

ПОЛЕЗЕН ХЛЯБ БЕЗ КОНСЕРВАНТИ.^{1а), б)}

Функционалните храни наред с хранителната си стойност, носят вещества, които оказват ползотворно влияние върху функционирането на органи и системи в човешкия организъм или намаляват риска от заболяване. Хлябът и хлебните изделия са основни храни в изхранването на съвременните хора. За обезпечаване на микробиологичната им безопасност в тях се внасят консервиращи агенти, които пряко влияят върху баланса на микрофлората в тракта. Сериозен проблем са плесенясването и „картофената болест” на хляба. Това налага търсенето на нови пътища за подобряване на микробиологичното качество на тези храни. Още повече, че с влошаване на екологичната обстановка значително се повиши нивото на осемененост на типичните за производството на хляб и хлебни изделия суровини. За да се справят с този проблем, производителите прибегват до все по-засилената употреба на консерванти, които влияят негативно върху здравето на човека. И естествено се налага търсенето на храни без консервиращи агенти, но със запазени или подобрени органолептични характеристики и срок на съхранение. Мощна стратегия за създаването и усъвършенстването на такива храни е селекцията на подходящи щамове лактобацили, бифидобактерии и пропионовокисели бактерии и създаването на закваски за широк диапазон от хранителни продукти – млечни, месни, зърнени и други, които да заместят понастоящем използваните в производствената практика консерванти. В производството на хляб и хлебни изделия е необходимо внасяне на полезна микрофлора (селекционирани щамове хомо- и хетероферментативни млечнокисели бактерии), под формата на кисело тесто, която да обезпечи надежден и целенасочен ферментационен процес и микробиологична безопасност при удължен срок на съхранение, без добавка на консерванти. Разработването и приложението на закваски, в чиито състав са включени лактобацили, за кисело тесто за производството на хляб и хлебни изделия без консерванти с удължен срок на съхранение е актуален проблем, чието решаване ще позволи на човека да се върне към традициите на създаване и консумация на полезен хляб без консерванти.

Ключови думи: консерванти, кисело тесто, закваски, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, плесенясване, бактериална развала

^{а)} проф. д.т.н. Запряна Денкова, Катедра „Микробиология”, Университет по Хранителни Технологии, Пловдив

^{б)} докторант Росица Денкова, Катедра „Биотехнология”, Софийски Университет „Св. Климент Охридски”, София

BENEFICIAL BREAD WITHOUT PRESERVATIVES

Besides their inherent nutritional value functional foods contain substances that have beneficial impact on the functioning of organs and systems in the human body and reduce the risk of disease. Bread and bakery goods are basic foods in the diet of contemporary people. Preservatives are added to the composition of foods in order to ensure their microbiological safety, but these substances affect directly the balance of microflora in the tract. A great problem is mold and bacterial spoilage (roping) of bread. These issues require searching for new ways to improve the microbiological quality of these foods. Moreover, the deterioration of the environment leads to a significant increase in the level of insemination of the typical raw materials used for the production of bread and bakery goods. To deal with this problem manufacturers have resorted to even more extensive use of preservatives that adversely affect human health. There is an increasing demand for foods without preservatives, but with preserved or improved organoleptic characteristics and extended shelf-life. A powerful strategy for the development and improvement of such foods is the selection of suitable strains of lactobacilli, bifidobacteria, propionic acid bacteria and yeasts and the development of starters for a wide range of food products - dairy, meat, cereal, etc., intended to replace the preservatives currently used in manufacture. Beneficial microflora (selected strains homo- and heterofermentative lactic acid bacteria), in the form of sourdough, needs to be introduced in the production of bread and bakery products in order to provide a reliable and targeted fermentation process, microbiological safety and extended shelf life of the final products without the addition of preservatives. The development and application of lactobacilli starters for sourdough for the production of bread and bakery products with extended shelf life without the addition of preservatives is an actual problem whose solution would allow people to return to the traditions of preparation and consumption of useful and beneficial bread and bakery products without preservatives.

Key words: preservatives, sourdough, starters, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, mold spoilage, roping of bread

Съдържание

	Стр.
1. Основни проблеми в хлебопроизводството	4
2. Кои са най-често употребяваните консерванти в производството на хляб и какво е тяхното въздействие върху човешкия организъм?	6
3. Защо кисело тесто?	10
4. Българско кисело тесто	18
5. Замразено кисело тесто	25
6. Лиофилно кисело тесто	26
7. ЛБ-подкислител	27
8. Литература	28

1. Основни проблеми в хлебопроизводството

Човекът познава ферментативната способност на микроорганизмите и я използва от дълбока древност при приготвянето на хляб от грубо смлени житни зърна (без да се отделят обвивката и зародиша на зърното). Така той запазва своите полезни съставки.

Хлябът е един от най-консумираните продукти в световен мащаб с годишно производство 9 милиарда килограма. Хлябът е важна съставка на ежедневно човешко хранене почти във всяка страна по света. Той е източник на хранителни вещества, особено на въглехидрати, фибри, протеини и някои минерали (магнезий, фосфор, желязо).

Хлябът на съвременния човек се приготвя от бяло брашно, мая, сол, консервиращи агенти, подобрители, овкусители и др. В този хляб липсват полезните съставки на житните зърна. Нещо повече бялото брашно не се усвоява добре от организма, което пряко влияе върху функциите на храносмилателния тракт и най-вече на дебелото черво. По-висока е концентрацията на добавяната сол, която заедно с останалите добавки не само нарушават храносмилането, но създават и нови проблеми на гастроинтестиналния тракт, които на по-късен етап водят до редица заболявания не само на самия тракт, но и на свързаните с него органи и системи, като черен дроб, сърдечно-съдова система и др.

Хлебните продукти имат много кратък срок на годност и качеството им зависи от периода от време между печене и консумация. Свежестта на хляба зависи от вкуса и аромата, външния вид и хрупкавостта на кората, твърдостта на средината и обема на хляба. Вкусът на хляба, обаче, се смята за най-важната характеристика за потребителите, като критерий за приемливостта на продуктите [1].

Най-важните качествени характеристики на втасалия пшеничен хляб са големия обем, меката и еластична структура на средината, добрият срок на годност, както и микробиологичната безопасност на продукта [2, 3].

Качеството на хляба зависи от няколко фактора. Вътрешните параметри на брашното, като въглехидрати, глютен, минерални елементи, съдържание на липиди и ендогенната ензимна активност, и от друга страна външните параметри, отнасящи се до процедурата за производство на хляба, като температура, етапи и степен на ферментация, водна активност, редокс потенциал и добавки, и включване на хранителни или реологични подобрители, като млечни съставки, се отразяват на качеството на крайния продукт. Ефектът от тези фактори може да бъде пряк или косвен и повлиява микрофлората,

независимо дали тя се доставя под формата на търговска стартерна култура или чрез традиционните процеси с участието на кисело тесто.

Развалянето на хлебните изделия се дължи главно на растежа на плесенни гъби, като основните видове принадлежат към родовете *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*. В допълнение към големите икономически загуби, произтичащи от наличието на плесенни гъби, допълнителен проблем е и потенциалната продукция на микотоксини, които представляват риск общественото здраве [4].

„Картофената болест” е широко разпространена бактериална развала на хляба, причинена главно от *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, които идват от суровините, атмосферата при печене на хляб и повърхностите на оборудването и все още е основен икономически проблем при хлебопроизводството [5].

„Картофената болест” става забележима в рамките на 12-24 часа след изваждането на хляба от пещта. При печенето на хляба се унищожават само вегетативните форми на бактериите, докато спорите им остават в хляба. Те могат да преживяват процеса на печене, при който температурата в центъра на средината не надвишава 97-101°C [6]. Развалата първоначално се забелязва като неприятна миризма, следвана от променен цвят, лепкава и мека средина на хляба, причинени от разграждането на нишестето и белтъците от микробните амилази и протеази, както и от продуцирането на екстрацелуларните полизахариди [7]. Щамове и на двата вида могат да предизвикат и хранителни заболявания, ако концентрациите им надхвърлят 10^5 cfu/g.

Въпреки че е малко вероятно да се появят хранителни заболявания, свързани с консумацията на хляб с лошо качество, поради мазния външен вид на средината на хляб с високи концентрации на *B. subtilis* and *B. licheniformis*, при който не се забелязва „картофена болест”, е възможно да се предизвикат диария и повръщане.

Намаляването на свежестта на хляба успоредно с увеличаването на твърдостта на средината по време на съхранение води до загуба на приемлив вид за потребителите, процес, известен като стареене. Измененията по време на стареенето включват промени, както в средината, така и в кората на хляба. Настъпват промени и в консистенцията на средината – тя става все по-твърда, по-ронлива и непрозрачна. Стареенето на кората обикновено е причинено от миграцията на влага от средината към кората, в резултат на

което кората става мека, с жилава консистенция, което като цяло е по-малко неприятно от промените в средината [8].

Освен общите физични методи за консервиране на храните (топлинна обработка, хладилно съхранение, съхранение в модифицирана атмосфера, сушене, лиофилизиране) [9], защита на тестените изделия от развала, предизвикана от плесенни гъби, се постига основно чрез инактивиране на замърсяващите спори чрез използване на (1) инфрачервена и микровълнова радиация; (2) гъбни инхибитори като етанол и пропионова, сорбинова, бензоена и оцетна киселина и техните соли; (3) подходящи опаковъчни техники като опаковане в модифицирана атмосфера и (4) включване на кисело тесто [6].

Един от начините за предотвратяване на развалата на хляба и хлебните изделия е добавянето на консерванти. Хранителните консерванти са натурални и синтетични вещества, които подобряват микробиологичната безопасност и удължават срока на съхранение на храните, като предотвратяват тяхната микробна развала. Добавяните към хляба консерванти – калциев пропионат, серен диоксид, калиев сорбат, натриев бензоат, оцетна киселина, подобряват вкусово-ароматичния комплекс, осигуряват неговата пухкавост и дълъг срок на съхранение. За производителите на хляб добавката на химични консерванти е гарант за качеството на произвеждания от тях хляб. Но едва ли те осъзнават, че влагането на такова количество консерванти нарушава нормите за безопасност на храните.

2. Кои са най-често употребяваните консерванти в производството на хляб и какво е тяхното въздействие върху човешкия организъм?

Оцетната киселина (E260) се внася в количество 0.20 – 0.30%. В количество по-голямо от 0.50% и в зависимост от рН на средата оцетната киселина проявява антимикробен ефект, който се свързва с константата и на дисоциация. При високи стойности на рН оцетната киселина практически не влияе върху растежа на микроорганизмите, независимо че значителна част от нея се намира в недисоциирана форма. При рН в границите на 6 – 5 (в тази област е рН на хляба) действието на оцетната киселина се удвоява, тъй като нараства количеството на недисоциираната форма. Действието на оцетната киселина, поради понижаването на рН, е свързано с потискане на

растежа на бактериите, тъй като оптималните стойности на рН на средата за развитието на повечето бактерии, в това число род *Bacillus*, се намират в слабокиселата и неутрална област.

Оцетната киселина оказва инхибиращо действие върху растежа на плесенните гъби и дрождите, но в сравнение с действието на другите консерванти това влияние е слабо. Пълно потискане на растежа на плесенните гъби и дрождите настъпва при 3.50 – 4.00% оцетна киселина. Трябва да отбележим, че по-високите концентрации на сол в хляба засилват инхибиращия ефект на оцетната киселина, поради намаляване на водната активност (a_w). Ацетатът се прилага в производството на хляб по утвърдения стандарт „България”. При това не се допуска употребата на други консерванти.

Вторият по значение консервиращ агент е **калциевият пропионат (E281)**, който се внася в количество 0.10 – 0.32% спрямо частта на брашното. Той се всмуква лесно от храносмилателния тракт, поради добрата си разтворимост във вода. Присъствието на калциевия пропионат във високи концентрации потиска ензимите, блокира обмяната на веществата. Получената при разтварянето пропионова киселина потиска растежа на клетките в организма и предизвиква мигрена. Доказано е, че пропионовата киселина инхибира плесенни гъби и спори на род *Bacillus*, но не и дрожди, и затова е традиционно химично вещество, което се прилага за запазване на хляба. Антимикробно действие притежава недисоциирания калциев пропионат, което в значителна степен зависи от рН на хляба. Нещо повече антимикробната му активност се проявява при високи стойности на рН ($pH \geq 7$). Поради това в допустимите концентрации калциевият пропионат се изявява като слаб консервиращ агент. За да се постигне ефект, той трябва да се внася във високи концентрации. Някои от плесенните гъби, като гъбите от род *Penicillium*, растат при 5% пропионат в средата. Независимо от това калциевият пропионат се влага, за да се потисне растежа на плесенните гъби и бактериите от вид *Bacillus mesentericus*, спорите на които предизвикват „картофената болест” по хляба. Противогъбното действие на пропионата е по-високо от това на лактата и ацетата. В допълнение към ефекта на пропионовата киселина върху цитоплазменото рН, пропионата се превръща в пропионил-СоА, който инхибира пируват дехидрогеназата и по този начин инхибира метаболизма на глюкозата в плесените [10].

Законодателството, което се осъществява в рамките на Европейския парламент и на Директивата на Съвета № 95/2/ЕО изисква пропионовата киселина да се добавя в хляба в концентрация не повече от 3000 ppm [11]. Въпреки това, последните проучвания показват, че при тези условия пропионова киселина не е ефективна срещу обичайните микроорганизми, предизвикващи развала на хляба [12]. Освен това, намаляването на консервантите до под-инхибиторни нива може да стимулира растежа на развала-предизвикващите плесенни гъби и/или продукцията на микотоксини. Поради ниската активност на пропионата се налага той да се внася в по-високи концентрации, за да се предотврати плесенясването на хляба, най-вече да се потисне растежа на микотоксин-продуциращите плесенни гъби. Високите концентрации на калциевия пропионат, обаче, забавят ферментацията на тестото, което може да се компенсира с повишаване на количеството на дрождите или с увеличаване на времето на ферментационния процес. Освен това пропионатът влияе върху вкуса, мириса на хляба, което е нежелателно за хлебните изделия за тостове.

Заедно с калциевия пропионат в хляба и хлебните изделия се внася и **калиев сорбат (E202)** в количество 0.1 – 0.3%. Антимикробната активност на калиевия сорбат е свързана с потискане на действието на различни ензими в микробните клетки, като ензимите, участващи във въглехидратната обмяна – енолаза и лактат-дехидрогеназа; намесва се и в цикъла на трикарбоновите киселини – потиска действието на малат-дехидрогеназата, изоцитрат-дехидрогеназата, кетоглутарат-дехидрогеназата, сукцинат-дехидрогеназата, фумаразата и аспартазата, каталазата и пероксидазата; разрушава клетъчната стена на вегетативните форми на микроорганизмите. Подобно на калциевия пропионат калиевият сорбат притежава ниска константа на дисоциация. При това по-висока инхибираща активност проявява недисоциираната му форма в сравнение с дисоциираната.

Някои микроорганизми обаче включват калиевия сорбат в своята обмяна на веществата (например плесенните гъби от род *Aspergillus* и род *Penicillium*). Поради това калиевият сорбат се прилага за съхранение на микробиологично чисти хранителни продукти. Трябва да се отбележи, че калиевият сорбат не оказва влияние върху растежа на бактериите от род *Bacillus* и род *Clostridium* в слабокиселата и неутралната област на рН (рН=5 - 7). При това за всеки вид микроорганизъм има определена стойност на рН за

действие, както и определена концентрация (в повечето случаи те надхвърлят максимално допустимите стойности).

В сравнение с калциевия пропионат калиевият сорбат проявява значително по-висока инхибираща активност. Той се добавя в брашното при замесването на тестото. Особено добър ефект се постига, когато се използва лиофилизирана хлебна мая. При внасяне на пресувани дрожди се наблюдава същото действие, както при калциевия пропионат – поради влиянието му върху растежа на дрождите се наблюдава забавяне на ферментацията на тестото и удължаване на ферментационния процес. Понастоящем, за преодоляването на възникналите проблеми при производството на хляб се внася твърде голямо количество дрожди (суха или пресувана мая) – до 4 – 5%. При усвояването на отделните съставки на хляба в човешкия организъм, от дрождевите клетки се усвояват основно белтъци, въглехидрати, липиди, но не и техните нуклеинови киселини. Диетата на съвременния човек е високоенергийна и нуждите на индивидите от енергия се задоволяват от разграждането на белтъци, въглехидрати и липиди. Но не се налага да използват нуклеиновите киселини като източник на енергия. Ако все пак те се разградят, се получава пикочна киселина, чието натрупване в организма предизвиква заболяването подагра.

По-рядко в производството на хляб се използва **натриев бензоат (E211)**, който се внася в количество до 0.15 – 0.25% предимно за потискане на растежа на плесенните гъби и дрождите. Поради високата константа на дисоциация натриевият бензоат се прилага при консервиране на кисели храни и слабо потиска растежа на бактериите. Нещо повече, той е консервиращо вещество с доказан канцерогенен ефект.

Много рядко в производството на хляб и хлебни изделия се прилага **серен диоксид (E220)**. Той се добавя към брашното и има избелващ ефект. Това е един от консервиращите агенти, които трябва да се избягват като добавка към хляба и хлебните изделия.

Всеки химичен консервант има свой рН оптимум на действие. Внесен в храна, която няма тази рН стойност, той не проявява полагащата му се превантивна роля. Но попаднал заедно с храната в храносмилателния тракт, където рН се изменя от 1.8 – 2.0 до 7 намира оптимална среда за своето действие и наред с влиянието върху патогенната и сапрофитна микрофлора, влияе и върху полезната флора, населяваща тракта. Нарушаването на

микрофлората в стомаха и червата в значима степен определя здравословното състояние на индивидите.

3. Защо кисело тесто?

Добавянето на кисело тесто е най-добрият подход за запазване на хляба от микробна развала, отговарящ на потребителското търсене на природни хранителни продукти, без добавки [6].

Киселото тесто е смес от брашно (пшенично, ръжено, оризово и др.) и вода, което ферментира под действието на млечнокисели бактерии и дрожди [13]. Тези микроорганизми обикновено произхождат от брашното, съставки на тестото или от околната среда.

Съществуват значителни доказателства по отношение на положителните ефекти на киселото тесто при производството на хляб, включително подобрения в обема на хляба и структурата на средината, вкуса, хранителните стойности и срока на годност [8], поради забавяне на процеса на стареенето и предпазване от плесенна и бактериална развала [14].

Положителният ефект на киселото тесто за обема на хляба е резултат от по-добрата газозадържаща способност на глутена в тестото, съдържащо кисело тесто, разтваряне на пентозаните, променени активности на ендогенните ензими, което се дължи на използването на кисело тесто и последващо ниско рН, и по-бързата дрождева ферментация в присъствието на млечнокисели бактерии [15]. Подобряването на специфичния обем на хляба е свързано с намаляване на скоростта на стареене, което е резултат от намаляването на мекотата на средината при хляб с кисело тесто по време на съхранение [8]. Тези положителни ефекти са свързани с метаболитните процеси на микроорганизмите, влизащи в състава на киселото тесто, като млечнокисела ферментация, протеолиза, продуциране на екзополisahариди и синтез на летливи и антимикуробни съединения [6, 8].

Микроорганизмите в киселото тесто традиционно се оставят да се развиват естествено, но за да се контролира процеса на приготвяне на киселите теста и да се оптимизират ползите от тях се прилагат нови закваски с определен щамов състав. Тенденция е разработването на нови и подобрени закваски за оптимизация на ферментациите с кисело тесто, водещи до получаването на хранителни продукти с по-добри качества. Ето защо изборът на използваните микроорганизми е от голямо значение,

не само да се осигури висококачествено кисело тесто, но и за по-лесен контрол на процеса на приготвяне на кисело тесто. Асоциациите на дрожди и млечнокисели бактерии са самозащитаващи се и саморегулиращи се [16].

За да се приготвят закваски за хлебопроизводството, основната предпоставка е селекцията на щамове. Дизайнът на закваските се основава главно на подкисляването, протеолизата и синтеза на летливи съединения по време на ферментацията на киселото тесто [17]. Освен това, функционалните закваски за кисело тесто трябва добре да се адаптират към средата и процеса на ферментация на киселото тесто, за да се гарантира стабилност и постоянство на тестото [18]. Въпреки че видовете, принадлежащи към родовете *Pediococcus*, *Leuconostoc* или *Weissella*, са изолирани от кисело тесто, по-голямата част на автохтонните щамове от кисело тесто принадлежат към род *Lactobacillus*.

Като компоненти на закваските за хляб се прилагат селектирани щамове хомо- и хетероферментативни млечнокисели бактерии. Те участват във ферментацията на тестото и във формирането на вкусово-ароматния комплекс на готовия хляб, удължават срока на съхранение и трайността, като го предпазват от картофена болест и плесенясване.

Хетероферментативните млечнокисели бактерии влияят благоприятно на структурата на тестото, респективно на хляба. Отделят и въглероден диоксид, който допълнително повишава обема на хляба. Хетероферментативните млечнокисели бактерии, въпреки че образуват по-малко количество въглероден диоксид от дрождите, включени в закваските за хляб заедно с тях, са много важни за хляба, защото понижават киселинността и придават специфичен вкус на хляба. Млечнокиселите бактерии имат ключова роля по отношение на предпазване на тестото от развала и контаминация.

Хлябът, получен със закваски от хомоферментативни видове млечнокисели бактерии, не носи специфичен аромат. Развитието само на хетероферментативни култури води до образуване на по-голямо количество оцетна киселина, която придава на хляба остър мирис и по-кисел вкус. Хляб с най-добро качество се получава при съвместното използване на хомо- и хетероферментативните млечнокисели бактерии в определено съотношение [19].

Формирането на богат вкус се контролира чрез ограничаване на количеството на използваното кисело тесто (5-10g/100g тесто) при приготвянето на главното тесто. Този подход, обаче, ограничава количеството на ароматните прекурсори, както и важни вкусови съединения, идващи от киселото тесто, в крайното тесто за хляб [15].

Друга възможност е да се коригират условията за преработка, за да се продуцират максимално количество ароматни прекурсори, като аминокиселини и вкусовоактивни летливи съединения с минимално подкисляване [20]. Подобреният обем и срок на годност на хляба, приготвен с кисело тесто зависи от характера и интензивността на процеса на подкисляване [15].

Подборът на чисти култури се свежда до използване на отделни видове или комбинация от видове, характерни за дадения технологичен процес и притежаващи способността да се развиват в тези условия. При подбора е необходимо първо да се изучат физиологичните свойства на отделните видове. Най-активните от тях се използват в процеса на приготвяне на хляба по определената технология. Крайният подбор на щамовете млечнокисели бактерии и дрожди определя качеството на готовия хляб и хлебните изделия. От особено значение при използването на чистите култури е те да се запазят в закваските при продължително използване. Използването в производството на високо активни дрождеви и млечнокисели закваски изисква изследвания за отбор на активни щамове от една страна, а от друга - разработването на методи за запазване на производствените култури.

Дрождите се свързват с млечнокиселите бактерии в киселото тесто и съотношението дрожди/млечнокисели бактерии обикновено е 1:100. Дрождите, откривани в киселите теста, принадлежат към повече от 20 вида. Доминиращият вид *Saccharomyces cerevisiae* често се въвежда чрез добавянето на хлебна мая [19]. Типични дрожди, свързани с млечнокиселите бактерии в киселите теста са *Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis* (понастоящем наименована като *Candida milleri*), и *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) [21]. Други видове дрожди, открити в екосистемата кисело тесто са: *Pichia anomala* (известна като *Hansenula anomala*), *Saturnispora saitoi* (известна като *Pichia saitoi*), *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* и *Pichia membranifaciens* [22].

Голямо е разнообразието на млечнокисели бактерии, изолирани от кисело тесто: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis* (облигатно хомоферментативни), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus homohiochii*, (факултативно хетероферментативни), *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus viridiscens*, *Lactobacillus panis* и *Lactobacillus pontis* (облигатно хетероферментативни) [23].

Lactobacillus sanfranciscensis, *Lactobacillus brevis* и *Lactobacillus plantarum* са най-често изолираните лактобацили от кисели теста [6].

При спонтанната ферментация на кисело тесто освен доминиращите видове млечнокисели бактерии и дрожди, които се изолират в големи количества и са със значителен принос за ферментацията, да съществува и вторична микрофлора, която е с пониски концентрации. Тази вторична микрофлора включва млечнокисели бактерии от видовете *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus pontis* и дрождевите видове като *S. exiguus*, *Candida krusei* and *Candida milleri*. Тези видове може да имат ефект върху екосистемата на киселото тесто пряко или косвено, като оказват влияние върху доминиращата микрофлора [24].

Стабилният ко-метаболизъм между млечнокисели бактерии и дрожди е характерен за много храни, което позволява използването на субстрати, които иначе са неферментируеми (например нишесте) от отделните микроорганизми и по този начин се увеличава микробната адаптивност към сложните хранителни екосистеми [6].

Стабилността на зрелите кисели теста зависи от микрофлората от околната среда (брашното и другите използвани съставки, присъщата микрофлора и др.), метаболитната активност (амилазната активност на брашното и/или микроорганизмите, способността за регенерация на кофактори и способността за производство на енергия на включените микроорганизми и т.н.), както и от специфичните технологични параметри на процеса (химичен и ензимен състав на брашното, втасване и температура на съхранение, рН и редокс потенциал, хидратация на тестото и добив, брой на стъпките на презамесване на киселото тесто, времето за ферментация между презамесванията, използването на закваски и/или пекарски дрожди и т.н.) [6]. Като следствие от хетерогенността на тези екологични детерминанти, зрелите кисели теста се различават по видово разнообразие и метаболитна активност [18].

Ферментацията на киселото тесто може да повлияе на чревното здраве чрез няколко механизма: 1) модулиране на комплекса от хранителни фибри и последващия модел на ферментация; 2) продукция на екзополизахариди с пребиотични свойства и 3) продукция на метаболити от ферментация на млечнокисели бактерии, които влияят на чревната микрофлора [25].

За да се осигурят продукти със съответния вкус, консистенция и стабилност по време на съхранение, както и за подобряване на безопасността на продуктите, повечето производители използват чисти микробни култури, самостоятелно или в комбинация, за да се контролира ферментацията и нейните продукти [26]. С включването на стартерни култури, рН пада много по-бързо, затова целият производствен процес се ускорява, което води до икономически ползи за производителя. По-голямата част от стартерните култури са природни изолати на желаните микроорганизми, обичайно откривани в субстратите.

Чистите култури дрожди и млечнокисели бактерии, внесени в достатъчно количество, обезпечават бърза и надеждна стабилизация на доминиращата микрофлора, нормален ферментационен процес, както и активно участие в качеството на готовия хляб. За да се наблюдава този ефект, се изисква правилен подбор на видове и щамове млечнокисели бактерии и на технологична схема, контрол върху чистотата и активността на културата.

Използването на хлебни дрожди при производството на ръжен хляб не отстранява използването на кисели теста. При ръжения хляб е необходимо понижаване на рН, за да се изпече. Свойствата за печене на ръженото и пшеничното брашно се различават - ръжените брашна съдържат високи нива на пентозани. В ръжените теста белтъците играят малка роля в процеса на формиране на структурата на тестото в сравнение със същата роля при пшеничните теста, защото пентозаните потискат образуването на глютеновата мрежа. Свойствата разтворимост и набухване на пентозаните нарастват при ниските стойности на рН, характерни за киселите теста. Освен това, при киселинните условия частично се инактивират ензимни активности, особено амилазната активност в ръженото брашно. Това е важен аспект, тъй като нишестето в ръжта желира при относително по-ниска температура $55-70\pm 1^{\circ}\text{C}$, което съвпада с температурния диапазон за максималната активност на α -амилазата. При ръжено брашно с лошо качество, амилазната активност е толкова висока, че средината може напълно да се хидролизира. Прекомерното количество α -амилаза в ръженото брашно не само прави средината леплива, но при по-високи нива, се наблюдава намаляване на обема на хляба. Подкисляването оказва положителен ефект върху структурата на нишестените гранули, което води до повишен водосвързващ капацитет. Повишаването на киселинното съдържание на ръжените теста подобрява

техните физични свойства, правейки ги по-еластични и разширяеми и придава кисел привкус, който е характерен за ръжения хляб [8].

Установен е синергичен ефект при кисело тесто, ферментирало с противогъбни щамове на *Lactobacillus plantarum* в комбинация с калциев пропионат (САР) за производство на пшеничен хляб [27]. Всъщност включването на кисело тесто позволява да се намалят нивата на САР с около 30%, без да се повлиява негативно срока на годност на хляба [28].

Антимикробната активност на киселото тесто се дължи на млечната киселина, оцетната киселина, въглеродния диоксид, диацетила, етанола, водородния пероксид и бактериоцините, продуцирани от млечнокиселите бактерии по време на ферментацията [7].

Антимикробните вещества, продуцирани от някои млечнокисели бактерии, подпомагат растежа на микроорганизмите, предизвикващи развала, и патогенните микроорганизми, когато те са устойчиви на условията на печене и са активни при физичните условия в хляба.

Основните характеристики на едно антимикробно вещество, за да бъде активно при условията на храната, е то да се продуцира в активни концентрации и ефектът му да не е маскиран от хранителни компоненти.

Бактериоцините са антимикробни пептиди или малки белтъци, които потискат по бактерициден или бактериостатичен начин, микроорганизми, които обикновено са тясно свързани с щама продуцент. Бактериоцин-продуциращите щамове са защитени срещу собствените си бактериоцини. Всеки бактериоцин-продуциращ щам има свой специален белтък, експресиращ се едновременно с бактериоцина, на който се дължи имунитета му. Бактериоцините допринасят за конкурентоспособността на щама продуцент в екосистемата на ферментиралите храни.

Въпреки че според Rosenquist and Hansen, 1998 [29] различните бактериоцини, продуцирани от млечнокиселите бактерии, са неефективни срещу растежа на *Bacillus* sp. в хляба, някои бактериоцини от млечнокисели бактерии, асоциирани с киселото тесто, показват способност за инхибиране на патогените, пренасяни с храната, и/или на бактериите, предизвикващи хранителна развала, включително и *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, поради което тяхното използване като хранителни добавки или прилагането на щамове продуценти като стартерни култури, допринася за

производството на по-безопасни храни. Освен това, бактериоцините намаляват химическите консерванти, използвани в хранително-вкусовата промишленост [6].

Според Schnurer and Magnusson, 2005 [30] основните противогъбни съединения, продуцирани от различните млечнокисели бактерии, са: млечна и оцетна киселина, въглероден диоксид, диацетил, водороден пероксид, капронова киселина, 3-хидрокси мастни киселини, фенилмлечна киселина, циклични дипептиди, реутерин и фунгицини [7].

Съществуват редица потвърждения за противогъбните свойства на някои лактобацили, напр. за *Lactobacillus acidophilus*, за *Lactobacillus casei*, за *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, за *L. pentosus*, за *L. plantarum*, за *Lactobacillus rhamnosus*, за *Lactobacillus salivarius*, за *Lactobacillus sanfranciscensis*, за *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* и за *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetyllactis*.

Lavermicocca et al., 2000 [12] пречистват и охарактеризират две антигъбни съединения, продуцирани от *Lactobacillus plantarum* ITM21B, идентифицирани като фенилмлечна и 4-хидрокси-фенилмлечна киселини, които запазват своите фунгицидни активности след изпичането. Доказано е, че лактобацилите, които са в състояние да продуцират горните две противогъбни съединения, сред които фенилмлечната киселина е с най-висока активност, забавят растежа на *Aspergillus niger* и *Penicillium roqueforti* в тестото до 7 дни и значително удължават срока на годност на хляба [12, 31].

До голяма степен противогъбния капацитет на млечнокиселите бактерии се дължи на продукцията на противогъбен белтък или белтъчни съединения. Други видове, като *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus sanfranciscensis*, продуцират специални органични киселини (съответно 3-фенил-L-млечна киселина и капронова киселина), които имат противогъбни свойства [31].

Ароматът на печените изделия с участието на кисело тесто се повлиява от суровините, ферментацията на киселото тесто, от типа на стартерните култури и от условията на импрегниране и печене. Ароматните вещества се премахват или генерират по време на целия процес на производство на хляб. Микробните и ензимните превръщания на въглехидратите, аминокиселините и липидите в тестото водят до получаването на вкусовите съединения, свързани с аромата на средината, т.е., алкохоли, естери и карбонилни съединения, докато ароматът на кората се влияе от термичните реакции, настъпващи по време на печене [28].

Съществуват две категории ароматни съединения, получени по време на ферментацията на киселото тесто. Нелетливите съединения, включително органични киселини, продуцирани от хомо- и хетероферментативни бактерии, които подкисляват средата, намаляват рН и допринасят за аромата на тестото за хляб и летливите съединения на хляба с кисело тесто, които включват алкохоли, алдехиди, кетони, естери и сяра. Всички тези съединения са продуцирани в резултат на биологични и биохимични действия по време на ферментацията и допринасят за формирането на вкуса на хляба [32].

Хлябът, приготвен с кисело тесто, има по-високо съдържание на летливи вещества и постига по-високи резултати при оценка на крайния продукт, в сравнение с хляб, химически подкислен с млечна и оцетна киселина.

Млечнокиселите бактерии могат да катализират реакции като дезаминиране, трансаминиране и декарбоксилиране, и метаболизмът на аминокиселините също допринася за формиране на вкуса на крайния продукт [28].

Най-важните фактори, които регулират нивата на аминокиселини в пшеничното тесто, са рН на тестото, времето на ферментация и консумацията на аминокиселини от ферментиращата микрофлора [8].

Киселите теста се използват в производството на обикновен хляб, приготвен с дрожди (като носители на вкусово-ароматния комплекс или подобрители на качеството на хляба, под формата на активни или неактивни препарати от кисело тесто); на специални традиционни хлябове (използва се кисело тесто като естествен агент, осигуряващ втасване, заради високото си качество); традиционни ръжени хлябове, както и сладкиши и бисквити, пица и различни сладки печива [33].

Целите, които се постигат чрез използването на кисело тесто, са значителното увеличение на времето на запазване на хляба при съхранение, увеличаването на хранителната стойност и по-добри органолептични характеристики на хляба. Увеличаването на времето на запазване се дължи на по-високите стойности на киселинността и по-високата достигната концентрация на органични киселини в сравнение с търговския хляб, произведен с хлебна мая. Подобряването на органолептичните характеристики се дължи на присъствието на значителни количества летливи и нелетливи съединения, които подобряват вкуса на хляба. Въпреки това, производството на хляб с използването на кисело тесто е много чувствителен метод, който зависи от различни

параметри, които трябва да бъдат контролирани. Най-важни измежду тях са рН по време на ферментация, температурата на ферментация и внимателният подбор на стартерни култури за кисели теста с конкретни и желани свойства [34].

За да се осигурят продукти със съответния вкус, консистенция и стабилност по време на съхранение, както и за подобряване на безопасността на продуктите, се използват чисти микробни култури, самостоятелно или в комбинация, за да се контролира ферментацията и нейните продукти.

Млечнокиселите бактерии ускоряват времето за приготвяне на хляба и подобряват технологичните показатели. Не всички млечнокисели бактерии могат да се размножават в брашнената маса. В нашата страна понастоящем не се прилагат закваски от млечнокисели бактерии в производството на хляб. За да бъдат включени в състава на закваски за хляб и хлебни изделия се налага селекция на щамове млечнокисели бактерии.

4. Българско кисело тесто

Първата стъпка към крайната цел – създаване на закваски и технология за получаване на микробиологични подкислители – включва мащабна работа по изолирането на лактобацили от различни източници и пълната им видова идентификация чрез прилагане на полифазна таксономия, включваща комбинация от съвременни морфологични, физиолого-биохимични и молекулярно-генетични методи (ARDRA анализ и секвениране на гена за 16S рРНК). Изолираните щамове принадлежат към видовете *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus sanfranciscensis*. Въз основа на априорна информация от литературна справка и предварителен опит на екипа за по-нататъшни изследвания са подбрани представители на видовете *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus sanfranciscensis*, изолирани от различни източници. Следват изследвания на способността на щамовете да се развиват на среда брашно/вода, тяхната антимикробна активност срещу сапрофитни микроорганизми, чувствителността им към най-често прилаганите в хлебопроизводството консервиращи агенти. Изключително важен е целенасоченият и

внимателен подбор на стартерни култури с конкретни и желани свойства, за да се създадат симбиотични закваски за кисели теста.

Изследваните щамове на *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus sanfranciscensis* се развиват на среда брашно/вода, като натрупват високи концентрации на жизнеспособни клетки при ежедневното презамесване на еднощамовите кисели теста.

Въз основа на резултатите от тези изследвания са създадени 2 комбинации за кисело тесто за пшеничен хляб:

Двущамова комбинация: *Lactobacillus brevis* + *Lactobacillus paracasei*

Четирищамова комбинация: *Lactobacillus brevis* + *Lactobacillus fermentum* + *Lactobacillus paracasei* + *Lactobacillus plantarum*

Двете комбинации са изследвани в микробиологична лаборатория и са апробирани в производствена лаборатория. Резултатите от тези опити недвусмислено показаха наличие на симбиотични взаимоотношения между включените в комбинациите щамове.

Кисели теста с двете симбиотични закваски са включени в различно процентно съотношение при приготвянето на пшеничен хляб – 5%, 7% или 10% за кисело тесто с двущамовата закваска и 5% или 7% за кисело тесто с четирищамовата закваска. Целта е да се определи по-добрата закваска и процентът на включването на кисело тесто с нея за получаването на пшеничен хляб с по-добро качество. Най-добри резултати се получават с четирищамовата закваска при процент на включване на киселото тесто при замесване на главното тесто – 7%. – Полученото главно тесто е по-здро, по-еластично, късовете хляб са по-високи. Готовият пшеничен хляб е с по-мека и по-светла средина, с приятен и характерен млечнокисел аромат, по-тъмна и хрупкава кора.

Влошаването на екологичната обстановка, както в България, така и по целия свят, води до получаването на силно осеменени с плесенни спори и спори на *Bacillus* sp. брашна. При използването на тези брашна в хлебопроизводството се получават хляб и хлебни продукти, които са с твърде кратък срок на съхранение, поради настъпването на плесенна и бактериална развала, известна още като „картофена болест”. Това води до големи икономически загуби за производителите, като в същото време консуматорите са изложени на сериозен здравословен риск. Тези проблеми са особено остри през топлите месеци. За да се справи с този проблем, промишлеността прибегва до все по-засилената

употреба на консерванти, които влияят негативно върху здравето на консуматора. Освен това консервантите имат бактериостатичен и фунгистатичен ефект, но не проявяват бактерициден и фунгициден ефект. Предотвратяването на плесенната и бактериална развала на хляба и хлебните изделия може да се осъществи и чрез прилагането на редица физични методи, но добавянето на кисело тесто е единственият вариант, който отговаря на информираното потребителско търсене на безопасни храни, които са минимално обработени и без химични добавки.

Необходимо бе да се установи концентрацията на добавяне на кисело тесто към главното тесто по време на хлебопроизводство за получаването на хляб и хлебни изделия с удължен срок на годност без добавянето на консерванти, както и без да се влошават характеристиките на произведените продукти. За да бъдат включени в състава на закваски за кисело тесто за хляб с цел предотвратяване на микробна развала на крайния продукт и удължаване на срока му на годност без прилагането на консерванти, е необходимо да бъдат проведени допълнителни изследвания с щамове лактобацили.

Инхибиращото действие на лактобацилите срещу сапрофитни микроорганизми се определя по метода на дифузия в агар, като паралелно се изследва активността на културалната течност (КТ), безклетъчната супернатанта (БСН) и неутрализираната безклетъчна супернатанта с рН=6.5 (НБСН) поотделно на всеки от щамове. Всички щамове демонстрират отчетлива антимикробна активност срещу сапрофити: плесени (*Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp.), бактерии (*Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*), но не и срещу хлебните дрожди *Saccharomyces cerevisiae* при 30°C (температурата, при която се развиват закваските в производствената лаборатория, при приготвянето на ЛБ-подкислителите и стайната температура при замесване и втасване от крайния консуматор). Установено е, че наблюдаваното инхибиране се дължи както на конкуренция за субстрати, така и на продуцираните от лактобацилите млечна и други органични киселини, бактериоцини и други вещества с антимикробни свойства.

Определянето на чувствителността на лактобацилите към калиев сорбат и калциев пропионат става по метода на дифузия в агар. При използваните различни концентрации на калиев сорбат и калциев пропионат (0,1%; 0,2% или 0,3%) не е наблюдавано потискане на растежа на изследваните щамове лактобацили, което позволява включването им в

състава на закваски за кисело тесто за хляб, дори едновременно с изследваните консерванти.

Въз основа на тези експерименти е осъществена селекция на пробиотичните щамове хомо- и хетероферментативни лактобацили с най-добри характеристики и са създадени и апробирани в производствена лаборатория 4 симбиотични комбинации. След предварителен анализ на резултатите от предходни изследвания на закваска за кисело тесто с най-добри характеристики е определена комбинация, означена като „Основна”, вклучваща щамове на *Lb.paracasei*, *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* и *Lb.fermentum* в съотношение съответно 1 : 2 : 1 : 1. С нейно участие са направени четири нови комбинации – две, в които е включен и щам *Lactobacillus buchneri*, за получаване на пшеничен хляб, и две, в които е включен щам *Lactobacillus sanfranciscensis* за получаване на ръжен хляб. Към състава на две от закваските е добавен и пробиотичен щам *Propionibacterium frendenreichii* ssp.*shermanii*:

Комбинация 1: Комбинация „Основна” + *Lactobacillus sanfranciscensis*

Комбинация 2: Комбинация „Основна” + *Lactobacillus sanfranciscensis* + *Propionibacterium frendenreichii* ssp.*shermanii*

Комбинация 3: Комбинация „Основна” + *Lactobacillus buchneri*

Комбинация 4: Комбинация „Основна” + *Lactobacillus buchneri* + *Propionibacterium frendenreichii* ssp.*shermanii*

Резултатите от изследванията на четирите комбинации в микробиологична лаборатория и апробацията им в производствена лаборатория ясно показват наличието на симбиотични взаимоотношения между щамовете в комбинациите.

При изследването на антимикуробната активност на киселите теста срещу сапрофитни микроорганизми по метода на дифузия в агар е установено, че всички теста проявяват инхибиращо действие срещу *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. и *Penicillium* sp. Нито едно кисело тесто със закваска не потиска *Saccharomyces cerevisiae*. До известна степен наблюдаваната антимикуробна активност на комбинациите срещу сапрофитните микроорганизми се дължи на присъствието на щамове от вида *Lactobacillus plantarum*, които потискат растежа на предизвикващия „картофена болест” *Bacillus subtilis*, благодарение на продуцираните от *Lactobacillus plantarum* бактериоцини и органични киселини. При сравнение между закваските с участието на

Lactobacillus buchneri LBRZ6 (Закваска 3 и Закваска 4) се забелязва, че закваска 4 (с участие на *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*) е с по-висока антимикробна активност срещу сапрофитните микроорганизми. Аналогични са изводите при сравнение на Закваска 1 и Закваска 2, които са с участие на *Lactobacillus sanfranciscensis*, което е явно доказателство за инхибиращото действие на *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* срещу сапрофитите.

С четирите кисели теста с четирите закваски е изпечен хляб с различен процент кисело тесто, за да се определи най-добрата комбинация за получаването на пшеничен и ръжен хляб, както и оптималния и процент на включване при приготвяне на главно тесто, за да се предотврати максимално дълго време плесенясването и „картофената болест” на изпечения хляб, без това да влияе негативно върху органолептичните му показатели. Киселите теста с разработените стартерни комбинации се влагат в количество 10%, 15% или 20% при нестерилни условия и съхранението при различни температури на изпечения хляб също се осъществява в нестерилни условия, максимално доближаващи се до условията на домашно съхранение. Изпечените хлябове се съхраняват при стайна температура и при 37°C в продължение на 96 часа за определяне на бактериална развала (Табл. 1) и при стайна температура и при 30°C в продължение на 120 часа за определяне на плесенна развала (Табл. 2).

Най-рано се появява бактериална развала в контролния хляб – на 48^а час при 37°C и на 72^а час при стайна температура. По стандарт не трябва да се наблюдават признаци на бактериална развала до 48^а час. Изпеченият контролен хляб не отговаря на стандартните изисквания за микробна безопасност на хлебните продукти. Най-добрият процент на включване на кисело тесто с разработените закваски за ръжен и пшеничен хляб е между 10% и 15% при използване на кисели тесто със закваска 2 (за ръжен хляб) или кисело тесто със закваска 4 (за пшеничен хляб). Важно е да се отбележи, че двете най-добри комбинации включват и пробиотичния щам пропионовокисели бактерии *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* (Табл. 1).

Оптималната концентрация на включване на кисело тесто със закваска 2 за ръжен хляб или закваска 4 за пшеничен хляб за предотвратяване на плесенна развала, без негативно повлияване на обема и вкусово-ароматния профил на получения хляб, е 15 – 20%.

Таблица 1.

Бактериална развала, причинена от *Bacillus* sp. при съхранение на изпечения хляб при 37°C и при стайна температура

Проби	Температура	24 h		48 h		72 h		96 h	
		СР	Мирис	СР	Мирис	СР	Мирис	СР	Мирис
Контрола	37°C	-	Не	I	Да	II	Да	III	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 10%	37°C	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 15%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 20%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 2; Ръжена закваска 10%	37°C	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 2; Ръжена закваска 15%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 2; Ръжена закваска 20%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 3; Пшенична закваска 10%	37°C	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
Закваска 3; Пшенична закваска 15%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
Закваска 3; Пшенична закваска 20%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	I	Да
Закваска 4; Пшенична закваска 10%	37°C	-	Не	-	Не	I	Да	II	Да
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 4; Пшенична закваска 15%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
Закваска 4; Пшенична закваска 20%	37°C	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не
	стайна температура	-	Не	-	Не	-	Не	-	Не

Степен на развала (СР):

I степен – едва уловима (приятен плодов мирис)

II степен – слаба (промяна в миризмата - остра)

III степен – средна (влажна, лепкава средина; миризма - остра)

IV степен – силна (отвратителна с жълто кафява средина)

Таблица 2.

Плесенна развала при съхранение на изпечения хляб при 30°C и при стайна температура

Проби	Температура	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Контрола	30°C	Не	Не	Да	Да	Да
	стайна температура	Не	Не	Да	Да	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 10%	30°C	Не	Не	Не	Да	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Да	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 15%	30°C	Не	Не	Не	Не	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Да
Закваска 1; Ръжена закваска 20%	30°C	Не	Не	Не	Не	Не
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не
Закваска 2; Ръжена закваска 10%	30°C	Не	Не	Не	Да / Не – най-малко; единични колонии	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Да / Не – най-малко; единични колонии	Да
Закваска 2; Ръжена закваска 15%	30°C	Не	Не	Не	Не	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не
Закваска 2; Ръжена закваска 20%	30°C	Не	Не	Не	Не	Не
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не
Закваска 3; Пшенична закваска 10%	30°C	Не	Не	Не	Да	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Да	Да
Закваска 3; Пшенична закваска 15%	30°C	Не	Не	Не	Не	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Да
Закваска 3; Пшенична закваска 20%	30°C	Не	Не	Не	Не	Не
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не
Закваска 4; Пшенична закваска 10%	30°C	Не	Не	Не	Да / Не – най-малко; единични колонии	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Да / Не – най-малко; единични колонии	Да
Закваска 4; Пшенична закваска 15%	30°C	Не	Не	Не	Не	Да
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не
Закваска 4; Пшенична закваска 20%	30°C	Не	Не	Не	Не	Не
	стайна температура	Не	Не	Не	Не	Не

Извършени са алвеографски изследвания на влиянието на различни количества пшенична закваска върху реологичните характеристики на пшенично брашно. Добавянето на пшенична закваска в широк диапазон от 5% до 20% води до следните промени:

1. Сила на брашното (тесто) - Добавка на 5% кисело тесто не влияе върху силата на брашното. При добавяне на 7% и 10% силата на брашното се понижава с 14 – 16%. При високите нива на влагане (15% и 20%) силата на брашното рязко намалява – съответно с 40% или 45%.

2. Еластичност и разтегливост - Промените в тези два показателя са приблизително същите, както при показателя сила на брашното. При добавянето на 5% кисело тесто те почти не се повлияват, при добавяне на 7% или 10% разтегливостта се повишава, а при 15% и 20% повишението на разтегливостта е много рязко.

Голямото количество млечна киселина, образувано при съзряването на закваската, влияе негативно върху структурата на глутена. Това респективно намалява силата на брашното, както и увеличава разтегливостта на тестото.

Включването на 15% или повече кисело тесто при замесването на главното тесто инхибира растежа на бактериалните и плесенни спори и осигурява дълъг срок на годност на печените продукти и въпреки че подкисляването е необходимо за оптималното набухване на хляба, за контрола на ензимните активности, еластичността на средината и дългия срок на съхранение; прекаленото подкисление има неблагоприятен ефект върху някои реологични параметри.

Поради това за оптимални резултати се прилага 15% кисело тесто с разработените най-добри комбинации за получаването на полезен и безопасен хляб, без негативни промени в обема или вкусово-ароматния му профил.

5. Замразено кисело тесто

Стабилизиращи кисели теста със Закваска 2 за ръжен хляб и Закваска 4 за пшеничен хляб се съхраняват при температура -20°C в продължение на 15, 30 и 45 дни, след което те са презамесени по стандартната схема $\frac{1}{4}$ замразено кисело тесто : $\frac{3}{4}$ прясна смес вода и брашно и се презамесват ежедневно при спазване на същата пропорция. Установено е, че киселите теста, съхранявани при -20°C , се възстановяват успешно и могат да се прилагат за производство на ръжен (кисело тесто със Закваска 2) и пшеничен (кисело тесто със Закваска 4) хляб.

С възстановените след 45-дневно съхранение при -20°C киселите теста е изпечен хляб с различен процент кисело тесто – 10%, 15% и 20%. Проследява се появата на

бактериална развала при съхранение на хлябовете при 37°C и стайна температура, както и на плесенна развала при паралелно съхранение на изпечените варианти при температура 30°C и стайна температура. Потвърдено е, че оптималната концентрация на включване на кисело тесто със закваска 2 за ръжен хляб и закваска 4 за пшеничен хляб за предотвратяване на бактериална и плесенна развала, без негативно повлияване на обема и вкусово-ароматния профил на получения хляб, е 10 - 15% за предотвратяване на бактериална развала и 15 – 20% за предотвратяване на плесенна развала.

6. Лиофилно кисело тесто

Осъществена е имобилизация и лиофилизация на закваска 2 и закваска 4 в присъствие на високоестерифициран ябълков пектин и натриев алгинат и получените лиофилни препарати се съхраняват на стайна температура (20°C - 22°C), като са проследени преживяемостта на клетките на лактобацилите и пропионовокиселите бактерии в продължение на 12 месеца.

Проведените по стандартните методи изследвания върху микробиологичните показатели на лиофилизираните препарати доказват отсъствие на осемененост с патогенна микрофлора.

Самата технология на сублимационно сушене не допуска развитие на патогенна микрофлора. Колкото по-голяма е степента на дехидратация, каквато е при новите биопродукти, толкова по-малка е преживяемостта на патогенната микрофлора. От друга страна, приложените условия на съхранение на изследваните лиофилизирани проби стайна температура и относителна влажност до 35% са благоприятни за продължителното им съхранение, при което запазват висока концентрация на жизнеспособни клетки.

В процеса на съхранение в продължение на 12 месеца при стайна температура при двете закваски (Закваска 2 и Закваска 4) съдържанието на жизнеспособни клетки е от порядъка на 10^{12} CFU/g.

Отсъствието на патогенни микроорганизми и ниското остатъчно влагосъдържание на новите лиофилизирани биопродукти са фактори за продължителната им съхраняемост - през наблюдавания 12-месечен период не се наблюдават нежелани промени в качествените им показатели и настъпват несъществени изменения в преживяемостта на полезната микрофлора.

След 8 месеца на съхранение на лиофилизираните закваски при стайна температура те са рехидратирани и апробирани в производствената лаборатория.

И двете закваски се възстановяват напълно при приготвяне на кисело тесто и презамесването му в производствената лаборатория. Понастоящем двете закваски продължават да се презамесват ежедневно в производствената лаборатория.

С кисели теста с лиофилизираните комбинации е изпечен хляб с различен процент кисело тесто - 10%, 15% или 20%. Изпечените хлябове се съхраняват при стайна температура и при 37°C в продължение на 96 часа за определяне на бактериална развала и при стайна температура и при 30°C в продължение на 120 часа за определяне на плесенна развала.

Отново се потвърди, че оптималната концентрация на включване на кисело тесто с ръжена закваска (закваска 2) и кисело тесто с пшенична закваска (закваска 4) за предотвратяване на бактериална и плесенна развала, без негативно повлияване на обема и вкусово-ароматния профил на получения хляб, е 10 - 15% за предотвратяване на бактериална развала и 15 – 20% за предотвратяване на плесенна развала, като добавянето на 20% кисело тесто води до свиване на обема на хляба, поради което тази висока концентрация на влагане на киселото тесто при изпичането на хляб е нежелателна.

7. ЛБ-подкислители

Закваска 2 (за ръжен хляб) и закваска 4 (за пшеничен хляб) са избрани и заложили при производството на ЛБ-подкислители (ЛБ-подкислител за ръжен хляб и ЛБ-подкислител за пшеничен хляб) по нова биотехнологична схема, включваща няколко етапа:

1. набогатяване със следните стъпки: лабораторна закваска - малък инокулатор - инокулатор - първи ферментатор - втори ферментатор;
2. дълбочинно култивиране в тестообразна среда в контейнер - развитие на културата в анаеробна среда, повърхностно, върху влажни трохи;
3. формоване на трохите под форма на фузилии;
4. сушене при температурата на околната среда;
5. раздробяване на фузилиите на дребни гранулки;
6. разфасоване и съхранение в натронови торби;

7. експедиция;
8. приложение.

Получените два подкислителя - за пшеничен и за ръжен хляб – са с висока киселинност и без наличие на странична микрофлора. Подкислителите носят значимо количество полезна микрофлора – лактобацили и пропионовокисели бактерии (над 10^7 CFU/g), обезпечаваща правилен ход на ферментационния процес и предпазване на хляба и хлебните изделия от „картофена болест” и плесенясване.

Съвместно с фирма „Благополучие”, гр. Павликени с ръководител инж. Янко Янев са получени изсушени подкислители (ЛБ-подкислител за ръжен хляб, съдържащ закваска 2, и ЛБ-подкислител за пшеничен хляб, съдържащ закваска 4) и са приготвени брашнени смеси за получаване на хляб и хлебни изделия при домашни условия без употребата на консерванти.

Чрез използването на кисело тесто или подкислители се увеличава значително времето на запазване на хляб при съхранение, хранителна стойност и се постигат по-добрите органолептични характеристики на хляба, като това става без прилагането на консервиращи агенти. Увеличаването на времето на запазване се дължи на по-високи стойности на киселинностите и по-високата достигната концентрация на органични киселини в сравнение с търговския хляб, произведен с хлебна мая, докато подобряването на органолептичните характеристики се дължи на присъствието на значителни летливи и нелетливи съединения, които подобряват вкуса на хляба.

Достъпността на тези закваски и осведомеността на консуматорите ще позволи обогатяването на трапезата на Българина с вкусен, полезен, безопасен и с повишена трайност хляб, без консерванти.

8. Литература

- [1] Plessas S., Alexopoulos A., Bekatorou A., Mantzourani I., Koutinas A. A., Bezirtzoglou E. (2011b). Examination of freshness degradation of sourdough bread made with kefir through monitoring the aroma volatile composition during storage. *Food Chemistry* 124, 627–633.
- [2] Cauvain S. (2003). Bread making: an overview. In bread making improving quality. Woodhead Publication Ltd. p 14.
- [3] Chavan R. S., Jana A. (2008). Frozen dough for bread making – a review. *Intern J Food Sci, Technol Nut* 2, 9–27.

- [4] Gerez C. L., Torino M. I., Rollan G., de Valdez G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20, 144–148.
- [5] Nielsen P. V. (2003). Packaging, quality control, and sanitation of bakery products. In Y. H. Hui, T. Toldra, and W. K. Nip (Eds.), *Handbook of fermented food and beverage* (pp. 783 - 797). New York: Marcel Dekker Inc.
- [6] Corsetti A., Settanni L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International* 40, 539–558.
- [7] Menten O., Ercan R., Akcelik M. (2007). Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming Bacillus strains. *Food Control* 18, 359–363.
- [8] Arendt E. K., Ryan L. A. M., Dal Bello F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24, 165–174.
- [9] Farkas J. (2001). Physical methods for food preservation. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Mntville (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (pp. 67–592). Washington: ASM Press.
- [10] Zhang C., Brandt M. J., Schwab C., Gänzle M. G. (2010). Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology* 27, 390-395.
- [11] European Union (1995). European Parliament and Council Directive No. 95/2/EC of 20February 1995 on food additives other than colours and sweeteners, p. 53. http://europa.eu.int/eur-lex/en/consleg/pdf/1995/en_1995L0002_do_001.pdf.
- [12] Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4084–4090.
- [13] De Vuyst L., Ganzle M.G. (2005). Trends in Food Science & Technology Special Issue—Second International Symposium on Sourdough: from Fundamentals to Applications, vol. 16. Elsevier, Amsterdam.
- [14] De Vuyst L., Vancanneyt M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 120–127.
- [15] Katina K., Heinio R.-L., Autio K., Poutanen K. (2006). Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT* 39, 1189–1202.
- [16] Plessas S., Fisher A., Koureta K., Psarianos C., Nigam P., Koutinas A. (2008). Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chemistry* 106, 985–990.
- [17] Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 57–69.
- [18] De Vuyst L., Neysen P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 43–56.
- [19] Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95–104.

- [20] Katina K., Poutanen K., Autio K. (2004). Influence and interactions of processing conditions and starter culture on formation of acids, volatile compounds and amino acids in wheat sourdoughs. *Cereal Chemistry*, 81(5), 598–610.
- [21] Vernocchi P., Valmorri S., Gatto V., Torriani S., Gianotti A., Suzzi G. (2004b). A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Research International*, 37, 469–476.
- [22] Succi M., Reale A., Andrighetto C., Lombardi A., Sorrentino E., Coppola R. (2003). Presence of yeasts in Southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 143–148.
- [23] Pepe O., Blaiotta G., Anastasio M., Moschetti G., Ercolini D., Villani F. (2004). Technological and Molecular Diversity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Naturally Fermented Sourdoughs. *System. Appl. Microbiol.* 27, 443–453.
- [24] Paramithiotis S., Gioulatos S., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry* 41, 2429–2433.
- [25] Poutanen K., Flander L., Katina K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology* 26, 693–699.
- [26] Holzapfel W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for smallscale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197–212.
- [27] Ryan L.A.M., Dal Bello F., Arendt E.K. (2008). The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *International Journal of Food Microbiology* 125, 274–278.
- [28] Moroni A. V., Dal Bello F., Arendt E. K. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology* 26, 676–684.
- [29] Rosenquist H., Hansen A. (1998). The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 621–631.
- [30] Schnurer J., Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 70–78.
- [31] Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 634–640.
- [32] Chavan R. S., Chavan S. R. (2011). Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10.
- [33] De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26, 666–675.
- [34] Plessas S., Alexopoulos A., Mantzourani I., Koutinas A., Voidarou C., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. (2011a). Application of novel starter cultures for sourdough bread production. *Anaerobe* 17, 486–489.