



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАМЕЛИЯ КИРИЛОВА ЛОГИНОВСКА

Технология за получаване на лиофилизирани биоактивни
продукти на основата на белтъчни хидролизати

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд за придобиване на образователна и
научна степен „Доктор“*

Област на висше образование: 5. Технически науки

Професионално направление: 5.12. Хранителни технологии

Докторска програма: „Технология на биологично активните
вещества

(вкл. ензими, хормони, белтъчини)

Научни ръководители:

проф. д-р Илиана Борисова Начева

доц. д-р Мария Дончева Донева - Николова

София, 2024г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от заседание на Разширен научен съвет към отдел „Криобиология и биологично активни вещества“, Институт по криобиология и хранителни технологии, София, проведен на 09.05.2024г.

Дисертационният труд е написан на 185 страници и съдържа 49 таблици и 43 фигури. Цитираната литература включва 243 източника, от които 22 на кирилица и 221 на латиница.

Номерацията на разделите, фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертацията.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 2024г. от часа в Заседателната зала на ИКХТ, София 1407, бул. “Черни връх“ 53.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Засиленият интерес към рационалното и здравословно хранене създава предпоставки за търсене на нови технологични решения при производството на храни и хранителни добавки. Актуална тенденция в тази област е получаването и използването на протеинови хидролизати от растителен и животински произход като източници на биоактивни пептиди. Хидролизиращият млечен протеин е бързо и напълно усвояема от човешкия организъм храна с биостимулативен ефект, а белтъкът от краве мляко е най-важният протеинов източник, използван при получаване на хидролизати. Нарастващото приложение на протеиновите хидролизати от мляко и млечни продукти под формата на протеинови добавки или клинични диетични формули налага оптимизиране на технологиите за тяхното производство.

Именно в тази актуална област са насочени изследванията в настоящия дисертационен труд, който е посветен на разработване на технология за получаване на нови лиофилизирани биоактивни продукти на основата на хидролизати от прясно краве мляко и суроватка.

Акцентът в разработката съдържа следните иновативни елементи:

- Използване на прясно краве мляко и суроватка, като отпаден продукт в качеството им на белтъчни субстрати за провеждане на ензимна хидролиза и превръщането им в продукти с висока добавена стойност.
- Оптимизиране на методи за ензимна хидролиза на казеинови и суроватъчни протеини с цел получаване на биоактивни хидролизати и пептиди. Установяване на влиянието на технологичните параметри – вид, време на действие и концентрация на протеолитични ензими върху степента на хидролиза на протеиновите субстрати.
- Установяване ефекта от добавянето на щамове млечнокисели бактерии *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447; *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 към хидролизирани белтъчни субстрати

върху времето за протичане на процеса на ферментация и преживяемостта на пробиотичните бактерии

- Определяне на оптималните параметри на процеса сублимационно сушене и прилагане на криопротектори за повишаване преживяемостта на бактериалните клетки във ферментиралите млечни и суроватъчни хидролизати след замразяване и лиофилизация.
- Създаване на оригинална технология за производство на биоактивни продукти на основата на млечни хидролизати.

Използването на протеинови хидролизати, като субстрат за ферментация с щамове млечнокисели бактерии е слабо проучено и наличната научна информация е оскъдна. Проведените експерименти доказват, че млечни хидролизати, получени чрез ензимна хидролиза и последваща млечнокисела ферментация са подходяща основа за получаване на хранителни продукти, съдържащи биоактивни пептиди, които могат да окажат положително влияние върху метаболитни функции на организма. Добавянето на щамове млечнокисели бактерии към млечните хидролизати допринася и за подобряване на функционалните им свойства, т.е. превръща ги в средство за поддържане баланса и за възстановяване на основната микрофлора на храносмилателната система на човека.

II. ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

От направения литературния преглед, могат да бъдат формулирани следните **обобщени изводи**:

✓ Установено е, че протеиновите хидролизати представляват интерес за хранително-вкусовата промишленост, поради благоприятното им въздействие върху човешкото здраве. Процесът на ензимна хидролиза се прилага за получаване на храни, обогатени с ниско молекулни протеинови компоненти и свободни аминокиселини, които се предпочитани при някои хранителни режими. Ензимните протеинови хидролизати, съдържащи пептиди с характерен аминокиселинен състав, са предпочитани за специализирано клинично хранене.

✓ Чрез хидролиза на протеини от животински или растителни източници могат да бъдат генерирани биоактивни пептиди. Здравословните ползи на пептидите се изразяват в антихипертензивно, антимикробно, антиоксидантно, имуномодулиращо и минерало-свързващо действие.

✓ Белтъкът от краве мляко е най-важният протеинов източник, използван при разработването на хидролизати и предназначен за хранителна терапия. Хидролизирания млечен протеин е бързо и напълно усвояема от човешкия организъм белтъчна храна с биостимулативен ефект. Установено е, че казеиновите и суроватъчните протеини освобождават пептиди по три начина: чрез храносмилателни ензими, чрез процеса ферментация и чрез действието на протеолитични ензими, получени от микроорганизми или растения.

✓ Качеството на суровото мляко и суроватка и съдържанието на сухо вещество в тях е от решаващо значение за качеството и свойствата на крайния продукт. Използването на суроватка за получаване на хидролизат с висока биологична стойност, все още не е достатъчно проучено и представлява интерес за науката и практиката.

✓ Пробиотичните млечнокисели бактерии за създаване на функционалния продукт от млечен хидролизат, трябва да бъдат в симбиотична връзка помежду си при съвместното им култивиране. Млечнокиселите пръчици проявяват по-висока протеолитична активност по сравнение със стрептококите. Съвместното култивиране между термофилния стрептокок и млечнокиселите пръчици се изразяват в продуцирането на повече свободни аминокиселини, особено есенциални, които са необходими и стимулират по-бързото размножаване на стрептококите. От своя страна, те отделят повече мравчена киселина в процеса на размножаване и по този начин повлияват положително развитието на лактобацилите. Подбраните комбинации от щамове млечнокисели бактерии трябва да бъдат устойчиви на условията в стомашно-чревния тракт на човека и да запазват по-продължително време характерните си морфологични качества.

✓ Проследяването и отчитането на технологичните параметри – рН, температура и време на действие на ензимите са от първостепенно значение за получаването на хидролизат с

биологично активни пептиди. От правилното и своевременно контролиране на ферментационния процес зависят жизнеспособността и броя на млечнокиселите пробиотични бактерии.

✓ Прилагането на съвременният метод на технологична обработка - сублимационно сушене е предпоставка за получаване на функционален пробиотичен продукт с висок титър на жизнеспособна микрофлора, дълготрайна съхраняемост и максимално изразен благоприятен ефект върху организма на човека.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е разработване на технология за получаване на нови лиофилизирани биоактивни продукти на основата на хидролизати от прясно краве мляко и суроватка.

ЗАДАЧИ

- Подбор на различни по произход протеолитични ензими за получаване на белтъчни хидролизати, като източник на биологично активни пептиди и определяне на тяхната ензимна активност.
- Подбор на подходящ субстрат за провеждане на хидролизен процес и получаване на белтъчни хидролизати.
- Провеждане на експерименти с различни щамове микроорганизми, с цел осигуряване на специфични характеристики в крайния ферментирал продукт по контролиран и предвидим начин.
- Провеждане на ферментационни експерименти с подбрани щамове млечнокисели бактерии в среди с млечен и суроватъчен хидролизат.
- Провеждане на процеса сублимационно сушене.
- Изследвания върху качествените показатели на получените функционални продукти - органолептични, биохимични и микробиологични показатели, с оглед определяне на техните здравни ползи.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

Експерименталната част и изследванията са проведени през периода 2019 - 2022 год. в Институт по криобиология и хранителни технологии и Централна лаборатория за химични изпитвания и контрол (ЦЛХИК) към Агенция по храните - гр. София.

1.1 Биологичен материал

1.1.1 Краве прясно мляко - сборно мляко от фермата на ИПЖЗ гр. Троян.

1.1.2 Суроватка от краве мляко - изследванията и експериментите са проведени със сборна суроватка получена от производство на бяло саламурено сирене от фермата на ИПЖЗ гр. Троян.

1.1.3 Протеолитични ензими :

Папаин (Papain, Technical Powder) закупен от MP Biomedicals, LLC, cat. № 102566, съхранение при температура 2-8°C - с растителен произход. Оптималната активност на папаин се проявява при pH 5.8–7.0. Ефективният температурен диапазон е 35-55°C.

Бромелин (Bromelain from pineapple steam) закупен от SERVA Electrophoresis GmbH, cat. №15250, съхранение при температура 2-8°C - с растителен произход. Оптималното pH за ензимна реакция на бромелина е 6–8,5 за повечето от неговите субстрати, а ефективният температурен диапазон е 40-65°C.

Химозин (CHY-MAX EXSTRA химозинова мая) закупена от фирма Admix LTD, партида 3478838, съхранение при температура 2-8°C - с животински произход. Условието за оптимално протичане на ензимната реакция са pH 5,5-6, а температурата е 36-40°C.

1.1.4 Щамове микроорганизми

- *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447
- *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450
- *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013

Монокултурите са закупени от Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури в лиофилизиран вид (НБПМКК).

1.1.5 Пребиотични компоненти:

- Гума Locust bean (E410), партиден № 4720/A02, фирма „Орион-Матеев“ ЕООД
- Пектин - фирма „Орион-Матеев“ ЕООД

➤ Захароза - фирма „Орион-Матеев“ ЕООД

1.2 Хранителни среди

1.2.1 Краве прясно мляко и суроватка от краве мляко - среда за провеждане на ензимна хидролиза, стерилизирани при 121°C за 6 min.

1.2.2 MRS broth (de man, Rogosa, Sharpe, Oxoid) - среда за възстановяване, активиране и инокулум на пробиотичните щамове *L. plantarum*, *L. gasseri* и *L. rhamnosus*.

1.2.3 MRS агар (Merck, Germany) за броене на колонии след ферментация и по време на съхранение след лиофилизация на щамове *L. plantarum*, *L. gasseri* и *L. rhamnosus*, pH на средата 6,8; стерилизация при 121°C за 15 min.

1.2.4 PCA (Himedia) - за определяне на общ брой микроорганизми (ОБМ)

1.2.5 Tryptone Bile X-glucuronide agar (Merck, Germany) - са изолиране и изброяване на *Escherichia coli*.

1.2.6 Baird-Parker агар (Himedia) - изолиране и преброяване на *Staphylococci*.

1.2.7 Агар на Сабуро с декстроза (Himedia) - за култивиране и преброяване на плесени и дрожди.

1.2.8 Среда за ферментация - 10% млечен или суроватъчен хидролизат, 2% лактоза, 0,5% дрождев екстракт, 4% глюкоза и dH₂O. pH на средата 6,8; стерилизация при 121°C за 6 min.

1.2.9 Криопротектираща среда за лиофилизация:

➤ 3% разтвор захароза и 2% разтвор пектин

➤ 0,1% разтвор на гума Locust bean (E410)

2. Методи за анализ

2.1 Органолептична оценка

Органолептичната оценка на изходната суровини суроватка от краве мляко и прясно краве мляко е извършена по показателите: външен вид, цвят, вкус и аромат (БДС - 15612-83). Разработените биоактивни продукти на основата на суроватъчен и млечен хидролизат са оценени органолептично по 9-балната Хедонична скала (Lim et al., 2009).

2.2 Физикохимични методи

- Определяне на сух безмаслен остатък на суроватка и краве мляко - на проточен анализатор „Milkoscan Conbfifoss 5000” и Milkotester.
- Определяне на сухо вещество на суроватка и краве мляко - на проточен анализатор „Milkoscan Conbfifoss 5000” и Milkotester
- Определяне на остатъчното влагосъдържание след лиофилизация (БДС 1109-89) - методът е модифициран, с използването на електронна везна “Sartorius” с инфрачервено загряване на пробите.
- Определяне на активната киселинност /pH/ – потенциометрично с pH – метър „CONSORT”, модел C830.
- Определяне на титруема киселинност – (БДС 1111-80).
- Определяне съдържанието на общ белтък – метод на Келдал (БДС 6231-73).
- Определяне съдържанието на мазнини – автоматично чрез апарат „Soxtec” (БДС 1671-89).
- Определяне на обща пепел - (БДС 6154-74)
- Енергийна стойност на 100g продукт - kJ /kcal/ - изчисляване на базата на химичния състав.

2.3 Биохимични методи

2.3.1 Определяне на ензимна активност - протеолитичната активност на ензимите папаин, бромелин и химозин е определена и изчислена по метода на Ансон.

2.3.2 Определяне на степен на хидролиза - методът се базира на реакцията на аминокиселините с нинхидрин хидрат ($C_9H_6O_4xH_2O$) при pH 5,0 и температура 100°C за стандартен период от време.

2.3.3 Определяне на антиоксидантна активност – антиоксидантният капацитет на суроватъчните и млечните хидролизати е определен по метода на Brand-Williams et al. (1995).

2.3.4 Определяне на аминокиселинен състав на биоактивните продукти - идентифицирането и количественото определяне на аминокиселини в крайните продукти е извършено чрез ултра високоефективна течна хроматография (HPLC) с помощта на Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, DAD.

2.3.5 Макроелементен и микроелементен състав - анализът е извършен на атомно-емисионен спектрофотометър „AES-ICP” в

Централна лаборатория за химични изпитвания и контрол (ЦЛХИК)
към Агенция по храните - гр. София.

2.4 Микробиологични методи

2.4.1 Култивиране (възстановяване и активиране)на шамове пробиотични бактерии за провеждане на експерименталната част.

2.4.2 Определяне на общ брой жизнеспособни клетки (CFU/ml) *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactocaseibacillus rhamnosus*, cfu/ml - БДС ISO 7889: 2005.

Етапи на отчитане на преживяемостта на пробиотичните бактерии:

➤ Непосредствено след приключване на ферментационния процес при култивиране в среда с краве прясно мляко и суроватка и получените от тях хидролизати с ензимите бромелин и папаин.

➤ Отчитане преживяемостта на пробиотичната млечнокисела микрофлора след лиофилизация с използване на два криопротектора.

➤ Отчитане на преживяемостта на млечнокиселите пробиотични бактерии по време на съхранение при три различни температурни режима - стайна температура, хладилни условия - 4°C и във фризер при -18°C.

2.4.3 Микробиологични изследвания на изходните суровини и продуктите - (БДС 1670-82).

2.4.3.1 Общ брой мезофилни аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми – CFU/ml, (БДС EN ISO 4833-1,2)

2.4.3.2 Млечнокисели бактерии, CFU/ml, (БДС ISO 15214)

2.4.3.3 Спори на микроскопични плесени и дрожди, CFU/ml, (БДС ISO 6611:2006)

2.4.3.4 *Escherichia coli* в 0.1 g от продукта (ISO 16649 -2:2004)

2.4.3.5 Коагулазоположителни стафилококи в 1.0 g от продукта (БДС EN ISO 6888-1)

2.5 Диференциален термичен анализ

Измерванията са проведени с DSC 204F1 Phoenix (Netzsch Gerätebau GmbH, Германия). Топлинният поток и температурата са калибрирани със стандарт на индий (температура на топене $T_m=156.6^{\circ}\text{C}$, енталпия на топене $H_m=28.5\text{ J/g}$) за всички стойности на използваните скорости на нагряване или охлаждане.

Първоначално образците са охлаждаани до -60°C със скорост 5 K/min , след което са нагрявани до 200°C със скорост 10 K/min .

2.6 Технологични методи

На базата на всички извършени анализи и отчетени резултати е разработена технологична схема за експериментално производство на два биоактивни продукта, включващи млечен или суроватъчен хидролизат, пробиотичен щам, показал най-високи стойности на преживяемост по време на ферментация и след процеса на лиофилизация, пребиотични компоненти, плодове и натурални подсладители.

2.6.1 Леофилизация

Сублимационното сушене е извършено в полупромишлена сублимационна инсталация „LYOBETA 6PL“ на фирмата TELSTAR.

2.7 Статистическа обработка на резултатите

Средните стойности и стандартното отклонение са изчислени от експерименталните данни за 3 повторения. Използвана е функцията t - test за статистическа достоверност на различието между отделните стойности. Резултатите са обработени с помощта на програмен продукт MS Office Excel 2007.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Подбор на различни по произход протеолитични ензими и определяне на ензимната им активност с цел получаване на белтъчни хидролизати, като източник на биологично активни пептиди.

За провеждане на серия експерименти по хидролизата на белтъчните компоненти в изходните субстрати са използвани три търговски протеази – *папаин*, *бромелин* и *химозин*. Определена е протеолитична им активност по метод на Ансон, при условия и рН на средата, специфични за дадения ензим. Получените резултати са посочени в таблица 1.

Таблица 1. Каталитична активност на използваните ензимни препарати

Ензим	Активност
Папаин	67550,00 U/g
Бромелаин	256475,00 U/g
Химозин	79,64 U/ml

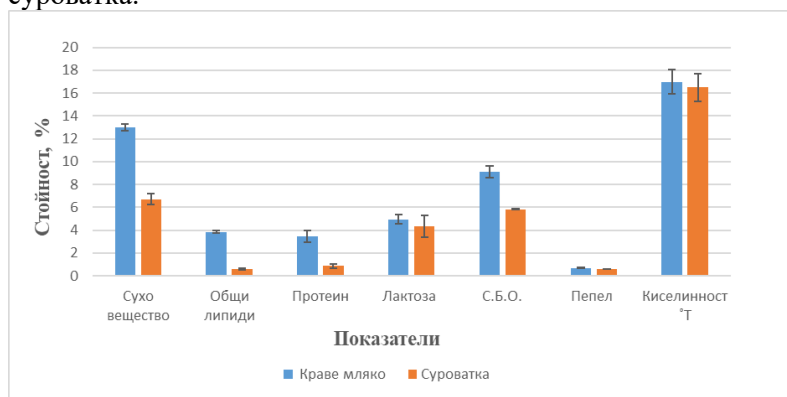
2. Подбор на подходящ белтъчен субстрат. Предварителни изследвания върху физикохимичните и органолептични показатели на прясно краве мляко и суроватка от краве мляко.

2.1 Органолептична оценка

Кравето прясно мляко представлява еднородна течност, без външни примеси и наличие на агломерати от маслени клъбца, с бял цвят с леко кремав оттенък. Суроватката е млечен серум с водниста консистенция с доминиращо бледо-жълт цвят, непривлекателен вкус и аромат, който се получава като отпадъчен продукт при производството на сирене.

2.2 Физикохимична оценка

На фигура 1 графично е показан сравнителен анализ на физикохимичните показатели между краве мляко и неговата суроватка.



Фигура 1. Сравнителен физикохимичен анализ между краве мляко и суроватка от краве мляко

Сравнителният физикохимичен анализ показва, че съдържанието на сухо вещество в кравето мляко е почти два пъти по-високо от това в суроватката. Съдържанието на протеини в

суроватката (α -лакталбумин и β -лактоглобулин) е по-ниско в сравнение с млякото, тъй като при производството на сирене основният млечен белтък – казеинът, коагулира под действието на сирищните ензими, като задържа повечето млечна мазнина и част от минералните соли и лактозата. Поради тази причина тя е бедна и на мазнини. Титруемата киселинност варира между 16-17°Т и при двата изходни субстрата.

2.3 Биохимична оценка

Експериментално е определен мастнокиселиния профил на краве прясно мляко и суроватка. Данните са представени в таблица 2.

Таблица 2. Съдържание на основни групи мастни киселини в краве прясно мляко и суроватката g/100g мазнина ($\bar{x} \pm \text{sd}$)

Групи мастни киселини, %	Краве мляко	Суроватка
Σ НМК	66,12 $\pm$ 0,26	52,76 $\pm$ 0,32
Σ МНМК	27,72 $\pm$ 0,45	31,46 $\pm$ 0,25
Σ ПНМК	5,76 $\pm$ 0,22	15,38 $\pm$ 0,42
Σ C-18:1trans	5,94 $\pm$ 0,15	
Σ CLA	2,56 $\pm$ 0,04	
Σ ω -3	1,13 $\pm$ 0,02	
Σ ω -6	2,85 $\pm$ 0,28	
ω -6/ ω -3	2,58	

Установено е високо съдържание на ваксенова киселина и CLA, но количеството на есенциалните ω -6 и ω -3 мастни киселини е ниско, в сравнение с други компоненти. Съотношението на ω -6/ ω -3 мастни киселини в кравето мляко има стойности по-ниски от 5.0, което го характеризира като мляко с нисък рисков фактор за човешкото здраве.

Съдържанието на наситени мастни киселини в суроватката е високо – почти 53% (g/100 g мазнина). Количеството на ненаситените мастни киселини е малко над 30 %. Много автори смятат, че ненаситените мастни киселини повишават биологичната

стойност на млечната мазнина в млякото и продуктите, получени от него.

2.4 Антиоксидантен капацитет

Антиоксидантният капацитет на изходните продукти – краве прясно мляко и суроватка е измерен чрез метод с DPPH със стандарт Trolox. Резултатите са представени като Trolox еквиваленти антиоксидантен капацитет (TE) mg /100 ml продукт в таблица 3.

Таблица 3. Антиоксидантна активност на прясно краве мляко и суроватка ($\bar{x} \pm sd$)

Изходна суровина	Антиоксидантна активност, mg TE/100 ml
Краве прясно мляко	2,21 $\pm$ 0,03
Суроватка от краве мляко	1,67 $\pm$ 0,02

2.5 Микробиологичен статус на изходните суровини - краве мляко и суроватка

Кравето прясно мляко и суроватка преминават пастеризация за 10 минути при температура 90-95°C преди използването им за следващи експерименти. По отношение на общ брой микроорганизми изходните суровини отговарят на изискванията на БДС EN ISO 4833-1, 2. Не е установено наличие на микроскопични плесени и дрожди.

3. Провеждане на експерименти по хидролизата на белтъчните компоненти на субстрата.

Ефективността на процеса хидролиза е оценена за всеки субстрат чрез модифициране на следните параметри:

- ензимна концентрация (0,1; 0,5 и 1 mg/ml за папаин и бромелин и 1; 5 и 10 μ l/ml за химозин)
- времето за реакция върху изходните протеинови субстрати – 10, 20, 30 и 60 мин.

Вариантите хидролизати и съкращенията на получените проби са показани в таблици 4 и 5.

Таблица 4. Варианти хидролизати от краве прясно мляко

Ензим	Концентрация на ензима	Време на хидролиза (min)	Вариант проба
Папаин	0,1 mg/ml	10	МП1
		20	МП2
		30	МП3
		60	МП4
	0,5 mg/ml	10	МП5
		20	МП6
		30	МП7
		60	МП8
	1 mg/ml	10	МП9
		20	МП10
		30	МП11
		60	МП12
Бромелин	0,1 mg/ml	10	МБ1
		20	МБ2
		30	МБ3
		60	МБ4
	0,5 mg/ml	10	МБ5
		20	МБ6
		30	МБ7
		60	МБ8
	1mg/ml	10	МБ9
		20	МБ10
		30	МБ11
		60	МБ12
Химозин	1 µl/ml	10	МХ1
		20	МХ2
		30	МХ3
		60	МХ4
	5 µl /ml	10	МХ5
		20	МХ6
		30	МХ7
		60	МХ8
	10 µl /ml	10	МХ9
		20	МХ10
		30	МХ11
		60	МХ12

Таблица 5. Варианти хидролизати от суроватка

Ензим	Концентрация на ензима	Време на хидролиза (min)	Вариант проба
Папаин	0,1 mg/ml	10	СП1
		20	СП2
		30	СП3
		60	СП4
	0,5 mg/ml	10	СП5
		20	СП6
		30	СП7
		60	СП8
	1 mg/ml	10	СП9
		20	СП10
		30	СП11
		60	СП12
Бромелин	0,1 mg/ml	10	СБ1
		20	СБ2
		30	СБ3
		60	СБ4
	0,5 mg/ml	10	СБ5
		20	СБ6
		30	СБ7
		60	СБ8
	1mg/ml	10	СБ9
		20	СБ10
		30	СБ11
		60	СБ12
Химозин	1 µl/ml	10	СХ1
		20	СХ2
		30	СХ3
		60	СХ4
	5 µl /ml	10	СХ5
		20	СХ6
		30	СХ7
		60	СХ8
	10 µl /ml	10	СХ9
		20	СХ10
		30	СХ11
		60	СХ12

3.1 Биохимични изследвания на получените хидролизати

Степен на хидролиза

Определена е степента на хидролиза /DH/ като резултата е изразен в процент на хидролизираните пептидни връзки. Резултатите са представени в таблици 6 и 7.

Таблица 6. Степен на хидролиза на проби с прясно мляко ($x \pm sd$)

Вариант	DH, %	Вариант	DH, %	Вариант	DH, %
МП1	2,56 $\pm$ 0,02	МБ1	6,46 $\pm$ 0,12	МХ1	4,66 $\pm$ 0,06
МП2	2,88 $\pm$ 0,03	МБ2	7,94 $\pm$ 0,14	МХ2	4,70 $\pm$ 0,07
МП3	3,15 $\pm$ 0,05	МБ3	9,00 $\pm$ 0,19	МХ3	5,58 $\pm$ 0,09
МП4	3,39 $\pm$ 0,04	МБ4	10,16 $\pm$ 0,24	МХ4	6,35 $\pm$ 0,08
МП5	8,11 $\pm$ 0,12	МБ5	30,46 $\pm$ 0,36	МХ5	8,50 $\pm$ 0,09
МП6	8,43 $\pm$ 0,16	МБ6	30,77 $\pm$ 0,34	МХ6	8,93 $\pm$ 0,1
МП7	10,18 $\pm$ 0,14	МБ7	34,24 $\pm$ 0,38	МХ7	9,53 $\pm$ 0,12
МП8	10,86 $\pm$ 0,17	МБ8	34,42 $\pm$ 0,4	МХ8	9,80 $\pm$ 0,11
МП9	24,05 $\pm$ 0,31	МБ9	37,93 $\pm$ 0,41	МХ9	8,29 $\pm$ 0,10
МП10	24,50 $\pm$ 0,29	МБ10	39,51 $\pm$ 0,46	МХ10	8,49 $\pm$ 0,12
МП11	24,74 $\pm$ 0,30	МБ11	42,82 $\pm$ 0,52	МХ11	9,37 $\pm$ 0,14
МП12	28,76 $\pm$ 0,41	МБ12	46,14 $\pm$ 0,57	МХ12	12,18 $\pm$ 0,18

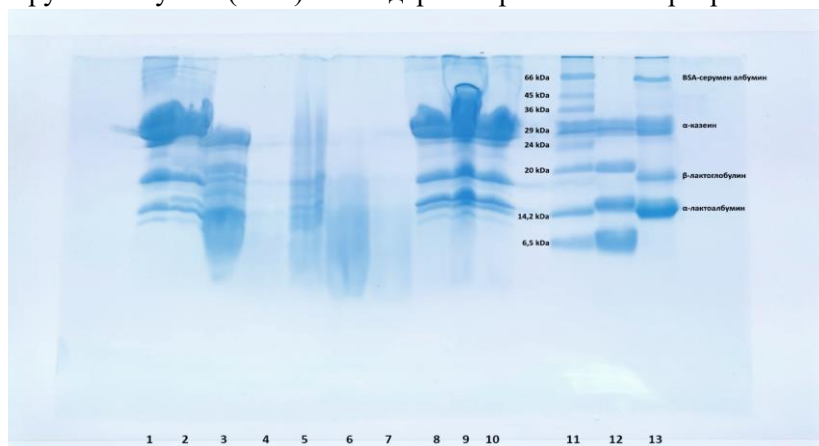
Таблица 7. Степен на хидролиза на проби със суроватка ($x \pm sd$)

Вариант	DH, %	Вариант	DH, %	Вариант	DH, %
СП1	33,22 $\pm$ 0,52	СБ1	28,88 $\pm$ 0,32	СХ1	13,18 $\pm$ 1,51
СП2	33,81 $\pm$ 0,51	СБ2	29,19 $\pm$ 0,38	СХ2	15,62 $\pm$ 1,59
СП3	35,16 $\pm$ 0,54	СБ3	30,24 $\pm$ 0,46	СХ3	15,62 $\pm$ 1,58
СП4	41,63 $\pm$ 0,65	СБ4	31,91 $\pm$ 0,48	СХ4	19,77 $\pm$ 1,61
СП5	60,43 $\pm$ 1,52	СБ5	47,02 $\pm$ 0,71	СХ5	29,03 $\pm$ 1,73
СП6	60,78 $\pm$ 1,55	СБ6	49,77 $\pm$ 0,70	СХ6	32,66 $\pm$ 1,85
СП7	62,02 $\pm$ 1,68	СБ7	54,81 $\pm$ 0,68	СХ7	32,82 $\pm$ 2,04
СП8	63,22 $\pm$ 1,72	СБ8	58,18 $\pm$ 0,74	СХ8	34,84 $\pm$ 2,12
СП9	60,39 $\pm$ 1,54	СБ9	54,54 $\pm$ 0,67	СХ9	40,31 $\pm$ 1,98
СП10	73,80 $\pm$ 1,72	СБ10	56,05 $\pm$ 0,72	СХ10	45,78 $\pm$ 2,37
СП11	74,57 $\pm$ 1,78	СБ11	60,66 $\pm$ 0,85	СХ11	47,36 $\pm$ 2,56
СП12	75,62 $\pm$ 1,83	СБ12	74,45 $\pm$ 0,92	СХ12	47,36 $\pm$ 2,95

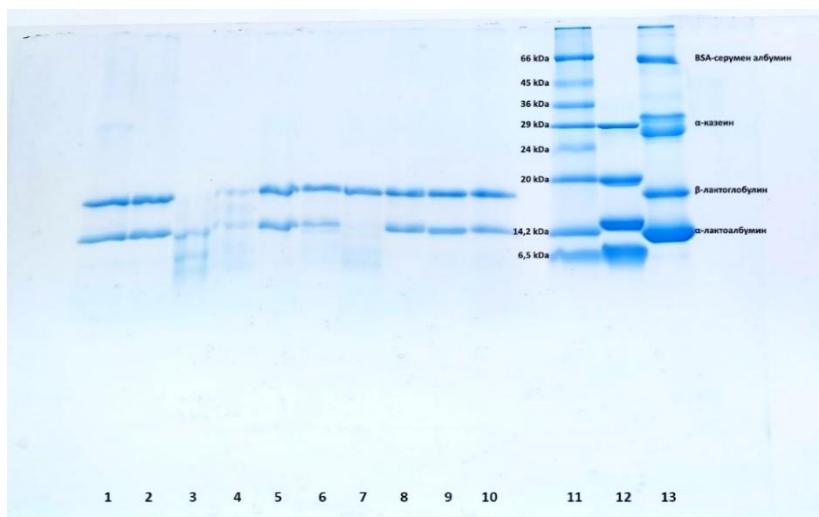
Най-ниска степен на хидролиза се отчита при проба прясно мляко МП1 (10 минути обработка с 0,1 mg/ml папаин), а най-висок процент е получен от бромелин с висока концентрация при хидролизат МБ12 (1 mg/ml, 60-та минута на обработка). За пробите от суроватка, процентът хидролиза при проба CX1 (химозин 1 μ l/ml при 10 минути реакционно време) е само 13,18 %. Най-висок процент е постигнат при хидролизат СП12 с използване на папаин в 1 mg/ml .

3.2 Електрофоретичен анализ на получените белтъчни хидролизати

За установяване изменението в състоянието на белтъчните вещества при вариантите краве мляко и суроватка (фигура 2 и 3) е проведена полиакриламидна SDS електрофореза. За сравнение са дадени β -лактоглобулин (β -Lg), α -лакталбумин (α -La), α -казеин и серумен албумин (BSA) и стандартни протеинови маркери.



Фигура 2. SDS - PAGE на протеинови хидролизати от краве мляко
1- Прясно мляко, 2- МП4, 3- МП8, 4- МП12, 5- МБ4, 6- МБ8, 7- МБ12, 8- МХ4, 9 -МХ8, 10 -МХ12, 11- Протеинов маркер (SigmaMarker low range), 12- Протеинов маркер (protein test mixture 5- SERVA), 13- BSA (серумен албумин), α -казеин, β -лактоглобулин, α -лакталбумин.



Фигура 3. SDS - PAGE на протеинови хидролизати от суроватка
 1- Суроватка, 2 -СП4, 3- СП8, 4- СП12, 5- СБ4, 6- СБ8, 7- СБ12, 8- СХ4, 9- СХ8, 10- СХ12, 11- Протеинов маркер (SigmaMarker low range), 12- Протеинов маркер (protein test mixture 5- SERVA), 13- BSA (серумен албумин), α -казеин, β - лактоглобулин, α -лакталбумин

При хидролизатите, получени след обработка с ензимите папаин и бромелин се вижда, че получените продукти са претърпели протеолитично разграждане.

Основните протеинови компоненти на млякото са напълно разградени след третиране с папаин и бромелаин в концентрация 1mg/m.

Електрофореграмите на вариантите суроватка обработени с папаин и бромелаин показват значителни промени в количеството на фракциите α -лакталбумин и β -лактоглобулин.

Не се отчита съществена разлика в протеиновия профил на вариантите, обработени с химозин.

3.3 Антиоксидантен капацитет

Антиоксидантната активност на получените хидролизати от краве прясно мляко и суроватка са представени в таблици 8 и 9.

Таблица 8. Антиоксидантен капацитет на хидролизати от мляко получени с ензимите папаин, бромелин и химозин ($x \pm sd$).

Ензим	Концентрация на ензима	Време на хидролиза (min)	Вариант проба	Антиоксидантна активност (mg TE/100 ml)
Папаин	0,1 mg/ml	10	МП1	4,38 $\pm$ 0,03
		20	МП2	4,58 $\pm$ 0,05
		30	МП3	5,94$\pm$0,04
		60	МП4	4,86 $\pm$ 0,29
	0,5mg/ml	10	МП5	5,88 $\pm$ 0,32
		20	МП6	7,57 $\pm$ 0,29
		30	МП7	9,31$\pm$0,36
		60	МП8	8,40 $\pm$ 0,06
	1mg/ml	10	МП9	5,26 $\pm$ 0,03
		20	МП10	5,67 $\pm$ 0,05
		30	МП11	5,90$\pm$0,12
		60	МП12	5,58 $\pm$ 0,17
Бромелин	0,1 mg/ml	10	МБ1	9,37 $\pm$ 0,23
		20	МБ2	9,74 $\pm$ 0,09
		30	МБ3	11,32$\pm$0,41
		60	МБ4	10,57 $\pm$ 0,37
	0,5mg/ml	10	МБ5	7,56 $\pm$ 0,26
		20	МБ6	7,72 $\pm$ 0,11
		30	МБ7	9,36$\pm$0,15
		60	МБ8	8,76 $\pm$ 0,09
	1mg/ml	10	МБ9	6,97 $\pm$ 0,07
		20	МБ10	7,20 $\pm$ 0,13
		30	МБ11	7,31$\pm$0,18
		60	МБ12	6,93 $\pm$ 0,08
Химозин	1 μ l/ml	10	МХ1	3,26 $\pm$ 0,02
		20	МХ2	3,38 $\pm$ 0,04
		30	МХ3	3,61$\pm$0,03
		60	МХ4	3,54 $\pm$ 0,07

	5 μ l /ml	10	MX5	3,43 $\pm$ 0,08
		20	MX6	3,73 $\pm$ 0,11
		30	MX7	4,07 $\pm$ 0,12
		60	MX8	4,26$\pm$0,16
	10 μ l /ml	10	MX9	4,03 $\pm$ 0,13
		20	MX10	4,40 $\pm$ 0,20
		30	MX11	4,61 $\pm$ 0,23
		60	MX12	4,90$\pm$0,22

Резултатите показват, че при всички изследвани протеинови хидролизати от мляко е установена по-висока антиоксидантна активност, спрямо изходния субстрат (2,21mg TE/100 ml). Най-висока антиоксидантна активност е отчетена при вариант мляко хидролизирано с 0,1 mg/ml с бромелин за 30 мин.

Групата от проби суроватка, хидролизирана с ензима папаин, проявява по-висока антиоксидантна активност в сравнение с хидролизатите, получени с ензимите бромелин и химозин. Най-висока стойност е установена с 0,5 mg/ml папаин за 30 мин.

Ензима химозин оказва слабо въздействие на процеса на хидролиза и антиоксидантната активност в тази група проби е най-слабо изразена.

Таблица 9. Антиоксидантен капацитет на хидролизати от суроватка с ензими папаин, бромелин и химозин ($\bar{x}\pm sd$).

Ензим	Концентрация на ензима	Време на хидролиза (min)	Вариант проба	Антиоксидантна активност (mg TE/100 ml)
Папаин	0,1 mg/ml	10	СП1	2,30 $\pm$ 0,03
		20	СП2	2,55 $\pm$ 0,06
		30	СП3	3,07$\pm$0,05
		60	СП4	2,91 $\pm$ 0,01
	0,5mg/ml	10	СП5	5,62 $\pm$ 0,11
		20	СП6	6,80 $\pm$ 0,12
		30	СП7	7,83$\pm$0,21
		60	СП8	6,19 $\pm$ 0,19
	1mg/ml	10	СП9	5,36 $\pm$ 0,16
		20	СП10	5,46 $\pm$ 0,09
		30	СП11	6,15$\pm$0,18
		60	СП12	5,71 $\pm$ 0,21

Бромелаин	0,1 mg/ml	10	СБ1	3,12±0,04
		20	СБ2	3,46±0,05
		30	СБ3	4,06±0,16
		60	СБ4	3,80±0,08
	0,5mg/ml	10	СБ5	4,53±0,22
		20	СБ6	4,78±0,25
		30	СБ7	4,99±0,32
		60	СБ8	4,76±0,33
	1mg/ml	10	СБ9	2,32±0,02
		20	СБ10	2,39±0,07
		30	СБ11	3,08±0,25
		60	СБ12	2,90±0,05
Химозин	1 µl/ml	10	СХ1	2,23±0,08
		20	СХ2	2,31±0,09
		30	СХ3	2,55±0,12
		60	СХ4	2,82±0,17
	5 µl /ml	10	СХ5	2,38±0,15
		20	СХ6	2,54±0,26
		30	СХ7	3,05±0,22
		60	СХ8	3,19±0,24
	10 µl /ml	10	СХ9	3,36±0,29
		20	СХ10	2,30±0,03
		30	СХ11	2,55±0,06
		60	СХ12	3,07±0,05

Групата от проби суроватка, хидролизирана с ензима папаин, проявява по-висока антиоксидантна активност в сравнение с хидролизатите, получени с ензимите бромелин и химозин. Най-висока стойност е установена с 0,5 mg/ml папаин за 30 мин. Ензима химозин оказва слабо въздействие на процеса на хидролиза и антиоксидантната активност в тази група проби е най-слабо изразена. Всички варианти хидролизати проявяват по-висока антиоксидантна активност от нативния субстрат (1,67 mg TE/100 ml).

Въз основа на получените резултати в следващите изследвания и дейности бяха използвани млечни и суроватъчни

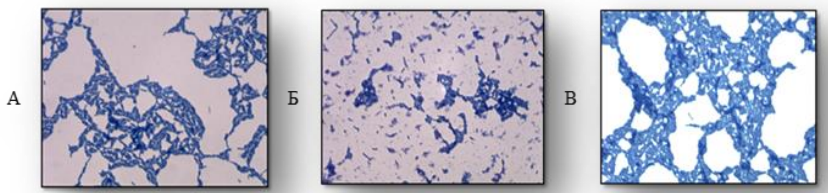
хидролизати показали най-висок антиоксидантен капацитет, а именно:

- Хидролизати, получени чрез хидролиза на прясно краве мляко с ензима бромелин в концентрации 0,1mg/ml, 0,5mg/ml и 1,0mg/ml и в продължение на 30 min
- Хидролизати, получени чрез хидролиза на суроватка от мляко с ензима папаин в концентрации 0,1mg/ml, 0,5mg/ml и 1,0mg/ml и в продължение на 30 min

4 Ферментация с подобрани щамове млечнокисели бактерии и получаването на функционални продукти с нови физиологични ефекти.

4.1 Възстановяване и активиране на бактериалните култури

За ферментационните експерименти са избрани три пробиотични щамове млечнокисели бактерии с доказано полезно за здравето свойство *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 (А), *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 (Б) и *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 (В) (фигура 4).



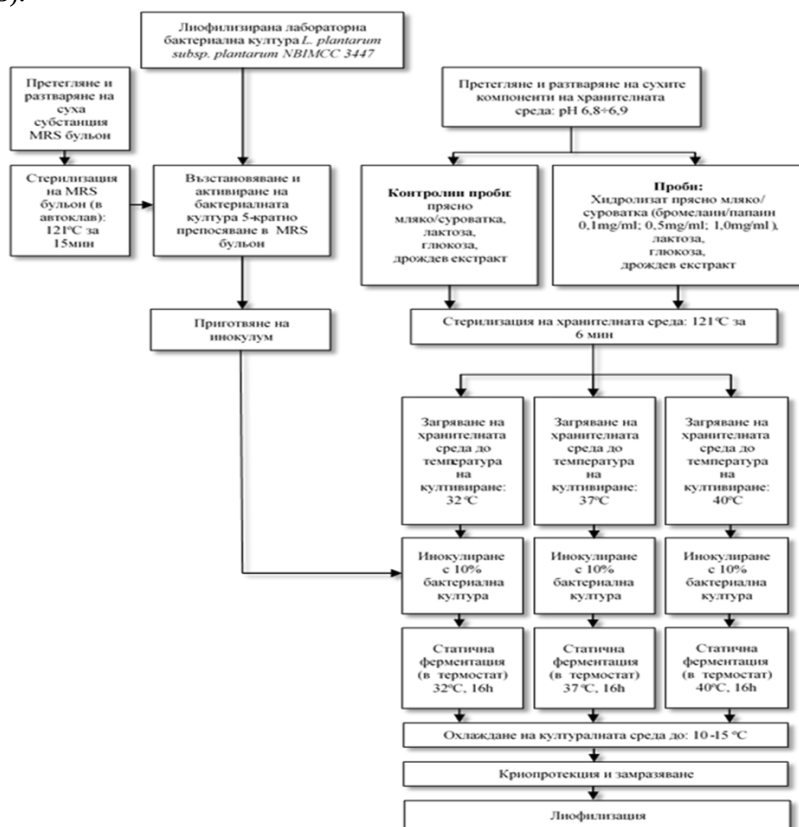
Фигура 4. Микроскопска снимка на пробиотични щамове

За тяхното възстановяване и активиране е използван MRS бульон (de man, Rogosa, Sharpe, Oxoid) предварително стерилизиран. Активираните пробиотични щамове в количество от 5-10% се култивират в предварително стерилизиран MRS бульон, статично при температура 37°C за 16-18 часа. След приключване на процеса на култивиране, технологичният статус на културите се оценява чрез определяне на общ брой жизнеспособни клетки (CFU/ml) и чрез микроскопски анализ за изследване на морфологията на клетките.

4.2 Определяне на технологични параметри за протичане на ферментацията

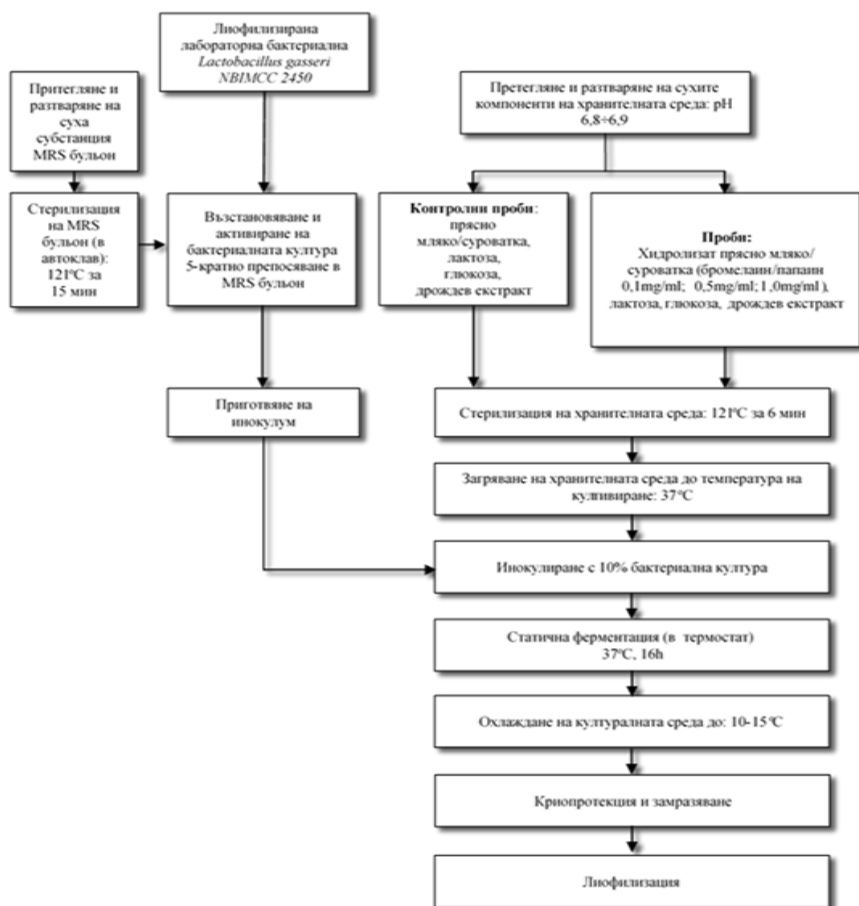
Създадени са технологични схеми на ферментационния процес за всеки щам поотделно.

Тъй като щам *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 е изолиран от кисело зеле, което предполага широки граници за вариране на температура на култивиране и в технологичната схема за култивиране на щама са заложили и експериментирани три температурни режима - 32°C, 37°C и 40°C с цел определяне на оптималната температура за нашите цели (фигура 5).



Фигура 5. Технологична схема за ферментация на щам *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447

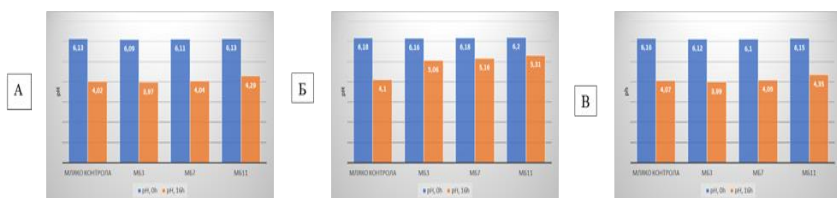
Щам *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 е изолиран от фекалии, а *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 е изолиран от ферментирани млечни продукти и в сертификата от НБПМКК е указана оптимална температура за култивиране - 37°C. В технологичната схема е приложен само един температурен режим.



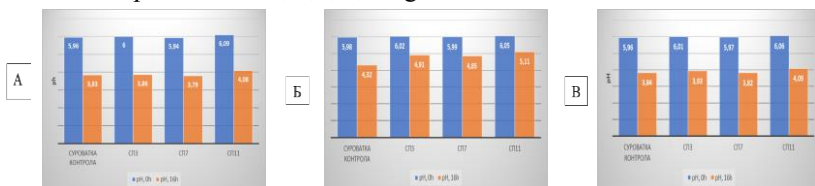
Фигура 6. Технологична схема за ферментация на щам *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450

Основните етапи в култивирането на пробиотичните щамове са: възстановяване и активиране на бактериалните култури; приготвяне на инокулум и инокулиране в хранителна среда; статична ферментация; охлаждане на културалната среда; криопротектиране и замразяване и сублимационно сушене.

Данните от отчетената активната киселинност на средата в началото и в края на ферментационния процес с участието на пробиотичните щамове са представени на фигури 7 и 8.



Фигура 7. Промяна на активната киселинност на ферментационната среда с участието на А – *L. plantarum*, Б – *L. gasseri* и В – *L. rhamnosus* при култивирането им в мляко и хидролизати от прясно мляко с концентрации на ензима бромелаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.



Фигура 8. Промяна на активната киселинност на ферментационната среда с участието на А – *L. plantarum*, Б – *L. gasseri* и В – *L. rhamnosus* при култивирането им в суроватка и хидролизати от суроватка с концентрации на ензима папаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Критерий за приключване на ферментационния процес е достигане на рН по-ниско от 5

Резултатите показват, че активната киселинност в процеса на ферментация плавно намалява и достига тази стойност в края на ферментационния процес при *L. plantarum* и *L. rhamnosus*. Има забавяне на киселинообразуващата активност при щам *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 (рН на 16 час е над 5,00) в сравнение с другите два щам.

Жизнеспособните клетки на пробиотичните бактерии са преброени на твърда хранителна среда - MRS агар чрез дълбочинна посевка (фигура 9).



Фигура 9. Дълбочинна посевка в MRS агар на А - *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, Б - *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450, В - *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013

Броят на жизнеспособните клетки на трите изследвани пробиотични бактерии, отчетени в процеса на култивиране в мляко и суроватка и в техните протеинови хидролизати при различни температурни режими са посочени на таблици 10, 11, 12 и 13.

Таблица 10. Брой жизнеспособни клетки *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 при култивиране в мляко и хидролизати от прясно мляко с концентрации на ензима бромелаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преживяемост след ферментация					
	32°C		37°C		40°C	
	CFU/ml	log	CFU/ml	log	CFU/ml	log
Мляко контрола	$9,7 \times 10^8$	8,98	$1,2 \times 10^9$	9,08	$4,2 \times 10^8$	8,62
МБ3	$1,3 \times 10^9$	9,11	$1,6 \times 10^{10}$	10,20	$8,5 \times 10^8$	8,93
МБ7	$8,1 \times 10^8$	8,91	$1,9 \times 10^9$	9,28	$3,9 \times 10^8$	8,59
МБ11	$1,7 \times 10^8$	8,23	$9,7 \times 10^8$	8,99	$8,7 \times 10^7$	7,93

Таблица 11. Брой жизнеспособни клетки *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 при култивиране в мляко и хидролизати от прясно мляко с концентрации на ензима бромелаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преживяемост след ферментация, 37°C			
	<i>L. gasseri</i>		<i>L. rhamnosus</i>	
	CFU/ml	log	CFU/ml	log
Мляко контрола	$4,0 \times 10^8$	8,60	$1,1 \times 10^9$	9,04
МБ3	$1,5 \times 10^9$	9,18	$8,2 \times 10^9$	9,91
МБ7	$1,8 \times 10^9$	9,25	$2,6 \times 10^9$	9,41
МБ11	$8,5 \times 10^8$	8,92	$9,3 \times 10^8$	8,97

Представените резултати показват, че процеса на култивиране и на трите пробиотични щама е протекъл успешно в среда на хидролизирано мляко.

За хидролизатите култивирани с щам *Lactiplantibacillus plantarum*, по-високи стойности преживяемост се отчита при температура 37°C. Най-висока от $1,6 \times 10^{10}$ CFU/ml (log 10,20) се отчита при проба МБ3 (0,1mg/ml).

За *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 най-висока преживяемост $8,2 \times 10^9$ CFU/ml (log 9,91) е отчетена при същия вариант хидролизат (0,1mg/ml ензим).

При *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 се наблюдава по-ниска преживяемост $1,8 \times 10^9$ CFU/ml (log 9,25).

Таблица 12. Брой жизнеспособни клетки *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 при култивиране в среда със суроватка и хидролизати от суроватка с концентрации на ензима папаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преживяемост след ферментация					
	32°C		37°C		40°C	
	CFU/ml	log	CFU/ml	log	CFU/ml	log
Суроватка контрола	$8,4 \times 10^8$	8,92	$1,4 \times 10^9$	9,15	$3,4 \times 10^8$	8,53
СПЗ	$8,6 \times 10^8$	8,93	$1,6 \times 10^9$	9,20	$4,2 \times 10^8$	8,62
СП7	$9,5 \times 10^8$	8,98	$3,0 \times 10^9$	9,48	$5,5 \times 10^8$	8,74
СП11	$5,1 \times 10^7$	7,71	$3,1 \times 10^8$	8,50	$1,1 \times 10^7$	7,04

Таблица 13. Брой жизнеспособни клетки *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 при култивиране в суроватка и хидролизати от суроватка с концентрации на ензима папаин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преживяемост след ферментация, 37°C			
	<i>L. gasseri</i>		<i>L. rhamnosus</i>	
	CFU/ml	log	CFU/ml	log
Суроватка контрола	4×10^8	9,04	$3,9 \times 10^8$	8,59
СПЗ	$1,3 \times 10^9$	9,11	$1,1 \times 10^9$	9,04
СП7	$1,6 \times 10^9$	9,20	$2,1 \times 10^9$	9,32
СП11	$2,3 \times 10^8$	8,36	$6,9 \times 10^8$	8,84

Подобно на ферментацията в млечни хидролизати и при суроватъчните хидролизати наблюдаваме най-висока ферментативна способност на щам *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 при температура 37°C.

Най-висока жизнеспособност на клетките отчитаме в пробите третиран с ензима папаин в концентрация 0,5mg/ml.

От получените резултати и отчетената по-ниска преживяемост на *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 следващите ферментационни опити ще продължат с *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013.

4.3 Подбор и приложение на криопротектор

Изследвано е въздействието на два криопротектори върху пробиотични бактерии след лиофилизация.

I - 3% захароза, 2% пектин и 95% dH₂O.

II - 0,1% разтвор Locust bean гума (E410)

Количеството криопротекторна среда е 10% от количеството на културалната течност предварително стерилизирана в автоклав за 15 мин при 121°C.

4.4 Замразяване и сублимационно сушене на пробиотичните култури след ферментация

Процесът е осъществен в полупромишлена сублимационна инсталация „LYOBETA 6PL“ на фирмата TELSTAR. Вариантите са предварително замразени при температура от -30 до -35°C в хладилна инсталация. Лيوфилизацията преминава към втора фаза - сублимация (отвеждане на водата при - 22°/-25°C под дълбок вакуум) и накрая процеса завършва с трета фаза - десорбция (доизсушаване) чрез нагряване при положителни температури до +28 до + 30°C.

4.5 Преживяемост на млечнокиселата микрофлора след лиофилизация.

Проследена е преживяемостта на пробиотичните бактерии след лиофилизация с използване на два криопротектора. Резултатите от изследването за брой жизнеспособни клетки на *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus*

rhamnosus NBIMCC 1013 с хидролизати от прясно мляко са представени в таблица 14 и 15.

Таблица 14. Преживяемост след лиофилизация на *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum NBIMCC 3447* при култивиране с хидролизати от прясно мляко с концентрации на ензима бромелин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преди лиофилизация log	След лиофилизация			
		1 вариант криопротектор		2 вариант криопротектор	
		log	% преживяемост	log	% преживяемост
Мляко контрола	9,08	8,99	81,3	8,97	77,5
МБ3	10,20	10,13	84,9	10,18	94,0
МБ7	9,28	9,16	76,0	9,20	84,2
МБ11	8,99	8,85	73,5	8,89	79,8

Таблица 15. Преживяемост след лиофилизация на *Lactiseibacillus rhamnosus NBIMCC 1013* при култивиране с хидролизати от прясно мляко с концентрации на ензима бромелин 0,1; 0,5; 1,0 mg/ml.

Проби	Преди лиофилизация log	След лиофилизация			
		1 вариант криопротектор		2 вариант криопротектор	
		log	% преживяемост	log	% преживяемост
Мляко контрола	9,04	8,95	80,5	8,93	78,0
МБ3	9,91	9,83	82,3	9,88	91,5
МБ7	9,41	9,27	71,5	9,33	83,0
МБ11	8,97	8,80	68,0	8,86	77,6

Във всички проби с включен хидролизат се отчита по-висока преживяемост на пробиотичните щамове с използване на криопротектор 2 - гума Локуст бийн. Наблюдаваме тенденция на понижаване на броя жизнеспособни клетки с повишаване концентрацията на ензима за получаване на хидролизат. От получените резултати се вижда, че Локуст бийн проявява по-добри

криопротективни свойства в процеса на замразяване на пробите с хидролизат, като запазва целостта на клетките, които успешно преживяват процеса на лиофилизация.

4.6 Антиоксидантна активност на избрани хидролизати, включени в хранителната среда за култивиране на двата пробиотични щама *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013.

Резултатите за антиоксидантна активност на културалната среда със и без млечен или суроватъчен хидролизат след приключване на ферментационния процес с *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 са показани в таблица 16 и 17.

Таблица 16. Антиоксидантна активност на културалната среда на мляко и неговите хидролизати след ферментация.

Проба	TEAA mg/100 ml	Проба	TEAA mg/100 ml
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с мляко	13,94	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с мляко	12,82
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с МБ 3	21,28	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с МБ 3	20,49
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с МБ 7	16,95	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с МБ 7	16,30
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с МБ 11	12,87	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с МБ 11	12,43

Културалната течност на пробиотичните щамове в среда с нехидролизирано мляко показва по-слаба антиоксидантна активност в сравнение с пробите, където бактериите са преминали ферментация в среда с включени млечни хидролизати. При хидролизата на млякото с ензима бромелин се наблюдава разграждане на млякото до нискомолекулни пептиди, които безпроблемно се усвояват от пробиотичните бактерии, в резултат на което се увеличава антиоксидантната стойност на пробата след ферментация.

Във всички ферментационни среди с включен хидролизат и при двете пробиотични бактерии се наблюдава повишаване на антиоксидантната активност, като най-висока е в средата с най-ниско количество на ензима.

Таблица 17. Антиоксидантна активност на културалната среда на суроватка и нейните хидролизати след ферментация.

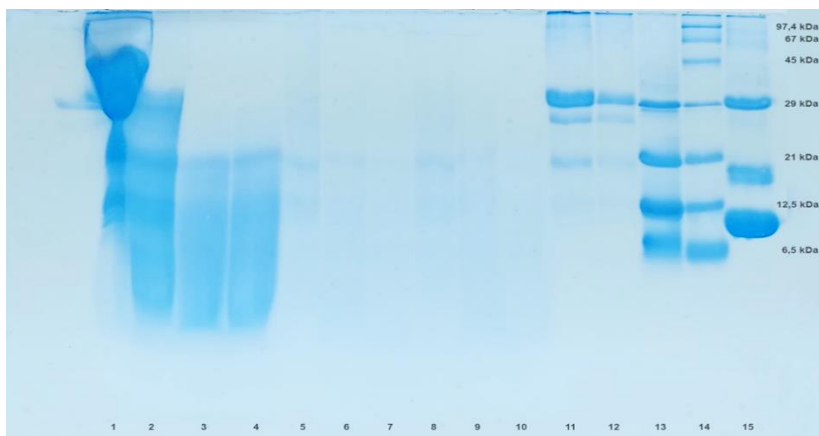
Проба	TEAA mg/100 ml	Проба	TEAA mg/100 ml
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда със суроватка	9,53	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда със суроватка	8,92
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с СП 3	10,37	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с СП 3	9,94
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с СП 7	16,70	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с СП 7	17,08
Ферментация <i>L. plantarum</i> в среда с СП 11	11,78	Ферментация <i>L. rhamnosus</i> в среда с СП 11	10,59

Във всички среди с добавен суроватъчен хидролизат наблюдаваме повишен антиоксидативен капацитет в сравнение с контролните ферментационни среди. Не се отчита съществена разлика в антиоксидантната активност между двете пробиотични бактерии като и при *L. plantarum* и при *L. rhamnosus* тя е най-висока в културалната среда с хидролизат получен с 0,5mg/ml ензим.

Следователно суроватъчните хидролизати, добавени към културалната среда за ферментация на двата пробиотични щама могат да се използват като естествени биофункционални съставки за подобряване на антиоксидантните свойства на новите функционални продукти.

4.7 Електрофоретичен анализ

Проведени са електрофоретични анализи на вариантите хидролизати, показали най-висока антиоксидантна активност и подбрани за провеждане на ферментация с щамове *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013. SDS-PAGE електрофорезата на проби на мляко и суроватка и съответно техните хидролизати, преди и след ферментация с определените щамове са показани на фигура 10 и 11.

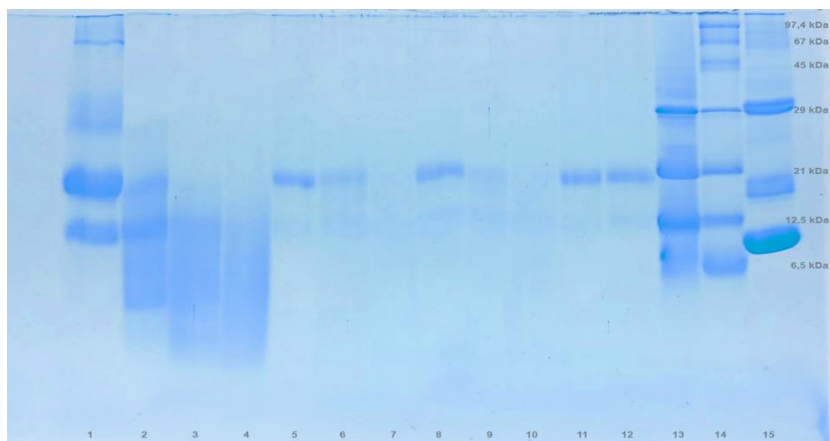


Фигура 10. SDS - PAGE на протеинови хидролизати на мляко преди и след ферментация с пробиотични щамове.

1- Мляко, 2- МБ3, 3- МБ7, 4- МБ11, 5- МБ3+*L. plantarum*, 6- МБ7+*L. plantarum*, 7- МБ11+*L. plantarum*, 8- МБ3+*L. rhamnosus*, 9- МБ7+ *L. rhamnosus*, 10- МБ11+ *L. rhamnosus*, 11- Мляко +*L. plantarum*, 12- Мляко+ *L. rhamnosus*, 13- Протеинов маркер (protein test mixture 5 - SERVA 6,5 - 29,0 kDa), 14- Протеинов маркер (protein test mixture 6 - SERVA 6,5 - 97,4 kDa), 15- смес стандартни протеини (BSA, α -казеин, β -казеин, α -лактоалбумин, β -лактоглобулин).

При хидролизатите, получени след ензимна обработка с бромелин, ясно се вижда, значително протеолитично разграждане. Във варианта, третиран с най-ниската концентрация на бромелин - 0,1mg/ml се наблюдава разграждане до по-ниско молекулни пептиди (от 6,5 до 24 kDa). При пробите, третирани с бромелин в концентрации 0,5mg/ml и 1mg/ml, линиите са слабо отчетливи, което ни дава основание да приемем, че голяма част от протеините са се разпаднали до аминокиселини.

Във всички варианти преминали ферментация с *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 практически не се наблюдават линии, отговарящи на млечните протеини. По всяка вероятност след ферментацията на хидролизатите (особено тези, получени с високи концентрации на ензима) имаме пълно разграждане на протеиновите фракции до аминокиселини.



Фигура 11. SDS – PAGE на протеинови хидролизати на суроватка преди и след ферментация с пробиотични щамове.

1- Суроватка, 2- СПЗ, 3- СП7, 4- СП11, 5- СПЗ+*L. plantarum*, 6- СП7+ *L. plantarum*, 7- СП11+*L. plantarum*, 8- СПЗ+*L. rhamnosus*, 9-СП7+*L. rhamnosus*, 10- СП11+*L. rhamnosus*, 11- Суроватка + *L. plantarum*, 12- Суроватка + *L. rhamnosus*, 13- Протеинов маркер (protein test mixture 5 - SERVA 6,5 - 29,0 kDa), 14- Протеинов маркер (protein test mixture 6 - SERVA 6,5 - 97,4 kDa), 15- BSA - серумен албумин, α -казеин, β -казеин, α -лакталбумин, β -лактоглобулин.

Електрофореграмата на суроватката (пътечка 1) показва две интензивни ивици, отговарящи на основните протеинови компоненти - α -лакталбумин и β -лактоглобулин. Отчитат се и по-бледа ивица, съответстваща на серумния албумин и следи от казеинови фракции. Във вариантите, третирани с различна концентрация на ензима папаин (СПЗ, СП7 и СП11) се наблюдава тенденция на хидролитично разграждане на основните протеинови фракции на суроватката, която се увеличава със концентрацията на ензима.

В пробите, преминали ферментация с двата пробиотични щама може да отбележим, че там, където е постигнато по-пълно разграждане на протеиновите компоненти линиите са с минимален интензитет. Интензитетът на протеиновите фракции при ферментация на хидролизните продукти, получени след обработка с 0,1 mg/ml папаин намалява в по-ниска степен.

5 Формулиране на рецептурен състав и изготвяне на технологична схема за производство на биоактивни продукти от хидролизиран белтък

От проведените експерименти и получените от тях резултати за включване в състава на функционалните продукти са определени следните ензимни хидролизата:

- Лиофилизиран хидролизат от прясно мляко с пробиотични щамове *L. plantarum* и *L. rhamnosus*, получен чрез ензимно третиране с бромелин с концентрация 0,1mg/ml за 30 минути (МБ3)
- Лиофилизиран хидролизат от суроватка с пробиотични щамове *L. plantarum* и *L. rhamnosus*, получена чрез ензимно третиране с папаин с концентрация 0,5mg/ml за 30 минути (СП7)

В таблица 18 е представен рецептурния състав на разработените продукти.

Таблица 18. Продукт 1 и 2 с ензимни хидролизати от мляко и суроватка, ферментирани с пробиотични щамове

Състав	Количество в 100g/ g	Състав
Лиофилизиран хидролизат от прясно мляко с пробиотични щамове <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NBIMCC 3447 и <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> NBIMCC 1013	60	Лиофилизиран хидролизат от суроватка с пробиотични щамове <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NBIMCC 3447 и <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> NBIMCC 1013
Лиофилизиран плод манго	10	Лиофилизиран плод малина
Фруктоолигозахариди	10	Фруктоолигозахариди
Ксилитол	9,4	Ксилитол
Манитол	5	Манитол
Фукоза	3	Фукоза
Микрокристална целулоза	2	Микрокристална целулоза
Гума Locust bean	0,6	Гума Locust bean

6 Изследване на качествените характеристики на получените продукти - органолептични, физикохимични, биохимични и микробиологични показатели, с оглед определяне на техните здравни ползи.

6.1 Органолептична оценка

За изследване на органолептичните показатели – външен вид, консистенция, цвят, вкус и аромат е използвана 9-бална Хедонична скала. Резултатите са представени в таблица 19.

Таблица 19. Органолептична оценка на лиофилизираните синбиотични храни

Продукт	Външен вид	Консистенция	Аромат	Вкус	Обща оценка
1. Лيوфилизиран продукт на основата на хидролизат от прясно краве мляко с 10% добавен плод – лيوфилизирано манго	Леофилен продукт с жълт цвят	Фина, прахо-образна	Приятен, специфичен за състава	Приятен, млечнокисел, с привкус на плод манго	8.9
оценка	9.0	9.0	88	8.9	
2. Леофилизиран продукт на основата на хидролизат от суроватка с 10% добавен плод - леофилизирана малина	Леофилен продукт с бледо розов цвят	Фина, прахо-образна	Приятен, специфичен за състава	Приятен, млечнокисел, с привкус на малина	8.9
оценка	9.0	9.0	89	8.7	



Фигура 12. Леофилизиран продукт 1.



Фигура 13. Леофилизиран продукт 2.

6.2 Физикохимични показатели

Основните физикохимични показатели на лиофилизираните продукт 1 (на основата на млечен хидролизат) и продукт 2 (на основата на суроватъчен хидролизат) са представени в таблица 20.

Таблица 20. Физикохимични показатели на лиофилизираните продукти ($\bar{x} \pm sd$)

Показатели	Стойности по анализ		Методи и стандарти за изследване
	Продукт 1 на основата на хидролизат от мляко	Продукт 2 на основата на хидролизат от суроватка	
Водно съдържание, %	$2,12 \pm 0,02$	$3,32 \pm 0,01$	влагомерна везна „Sartorius”
Сухо вещество, %	$97,88 \pm 0,04$	$96,68 \pm 0,01$	
Общ белтък, %	$21,37 \pm 0,01$	$6,01 \pm 0,03$	метод на Келдал (БДС 6231)
Фибри, %	$11,87 \pm 0,03$	$15,26 \pm 0,03$	
Общи липиди, %	$12,22 \pm 0,07$	$5,80 \pm 0,02$	апарат “Soxtex” (БДС 1671 -89),
Обща пепел, %	$2,32 \pm 0,10$	$3,11 \pm 0,03$	тегловен метод БДС 6191-74
Въглехидрати (вкл. редуциращи захари), %	$35,40 \pm 0,01$	$51,8 \pm 0,01$	БДС 9373-80
Полиоли, %	$14,7 \pm 0,01$	$14,7 \pm 0,01$	По състав на продуктите
Активна киселинност - рН	$3,87 \pm 0,02$	$3,92 \pm 0,03$	Потенциометрично, рН-метър “Hanna”
Титруема киселинност, °Т	$71,5 \pm 0,04$	$72,5 \pm 0,01$	БДС 1111- 80
Витамин С, %	$3,45 \pm 0,2$	$4,26 \pm 0,04$	титриметрично
Енергийна стойност / 100 g продукт, (kcal/ kJ)	396,07/1683,31	349,24/1484,27	по химичен състав

Водното съдържание е под 5 %, което е важен показател за успешно преминала лиофилизация.

Съдържанието на общ белтък е относително ниско, тъй като самите изходни суровини не са с високо съдържание на белтък и с тях допълнително е проведена ензимна хидролиза.

Сравнително ниски са и количествените стойности на общите мазнини – 12,22% за продукта на млечна основа и 5,80% за продукта с включен суроватъчен хидролизат.

Въглехидратите, в това количество редуциращите захари и фибрите са с повишени стойности, което се дължи на внесените допълнителни съставки в рецептурните формули на двата продукта.

6.3 Биохимични показатели

Анализираните функционални храни са с високо съдържание на калий от макро елементите. А от микроелементите се отчита повишено съдържание на манган, желязо и цинк (таблица 21).

Таблица 21. Микро и микро елементен състав на лиофилизирано прясно краве мляко и суроватка и лиофилизирани продукти от техните хидролизати

Проба \ Изследване	Макро елементи, g/kg				Микро елементи, mg/kg			
	Ca	P	Mg	K	Mn	Fe	Cu	Zn
Функционален продукт, на основата на хидролизат от мляко	1,28	1,51	0,24	6,42	21,80	8,45	0,76	9,87
Функционален продукт на основата на хидролизат от суроватка	0,76	1,85	0,19	5,90	13,89	8,36	0,78	8,36

Таблица 22. Групи мастни киселини продукт 1 (g/100g мазнина)

Групи МК	Контрола мляко	Хидролизат от мляко с <i>L. plantarum</i>	Хидролизат от мляко с <i>L.rhamnosus</i>	Функционален продукт на основата на хидролизат от мляко
SFA	66,39	68,08	65,48	66,96
MUFA	29,22	23,75	30,12	29,16
PUFA	4,43	6,40	4,55	4,14
Σn-3	0,75	1,44	0,72	0,80
Σn-6	3,52	4,75	3,63	3,01
Σn-6/Σn-3	4,69	3,31	5,05	3,75

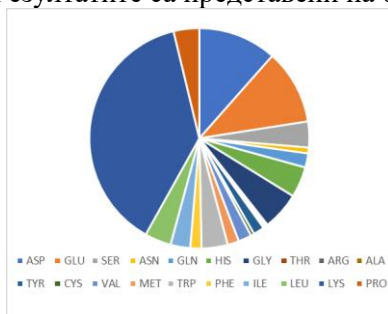
Таблица 23. Групи мастни киселини продукт 2 (g/100g мазнина)

Групи МК	Контрола суроватка	Хидролизат от суроватка с <i>L. plantarum</i>	Хидролизат от суроватка с <i>L. rhamnosus</i>	Функционален продукт на основата на хидролизат от суроватка
SFA	57,47	59,19	58,51	58,59
MUFA	35,59	35,01	35,20	35,55
PUFA	6,59	6,05	6,07	6,26
Σn-3	0,90	0,87	0,86	0,89
Σn-6	4,73	4,23	4,45	4,63
Σn-6/Σn-3	5,24	4,89	5,17	5,20

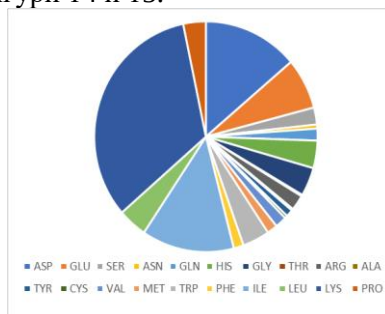
От проведения мастно киселинен анализ (таблицы 22 и 23) се отчита, че количествата на основните групи мастни киселини ненаситени, полиненаситени и наситени мастни киселини остават непроменени в крайните продукти в сравнение с изходните суровини.

6.4 Аминокиселинен профил

Чрез течна хроматография HPLC са определени аминокиселините профили на новите функционални продукти. Резултатите са представени на фигури 14 и 15.



Фигура 14. Аминокиселинен профил на продукт 1



Фигура 15. Аминокиселинен профил на продукт 2

В изходните суровини – мляко и суроватка се съдържат в по-изразено количество лизин (14,97 $\mu\text{M/ml}$), пролин (5,96 $\mu\text{M/ml}$), аспарагинова киселина, глутаминовата и аргинин.

След провеждане на ензимна хидролиза броят на свободните аминокиселини се увеличава и се освобождават част от незаменимите за човека аминокиселини – валин, триптофан, фенилаланин, изолевцин и левцин. Проведения ферментационен процес с пробиотичните щамове *L. plantarum* и *L. rhamnosus* води до допълнително освобождаване и натрупване на аминокиселини, като аспарагин, глицин, аланин, триптофан, фенилаланин и лизин. Както при млечните, така и при суроватъчните варианти наблюдаваме пълен аминокиселинен спектър.

6.5 Микробиологично определяне на брой жизнеспособни клетки на пробиотичните бактерии и микробна обсемененост на новите продукти

Проследена е преживяемостта на *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 в крайните продукти за период от 1 година при три температурни режима на съхранение (таблица 24).

Таблица 24. Преживяемост на пробиотичните щамове в новите функционални продукти по време на съхранение (CFU/ml).

Срок, дни	Преживяемост, CFU/ml					
	Продукт 1			Продукт 2		
	Стайна Т, °C	4°C	-18°C	Стайна Т, °C	4°C	-18°C
1 ден	2,5x10 ⁹			2,0x10 ⁹		
30 ден	6,4x10 ⁷	2,2x10 ⁹	2,5x10 ⁹	5,6x10 ⁷	6,1x10 ⁸	1,0x10 ⁹
60 ден	1,5x10 ⁷	1,2x10 ⁹	2,2x10 ⁹	1,0x10 ⁷	2,5x10 ⁸	7,6x10 ⁸
3 месец/ 90 ден	1,8x10 ⁶	8,7x10 ⁸	1,4x10 ⁹	1,5x10 ⁶	1,2x10 ⁸	6,8x10 ⁸
120 ден	1,2x10 ⁵	3,2x10 ⁸	9,3x10 ⁸	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁷	2,3x10 ⁸
150 ден		8,5x10 ⁷	5,8x10 ⁸		2,2x10 ⁶	7,9x10 ⁷
6 месец/ 180 ден		1,2x10 ⁶	2,8x10 ⁸		1,2x10 ⁵	2,2x10 ⁷

210 ден		$2,3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^7$			$7,9 \times 10^6$
240 ден			$2,4 \times 10^7$			1×10^6
9 месец/ 270 ден			$9,4 \times 10^6$			$4,4 \times 10^5$
300 ден			$2,6 \times 10^6$			
330 ден			$8,5 \times 10^5$			
12 месец/360 ден						

От представените данни се вижда, че преживяемостта на пробиотичните клетки в продуктите, съхранявани на стайна температура, рязко се понижава като и в двата продукта след третия месец клетките са на степен под $1,0 \times 10^6$.

След този срок продуктите губят по дефиниция названието „пробиотичен продукт“, тъй като броя жизнеспособни клетки в тях е по-малко от 10^6 степен. Съхраняването на продуктите в хладилни условия запазва жизнеспособността на пробиотичните клетки до края на 6-тия месец в продукт 1 и до 5-тия месец в продукт 2.

Съхраняването при -18°C запазва висока преживяемостта на щамовете в продукт 1 - до десетия месец, а за продукт 2 тя е до осмия месец.

В таблица 25 са отразени показателите за микробна обсемененост на новите продукти след процеса лиофилизация.

Таблица 25. Стойности на микробна обсемененост.

Показатели	Продукт 1	Продукт 2
Общ брой мезофилни аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми, CFU/g	$3,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$
Спори на микроскопични плесени и дрожди, CFU/g	$2,1 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
<i>Escherichia coli</i> в 0.1 g от продукта	Не се установяват	Не се установяват
Коагулазоположителни стафилококи в 1.0 g от продукта	Не се установяват	Не се установяват

Преживяемостта на патогенната микрофлора след лиофилизация се влияе от остатъчното влагосъдържанието на продуктите, температурните параметри и условията на съхранение.

Изследванията на разработените продукти са проведени по стандартни микробиологични методи. Показателите на микробната обсемененост са в съответствие с определените по стандарт норми за храни, съдържащи млечнокисели бактерии и доказват отсъствие на патогенна микрофлора.

VI. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Установено е влиянието на технологичните параметри – вид, концентрация и време на действие на протеолитичните ензими- папаин, бромелин и химозин върху степента на хидролиза на прясно краве мляко и суроватка и е определена антиоксидантната активност на получените хидролизати.
2. Електрофоретично е доказано разграждането на основните протеинови компоненти на изходните субстрати до нискомолекулни пептиди след хидролиза.
3. Определена е степента на хидролиза като процент на хидролизираните пептидни връзки за количествена оценка на процеса. Най-ниска степен на хидролиза е отчетена при прясно мляко МП1 (10 минути обработка с 0,1 mg/ml папаин), а най-висок процент е получен от бромелин с висока концентрация при хидролизат СП12, 60-та минута на обработка. За пробите от суроватка, процентът хидролиза при проба СХ1 (химозин 1 μ l/ml при 10 минути реакционно време) е само 13,18 %. Най-висок процент е постигнат при хидролизат СП12 с използване на папаин в 1mg/ml.
4. Установени са стойностите за антиоксидантен капацитет на хидролизираните продукти, които показват по-висока активност, спрямо изходния субстрат. Най-висока активност 11,32 mg TE/100 ml е установена при вариант МБ3 (мляко хидролизирано с бромелаин в концентрация 0,1mg/ml за 30 минути) При вариантите обработени с по-висока концентрация на ензим (1mg/ml) стойността на

антиоксидантния капацитет намалява. Вариантите хидролизирани с ензима папаин проявят най-силно антиоксидантния си капацитет на 30-та минута от започване на хидролизата.

5. Извършени са ферментационни опити с подобрени пробиотични щамове млечнокисели бактерии: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013, които показват, че най-благоприятни за размножаване на пробиотичните бактерии са вариантите среди МБ3 – хидролизирано мляко с бромелин с концентрация на ензима 0,1mg/ml и СП7 – хидролизирана суроватка с папаин с концентрация на ензима 0,5mg/ml.
6. Най-висок брой жизнеспособни клетки установяваме при *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 при температура на култивиране 37°C - log 10,20 в млечен хидролизат и log 9,48 - в суроватъчен, *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013- log 9,91 в млечен хидролизат и log 9,32 – в суроватъчен и *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 - log 9,25 в млечен хидролизат и log 9,20 - в суроватъчен.
7. Определени са оптималните параметри на процеса сублимационно сушене, като е установено, че използването на криопротектори повишава преживяемостта на бактериалните клетки на *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 в млечните и суроватъчни проби след замразяване и след лиофилизация.
8. Доказан е по-високият криозащитен ефект на гума Локуст бийн (криопротектор 2) в сравнение с комбинацията от захароза и пектин (криопротектор 1) върху преживяемостта на бактериалните клетки.
9. Създадена е технология за производство на биологично активни продукти на основата на хидролизати от прясно мляко и суроватка, ферментирани с подобрените щамове млечнокисели бактерии.
10. Формулираният многокомпонентен състав на разработените функционални продукти включва ензимно получени

протеинови хидролизати, обогатени с доказано полезни за здравето пробиотични щамове *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 и физиологично активни вещества от различен произход.

11. Обобщените резултати от проведените органолептични, физикохимични и биохимични изследвания доказват, че новите биологично активни продукти са с балансиран състав и висока биологична стойност.

VII. ПРИНОСИ

Научни приноси

- Експериментално е доказано, че провеждането на ензимна хидролиза на краве прясно мляко и суроватка води до повишаване на тяхната антиоксидантна активност.
- Установено е, че ферментацията на подбраните млечни и сурватъчни хидролизати с пробиотичните бактерии *L. plantarum* и *L. rhamnosus* допълнително повишава антиоксидантната им активност.
- Доказан е високият криозащитен ефект на гума Локуст бийн (криопротектор 2) върху преживяемостта на бактериалните клетки във ферментирани млечни и сурватъчни хидролизати след замразяване и лиофилизация.

Научно - приложни приноси

- Установено е влиянието на технологичните параметри – вид, време на действие и концентрация на протеолитичните ензими папаин, бромелин и химозин върху степента на хидролиза на два протеинови субстрати – прясно краве мляко и суроватка.
- Оптимизирани са методите за ензимна хидролиза на казеинови и сурватъчни протеини в прясно краве мляко и

суроватка с цел получаване на биоактивни хидролизати и пептиди.

- Установен е ефектът от добавянето на хидролизирани белтъчни субстрати в културалната среда върху времето за протичане на процеса на ферментация и преживяемостта на пробиотични щамове млечнокисели бактерии - *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447; *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013
- Доказано е, че най-благоприятните вариантни среди за размножаване за щамовете млечнокисели бактерии: *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 са МБЗ – хидролизирано мляко с бромелин с концентрация на ензима 0,1mg/ml и СП7 – хидролизирана суроватка с папаин с концентрация на ензима 0,5mg/ml.
- Определени са основните технологични параметри на процеса сублимационно сушене на щамовете млечнокисели бактерии *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 в млечните и суроватъчни хидролизати.

Приложни приноси

- Доказана е възможността за използване на прясно краве мляко и суроватка (отпаден продукт от производството на сирене) в качеството им на белтъчни субстрати за провеждане на ензимна хидролиза и превръщането им в продукти с висока добавена стойност.
- Формулирани са рецептурни състави и е разработена технология за производство на нови функционални храни на основата на млечни хидролизати.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

1. **Loginovska, K.**, 2021. Receiving of Protein Hydrolysates from Cow's Milk by Enzymatic Treatment, Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 24 (4), 10-22
2. **Loginovska, K.**, A. Valchkov, M. Doneva, P. Metodieva, I. Nacheva, 2023. Technology for Obtaining a Lyophilized Product Based on Milk Hydrolyzate, 2023, Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 26 (5), 47-65
3. Doneva, M., **K. Loginovska**, S. Dyankova, I. Nacheva, P. Metodieva, N. Ninova-Nikolova, 2024. Application of whey protein hydrolysates as a fermentation medium with strains of lactic acid bacteria, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 59, 1, 15-22