0.12$. При *S23L5* и *S23L11* активната киселинност е еднаква – 6.59, а съответните грешки на средната са ± 0.21 и ± 0.17 . Култури *S23L6* с 6.51 ± 0.24 и *S23L14* с 6.55 ± 0.28 се различават слабо помежду си.

След 30 минути инкубиране културите понижават статистически значимо активната киселинност на млякото с 0.16 – 0.25 единици. При *S23L7* с 6.46 ± 0.1 активната киселинност остава по-висока. Следват я култури *S23L5* с 6.41 ± 0.14 и *S23L11* с 6.40 ± 0.19 . Другите три култури имат по-ниска активна киселинност. Култура *S23L3* е с най-ниско pH – 6.26 ± 0.15 , а с малка разлика от нея са *S23L6* с 6.28 ± 0.18 и *S23L14* с 6.30 ± 0.18 . Статистическа разлика се открива между *S23L7* в сравнение с *S23L3*, *S23L6* и *S23L14*, както и между *S23L3* и *S23L5*.

Изменението на активната киселинност от 30-та минута до 1-я час е аналогично на изменението при предходният половин час и варира от 0.19

до 0.27 единици. Съществена статистическа разлика се открива само между *S23L7* спрямо *S23L3* и *S23L14* от които има по-висока стойност на рН с 0.17-0.18. Активната киселинност на млякото на 1-я час е сходна при културите: *S23L7* – 6.22 ± 0.1 , *S23L5* – 6.15 ± 0.13 , *S23L11* – 6.13 ± 0.14 , *S23L6* – 6.09 ± 0.3 , *S23L14* – 6.05 ± 0.3 и *S23L3* – 6.04 ± 0.18 .

Таблица 4.14. Изменение на активната киселинност на средата под действието на симбиотични двойки в състава на които участва щам *St. thermophilus* S23 (група 4).

Култура	Активна киселинност, рН						
	При инокулиране	30min	1h	1.30h	2h	2.30h	3h
<i>S23L3</i>	6.49 ± 0.24	6.26 ± 0.15	6.04 ± 0.18	5.70 ± 0.15	5.23 ± 0.5	4.85 ± 0.39	4.60 ± 0.4
<i>S23L5</i>	6.59 ± 0.21	6.41 ± 0.14	6.15 ± 0.13	5.57 ± 0.21	5.04 ± 0.23	4.70 ± 0.2	4.49 ± 0.13
<i>S23L6</i>	6.51 ± 0.24	6.28 ± 0.18	6.09 ± 0.3	5.68 ± 0.16	5.12 ± 0.26	4.78 ± 0.24	4.52 ± 0.19
<i>S23L7</i>	6.62 ± 0.12	6.46 ± 0.1	6.22 ± 0.1	5.65 ± 0.07	5.08 ± 0.04	4.70 ± 0.5	4.51 ± 0.06
<i>S23L11</i>	5.59 ± 0.17	6.40 ± 0.19	6.13 ± 0.14	5.49 ± 0.11	5.02 ± 0.15	4.77 ± 0.15	4.65 ± 0.13
<i>S23L14</i>	6.55 ± 0.28	6.30 ± 0.18	6.05 ± 0.3	5.75 ± 0.14	5.25 ± 0.31	4.85 ± 0.24	4.60 ± 0.32

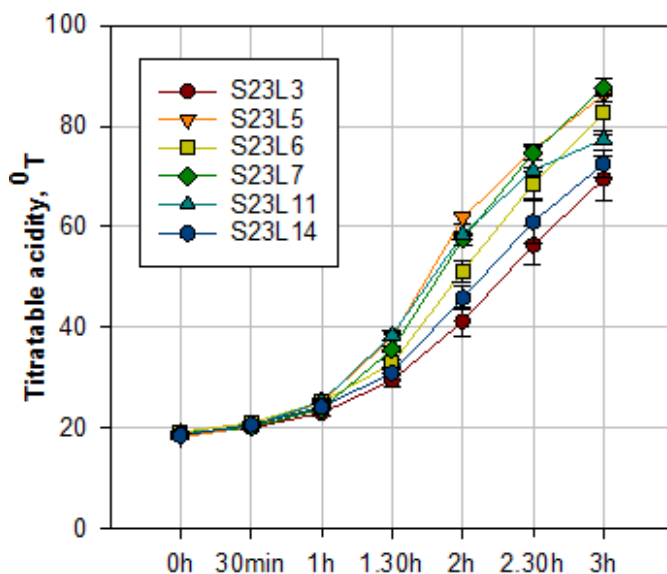
До 1.30h и през следващия половин час от инкубирането културите понижават най-значително активната киселинност на млякото. Изменението с 0.3 единици е най-слабо при култури *S23L3* и *S23L14* и те имат най-високи стойности на активната киселинност. При *S23L3* рН е 5.70 ± 0.15 и при *S23L14* – 5.75 ± 0.14 като *S23L14* се различава статистически от *S23L5*. При култура *S23L11* се наблюдава ускоряване на процеса. Понижението при *S23L11* е най-значително – 0.64 и резултатът е най-ниско рН – 5.49 ± 0.11 . На 1.30h *S23L11* се различава статистически от всички култури с изключение на *S23L5*. Това се дължи на факта, че култура *S23L5* с 5.57 ± 0.21 има малко по-висока активна киселинност от *S23L11*. За разлика от тях при *S23L6* и *S23L7* активната киселинност се приближава към най-високите установени стойности. При култура *S23L6* активната киселинност е 5.68 ± 0.16 и при *S23L7* – 5.65 ± 0.07 .

На 2-я час активната киселинност се понижава отново с 0.47 до 0.57 единици. При *S23L14* с 5.25 ± 0.31 и *S23L3* с 5.23 ± 0.5 стойността на рН е най-висока. За сравнение активната киселинност при *S23L6* е само с 0.1 пониска и е 5.12 ± 0.26 . Активната киселинност се различава незначително между *S23L11* с 5.02 ± 0.15 , *S23L5* с 5.04 ± 0.23 и *S23L7* с 5.08 ± 0.04 . Статистическа разлика се открива само между *S23L11* спрямо *S23L3* и *S23L14* и между *S23L5* и *S23L14*. Прави впечатление, че разлики се откриват само между крайните стойности при установената активна киселинност.

На 2.30h понижението на активната киселинност намалява. Установява се сходство с изменението на рН в интервала от 30-та минута до 1-я час. Изменението през 2-2.30h е от 0.25 до 0.38 единици и има статистическа значимост при всички култури. При *S23L3* и *S23L14* активната киселинност е по-висока в сравнение с останалите култури от групата и съвпада – 4.85, като съответните грешки на средната са: ± 0.39 и ± 0.24 . При *S23L5* и *S23L11* активната киселинност също е еднаква – 4.70. При *S23L6* с рН=4.78 ± 0.24 и *S23L11* с 4.77 ± 0.15 разликата е несъществена. На 2.30h между културите не се открива статистически значима разлика.

На 3-я час понижението на активната киселинност е от 0.12 до 0.26 единици. Най-висока е стойността на активната киселинност при *S23L11* с 4.65 ± 0.13 , *S23L3* с 4.60 ± 0.4 и *S23L14* с 4.60 ± 0.32 . Изменението спрямо предходния час е най-слабо при *S23L11* – 0.12, а при *S23L3* и *S23L14* съвпада – 0.25. Най-ниска е стойността на рН при *S23L5* с 4.49 ± 0.13 . Култури *S23L6* с 4.52 ± 0.19 и *S23L7* с 4.51 ± 0.06 имат както незначителна разлика спрямо *S23L5* така и помежду си. Статистическа разлика се открива само между *S23L11* в сравнение с *S23L5* и *S23L7*. Спрямо предходното измерване статистически значима разлика според F-теста се открива при всички култури с изключение на *S23L11*, а t-теста открива разлика само при *S23L7*.

На фигура 4.12 е представено изменението на титруемата киселинност на мляко в продължение на три часа. Млякото е инокулирано със стартерни култури, в състава на които участва щам *St. thermophilus S23* (група 4). Както се вижда от фигура 12 до първия час титруемата киселинност при културите е почти еднаква, а до 1.30h остава сходна след което в изменението на киселинността се откриват съществени различия.



Фиг. 4.12. Изменение на общата титруема киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на мляко за 3 часа при действието на симбиотични двойки, с участието на щам *St. thermophilus* S23.

При инокулирането на културите млякото има киселинност от 18 до 19°T . По реда на нарастване на титруемата киселинност културите са както следва: S23L5 с $18^{\circ}\text{T} \pm 0.86$, S23L14 с $18.5^{\circ}\text{T} \pm 0.6$, S23L11 с $18.7^{\circ}\text{T} \pm 0.7$, S23L7 с $18.9^{\circ}\text{T} \pm 0.53$, S23L3 с $19^{\circ}\text{T} \pm 0.66$ и S23L6 с $19.2^{\circ}\text{T} \pm 0.79$.

След 30 минути термостатиране титруемата киселинност се изменя незначително и между културите няма статистически значима разлика. При S23L6 титруемата киселинност е малко по-висока – $21^{\circ}\text{T} \pm 0.94$. Другите култури по реда на увеличението на средната стойност на киселинността са както следва: S23L3 с $20^{\circ}\text{T} \pm 0.66$, S23L7 с $20.1^{\circ}\text{T} \pm 0.46$, S23L5 с $20.2^{\circ}\text{T} \pm 0.97$, S23L11 с $20.4^{\circ}\text{T} \pm 1.2$ и S23L14 с $20.7^{\circ}\text{T} \pm 0.86$.

На 1-я час нарастването на титруемата киселинност отново е съвсем слабо. Изменение от $4\text{--}5^{\circ}\text{T}$ спрямо предходното измерване е статистически съществено при S23L5 с $25.1^{\circ}\text{T} \pm 0.5$, S23L6 с $25.2^{\circ}\text{T} \pm 0.43$ и S23L11 с $25.3^{\circ}\text{T} \pm 1.03$. Изменението от $3\text{--}4^{\circ}\text{T}$ при останалите три култури е несъществено. Титруемата киселинност при тях е по-ниска и варира слабо. При S23L3 титруемата киселинност е най-ниска – $23^{\circ}\text{T} \pm 1.76$. С незначителна разлика я следват S23L7 с $23.8^{\circ}\text{T} \pm 0.75$ и S23L14 с $24.2^{\circ}\text{T} \pm 1.4$. Статистическа разлика има между култура S23L3 и S23L7 спрямо S23L5, S23L6 и S23L11.

На 1.30h титруемата киселинност нараства до $40\text{--}60\%$ от максимално измерената и е статистически значима при всички култури с изключение

на *S23L3*. Най-висока е киселинността при *S23L11* с $38.5^{\circ}\text{T} \pm 2.23$ и *S23L5* с $38^{\circ}\text{T} \pm 1.09$. Най-значителното – 13°T нарастване на киселинността се установява при *S23L5* и *S23L11*. Най-ниска е титруемата киселинност при *S23L3* с $29.5^{\circ}\text{T} \pm 3.7$. С незначително по-висока титруема киселинност от *S23L3* са *S23L14* с $31^{\circ}\text{T} \pm 1.76$ и *S23L6* с $32.8^{\circ}\text{T} \pm 2.1$. Култура *S23L7* има междина стойност на титруемата киселинност – $35.7^{\circ}\text{T} \pm 1.44$ и изменение спрямо предходния етап – 12°T . Според F-критерия *S23L7* се различава статистически от всички останали симбиотични двойки в групата, а според t-теста само от *S23L3* и *S23L14*. Симбиотични двойки *S23L5* и *S23L11* се различават от *S23L3*, *S23L6*, *S23L7* и *S23L14* от които имат по-висока титруема киселинност с 3 до 9°T . Култура *S23L3* се различава още от *S23L5*, *S23L6* и *S23L7*. Култура *S23L14* се различава и от *S23L5* и *S23L7*.

На 2-я час повишаването на титруемата киселинност достига максималната си стойност и варира от 12 до 24°T като изменението е статистически значимо при всички култури. Най-висока е титруемата киселинност при *S23L5* с $61.7^{\circ}\text{T} \pm 2.6$, *S23L11* – $58.5^{\circ}\text{T} \pm 1$ и *S23L7* – $57.5^{\circ}\text{T} \pm 3$. Млякото с култура *S23L6* има по-ниска киселинност – $51.2^{\circ}\text{T} \pm 5.5$, следвана от *S23L3* – $41.2^{\circ}\text{T} \pm 7.2$ и *S23L14* – $45.8^{\circ}\text{T} \pm 6$. Култури *S23L3* и *S23L14* се различават от всички други симбиотични двойки, но не и помежду си. Култури *S23L5* и *S23L7* се различават от *S23L3*, *S23L6* и *S23L14*. Симбиотична двойка *S23L6* се различава от всички останали според F-теста и само спрямо *S23L3* и *S23L5* според t-теста. Култура *S23L5* се различава и от *S23L14*.

На 2.30h понижаването на титруемата киселинност намалява, но остава статистически значимо при всички култури. В някои аспекти числените и статистически разлика между тях се запазват почти непроменени от предходното измерване. Най-висока отново е титруемата киселинност на млякото с *S23L5* – $75.2^{\circ}\text{T} \pm 2.4$, *S23L7* – $74.7^{\circ}\text{T} \pm 3.3$ и *S23L11* – $71.2^{\circ}\text{T} \pm 0.9$. По-ниска е титруемата киселинност при *S23L6* – $68.5^{\circ}\text{T} \pm 8$, *S23L14* – $61^{\circ}\text{T} \pm 11.5$ и *S23L3* – $56.3^{\circ}\text{T} \pm 9.8$. Статистическа разлика се открива между култури *S23L5*, *S23L7* и *S23L11* спрямо *S23L3* и *S23L14* които превъзхождат средно с $13-17^{\circ}\text{T}$. Статистическа разлика се открива още и между *S23L3* и *S23L6*.

На 3-я час изменението на титруемата киселинност е статистически значимо при всички култури и варира от 6 до 14°T . Забавянето на процеса е най-значително при култура *S23L11*, при която изменението намалява до 70% от максимално, при *S23L5* и *S23L7* изменението намалява с 40-60%, а

при *S23L3*, *S23L6* и *S23L14* изменението намалява само с 20% от максимално измереното. На 3-я час титруемата киселинност на млякото е най-висока при *S23L7* – $87.6^{\circ}\text{T} \pm 3.7$, *S23L3* – $85.7^{\circ}\text{T} \pm 2.8$ и *S23L6* – $82.7^{\circ}\text{T} \pm 9.16$. По-ниска с 10°T е титруемата киселинност на средата с *S23L11* – $77.4^{\circ}\text{T} \pm 2.2$ и с *S23L14* – $72.5^{\circ}\text{T} \pm 7$, а най-ниска е с *S23L3* – $69.5^{\circ}\text{T} \pm 11.4$. Статистическа разлика се открива между *S23L5* и *S23L7* спрямо *S23L3*, *S23L11* и *S23L14*. Култура *S23L3* се различава от всички симбиотични двойки в групата, които имат по-висока титруема киселинност с изключение на *S23L14*, която я превъзхожда само с 3°T . Култура *S23L14* се различава още от *S23L6* в сравнение с която има по-ниска с 10°T титруема киселинност.

4.3.2.б. Определяне времето на коагулация

Всички симбиотични двойки понижават активната киселинност на 10 % възстановено сухо мляко за не по-малко от 2 часа и не повече от 3 часа. Времето за коагулация е най-кратко при 23% от културите: *S17L6* – $2.20\text{h} \pm 0.19$, *S19L5* – $2.20\text{h} \pm 0.14$, *S19L7* – $2.20\text{h} \pm 0.17$, *S19L14* – $2.21\text{h} \pm 0.15$ и *S22L3* – $2.19\text{h} \pm 0.13$. Коагулационното време е незначително повече при 18% от културите. Към тази група се отнасят: *S17L5* с $2.24\text{h} \pm 0.20$, *S22L5* с $2.26\text{h} \pm 0.13$, *S22L7* с $2.25\text{h} \pm 0.10$ и *S23L5* с $2.24\text{h} \pm 0.18$.

По-голямата част (41%) от културите коагулират млякото за 2.30h, тук се отнасят: *S17L3* – $2.27\text{h} \pm 0.14$, *S17L7* – $2.27\text{h} \pm 0.27$, *S17L11* – $2.27\text{h} \pm 0.10$, *S19L3* – $2.27\text{h} \pm 0.16$, *S19L11* – $2.27\text{h} \pm 0.16$, *S22L11* – $2.30\text{h} \pm 0.08$, *S23L6* – $2.32\text{h} \pm 0.10$, *S23L7* – $2.27\text{h} \pm 0.19$ и *S23L11* – $2.30\text{h} \pm 0.06$. Симбиотичните двойки, които причиняват забавена и силно забавена коагулация на млякото са по 9% от изследваните, така коагулацията се наблюдава няколко минути по-късно при *S22L6* – $2.35\text{h} \pm 0.23$, *S23L3* – $2.37\text{h} \pm 0.14$, а най-удължено е времето на коагулация при *S22L14* – $2.51\text{h} \pm 0.52$ и *S23L14* – $2.59\text{h} \pm 0.44$.

Данните от статистическата обработка са сравнително еднотипни относно времето на коагулация на изследваните симбиотични двойки. Поради по-удълженото си време на коагулация симбиотични двойки *S22L14* и *S23L14*, не се различават помежду си, но се отличават от всички останали изследвани култури. Изключение прави сравнението при *S22L6* и *S22L14*, между които не се открива съществена разлика. Според по-консервативния t-тест съществена статистическа разлика се открива само при сравнението на *S23L14* спрямо *S17L6*, *S19L5*, *S19L7*, *S19L14* и *S22L3*.

4.3.2.в. Установяване на пост-киселинообразуването на създадените симбиотични двойки при хладилно съхранение (4°C) до 21 дни

Установено е, че при съхранението на млечнокиселите продукти в зависимост от вида и активността на използваната стартерна културата и условията на съхранение: температура и продължителност се наблюдава т.нар. пост-киселинообразуване, което е свързано с понижаване на активната киселинност и повишаване количеството на отделената млечна киселина. За да се предотврати изменението на характеристиките на продукта се предпочитат култури, при които пост-киселинообразуването е слабо изразено.

В таблици 4.15, 4.16, 4.17 и 4.18 е представено изменението на активната киселинност на киселото мляко при хладилно съхранение (4°C) до 21-я ден. При всички култури изходната активна киселинност при коагулацията на млякото е $pH=4.7$.

Както се вижда от таблица 4.15 на 7-я ден най-висока е активната киселинност на киселото мляко със стартерни култури *S17L6* – 4.43 ± 0.04 и *S17L3* – 4.40 ± 0.23 . С 0.2 единици е по-ниска активната киселинност с *S17L5* – 4.25 ± 2.5 и с *S17L11* – 4.16 ± 2 , а най-ниска е с *S17L7* – 4.03 ± 0.32 .

На 21-я ден киселото мляко с *S17L6* и *S17L3* отново има най-висока активна киселинност, съответно 4.35 ± 0.16 и 4.33 ± 0.2 . С култура *S17L5* pH е 4.09 ± 2.4 , а при *S17L7* и *S17L11* средната стойност съвпада – 4.04. При култура *S17L5* статистическата обработка показва, че няма съществено изменение на активната киселинност за целия изследвания период. При култури *S17L3*, *S17L6*, *S17L7* и *S17L11* статистически съществено изменение се установява от коагулация до 7-я, но не и от 7-я до 21-я ден.

Таблица 4.15. Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам *St. thermophilus* S17 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.

Стартерна култура	Активна киселинност, pH		
	коагулация	7-и ден	21-и ден
<i>S17L3</i>		4.40 ± 0.23	4.33 ± 0.20
<i>S17L5</i>		4.25 ± 2.50	4.09 ± 2.40
<i>S17L6</i>	4.70	4.43 ± 0.04	4.35 ± 0.16
<i>S17L7</i>		4.03 ± 0.32	4.04 ± 0.19
<i>S17L11</i>		4.16 ± 2.00	4.04 ± 1.80

Таблица 4.16. Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам *St. thermophilus* S19 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.

Стартерна култура	Активна киселинност, pH		
	коагулация	7-и ден	21-и ден
S19L3		4.26 ±0.31	4.13 ±0.21
S19L5		4.24 ±2.00	4.06 ±2.10
S19L7	4.70	4.06 ±0.32	4.04 ±0.32
S19L11		4.18 ±1.90	4.05 ±1.70
S19L14		4.27 ±0.15	4.10 ±0.22

В таблица 4.16 по аналогичен начин е представено изменението на активната киселинност на киселото мляко със стартерни култури, в състава на които участва щам *St. thermophilus* S19. На 7-я ден с най-висока активна киселинност е млякото с култури S19L14, S19L3 и S19L5, съответно с 4.27 ± 0.15 , 4.26 ± 0.31 и 4.24 ± 2.00 . По-ниска е активна киселинност с S19L11 – 4.18 ± 1.9 и S19L7 – 4.06 ± 0.32 .

На 21-я ден по-висока е активната киселинност на продукта с S19L3 – 4.13 ± 0.21 и S19L14 – 4.10 ± 0.22 . Статистическата обработка на резултатите показва разлика в стойностите на pH от коагулация до 7-я ден при всички култури. При S19L14 разлика се установява и между 7-я и 21-я ден.

От таблица 4.17 се вижда, че най-висока е стойността на pH на 7-я ден на продукта с култури S22L3 – 4.34 ± 0.19 и S22L14 – 4.33 ± 0.64 . Активната киселинност е малко по-ниска с S22L6 и S22L5, съответно с 4.26 ± 0.16 и 4.25 ± 1.70 . С култури S22L11 – 4.14 ± 1.30 и S22L7 – 4.08 ± 0.83 киселинността е най-ниска.

На 21-я ден активната киселинност на продукта намалява в реда: S22L3 – 4.22 ± 0.24 , S22L6 и S22L14 – $4.19 (\pm 0.09 \text{ и } \pm 0.90)$, S22L5 – 4.09 ± 1.50 , S22L7 – 4.07 ± 0.06 , S22L11 – 4.02 ± 1.20 . Културите понижават pH от коагулация до 7-я ден и незначително изменят активната киселинност до 21-я ден.

Таблица 4.17. Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам *St. thermophilus* S22 при хладилно му съхранение (4°C) за 21 дни.

Стартерна култура	Активна киселинност, pH		
	коагулация	7-и ден	21-и ден
S22L3		4.34 ±0.19	4.22 ±0.24
S22L5		4.25 ±1.70	4.09 ±1.50
S22L6	4.70	4.26 ±0.16	4.19 ±0.09
S22L7		4.08 ±0.83	4.07 ±0.06
S22L11		4.14 ±1.30	4.02 ±1.20
S22L14		4.33 ±0.64	4.19 ±0.90

В таблица 4.18 са представени данните за изменението на активната киселинност на средата със симбиотични двойки, в състава на които участва *St. thermophilus* S23. На 7-я ден най-висока е активна киселинност с култури S23L6 – 4.32 ±0.09, S23L5 – 4.30 ±2.4, S23L3 и S23L11 – 4.28. Пониска е активната киселинност с S23L14 – 4.24 ±0.9 и с S23L7 – 4.15 ±0.38. От 7-я до 21-я ден понижаването на активната киселинност е от 0.02 до 0.15.

На 21-я ден най-висока е активната киселинност на киселото мляко с S23L6 – 4.24 ±0.13 и с S23L3 – 4.23 ±0.14. Останалите симбиотични двойки в групата се различават незначително по активната си киселинност и в реда с намаляване на pH културите са както следва: S23L5 – 4.15 ±2.4, S23L11 – 4.14 ±1.5, S23L7 и S23L14 – 4.13 и съответни грешки на средната ±0.45 и ±0.06. Статистическата обработка на резултатите в тази група симбиотични двойки показва, че при S23L5 не се открива съществено изменение на активната киселинност за целия изследван период. При култура S23L6 според F-теста статистически значимо е изменението от коагулация до 7-я ден и от 7-я до 21-я ден. При S23L3, S23L7, S23L11 и S23L14 съществено е изменението на активната киселинност от коагулация до 7-я и несъществено от 7-я до 21-я ден.

Таблица 4.18. Изменение на активната киселинност (pH) на кисело мляко, получено при дейността на стартерни култури с участието на щам *St. thermophilus* S23 при хладилно съхранение (4°C) за 21 дни.

Стартерна култура	Активна киселинност, рН		
	коагулация	7-и ден	21-и ден
<i>S23L3</i>		4.28 ±0.17	4.23 ±0.14
<i>S23L5</i>		4.30 ±2.40	4.15 ±2.40
<i>S23L6</i>	4.70	4.32 ±0.09	4.24 ±0.13
<i>S23L7</i>		4.15 ±0.38	4.13 ±0.45
<i>S23L11</i>		4.28 ±1.80	4.14 ±1.50
<i>S23L14</i>		4.24 ±0.90	4.13 ±0.06

Обобщението на данните за активната киселинност показва, че според двата статистически теста при култури *S17L5* и *S23L5* няма съществено изменение на рН за целия изследван период. Според двата теста изменението на рН от коагулация до 7-я ден е съществено при симбиотични двойки *S19L14* и *S23L6*, а според F-теста единствено при тези култури е съществено и понижението на рН от 7-я до 21-я ден. Според F-теста при останалите култури през първата седмица от хладилното съхранение активната киселинност се понижава статистически значимо при култури *S17L3*, *S17L6*, *S17L7*, *S17L11*, *S19L3*, *S19L7*, *S19L11*, *S22L3*, *S22L5*, *S22L6*, *S22L7*, *S22L11*, *S22L14*, *S23L3*, *S23L6*, *S23L7*, *S23L11*, *S23L14*, но според t-теста разликата не е значима при *S17L11*, *S19L11*, *S22L5* и *S23L11*.

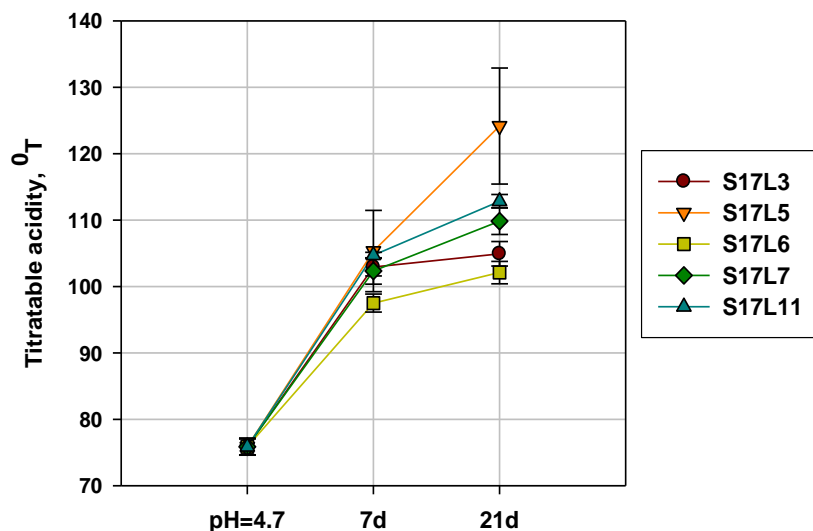
При сравнението на културите по-консервативния t-тест не открива никакви разлики между културите на 7-я ден. На 21-я ден тестът открива съществена разлика само между *S19L5* спрямо *S17L3* и *S17L6*, от които има по-ниско рН с 0.27 и 0.29 единици.

На фигури 4.13, 4.14, 4.15 и 4.16 е показано изменението на титруемата киселинност при хладилното съхранение на кисело мляко, получено при дейността на разпределените в четири групи симбиотични двойки. При всички симбиотични двойки средната стойност на титруемата киселинност на млякото при рН=4.7 е 76.9°Т ±1.7. От фигурите се вижда, че при всички култури от коагулация до 7-я ден се наблюдава аналогична крива на нарастване на титруемата киселинност. На 7-я ден титруемата киселинност при културите варира от 94.3°Т до 111.9°Т. Различията във хода на изменение на киселинността в отделните групи ясно се виждат от 7-я ден до 21-я ден. На 21-я ден титруемата киселинност при симбиотичните двойки е в границите от 99.7°Т до 127.8°Т.

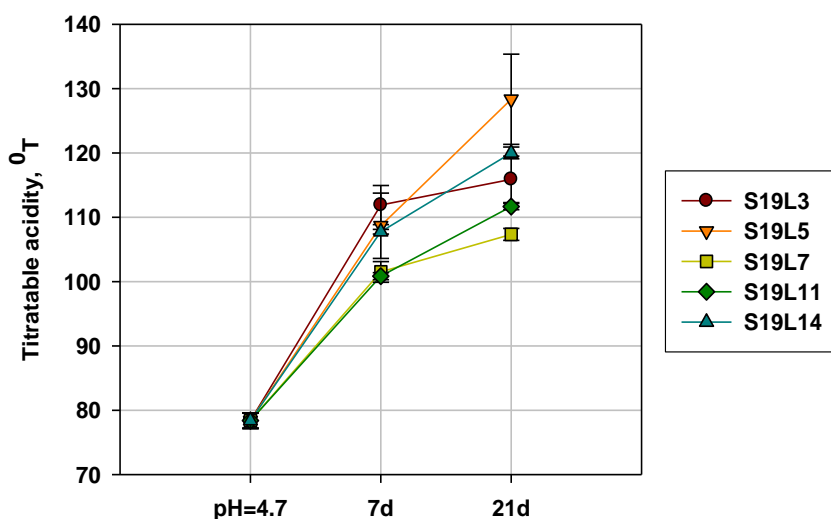
На фигура 4.13 е показана пост-киселинообразуващата способност на симбиотични двойки *S17L3*, *S17L5*, *S17L6* и *S17L11*. На 7-я ден най-ниска титруема киселинност има *S17L6* с $97.5^{\circ}\text{T} \pm 3$. Останалите култури се различават слабо помежду си и по нарастване на титруемата киселинност са както следва: *S17L7* – $102.3^{\circ}\text{T} \pm 5.1$, *S17L3* – $103^{\circ}\text{T} \pm 3$, *S17L11* – $104.7^{\circ}\text{T} \pm 1$ и *S17L5* – $105^{\circ}\text{T} \pm 3$.

На 21-я ден най-висока е титруемата киселинност на киселото мляко с *S17L5* – $124.2^{\circ}\text{T} \pm 22.4$. С 10°T е по-ниска титруемата киселинност с *S17L11* – $112.8^{\circ}\text{T} \pm 2.6$, а най-ниска с *S17L7* – $109.8^{\circ}\text{T} \pm 5.2$, *S17L3* – $105^{\circ}\text{T} \pm 4$ и *S17L6* – $102^{\circ}\text{T} \pm 3.7$.

На фигура 15 се вижда, че на 7-я ден най-ниска е титруема киселинност на продукта с *S19L11* – $100.8^{\circ}\text{T} \pm 1.4$ и *S19L7* – $101.5^{\circ}\text{T} \pm 4$. С $8\text{-}10^{\circ}\text{T}$ е по-висока титруемата киселинност при стартерни култури: *S19L14* – $107.8^{\circ}\text{T} \pm 0.87$, *S19L5* – $108.7^{\circ}\text{T} \pm 13$ и *S19L3* – $111.9^{\circ}\text{T} \pm 7$.



Фиг. 4.13. Изменение на титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва шам *St. thermophilus* *S17*, при съхранение 4°C за 21 дни.

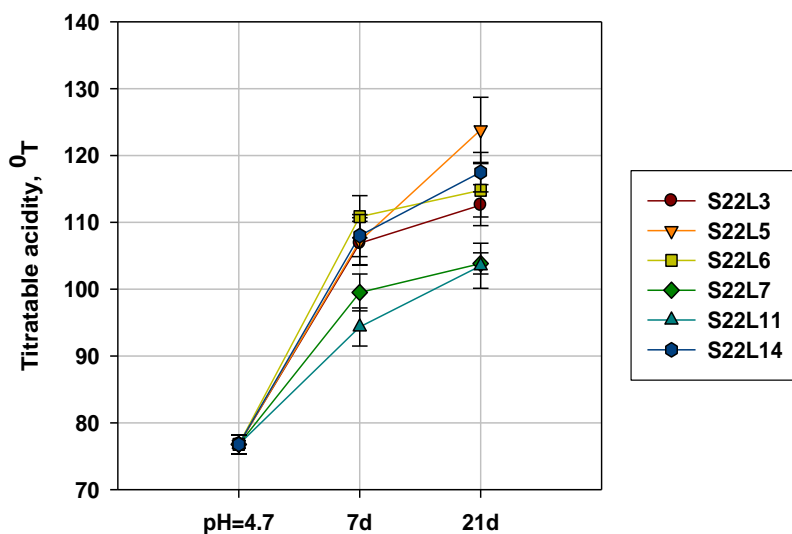


Фиг. 4.14. Изменение на титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва шам *St. thermophilus* S19, при съхранение 4°C за 21 дни.

На 21-я ден най-висока е титруемата киселинност с култура S19L5 – $128.3^{\circ}\text{T} \pm 18$, следвана от S19L14 с $120^{\circ}\text{T} \pm 2.1$. По-ниска е титруемата киселинност с S19L3 – $115.9^{\circ}\text{T} \pm 8.3$, S19L11 – $111.7^{\circ}\text{T} \pm 1.3$ и S19L7 – $107.3^{\circ}\text{T} \pm 2.4$.

От фигура 4.15 се вижда, че най-ниска е титруемата киселинност на киселото мляко с S22L11 – $94.3^{\circ}\text{T} \pm 7.3$ и S22L7 – $99.5^{\circ}\text{T} \pm 7.1$. С 10°T повече и по реда на нарастването с $1\text{-}2^{\circ}\text{T}$ помежду си са останалите култури: S22L3 – $106.8^{\circ}\text{T} \pm 8$, S22L5 – $107^{\circ}\text{T} \pm 9$, S22L14 – $108^{\circ}\text{T} \pm 8.1$ и S22L6 – $110^{\circ}\text{T} \pm 6.9$.

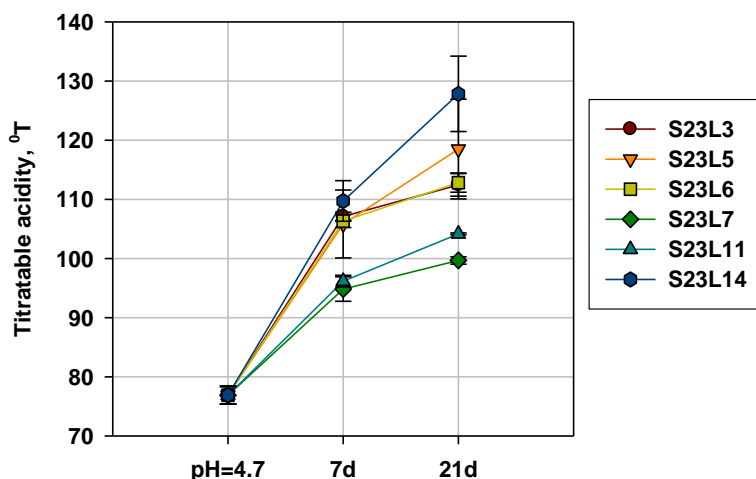
На 21-я ден най-ниска е стойността на титруемата киселинност при S22L11 с $103.5^{\circ}\text{T} \pm 8.7$ и S22L7 – $103.8^{\circ}\text{T} \pm 10$. Култури S22L7 и S22L6 имат сходна крива на повишението на титруемата киселинност, но поради по-високата си стойност на 7-я ден S22L6 се нарежда сред умерените пост-киселинообразуватели в групата. Такива култури са S22L3 с $112.6^{\circ}\text{T} \pm 7$, S22L6 с $114.8^{\circ}\text{T} \pm 9.2$ и S22L14 с $117.5^{\circ}\text{T} \pm 7.6$. Най-висока е титруемата киселинност при S22L5 с $123.8^{\circ}\text{T} \pm 12.5$.



Фиг. 4.15. Изменение на титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам *St. thermophilus* S22, при съхранение 4°C за 21 дни.

От фигура 4.16 се вижда, че при пост-киселинообразуването на културите в групата има отчетливи различия. На 7-я ден най-ниска е титруемата киселинност на млечнокиселия продукт с *S23L7* – $94.8^{\circ}\text{T} \pm 5.3$ и *S23L11* – $96.2^{\circ}\text{T} \pm 2.5$. С по-висока киселинност, но по аналогичен начин с малка разлика помежду си са *S23L5* – $105.6^{\circ}\text{T} \pm 14.7$, *S23L6* – $106.3^{\circ}\text{T} \pm 2.8$ и *S23L3* – $107^{\circ}\text{T} \pm 1.6$. Киселото мляко с култура *S23L14* има най-висока титруема киселинност – $109.7^{\circ}\text{T} \pm 8.4$.

На 21-я ден отново най-ниска е титруемата киселинност с *S23L7* – $99.7^{\circ}\text{T} \pm 1.6$ и *S23L11* – $104.2^{\circ}\text{T} \pm 0.4$. С $10-15^{\circ}\text{T}$ е по-висока титруемата киселинност при *S23L3* – $112.4^{\circ}\text{T} \pm 4.4$, *S23L6* – $112.8^{\circ}\text{T} \pm 4.2$ и *S23L5* – $118.5^{\circ}\text{T} \pm 21.7$. Най-висока е титруемата киселинност с *S23L14* – $127.8^{\circ}\text{T} \pm 16.4$.



Фиг. 4.16. Изменение на титруемата киселинност (°Т) на кисело мляко, получено със стартерни култури, в които участва щам *St. thermophilus* S23, при съхранение 4°C за 21 дни.

Обработката на данните показва, че при 45% от културите съществена статистическа разлика се открива при титруемата киселинност на двата етапа на изследването: 1) между коагулация и 7-я ден и 2) между 7-я ден и 21-я ден. При 55% от културите съществена статистическа разлика се открива както между коагулация и 7-я ден, така и между коагулация и 21-я ден, но не и между 7-я и 21-я ден.

На 7-я ден по-строгият тест открива разлика при сравнението на *S19L3* и *S22L6* спрямо *S17L6*, *S22L11*, *S23L7* и *S23L11*. Култури *S19L3* и *S22L6* показват средно с 15°Т по-висока титруема киселинност. Данните от t-теста не показват други съществени разлики между останалите култури.

На 21-я ден t-теста открива съществени различия в стойностите на титруемата киселинност между *S19L5* и *S23L14* в сравнение с *S17L3*, *S17L6*, *S22L7*, *S22L11*, *S23L7* и *S23L11*. Култури *S19L5* и *S23L14* имат средно с 25°Т по-висока титруема киселинност в сравнение с *S17L3*, *S17L6*, *S22L7*, *S22L11*, *S23L7* и *S23L11*. Култура *S19L14* има по-висока с 18-20°Т титруема киселинност и статистически значимо се различава от *S23L7* и *S17L6*. Симбиотични двойки *S17L5* и *S22L5* имат по-висока с 22°Т титруема киселинност и съществено се различават спрямо *S17L3*, *S17L6* и *S23L7*.

По време на съхранението от 21 дни при всички стартерни култури се наблюдава понижаване на активната киселинност и повишаване на отделената млечна киселина. Според Martin и сътр. (1999, а) наблюдавано явление е свързано с високата инкубационна температура (45°C), по-бавното и продължително охлаждане на средата и по-изразената при тези условия бактериална активност, която вероятно се запазва с часове след термостабирането.

Киселото мляко, получено от действието на изследваните 22 култури и съхранявано при 4°C за 1 седмица се характеризира със следните показатели: активна киселинност (рН) – от 4.34 до 4.02 и титруема киселинност (преизчислена в % млечна киселина) – от 0.85% до 1%. Представените данни са аналогични на получените от Laye и сътр. (1993), които установяват рН на млякото от 4.37 до 4.20 и млечна киселина от 0.94% до 1.30%. Съответствие има и с резултатите на Oliveira и кол. (2002) които показват, че най-съществено рН се понижава през първата седмица на съхранението, след което се изменя слабо и до 28 дни достига рН=4.26. За разлика от данните на Adhikari и сътр. (2003), които констатират рН 4.40-4.42 на 15-я ден от съхранение при 4.4°C, представените и настоящето изследване симбиотични двойки показват по-ниски стойности на рН на 14-я ден.

4.3.2.2. *Определяне на преживяемостта на компонентите на симбиотичните двойки при хладилно съхранение (4°C) за период от 7 дни*

За благоприятният ефект на киселото мляко върху храносмилателната система важно значение има количеството на живата микрофлора при консумацията му. Известно е, че на 24-я час от получаването си компонентите на закваската на киселото мляко достигат максимален брой и по време на хладилното съхранение постепенно намаляват. Поради това броя на микроорганизмите в стартерната култура е изследван на 24-я час от получаването на киселото мляко и след едноседмично хладилно съхранение.

От създадените 22 симбиотични двойки промените в компонентите на стартерните култури са изследвани при 45% от комбинациите. Избраните за изследването комбинации съдържат щамове *L. bulgaricus* L6 и L14, които имат най-висока преживяемост при киселинни условия и най-висок брой микроорганизми в киселинно третирано мляко. За сравнение са изследвани и комбинациите на щам *L. bulgaricus* L3, който е представител на щамовете

с по-ниска преживяемост при киселинни условия, но има най-кратко време на коагулация и се различава по пост- и пределното си киселинообразуване.

В таблица 4.19 са представени данните за изменението на живите клетки на щамовете *St. thermophilus*, които участват в стартерни култури *S17L3*, *S17L6*, *S19L3*, *S19L14*, *S22L3*, *S22L6*, *S22L14*, *S23L3*, *S23L6* и *S23L14*. Очевидно е, че на 24-я час всички стартерни култури показват значителен брой живи клетки. Най-висок е броя на колонообразуващите единици на *St. thermophilus* в киселото мляко със симбиотична двойка *S19L14* – 5.50×10^{17} , следвана от *S22L3* – 4.90×10^{17} , *S23L6* – 4.75×10^{17} и *S22L14* – 4.65×10^{17} CFU/ml. Сходен е броя на микрофлората при двойки *S17L3* – 3.35×10^{17} , *S17L6* – 3.05×10^{17} , *S22L6* – 3×10^{17} и *S19L3* – 2.96×10^{17} CFU/ml. Най-нисък е броя при *S23L14* – 1.20×10^{17} и *S23L3* – 1.25×10^{17} CFU/ml. Статистическата обработка на данните показва, че на 24-я час между културите няма съществена разлика в броя на жизнеспособните клетки на *St. thermophilus*.

След едноседмично съхранение при хладилни условия най-висок е броя на *St. thermophilus* в закваски *S22L14* – 2.45×10^{17} , *S22L3* – 2.15×10^{17} , *S17L6* – 1.35×10^{17} и *S22L6* – 1.70×10^{17} CFU/ml. Малко по-нисък е броят на *St. thermophilus* в киселото мляко с култура *S19L3* – 2.85×10^{16} CFU/ml. По-нисък с 2 логаритъма е броят *St. thermophilus* при култури *S23L6* – 8.65×10^{15} , *S17L3* – 7.55×10^{15} , *S19L14* – 6.2×10^{15} и *S23L14* – 3.4×10^{15} , а най-нисък при *S23L3* – 7.65×10^{14} CFU/ml. Статистическата обработка на данните с по-строгия t-тест показва, че съществена разлика се открива между културата с най-нисък брой стрептококи – *S23L3* спрямо симбиотични двойки *S17L6*, *S22L3*, *S22L6*, *S22L14* и *S23L6*. Сравнението между броя на *St. thermophilus* на 24-я час и на 7-я ден показва съществено намаляване на клетките само при култури *S17L3*, *S19L14*, *S23L3*, *S23L14*, въпреки че в споменатите случаи преживяемостта на клетките е ~90%.

Таблица 4.19. Изменение на броя на активните клетки на *St. thermophilus* в стартерните култури при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко до 7 дни.

Стартерна култура	<i>Streptococcus thermophilus</i>			
	24-и час		7-и ден	
	CFU/ml	log ₁₀ CFU/ml	CFU/ml	log ₁₀ CFU/ml
<i>S17L3</i>	3.35x10 ¹⁷	17.52±0.80	7.55x10 ¹⁵	15.86±0.7
<i>S17L6</i>	3.05x10 ¹⁷	17.48±1.00	1.35x10 ¹⁷	16.83±7.1
<i>S19L3</i>	2.96x10 ¹⁷	17.47±0.83	2.85x10 ¹⁶	16.38±3.8
<i>S19L14</i>	5.50x10 ¹⁷	17.74±0.70	6.20x10 ¹⁵	15.78±1.0
<i>S22L3</i>	4.90x10 ¹⁷	17.59±3.80	2.15x10 ¹⁷	17.31±1.5
<i>S22L6</i>	3.00x10 ¹⁷	17.47±0.60	1.70x10 ¹⁷	17.21±1.3
<i>S22L14</i>	4.65x10 ¹⁷	17.46±5.72	2.45x10 ¹⁷	17.27±4.3
<i>S23L3</i>	1.25x10 ¹⁷	16.79±7.75	7.65x10 ¹⁴	14.73±4.7
<i>S23L6</i>	4.75x10 ¹⁷	17.39±7.05	8.65x10 ¹⁵	16.82±4.2
<i>S23L14</i>	1.20x10 ¹⁷	17.01±3.10	3.40x10 ¹⁵	15.45±3.2

В таблица 4.20 е представен броя на жизнеспособните клетки *L. bulgaricus* на стартерната култура на 24-я час и на 7-я ден. На 24-я час културите имат от 10¹⁰ до 10¹¹ клетки на *L. bulgaricus*. По-голям е броят на колонообразуващите единици на *L. bulgaricus* при стартерни култури *S22L6* – 6.60x10¹¹, *S22L14* – 5.60x10¹¹, *S19L14* – 5.50x10¹¹, *S22L3* – 4.22x10¹¹CFU/ml. Малко по-нисък е броя на *L. bulgaricus* в млякото с култури *S23L14* – 2.81x10¹¹, *S23L3* – 2.41x10¹¹, *S23L6* – 2.27x10¹¹ и *S17L6* – 1.79x10¹¹ CFU/ml. Най-нисък е броя на *L. bulgaricus* при симбиотични двойки *S17L3* – 4.04x10¹⁰ и *S19L3* – 3.15x10¹⁰CFU/ml.

Според F-теста на 24-я час разлика се открива само между *S19L14* спрямо *S17L3* и *S19L3*, както и между *S22L6* и *S19L3*. По-строгий статистически тест не открива съществена разлика между броя на *L. bulgaricus* при отделните култури.

При хладилно съхранение на киселото мляко до 1 седмица културите показват несъществено числено и статистическо намаляване на броя на *L. bulgaricus* в стартерната култура. Трябва да се отбележи, че най-ниската преживяемост е не по-малко от 88%, а при закваски *S19L14*, *S22L3*, *S22L6*, *S22L14*, и *S23L14* преживяемостта е над 97%. По-висок е броя на клетките *L. bulgaricus* при култури *S22L6* – 2.07x10¹¹, *S22L3* – 2.01x10¹¹, *S23L14* – 1.95x10¹¹, *S23L3* – 1.61x10¹¹ и *S22L14* – 1.05x10¹¹ CFU/ml. Незначително

по-нисък е броя на *L. bulgaricus* при симбиотични двойки *S17L6* – 5.03×10^{10} , *S19L14* – 3.70×10^{10} , *S19L3* – 1.75×10^{10} , *S23L6* – 1.17×10^{10} и *S17L3* – 1.05×10^{10} CFU/ml. Статистическите тестове не откриват съществена разлика в броя на клетките *L. bulgaricus* между отделните култури на 7-я ден.

Таблица 4.20. Изменение на броя на активните клетки на *L. bulgaricus* в стартерните култури при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко до 7 дни.

Стартерна култура	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>			
	24-и час		7-и ден	
	CFU/ml	log ₁₀ CFU/ml	CFU/ml	log ₁₀ CFU/ml
<i>S17L3</i>	4.04×10^{10}	10.61 ± 0.76	1.05×10^{10}	9.95 ± 3.20
<i>S17L6</i>	1.79×10^{11}	11.17 ± 3.60	5.03×10^{10}	10.36 ± 7.80
<i>S19L3</i>	3.15×10^{10}	10.49 ± 1.90	1.75×10^{10}	10.23 ± 0.44
<i>S19L14</i>	5.50×10^{11}	11.73 ± 0.95	3.70×10^{10}	11.06 ± 7.05
<i>S22L3</i>	4.22×10^{11}	11.53 ± 3.70	2.01×10^{11}	11.24 ± 2.90
<i>S22L6</i>	6.60×10^{11}	11.58 ± 6.20	2.07×10^{11}	11.24 ± 3.40
<i>S22L14</i>	5.60×10^{11}	11.46 ± 3.90	1.05×10^{11}	11.01 ± 0.70
<i>S23L3</i>	2.41×10^{11}	11.00 ± 8.40	1.61×10^{11}	10.48 ± 12.9
<i>S23L6</i>	2.27×10^{11}	11.23 ± 4.40	1.17×10^{10}	9.99 ± 2.70
<i>S23L14</i>	2.81×10^{11}	11.43 ± 1.60	1.95×10^{11}	11.26 ± 1.90

Незначителното изменение в броя на компонентите на изследваните стартерни култури е в съответствие с данните получени за култури за кисело мляко изследвани в ЦЕПЛ (Кондратенко, 1985) и данните получени от Adhikari и сътр. (2003) и Oliveira и сътр. (2002).

Една от важните характеристики на стартерната култура е съотношението между компонентите. Според изискванията към стартерните култури за българско кисело мляко съотношението *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* трябва да е от 3:1 до 5:1 в полза на стрептококовия компонент на закваската (Кондратенко и сътр., 1983), докато при изследваните култури съотношението *St. thermophiles*:*L. bulgaricus*: (S/L) е 1.5:1 до 1.7:1 и не се променя при хладилното съхранение. Съотношението S/L, което е ~1 при изследваните култури според Laye и сътр. (1993) е оптималното съотношение, за да се получи максимално ароматообразуване и добра консистенцията на киселото мляко.

4.3.3. *Органолептична оценка на киселото мляко, получено при ферментацията от създадените стартерни култури*

Под действието на изследваните 22 култури се получава ферментирал продукт с ясно изразен млечнокисел вкус и характерен млечнокисел аромат. Културите коагулират млякото с получаването на гладък коагулум, при разрушаването на който синерезиса е умерен, липсва провлачване и ослизвяване, не се наблюдават пресечки или парцалести образувания. Продължителното хладилно съхранение (21 дни) на киселото мляко, получено при дейността на културите не показва вгорчаване и отклонения от характерния млечнокисел вкус и аромат.

В резултат на проведените изследвания могат да се направят следните изводи:

- При комбинирането на подбрани щамове *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* са получени 22 симбиотични двойки.
- При термостатирането си в мляко за 3 изследваните симбиотични двойки се подчиняват на обща закономерност с конкретен числов израз на всеки един етап от изследването.
- От изследваните симбиотични двойки 41% коагулират млякото за по-малко от 2.30h, 41% коагулират млякото за 2.30h, 18% коагулират млякото за повече от 2.30h. По-консервативния статистически t-тест показва съществена статистическа разлика при сравняването на времето на коагулация при симбиотична двойка *S23L14* спрямо *S17L6*, *S19L5*, *S19L7*, *S19L14* и *S22L3*.
- Обобщението на данните за активната киселинност показват, че 9% от културите не показват съществено изменение на рН за целия изследван период, а 9% имат съществено понижение на активната киселинност от коагулация до 7-я ден и от 7-я до 21-я ден. През първата седмица от хладилното съхранение активната киселинност се понижава статистически значимо при 90% от симбиотичните двойки. При сравнението на културите по-консервативния t-тест не открива никакви разлики между културите на 7-я ден. На 21-я ден тестът открива съществена разлика само между *S19L5* спрямо *S17L3* и *S17L6*, от които има рН по-ниско с 0.27 и 0.29 единици.
- При създадените 22 симбиотични двойки средната стойност на титруемата киселинност на млякото при рН=4.7 е 76.9°Т ±1.7.

При всички култури от коагулация до 7-я ден се наблюдава аналогична крива на нарастване на титруемата киселинност при хладилното им съхранение. На 7-я ден титруемата киселинност при културите варира от 94.3°Т до 111.9°Т и на 21-я ден от 99.7°Т до 127.8°Т.

- Избраните за изследване стартерни култури *S17L3*, *S17L6*, *S19L3*, *S19L14*, *S22L3*, *S22L6*, *S22L14*, *S23L3*, *S23L6* и *S23L14* показват значителен брой живи клетки на 24-я час. Най-висок е броя на колонообразуващите единици на *St. thermophilus* при *S19L14* – 5.50×10^{17} и най-нисък при *S23L14* – 1.20×10^{17} и *S23L3* – 1.25×10^{17} CFU/ml. В състава на изследваните симбиотични двойки клетките на *St. thermophilus* имат преживяемост над 90% при хладилно съхранение за срок от 7 дни.
- На 24-я час в симбиотичните двойки се установяват от 10^{10} до 10^{11} CFU/ml клетки на *L. bulgaricus*. По-строгий статистически тест не открива съществена разлика между броя на *L. bulgaricus* при изследваните симбиотични двойки. Изследваните симбиотични двойки показват числено и статистически незначително намаляване на броя на клетките на *L. bulgaricus* в стартерната култура до 7-я ден хладилно съхранение. Най-ниската преживяемост е не по-малко от 88%, а при пет закваски е над 97%. Статистическите тестове не откриват съществена разлика в броя на клетките *L. bulgaricus* между отделните култури на 7-я ден.
- При ферментацията на млякото със симбиотичните двойки се получава кисело мляко с типична органолептика.

4.4. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ПЕКТИН ВЪРХУ ОСНОВНИ ТЕХНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПОЛУЧАВАНЕТО НА КИСЕЛО МЛЯКО

От изследваните 22 симбиотични двойки са подбрани две стартерни култури, които се изследват при получаването на кисело мляко, което съдържа различни концентрации пектин. За опитите са избрани стартерни култури *S17L6* и *S19L14*. Изборът им е обоснован по няколко причини. Щамове *L. bulgaricus* *L6* и *L14* имат най-висока процентна преживяемост и най-много колонообразуващи единици в киселинно третирано мляко. Щамовете притежават умерено пределно и пост-киселинообразуване и добро време на коагулация на млякото. Поради фактът, че между изследваните

щамове *St. thermophilus* не се открива съществена разлика и само органолептичната оценка показва по-добре изразен аромат при *S17* и *S19* под внимание са взети техните комбинации. Симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* имат висока ферментационно активност и понижават рН до 4.39-4.45 при $45 \pm 2^\circ\text{C}$ за 3 часа. Културите имат кратко време на коагулация на млякото, ниска и средна киселинообразуваща способност, висок изходен брой на компонентите на стартерната култура на 24-и час и висока преживяемост при хладилно съхранение за период от 7 дни. Началните етапи на изследванията са проведени с култура *S19L14*, която показва по-добре запазена активност при киселинни условия.

4.4.1. Определяне на оптималната концентрация пектин за получаване на кисело мляко

4.4.1.a. Изследване на ферментационната активност

Данните за изменението на активната киселинност при дейността на стартерна култура *S19L14* в млечна среда, която съдържа пектин в концентрации от 0.20% до 1% са представени в таблица 4.21. Изходната активна киселинност на стерилното мляко преди добавянето на пектина е 6.57 ± 0.01 . При добавянето на пектина в млякото понижението в стойността на активната киселинност е в съответствие с нарастването на използваната концентрация. Най-висока е активната киселинност при вариант с 0.20% – 6.39 ± 0.03 и 0.40% – 6.34 , следвани от вариант с 0.60% – 6.24 ± 0.03 , с 0.80% – 6.18 ± 0.04 и с 1% – 6.11 ± 0.03 . При варианти с 0.20% и 0.40% активната киселинността, която се отчита е аналогична на киселинността, която има мляко инокулирано със стартерна култура, но след 30 минутно инкубиране.

Статистическата обработка на резултатите показва, че активната киселинност на млякото се изменя съществено при прибавянето на пектин в концентрации от 0.20% до 1%. Анализът с F-теста показва статистическа значима разлика в стойностите на рН между всички варианти, а при използването на t-теста прави впечатление формирането на двойки: едната между варианти с 0.20% и 0.40% , а втората с 0.60% и 0.80%, които се различават от другите варианти, но не и помежду си. Вариантът с 1% пектин е изключение, защото статистически се различава от всички останали.

Таблица 4.21. Изменение на активната киселинност (рН) на мляко с пектин, при действието на симбиотична двойка *S19L14*.

Вариант		Активна киселинност, рН				
Стартерна култура	Съдържание на пектин, %	Мляко+ Пектин	1h	2h	2.30h	3h
<i>S19L14</i>	0.20	6.39	5.90	4.86	4.52	4.30
		±0.03	±0.1	±0.08	±0.07	±0.05
	0.40	6.34	5.83	4.83	4.49	4.29
		±0.04	±0.16	±0.12	±0.1	±0.07
	0.60	6.24	5.79	4.96	4.55	4.37
		±0.03	±0.14	±0.24	±0.1	±0.11
	0.80	6.18	5.74	4.93	4.61	4.48
		±0.04	±0.16	±0.18	±0.1	±0.14
	1.00	6.11	5.65	4.79	4.48	4.31
		±0.03	±0.12	±0.11	±0.08	±0.1

Изменението на активната киселинност на млякото с пектин на първия час, варира от 0.44 до 0.51, което не се различава съществено от изменението на рН в мляко, при действието на стартерна култура без присъствието на пектин. На 1-я час най-ниска е активната киселинност при вариант с 1% пектин – 5.65 ± 0.12 , следван от 0.80% – 5.74 ± 0.16 и от 0.60% – 5.79 ± 0.14 . С най-висока активна киселинност са варианти с 0.40% и с 0.20%, съответно – 5.83 ± 0.16 и 5.90 ± 0.1 . Според F-теста статистическа разлика на 1-я час се открива между варианти с 0.20% и 0.40% спрямо вариант с 1% пектин като средната разлика на активната киселинност между тях е 0.25 и 0.18. Статистическа разлика се открива и между активната киселинност на мляко с 0.20% и 0.80%. Според по-консервативния тест на 1-я час статистически съществена е само разликата на рН между варианти с 0.20% и 1% пектин.

От 1-я до 2-я час на термостатирането се забелязва най-значителното (0.81 – 1.04) изменение на активната киселинност. Най-ниска е активната киселинност на млякото с 1% пектин – 4.79 ± 0.11 , следван от 0.40% – 4.83 ± 0.12 и 0.20% – 4.86 ± 0.08 . Най-висока е активната киселинност при варианти с 0.80% – 4.93 ± 0.18 и с 0.60% – 4.96 ± 0.24 пектин. На 2-я час статистическата обработка на данните не показва съществена разлика между вариантите.

След 2.30 часа от развитието на културата активната киселинност е най-ниска при варианти с 1% пектин – 4.48 ± 0.08 и при 0.40% – 4.49 ± 0.1 . Активната киселинност е сходна при варианти с 0.20% с 4.52 ± 0.07 и с 0.60% – 4.55 ± 0.1 и най-висока при вариант с 0.80% пектин – 4.61 ± 0.1 . Докато според t-теста между културите няма разлика, според F-теста варианта с най-висока активна киселинност – 0.80% пектин съществено се различава от вариантите с най-ниска стойност – 0.40% и 1%.

От 2-я до 2.30 часа и от 2.30 до 3-я час от инкубирането стартерната култура продължава плавно да понижава активната киселинност при всички варианти. От 2-я до 2.30 часа при варианти с 0.20% и 0.40% изменението е не повече от 33-34% от максимално измереното, а при варианти с 0.60%, 0.80% и 1% пектин достига до 40-50%. От 2.30 часа до 3-я час изменението при всички варианти не превишава 21% от максимално измереното.

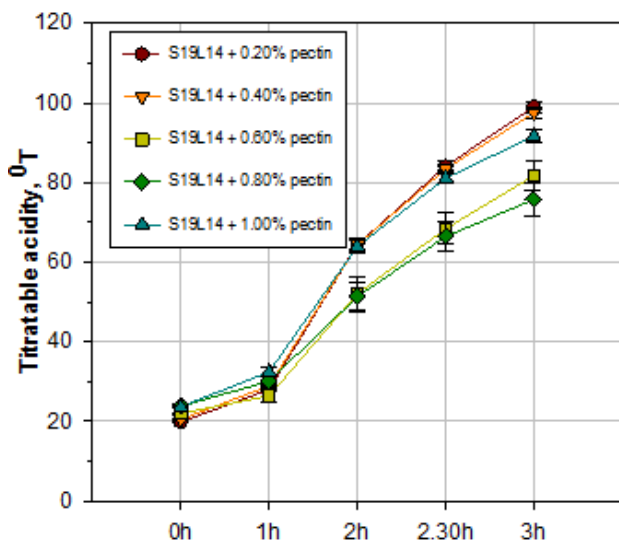
На 3-я час най-ниска е активната киселинност при варианти с 0.40%, 0.20% и 1% пектин, като съответните стойности на рН са 4.29 ± 0.07 , 4.30 ± 0.05 и 4.31 ± 0.1 . При варианти с 0.60% с 0.80% пектин киселинността е най-висока – 4.37 ± 0.11 и 4.48 ± 0.14 . Статистическата обработка с F-теста показва разлика между вариант с 0.80% пектин и всички останали, а t-тестът открива същите разлики с изключение на сравнението между вариант 0.80% и 0.60% пектин.

Общият ход на изменението на активната киселинност в мляко, което съдържа пектин в изследваните концентрации е в съответствие със способността на стартерната култура да понижава рН при развитието си в мляко без добавки. Не се открива съществена статистическа разлика и в тенденцията на понижаването на активната киселинност при изследваните варианти. Получените резултати са в съответствие с данните на Ferniez-García и сътр. (1998). Авторите установяват, че добавените в млякото хранителни фибри влияят несъществено върху ферментационното време и изменението на активната киселинност.

На фигура 4.17 е показано изменението на титруемата киселинност на мляко, след прибавянето на пектин при развитието на стартерна култура *S19L14*.

Титруемата киселинност на възстановено стерилно мляко без пектин е 18-20°Т. В по-долу представените данни като изходна титруема киселинност е използвана титруемата киселинност след прибавянето на пектина в

определените концентрации. Според F- и t-теста не се наблюдава статистически съществена разлика на титруемата киселинност при млякото без и с пектин единствено при вариант с концентрация 0.20%. При вариант с 0.40% и с 0.60% пектин F-теста открива съществена разлика в киселинността на млякото след прибавянето на пектина, но по-строгия тест не открива такава разлика. И двата теста откриват съществени различия в киселинността на млякото след прибавянето на 0.80% и 1% пектин. След прибавянето на пектина в млякото титруемата киселинност е най-висока при варианти с 0.80% и с 1%, съответно с $23.8^{\circ}\text{T} \pm 0.9$ и $23.7^{\circ}\text{T} \pm 0.6$. При вариант с 0.60% титруемата киселинност е малко по-ниска – $22^{\circ}\text{T} \pm 0.5$. При вариантите с най-ниско съдържание на пектин киселинността на млякото е сходна с възстановеното стерилно мляко без добавки: при вариант с 0.20% титруемата киселинност е $19.9^{\circ}\text{T} \pm 0.4$ и при 0.40% – $20.5^{\circ}\text{T} \pm 0.3$.



Фиг. 4.17. Изменение на титруемата киселинност на мляко с пектин при действието на стартерна култура *S19L14* за период от 3 часа (h).

На 1-я час нарастването на титруемата киселинност при варианти с 0.20%, с 0.40% и с 1% е $8.1^{\circ}\text{T} - 8.7^{\circ}\text{T}$. Почти два пъти е по-слабо изменението при вариант с 0.60% – 4.4°T , а при вариант с 0.80% е 6.2°T . При всички варианти изменението е съществено и според двата приложени теста. Аналогично с наблюдаваното изменение са и стойностите на титруемата киселинност. Най-висока е киселинността при вариант с 1% пектин – $32.4^{\circ}\text{T} \pm 2.2$, следван от вариант с 0.80% пектин с $30^{\circ}\text{T} \pm 2.3$, 0.40% с $28.9^{\circ}\text{T} \pm 1.5$ и

при 0.20% с $28^{\circ}\text{T} \pm 1.2$. Най-ниска е стойността при вариант с 0.60% пектин с $26.4^{\circ}\text{T} \pm 3$. Обработката на данните показва съществена разлика между киселинността при вариант с 1% спрямо вариантите с 0.20%, с 0.40% и с 0.60% пектин.

От 1-я до 2-я час при всички варианти се наблюдава статистически значимо и по размер максимално нарастване на титруемата киселинност за изследвания период от 3 часа. Прави впечатление, че най-значително е нарастването при вариантите, които са претърпели най-слабо изменение в изходната си титруема киселинност – 0.20% и 0.40%. Изменението при вариант с 0.20% пектин е 36.5°T и при вариант с 0.40% – 35.5°T и стойностите на титруемата киселинност са съответно $64.5^{\circ}\text{T} \pm 2.7$ и $64.4^{\circ}\text{T} \pm 3.2$. При вариант с 1% пектин нарастването на титруемата киселинност е малко по-слабо – 31.6°T и киселинността е $64^{\circ}\text{T} \pm 3.5$. При варианти с 0.60% и 0.80% пектин средната титруемата киселинност е по-ниска с $12-13^{\circ}\text{T}$. При тях са сходни както стойностите на изменението – $21-25^{\circ}\text{T}$ спрямо предходния час, така и измерената титруемата киселинност – $51.4^{\circ}\text{T} \pm 7.8$ и $52.1^{\circ}\text{T} \pm 9.5$. На 2-я час според двата теста статистическа разлика липсва между варианти 0.60% и 0.80%, а се открива различие при сравняването им с вариантите с 0.20%, 0.40% и 1%, които от своя страна също не се различават помежду си.

На 2.30h изменението при варианти с 0.20% и 0.40% пектин намалява до 50% от максималното измерено, но запазват най-висока киселинност. При вариант с 0.20% пектин титруемата киселинност е $84.1^{\circ}\text{T} \pm 2.4$ и при вариант с 0.40% пектин – $83.5^{\circ}\text{T} \pm 2.5$. Аналогично е изменението при вариант с 1% пектин и титруема киселинност – $81^{\circ}\text{T} \pm 3$. При варианти с 0.60% и 0.80% киселинността отново е по-ниска, съответно – $68.4^{\circ}\text{T} \pm 8.7$ и $66.5^{\circ}\text{T} \pm 8.4$. Изменението при всички варианти е статистически значимо. Поради запазената тенденция в изменението на киселинността до 2.30 часа, сравнението на титруемата киселинност между вариантите е идентично с анализа на 2-я час.

На 3-я час изменението на титруемата киселинност се забавя до 32-52% от максималното и е статистически значимо при четири от вариантите. Вариант с 0.80% пектин е изключение като има най-слабо и статистически несъществено изменение от 9.2°T , както и най-ниска стойност на титруемата киселинност – $75.7^{\circ}\text{T} \pm 9.2$. При останалите варианти титруемата киселинност е по-висока в следния ред: с 0.60% – $81.7^{\circ}\text{T} \pm 8.1$, с 1% – $91^{\circ}\text{T} \pm 3.4$, с 0.40% – $97.6^{\circ}\text{T} \pm 3$ и с 0.20% пектин – $99.1^{\circ}\text{T} \pm 2.9$. Не се открива

съществена разлика между двойки варианти 0.20% – 0.40%, 0.40% – 1% и 0.60% – 0.80%. Според F-теста всички останали комбинации сравнения показват статистическа разлика.

Общата тенденция в изменението на титруемата киселинност, аналогично на изменението при активната киселинност не се различава значително при отделните варианти. Това показва, че изследваните концентрации пектин не са инхибиторни за стартерната култура. Независимо от изменените показатели на изходната суровина използваната стартерна култура осъществява успешна ферментация на млечната захар и коагулира млякото. Получените резултати са аналогични на Chick и сътр. (2001), които използват мед с $pH=3.9$ при концентрация от 5% без инхибиторен ефект. Липсата на потискащ ефект от страна на използваните концентрации пектин може убедително да се потвърди чрез изследването на броя на жизнените клетки в млечнокиселия продукт.

4.4.1.б. Определяне на общия брой микроорганизми на стартерна култура S19L14 след 3 часа термостатиране

В таблица 4.22 са показани колонообразуващите единици на компонентите на стартерна култура S19L14, след инкубирането ѝ за период от 3 часа в мляко, което съдържа различни концентрации пектин. Както се вижда от таблицата по-голямо вариране има при клетките на *St. thermophilus* в закваската при различните концентрации пектин. По-висок брой колонообразуващи единици има при вариант с 0.40% пектин – 1.04×10^{16} CFU/ml, следван от варианти с 0.80% – 7.4×10^{15} , с 0.60% – 3.4×10^{15} , с 0.20% – 7.3×10^{14} и с 1% пектин – 6.20×10^{14} CFU/ml. Статистическата обработка на резултатите показва, че не съществува съществена разлика в броя на клетките на *St. thermophilus* в стартерната култура при развитието в млечна среда, която съдържа изследваните концентрации пектин.

В броя на *L. bulgaricus* в стартерната култура се забелязва същата особеност – най-много клетки се установяват във вариант с 0.40% пектин с 4.40×10^{10} CFU/ml. Вариант с 0.60% е също с висок брой лактобацили в закваската – 2.50×10^{10} CFU/ml. Останалите варианти подредени по реда на намаляване на броя на лактобацилите са както следва: с 1% – 2.10×10^{10} , с 0.20% – 1.60×10^{10} и с 0.80% пектин – 1.40×10^{10} CFU/ml. Обработката на ре-

зультатите е аналогична на анализа при броя на *St. thermophilus* в стартерната култура и показва, че между броя на лактобацилите в млякото с различни концентрации пектин няма съществена статистическа разлика.

Таблица 4.22. Общ брой на компонентите на стартерната култура в кисело мляко на 3-я час от термостатирането.

Вариант		Компоненти на стартерната култура			
Стартерна култура	Съдържание на пектин, %	<i>St. thermophilus</i>		<i>L. bulgaricus</i>	
		CFU/ml	log CFU/ml	CFU/ml	log CFU/ml
S19L14	0.20	7.20x10 ¹⁴	14.86±0.8	1.60x10 ¹⁰	10.20±0.6
	0.40	1.00x10 ¹⁶	15.86±5.1	4.40x10 ¹⁰	10.50±4.6
	0.60	3.40x10 ¹⁴	15.46±3.2	2.50x10 ¹⁰	10.30±3.9
	0.80	7.40x10 ¹⁵	15.70±5.5	1.40x10 ¹⁰	10.02±4.4
	1.00	6.20x10 ¹⁴	14.90±0.7	2.10x10 ¹⁰	10.30±1.7

Поради по-високия брой на стрептококите в стартерната култура определянето на общия брой микроорганизми в млякото се влияе съществено от степенния им показател. Така например киселото мляко с 0.40% пектин има общ брой микроорганизми 1x10¹³CFU/ml, при вариант с 0.80% пектин – 7x10¹³CFU/ml. При останалите култури общия брой микроорганизми е сходен и достига 10¹².

4.4.2. Органолептична оценка на кисело мляко с пектин

Резултатите относно запазената ферментационната активност на стартерната култура и високият ѝ брой микроорганизми в млякото със съдържание на пектин предполагат и високи органолептични качества на продукта. В действителност три от вариантите с пектин получиха изключително ниска органолептична оценка и изобщо не притежаваха типичните за киселото мляко качества (таблица 4.23). Изменение в цвета на изходното мляко се наблюдава още при добавянето на най-ниската използвана концентрация – 0.20% пектин: млякото придобива кафеникаво-карамелен оттенък, по-интензивен като оцветяване в сравнение с характерният за кравето мляко цвят, но запазва течната си консистенция и не се долавят изменения във вкуса и аромата.

Таблица 4.23. Органолептични показатели на кисело мляко с различни концентрации пектин.

Съдържание на пектин, %	Показатели			
	цвет	вкус	аромат	коагулум
0.20	a	b	b	b
0.40	b	b	b	b
0.60	d	d	c	d
0.80	d	d	c	d
1.00	d	c	c	d

Легенда: a – много добро качество; b – добро качество; c – средно качество; d – незадоволително качество

Изходното мляко, което съдържа 0.40% пектин е със забележимо потъмен оттенък от естествения си цвят, със запазена течна консистенция, без съществени отклонения в аромата и вкуса. Добавянето на 0.60%, 0.80% и 1% пектин нарушава структурата и консистенцията на млякото. Стерилното мляко с 1% пектин се пресича на утайка от фини, светло-бели парцалчета и кафеникава на цвят над утаечна течност. При варианти с 0.60% и 0.80% пектин млякото се пресича както млякото с 1% пектин, но при дейността на стартерната култура и без разбъркване фината утайка от млечни белтъци проявява склонност към агрегиране и образуване на твърди, плътни плаки, които се залепят за дъното на използвания съд. От измененото изходно мляко се получава продукт, който и след дейността на стартерната култура показва същите недостатъци като изходната суровина. По отношение споменатите критерии най-силно изразен е цвета при варианти с 0.60%, 0.80% и 1% пектин. Доловим е и кафеникавия оттенък при вариант с 0.40% пектин. Аналогичен резултат е получен от Staffolo и сътр. (2004), които установяват значително покафеняване на мляко при използването на ябълкови фибри в сравнение с използването на инулин, бамбукови или овесени фибри. Изследователите дори изключват пробата с ябълкови фибри от органолептичния анализ именно поради изменения цвят.

При всички варианти вкусът е кисел и ясно изразен. Типичният за киселото мляко млечнокисел аромат е оптимално съхранен при вариант с 0.20% и слабо засегнат при 0.40% пектин. При варианти с 0.60%, 0.80% и 1% пектин е ясно доловим страничния мирис на пектиновия разтвор, което значително понижава оценката им. Полученият резултат е в съответствие с резултатите на Karagul-Yuceer и сътр. (1999), които подчертават аромата на продукта като един от важните показатели за възприемането му.

По отношение текстурата на млякото коагулум не се образува при варианти с 0.60%, с 0.80% и с 1% пектин. Получените данни са в несъответствие с резултатите получени от Ferniez-García и сътр. (1998), които докладват получаването на коагулум при използването на 1.32% хранителни фибри. При действието на стартерната култура млякото коагулира при варианти с 0.20% и 0.40%. Коагулумът, който се получава е гладък и еднороден, забелязва се повишената му плътност и намален синерезис в сравнение с мляко без пектин.

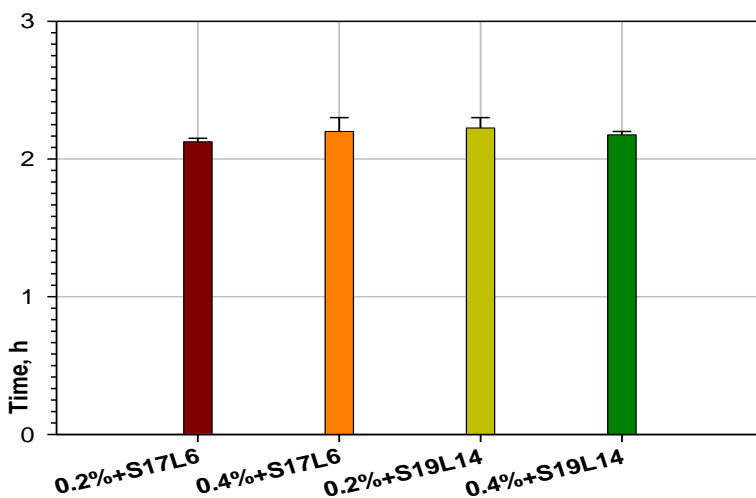
Органолептичната оценка на кисело мляко с различни концентрации пектин показва, че единствено варианти с 0.20% и 0.40% пектин отговарят максимално на изискванията на кисело мляко.

4.4.3. Изследване на основни технологични показатели на кисело мляко с 0.20 % и 0.40 % пектин

4.4.3.a. Определяне времето на коагулация

При определянето на времето на коагулация на млякото при използването на избраните симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* не е възможно като критерий да се използва момента при достигането на $\text{pH}=4.7$. Причината е, че внасянето на пектина в млякото понижава активната му киселинност в изходния момент и киселинността при фиксираната стойност не може адекватно да служи като краен етап на процеса. Поради това като време на коагулация е отчитано времето, през което се установява видимата коагулация на млякото.

От фигура 4.18 се вижда, че най-кратко е времето на коагулация при вариант с 0.20% пектин и стартерна култура *S17L6* – $2.12\text{h} \pm 0.32$. С около 5 минути по-късно коагулира млякото при вариант с 0.40% пектин и *S19L14* – $2.18\text{h} \pm 0.32$. Само 2 минути е разликата между вариант с 0.40% пектин и *S17L6* – $2.20\text{h} \pm 1.27$ и вариант с 0.20% пектин и *S19L14* – $2.22\text{h} \pm 0.95$. При видимата коагулация на млякото се очаква, че повишена плътност при 0.40% пектин би повлияла на коагулацията и тя може да настъпи по-рано в сравнение с коагулацията на мляко с 0.20% пектин. Тази тенденция обаче се наблюдава само при стартерна култура *S17L6*. Обработката на данните показва, че няма съществена статистическа разлика във времето на коагулация при използването на двете стартерните култури и концентрациите пектин.



Фиг. 4.18. Време на видима коагулация на мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин при дейността на симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14*.

4.4.3.б. Пост-киселинообразуване на кисело мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин

Изследване на пост-киселинообразуването на симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* в кисело мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин е изследвано при хладилното им съхранение (4°C).

Видимата коагулация на млякото при отделните варианти се установява при различно рН на млечната среда (таблица 4.24). Активната киселинност на млякото при вариантите с 0.40% пектин е сходна: при стартерна култура *S17L6* – 4.79 ± 1.40 и при *S19L14* – 4.78 ± 1.08 . Активната киселинност при вариант с 0.20% и *S19L14* е по-ниска – 4.64 ± 2.60 в сравнение с рН при с 0.20% и *S17L6* – 4.87 ± 0.06 . Трябва да се отбележи, че не се открива съществена статистическа разлика в киселинността на млякото при коагулация между отделните варианти.

Таблица 4.24. Изменение на активната киселинност, (pH) при хладилното съхранение (4°C) на кисело мляко, което съдържа 0.20% и 0.40% пектин.

Вариант		Активна киселинност, рН		
Стартерна култура	Съдържание на пектин, %	видима коагулация	7-и ден	14-и ден
<i>S17L6</i>	0.20	4.87 ±0.06	3.98 ±0.25	3.74 ±1.02
<i>S17L6</i>	0.40	4.79 ±1.40	4.03 ±0.06	3.84 ±0.90
<i>S19L14</i>	0.20	4.64 ±2.60	3.96 ±0.13	3.78 ±0.64
<i>S19L14</i>	0.40	4.78 ±1.08	3.96 ±0.32	3.79 ±1.14

Симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* показват повишено пост-киселинообразуване в мляко с пектин в сравнение с развитието си в мляко без пектин при хладилно съхранение на киселото мляко за срок от 14 дни. Очевидно е, че стойността на активната киселинност на ферментиралото мляко има дълготраен ефект върху изменението на рН при хладилното му съхранение. Получените данни са в несъответствие с получените от Fernandez-García и сътр. (1998). Изследователите установяват понижаване на рН в хода на съхранението, но прибавянето на фибрите води до по-високи стойности на рН. Несъответствието в експерименталните резултати може да се отдаде на различният химически състав на използваните фибри.

На 7-я ден вариантите с участието на симбиотична двойка *S19L14* са с по-ниска активна киселинност: с 0.20% пектин – 3.96 ±0.13 и с 0.40% – 3.96 ±0.32 в сравнение с вариантите с *S17L6*: при 0.20% – 3.98 ±0.25 и при 0.40% пектин – 4.03 ±0.06. Статистически значима разлика според F-теста има между варианти *S17L6* с 0.40% пектин и *S19L14* с 0.40% пектин. Според t-теста на този етап не се откриват съществени различия между вариантите.

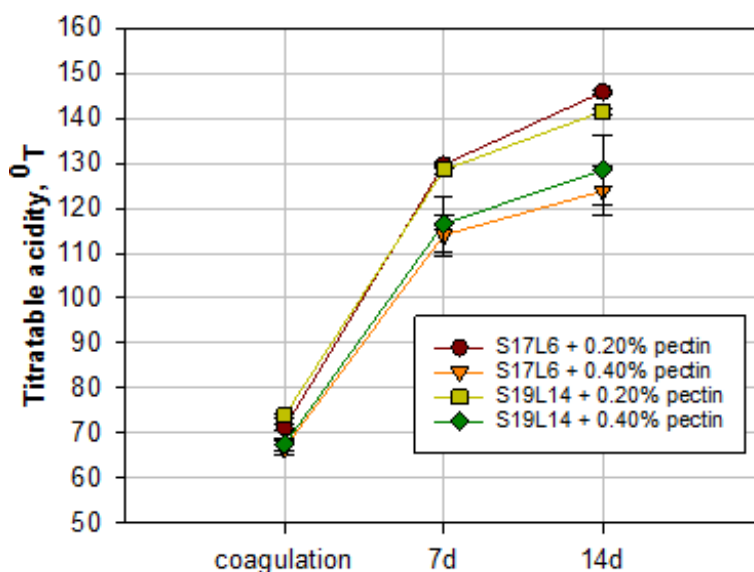
На 14-я ден рН при вариантите с култура *S19L14* са сходни: с 0.20% – 3.78 ±0.64 и с 0.40% – 3.79 ±1.14. При *S17L6* вариантът с 0.40% пектин – рН=3.84 ±0.9 има по-висока активна киселинност от варианта с 0.20% пектин – 3.74 ±1.02. На 14-я ден между вариантите с двете симбиотични двойки съдържание 0.20% и 0.40% пектин няма съществена разлика.

Обработката на данните показва, че при симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* в мляко с 0.20% и 0.40% пектин има съществено понижаване на активната киселинност от коагулация до 7-я ден. От 7-я до 14-я ден според двата теста не се наблюдава съществено понижаване на активната киселинност при *S17L6* с 0.40% пектин и на *S19L14* с двете концентрации пектин. От 7-я до 14-я ден според F-теста само при вариант *S17L6* с 0.20% пектин има съществено изменение. И двата теста откриват съществена разлика в

изменението на киселинността от коагулация до 14-я ден. Получените данни дават основание да се смята, че млякото с пектин не е подходящо за продължително съхранение.

На фигура 4.19 е показано изменението на титруемата киселинност на млякото при различните варианти при хладилното съхранение. След прибавянето на пектина предположението, че млякото коагулира при по-ниска киселинност, което не се установи категорично при активната киселинност се установява при титруемата киселинност. При коагулация варианти *S17L6* с 0.40% пектин и *S19L14* с 0.40% пектин имат по-ниска титруема киселинност. При вариант *S17L6* с 0.40% пектин титруемата киселинност е $66.7^{\circ}\text{T} \pm 4.2$ и при *S19L14* с 0.40% пектин е $67.5^{\circ}\text{T} \pm 3.4$. Коагулацията на млякото при вариантите с 0.20% пектин се наблюдава при по-висока с 4 до 6°T киселинност. При тези условия вариант *S17L6* с 0.20% пектин има киселинност $71.2^{\circ}\text{T} \pm 1.8$ и *S19L14* с $73.8^{\circ}\text{T} \pm 1.5$. Данните от F-теста показват, че по аналогичен начин се различават *S17L6* с 0.20% пектин спрямо *S17L6* с 0.40% пектин и *S19L14* с 0.20% пектин спрямо *S19L14* с 0.40% пектин. Разлика има още между *S17L6* с 0.20% пектин и *S19L14* с 0.40% пектин. При вариантите с различна стартерна култура, но еднакви концентрации пектин няма съществена разлика в титруемата киселинност при коагулация.

От коагулация до 7-я ден от графиката се вижда разликата в хода на изменението на титруемата киселинност, която очевидно зависи не от вида на стартерната култура, а от съдържанието на пектин в млякото. Титруемата киселинност при *S17L6* с 0.20% пектин е $129.7^{\circ}\text{T} \pm 1.4$ и при *S19L14* с 0.20% пектин – $128.5^{\circ}\text{T} \pm 2.4$. При вариантите с по-висок процент пектин киселинността е с $12-16^{\circ}\text{T}$ по-ниска: при *S17L6* и *S19L14* с 0.40% пектин киселинността е съответно $114^{\circ}\text{T} \pm 11.9$ и $116.5^{\circ}\text{T} \pm 15.9$. При всички варианти изменението на титруемата киселинност от коагулация до 7-я ден е съществено, което е в съответствие с данните за активната киселинност през същия период.



Фиг. 4.19. Изменение на титруемата киселинност ($^{\circ}\text{T}$) на кисело мляко, което съдържа 0.20 % и 0.40 % пектин при съхранение 4°C за 14 дни.

На 14-я ден съотношението между вариантите остава непроменено. Със значително по-висока титруема киселинност са варианти с 0.40% пектин, като титруемата им киселинност е съответно: при *S17L6* – $145.8^{\circ}\text{T} \pm 1.4$ и при *S19L14* – $141.5^{\circ}\text{T} \pm 1.7$. Вариант с *S17L6* и 0.40% пектин има по-висока с 22°T киселинност от *S17L6* с 0.20% пектин и разликата е статистически значима. Вариант *S19L14* с 0.20% пектин има с 13°T по-висока киселинност от аналога си с 0.40% пектин, като разликата е статистически несъществена. Вариантите, които съдържат 0.40% пектин при двете стартерни култури не се различават помежду си, а стойностите на титруемата им киселинност са както следва: при *S17L6* – $123.8^{\circ}\text{T} \pm 14.4$ и при *S19L14* – $128.5^{\circ}\text{T} \pm 19.8$. Вариантите с различни стартерни култури, но еднакво съдържание на пектин не се различават помежду си. Изменението на титруемата киселинност от 7-я до 14-я ден е съществено само при вариантите с по-ниско съдържание на пектин – 0.20%, независимо от стартерната култура. При вариантите с 0.40% пектин изменението на титруемата киселинност през едноседмичния интервал е несъществено. Сравняването на титруемата киселинност при коагулация и 14-я ден, също както и при активната киселинност показва съществени изменения на стойностите. Прави впечатление,

че добавянето на пектин към млякото води до повишеното киселинообразуване от стартерните култури в сравнение с мляко, което не съдържа пектин. В мляко без пектин стартерна култура *S17L6* показва до 21-я ден титруема киселинност около 100°Т, а при използването на пектин киселинността още на 14-я ден достига до 145.8°Т. Същата особеност се наблюдава и при култура *S19L14*.

4.4.3.в. Определяне преживяемостта на микрофлората на кисело мляко с 0.20% и 0.40% пектин при хладилно съхранение (4°С)

Установяването на броя на микроорганизмите в млякото с пектин потвърждава, че *St. thermophilus* числено преобладава както при коагулация, така и в периода на съхранение на продукта (таблица 4.25). При коагулация прави впечатление, че най-висок е броят както на *St. thermophilus* – 5.2×10^{15} CFU/ml така и на *L. bulgaricus* – 3.4×10^{10} CFU/ml при вариант *S17L6* с 0.20% пектин. С висок брой клетки *St. thermophilus* е и вариант *S19L14* с 0.40% пектин – 4.7×10^{15} CFU/ml, който обаче има по-нисък брой *L. bulgaricus* – 3.4×10^{10} CFU/ml. Със сходен брой *St. thermophilus* при коагулация са варианти *S17L6* с 0.40% пектин – 1.2×10^{15} CFU/ml и *S19L14* с 0.20% пектин – 1.9×10^{10} CFU/ml. Броят на колонообразуващите единици на *L. bulgaricus* е най-висок при вариант *S17L6* с 0.20% пектин – 6.4×10^{10} CFU/ml, наполовина по-малък е коефициента на вариант *S17L6* с 0.40% пектин – 3.9, но без промяна на степения показател – 10^{15} CFU/ml. Най-нисък е броят на *L. bulgaricus* при вариант *S19L14* с 0.20% пектин – 1.8×10^{10} CFU/ml (таблица 4.26).

На 7-я ден изменението и при двата компонента на стартерните култури е несъществено и стойностите на изчислените колонообразуващи единици запазват непроменен степения си показател спрямо коагулацията. Колониите на *St. thermophilus* които се изброяват при *S17L6* с 0.20% пектин – 4.8×10^{15} CFU/ml е по-висок от установените при *S19L14* – 1.9×10^{15} CFU/ml. Аналогичен е броят на *St. thermophilus* при вариантите с 0.40% пектин: *S17L6* – 6.5×10^{15} и при *S19L14* – 1×10^{15} CFU/ml.

Таблица 4.25. Изменение на броя на *St. thermophilus* в кисело мляко с 0.20% и 0.40% пектин при хладилно съхранение (4°C).

Вариант			Време	
Стартерна култура	Съдържание на пектин, %	При коагулация	7-и ден	14-и ден
<i>S17L6</i>	0.20	5.2×10^{15}	4.8×10^{15}	6.1×10^{14}
<i>S17L6</i>	0.40	1.2×10^{15}	6.5×10^{15}	7.3×10^{14}
<i>S19L14</i>	0.20	1.9×10^{15}	1.9×10^{15}	5.3×10^{13}
<i>S19L14</i>	0.40	4.7×10^{15}	1×10^{15}	1.9×10^{13}

Таблица 4.26. Изменение на броя на *L. bulgaricus* в кисело мляко с 0.20% и 0.40% пектин при хладилно съхранение (4°C).

Вариант			Време	
Стартерна култура	Съдържание на пектин, %	При коагулация	7-и ден	14-и ден
<i>S17L6</i>	0.20	6.4×10^{10}	2×10^{10}	4.2×10^9
<i>S17L6</i>	0.40	3.9×10^{10}	5.7×10^{10}	2.8×10^9
<i>S19L14</i>	0.20	1.8×10^{10}	5.9×10^{10}	1.5×10^{10}
<i>S19L14</i>	0.40	3.4×10^{10}	3.4×10^{10}	7.2×10^9

Броят на *L. bulgaricus* при отделните варианти на 7-я ден е най-висок при *S19L14* с 0.20% пектин – 5.9×10^{10} CFU/ml, следван от вариант *S17L6* с 0.20% пектин – 5.7×10^{10} CFU/ml. С най-нисък брой клетки на *L. bulgaricus* са *S19L14* с 0.40% пектин – 3.4×10^{10} CFU/ml и *S17L6* с 0.20% пектин – 2×10^{10} CFU/ml.

На 14-я ден се наблюдава понижаване на броя и на двата компонента. При клетките на *St. thermophilus* това е по-изразено при варианти *S19L14* с 0.20% пектин и 0.40% пектин, съответно до 5.3×10^{13} CFU/ml и 1.9×10^{13} CFU/ml. Само с един логаритмичен цикъл спрямо 7-я ден намалява броят на стрептококите при вариант *S17L6* с 0.20% пектин и 0.40% пектин, съответно до 6.1×10^{14} CFU/ml и 7.3×10^{14} CFU/ml. При броя на лактобацилите степенния показател се запазва без промяна при вариант *S19L14* с 0.20% пектин – 1.5×10^{10} CFU/ml. При останалите три варианта се забелязва слабо понижаване в броя на лактобацилите. Най-висок е коефициента при *S19L14* с 0.40% пектин – 7.2×10^9 CFU/ml, следван от вариант *S17L6* с 0.20% пектин – 4.2×10^9 CFU/ml и *S17L6* с 0.40% пектин – 2.8×10^9 CFU/ml.

При хладилното съхранение за период от 14 дни несъществено се изменя броят на клетките на *St. thermophilus* при варианти *S17L6* с 0.20% пектин и 0.40% пектин. Броят на *St. thermophilus* намалява по-чувствително при

S19L14 и при двете концентрации пектин. Сравнението на броя на *St. thermophilus* между отделните варианти на всеки етап от изследването не показва съществени различия, което е лесно обяснимо при запазване стойностите на степенните показатели.

Броят на лактобацилите се изменя съществено само при вариант *S17L6* с 0.40% пектин, като разликата се проявява от 7-я до 14-я ден и при сравнението на коагулацията и 14-я ден. При стартерна култура *S19L14* броя на *L. bulgaricus* в мляко с 0.20% и 0.40% пектин се изменя незначително. Сравнението на броя на *L. bulgaricus* на всеки един етап от изследването показва, че между вариантите няма съществена разлика с изключение на 14-я ден между *S19L14* с 0.20% пектин и *S17L6* с 0.40% пектин.

При някои варианти се наблюдава повишаване, макар и несъществено в броя на бактериалните клетки през първите дни от хладилното съхранение. Полученият резултат е аналогичен на установеният от Nighswonger и сътр. (1995), Vinderola и сътр. (2002). След като установяват същото явление Birollo и сътр. (2000) изказват предположението, че при съхранение от 6°C *St. thermophilus* не само запазва жизнеспособността си, но дори е в състояние да се размножава. По-логично обаче изглежда предположението на То и Etzel (1997), които обясняват нарастването на броя на микроорганизмите с разделянето на групирани клетки на къси верижки или единични клетки. Незначително понижаване на броя на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* до 28 дни хладилно съхранение на мляко с различни добавки установяват Keating и сътр. (1990), аналогични са резултатите на Salwa и сътр. (2004). Според Fernieз-García и сътр. (1998) фибрите в млякото са фактор, който благоприятства преживяването на лактобацилите в хода на съхранението.

4.4.4. Изводи

В резултат на направените изследвания, относно влиянието на пектин, в концентрации от 0.2% до 1%, върху основни технологични характеристики на кисело мляко могат да се направят следните изводи:

- Статистическата обработка на резултатите показва, че активната киселинност на млякото се изменя несъществено единствено при вариант с 0.20% пектин и съществено при прибавянето на пектин в концентрации от 0.40% до 1%. Понижението в стойността на ак-

тивната киселинност е в съответствие с нарастването на концентрацията на пектина. Най-ниска е активната киселинност при вариант с 1% пектин – $pH=6.11 \pm 0.03$.

- Концентрации от 0.20% до 1% пектин не са инхибиторни за развитието на стартерна култура *S19L14* в мляко.
- Статистическата обработка на резултатите показва, че не съществува съществена разлика в броя на клетките на *St. thermophilus* и *L. bulgaricus* при стартерна култура *S19L14* при развитието ѝ до 3 часа в мляко, което съдържа концентрации пектин от 0.20% до 1%.
- Млечнокиселия продукт, получен от дейността на симбиотична двойка *S19L14*, със съдържание на пектин в количество от 0.20% до 1% се различава значително по отношение основните органолептични показатели – цвят, вкус, аромат и коагулум.
- Не се открива съществена разлика във времето на видимата коагулация на млякото, съдържащо 0.20% и 0.40% пектин и инокулирано със симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14*.
- Симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* показват повишено пост-киселинообразуване в мляко с пектин в сравнение с развитието си в мляко без пектин при хладилно съхранение за 14 дни.
- Обработката на данните показва, че при симбиотични двойки *S17L6* и *S19L14* в мляко с 0.20% и 0.40% пектин има съществено понижаване на активната киселинност от коагулация до 7-я ден. От 7-я до 14-я ден не се наблюдава съществено понижаване на активната киселинност при варианти *S17L6* с 0.40% пектин, *S19L14* с 0.20% и с 0.40% пектин.
- От коагулация до 7-я ден разликата в хода на изменението на титруемата киселинност зависи не от вида на стартерната култура, а от съдържанието на пектин в млякото.
- Броят на клетките на *St. thermophilus*, при варианти *S17L6* с 0.20% пектин и 0.40% пектин, при хладилното съхранение за период от 14 дни се изменя несъществено и намалява по-чувствително при култура *S19L14* и при двете концентрации пектин.
- Броят на лактобацилите се изменя съществено при вариант *S17L6* с 0.40% пектин, като разликата се проявява от 7-я до 14-я ден и при сравнението на коагулацията и 14-я ден. При стартерна култура *S19L14* броят на *L. bulgaricus* в мляко с 0.20% и 0.40% пектин се изменя незначително. Сравнението на броя на *L. bulgaricus* на

всеки един етап от изследването показва, че между вариантите няма съществена разлика с изключение на 14-я ден между *S19L14* с 0.20% пектин и *S17L6* с 0.40% пектин.

5. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Селекционирани и идентифицирани са щамове *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* – L3, L5, L6, L7, L11 и L14 и щамове *Streptococcus thermophilus* – S8, S10, S17, S19, S22 и S23.
2. Установени са основни биологични свойства на щамове *L. bulgaricus* и *St. thermophilus*, характеризиращи тяхното значение при приложението им в технологични процеси при получаване на млечнокисели продукти.
 - 2.1. Млякото коагулира с избраните щамове *L. bulgaricus* при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за време от 4.24 до 5.54 часа (L3 – 4.24h, L7 – 4.32h, L6 – 5.31h, L5 и L11 – 5.39h и L11 – 5.54h), а с щамове *St. thermophilus* – от 3.37 до 4.52 часа (S19 – 3.37h, S17 – 3.38h, S23 – 3.39h, S22 – 3.42h, S10 – 4.52h и S8 – 4.59h).
 - 2.2. Пределната киселинност на мляко, съхранявано 21 дни при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$, с щамове *L. bulgaricus* достига рН от 3.57 до 3.71 (титруема киселинност от 139.5°T до 227.5°T), а с щамове *St. thermophilus* – рН от 4.20 до 4.23 (титруема киселинност от 117.3°T до 123.9°T).
 - 2.3. Пост-киселинността на млечнокиселия продукт с щамовете на *L. bulgaricus*, за период на съхранение 21 дни при температура 4°C , достига рН от 4.11 до 4.25 (титруема киселинност от 96.4°T до 122°T), а с щамовете на *St. thermophilus* – рН от 4.32 до 4.36 (титруема киселинност от 93°T до 98°T).
3. Установена е степента на преживяемост (%) на щамовете *L. bulgaricus* при активна киселинност рН=3.0, за време 120 min и температура 37°C , както следва: L6 – 92%, L11 и L14 – 88%, L5 – 74%, L3 – 72% и L7 – 70%.
4. Млечният коагулат на *St. thermophilus* има чист млечнокисел вкус, а млечния коагулат на *L. bulgaricus* има млечнокисел вкус и аромат на диацетил.
5. Установени са технологичните свойства на симбиотични двойки от избрани щамове *L. bulgaricus* и *St. thermophilus*, в количествено съотношение 1:1.5, култивирани в млечна среда при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$.

- 5.1. Създадените симбиотични двойки, култивирани при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ за време 3 часа, понижават активната киселинност на млякото до рН 4.66 – 4.39 и повишават титруемата киселинност до $69.5^{\circ}\text{T} - 96^{\circ}\text{T}$.
- 5.2. Симбиотичните култури понижават активната киселинност на млякото до рН=4.7 за време 2.20 – 2.59 часа.
- 5.3. Пост-киселинообразуващата способност на симбиотичните култури в мляко при температура на съхраняване 4°C за 7 дни е рН от 4.43 до 4.03 (титруема киселинност от 94.3°T до 111.9°T), а за 21 дни – рН от 4.35 до 4.04 (титруема киселинност от 99.7°T до 127.8°T).
- 5.4. Симбиотичните двойки на *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* показват висок брой активни клетки във ферментирало мляко: *L. bulgaricus* – 10^{11}CFU/ml и *St. thermophiles* – 10^{17}CFU/ml . Тяхното количество не се изменя съществено при температура на съхранение 4°C за 7 дни.
6. Изследвани са възможностите за развитие на симбиотични култури *L. bulgaricus* и *St. thermophilus*, култивирани в мляко, съдържащо пектин.
- 6.1. Установено е, че развитието на *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* в симбиотична двойка *S19L14* в млечна среда с 0.2-1.0% пектин, при температура $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ до 3 часа е както следва: *L. bulgaricus* 0.2% – 1.6×10^{10} , 0.4% – 4.4×10^{10} , 0.6% – 2.5×10^{10} , 0.8% – 1.4×10^{10} , 1.0% – $2.1 \times 10^{10}\text{CFU/ml}$ и *St. thermophilus* – 0.2% – 7.2×10^{14} , 0.4% – 1.0×10^{16} , 0.6% – 3.4×10^{14} , 0.8% – 7.4×10^{15} , 1.0% – $6.2 \times 10^{14}\text{CFU/ml}$.
- 6.1.1. Пектинът в количество над 0.5% влошава реологичните свойства на коагулума на киселото мляко;
- 6.1.2. Симбиотичните култури от избраните щамове *L. bulgaricus* и *St. thermophilus*, при развитието си в млечна среда с пектин в количество 0.2% и 0.4% показват висока активност. Продуктът съдържа активни клетки на *L. bulgaricus* – 10^{10}CFU/ml и на *St. thermophilus* – 10^{15}CFU/ml . Броят им се изменя незначително при температура на съхраняване 4°C в продължение на 14 дни.

7. Активността и преживяемостта на щамовете *L. bulgaricus* и *St. thermophilus* и симбиотичните им двойки са потвърдени в условията на практиката за получаване на кисело мляко.

6. СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНАТА ЛИТЕРАТУРА

Кондратенко, М.С., П.В. Груев, А.Ф. Андреев, К.П. Мутафова, М.Н. Козарева, Р.К. Еникова, К.Г. Тодоров и С.Д. Пенделашка, Българско кисело мляко, Земиздат, 1985, София.

Минкова, С.Т., Изследване на шамове *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* за получаване на млечнокисели продукти със специфични качества. Докторска дисертация, 2001. Пловдив

Михайлова, М., К. Исава и Л. Влъчкова, Проучване на млечнокисели бактерии, изолирани от растения. Национална научна конференция, София, 2003.

Сборник стандарти БДС, 1982. Мляко и млечни продукти, т.3, София.

Уршев, З., Ж. Димитров, Н. Фачикова, И. Петрова и Д. Ишлимова, Извънклетъчни полизахариди на *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* в полза на повишаване качеството на ферментиралите млечни продукти. Национална научна конференция – Българското кисело мляко-настояще и бъдеще, 2003, София.

Adhikari, K., Mustapha, A., & Grun, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *J Food Sci.*, 68(1), 275–280.

Adolfsson, O., Meydani, S. N. & Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *Am L Clin Nutr.*, 80, 245–256.

Agri-FoodCanada, 2002. Per capita consumption of dairy products. <http://www.dairyinfo.agr.ca/dpconsumption.pdf>

Akalin, A. S., Gonc, S. & Duzel, S. (1997). Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum holesterol levels in mice. *J Dairy Sci.*, 80, 2721-2725.

Amiel, C., Mariey, L., Pichon, C. P., & Travert, J. (2001). FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Lait*, 81, 249–255.

Askon-Reyes, D. B., Asconcabrera, M. A., Cochet, N., & Lebeaulti, J. M. (1995). Indirect conductance for measurements of carbon dioxide produced by *Streptococcus salivarius spp. thermophilus* TJ 160 in pure and mixed cultures. *J Dairy Sci.*, 78(1), 8–16.

Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Hoover-Fitzula, R. L., Cano, R. J. & Klaenhammer, T. R. (2004). Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl and Environ Microbiol.*, 70(9), 5315–5322.

Balasubramanyam, B. V., & Varadaraj M. C. (1998). Culture condition for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. *J Appl Microbiol.*, 84, 97–102.

Barnes, D. L., Harper, S. J., & Bodyfelt, F. W. (1991). Prediction of consumer acceptability of yogurt by sensory and analytical measures of sweetness and sourness. *J Dairy Sci.*, 74(11), 3746–3754.

Beal, C. & Corrieu, G. (1998). Production of thermophilic lactic acid starters in mixed cultures. *Lait*, 78, 99–105.

Beal, C., Louvet, P., & Corrieu, G. (1989). Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 32, 148–154.

Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N. & Corrieu, G. (1999). Combined effects of culture condition and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *J Dairy Sci.*, 82, 673–681.

Beal, C., Spinnler, H. E., & Corrieu, G. (1994). Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 398. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 41, 95–98.

Berrada, N., Lememl, J.-F., Laroche, G., Thouvenot, P., & Piaia, M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J Dairy Sci.*, 74, 409–413.

Birollo, G. A., Reinheimer, J. A., & Vinderola, C. G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33, 799–805.

Bodana, A. R., & Rao D. R. (1990). Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci.*, 73(12), 3379–3384.

Branen, A. L., & Keenan, T. W. (1969). Growth stimulation of *Lactobacillus* species by lactic streptococci. *Appl Microbiol.*, 17(2), 280–285.

Branen, A. L., & Keenan, T. W. (1970). Identification of a stimulant for *Lactobacillus casei* produced by *Streptococcus lactis*. *Appl Microbiol.*, 20(5), 757–760.

Brennan, E. M, Setser, C., & Schmidt, K. A. (2002). Yogurt thickness: effect of flavor perception and liking. *J Food Sci.*, 67(7), 2785–2789.

Burton, J. P., & Tannock, G. W. (1997). Properties of porcine and yogurt lactobacilli in relation to lactose intolerance. *J Dairy Sci.*, 80(10), 2318–2324.

Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E., & Beaulieu, Y. (1991). The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can Inst Sci Technol.*, 24(3/4), 118–128.

Champagne, C. P., Lacroix, C., & Sodini-Gallot, I. (1994). Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit Rev in Biotechnology*, 14(2), 109–134.

Chaplin, M. (2006). <http://www.lsbu.ac.uk/water/index.html>

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int J Dairy Technol.*, 51(4), 123–136.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelly, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl. Microbiol.*, 84, 759–768.

Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl and Environ Microbiol.*, 68(11), 5656–5662.

Chick, H., Shin, H. S., & Ustinol, Z. (2001). Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria growth in skim milk containing honey. *J Food Sci.*, 66(3), 478–481.

Christensen, M. D., Albury, M. N., & Pederson, C. S. (1958). Variation in the acetic acid-lactic acid ratio among the lactic acid bacteria. *Appl Microbiol.*, 6(5), 316–318.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 2003, 83, 269–306.

Cogan, T. M., Gilliland, S. E., & Speck, D. M. L. (1968). Identification of stimulants for *Lactobacillus bulgaricus* in tomato juice. *Appl Microbiology*, 16(8), 1215–1219.

Conway, P. L., Gorbach, S. L. & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci.*, 70(1), 1–12.

Courtin, P. & Rul, F. (2004). Interaction between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait*, 84, 125–134.

Courtin, P., Monnet, V. & Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148, 3413–3421.

Creamer, L. K., Pearce, L. E., Hill, J. P. & Boland, M. J. (2002). Milk and dairy products in the 21st century. *J Agric Food Chem.*, 50(25), 7187–7193.

Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis, *Comp Biochem Physiol A Mol Integrat Physiol.*, 131, 505–513.

Dave, R. I. & Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J of Dairy Sci.*, 79(9), 1524–1536.

Dave, R. I. & Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci.*, 81(11), 2804–2816.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics- compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.*, 2001, 73(2), 421–429.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food hydrocolloids*, 17, 25–39.

Dilmi-Bouras, A., & Sadoun, D. (2002). Survie des ferments du yaourt dans le tube du lapin. *Lait*, 2002, 82, 247–253.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Degivry, M.-C., Bouley, C., & Szytli, O. (1997). The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *J Nutr.*, 1997, 127, 2260–2266.

Donaldson, M. S. (2004). Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr Journal*, 3:19.

Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (1999). Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl and Environ Microbiol.*, 65(11), 4881–4886.

Drouault, S., Anba, J., & Corthier, G. (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -Galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl and Enviro. Microbiol.*, 68(2), 938–941.

Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Application of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy Journal*, 11, 759–768.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B.,

O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr.*, 7, 386–392.

Eastwood, M. A., & Kay, R. M. (1979). A hypothesis for the action of dietary fiber along the gastrointestinal tract. *Am J of Clin Nutr.*, 32, 364–367.

Economic Research Service, (2002). Food consumption (per capita) data system. www.usda.gov/factbook/tables/ch2table22.jpg

European Dairy Assosiation www.euromilk.org/upload/docs/EDA/Major_Issues_12.pdf

Farrow, J. A. E., & Collins, M. D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, *J Gen Microbiol.*, 30, 357–362.

FDA-Food and Drug Administration, Federal Register, (2003), 68(128). www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/03-16789.pdf

Fernandes-Garcia, E., McGregor, J. U., & Traylor, S. (1998). The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. *J Dairy Science*, 81(3), 655–663.

Fernandez, M. L. (1995). Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum and psyllium. *J Lipid Research*, 36, 2394–2404.

Fonseca, F., Beal, C., & Corrieu, G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J Dairy Res.*, 67, 83–90.

Frohlich-Wyder, M.-T., Bachmann, H.-P., & Casey, M. G. (2002). Interaction between propionibacteria and starter/non-starter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Lait*, 82, 1–15.

Garault, P., Bars, D., Besset, C., & Monnet, V. (2002). Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biological Chemistry*, 277(1), 32–39.

Garde, S., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Medina, M., & Nunez, M. (2003). Proteolysis, volatile compounds, and sensory evaluation in Hispanico cheese manufactured with the addition of a thermophilic adjunct culture, nisin, and calcium alginate-nisin microparticles. *J Dairy Sci.*, 86(10), 3038–3047.

Giannouli, P., & Morris, E. R. (2003). Cryogelation of xanthan. *Food Hydrocoll.*, 17, 495–501.

Gibson, G.R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*, 125(6), 1401–1412.

Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Review*, 87, 175–188.

Gilliland, S. E., Reilly, S. S., Kim, G. B., & Kim, H. S. (2002). Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yogurt-like product. *J Food Science*, 67(8), 3091–3095.

Go, V. L. W., Wong, D. A., Wang, Y., Butrum, R. R., Norman, H. A., & Wilkerson, L-A. (2004). Diet and cancer prevention: evidence-based medicine to genomic medicine. *J Nutr.*, 134, 3513–3516.

Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trends in Food Sci and Tech.*, 10, 139–157.

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., & Angelov, A. (2002). Assesment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol.*, 16(3), 211–225.

Guerin-Danan, C., Chabanet, C., Pedone, C., Popot, F., Vaissade, P., Bouley, C., Szytit, O., & Andrieux, C. (1998). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr.*, 67, 111–117.

Guinard, J.-X., Little, C., Marty, C., & Palchak, T. R. (1994). Effect of sugar and acid on the acceptability of frozen yogurt to a student population. *J Dairy Sci.*, 77(5), 1232–1238.

Guss, M. L., & Delwiche, E. A. (1954). *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriology*, 67(6), 714–717.

Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E., & Seydim, A. C. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control*, 16, 205–209.

Halsted, C. H. (2003). Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am J Clin Nutr.*, 77, 1001–1007.

Harper, S. J., Barnes, D. L., Bodyfelt, F. W., & McDaniel, M. R. (1991). Sensory ratings of commercial plain yogurts by consumer and descriptive panels. *J Dairy Sci.*, 74(9), 2927–2935.

Harte, F., Luedecke, L., Swanson, B., & Barbosa-Canovas, G. V. (2003). Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *J Dairy Sci.*, 86(4), 1074–1082.

Hassan, A. N., Corredig, M., & Frank, J. F. (2002). Capsule formation by nonropy starter cultures affects the viscoelastic properties of yogurt during structure formation. *J Dairy Sci.*, 85(4), 716–720.

Heaton, K. W. (1979). Fiber: new terminology or new concepts? *Am J Clin Nutr.*, 32, 2373–2374.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin. Nutr.*, 73(2), 347–349.

Hepner, G., R., Fried, M. D., Jeor, S. St., Fusetti, L., & Morin, R. (1979). Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am J of Clin Nutr.*, 32, 19–24.

Hickey, M. W., Hillier, A. J., & Jago, G. R. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. *Appl and Environ Microbiol.*, 51(4), 825–831.

Holloway, W. D., Tasman-Jones, G., & Maher, K. (1983). Pectin digestion in humans. *Am J Clin Nutr.*, 37, 253–255.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.*, 73, 365–373.

Horton, B. S. (1995). Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. *J Dairy Sci.*, 78, 2584–2589.

Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M., & Hosono, A. (1992). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Dairy Sci.*, 75(4), 976–981.

Huffman, L. M., & Harrper, W. J. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *J Dairy Sci.*, 82(10), 2238–2244.

Hugenholtz, J., Splint, R., Konings, W. N., & Veldkamp, H. (1987). Selection of protease-positive and protease-negative variants of *Streptococcus cremoris*. *Appl and Environ Microbiol.*, 53(2), 309–314.

Husson-Kao, C., Mengaud, J., Gripon, J-C., Benbadis, L., & Chapot-Chartier, M-P. (1999). The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. *Int Dairy Journal*, 9, 715–723.

Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.*, 76, 2354–2365.

Hutkins, R., Morris, H. A., & McKay, L. L. (1985)b. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl and Environ Microbiol.*, 50(4), 777–780.

Hutkins R., Morris, H. A., & McKay, L. L. (1985)a. Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl and Environ Microbiol.*, 50(4), 772–776.

IDF-International Dairy Federation, Fermented milks: science and technology. Bulletin of the IDF no.227, 1988. Brussels.

IDF-International Dairy Federation. Yogurt – Enumeration of characteristics microorganisms, colony count technique at 37°C, IDF Standart 1117B:199.

IDF-International Dairy Federation. Yogurt – Identification of characteristics microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, IDF Standart 146:1991.

Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.*, 73, 444–450.

Jay, J. M. (1996). Fermentation and fermented dairy products. *Modern food microbiology* (6st ed, pp. 132–136). Chapman and Hall. New York.

Ji, T., Alvarez, V. B., & Harper, W. J. (2004). Influence of starter culture ratios and warm room treatment on free fatty acid and amino acid in Swiss cheese. *J Dairy Science*, 87(7), 1986–1992.

Jones, T. H., Ozimec, L., & Stiles, M. E. (1990). Comparative evaluation of bulk starter substrates on activity and storage of two commercial starter strains. *J Dairy Sci.*, 73, 1166–1172.

Jones, D. (1978). Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. In F. A. Skinner, & L. B. Quesnel (Eds.), *Streptococci, Society for Applied Bacteriology Symposium* (series № 7, pp.1–49). Academic Press, London.

Karagul-Yuceer, P., Coggins, C., Wilson, J. C., & White, C. H. (1999). Carbonated yogurt-sensory properties and consumer acceptance. *J Dairy Sci.*, 82, 1394–1398.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., & Kondyli, E. (2002). Improvement of sensory quality of low fat kefalograviera-type cheese by using commercial special starter cultures. *J Dairy Sci.*, 85(11), 2759–2767.

Keating, K. R., & White, C. H. (1990). Effect of alternative sweeteners in plain and fruit-flavored yogurts. *J Dairy Science*, 73(1), 54–62.

Keogh, M. K., & O'Kennedy, B. T. (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *J Food Sci.*, 63(1), 108–112.

Khalid, N. M., & Marth, E. H. (1990). Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A Review. *J Dairy Sci.*, 73(10), 2669–2684.

Kilpper-Balz, R., Fischer, G., & Schleifer, K. H. (1982). Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Curr Microbiol.*, 7, 245–250.

Kjoniksen, A-L., Hiorth, M., & Nystrum, B. (2004). Temperature-induced association and gelation of aqueous solutions of pectin. A dynamic light scattering study. *Eur. Polymer J.*, 40, 2427–2435.

Kneifel, W., Jaros, D., & Erhard, F. (1993). Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. *Int J of Food Microbiol.*, 18, 179–189.

Koort, J, Murros, A., Coenye, T., Eerola, S., Vandamme, P., Sukura, A., & Bjoorkroth, J. (2005). *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. *Appl and Environ Microbiol.*, 71(8), 4400–4406.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P., & Tupasela, T. (1998). The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agric and Food Sci in Finland*, 7, 283–296.

Kothari, S. L., & Nambudripad, V. K. N. (1973). Casein as a necessary factor in the production of stimulatory material for associative growth of lactic streptococci. *Applied Microbiology*, 25(2), 212–215.

Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83, 437–446.

Kunji, E.R.S., Hagting, A., De Vries, C. J., Julliard., V., Haandrikman, A., Poolman, B., & Konings, W.N. (1996). Transport of β -casein peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Biol. Chemistry*, 270(4), 1569–1574.

Laligant, A., Famelart, M.-H., Paquet, D., & Brulef, G. (2003). Fermentation by lactic bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. II – Dynamic approach of the gel construction. *Lait*, 83, 307–320.

Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J Exp Med.*, 59, 571–595.

Laye, D., Karleskind, D., & Morr, C. V. (1993). Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. *J Food Science*, 58(5), 991–995.

Lee, S-Y., Morr, C. V. & Seo, A. (1990). Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J Food Sci.*, 55(2), 532–536.

Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., & Juillard, V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl and Environ Microbiol.*, 68(6), 3162–3165.

Levander, F., Svensson, M., & Raadstroom, P. (2001). Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. *BMC Microbiol.*, 1–23.

Lick, S., Drescher, K., & Heller, K. J. (2001). Survival of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated gottingen minipigs. *Appl and Environ Microbiol.*, 67(9), 4137–4143.

Lin, M. Y., & Yen, C. L. (1999). Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. *J Dairy Sci.*, 82(8), 1629–1634.

Lopez, M. C., Medina, L. M., & Jordano, R. (1998). Survival of lactic acid bacteria in commercial frozen yogurt. *J Food Sci.*, 63(4), 706–708.

Lyhs, U. Lactic acid bacteria associated with spoilage of the fish products. PhD, 2002, Helsinki. ISBN 952-10-0532-7.

Marteau, P., Minekus, M., & Havenaar, R. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci.*, 80(6), 1031–1037.

Marteau, P. R., Vrese, M. de, Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.*, 73(2), 430–436.

Martin, N. C., J. Skokanova, E. Latrille, C. Beal & G. Corrieu, G. (1999)a. Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yogurts. *J Sensory Studies*, 14, 139–160.

Martin, N. C., Skokanova, J., Latrille, E., Beal, C., & Corrieu, G. (1999)b. Sensory and instrumental characterization of the texture of stirred yoghurt. IDF, *Texture of Fermented mil products and dairy desserts*, 24–33.

Martini, M. C., Bollweg, G. L., Levitt, M. D., & Savaiano, D. A. (1987). Lactose digestion by yogurt β -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr.*, 45, 432–436.

McDonald, L. C., Fleming, H. P., & Hassan, H. M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl and Environ Microbiol.*, 56(7), 2120–2124.

McRorie, R. A., & Williams, W. L. (1951). Studies on the relationship between the *Lactobacillus bulgaricus* factor and pantothenic acid. *J Bacteriol.*, 61(6), 737–745.

Meydani, S. N., & Ha, W.-K. (2000). Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin. Nutr.*, 71, 861–872.

Mollet, B. (2001). For better health and nutrition. *Curr Opinon in Biotechnology*, 12, 481–482.

Mollet, B. (1999). Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry. *Int Dairy Journal*, 9, 11–15.

Mollet, B. (1996). New technologies in fermented milk. *Belg J Brewing and Biotechnology*, 21(1), 63–65.

Montes, R. G., Bayless, T. M., Saavedra, J. M., & Perman, J. A. (1995). Effect on milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *J Dairy Sci.*, 78, 1657–1664.

Moon, N. J., Hamann, A. C., & Reinbold, D. G. W. (1974). Recovery of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on nine commonly used agar media. *Appl Microbiology*, 28(6), 1076–1078.

Moreira, M., Abraham, A. & Antoni, G. De. (2000). Tehnological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *J Dairy Science*, 83(3), 395–400.

Mukherjee, K. K., & Hutkins, R. W. (1994). Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *J Dairy Sci.*, 77(10), 2839–2849.

Nabhan, M. A., Girardet, J.-M., Campagna, S., Gaillard, J.-L., & Le Roux Y. (2004). Isolation and characterization of copolymers of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, κ -casein, and α s1-casein generated by pressurization and thermal treatment of raw milk. *J Dairy Sci.*, 87(11), 3614–3622.

Nadathur, S. R., Gould, S. J., & Bakalinsky, A. T. (1994). Antimutagenicity of fermented milk. *J Dairy Sci.*, 77(11), 3287–3295.

Nannen, N. L., & Hutkins, R. W. (1991). Intracellular pH effects in lactic acid Bacteria. *J Dairy Sci.*, 74, 741–746.

Neviani, E., Divizia, R., Abbiati, E., & Gatti, M. (1995). Acidification activity of thermophilic lactobacilli under the temperature gradient of Grana cheese making. *J Dairy Sci.*, 78(6), 1248–1252.

Nighswonger, B. D., Brashears, M. M., & Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J Dairy Sci.*, 79(2), 212–219.

O'Leary, V. S., & Woychik, J. H. (1976). Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Appl and Environ Microbiol.*, 32(1), 89–94.

Oberg, C. J., & Broadbent, J. R. (1993). Thermophilic starter cultures: another set of problems. *J Dairy Sci.*, 76(8), 2392–2406.

Oberg, C. J., Weimer, B. C., Moyes, L. V., Brown, R. J., & Richardson, G. H. (1991)b. Proteolytic characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* strains by o-phthaldialdehyde test and amino acid analysis. *J Dairy Sci.*, 74(2), 398–403.

Olasupo, N. A., Schllinger, U., & Holzappel, W. H. (2001). Studies of some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food biotech.*, 15(3), 157–167.

Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeus, F., Tissier, J. P., & Corrieu, G. (2002). Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *J Food Sci.*, 67(6), 2336–2341.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., Tolkkio, S., Roberts, P., Ovaska, J., & Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin and Diagn Lab Immunol.*, 9(1), 184–186.

Pearce, L. E., Truong, H. T., Crawford, R. A., Yates G. F., Cavagnac S., & Lesle G. W. (2001). Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* added to raw milk. *Appl and Environ Microbiol.*, 67(9), 3964–3969.

Pearce, L. E., Skipper, N. A., & Jarvis, B. D. W. (1974). Proteinase activity in slow lactic acid-producing variants of *Streptococcus lactis*. *Appl Microbiology*, 27(5), 933–937.

Pedrosa, M. C., Golner, B. B., Goldin, B. R., Barakat, S., Dallal, G. E., & Russell, R. M. (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the

gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr.*, 61, 353–358.

Penna, A. L. B., Baruffaldu, R., & Oliveira, M. N. (1997). Optimization of yogurt production using demineralized whey. *J Food Sci.*, 62(4), 846–850.

Perdigon, G., Vintini, E., Alvarez, S., Medina, M., & Medici, M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 82(6), 1108–1114.

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., & Gobbato, N. (1995). Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci*, 78(7), 1597–1606.

Pereira, D. I. A., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl and Environ. Microbiol.*, 68(9), 4689–4693.

Perez, P. F., de Antoni, G. L., & Anon, M. C. (1991). Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures. *J Dairy Sci.*, 74(9), 2850–2854.

Perez, P. F., de Antoni, G. L., & Anon, M. C. (1990). An enzymatic method for determination of formate production by *Streptococcus thermophilus*. *J Dairy Sci.*, 73(10), 2697–2701.

Pérez, S., Mazeau, K., & Hervé du Penhoat, C. (2003). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides, *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 37–55.

Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85, 109–121.

Pernoud, S., Fremaux, C., Sepulchre, A., Corrieu, G., & Monnet, C. (2004). Effect of the metabolism of yrea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *J Dairy Sci.*, 87(3), 550–555.

Perry, D. B., McMahon, D. J., & Oberg, C. J. (1998). Manufacture of low fat mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures. *J Dairy Science*, 81(2), 563–566.

Pessi, T., Sutas, Y., Saxelin, M., Kallioinen, H., & Isolauri, E. (1999) Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl and Environ. Microbiol.*, 65(11), 4725–4728.

Petersen, B. L., Dave, R. I., McMahon, D. J., Oberg, C. J., & Broadbent, J. R. (2000). Influence of capsular and rropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *J Dairy Sci.*, 83(9), 1952–1956.

Phillips, G. O., and Williams, P. A. (2000). *Handbook of hydrocolloids*, CRC Press, Cambridge, England.

Pigeon, R. M., Cuesta, E. P., & Gilliland, S. E. (2002). Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci.*, 85(11), 2705–2710.

Plant, L., & Conway, P. (2001). Association of *Lactobacillus ssp.* with Peyer's patches in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 8(2), 320–324.

Pochart, P., Dewit, O., Desjeux, J.-F., & Bourlioux, P. (1989). Viable starter culture, β -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr*, 49, 828–831.

Pochart, P., Marteau P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., & Rambaud, J.-C. (1992). Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr.*, 55, 78–80.

Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E., & Schmidt, B. F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J Bacteriol.*, 171(1), 244–253.

Poolman, B. A., Driessen, J. M., & Konings, W. N. (1987). Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiological reviews*, 51(4), 498–508.

Postma, P.W., & Lengeler, J. W. (1985). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate photransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 49(3), 232–269.

Premi, L., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1972). Lactose-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus* species. *Appl Microbiology*, 24(1), 51–57.

Radke-Mitchel, L., & Sandine, W. E. (1986). Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci.*, 69(10), 2558–2568.

Ragout, A., & Sineriz, F. (1994). Influence of dilution rate on the morphology and technological properties of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 41, 461–464.

Rajagopal, S. N., & Sandine, W. E. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J Dairy Sci.*, 73(4), 894–899.

Ralet, M.-C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., & Thibault, J.F. (2001). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation,

polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties, *Carbohydr. Res.*, 336, 117–125.

Roberfroid, M. B. (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr.*, 71, 1660–1664.

Robins-Browne, R.M., Path, F. F., & Levine, M. M. (1981). The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. *Am J Clin Nutr.*, 34, 514–519.

Ross, S. (2000). Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *Am J Clin Nutr.*, 71 suppl., 1735–1738.

Rushing, N. B., Veldhuis, M. K., & Senn, V. J. (1956). Growth rates of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* species in orange juice as affected by pH and juice concentration. *Appl Microbiol.*, 1956, 4(2), 97–100.

Rutter, W. J., & Hansen, R. G. (1952). Lactose metabolism. I. Carbohydrate metabolism of *Lactobacillus bulgaricus* strain Gere A. *J Biol. Chem.*, 202(1), 311–321.

Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr.*, 73, 1147–1151.

Sakai, T., & Okushima, M. (1980). Microbial production of pectin from citrus peel, *Appl and Environ Microbiology*, 39(4), 908–911.

Salwa, A. A, Galal, E.A. & Neimat, A. E. (2004). Carrot yoghurt: sensory, chemical, microbiological properties and consumer acceptance. *P J Nutrition*, 3(6), 322–330.

Sanders, M. E., & Klaenhammer, T. R. (2001). Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci.*, 84, 319–331.

Sanders, M. E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr.*, 130(2), 384–390.

Savaiano, D. A., & Levitt, M. D. (1987). Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J Dairy Sci.*, 70(2), 397–406.

Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch U., & Neve, H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus*. *Syst Appl Microbiol.*, 14, 386–388.

Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics- approaching a definition. *Am J of Clin Nutr.*, 73(2), 361–364.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci.*, 83, 894–907.

Shah, N. P., & Jelen, P. (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J Food Sci.*, 55(2), 506–509.

Shahbal, S., Hemme, D., & Renault, P. (1993). Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains., *Appl. and Envir. Microbil.*, 59(1), 177–182.

Sherman, J. M., & Stark, P. (1938). The fermentation of disaccharides by *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.*, 36(1), 77–81.

Sherman, J.M. (1937). The streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 1, 3–97.

Simmering, R., & Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels? *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 55, 19–28.

Smiley, M. B., & Fryder V. (1978). Plasmids, lactic acid production, and N-acetyl-Dglucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus subsp. jugurti*. *App. and Environ. Microbiol.*, 35(4), 777–781.

Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health- a review. *P J Nutr.*, 1(1), 20–24.

Spiller, G. A., & Kay, R. M. (1979). Recommendations and conclusions of the dietary fiber workshop of the XI International Congress of Nutrition, Rio de Janeiro. *Am J Clin Nutr.*, 32, 2102–2013.

Spiller, G.A. (1991). Beyond dietary fiber. *Am L Clin Nutr.*, 54, 615–617.

Staffolo, D. M., Bertola, N., Martino, M., & Bevilacqua, A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *Int Dairy Journal*, 14, 263–268.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B., & Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr.*, 73, 476–483.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.*, 36, 1–29.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile hydrolase activity. *J Dairy Sci.*, 82(12), 2530–2535.

Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Appl and Environ Microbiol.*, 70(6), 3189–3194.

Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *J. Dairy Sci.*, 86(7), 2288–2296.

Thomas, T. D., & Crow, V. L. (1984). Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl and Environ Microbiol.*, 48(1), 186–191.

Thornhill, P. J., & Cogan, T. M. (1984). Use of gas-liquid chromatography to determine the end products of growth of lactic acid bacteria. *Appl and Environ Microbiol.*, 47, 1250–1254.

Titgemeyer, E. C., Bourquin, L. D., Fahey, G. C. Jr., & Garleb, K. A. (1991). Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *Am J Clin Nutr.*, 53, 1418–1424.

To, B. C. S., & Etzel, M. R. (1997). Spray drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J Food Sci.*, 62(3), 576–578.

Tsoga, A., Richardson, R. K., & Morris, E. R. (2004). Role of cosolutes in gelation of high methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols, *Food Hydrocolloids*, 18, 907–919.

Turner, K.W., & Martley, F. G. (1983). Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. *Appl and Environ Microbiol.*, 45(6), 1932–1934.

Van de Water, J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1999). The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J Nutr.*, 129, 1492–1495.

Vandamme P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Reviews*, 60(2), 407–438.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & Vuyst, L. de. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl and Environ Microbiol.*, 70(2), 900–912.

Varga, L., Szigeti, J., Kovacs, R., Foldes, T., & Buti, S. (2002). Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). *J Dairy Sci.*, 85(5), 1031–1038.

Vinderola, C.G, Costa, G. A., Regenhardt, S. & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int Dairy Journal*, 12, 579–589.

Vinderola, C.G., & Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *Int Dairy Journal*, 9, 497–505.

Vinderola, C.G., Mocchiutti, P., & Reinheimer, J. A. (2002). Interaction among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, 85(4), 721–729.

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *J Dairy Sci.*, 83(9), 1905–1911.

Vuyst, L. de. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.*, 38(2), 105–112.

Weiss, N., Schillinger, U., & Kandler, O. (1983). *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanii* and *Lactobacillus bulgaricus*. subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol.*, 4, 552–557.

Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci.*, 81, 597–608.

Wollowski, I., Ji, S.-T., Bakalinsky, A., Neudecker, C., & Pool-Zobel, B. L. (1999). Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr.*, 129, 77–82.

Wong, H. C., & Chen, Y. L. (1988). Effect of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl and Environ Microbiol.*, 54(9), 2179–2184.

Xanthopoulos, V., Petridis, D., & Tzanetakis, N. (2001). Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts. *J Food Science*, 66(5), 747–752.

Yu, W., Gillies, K., Kondo, J. K., Broadbent, J. R., & McKay, L. L. (1996). Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in lactococci: another reason for slow milk coagulation. *Plasmid*, 35(3), 145–155.