



Становище

относно технологичните свойства на стартерна пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“ за производство на сурово-сушени трайни колбаси тип „луканка“ без нитрити и нитрати и за безопасността на готовия продукт

РЕЗЮМЕ

Настоящото становище на Центъра за оценка на риска по хранителната верига (ЦОРХВ) е изготвено по искане на група производители, представлявани от правна кантора „Schoenherr“, за изготвяне на оценка относно технологичните свойства на стартерна пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“, съдържаща щам *Lactobacillus plantarum* GPL3, предназначена за употреба при производството на сурово-сушени трайни колбаси тип „луканка“ без използване на нитрити и нитрати и на нейния ефект върху микробиологичните и органолептичните свойства на готовия продукт.

Стартерната пробиотична култура представлява смес от щам *Lactobacillus plantarum* GPL3, дрожди *Debaromyces hansenii* и хранителна среда (от растителен произход и декстроза). Съгласно предоставената от заявителя документация, стартерната култура е способна да осъществи ферментация при производство на сурово-сушени месни продукти тип „луканка“ без употреба на нитрити/нитрати, при което се потискат нежеланите патогенни микроорганизми, което обезпечава безопасността на продуктите и запазване на тяхното качество. Заедно с това, след приключване на процеса на зреене в месните продукти се установява висока концентрация на жизнеспособни клетки на пробиотичния щам *L. plantarum* GPL3 от 7.1×10^7 до 1.4×10^7 cfu/g, като на 112-тия ден от датата на производство те са 1.3×10^8 cfu/g и на 133-тия ден са 5.7×10^7 cfu/g. Направените изследвания показват, че произведените сурово-сушени трайни колбаси тип „луканка“ е със запазени органолептични свойства, характерни за този вид продукти.

Въз основа на анализа на достъпната научна литература, на предоставените от заявителя данни и информация за стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ и извършените лабораторни изпитвания на произведени с нея месни продукти, ЦОРХВ заключава, че сурово-сушени колбаси тип „луканка“ могат да се ферментират със стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“. Тя притежава висока антимикробна активност спрямо патогенни микроорганизми, предизвикващи хранителни заболявания и показва добри технологични свойства, които допринасят за запазване на органолептичните качества на продукта. Използването на стартера „ПроВиотик“ в комбинация с ферментация при ниска температура прави възможно производството на сурово-сушени колбаси тип „луканка“ без употреба на нитрати/нитрити.

Заявител: правна кантора "Schoenherr"

Входящ номер: Ц-1182/16.08.2019 г.

Кореспонденция: corhv@mzh.government.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

Резюме	1
Съдържание	2
Използвана терминология	2
1. Общи положения в контекста на заявлението	3
1.1. Регулаторна рамка	3
1.2. Млечнокисели бактерии	4
1.3. Пробиотици	5
1.4. Нитрати и нитрити, като добавка в храни	7
1.5. Критерии за подбор и оценка за безопасността на стартерни пробиотични култури	7
1.6. Функционални аспекти на стартерните пробиотични култури	9
1.7. Ролята на стартерните култури за безопасността на ферментиралите месни продукти	10
1.8. Научни разработки, свързани с ефекта на нови стартерни култури и специфични условия на зреене върху микробиологичните характеристики на сурово-сушени месни продукти без употреба на нитрати	11
2. Оценка	11
2.1. Цел на оценката	11
2.2. Методология и данни	12
2.3. Описание на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“	12
2.4. Безопасност на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“	13
2.5. Антимикробна активност на стартерна пробиотична култура „ПроВиотик“	13
2.6. Влияние на стартера „ПроВиотик“ върху органолептиката на сурово-сушени колбаси тип „луканка“	15
Заключения и препоръки	16
Данни, предоставени на ЦОРХВ от заявителя	17
Литературни източници	19

ИЗПОЛЗВАНА ТЕРМИНОЛОГИЯ

Стартерни култури са микробни култури, използвани за стимулиране и провеждане на ферментацията при месните продукти.

Пробиотици са живи микроорганизми, които, когато се прилагат (приемат) в достатъчни количества, предоставят полза за здравето на гостоприемника (FAO, 2001).

Ферментирали храни са храни, при които с влагане на стартерна микробиологична култура се променят съставът, качествата и микробиологичната им обсемененост, което спомага за постигане на възприемчиви вкусови качества и удължен срок на годност.

1. ОБЩИ ПОЛОЖЕНИЯ В КОНТЕКСТА НА ЗАЯВЛЕНИЕТО

1.1. Регулаторна рамка

На ниво Европейски съюз

Употребата на микроорганизми е една от най-старите технологии за обработка на храни, която води до трансформация и консервиране на продуктите, с което се удължава тяхната трайност. Това е причината категорията на стартерните култури да се разглежда като характерна съставка на храните, формираща част от ферментиралите млечни, месни и зеленчукови продукти, хляб, вино и др.

Стартерните култури (микроорганизми), използвани директно в производството на храни, се считат за хранителни съставки в Европейския съюз (ЕС). Това е категория хранителни съставки с много дълга история на употреба в голямо разнообразие от хранителни продукти. Стартерните култури, подобно на другите хранителни съставки, трябва да отговарят на разпоредбата на член 14, параграф 1 от **Регламент (ЕО) № 178/2002**¹, която гласи: „*На пазара не се пускат храни, които не са безопасни.*“ Също така, съгласно член 17, параграф 1 от Регламента, цялата отговорност за осигуряване на безопасността на храните е на стопанските субекти в хранителната промишленост.

Регламент (ЕО) № 2073/2005² предвижда микробиологичните критерии за някои микроорганизми и правилата за прилагане, които трябва да се спазват от производителите и търговците на храни, когато осъществяват общите и специфични хигиенни мерки, посочени в член 4 от **Регламент (ЕО) № 852/2004**³.

Друг документ, който се използва по отношение на безопасността на стартерните култури, е списъкът на микроорганизмите със статут на квалифицирана презумпция за безопасност (Qualified Presumption of Safety) (QPS статут), изготвен и поддържан от Европейският орган по безопасност на храните (ЕОБХ). Понятието за квалифицирана презумпция за безопасност е въведено през 2007 г. от ЕОБХ като инструмент за оценка на безопасността на микроорганизмите, използвани в храни и фуражи.

В законодателството на ЕС няма определена дефиниция за стартерна култура. Поради това, Европейската асоциация за стартерни култури за храни и фуражи предлага следното определение: „*безопасни живи бактерии, дрожди или плесени, използвани при производството на храни, които сами по себе си представляват характерна хранителна съставка. Те са формулации, състоящи се от концентрации (> 10⁸ colony forming units/g (cfu/g)⁴) от един или повече живи и активни микробни видове и/или щамове, включително неизбежни съставки на хранителната среда, пренесени от ферментацията, които са необходими за тяхното оцеляване и съхраняване, както и за улесняване на приложението им в производствения процес на храните*“.

¹ Регламент (ЕО) № 178/2002 на Европейския парламент и на Съвета от 28 януари 2002 година за установяване на общите принципи и изисквания на законодателството в областта на храните, за създаване на Европейски орган за безопасност на храните и за определяне на процедури относно безопасността на храните, OJ L 31, 1.2.2002, р. 1–24.

² Регламент (ЕО) № 2073/2005 на Комисията от 15 ноември 2005 година относно микробиологични критерии за храните, OJ L 338, 22.12.2005, р. 1–26.

³ Регламент (ЕО) № 852/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 година относно хигиената на храните, OJ L 139, 30.4.2004, р.1

⁴ колония образувачи единици (КОЕ/грам)

Натриевите и калиевите соли на нитритите и нитратите са разрешени (E249 - E252) за консервиране на месни продукти, сирене и определени рибни продукти с **Регламент (ЕО) №1333 /2008⁵**.

Регламент (ЕС) №1169/2011⁶ установява общите принципи, изисквания и отговорности, уреждащи информацията за храните, и по-специално етикетирането на храните. Също така определя средствата за гарантиране на правото на потребителите на информация и процедурите за предоставяне на информация за храните.

На национално ниво

Закон за храните⁷ има за цел да гарантира спазването на нормативните изисквания за производство и търговия с храни, с оглед защита на здравето и интересите на потребителите, както и да осигури прилагането на законодателството на Европейския съюз в областта на храните и тяхната безопасност на национално ниво.

1.2. Млечнокисели бактерии

Млечнокиселите бактерии (МКБ) са хетерогенна група микроорганизми, включваща род *Lactobacillus*, чиито видове са признати за пробиотици. Същевременно много от тях играят ролята на стартерна микрофлора във ферментираните храни и са в основата на специфичните им органолептични качества. Това доказва дългата им история на безопасна употреба и тяхната класификация като GRAS (generally recognized as safe – (общо)признати за безопасни) от Американската агенция по храните и лекарствата (Food and Drug Administration - FDA) на САЩ [23] и принадлежността им към видове, които се считат за безопасни, съгласно приложената от ЕОБХ концепция за QPS за оценка на безопасността на микроорганизмите. Млечнокиселите бактерии могат да подобрят вкуса, аромата и консистенцията и играят ролята на биоконсерванти, увеличавайки по естествен начин срока на годност на храните.

Според Организацията по прехрана и земеделие (ФАО) и Световната здравна организация (СЗО) [22] функционалните характеристики, определящи пробиотичния потенциал и приложимост на МКБ, обикновено са щамово-специфични, което налага по-пълното изучаване и охарактеризиране на новите щамове с цел биотехнологичното им внедряване.

Род *Lactobacillus*

Микроорганизмите от род *Lactobacillus* са грам-положителни, пръчковидни и неспорообразуващи бактерии, факултативни анаероби. Те са основна част от групата на

⁵ Регламент (ЕО) № 1333/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно добавките в храните, OJ L 354, 31.12.2008, р. 16–33

⁶ Регламент (ЕС) № 1169/2011 на Европейския парламент и на Съвета от 25 октомври 2011 година за предоставянето на информация за храните на потребителите, за изменение на регламенти (ЕО) № 1924/2006 и (ЕО) № 1925/2006 на Европейския парламент и на Съвета и за отмяна на Директива 87/250/ЕИО на Комисията, Директива 90/496/ЕИО на Съвета, Директива 1999/10/ЕО на Комисията, Директива 2000/13/ЕО на Европейския парламент и на Съвета, директиви 2002/67/ЕО и 2008/5/ЕО на Комисията и на Регламент (ЕО) № 608/2004 на Комисията, OJ L 304, 22.11.2011, р. 18–63

⁷ Закон за храните, Обн. ДВ. бр.90 от 15 Октомври 1999г., изм. ДВ. бр.102 от 21 Ноември 2003г., изм. ДВ. посл. изм. и доп. ДВ. бр.77 от 18 Септември 2018г., доп. ДВ. бр.106 от 21 Декември 2018г.

млечнокиселите бактерии (превръщат захарите в млечна киселина). При хората те съставляват важен компонент от микрофлората в организма.

Lactobacillus plantarum е вид пробиотични бактерии, които обикновено се намират в стомашно-чревния тракт на човека, слюнката и някои храни. Името „*plantarum*“ се отнася до това, че е „вид от растенията“. Тези бактерии присъстват в храни като хляб (с мая), кисело зеле и саламура за маслини.

Lactobacillus plantarum действа чрез ферментирание на захари и образуване на млечна киселина, етанол или оцетна киселина и въглероден диоксид. Освен това, той е способен да устои на жлъчните киселини и соли, което му дава възможност да преживява в стомашно-чревния тракт.

Резултатите на българско изследване от 2014 г. [3] на четири щама *L. plantarum* показват, че същите проявяват висока антимикробна активност спрямо патогенни микроорганизми, причинители на хранителни токсикоинфекции и интоксикации.

1.3. Пробиотици⁸

Етимологично, терминът е съставен от латинския предлог pro („за“) и гръцкото прилагателно βιωτικός („биотични“), като последното произлиза от съществителното βίος, (bios, „живот“).

Най-известното определение, давано за пробиотиците, принадлежи на Fuller R., (1989): „Живи организми, които, добавени с храната, оказват положителен ефект върху организма-гостоприемник чрез подобряване на баланса на неговата интестинална микрофлора“.

Голяма част от пробиотичните храни са с древна история и от много векове са традиционни в храненето на много народи. Примерите са много: българското кисело мляко, известно в света като „йогурт“, кефирът, ацидофилните млека, много видове сирена – чедар, гауда, саламурени, плесенни и др.; квасеното зеле, туршиите от ябълки, домати, краставици, корейското кимчи, зелените маслини, соевото тесто „темпе“, японската соева супа „мисо“, черният шоколад, ферментираният чай „комбуча“, кумисът в Монголия и Казахстан. Във всички тях се съдържат бактерии или микроскопични гъбички с повече или по-малко изразени биологични свойства, близки до пробиотичните [4].

Пробиотичните микроорганизми в храните се развиват в естествената си среда, където клетките им са в активно жизнеспособно състояние. Полезните им свойства се разглеждат като щамово-специфични и резултати получени с един щам не е

⁸ Международната научна асоциация за пробиотици и пребиотици, ISAPP, предложи, когато се комбинира със спецификациите, очертани от Работната група на ФАО/СЗО за оценка на пробиотиците в храните (2002г.), ключовите аспекти на това определение трябва да бъдат по-точни и в допълнение да включват следните аспекти:

- Пробиотикът трябва да е жив, когато се прилага;
- Пробиотикът трябва да е преминал контролирана оценка, за да документира ползите за здравето на целевия приемник;
- Пробиотикът трябва да бъде таксономично дефиниран микроб или комбинация от микроби (род, вид и щам);
- Пробиотикът трябва да е безопасен за предназначението му.

задължително да са характерни за други щамове, дори и близкородствени и изолирани от същата екологична ниша [43].

Подборът на пробиотици включва оценка на редица технологични характеристики. Сред тях антимикробната активност е един от основните *in vitro* критерии. Млечните киселини бактерии, в това число и лактобацилите, представляват богат източник на антибактериални субстанции (органични киселини, бактериоцини, водороден пероксид, въглероден диоксид, биосърфактанти), които действат инхибиращо върху растежа на различни патогени. Най-характерен метаболитен продукт е млечната киселина, чието бързо натрупване води до рязко понижаване нивото на рН, а оттам и до потискане на различни патогенни (*Salmonella*, *Listeria*) и токсиногенни бактерии (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*). При хетероферментативните *L. plantarum*, едновременно с млечната киселина се синтезират и равни количества оцетна киселина [43].

Cortez Sawitzki M. и колектив [36] изследват *L. plantarum* щам AJ2, който показва потенциален ефект за намаляване нивата на нитрати/нитрити и за повишаване на интензивността на оцветяването на ферментирани месни продукти. Авторите посочват, че нивата на нитритите намаляват по време на ферментацията на колбасите поради намаляването на рН, което позволява нитритът да се трансформира в азотен оксид, който реагира с миоглобина, при което се образува мононитрозилхемокром, характерния пигмент на сушеното месо. Проучването е съсредоточено върху липидния състав, който е важен качествен параметър на ферментиралите месни продукти. По време на производствения процес, липидите прогресивно се променят, както чрез липолиза, така и от окисляване. Резултати от проучването показват, че *L. plantarum* щам AJ2 не оказва значително влияние върху състава на мастните киселини ($p > 0,05$). Заключение на авторите е, че *L. plantarum* щам AJ2, показва добри технологични свойства като стартерна култура в колбаси, но има необходимост от допълнителни проучвания на тези свойства, главно за отчитане окислителната стабилност на липидите през периода на съхранение на продуктите.

Критериите за подбор и оценка на пробиотиците, влагани в храните у нас, са описани подробно в материал на БАН „Пробиотици за функционални храни и здраве“ [1].

В разработка на български учени [6] на тема „Микроорганизмите в производството на функционални храни, напитки и пробиотици“ е засегната ролята на пробиотичните бактерии при производството и съхранението на функционални храни и напитки. Авторите описват основните изисквания към микроорганизмите, използвани като съставки на пробиотични композиции: (1) да бъдат безвредни (апатогенни) за гостоприемника; (2) да бъдат устойчиви към ниско рН и жлъчни сокове; (3) да се адхезират върху чревната мукоза и да я колонизират; (4) да продуцират органични киселини и бактериоцини; (5) да проявяват антагонизъм към патогенна и токсигенна микрофлора; (6) да бъдат пригодни за клинично и хранително приложение. Технологичните изисквания към стартерните пробиотични култури, в най-общ план, се отнасят до възможностите им да се размножават бързо, да натрупват висок титър активна биомаса, да се развиват както върху животински, така и върху растителни

субстрати, да подлежат на след-ферментационна обработка, като сушене, продължително съхранение и бързо да възстановяват активността си. Пробиотичните щамове самостоятелно и в комбинации проявяват антимикробно действие спрямо ентеропатогени – патогенни щамове на *E. coli*, *St. aureus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori* и други патогенни щамове.

1.4. Нитрати и нитрити, като добавка в храни

Нитритът като добавка в храните се счита за съществена съставка за зреенето [35, 39, 42] и има няколко важни функции в месните продукти: 1) допринася за характерния аромат на сушеното месо; 2) ефективно антимикробно средство, което допринася за микробиологичната безопасност, като инхибира растежа на редица патогенни бактерии, особено на *Clostridium botulinum* и микроорганизми, които предизвикват развала; 3) стабилизира характерния цвят, свързан със сушените меса и 4) допринася за антиоксидантната стабилност на месните продукти (осигурява контрол на окисляването на липидите като забавя развитието на грањясване на мазнините).

Поради сложността на процеса на зреене на месните продукти и реакциите, свързани с него, научните изследвания продължават и днес. По отношение на ферментиралите месни продукти, нитритът се счита за изключително съществена тяхна съставка, защото им придава характерните свойства за сушени месни продукти. Поради това, че нитритът все още не е докрай проучен, се смята, че той трудно би могъл да бъде заменен с друга съставка. Според редица изследователи [8, 40], до момента не е идентифициран единичен заместител на нитрита, който може да възпроизвежда едновременно всички негови функции за стабилизиране на цвета, придаване на аромат, предотвратяване на окисляването на мазнините, променяне на текстурата и да действа толкова ефективно като консервант.

Нитритът се счита за многофункционална добавка в храните при процеса на сушене на месото, но потребителското търсене на месни продукти без нитрити остава голямо. Следователно, предизвикателството пред месната промишленост е да търси ефективни стратегии за намаляване на остатъчния нитрит в сушеното месо и да търси по-добри алтернативи на нитритите.

1.5. Критерии за подбор и оценка за безопасността на стартерните пробиотични култури

Безусловно важно е да бъде доказано, че използваният щам е безвреден и безопасен за човека и не притежава патогенни свойства. Тази безопасност изисква особено внимание и е в обсега на специален надзор от ЕОБХ, който системно наблюдава и ежегодно попълва листата на микроорганизмите с признат QPS статут въз основа на задълбочени анализи на риска [16, 19, 26].

Критериите, според които даден щам се определя като безвреден са: произход, история на употреба, история на непатогенност, липса на синтез на вредни за гостоприемника метаболити, антибиотична резистентност.

Щамовете могат да бъдат признати за безопасни, ако:

- могат да бъдат доказано идентифицирани (доказан произход);

- съществува необходим обем от знания (история на употреба) за безопасност - млечнокиселите бактерии са използвани от човека от хилядолетия за производството на ферментирани храни;
- не са познати патогенни щамове (история на непатогенност) на съответните микроорганизми - някои видове лактобацили са нормални обитатели на стомашно-чревния тракт или са обичайно преминаващи през него и като такива не са заразни или токсични за гостоприемника;
- има данни за антибиотичната устойчивост на лактобацилите с пробиотичен потенциал. Редица автори изказват хипотезата, че нормално срещащите се в организма бактерии, включително и лактобацилите, могат да служат като източник на гени за антибиотична устойчивост, трансферирайки ги към различните патогенни микроорганизми [31]. Затова, едно от условията за подбор на потенциално пробиотични щамове е познаването на тяхната антибиотична чувствителност (устойчивост).

Произход

Млечнокиселите бактерии, които обикновено се използват като стартерни култури във ферментирани месни продукти, са факултативно анаероби и принадлежат главно към родовете *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* и *Enterococcus*.

Лактобацилите, други млечнокисели бактерии и дрожди (главно сред признатите като пробиотици) са повсеместно разпространени, но за пробиотично приложение предпочитани са щамове изолирани от съответния гостоприемник, тъй като след прилагане на препаратите, щамовете попадат в свойствена и благоприятна за тях среда и имат по-големи шансове да се задържат и да окажат положителния си ефект.

История на употреба

Необходимо условие, за да се класифицира един щам като безвреден, в употребяваните пробиотични препарати, е той да има дълга история на присъствие. ЕОБХ отбелязва, че тези микроорганизми, не са обект на регламент на Общността, а по-скоро се предполага да бъдат безопасни, въз основа на тяхната дълга история на употреба, без очевидна вреда. За оценка на пробиотиците по този показател на практика се използва подхода QPS на ЕОБХ [17].

Всеки микроорганизъм, който притежава QPS статут е освободен от необходимостта да бъде подлаган на допълнителни тестове за безвредност. Така презумпцията за безопасност QPS е освободила много, но не всички, пробиотични щамове от необходимостта да представят токсикологични данни.

История на непатогенност

Задължително е да се установи непатогенността на всички използвани пробиотични щамове, т.е. пробиотиците се оценяват за патогенност, инфекциозност, токсичност, както и наличие на вирулентни фактори. Липсата на патогенност и инфекциозност е задължително условие за пробиотична безопасност. Международно приет е GRAS-статут за млечнокиселите бактерии, особено за тези, които се използват като пробиотици.

Антибиотична резистентност

Изключително важен въпрос по отношение на безопасността на пробиотичните щамове е широко разпространената антибиотична резистентност в микроорганизмовия свят. Появата и разпространението на устойчивост към антимикуробни средства при бактериите представляват заплаха за здравето на хората и животните.

Профилите на антибиотична чувствителност на род *Lactobacillus* варират между отделните видове. При проучване на учени от Шуменския университет „Епископ Константин Преславски” [5] е тествана антибиотичната чувствителност на два щам *L.plantarum*, като за целта са подбрани седем антибиотика с различен механизъм на действие от основните групи, използвани в медицинската практика. Резултатите показват, че изследваните лактобацили в различна степен се повлияват от различните групи антибиотици.

1.6. Функционални аспекти

Жизнеспособност

Стартерните пробиотични култури проявяват своята основна активност в месните продукти. Техните метаболитни функции и взаимодействия с гостоприемника повлияват процеса на зреене и съхранение на ферментираните храни. От особена важност са метаболитната активност и свойства на доминиращи полезни бактерии.

Антимикуробна активност

Някои метаболитни компоненти като органични киселини, мастни киселини, водороден пероксид, продуцирани от млечнокисели бактерии показват антимикуробни ефекти. Бактериоцините със специфича инхибираща активност срещу близкородствени видове са най-интензивно изучавани. В последните години са събрани много данни за продукцията на антагонистични вещества и срещу редица хранително асоциирани патогени и развалящи продуктите микроорганизми.

Много важна е антимикуробната активност на стартерните пробиотични култури в аспект безопасност на храните. Те са основни агенти на биоконтрола на хранителните продукти, изразяващ се в използването им като живи микробни клетки или на техните метаболити, за потискане на растежа на други бактерии, имащи същото местообитание, но оказващи вреден за здравето ефект. Жизнеспособните лактобацилни клетки в хранителните продукти ограничават по естествен начин развитието на развалящи или патогенни микроорганизми, посредством синтез на биологично активни метаболити и промени в общата среда на местообитание.

Препоръки относно обозначаването на пробиотичните продукти

Необходимо е да бъде точно идентифициран всеки пробиотичен щам или микроорганизъм, включен в хранителния продукт и се препоръчва да бъдат ясно отбелязани върху етикета съответните микробни видове.

От съществено значение е да бъде извършен точен количествен анализ - като брой живи клетки (cfu/ml или cfu/g продукт) от конкретния пробиотичен щам, включен в стартерната култура. По дефиниция ефектът ѝ е в зависимост от броя живи клетки, които съдържа. Следователно, тази информация задължително трябва да се отбелязва на

етикета. Това означава, че производителят гарантира наличието им и следователно и съответния положителен ефект.

Производство и производствени процедури

За да се гарантира, че дадена стартерна пробиотична култура запазва и поддържа полезните си свойства, е необходимо да се съхранява изходния щам при подходящи условия и да се проверява периодично за идентичност на щама. Освен това, е нужно да се следи дали се запазват жизнеспособността и пробиотичната активност за целия период на производство и съхранение на ферментиралите месни продукти, в които са вложени пробиотичните култури. Не на последно място са и тестовете за проверка на параметрите (жизненост/активност) в края на срока на годност на стартерната култура.

1.7. Ролята на стартерните култури за безопасността на ферментиралите месни продукти

Известно е, че стартерните култури са микробни култури, използвани за стимулиране и провеждане на ферментацията при месните продукти. Като стартери се използват млечнокисели бактерии и коагулазо-отрицателни стафилококи, както и дрожди и плесени. Щамове на *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces taramus*, *Hurhopichia burtonii*, *Penicillium chrysogenum* и *Penicillium sp.* се използват като стартери при производството на сурово-сушени месни продукти.

Микробиологични опасности в месни продукти

Основните микробиологични опасности във ферментиралите месни продукти са патогените предавани с храните, например: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*, също така токсините на *Staphylococcus aureus*, *Cl.perfringens* и *Cl. botulinum*.

Стартерните култури могат да подобрят безопасността на ферментиралите месни продукти чрез бързо повишаване на киселинността или поради производството на антимикробни вещества, като бактериоцини. Освен това, стартерите могат да помогнат за запазване качествата на продукта и да съкратят времето на зреене [30].

Бактериоцините са група пептиди с бактерицидна или бактериостатична активност срещу бактерии, причиняващи развала на храните и хранителни заболявания - грам-положителни бактерии като *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. и *Listeria* spp. [29].

Пряката конкуренция между стартерните култури и потенциалните патогени, предавани с храните, чрез конкурентно изключване може да бъде важен механизъм за ограничаване на растежа на нежелани микроорганизми.

Няколко българска научни разработки, свързани с проучване на свойствата на пробиотични щамове на *L. plantarum* [2, 7, 33], демонстрират тяхната устойчивост при неблагоприятни условия, както и способността им да инхибират растежа на патогенни микроорганизми като *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* G, *Salmonella* spp., *Salmonella abony* NTCC 6017, *Staphylococcus aureus* ATCC 25093, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Listeria monocytogenes* при температура на сушене 15-18°C на месните продукти. Щамовете на *L. plantarum* образуват висок титър

на живи клетки при самостоятелно и съвместно култивиране с патогенни и токсигенни бактерии.

Химични опасности в месни продукти

Към химичните опасности, които имат значение за безопасността на месните продукти се отнасят биогенните амини, нитрозамини, полициклични ароматни въглеводороди и микотоксини.

Доказано е, че някои млечнокисели бактерии съдържат нитрит редуктаза, която при анаеробни условия намалява нитрита, използван като консервант в месните продукти, което предполага, че тези бактерии допринасят за намаляването на нитритите в храните [45]. Това е важен факт за безопасността на храните, като се вземат предвид препоръките на ЕОБХ [32] за намаляване използването на нитрати и нитрити при консервиране на храните.

Стартерите могат да предизвикат бързо понижаване на рН, като инхибират развитието на микроорганизмите, декарбоксилиращи аминокиселините и по този начин предотвратяват натрупването на биогенни амини във ферментирани месни продукти. Освен това, стартерните култури могат да се конкурират с автохтонните, нестартерни микроорганизми по време на зреене и съхранение на продуктите, като по този начин намаляват производството на биогенни амини.

1.8. Научни разработки, свързани с ефектите на нови стартерни култури и специфични условия на зреене върху микробиологичните характеристики на сурово-сушени месни продукти без употреба на нитрати

Няколко екипа от италиански учени [10, 12, 14] изследват ефекта на подбрани щамове стартерни култури от млечнокисели бактерии и специфични условия на зреене върху микробиологичните характеристики и органолептични качества на сурово-сушени колбаси с ниска киселинност от свинско и еленско месо, произведени без нитрати. Заключениета са, че приложените комбинации от два възпрепятстващи фактора (стартерна култура и ниска температура на зреене) представляват допълнително средство за недопускане растежа и развитието на потенциално патогенни бактерии, както и спомагат за запазване на органолептичните качества на ферментиралите месни продукти с ниска киселинност и без добавка на нитрати и нитрити.

2. ОЦЕНКА

2.1. Цел на оценката

Целта е да се направи оценка на технологичните свойства на стартерна пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“, съдържаща щам *Lactobacillus plantarum* GPL3, предназначена за употреба при производството на сурово-сушени трайни колбаси тип „дуканка“ без добавка на нитрити/нитрати и на нейния ефект върху микробиологичните и органолептичните свойства на готовия продукт.

2.2 Методология и данни

Методология

Използвани са метод на събиране, обработка, анализ и обобщаване на публикувана научна информация относно употребата на пробиотични стартерни култури за производство на сурово-сушени месни продукти със и без влагане на нитрати, както и на документацията, представена от заявителя.

Прегледани са голям брой, както български литературни източници, отнасящи се до българския опит в производството на пробиотични хранителни продукти, така и европейски и световни източници, като литературният обзор обхваща темата за използването и ефекта на стартерни пробиотични култури при производството на сурово-сушени месни продукти със и без добавка на нитрити/нитрати и тяхното влияние върху микробиологичните и органолептичните свойства на продуктите.

Данни

Настоящата оценка на ЦОРХВ се базира на данни, предоставени от заявителя относно изпитвания на стартерна пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“ и на сурово-сушени трайни колбаси „Маджаров“, тип „луканка“, произведени със стартера „ПроВиотик“ без добавка на нитрити и нитрати. Данните включват: технологична документация за производството на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ и на сурово-сушени трайни колбаси „Маджаров“ тип „луканка“ със стартера „ПроВиотик“, сертификати за качество и протоколи от лабораторни изпитвания на стартерната култура и на произведените с нея месни продукти, както и данни от достъпната научна литература по въпроса.

2.3. Описание на стартерната пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“

Стартерната пробиотична култура за месни продукти „ПроВиотик“ (търговско наименование ProViotic Meat Starter Culture) представлява смес от бактериален щам *L. plantarum* GLP3, дрожди *Debaromyces hansenii* и хранителна среда (от растителен произход и декстроза) и е предназначена за влагане при производство на сурово-сушени месни продукти.

Процесите на изолиране и начално охарактеризиране на щама показват всички типични признаци за представители на млечнокиселите бактерии - Грам-положителни, пръчковидни бактерии, каталаза-отрицателни, неподвижни и неспорообразуващи. На база на способностите на щама да асимилира различни въглеродни източници, установени с помощта на API LAB 50 CHL мини кит и API LAB 5.0 специализиран софтуер, изолатът е квалифициран като *L. plantarum*, с 99% вероятност. С помощта на 16S рНК секвенционен анализ на лактобацилния изолат GLP3 е установена принадлежността на щама към вида *Lactobacillus plantarum*. Резултатът след провеждане на BLAST анализ с наличните секвенции в геномната банка на National Center for Biotechnology Information (NCBI) показва 100% припокриване на секвенцията на анализирания GLP3 с наличните секвенции (Query cover) и 100% доказана идентичност на резултата (Identity).

Щамът е изолиран от природен източник и не е генно модифициран.

Съгласно предоставените данни от заявителя *L. plantarum* GLP 3 притежава следните култивационни особености:

- оптимална температура на развитие - 37⁰С (мезофилна област);
- изисквания към кислород - факултативен анаероб;
- тип метаболизъм - хетероферментативен;
- време за протичане на ферментационния процес - 24 часа;
- хранителна среда - изцяло базирана на комбинация от биорастителни компоненти (морков, грах и домати), не съдържа ГМО и алергени.

Стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ се предлага като лиофилизиран продукт, който съдържа живи бактерии и дрожди с общ брой от 1x10⁸ на доза необходима да ферментира 1 kg месна маса.

2.4. Безопасност на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“

Липсата на патогенност и инфекциозност е задължително условие за пробиотичната безопасност.

От големия род *Lactobacillus*, *L. plantarum* е най-универсалният вид с полезни свойства и обикновено се намира в множество ферментирани храни. Нещо повече, *L. plantarum* е широко използван в процеса на ферментация в хранителната индустрия и при преработката на сурови храни. Той е „(общо)признат като безопасен“ (GRAS)⁹. *Lactobacillus plantarum* и дрождите *Debaromyces hansenii* имат признат QPS статут [20].

Друга много важна характеристика за пробиотиците е отсъствието на така наречените вирулентни фактори. Проведените изследвания за вирулентни фактори не откриват такива при нито един вид от род *Lactobacillus*.

Използването на стартерни пробиотични бактерии е полезна стратегия за получаване на продукти с по-дълъг срок на годност, както и с по-безопасни свойства поради способността им да забавят или предотвратяват растежа на нежеланите и болестотворни бактерии, попадащи в храната.

2.5. Антимикробна активност на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“

Щамовете на *L. plantarum* са основни компоненти в различни ферментационни процеси, при което продуцираните от тях органични киселини, водороден пероксид (H₂O₂), диацетил и други антимикробни вещества, повишават безопасността и качеството на ферментиралите храни. Млечната киселина е основната органична киселина, произведена от щамовете на *L. plantarum*. Други произведени органични киселини са оцетна, пропионова, мравчена и янтарна киселини. Механизмът на действие на органичните киселини е намаляването на рН в околната среда, което предизвиква инхибиране на много микроорганизми, както и на токсигенни гъбички.

С цел изследване на антимикробната активност на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ са извършени следните лабораторни изпитвания:

⁹<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>

а) в Център за приложни изследвания и иновации към Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ е тестван сурово-сушен месен продукт „Луканка Панагюрска“, произведен със стартера „ПроВиотик“, съдържащ *L. plantarum* щам GPL3. Една проба от продукта е заразена с тест патогенна бактерия *E. coli* ATCC 25922, а друга - с лабораторен щам *Salmonella* spp. И двете проби са заразени с патогенни култури в експоненциална фаза на развитие и са с краен бактериален титър от 10^5 cfu/g в готовия месен продукт.

В заключението от изпитването се посочва, че получените резултати за антимикробна активност на пробиотичната стартерна култура, при *in situ* експеримент в реален готов продукт „Луканка Панагюрска“, демонстрират 100% антимикробна активност на щама *L. plantarum* GPL3, спрямо тест микроорганизмите *E. coli* ATCC 25922 и *Salmonella* spp. и че стартерът „ПроВиотик“ има потенциала за правилното протичане на процеса на ферментация при производство на сурово-сушения траен месен продукт.

б) в Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт (НДНИВМИ) към Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) са извършени лабораторни изпитвания на проби сурово-сушени колбаси „Луканка Панагюрска“, произведени по традиционна рецепта с влагане на натриев нитрат и такива без натриев нитрат, произведени със стартера „ПроВиотик“. Оформени са четири групи проби, като пълнежната маса на луканката е заразена в лабораторията с *E. Coli*, *L. monocytogenes*, *Cl. perfringens* (същия род бактерия като *Cl. botulinum*) и *S. typhimurium*.

Броят на млечнокиселите бактерии *L. plantarum* GPL3 в момента на приготвяне на пълнежната маса по рецепта, предложена от заявителя, е бил 1.2×10^6 cfu/g в едната проба и 1.5×10^6 cfu/g във втората. В контролната проба (тази, приготвена с влагане на натриев нитрат) не се откриват млечнокисели микроорганизми. Нивата на жизнеспособните млечнокисели микроорганизми се запазват на 10-тия, 20-тия и 30-тия ден от сушенето.

Изследването показва, че пробите, съдържащи *L. plantarum* GPL3, имат по-добра антимикробна активност срещу *E. Coli*, *S. typhimurium* и *L. monocytogenes*, в сравнение с тези произведени по традиционния метод с влагане на натриев нитрат по рецепта за сурово-сушени колбаси тип „Луканка Панагюрска“.

Изследването демонстрира и че пробите, съдържащи *L. plantarum* GPL3, имат равностепенна антимикробна активност срещу *Cl. perfringens*, както тези, произведени по традиционния метод с използване на натриев нитрат.

в) във френски институт за месото ADIV (Association pour le Développement de l'Institut de la Viande) са извършени лабораторни изпитвания на проба френски луканков салам, произведен със стартера „ПроВиотик“ без нитрати/нитрити и на контрола, произведена с комерсиална стартерна култура със силно антибактериално действие и с максимално разрешеното количество натриев нитрат. Резултатите показват:

- много близки криви за сушене на двете проби;
- лактобацилите и в двете проби се развиват по подобен начин, като броят им и в двете проби надвишава 100 милиона на грам на 30-тия ден;
- нивото на рН е близко и сравнимо между двете проби;

- водната активност е по-ниска при пробата с ПроВиотик, отколкото при контролата с вложен нитрат;
- много по-добра антимицробна активност срещу *Salmonella* spp. и *Listeria* spp. на пробите, съдържащи стартерната култура „ПроВиотик“, в сравнение с контролните проби, съдържащи нитрати/нитрити. На 30-тия ден (в края на процеса на сушене) в пробите с „ПроВиотик“ *Salmonella* spp. не се откриват в 4 от общо 9 проби и *Listeria* spp. в 6 от общо 9 проби, при средни нива на инокулация с тези патогени от 2,29 log cfu/g и 2,27 log cfu/g, съответно. В сравнение, в контролите с нитрати/нитрити - *Salmonella* spp. се откриват във всяка от 9-те проби и *Listeria* spp. в 8 от общо 9 проби.

В заключението се посочва, че стартерът „ПроВиотик“ изглежда показва по-висока ефективност по отношение на безопасността на продукта, в сравнение с контролите с вложени нитрати/нитрити. Тази ефективност вероятно е свързана с много бързото понижаване на водната активност, дължащо се на състава на стартерната култура „ПроВиотик“.

г) в лаборатория СЖС (SGS) България, ЕООД, гр. Варна, на 4.12.2019 г., е извършен количествен анализ на броя живи клетки на пробиотичния щам *L. Plantarum* GPL3 в две проби от сурово-сушени трайни месни колбаси тип „луканка“, произведени с „ПроВиотик“ и без нитрати/нитрити.

Установени са високи концентрации от жизнеспособни клетки на пробиотичния щам *L. Plantarum* GPL3 от 5.8×10^7 cfu/g в проба, взета от партида, произведена преди 4 месеца (на 24.07.2019 г.) и от 1.3×10^8 cfu/g в проба, взета от партида, произведена преди 3 месеца (на 15.08.2019 г.).

2.6. Влияние на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ върху органолептичните качества на сурово-сушени трайни колбаси тип „луканка“

В лаборатория СЖС (SGS) България, ЕООД, гр. Варна, на 4.12.2019 г., са извършени органолептични изследвания, определяне на пероксидна стойност (число) и реакция на Крайс за установяване на алдехиди и кетони на три проби сурово-сушени колбаси тип „луканка“. Една от пробите (контрола) е произведена по традиционна рецепта с влагане на нитрати/нитрити на 15.08.2019 г., а останалите две проби са произведени с „ПроВиотик“ и без добавени нитрати/нитрити, съответно на 24.07.2019 г. и 15.08.2019 г.

Резултатите за двете проби с „ПроВиотик“ и без нитрати/нитрити, произведени преди 3 и 4 месеца, показват, че:

- продуктите са със запазени специфични органолептични показатели за колбас тип „луканка“ - външен вид и повърхност, форма, разрезна повърхност, консистенция, вкус, мирис и цвят;
- в продуктите не са настъпили промени в качеството на липидите (мазнините).

ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ПРЕПОРЪКИ

Стартерните култури са важен инструмент, който допринася за осигуряване на безопасността на ферментиралите месни продукти. Това в същност, е основната причина за употребата им. Микроорганизмите, които представляват стартерни култури, могат да инхибират растежа на нежелани и патогенни бактерии чрез механизми, като производство на определени метаболити или конкурентно изключване. По този начин, използването на стартерни култури може да намали нуждата от добавки в храните, като нитрити и нитрати. Освен това, по-ниските остатъчни нива на нитрати и нитрити, открити във ферментирали месни продукти, инокулирани със стартерни култури, се дължат на способността на стартерите да метаболизират тези съединения. Освен полезното им въздействие върху безопасността на ферментиралите храни, стартерните култури могат да допринесат за запазване на органолептичните свойства на храните и за намаляване на времето за тяхното производство.

От анализа на литературните данни и на предоставените от заявителя резултати от извършени лабораторни изпитвания и изследвания, ЦОРХВ прави следните заключения:

- предложеният технологичен процес за производство на сурово-сушени трайни колбаси тип „луканка“ с ферментация при ниска температура и употреба на стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ допринася за постигане на бързо намаляване на киселинността (pH) на продукта;
- сурово-сушени колбаси тип „луканка“ могат да се ферментират със стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“;
- стартерната пробиотична култура „ПроВиотик“ притежава висока антимикробна активност спрямо патогенни микроорганизми и нежелана микробиота и показва добри технологични свойства, които допринасят за запазване на органолептичните качества на продукта
- използването на стартера „ПроВиотик“ в комбинация с ферментация при ниска температура прави възможно производството на сурово-сушени колбаси тип „луканка“ без употреба на нитрати/нитрити.

В допълнение на гореизложеното, екипът на ЦОРХВ прегледа представеното от заявителя Становище за проследяване на ефекта на аскорбинова киселина и нейните соли върху качествата на крайния продукт при производството на сурово-сушени месни продукти, изготвено от Център за приложни изследвания и иновации, гр. София, 22.10.2019 г. Имайки предвид изложените обстоятелства, включващи данни от литературно проучване и проведен лабораторен експеримент, ЦОРХВ счита, че има основание да се приеме фактът, че наличието на аскорбат в готовия продукт се дължи на пренасянето му чрез стартерната култура, съдържаща аскорбинова киселина.

С цел потвърждение на резултатите от проведените лабораторни и производствени изпитвания, ЦОРХВ препоръчва първите произведени партии от продукта да се анализират в акредитирана лаборатория за съответствие на произведения продукт с микробиологичните показатели за безопасност на храните и за хигиената на производствения процес, съгласно Регламент (ЕО) № 2073/2005 и вътрешната

мониторингова програма на производителя (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, включително и *Clostridium*). Следва да се включи и изпитване за наличие на брой жизнеспособни клетки на *L. plantarum* GPL3 в произведения продукт и през периода на неговата трайност.

ДАНИИ, ПРЕДОСТАВЕНИ НА ЦОРХВ ОТ ЗАЯВИТЕЛЯ

1. Копия на протоколи №№ 583МС/26.07.2019 г., 583МС-ИОА/26.07.2019 г. и 584МЛ-ИОА/26.07.2019 г. за изпитване по микробиологични показатели на Лаборатория за изпитване при Национален център по безопасност на храни - НЦБХ, НДНИВМИ, БАБХ;

Изпитванията за *Salmonella* са извършени по метода БДС EN ISO 6579-1:2017/СД CEN ISO/TS 6579-2:2012; за *E. Coli* съгласно БДС ISO 16649-2:2014; за *Listeria monocytogenes* съгласно БДС EN ISO 11290-2:2017; за *Clostridium perfringens* съгласно EN ISO 7937:2004 и за брой млечнокисели бактерии съгласно БДС ISO 7889/IDF 117:2005.

2. Копия на протоколи №№ 4368/17.09.2019г.; 4369/17.09.2019 г.; 4370/17.09.2019 г. и 4371/17.09.2019 г. за изпитване по микробиологични показатели на Аналитичен център за лабораторни изпитвания „Комихрис“ ООД, гр. Пловдив.

Изпитванията за *Salmonella* са извършени по метода БДС EN ISO 6579-1:2017; за *E. Coli* съгласно БДС ISO 16649-2:2014; за *Listeria monocytogenes* съгласно БДС EN ISO 11290-1:2017; за *Clostridium perfringens* съгласно БДС EN ISO 7937:2005.

3. Становище от Национален център по безопасност на храните, НДНИВМИ, БАБХ, 13.08.2019 г.

4. Копия на протоколи №№ RA 35581/07.10.2019 г. и RA 35582/07.10.2019 г. за изпитване по микробиологични показатели от Изпитвателен център (ИЦ) „Глобалтест“ ООД, гр.София.

Изпитванията за *Salmonella* са извършени по метода БДС EN ISO 6579-1:2017; за *E. Coli* съгласно ISO 16649-2:2001; за *Listeria monocytogenes* съгласно БДС EN ISO 11290-1:2017; за сулфит-редуциращи бактерии съгласно ISO 15213:2003.

5. Копие на протокол № RA 68938/1410.2019 г. за изпитване по микробиологични показатели на Лаборатория за изпитване „Алименти - Омнилаб“ при „ДИ ЕНД ВИ КОНСУЛТ“ ООД, гр. Пловдив.

Изпитванията за *Salmonella* са извършени по метода ISO 6579-1:2017; за *E. Coli* съгласно ISO 16649-2:2001; за *Listeria monocytogenes* съгласно ISO 11290-1:2017; за *Clostridium botulinum* СД CEN ISO/TS 17919:2013 и *Clostridium perfringens* ISO 7937:2004 -1:2017.

6. Копие на протокол № RA 35859/14.10.2019 г. за изпитване по микробиологични показатели на Изпитвателен център (ИЦ) „Глобалтест“ ООД, гр. София.

Изпитванията за *Salmonella* са извършени по метода БДС EN ISO 6579-1:2017; за *E. Coli* съгласно ISO 16649-2:2001; за *Listeria monocytogenes* съгласно БДС EN ISO 11290-1:2017; за Сулфит-редуциращи бактерии съгласно ISO 15213:2003 и за брой млечнокисели бактерии – *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* съгласно БДС ISO 7889:2005.

7. Становище на Център за приложни изследвания и иновации, София от 22.10.2019 г. за проследяване на ефекта на аскорбинова киселина и нейните соли върху качествата на крайния продукт при производството на сурово-сушени месни продукти.

8. Копие на протокол № VA 19-13446.001/1 NA/09.12.2019 г. за органолептично изпитване на луканка, произведена с употреба на нитрати/нитрити на 15.08.2019 г., на СЖС (SGS) България, ЕООД, гр. Варна.

9. Копие на протокол № VA 19-13445.001 NA/10.12.2019 г. за органолептично изпитване на луканка, произведена с „ПроВиотик“ без нитрати/нитрити на 15.08.2019 г., на СЖС (SGS) България, ЕООД, гр. Варна.

10. Копие на протокол № VA 19-13445.001 NA/10.12.2019 г. за органолептично изпитване на луканка, произведена с „ПроВиотик“ без нитрати/нитрити на 24.07.2019 г., на СЖС (SGS) България, ЕООД, гр. Варна.

11. Доклад от френски институт за месото ADIV за определяне на консервиращия ефект на стартера „ПроВиотик“ при влагането му в производство на сурово-сушени месни продукти без употреба на нитрати/нитрити (Rapport CT BioSanté V3/Décembre 2019).

12. Предоставена информация от заявителя, относно данни за безопасността на други продукти реализирани на българския и американския пазар, съдържащи стартерната култура ProViotic и обратна връзка от потребителите:

- **Стартерна култура ProViotic**, съдържаща *L.plantarum* GLP3. Общият брой на крайни клиенти, които са консумирали тази стартерна култура с *L.plantarum* GLP3 към момента надвишава 285 000.
- **Blue Magic Smoothie** – пробиотично смути предлагано на американския пазар. Напитката е с ProViotic с *L.plantarum* GLP3 като единствен натурален консервант в този продукт. Закваската е аналогична на тази, която ще се използва в сурово-сушените трайни месни продукти. По данни на производителя, за последните 12 месеца са продадени над 270 000 смутита на крайни потребители в Ню Йорк и до момента няма постъпили оплаквания за възникнали алергични реакции, странични ефекти и каквито и да било други оплаквания, след консумацията на продукта.
- **Proviotic Хумус** - български производител представя на българския пазара хумус без консерванти, само със стартерна култура ProViotic (*L.plantarum* GLP3) предлаган в българска търговска верига през 2019 г. По данни на производителя, до този момент са продадени над 10 000 опаковки без данни за постъпили оплаквания от потребителите за възникнали алергични реакции, странични ефекти и други.
- **ProViotic Cardio - Хранителна добавка**, която използва същата бактерия и се продава в над 2000 аптеки в България. По статистически данни от производителя, до момента над 5 000 крайни потребители са приемали хранителната добавка, без да има данни за оплаквания и нежелани странични ефекти.

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1. Данова С., Пробиотици за функционални храни и здраве, лаборатория „Млечнокисели бактерии и Пробиотици“, секция по Микробна генетика, Департамент по Обща микробиология, Институт по Микробиология “Стефан Ангелов“, БАН(2011), http://focalpointbg.com/images/stories/3Probiotics_DANOVA.pdf
2. Денкова З., П. Неделчева, Инхибиращо действие на *Lactobacillus plantarum* 226-15 върху растежа на патогенни и токсигенни бактерии, “Хранителна наука, техника и технологии 2009”, Научни трудове на УХТ, Том LVI, Свиськ 1, 417-422, 2009.
3. Денкова Р., Получаване на закваски от лактобацили и възможности за тяхното приложение в производството на храни, автореферат на дисертация за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, катедра „Биотехнологии“, София, 2014.
4. Еникова Р. Пробиотици в храненето днес, сп. Социална медицина, бр. 3/4, 2018.
5. Игнатова-Иванова Ц., Ерменлиева Н., Мехмедова С., Иванов Р., Иванова И. (2013) Изследване на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от домашно приготвени млечни продукти, Научни трудове на Русенския университет - 2013, том 52, серия 10.2.
6. Мургов И. и Денкова З., Микроорганизмите в производството на функционални храни, напитки и пробиотици, Университет по хранителни технологии, гр. Пловдив, Конференция „Хранителна наука, Техника и Технологии – 2009“, 23-24 октомври 2009, Пловдив.
7. Стояновски С., Изследване на млечнокиселата микрофлора на сурово-сушени традиционни български колбаси, тип „Луканка“, автореферат, за присъждане на образователна научна степен „Доктор“, Софийски университет “Св. Климент Охридски“, Биологически факултет (2011).
8. Alahakoon AU., Jayasena DD., Ramachandra S., Jo Ch., Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. Trends in Food Science & Technology 45 (2015) 37-49
9. Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G and Fiocco D (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. Front. Microbiol. 7:464. doi: 10.3389/fmicb.2016.00464.
10. Beniamino T. Cenci-Goga, Musafiri Karama, Paola Sechi, Maria Francesca Iulietto, Sara Novelli, Roberto Selvaggini & Salvatore Barbera (2016). Effect of a novel starter culture and specific ripening conditions on microbiological characteristics of nitrate-free dry-cured pork sausages, Italian Journal of Animal Science, 15:3, 358-374, DOI: 10.1080/1828051X.2016.1204633
11. Brazilian Journal of Microbiology, Volume 48, Issue 3, 2017, Pages 576-586, ISSN 1517-8382, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005>.
12. Cavalheiro CP., Ruiz-Capillas C., Herrero AM., Jimnez-Colmenero F., Pintado T., Ragagnin de Menezes C. and Martins Fries LL. Effect of different strategies of *Lactobacillus plantarum* incorporation in chorizo sausages (2019), published online in Wiley Online Library: (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.9952 / Accepted article published: 27 July 2019
13. Cenci-Goga, BT., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., & Cullor, J. S. (2012). Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free dry-cured sausages. *Meat Science*, 90(3), 599-606. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.022>.

14. Cenci-Goga BT., Karamaa M., Sechia P., Iuliettoa M.F., Grispoldia L., Selvagginic R., Ceccarellia M., Barberad S., (2018) Fate of selected pathogens in spiked «SALAME NOSTRANO» produced without added nitrates following the application of NONIT™ technology, Meat Science, volume 139 (May 2018), page 247-254.
15. Da Silva Sabo, Sabrina, Michele Vitolo, José Manuel Domínguez González, and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. "Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria." Food Research International 64 (2014): 527-536.
16. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Colloquium - Microorganisms in Food and Feed: Qualified Presumption of Safety. 13–14 December 2004, Brussels, Belgium.
17. EFSA. (2007) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal 2007; 587: 1-16.
18. EFSA. (2008) Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on the maintenance of the QPS list of microorganisms intentionally added to food or feed. EFSA Journal 2008; 923:1-48.doi: 10.2903/j.efsa.2008.923.
19. European Food Safety Authority (EFSA). The 2016 updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. EFSA Journal 2017; 15(3):4664, p. 1-4.
20. EFSA. (2018) BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, Girones R, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Cocconcelli PS, Peixe L, Maradona MP, Querol A, Suarez JE, Sundh I, Vlak J, Barizzone F, Correia Sand Herman L. Statement on the update of the list of QPS recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. EFSA Journal 2018; 16 (7):5315, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5315>.
21. EFSA. (2019) BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Cocconcelli PS, Fernández Escámez PS, Maradona MP, Querol A, Suarez JE, Sundh I, Vlak J, Barizzone F, Correia S and Herman L, 2019 a. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 9: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. EFSA Journal 2019; 17(1):5555, 46 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5555>.
22. FAO, WHO. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada.
23. FDA (2016) Generally Recognized as Safe (GRAS). <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/.check>
24. Gloria Díaz-Ruiz¹, Nabil Ben Omar², Hikmate Abriouel², Magdalena Martínez Cañamero² and Antonio Gálvez^{2*} Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system, (2012) African Journal of Microbiology Research Vol. 6(6), pp. 1103-1108, 16 February, 2012 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJMR>
25. Gradinarska, D., Danov, K., Valkova-Jorgova, K., Yordanov, D., Vasilev, K., Proteolytic effect of starter cultures used in the production of Bulgarian dry – cured

sausages (Протеолитични свойства на стартерни култури използвани при производството на български сурово – сушени колбаси), Proc. 56 International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, South Korea, E057.

26. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1 -4 October 2001.
27. K. Danov, D. Gradinarska, K. Valkova-Jorgova, A. Kuzelov, N.Taskov, D. Saneva, Funkcionalne osobine sojeva bakterija mlečne kiseline i mikrokoка u sredini sličnoj mesnoj masi sirovih kobasica kao modelu (Функционални свойства на щамове млечнокисели бактерии и микрококи в моделна месна среда), XIX Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik Radova, "XIX SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI, 2014, vol. 19 (21), p. 311-317, ISBN 978-86-87611-31-3.
28. K. Danov, D. Gradinarska, K. Valkova-Jorgova, T.Slavcheva. Influence of a bio-consortium starter culture on the biochemical and microstructural characteristics of traditional dry cured meat product (Влияние на биоконсорциум от стартерни култури върху биохимичните и микроструктурните свойства на традиционни сурово-сушени месни продукти), Bulgarian Journal of Agricultural Science, Vol. 20 (3), 2014, 523-531.
29. Keşka, P., Stadnik, J., Zielińska, D., and Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Potential of bacteriocins from the lab to improve the microbial quality of dry-cured and fermented meat products [pdf]. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 16, 119–126. doi: 10.17306 / J.AFS.0466
30. Laranjo M, Potes ME and Elias M (2019) Role of Starter Cultures on the Safety of Fermented Meat Products. *Front. Microbiol.* 10:853. doi: 10.3389/fmicb.2019.00853
31. Mathur S, Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal Food Microbiology* 105:281-295.
32. Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, MJ, et al. (2017b). Повторна оценка на натриев нитрат (E 251) и калиев нитрат (E 252) като хранителни добавки. *EFSA J.* 15: e04787.
33. Nedelcheva P., Z. Denkova, P. Denev, A. Slavchev & A. Krastanov (2010) Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum* NBIMCC 2415 with Antioxidant Activity as a Starter Culture in the Production of Dried Fermented Meat Products, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24:1, 1624-1630, DOI: [10.2478/V10133-010-0016-4](https://doi.org/10.2478/V10133-010-0016-4)
34. Paula Teixeira Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions (2015), *Food Microbiology* 48 (2015) 109e115
35. Pegg, R. B. 2004. Curing. In *Encyclopedia of Meat Sciences*. W. K. Jensen, C. Devine, and M. Dikeman, ed. Elsevier Ltd., Oxford, UK.
36. Sawitzki MC., Fiorentini AM., Cunha Junior A., Bertol TM., Sant'Anna ES., *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol. 28, no. 3, Campinas July/Sept. 2008, <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300030>.
37. Stoyanovski S., V. Chipeva, S. G. Dimov, Sv. Danova, I. Dimitrova, L. Yocheva, S. Antonova-Nikolova & I. Ivanova (2009), Characterization of Lactic Acid Bacteria from Dry Sausages, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23:sup1, 870-873, DOI:10.1080/13102818.2009.10818560

38. Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union. (2017) *Frontiers of Microbiology*, published: 12 September 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.01725, www.frontiersin.org
39. Sebranek, J. G., and J. B. Fox. 1985. A review of nitrite and chloride chemistry: Interactions and implications for cured meats. *J. Sci. Food Agric.* 36:1169–1182.
40. Sindelar JJ. and Milkowski AL., Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. American Meat Science Association White Paper Series, Number 3, November 2011.
41. Svetoslav Dimitrov Todorov, Saso Stojanovski, Ilia Iliev, Penka Moncheva, Luis Augusto Nero, Iskra Vitanova Ivanova, Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka”, *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 48, Issue 3, 2017, Pages 576-586, ISSN 1517-8382, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005>.
42. Townsend, W. E., and D. G. Olson. 1987. Cured meats and cured meat products processing. Pages 193–216, 431–456 in *The Science of Meat and Meat By Products*. 3rd ed. J. F. Price and B. S. Schweigert, ed. Food and Nutrition Press Inc., Westport, CT.
43. Tropcheva R., S. Danova. Screening for antibacterial activity of new isolated Lactobacilli from yogurt and cheeses. *Medicine (Bulgaria)*, 2011, 1 (1), pp.171-175. [pasteur-00748943](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005)
44. VKM. (2016) Risk assessment of specific strains of *Lactobacillus acidophilus* used as "other substances". Opinion of the Panel on Biological Hazards of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, ISBN: 978-82-8259-244-4, Oslo, Norway. <https://nofima.no/en/pub/1505999/>
45. Wang, XH, Ren, HY, Liu, DY, Zhu, WY, and Wang, W. (2013). Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. *Food Control* 32, 591–596. doi: 10.1016 / j.foodcont.2013.01.050
46. WHO (World Health Organization), 1999. Removing obstacles to healthy development – World Health Organization report on Infectious diseases. WHO, Geneva, Switzerland.