

**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ
ТЕХНОЛОГИИ**

АЛЕКСАНДЪР СПАСОВ ВЪЛЧКОВ

**ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ПРОБИОТИЧНИ И СИНБИОТИЧНИ ХРАНИ
НА ОСНОВАТА НА ОВЧЕ И КРАВЕ МЛЯКО**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Д О К Т О Р“

Научна специалност: **02.11.11.**

“Технология на биологично активните вещества
(вкл. ензими, хормони, белтъчини)”

Професионално направление ш. 5.12 “Хранителни технологии”

Научни ръководители:

проф. дбн. Любомир Ангелов

доц. д-р Илиана Начева

СОФИЯ, 2016

Дисертационният труд е написан на 155 страници и съдържа 56 таблици и 17 фигури. Цитираната литература включва 207 източника, от които 57 на кирилица и 150 на латиница.

Номерацията на разделите, фигурите и таблиците не съответства на тази в дисертацията.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 2016 г. от ч., в заседателната зала на ИКХТ, София 1407, бул. „Черни връх“ 53.

Списък с използваните съкращения

МНМК – мононенаситени мастни киселини

МК – мастни киселини

НМК – наситени мастни киселини

НБПМКК - Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури

ОЛ – общ липид

ПНМК – полиненаситени мастни киселини

СБО – сух безмаслен остатък

C18:1 – олеинова киселина

C18:1cis - цис-изомери на олеиновата киселина

C18:1trans - транс-изомери на олеиновата киселина

C18:1 trans-11 - ваксенова киселина

CLA – конюгирана линолова киселина

CFU – колонии образуващи единици (клетки)

log – логаритмична единица

pH - активна киселинност

1. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години основните акценти в науката за хранене са свързани със задоволяване на основните хранителни потребности на човека в съответствие с концепцията за балансирано и здравословно хранене.

Съвременните изследвания върху млякото и млечните продукти са фокусирани върху повишаване на тяхната биологична пълноценност и здравословни ефекти, чрез промени в липидното и белтъчното им съдържание. Научните проучвания доказват, че мляко от местните породи животни - Родопски цигай и Българско Родопско говедо са изключително подходящи като изходна суровина за създаване на нови продукти с повишена енергийна и биологична стойност, в сравнение с традиционните продукти на млечна основа.

В технологичен аспект това налага въвеждането на ефективни иновации в технологиите за производство на нови синбиотични храни с висок титър на полезната микрофлора и с богато съдържание на биологично активни вещества. Пробиотичният комплекс на тази нова категория храни включва експериментално подбрани комбинации от щамове млечнокисели култури с доказани пробиотични свойства и устойчиви на условията в стомашно-чревния тракт на човека.

Един от най-подходящите биотехнологични подходи и методи на технологична обработка на пробиотици и синбиотици е сублимационното сушене /лиофилизация/, който гарантира високо качество на крайния продукт и успешната му реализация в силно конкурентна пазарна среда.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на проучванията е разработване на технология за създаване на нови лиофилизирани пробиотични и синбиотични храни на основата на овче и краве мляко.

За реализиране на поставената цел бяха формулирани следните **задачи**:

1. Предварителен подбор на проби от сурово овче мляко от порода Родопски цигай и краве мляко от порода Българско Родопско говедо в планинските райони на Средните и Западни Родопи, за използването им като суровина в състава на лиофилизирани функционални храни.
 - 1.1. Изследвания върху физикохимичните и органолептични показатели на сурово овче мляко от три района на Средните и Западни Родопи и краве мляко от района Борино-Доспат, Западни Родопи.

- 1.2. Изследвания върху микробиалния статус на сурово овче и краве мляко от проучваните породи.
- 1.3. Биохимична оценка на овче и краве мляко - мастнокиселинен спектър, макроелементен състав.
2. Създаване на синбиотични лиофилизирани храни на основата на овче и краве мляко от местните породи Родопски цигай и Българско Родопско говедо.
 - 2.1. Подбор на щамове млечнокисели бактерии и на техни асоциации за включването им в състава на синбиотичните храни. Проследяване устойчивостта на щамовете в среди, симулиращи условията в стомашно-чревния тракт на човека.
 - 2.2. Включване на избраната комбинация от пробиотични щамове в полизахаридна гелна матрица (хитозан).
 - 2.3. Определяне влиянието на скоростта на замразяване върху преживяемостта на избраната пробиотична комбинация от щамове.
 - 2.4. Разработване на рецептури и технология за получаване на лиофилизирани синбиотични продукти на основата на овче и краве мляко от местните породи Родопски цигай и Българско Родопско говедо.
 - 2.5. Изследвания върху качествените характеристики на новите синбиотични лиофилизирани храни, с оглед определяне на техните здравни ползи.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Изходни суровини

1. Овче мляко от породата Родопски цигай - пробите са събрани по време на лактационния период /на три етапа: 30 април - 30 май - 30 юни 2013г./ от овце-майки на трета лактация, отглеждани в района на Западните и Средни Родопи – Борино-Доспат, м. “Новак“ - гр. Смолян и село Смилян.

2. Краве мляко от породата Българско Родопско говедо - пробите са събрани през лактационния период, на три вземания – 30 април, 30 май и 30 юни 2012 г. от района на село Борино и гр. Доспат.

3. Щамове микроорганизми - *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374, *L.acidophilus* 1379, *L.casei* 1014 и *B.bifidum* 1370 от колекцията на НБПМКК и поддържани в ИКХТ.

4. Пребиотични компоненти - използван е „Chitosan“ (Deacetylated chitin, Poly (D-glucosamine) на фирма “SIGMA”.

5. Зърнени съставки, ядки, плодове, натурални подсладители - чия, киноа, орехови ядки, сусам, манго, черен бъз, екстракт от стевия и фруктоза.

II. Използвани методи за анализ

1. Физикохимични методи

1.1. Определяне на сух безмаслен остатък на прясно овче и краве мляко - на проточен анализатор „Milkoscan Conbfifoss 5000” и Milkotester.

1.2. Определяне на точка на замръзване на прясно овче и краве мляко - на проточен анализатор „Milkoscan Conbfifoss 5000” и Milkotester.

1.3. Определяне на сухо вещество на прясно овче и краве мляко - на проточен анализатор „Milkoscan Conbfifoss 5000” и Milkotester .

1.4. Определяне на остатъчното влагосъдържание след лиофилизация (БДС 1109-89)

1.5. Определяне на активната киселинност /рН/ – потенциометрично с рН – метър „CONSORT”, модел С830.

1.6. Определяне на титруема киселинност – (БДС 1111-80).

1.7. Определяне съдържанието на общ белтък – метод на Келдал (БДС 6231-73).

1.8. Определяне съдържанието на мазнини – автоматично чрез апарат „Soxtec” (БДС 1671-89).

1.9. Определяне на обща пепел – (БДС 6154-74)

1.10. Определяне съдържанието на лактоза – тегловен метод (БДС 6191-74).

1.11. Определяне на витамин С – определя се по титриметричен метод при индикатор 2,6-дихлорфенолиндофенол (АОАС Method 967.21).

1.12. Енергийна стойност на 100g продукт - kJ /kcal/ - изчисляване на базата на химичния състав.

2. Биохимични методи

2.1. Определяне на мастнокиселинен състав - газов хроматограф „Shimadzu, 2000” (Kioto, Japan).

2.2. Макроелементен и микроелементен състав - атомно-емисионен спектрофотометър „AES-ICP”

3. Микробиологични методи

3.1. Определяне на общия брой соматични клетки в изходните суровини – прясно краве и овче мляко ($\text{бр./ml} \times 10^3$) - апарат Milkoscan Conbfifoss 5000.

3.2. Определяне на общия брой колиформи в изходните суровини – прясно краве и овче мляко (бр./ml x10³) - апарат Bactoscan FC.

3.3. Култивиране на щамовете млечнокисели микроорганизми -

3.4. Определяне на преживяемостта на избраните щамове в моделни условия на стомашен и чревен сок

3.5. Определяне броя жизнеспособни млечнокисели бактерии - по метода на пределните разреждания с последващи изчисления по таблицата на Mc Crady.

4. Технологични методи

4.1. Изготвяне на комбинации от изследваните пробиотични бактерии за включването им в синбиотични продукти - създадени са 3 пробиотични комбинации:

- **Вариант 1.** *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374, *L.acidophilus* 1379 –1:3:1;
- **Вариант 2.** *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374, *B.bifidum* 1370 - 1:3:1;
- **Вариант 3.** *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374, *L.casei* 1014 - 1:3:1.

4.2. Включване на избраната комбинация от пробиотични щамове в полизахаридна гелна матрица (хитозан) - използван е методът на механично включване в полимерната мрежа на хидроколоидния гел.

4.3. Определяне преживяемостта на щамовете от вариант 1 при моделни условия, симулиращи условията на гастроинтестиналния тракт – в чиста клетъчна суспензия и клетъчна суспензия, включена в 4%-ен разтвор на хитозан.

4.4. Определяне влиянието на скоростта на замразяване върху преживяемостта на избраната пробиотична комбинация от щамове - изследвани са 5 скорости на замразяване – 0.3, 1.5, 15.0, 30.0 и 400°C/min, от температура +20°C до -196°C върху преживяемостта на пробиотичната комбинация от щамове от **вариант 1.**

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Предварителен подбор на проби от сурово овче и краве мляко от селектираните породи

1. Изследвания върху физикохимичните и органолептични показатели на сурово овче мляко от три района на Средните и Западни Родопи и краве мляко от района Борино-Доспат, Западни Родопи

Резултатите от анализа на физикохимичните показатели на проби от сурово овче мляко от породата Родопски цигай са представени в таблица 1. Количеството на **млечна мазнина** в изследваните проби от трите района е от 5,09 до 8,17% и съответства на нормите за съдържание на млечна мазнина в овче мляко (БДС 2777-88). Съдържанието на **протеин** варира от 5,05% до 6,74%, което е в стандартните граници. Отчетените стойности за **съдържание на лактоза** (от 3,90 до 4,97%) отговарят на стандартите за овче мляко, между 4,0 и 6,0%. Съдържанието на **сухо вещество** в опитните образци овче мляко е в интервала от 16,10 до 19,83%. С най-висок процент сухо вещество се характеризират пробите мляко от 30 юни, район Смолян (19,83%). Това до голяма степен се дължи на високото съдържание на липиди и белтъчни вещества в млякото. **Сухият безмаслен остатък** при всички серии овче мляко има стойности по-високи от 10 % (по БДС 2777-88), което напълно отговаря на стандарта за овче мляко.

Таблица 1. Физикохимични показатели на сурово овче мляко от порода Родопски цигай ($n_{1;2;3} = 30$)

Регион	Период	ОЛ (%) ($x \pm sd$)	Протеини (%) ($x \pm sd$)	Лактоза (%) ($x \pm sd$)	Сухо в-во (%) ($x \pm sd$)	СБО (%) ($x \pm sd$)
Борино-Доспат	30.04	5,09±0,48	5,97±0,42	4,14±0,13 a*	16,20±1,03	11,20±0,57
	30.05	5,05±0,06 c*	5,05±0,04 c**	4,97±0,01c*	16,10±0,03	11,12±0,03
	30.06	6,42±0,23	5,51±0,03	3,90±0,35	16,81±0,62	10,51±0,37
Смолян	30.04	6,51±0,29 b*	6,19±0,28	4,33±0,25	18,00±0,31	11,62±0,03
	30.05	6,30±0,01 c*	5,32±0,10 c*	4,92±0,07	17,53±0,14 c	11,26±0,30
	30.06	8,17±0,28	6,40±0,19	4,35±0,18	19,83±0,66	11,82±0,35
Смилян	30.04	5,88±0,57	6,66±0,21	4,26±0,23	17,55±1,00	11,92±0,51
	30.05	5,89±0,1 c**	6,16±0,11	4,58±0,04	17,48±0,30 c*	11,73±0,16
	30.06	6,89±0,04	6,74±0,34	4,00±0,23	18,47±0,07	11,72±0,11

a- 30 април/ 30 май;

b- 30 април/ 30 юни;

c- 30 май/ 30 юни.

P<0,05*

P<0,01**

P<0,001***

Резултатите от физикохимичните изследвания на събраните проби от сурово краве мляко от породата Българско Родопско говедо са представени в таблица 2.

Таблица 2. Физикохимични показатели на сурово краве мляко от породата Българско Родопско говедо от район Борино-Доспат (n=30)

Период	Общи липиди (%) (x±sd)	Протеин (%) (x±sd)	Лактоза (%) (x±sd)	Сухо в-во (%) (x±sd)	СБО (%) (x±sd)
30.04	3,67±0,25 b*	4,03±0,31	5,04±0,15	10,97±1,12	10,16±0,17b*
30.05	4,30±0,17	3,44±0,18	4,77±0,09	12,77±0,62	9,28±0,27
30.06	4,89±0,29	3,83±0,11	4,65±0,08	14,12±0,27	9,57±0,03

Количеството на **общи липиди** в кравето мляко е в интервала от 3,67 до 4,89%, като нараства с напредване на лактацията. Съдържанието на млечна мазнина във всички проби е по-високо от 3,4 %, което отговаря на изискванията по БДС 2778-89. **Протеинът** е в нормата за краве мляко - от 3,44 до 4,03%. Количеството на **лактозата** варира от 4,65 до 5,04%, т.е. близко е до нормата - 4,8 % за краве мляко. От представените данни е видно, че с напредване на лактацията съдържанието на **сухо вещество** в млякото се повишава, съответно от 10,97% (30 април) до 14,12% (30 юни), но остава в допустимите норми. Същото е валидно и за **сухия безмаслен остатък**, чиито стойности са над 8,5%.

По отношение на **органолептичните показатели** на събраните проби овче и краве мляко, не са установени отклонения от стандартните норми. При всички проби, суровото мляко представлява еднородна течност, без външни примеси и наличие на агломерати от маслени клъбца, с бял цвят и леко кремав отенък. Пробите са с характерен слабо сладникав вкус, без страничен привкус и слаб специфичен мирис.

2. Изследвания върху микробиялния статус на сурово овче и краве мляко от породите Родопски цигай и Българско Родопско говедо

Микробиологичните показатели на сурово овче и краве мляко са представени в таблици 3 и 4.

Таблица 3. Микробиологични показатели на сурово овче мляко от породата Родопски цигай ($n_{1,2,3}=30$)

Регион	Период	Соматични клетки (бр./ml $\times 10^3$) ($x \pm sd$)	Колиформни (бр./ml $\times 10^3$) ($x \pm sd$)
1.Борино-Доспат	30 април	2126 \pm 12 а***, б***	630 \pm 5 а***, б***
	30 май	597 \pm 9 с***	26 \pm 5 с***
	30 юни	1519 \pm 4	386 \pm 7
2.Смолян	30 април	2756 \pm 2 а***, б***	508 \pm 12 а***, б***
	30 май	171 \pm 8 с***	16 \pm 4 с***
	30 юни	892 \pm 14	200 \pm 14
3.Смилян	30 април	2137 \pm 8 а***, б***	29 \pm 7 б**
	30 май	2461 \pm 10 с***	37 \pm 5 с*
	30 юни	2185 \pm 15	43 \pm 3

a- 30 април/ 30 май;

b- 30 април/ 30 юни;

c- 30 май/ 30 юни.

P<0,05*

P<0,01**

P<0,001***

Средното съдържание на **соматични клетки** за целия период на лактация в пробите от местност „Новак“, гр. Смолян е 1273 (бр./ml $\times 10^3$), в пробите от с. Смилян - 2261 (бр./ml $\times 10^3$), а в пробите от Борино-Доспат е 1414 (бр./ml $\times 10^3$). Съгласно Leitner et al. (2008), всички серии овче мляко имат стойности под 3500 (бр./ml $\times 10^3$).

По отношение съдържанието на **колиформни** е установено, че всички серии млека са в норма, защото съгласно определените норми с Директива 96/46 на ЕУ и Регламент 953/2004 на ЕУ за максимално допустимата граница на колиформни при млечни продукти без термична обработка, броя на колиформите (бр./ml $\times 10^3$) за сурово мляко не трябва да надвишава 1 500 (бр./ml $\times 10^3$).

Таблица 4. Микробиологични показатели на сурово краве мляко от порода Българско Родопско говедо, от район Борино-Доспат ($n=30$)

Период	Соматични клетки (бр./ml $\times 10^3$) ($x \pm sd$)	Колиформни (бр./ml $\times 10^3$) ($x \pm sd$)
30 април	18 \pm 6 а**, б**	10 \pm 0,7 а***, б***
30 май	155 \pm 5 с*	225 \pm 7
30 юни	203 \pm 8	235 \pm 4

Всички изследвани серии проби съдържат по-малко от 300 (бр./ml $\times 10^3$) **соматични клетки** (по БДС 2778-89 за екстра качество краве мляко), което означава, че млякото може да се използва за преработка, без да е необходим процес на пастьоризация.

Съгласно определените норми с Директива 96/46 на ЕУ и Регламент 953/2004 на ЕУ Парламента за максимално допустима граница при млечни продукти без термична обработка, трите серии краве мляко имат съдържание на **колиформи** под 300 (бр./ml $\times 10^3$), което означава, че по микробиологични показатели отговарят на стандарта.

3. Биохимична оценка на сурово овче и краве мляко

3.1. Мастнокиселинен профил на представителни сборни проби овче мляко от породата Родопски цигай

А) Съдържание на наситени мастни киселини

Съдържанието на наситени мастни киселини в опитните образци овче мляко от района на Борино-Доспат, м. „Новак“ - гр. Смолян и с. Смилян е представено в таблица 5. За трите района са посочени средни стойности на мастните киселини през лактационния период. В дисертационния труд са дадени стойностите на НМК за всеки отделен подпериод.

Таблица 5. Съдържание на наситени мастни киселини (НМК) в овче мляко от породата Родопски цигай, g/100g мазнина (n=18)

НМК	Борино – Доспат (април-юни)($\bar{x}\pm sd$)	Смолян (април- юни) ($\bar{x}\pm sd$)	Смилян (април – юни)($\bar{x}\pm sd$)
C-4:0	3,09 \pm 0,23	2,96 \pm 0,13	3,01 \pm 0,32
C-6:0	2,31 \pm 0,30	2,29 \pm 0,16	2,38 \pm 0,11
C-8:0	2,04 \pm 0,30	2,01 \pm 0,12	2,18 \pm 0,30
C-10:0	6,58 \pm 1,03	6,74 \pm 0,22	7,39 \pm 1,35
C-12:0	3,20 \pm 0,23	3,27 \pm 0,14	3,77 \pm 0,63
C-14:0	9,01 \pm 0,86	9,43 \pm 1,43	9,21 \pm 0,38
C-15:0	1,29 \pm 0,05	1,22 \pm 0,05	1,28 \pm 0,07
C-16:0	22,62 \pm 2,19	23,19 \pm 2,51	22,58 \pm 1,70
C-17:0	0,71 \pm 0,06	0,68 \pm 0,05	0,73 \pm 0,01
C-18:0	11,47 \pm 0,41	11,54 \pm 0,74	9,19 \pm 2,60
C-20:0	0,27 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,25 \pm 0,05
C-22:0	0,17 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
Σ НМК	65,68\pm3,63	66,60\pm3,68	64,95\pm3,72

Общото съдържание на наситени мастни киселини в млеката от района на Борино-Доспат варира в границите от 62,09 до 69,35 g/100g мазнина, а в млеката от местност „Новак“, гр. Смолян – от 62,38 до 69,13 g/100g мазнина. Количеството на НМК в млеката от района на с. Смилян е със стойности от 60,77 до 67,89 g/100g мазнина, което е по-

ниско с около 1,0 – 1,5 g/100g мазнина в сравнение с млеката от другите два района. От МНМК в опитните образци с най-големи количества са представени миристиновата (C14:0), палмитиновата (C16:0) и стеариновата (C18:0) киселини.

Б) Съдържание на мононенаситени мастни киселини

В таблица 6 са представени осреднени данни за съдържанието на мононенаситени мастни киселини в пробите овче мляко от трите района на Западни и Средни Родопи. Стойностите за съдържанието на МНМК през отделните подпериоди на млеката са представени в дисертационния труд.

Таблица 6. Съдържание на мононенаситени мастни киселини (МНМК) в овче мляко от породата Родопски цига̀й, g/100g мазнина (n=18)

МНМК	Борино–Доспат (април-юни) (x±sd)	Смолян (април-юни) (x±sd)	Смилян (април – юни) (x±sd)
C-10:1	0,17±0,02	0,17±0,04	0,20±0,04
C-14:1c9	0,17±0,03	0,18±0,06	0,20±0,04
C-16:1t9	0,38±0,07	0,33±0,11	0,44±0,03
C-16:1c9	0,80±0,06	0,79±0,10	0,92±0,16
C-18:1t9	0,30±0,03	0,29±0,05	0,02±0,01
C-18:1t10	0,49±0,33	0,38±0,15	0,31±0,02
C-18:1t11	3,74±0,81	3,61±1,23	0,67±0,53
C-18:1t12	0,40±0,10	0,42±0,12	3,87±0,36
C-18:1t13	0,53±0,14	0,48±0,15	0,40±0,04
C-18:1t15	0,35±0,09	0,35±0,09	0,49±0,10
C-18:1t16	0,70±0,13	0,67±0,16	0,67±0,10
C-18:1c9	18,95±2,14	19,00±1,76	18,45±1,17
C-18:1c11	0,44±0,09	0,41±0,06	0,45±0,12
C-18:1c12	0,17±0,05	0,16±0,04	0,17±0,04
C-18:1c13	0,17±0,05	0,16±0,04	0,18±0,04
C-18:1c15	0,19±0,05	0,19±0,05	0,15±0,03
Σ МНМК	28,10±2,86	27,76±2,75	28,11±2,62

Съдържанието на мононенаситени мастни киселини в млеката от трите района е в границите от 25 до 31 g/100g мазнина. С най-високо съдържание на МНМК са ваксеновата (C18:1trans11) и олеиновата (C18:1cis9) киселини. Съдържанието на **транс-изомерите на олеиновата киселина (C18:1trans)** в опитните образци варира в диапазона от 4,33 до 8,35 g/100g мазнина.

В) Съдържание на полиненаситени мастни киселини

Съдържанието на полиненаситени мастни киселини в опитните образци овче мляко от трите района е представено в таблица 7. Данните са осреднени стойности за всеки отделен район. Съдържанието на ПНМК за всеки подпериод е представено в дисертационния труд. Общото съдържание на полиненаситените мастни киселини в млеката от р. Борино-Доспат варира в границите от 5,63 до 7,24 g/100g мазнина, в млеката от м. „Новак” - гр. Смолян - от 4,90 до 6,76 g/100g мазнина, а в млеката от с. Смилян – от 6,28 до 8,26 g/100g мазнина. Съдържанието на полиненаситените мастни киселини в млеката от трите района е най-високо при сериите от 30 април.

Таблица 7. Съдържание на полиненаситени мастни киселини (ПНМК) в овче мляко от породата Родопски цигай, g/100g мазнина (n=18)

ПНМК	Борино-Доспат (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)	Смолян (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)	Смилян (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)
C-18:2 t9,12	0,17±0,03	0,16±0,05	0,18±0,03
C-18:2c9,12	1,84±0,25	1,68±0,35	2,03±0,36
α C-18:3c9,12,15	1,20±0,16	1,08±0,16	1,30±0,20
CLA-c9,t11	2,02±0,37	1,81±0,39	2,39±0,54
CLA-t11,c13	0,09±0,01	0,08±0,02	0,09±0,04
CLA-Y	0,21±0,02	0,18±0,01	0,21±0,04
CLA-t11,t13	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,03
C-20:4c5,8,11,14	0,10±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02
C-20:5n3	0,09±0,01	0,08±0,02	0,10±0,03
C-22:5n3	0,21±0,04	0,20±0,03	0,20±0,03
Σ ПНМК	6,23±0,88	5,64±0,98	6,94±1,14

Общото съдържание на ω -3 мастните киселини в изследваните проби през отделните подпериоди варира от 1,26 до 1,96 g/100g мазнина, а на ω -6 есенциалните мастни киселини - от 2,20 до 3,47 g/100g мазнина. Съотношението на ω -6/ ω -3 мастни киселини в овчите млека от трите района е по-ниско от 5.0 и съгласно насоките на СЗО (WHO) изследваните млека са с нисък рисков фактор за човешкото здраве.

В таблица 8 е представено **общото съдържание на мастните киселини по групи** в овчите млека от порода Родопски цигай от трите района. Посочени са осреднени стойности за всеки район. Пълният набор от данни за всеки подпериод е представен в дисертационния труд.

Таблица 8. Съдържание на мастни киселини в овче мляко от породата Родопски цигай, от района на Борино-Доспат, g/100g мазнина (n=18)

МК - профил	Борино–Доспат (април-юни) (x±sd)	Смолян (април-юни) (x±sd)	Смилян (април –юни) (x±sd)
Σ НМК	65,68±3,63	66,60±3,68	64,95±3,72
Σ МНМК	28,10±2,86	27,76±2,75	28,11±2,62
Σ ПНМК	6,23±0,88	5,64±0,98	6,94±1,14
Σ C-18:1trans	6,53±1,61	6,24±1,86	6,78±1,04
Σ CLA	2,46±0,40	2,21±0,41	2,88±0,49
Σ ω-3	1,57±0,20	1,42±0,21	1,66±0,26
Σ ω-6	2,77±0,44	2,58±0,55	2,97±0,46
ω-6/ ω-3	1,76	1,81	1,79

3.2. Маснокиселинен профил на представителни сборни проби краве мляко от породата Българско Родопско говедео

А) Съдържание на наситени мастни киселини

Съдържанието на наситени мастни киселини в опитните образци краве мляко от порода Българско Родопско говедео от район Борино-Доспат е представено в таблица 9.

Таблица 9. Съдържание на наситени мастни киселини (НМК) в краве мляко от породата Българско Родопско говедео, от район Борино-Доспат, g/100g мазнина (n=6)

НМК	30 април (x±sd)	30 май (x±sd)	30 юни (x±sd)
C-4:0	3,78±0,04 b*	4,08±0,11	4,30±0,16
C-6:0	2,57±0,01 a**, b*	2,60±0,01	2,60±0,02
C-8:0	1,47±0,02 b*	1,41±0,04	1,33±0,04
C-10:0	3,25±0,05 a*, b*	2,83±0,14	2,58±0,18
C-12:0	3,21±0,05	2,90±0,13	2,71±0,21
C-14:0	10,17±0,04	9,47±0,26	9,66±0,42
C-15:0	1,23±0,02	1,21±0,02	1,23±0,01
C-16:0	27,21±0,027a**,b*	22,93±0,20	24,24±0,76
C-17:0	0,74±0,01 a*	0,68±0,01	0,68±0,03
C-18:0	11,81±0,16 a*	14,10±0,37	12,36±0,75
C-20:0	0,23±0,02 a*	0,25±0,01 c*	0,19±0,02
Σ НМК	68,65±0,10 a**, b*	65,72±0,24	65,21±0,54

Съдържанието на наситените мастни киселини в кравето мляко варира между 65,21 и 68,65 g/100g мазнина, като се наблюдава тенденция към намаляване с напредване на лактацията. Съдържанието на НМК е сходно с това, установено при пробите овче мляко от трите района, но при тях то варира в по-широки граници.

Б) Съдържание на мононенаситени мастни киселини

Съдържанието на мононенаситени мастни киселини в млечните проби е представено в таблица 10. Общото съдържание на МНМК в пробите млека от тази порода нараства през лактационния период от 26,52 до 28,93 g/100g мазнина ($P < 0,05$). Количеството на ваксеновата киселина нараства от 1,76 до 3,57 g/100g мазнина от м. април към м. май и юни ($P < 0,01$). Съдържанието на **транс-изомерите на олеиновата киселина (C18:1trans)** варира от 3,71 до 6,02 g/100g мазнина (табл.12) и е по-ниско от това в овчите млека от трите района.

Таблица 10. Съдържание на мононенаситени мастни киселини (МНМК) в краве мляко от породата Българско Родопско говедо, от район Борино-Доспат, g/100g мазнина (n=6)

МНМК	30 април (x±sd)	30 май (x±sd)	30 юни (x±sd)
C-10:1	0,30±0,02	0,30±0,02	0,31±0,01
C-14:1	0,84±0,02 a*	0,75±0,02 c*	0,89±0,01
C-16:1	1,34±0,01 a**	1,00±0,01	1,26±0,19
C-18:1t6/7	0,20±0,01 a**, b*	0,22±0,01 c*	0,28±0,02
C-18:1t9	0,27±0,02	0,29±0,02	0,32±0,03
C-18:1t10	0,24±0,02 b*	0,26±0,05	0,29±0,02
C-18:1t11	1,76±0,03 a**, b**	3,55±0,10	3,57±0,18
C-18:1t12	0,27±0,02 a*	0,32±0,02	0,27±0,02
C-18:1t13	0,28±0,01 a***	0,36±0,01	0,26±0,08
C-18:1t15	0,28±0,11	0,32±0,01	0,28±0,08
C-18:1t16	0,35±0,01 a**, b*	0,63±0,02 c*	0,46±0,02
C-18:1c9	19,26±0,13	19,04±0,33	19,71±0,48
C-18:1c11	0,57±0,06	0,46±0,01	0,55±0,04
C-18:1c12	0,19±0,02	0,14±0,01	0,10±0,03
Σ МНМК	26,52±0,06 a*, b*	28,02±0,41	28,93±0,53

В) Съдържание на полиненаситени мастни киселини

Общото съдържание на ПНМК в изследваните млека (табл.11) варира в интервала от 4,83 до 6,26 g/100g мазнина, като се наблюдава рязко нарастване от април към май ($P < 0,01$).

Таблица 11. Съдържание на полиненаситени мастни киселини (ПНМК) в краве мляко от породата Българско Родопско говедо, от район Борино-Доспат, g/100g мазнина (n=6)

ПНМК	30 април (x±sd)	30 май (x±sd)	30 юни (x±sd)
C-18:2t9,12	0,42±0,01	0,89±0,19	0,50±0,06
C-18:2c9,12	1,81±0,01 a***, b***	1,35±0,01c**	1,17±0,02
γC-18:3c6,9,12	0,09±0,01 a**	0,12±0,01 c*	0,06±0,01
αC-18:3c9,12,15	0,71±0,02 a***,b**	1,06±0,01 c**	0,91±0,02
CLA- c9,t11	1,19±0,01 a***, b**	1,89±0,01 c**	2,29±0,05
CLA- t11,c13	0,05±0,01 a***,b*	0,14±0,01	0,13±0,03
CLA-c9,c11	0,03±0,01 a*, b**	0,09±0,01	0,10±0,01
CLA-Y	0,01±0,02 b*	0,02±0,02	0,02±0,01
CLA-t11,t13	0,02±0,01 a*, b*	0,06±0,01	0,05±0,02
CLA-t9,t11	0,07±0,01 a***, b*	0,13±0,01	0,16±0,02
C-20:5n3	0,07±0,01 a*, b*	0,09±0,01	0,10±0,01
Σ ПНМК	4,83±0,04 a**,b***	6,26±0,17	5,86±0,01

Съдържанието на **ω-3 мастни киселини** в кравите млека (табл.12) е в границите от 0,88 до 1,27 g/100g мазнина. Количеството е по-ниско от това в млеката от породата Родопски цигай. Общото съдържание на **есенциалните ω-6 мастни киселини** в кравите млека варира от 2,35 до 3,11 g/100g мазнина, което е почти аналогично на това в изследваните образци от овче мляко.

В таблица 12 е представено **общото съдържание на мастните киселини по групи** в кравето мляко от район Борино-Доспат.

Таблица 12. Съдържание на мастни киселини в краве мляко от породата Българско Родопско говедо, от района на Борино-Доспат, g/100g мазнина (n=6)

МК - профил	30 април (x±sd)	30 май (x±sd)	30 юни (x±sd)
Σ НМК	68,65±0,10 a**,b*	65,72±0,24	65,21±0,54
Σ МНМК	26,52±0,06 a*,b*	28,02±0,41	28,93±0,53
Σ ПНМК	4,83±0,04 a**,b***	6,26±0,17	5,86±0,01
Σ C-18:1trans	3,71±0,07 a**,b***	6,02±0,14	5,82±0,19
Σ CLA	1,39±0,01 a***,b***	2,36±0,03 c*	2,77±0,05
Σ ω-3	0,88±0,03 a**,b**	1,27±0,01 c**	1,13±0,01
Σ ω-6	3,05±0,04	3,11±0,24	2,35±0,14
ω-6/ ω-3	3,51	2,44	2,08

3.3. Макроелементен състав на овче мляко от породата Родопски цигай и краве мляко от породата Българско Родопско говедео

В таблици 13 и 14 е представено осредненото съдържание на макроелементите Ca, K, Mg, Na и P за всеки район в изследваните образци овче и краве мляко, а стойностите за отделните подпериоди са представени в дисертационния труд. Съдържанието на **калций** в млеката от породата Родопски цигай варира от 1,60 до 2,03 g/l и е по-високо в сравнение с млеката от порода Българско Родопско говедео – от 0,92 до 1,20 g/l. Количеството на **калий** в кравето мляко има стойности в интервала между 0,82 и 1,19 g/l. Прави впечатление, че количеството на този макроелемент е по-високо от това в изследваното овче мляко, което е в границите от 0,49 до 0,84 g/l. Съдържанието на **магнезий** и **натрий** в опитните образци овче мляко има по-високи стойности от това в образците краве мляко. Нивото на магнезий в пробите овче мляко варира от 1,15 до 1,71 g/l, а в кравето мляко - от 0,07 до 0,10 g/l. Количеството на натрий в кравето мляко е със стойности от 0,20 до 0,35 g/l, а в овче мляко - между 0,37 и 0,96 g/l. **Фосфорът** в пробите краве мляко има стойности в границите от 0,71 до 0,93 g/l, което е по-ниско от съдържанието в опитните образци овче мляко (1,06 - 1,36 g/l).

Таблица 13. Съдържание на макроелементи (Ca, K, Mg, Na, P) в овче мляко от Родопски цигай от райони Борино-Доспат, Смолян и Смилян, g/l (n=18)

Макроелементи	Борино-Доспат (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)	Смолян (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)	Смилян (април-юни) ($\bar{x}\pm sd$)
Ca	1,67 \pm 0,06	1.83 \pm 0,09	1.95 \pm 0,07
K	0,66 \pm 0,17	0.73 \pm 0,10	0.70 \pm 0,03
Mg	1,22 \pm 0,06	1.44 \pm 0,11	1.53 \pm 0,17
Na	0,68 \pm 0,29	0.56 \pm 0,16	0.55 \pm 0,13
P	1,10 \pm 0,09	1.25 \pm 0,06	1.22 \pm 0,14

Таблица 14. Съдържание на макроелементите Ca, K, Mg, Na и P в краве мляко от породата Българско Родопско говедо, от район Борино-Доспат, g/l (n=6)

Макроелементи	30 април ($\bar{x}\pm sd$)	30 май ($\bar{x}\pm sd$)	30 юни ($\bar{x}\pm sd$)
Ca	1,09 \pm 0,23	0,92 \pm 0,01 c*	1,20 \pm 0,09
K	1,09 \pm 0,14	0,82 \pm 0,01	1,19 \pm 0,14
Mg	0,08 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01 c*	0,10 \pm 0,01
Na	0,27 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02	0,35 \pm 0,06
P	0,88 \pm 0,14	0,71 \pm 0,01	0,93 \pm 0,10

В резултат на проведените изследвания се установи, че млеката от изпитваните породи имат високо съдържание на хранителни и биологично активни компоненти.

Овчите млека от порода Родопски цигай, получени от района на с. Смилян, Средни Родопи през месец април са най-богати на МНМК и ПНМК, в сравнение със всички изследвани проби овче мляко. Опитните образци от район Борино-Доспат от м. април се отличават с най-високо съдържание на транс-изомери на олеиновата киселина, основно - ваксеновата киселина, както и есенциални аминокиселини.

От изследваните образци краве мляко от порода Българско Родопско говедо с най-високо съдържание на ПНМК, ω -3, ω -6 есенциални мастни киселини са млеката от м. май, както и млеката от м. юни, които имат високи нива на МНМК, конюгирани линолови киселини и макроелементи (Ca, K, Na, Mg и P).

На базата на извършените проучвания и получените експериментални резултати, считаме за целесъобразно използването на овчи и крави млека от района на м. „Новак“ - гр. Смолян от м. юни 2014г., като основни суровини за състава на новите синбиотични функционални храни.

II. Създаване на синбиотични лиофилизирани храни на основата на овче и краве мляко от местните породи Родопски цигай и Българско Родопско говедо

1. Подбор на щамове млечнокисели бактерии и на техни асоциации за включването им в състава на храните на базата устойчивост в симулирана среда на стомашно-чревния тракт

1.1.Култивиране на щамовете млечнокисели микроорганизми - по физиологична и биохимична характеристика са подбрани щамове, отговаряща на основните изисквания за пробиотична микрофлора.

1.2.Определяне на преживяемостта на избраните щамове в моделни условия на стомашен и чревен сок.

От проведените експерименти се установи, че изследваните щамове – *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374, *L.acidophilus* 1379, *L.casei* 1014 и *B.bifidum* 1370, демонстрират различна способност да преживяват в моделни условия на храносмилане.

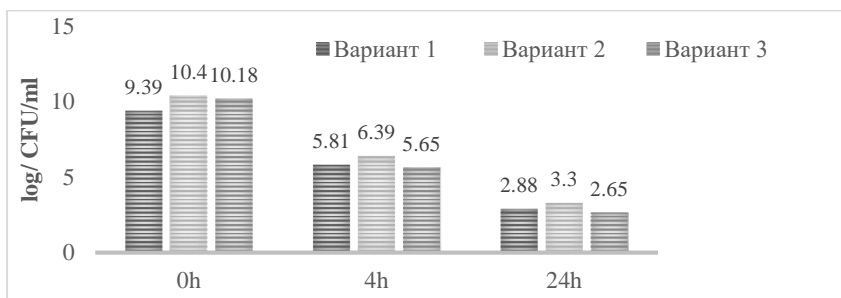
За времето на престоя в среда на стимулиран стомашен сок от 0 до 24 часа броят на активните клетки на всички щамове микроорганизми постепенно намалява. С най - висока чувствителност към условията на средата са клетките на *B.bifidum* 1370 и *L.casei* 1014, при които броя жизнеспособни клетки се редуцира съответно с 8,67 и 7,8 log единици. По-висока устойчивост демонстрират клетките на щамовете *L.acidophilus* 1379 и *L.bulgaricus* 1381, чийто брой се редуцира съответно с 5,2 и 4,0 log единици. Най-устойчив при тези условия е *Str.thermophilus* 1374, при който броят на жизнеспособни клетки намалява само с 3,2 log единици.

Тази тенденция се запазва и в моделните условия на симулиран чревен сок. Най-слабо от промяната на рН се повлияват клетките на *L.bulgaricus* 1381 и *Str.thermophilus* 1374. Броят им закономерно намалява и до 24 часа достига понижение, съответно с 2,4 и 3,0 log единици. Клетките на *L.acidophilus* 1379 и *L. casei* 1014 също намаляват, но в малко по-висока степен – до 24 часа броят им се редуцира с 3,2 и с 3,9 log единици. Щам *B.bifidum* 1370 е с най-висока чувствителност в тези моделни условия и броят на клетките му намалява със 7,2 log единици.

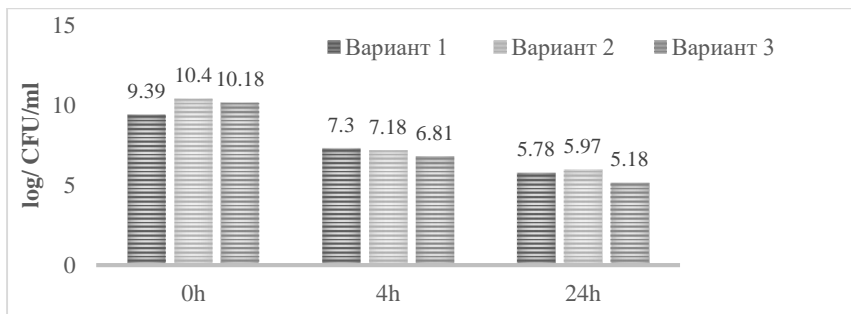
Получените експерименталните данни показват, че щамовете *L. bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374 и *L.acidophilus* 1379, независимо от редуцирания си брой запазват висока концентрация на жизнеспособни клетки за времето на престой в симулиран стомашен и чревен сок (0-24 часа), което ги определя като подходящи за включване в състава на пробиотични препарати.

1.3.Изготвяне на комбинации от изследваните пробиотични бактерии за включването им в синбиотичните храни

Резултатите от проведените експерименти са представени на фиг.1 и фиг.2.



Фиг.1. Общ брой жизнеспособни клетки (log/ CFU/ml) в изследваните варианти (1,2 и 3) при симулиран стомашен сок



Фиг.2. Брой жизнеспособни клетки (log/ CFU/ml) в изследваните варианти (1,2 и 3) при симулиран чревен сок

При **вариант 1** се наблюдава редукция в броя на живите клетки за периода от 24 часа в условията на стомашен и чревен сок, която е по-слабо изразена в сравнение с вариантите 2 и 3. В моделни условия на стомашен сок, за периода 0 - 4 часа, броят на клетките намалява с 3,58 log единици, а за 24 часа се редуцира с 6,51 log единици. В среда на симулиран чревен сок, броят на живите клетки за 4 часа намалява с 2,09, а за 24 часа – с 3,61 log единици.

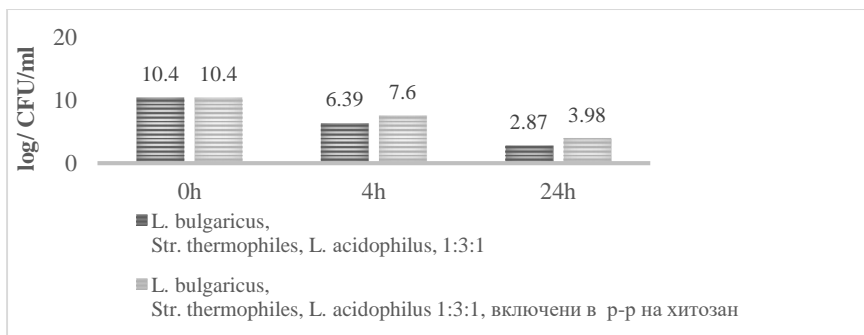
Броят на клетките на щамовете от **вариант 2** се повлиява почувствително от промяната на рН на средата и в условия на симулиран стомашен сок за периода от 0 до 4 часа намалява с 4,01, а за 24 часа се редуцира с 7,1 log единици. В среда на симулиран чревен сок (фиг.2) броят жизнеспособни клетки за 4 часа намалява с 3,22, а за 24 часа - с 4,43 log единици.

Комбинацията от шамове във **вариант 3** се отличава с най-висока обща чувствителност към условията на симулиран стомашен и чревен сок в сравнение с варианти 1 и 2. В условията на стомашен сок, броят на клетките за 4 часа се редуцира с 4,53, а за 24 часа - със 7,53 log единици. В среда от симулиран чревен сок, броят клетки към четвъртия час намалява с 3,37, а към 24-ия час – с 5 log единици.

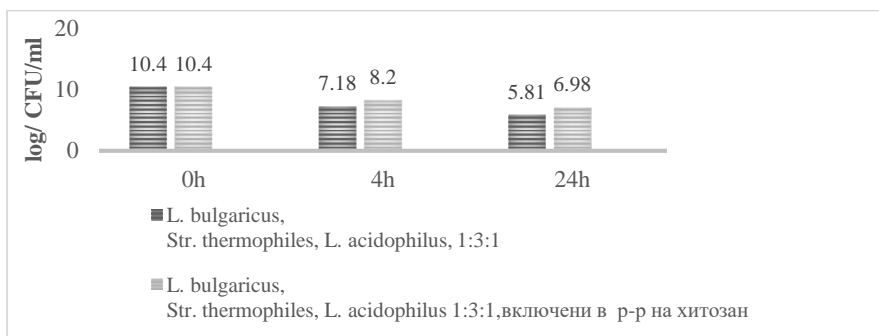
В резултат от проведения експеримент се установи, че варианти 2 и 3 демонстрират устойчивост и близки стойности на жизнеспособни клетки в моделни условия на стомашно-чревен тракт, но имат по-ниска преживяемост, в сравнение с микроорганизмите във **вариант 1**. Ето защо, тази комбинация от шамове, съдържаща стандартна закваска, обогатена с шам *L.acidophilus* 1379 ще бъде включена в състава на новите синбиотични храни.

2. Включване на избраната комбинация от пробиотични шамове в полизахаридна гелна матрица (хитозан)

Сравнителните резултати за преживяемостта на експерименталните шамове от вариант 1, включени в полизахаридна матрица в моделни условия на стомашен и чревен сок са представени на фиг.3 и 4.



Фиг. 3. Общ брой жизнеспособни клетки (log/ CFU/ml) във **вариант 1** при симулиран стомашен сок с и без включен хитозан



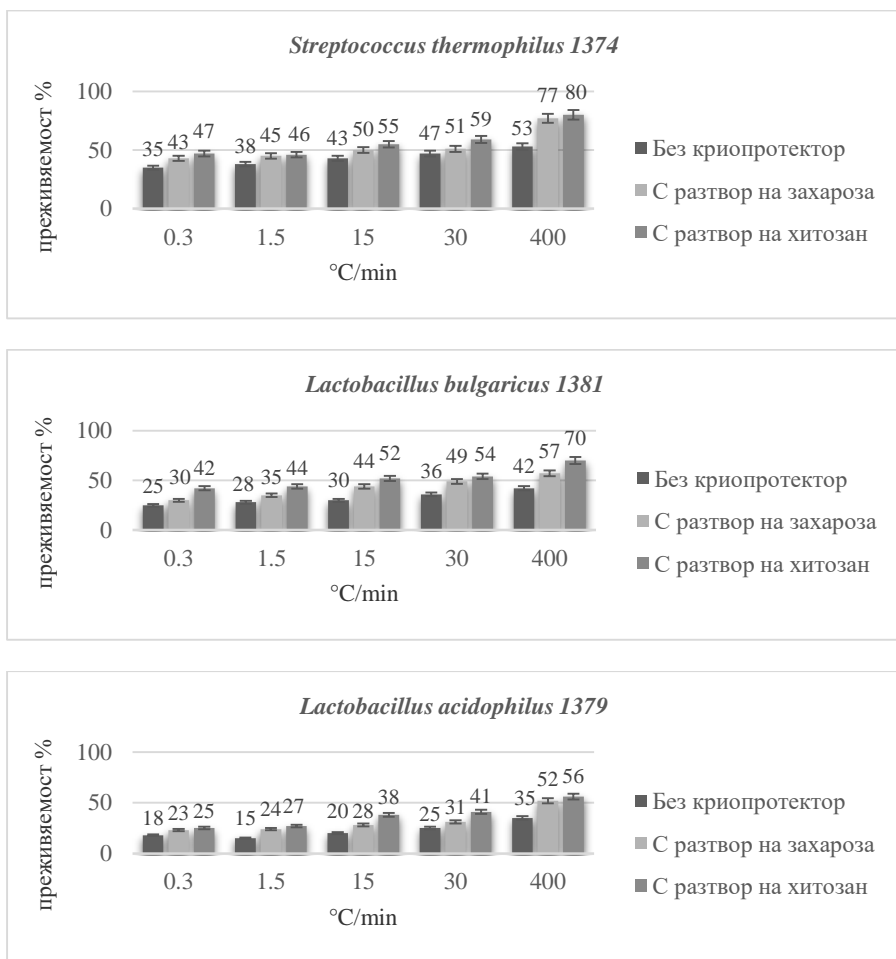
Фиг.4. Брой жизнеспособни клетки (log/ CFU/ml) във **вариант 1** при симулиран чревен сок с и без включен хитозан

При внасяне на чиста клетъчна суспензия в условията на симулиран стомашен сок, броят на живите клетки за 4 часа се редуцира с 4,01 log единици, а за 24 часа - със 7,53 log единици. В моделна среда на чревен сок, количеството живи клетки към четвъртия час намалява с 3,22 log единици, а към 24-ия час – с 4,59 log единици. Включените в разтвор на хитозан щамове, демонстрират по-висока устойчивост в условията на симулиран стомашно-чревен тракт за период от 24 часа в сравнение с чистите щамове. В условията на стомашен сок за 4 часа, броят на живите клетки се редуцира само с 2,8 log единици, а за 24 часа – с 6,42 log единици. В среда на симулиран чревен сок, броят на клетките за 4 часа намалява с 2,2 log единици, а за 24 часа - с 3,42 log единици.

Проведените експерименти показват, че включването на млечнокиселите бактерии *L.delbrueckii ssp. bulgaricus* 1381, *Str. thermophilus* 1374 и *L.acidophilus* 1379 в хитозанов гел води до стабилизиране на устойчивостта им в моделни условия на храносмилане и увеличение на биологичната им стойност.

3. Определяне влиянието на скоростта на замразяване върху преживяемостта на избраната пробиотична комбинация от щамове

Резултатите, отразяващи влиянието на различните скорости на замразяване върху преживяемостта на изследваните щамове, са представени на фиг. 5.



Фиг.5. Влияние на скоростта на замразяване върху преживяемостта на щамове *Str.thermophilus* 1374, *L.bulgaricus* 1381 и *L.acidophilus* 1379.

Резултатите от проведените експерименти показват, че при замразяване с ниски скорости - 0.3 и 1.50°C/min, преживяемостта на всички бактерии е най-ниска. От изследваните щамове, клетките на щам *Str.thermophilus* 1374 проявяват най-висока устойчивост. В среди без криопротектор преживяемостта е 35-38%, а в пробите с включени

криопротективни среди достига до 47%. Подобна зависимост е установена и при другите два щамове *L.bulgaricus* 1381 и *L.acidophilus* 1379, които са термолабилни и при тях стойностите са значително по-ниски.

При повишаване темпа на охлаждане със скорости от 15 и 30°C/min се наблюдава тенденция към повишаване на преживяемостта на клетките. При пробите без криопротектор тя е до 47%, а при тези с включена защитна среда, достига до 59%. И при тези скорости на замразяване се запазва тенденцията към по-голяма стабилност на клетките на щам *Str.thermophilus* 1374, спрямо другите щамове.

Експериментално получените данни показват, че при шоково замразяване със скорост от 400°C/min, изследваните щамове са с най-висока преживяемост. В пробите без защитна среда тя е в границите от 35 до 53%, а във вариантите с криопротектори значително се увеличава – от 56% до 80%.

По отношение на използваните криопротектори се установи, че в сравнение със захарозата, която е доказан криопротектор и увеличава преживяемостта на клетките на избраната комбинация от щамове млечнокисели бактерии, при хитозана това увеличение е по-високо. Тази тенденция се запазва при всички скорости на замразяване.

4. Разработване на рецептури и технология за получаване на лиофилизирани синбиотични храни на основата на овче и краве мляко от местните породи Родопски цигай и Българско Родопско говедео

Количественият състав на синбиотичните храни от овче и краве мляко включва 80% пробиотичен комплекс (прясно мляко, пробиотични щамове и хитозан) и 20% растителни добавки. Технологичните схеми на синбиотичните храни са представени в дисертационния труд.

5. Изследвания върху качествените показатели на новите синбиотични лиофилизирани храни

5.1.Органолептична оценка - Резултатите показват много добра органолептична възприемчивост на крайните продукти с доминиращ млечнокисел вкус и при двете храни. Това се дължи на съхранената активност на млечнокиселата микрофлора, а също и на оптималното съчетание между бактериите.

5.2.Физикохимична оценка - Резултатите от изследванията на изходната суровина – лиофилизирано прясно овче мляко от порода

Родопски цигай и лиофилизирана синбиотична храна и лиофилизирано прясно краве мляко от порода Българско Родопско говедо и лиофилизирана синбиотична храна са представени в таблици 15 и 16.

Таблица 15. Физикохимични показатели на лиофилизирано овче мляко и лиофилизирана синбиотична храна (n=6)

Показател	Леофилизирано овче мляко (контрола) (x±sd)	Леофилизирана синбиотична храна от овче мляко (x±sd)
Общи липиди (%)	42,57±0,540 a***	31,78±0,370
Белтъчно съдържание (%)	33,80±0,040 a***	32,02±0,021
Въглехидрати (вкл.лактоза) (%)	15,29±0,01 a***	25,68±0,01
Лактоза (%)	15,00 ±0,010 a***	8,10±0,041
Титруема киселинност (°Т)	25,00±1,731 a***	75,08 ±0,004
Активна киселинност (pH)	6,69±0,001 a***	4,91±0,002
Сухо вещество (%)	96,63±0,003 a***	96,86±0,002
Пепелно съдържание (%)	4,97±0,780 a*	7,38±0,100
Остатъчно влагосъдържание (%)	3,37±0,01 a***	3,14±0,003
Витамин С (mg/100g)	3,8 ±0,01 a***	4,64±0,005

P<0,05* P<0,01** P<0,001***

a - лиофилизирано овче мляко / лиофилизирана синбиотична храна от овче мляко.

Таблица 16. Физикохимични показатели на лиофилизирано краве мляко и лиофилизирана синбиотична храна (n=6)

Показател	Леофилизирано краве мляко (контрола) (x±sd)	Леофилизирана синбиотична храна от краве мляко (x±sd)
Общи липиди (%)	39,37±0,182 a***	31,89±0,400
Белтъчно съдържание (%)	30,93±0,040 a***	29,90±0,081
Въглехидрати (вкл.лактоза) (%)	18,7±0,02 a***	26,08 ±0,02
Лактоза (%)	18,00±0,011 a***	6,87±0,043
Титруема киселинност (°Т)	17,67±1,150 a**	70,67±0,581
Активна киселинност (pH)	6,64±0,003 a***	4,71±0,002
Сухо вещество (%)	95,63±0,002 a***	95,45±0,003
Пепелно съдържание (%)	5,98±0,490 a*	7,58±0,250
Остатъчно влагосъдържание (%)	5,02 ±0,04 a***	4,55±0,003
Витамин С (mg/ 100g)	1,92±0,01 a	3,17±0,005

P<0,05* P<0,01** P<0,001***

a - лиофилизирано краве мляко / лиофилизирана синбиотична храна от краве мляко.

Съдържанието на **общи липиди** в синбиотичните храни от овче и краве мляко намалява, спрямо изходните млека, което се дължи на внесените растителни добавки. Новите синбиотични продукти, както и изходните лиофилизирани овче и краве мляко са с високо **белтъчно съдържание**. При млечнокиселата ферментация част от **лактозата** се усвоява от бактериите и количеството ѝ в синбиотичните храни намалява, съответно до 8,10% и 6,87%. От друга страна, общото количество на **въглехидратите** в синбиотичните храни се увеличава с 10,39% и 7,38%. Внасянето на допълнителни съставки - манго и орехови ядки, допринася за увеличаване количеството на **витамин С** в крайните синбиотични продукти. **Енергийната стойност** на изходните лиофилизирани овчи и крави млека е 597 kcal (2499 KJ) и 570 kcal (2383 KJ), а на получените синбиотични храни, съответно 532 kcal (2226 KJ) и 526 kcal (2201 KJ).

5.3. Биохимична оценка на получените синбиотични храни

5.3.1.Маснокиселинен състав на лиофилизирана синбиотична храна на основата на овче мляко от порода Родопски цигай

Съдържанието на **наситени мастни киселини** (табл.17) в лиофилизираното овче мляко от порода Родопски цигай е 63,77 g/100g мазнина, а в получения синбиотичен продукт – 43,84 g/100 g мазнина. Включването на растителна мазнина в овчето мляко води до значително редуциране съдържанието на НМК в продукта с 19,93 g/100g мазнина ($P<0,05$), спрямо това в изходното мляко. Съдържанието на **мононенаситените мастни киселини** в синбиотичния продукт (30,81 g/100g мазнина) остава почти еднакво, спрямо това в изходното овче мляко (30,92 g/100g мазнина). Количеството на **полиненаситени мастни киселини** в синбиотичния продукт от овче мляко има достоверно повишена стойност от 25,35 g/100g мазнина ($P<0,01$) в сравнение с тази на изходното мляко (6,19 g/100g мазнина). Съдържанието на ПНМК нараства четири пъти с 19,16 g/100g мазнина. Това се дължи на добавените компоненти – орехови ядки и киноа, които са носители на есенциални полиненаситени мастни киселини. Наблюдава се намаляване на съдържанието на **транс-изомерите на олеиновата киселина (C18:1)** в синбиотичния продукт с 3,42 g/100g мазнина, спрямо това в изходната суровина ($P<0,01$). С добавяне на растителните компоненти в продукта, се намалява и относителният дял на **конюгираните**

линолови киселини в синбиотичния продукт с 1,15 g/100g мазнина (P<0,01). Съдържанието на **есенциалните мастни киселини ω-3 и ω-6** в синбиотичния продукт значително се увеличава спрямо изходното мляко (P<0,01). Съдържанието на ω-3 мастните киселини нараства четири пъти. Количеството на ω-6 мастните киселини нараства шест пъти в сравнение с изходното мляко. Това може да се свърже с добавките, включени в състава на синбиотичния продукт – растителни компоненти, които са богати на полиненаситени есенциални мастни киселини. **Съотношението на ω-6/ ω-3 мастни киселини** в разработения синбиотичен продукт е 2,56, тоест под 5.0, което съгласно насоките на Световната здравна организация е показател за продукти с нисък рисков фактор за човешкото здраве.

Таблица 17. Групи мастни киселини от лиофилизирано овче мляко от породата Родопски цигай и лиофилизирана синбиотична храна, g/100g мазнина (n=4)

МК-профил	Леофилизирано овче мляко (контрола) (x±sd)	Леофилизирана синбиотична храна от овче мляко (x±sd)
Σ НМК	63,77±3,19 a*	43,84±2,10
Σ МНМК	30,92±1,55	30,81±1,54
Σ ПНМК	6,19±0,31 a**	25,35±1,27
Σ C-18:1cis	24,05±1,20	28,04±1,40
Σ C-18:1trans	5,68±0,28 a**	2,26±0,11
Σ CLA	1,95±0,10 a**	0,80±0,02
Σ ω-3	1,61±0,08 a**	7,07±0,35
Σ ω-6	2,76±0,14 a**	18,10±0,91
Σ C-12:0 - C-14:0	15,37±0,77 a*	9,74±0,49
CLA-c9,t11	1,86±0,007 a***	0,74±0,004
ω-6/ ω-3	1,71	2,56

P<0,05* P<0,01** P<0,001***

a – леофилизирано овче мляко / леофилизирана синбиотична храна от овче мляко.

5.3.2.Мастнокиселинен състав на леофилизирана синбиотична храна на основата на краве мляко от порода Българско Родопско говедо

Получените резултати за мастнокиселинния състав са представени в таблица 18. Съдържанието на **наситени мастни киселини** в синбиотичния продукт от краве мляко (50,60 g/100g

мазнина) е по-ниско, в сравнение с това в изходната суровина (71,50 g/100g мазнина) ($P < 0,05$). Понижаването в съдържанието на НМК в синбиотичния продукт с 20,90 g/100g мазнина е в резултат на внесената растителна мазнина, предимно от сусамов тахан и ленено масло. Количеството на **мононенаситените мастни киселини** в синбиотичния продукт нараства с 3,17 g/100g мазнина, спрямо изходното краве мляко. Повишеното съдържание на МНМК в лененото масло и сусама допринася за нарастването съдържанието на тази група мастни киселини в синбиотичния продукт от краве мляко. В синбиотичния продукт от краве мляко, делът на **полиненаситените мастни киселини** нараства шест пъти с 17,51 g/100g мазнина, спрямо изходната суровина ($P < 0,01$), което се дължи на внесените растителни добавки, които обогатяват продукта с този тип мастни киселини. Наблюдава се намаляване на съдържанието на **транс-изомерите на С18:1** и **конюгираните линолови киселини** в лиофилизирания продукт с 0,61 g/100g мазнина и 0,33 g/100g мазнина в сравнение с лиофилизираното краве мляко.

Таблица 18. Групи мастни киселини на лиофилизирано краве мляко от породата Българско Родопско говедо и лиофилизирана синбиотична храна, g/100g мазнина (n=4)

МК-профил	Леофилизирано краве мляко (контрола) (x±sd)	Леофилизирана синбиотична храна от краве мляко (x±sd)
Σ НМК	71,50±3,58 a*	50,60±2,45
Σ МНМК	25,10±1,26	28,27±1,41
Σ ПНМК	3,62±0,18 a**	21,13±1,06
Σ С-18:1cis	20,85±1,04	23,03±0,021
Σ С-18:1trans	3,32±0,17	2,71±0,22
Σ CLA	0,93±0,04	0,60±0,05
Σ ω-3	0,50±0,03 a**	3,62±0,18
Σ ω-6	2,56±0,13 a**	16,6±0,83
Σ С-12:0 - С-14:0	18,55±0,93 a*	12,95±0,65
CLA-c9,t11	0,71±0,007 a**	0,51±0,012
ω-6/ω-3	5,17	4,58

$P < 0,05^*$

$P < 0,01^{**}$

$P < 0,001^{***}$

a - леофилизирано краве мляко / леофилизирана синбиотична храна от краве мляко.

Количеството на **есенциалните мастни киселини (ω -3 и ω -6)** в синбиотичната храна е значително по-високо, в сравнение с изходното мляко. Добавката на растителни мазнини повлиява достоверно не само върху съдържанието на ω -6 есенциални мастни киселини в синбиотичния продукт, което се увеличава 6 пъти ($P<0,01$), но води до нарастване на съдържанието на ω -3 есенциалните мастни киселини до 7 пъти ($P<0,01$). Това вероятно е свързано с добавката на ленено масло, богато на ω -3 есенциални мастни киселини, и сусамов тахан - на ω -6 есенциални мастни киселини. **Съотношението на ω -6/ ω -3 мастни киселини** в изходното краве мляко е 5,17, т.е. по-висока стойност от 5,00, което означава, че изходното лиофилизирано мляко е със слабо повишен рисков фактор за човешкото здраве. За разлика от него, синбиотичната храна има по-благоприятно съотношение на ω -6/ ω -3 мастни киселини - 4,58.

5.3.3.Макроелементен и микроелементен състав на лиофилизираните синбиотични храни

В таблица 19 е представен макроелементния състав на изходните млека и получените от тях синбиотични продукти.

Таблица 19. Съдържание на макроелементите Ca, K, Mg, Na и P в лиофилизирано овче мляко от породата Родопски цигай, лиофилизирано краве мляко от породата Българско Родопско говедо и лиофилизираните синбиотични храни, g/kg ($n_{1,2}=6$)

Макро-елементи	Леофилизирано овче мляко (контрола) ($\bar{x}\pm sd$)	Леофилизирана синбиотична храна от овче мляко ($\bar{x}\pm sd$)	Леофилизирано краве мляко (контрола) ($\bar{x}\pm sd$)	Леофилизирана синбиотична храна от краве мляко ($\bar{x}\pm sd$)
Ca	6,78 \pm 0,10 a***	5,34 \pm 0,13	6,04 \pm 0,42	5,05 \pm 0,10
K	4,29 \pm 0,31	4,28 \pm 0,30	6,52 \pm 0,74	6,32 \pm 1,26
Mg	0,72 \pm 0,08	0,84 \pm 0,03	0,58 \pm 0,05 a**	1,19 \pm 0,13
Na	1,81 \pm 0,14 a**	3,14 \pm 0,21	1,70 \pm 0,21 a*	3,55 \pm 0,46
P	3,75 \pm 0,13	3,28 \pm 0,29	3,54 \pm 0,24	3,72 \pm 0,20

Съдържанието на **калций** в синбиотичните храни намалява, спрямо това в изходните млека. Съдържанието на **калий** в изходните млека и синбиотичните продукти остава почти непроменено. Количеството на **магнезий** и **натрий** в лиофилизираните синбиотични храни нараства, спрямо това в изходните суровини, което е свързано с

внесените растителни компоненти. Съдържанието на тези два макроелемента в синбиотичната храна от краве мляко се увеличава два пъти, съответно с 0,61 g/kg ($P < 0,01$) и 1,85g/kg, спрямо изходната суровина, а в синбиотичната храна от овче мляко нивата им се повишават, съответно с 0,12g/kg и 1,33 g/kg. **Фосфорното съдържание** в лиофилизирания синбиотичен продукт от краве мляко нараства с 0,18g/kg, спрямо това в изходната суровина, за разлика от синбиотичния продукт от овче мляко, при който съдържанието на фосфор намалява с 0,47 g/kg.

Микроелементният състав на получените синбиотични храни и изходните млека е представен в таблица 20. В синбиотичните продукти от овче и краве мляко се наблюдава тенденция към достоверно повишаване съдържанието на микроелементите Cu, Fe, Mn и Zn спрямо изходните суровини, което се дължи на внесените добавки чия, киноа и сусамов тахан.

Таблица 20. Съдържание на микроелементите Cu, Fe, Mn и Zn в лиофилизирано овче мляко от породата Родопски цигай, в лиофилизирано краве мляко от породата Българско Родопско говедо и лиофилизиран синбиотични храни, mg/kg ($n_{1,2}=6$)

Микро-елементи	Леофилизирано овче мляко (контрола) ($\bar{x} \pm sd$)	Леофилизирана синбиотична храна от овче мляко ($\bar{x} \pm sd$)	Леофилизирано краве мляко (контрола) ($\bar{x} \pm sd$)	Леофилизирана синбиотична храна от краве мляко ($\bar{x} \pm sd$)
Cu	0,30±0,001 a***	1,79±0,001	0,80±0,003 a***	3,90±0,009
Fe	4,33±0,002 a***	15,50±0,002	7,20±0,002 a***	25,10±0,003
Mn	0,65±0,002 a***	6,03±0,005	0,21±0,001 a***	6,34±0,001
Zn	19,10±0,001 ***	19,70±0,004	18,70±0,002 a***	22,80±0,005
		$P < 0,05^*$	$P < 0,01^{**}$	$P < 0,001^{***}$

Съдържанието на **мед** в синбиотичната храна от овче мляко нараства шест пъти ($P < 0,001$) с 1,49mg/kg спрямо изходното мляко, а в синбиотичната храна от краве мляко нараства пет пъти ($P < 0,001$) с 3,10 mg/kg. Количеството на **желязо** в синбиотичните храни нараства три пъти ($P < 0,001$), спрямо изходните суровини. Най-силно е изразено увеличаването на нивото на **мангана**. В синбиотичния продукт от краве мляко съдържанието се увеличава многократно с 6,13mg/kg ($P < 0,001$), а в този от овче мляко нараства девет пъти с 5,38mg/kg

($P < 0,001$), спрямо изходната суровина. Съдържанието на **цинк** в синбиотичния продукт от овче мляко нараства с 11,17mg/kg ($P < 0,001$), а в този от краве – с 19,70mg/kg ($P < 0,001$).

5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящият дисертационен труд е реализирана идеята за разработване на нови лиофилизирани синбиотични храни, богати на биологично активни вещества, на основата на овче мляко от породата Родопски цигай от три района на Средните и Западни Родопи, както и на краве мляко от Българско Родопско говедо от района Борино-Доспат, Западни Родопи. Чрез предварително подбрана комбинация от щамове млечнокисели бактерии са разработени оригинални рецептури и технологични схеми за получаването на нови функционални синбиотични храни с висок процент живи, активни клетки на *L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374 и *L.acidophilus* 1379.

Резултатите от експерименталните изследвания показват, че новите синбиотични продукти, обработени по метода на сублимационното сушене, съдържат богат набор биологично активни вещества - есенциални ω -3 и ω -6 мастни киселини, витамин С, антиоксиданти и други полезни за организма нутриенти - алиментарни фибри, минерални вещества и др., което многократно повишава тяхната хранителната и лечебно-профилактична стойност.

6.ИЗВОДИ

Резултатите от проведените изследвания и научни експерименти, дават основание за **следните изводи:**

1. Данните от изследваните овчи млека от порода Родопски цигай от трите района на Западни и Средни Родопи са с високо съдържание на млечни мазнини (от 5,05 до 8,17%). Хетерогенният състав на пасищата влияе положително върху съдържанието на ПНМК в млякото (8,26 g/100g мазнина), нивото на конюгираните линолови киселини (3,43 g/100g мазнина) и есенциалните ω -3 и ω -6 мастни киселини (1,96 g/100g мазнина и 3,47 g/100g мазнина). При кравето мляко се запазва същата тенденция по отношение на конюгираните мастни киселини (3,57 g/100g мазнина), МНМК (28,93 g/100g мазнина) и ПНМК (6,26 g/100g мазнина).

2. Установено е, че щамовете във вариант 1 (*L.bulgaricus* 1381, *Str.thermophilus* 1374 и *L.acidophilus* 1379 в съотношение 1:3:1), запазват най-висока концентрация на жизнеспособни клетки в симулиран стомашен и чревен сок за период от 24 часа и демонстрират по-висока устойчивост при същите условия след включването им в разтвор на хитозан, в сравнение с чистата клетъчна суспензия.
3. Получените резултати от прилагане на 5 скорости на замразяване – 0.3, 1.5, 15.0, 30.0 и 400°C/min показват, че клетъчните суспензии на изследваните щамове имат най-висока преживяемост при шоково замразяване със скорост от 400°C/min. В пробите без защитна среда тя е в границите от 35 до 53%, а във вариантите с криопротектори значително се увеличава – от 56% до 80%.
4. По физикохимични показатели новите синбиотици представляват продукти с високо белтъчно (32,02% и 29,90%) и липидно съдържание (31,78 % и 31,89%), но с понижено съдържание на лактоза (8,10% и 6,87%), което ги определя като здравословни и полезни за организма.
5. Включването на растителни компоненти в разработените синбиотичните храни от овче и краве мляко достоверно ($P < 0,05$) редуцира нивата на наситените мастни киселини, съответно с 21,84 g/100g и 22,49 g/100g, а количествата на полиненаситени мастни киселини се увеличава съответно от четири до шест пъти, спрямо изходните суровини.
6. Експериментално е доказано, че съдържанието на ω -3 мастните киселини в синбиотичния продукт от краве мляко нараства седем пъти, а в продукта от овче мляко - четири пъти. Количеството на есенциалните ω -6 мастни киселини в синбиотичните храни от овче и краве мляко се увеличава шест пъти. Съотношенията на ω -6/ ω -3 мастните киселини в двата синбиотика са със стойности под 5,00, което означава, че продуктите са с нисък рисков фактор за човешкото здраве.
7. Съдържанието на макроелементите Ca, K, Mg, Na и P в синбиотичните продукти търпи незначителни колебания в сравнение с изходната суровина. Изключение в това отношение прави нивото на натрий и магнезий, което нараства два пъти. В резултат на внесените зърнени добавки е установено многократно нарастване на концентрациите на микроелементите Cu, Fe, Mn в получените синбиотични храни.

7. ПРИНОСИ

Научни приноси

1. Проучен е качественият състав на овче мляко от породата Родопски цигай от три района на Западните и Средни Родопи и краве мляко от породата Българско Родопско говедо от район Борино-Доспат.
2. Установени са динамичните промени в биохимичния състав на млеката през лактационния период на животните (април-юни), с акцент върху съдържанието на биологично активни вещества – CLA, есенциални ω -3 и ω -6 мастни киселини, ПНМК, МНМК, ваксенова киселина, макроелементи и незаменими аминокиселини.
3. Подбрани са подходящи комбинации от щамове млечнокисели бактерии с повишена устойчивост по отношение на преживяемост в стомашно чревния тракт и криогенно третиране.
4. Получени са нови експериментални данни в подкрепа на успешното използване на хитозана като пребиотик, криопротектор и хидроколоидна матрица за включване на млечнокисели бактерии при създаване на синбиотични продукти.
5. Разработени са нови високоенергийни лиофилизирани синбиотични храни от овче и краве мляко с подобрен мастнокиселинен и минерален състав.

Научно-приложни приноси

1. Разработена е технология и две технологични схеми за получаване на нови лиофилизирани синбиотични храни от овче и краве мляко от местните породи и са проведени полупромишлени изпитания.
2. Доказано е, че при шоково замразяване на клетъчните суспензии, при скорост от 400°C/min, избраните щамове млечнокисели бактерии проявяват най-висока преживяемост.
3. Установени са оптимални параметри на процеса лиофилизация на новите продукти, на базата на техния състав, за получаване на концентрати с високо качество.

Приложни приноси

1. Установено е, че млеката от изпитваните породи овце и крави са изключително подходящи като изходна суровина за създаване на функционални продукти, поради наличието на високо съдържание на хранителни и биологично активни компоненти.

2. Създадените храни са изцяло натурални и разширяват възможностите за диетично и лечебно-профилактично хранене. Включването на продуктите в ежедневно хранене на човека създава условия за намаляване на риска от сърдечни заболявания, както и за поддържане на добър здравен статус.
3. С новосъздадените лиофилизирани синбиотични концентрати се обогатява експериментално производствената листа на ИКХТ, свързана със създаване на здравословни храни от нов тип.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Вълчков А., 2013. Качествена характеристика на сурово сборно овче мляко от порода Родопски Цигай през лактационния период (април-юни), сп. Селскостопанска наука, 46, бр. 5-6, стр.42-48.
2. Вълчков А., 2014. Мастнокиселинен профил на овче мляко от породата Родопски цигай, през лактационния период от планински и високопланински пасища на Родопите, *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 17, бр. 4, стр.905-918.
3. Вълчков А., 2014. Сравнение на мастнокиселинния профил на овче мляко от порода Родопски цигай и краве мляко от порода Българско Родопско говедо от планинските и високопланинските пасища на Западните и Средни Родопи, Сборник научни трудове “Научна конференция с международно участие – Хранителна наука, техника и технологии 2014“, Пловдив, том LXI, част 1, стр.572-576.