

ЧТО НУЖНО ОБЯЗАТЕЛЬНО ЗНАТЬ О ЗАКВАСКАХ?

Йылдырым Е.А., Г. Ю. Лаптев, Л.А. Ильина, Д.Г. Тюрина, Н.И. Новикова, В.А. Филиппова, А.В. Дубровин

Психология многих российских потребителей часто заставляет перевозить качество импортных биопрепаратов, что распространяется и на силосные закваски. Стоимость таких препаратов в разы отличается от отечественных. Однако по умолчанию потребители выбирают именно те, что дороже.

Если бы отечественные закваски не стоили дешевле, чем импортные, это было бы обманом потребителя. Разберемся, из чего складывается стоимость зарубежного препарата? В себестоимость такой закваски заложены расходы на дорогостоящие процедуры сертификации, санкционные баталии мировых держав, транспортировку, расходы на излишние простои контейнеров на таможне, таможенные штрафы за нарушения, оплату работ агентов по сертификации товаров, юристов, логистов и т.д. За все это отдуваться приходится конечным потребителям этих самых товаров.

В то же время, качество дорогостоящих зарубежных силосных заквасок не редко «оставляет желать лучшего» по совершенно объективным причинам. Задача написания этой статьи - сформировать класс грамотных потребителей, которые делают осознанный выбор.

Миф о высоких титрах

Очевидно, что живые бактерии - это скоропортящаяся субстанция. Этот факт привел к необходимости зарубежных производителей заквасок (которые территориально удалены от потребителя) пользоваться методами лиофильного высушивания бактерий. Высушивание позволяет получить бактериальный препарат в форме, удобной для доставки потребителю. Однако производители умалчивают о том, что лиофильная сушка связана с низкой выживаемостью бактерий и потерей их активности. Поэтому этот метод рекомендуется только для консервации штаммов, подлежащих длительному хранению в биоресурсных центрах и коллекциях культур. Ведь даже единичные живые клетки, сохранившиеся в сухих препаратах, могут быть использованы для получения следующей генерации штамма.

Эти препятствия перед созданием качественных препаратов **вынуждают производителей повышать количество таких «полумертвых» бактерий в составе высушенных препаратов, что и породило миф о якобы необходимых высочайших титрах заквасок.** Более того, с помощью этих уловок производители пытаются выгодным образом позиционировать свой товар, что не корректно по отношению к покупателю.

Можно ли высушивать бактерии?

Все бактерии по своим физиологическим характеристикам можно разделить на две обширные группы: спорообразующие и неспорообразующие.

Спорообразующие бациллы, например, вид *Bacillus subtilis*, имеют в своем цикле развития покаящиеся структуры (эндоспоры) для длительного выживания в неблагоприятных условиях, что позволяет им с успехом переносить высушивание (рис. 1).



Рис. 1. Микрофотография *B. subtilis* и *Lactobacillus* sp. (сканирующее электронное микроскопирование)

Лактобактерии же не обладают способностью к образованию спор (рис. 1). Поэтому лиофильная сушка - это стрессовый фактор для данных микроорганизмов. Большинство вегетативных (неспоровых) форм микроорганизмов характеризуются плохой термостабильностью. Для них характерны высокие скорости гибели и потери активности в результате термической инактивации в диапазоне температур от 40 до 60° (Turuvekere, & Basavaraj, 2018).

Ученые давно пришли к выводу, что существует определенное критическое содержание воды, за рамками которого происходит обезвоживание и инактивация клеток. В случае вегетативных (беспоровых) микроорганизмов, таких, как лактобактерии, вода не только обеспечивает среду для их жизнедеятельности, но и выступает субстратом для биохимических реакций, а ее удаление ниже определенного уровня тормозит все метаболические процессы. Это делает клетку совершенно не защищенной от повреждений, в частности, в процессе хранения лиофильно высушенных культур (Goderska, 2012).

До сих пор, ни зарубежным, ни отечественным ученым не удалось решить проблему выживаемости и стабилизации свойств лактобактерий, «перенесших» лиофильное высушивание.

Гибнут или теряют активность

Силос - это агрессивная для чужеродных искусственно внесенных штаммов среда. Во-первых, в силосе в результате подвяливания растительной массы создается высокое осмотическое давление. С другой стороны, происходит активный процесс размножения высококонкурентной местной микробиоты поверхности растений. Поэтому эффективное использование бактерий в качестве силосных заквасок напрямую зависит от их активности и свойств, прежде всего, от конкурентоспособности: толерантности к осмотическому давлению, способности к высокой скорости синтеза молочной кислоты и других антимикробных компонентов.

Лиофильное высушивание – это сложный технологический процесс, который включает 3 агрессивных по отношению к беспоровым бактериям этапа: замораживание клеток; первичную сушку, в течение которой замороженная вода удаляется при субнулевых температурах; вторичную сушку, при которой из сухого препарата при положительных температурах удаляется незамороженная вода. На каждом этапе процесса происходят серьезные повреждения бактериальных клеток, которые связаны с действием низких температур, обезвоживания, осмотического стресса, изменения pH растворов (Грачева, Осин, 2016).

Процесс сушки вызывает повреждение клеточной стенки и клеточных компонентов, особенно цитоплазматической мембраны, белков, ДНК, происходит окисление липидов, что приводит к потере выживаемости и активности (рис. 2).

ПРИЧИНЫ ПОТЕРИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВЫСУШЕННЫХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

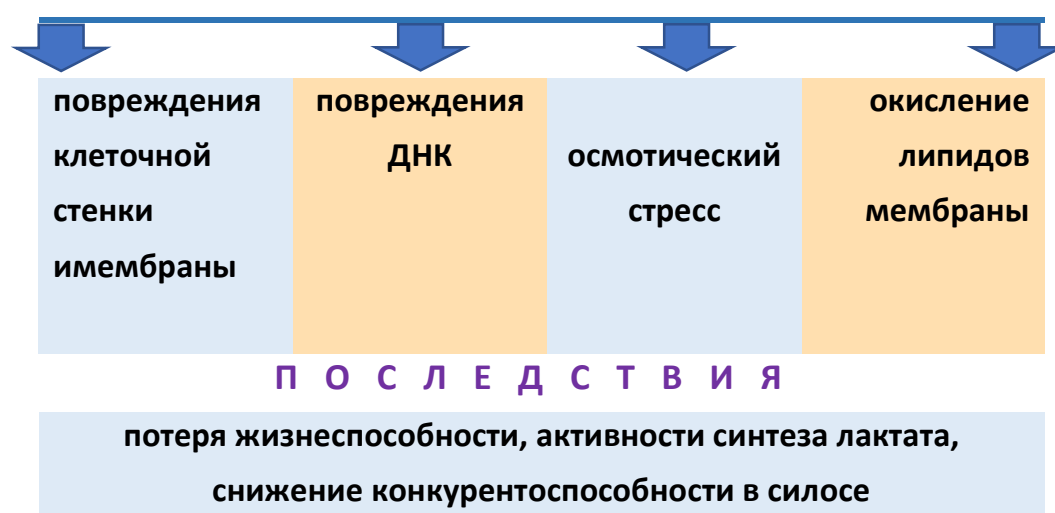


Рис. 2. Причины потери жизнеспособности высушенных лактобактерий (по данным Kandil, Soda, 2015)

Поскольку проницаемость клетки связана с клеточной мембраной, ее повреждения при лиофильной сушке приводят к «просачиванию», а, значит, повышенной чувствительности к соли в среде (Teixeira et al., 1996). Следовательно, выжить в силосе – среде с высоким уровнем осмотического давления такие высушенные лактобактерии уже не смогут.

Бактерии относятся к прокариотам, или доядерным — надцарству организмов, не обладающих (в отличие от эукариот) клеточным ядром, в результате чего генетический аппарат прокариот не защищён ядерной оболочкой. Поэтому лиофильное высушивание приводит к повреждению их ДНК, а значит, повреждаются гены, которые контролируют работу всех ферментов. Именно поэтому при высушивании происходит значительное снижение синтеза и активности ферментов (Kandil, El Soda, 2015), а, значит, и способности к производству молочной кислоты и других важных веществ, жизненно необходимых при ферментации кормов.

Поэтому для определения влияния высушивания на бактериальные клетки одной лишь оценки способных к культивированию на питательной среде бактерий не достаточно. Необходимо анализировать также и изменения их физиологического состояния.

Ученые (Vozoglu, Gurakan, 1989) посчитали долю выживших после лиофильного высушивания бактерий *Lactobacillus acidophilus*, а также долю возникших «нелетальных повреждений клеток», связанных с дефектами ДНК,

мембран, липидов (табл. 1). Оказалось, что даже при использовании специальных стабилизаторов количество выживших бактерий не превышало 16,7%. А ведь стоимость этих стабилизаторов не маленькая и тоже бьет по карману потребителя. Более того, доля поврежденных бактерий среди небольшого количества выживших составляла от 42,2 до 45%!

Таблица 1. Влияние высушивания на выживаемость и повреждение клеток *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4355 (Bozoglu, Gurakan, 1989)

Варианты	Выжившие бактерии, %	Поврежденные клетки среди выживших бактерий, %
Без стабилизаторов	13,3	43,0
Стабилизатор №1: NH ₄ Cl + сахара + аскорб. кислота	16,7	45,0
Стабилизатор №2: CaCO ₃	13,6	42,2

Самыми «нежными» культурами, плохо переносящими высушивание оказались палочкообразные лактобактерии. Так, коллективом ученых (Teixeira et al., 1996) было изучено влияние лиофильного высушивания на штамм *Lactobacillus bulguricus*. Проявилось резкое снижение выживаемости и способности к синтезу жирных кислот у высушенного штамма в процессе хранения. Кроме того, низким уровнем выживаемости обладают (Miyamoto-Shinohara et al., 2008) виды лактобацилл с тейхоевой кислотой в клеточной стенке, такие, как *Lactobacillus plantarum*.

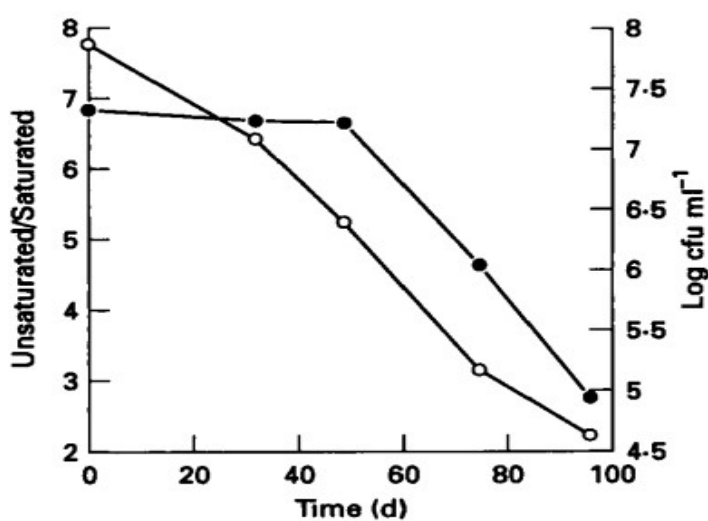


Рис. 2. Выживаемость (○) и количество ненасыщенных/насыщенных липидов (●) в культуре *Lactobacillus bulguricus* при хранении при 20°C после лиофильного высушивания (Teixeira et al., 1996)

Именно поэтому, принуждение зарубежных производителей высушенных лактобактерий гнаться за высокими титрами силосных заквасок – это коммерческий ход, который целенаправленно вводит потребителей в заблуждение.

Важен не титр, а активность

Для более глубокого понимания разницы процессов динамики увеличения в силосе количества бактерий, входящих в состав жидких и сухих препаратов, мы выбрали метод Хаттори. Это метод определения физиологического состояния различных микроорганизмов, который позволяет дать количественную оценку различиям в активности бактериальных популяций.

В результате наблюдения за процессом культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах Хаттори установил, что колонии бактерий при прочих равных условиях (состав питательной среды, температура и т. д.) имеют различную динамику увеличения численности до уровня визуального обнаружения.

Исходя из рисунка 3 видно, что время задержки активности сухих заквасок по сравнению с жидкой закваской Биотроф более суток. То есть при попадании в силосную массу после «летаргического сна» способность к размножению у высушенных бактерий восстанавливается не сразу, а через длительное время. При этом первые сутки силосования являются наиболее важной и уязвимой фазой, определяющий ход дальнейшего процесса брожения. Аэробные условия в этот период приводят к бурному развитию спонтанных эпифитных нежелательных микроорганизмов, в том числе плесеней – продуцентов микотоксинов.

ВРЕМЯ ЗАДЕРЖКИ АКТИВНОСТИ СУХОЙ ЗАКВАСКИ – БОЛЕЕ СУТОК

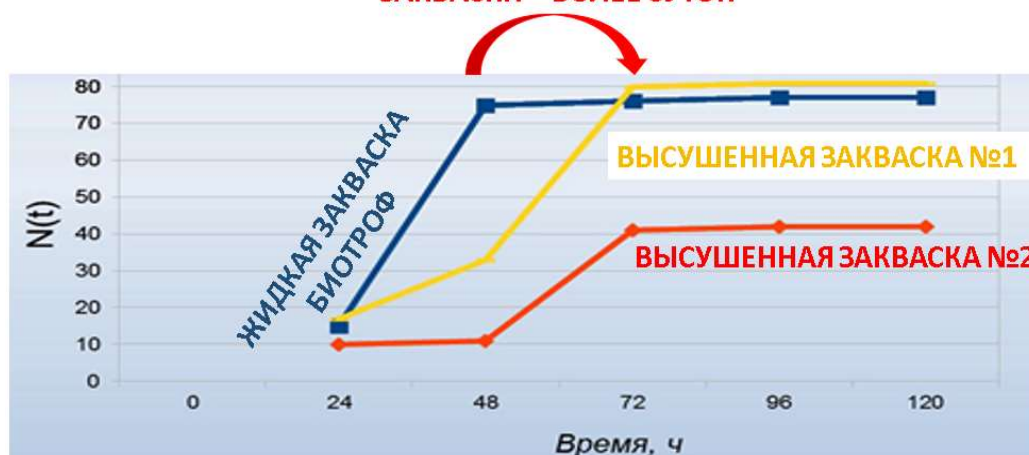


Рис. 3. Динамика увеличения количества бактерий, входящих в состав жидких и сухих препаратов, по методу Хаттори

Таким образом, даже та часть лактобактерий, которая выживает в процессе лиофильной сушки медленно восстанавливают свою жизнеспособность в силосе, а активность генов синтеза молочной кислоты не может реанимировать и вовсе (рис. 4). Поэтому такие штаммы синтезируют очень малое количество молочной кислоты и других антимикробных метаболитов. Это позволяет конкурентной микробиоте быстро вытеснить такие закваски из силоса, несмотря на высокие вносимые титры. По этим причинам производители заквасок на основе высушенных лактобактерий настаивают на обязательных высоких титрах.



Рис. 4. Титр и способность к синтезу молочной кислоты и высушенных заквасок на основе лактобактерий

Жидкая закваска, содержащая штаммы в физиологически активном состоянии, не имеет отсроченного действия, подавляя нежелательную микробиоту уже в первые часы после внесения в силосную массу.

Мы провели проверку выживаемости штамма бактерии *B. subtilis* 111 закваски Биотроф-111 в силосе из злаково-бобовых трав с применением метода количественной ПЦР. Установлено, что уже через сутки ферментации содержание *B. subtilis* в 1 грамме силоса в варианте с применением закваски возросло более, чем на миллион клеток по сравнению с вариантом без добавок (рис. 5).

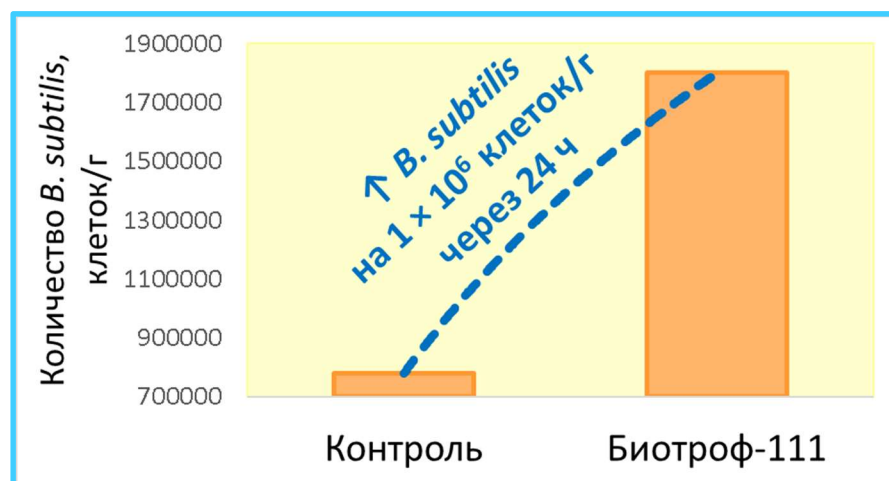


Рис. 5. Содержание штамма бактерии *B. subtilis* 111 в силосе через 24 ч после закладки

Стало понятно, что высокие титры необходимы только производителям высушенных препаратов, что никоим образом не может распространяться на жидкие закваски. Итогом внесения неоправданно высокого количества действительно активных молочнокислых бактерий, особенно при консервировании высокоуглеводного сырья, может явиться переокисленный силос.

Подтверждено на практике

В качестве практического подтверждения сказанного можно привести данные, полученные канд. с.-х. наук Вадимом Юрьевичем Молодкиным (Молодкин, Хамитова // Ценовик. 2012. №5. С. 44-45). С целью продемонстрировать сравнительную эффективность консервирующих препаратов для силосования зарубежного и отечественного производства автор провел обширный мониторинг (135 партий) биохимических показателей качества силосов из молочных ферм Ленинградской области. Риск возникновения нежелательных брожений оценивался по процентному количеству партий корма, оказавшихся в «зоне риска»: количество молочной кислоты ниже 70%, неблагоприятный уровень pH, содержание масляной кислоты больше 0,5%. Судя по биохимическим показателям качества, наилучшим консервирующим эффектом обладали закваски на основе живых бактерий, разработанных в НПК «БИОТРОФ», по сравнению с более дорогостоящими высушенными импортными консервантами, внесенными в огромных концентрациях (табл. 2).

Таблица 1. Результаты анализа эффективности консервантов на основе лактобактерий при силосовании многолетних трав в Ленинградской области

(Молодкин, Хамитова // Ценовик. 2012. №5. С. 44-45)

Закваска	Доля партий силоса от общего количества, %			Кол-во изученных партий
	Доля молочной к-ты > 70%	Неблагоприятный уровень рН	Доля масляной к-ты > 0,5%	
Жидкая Биотроф	53,3	12,7	6,7	30-47
Сухая зарубежная (образец №1)	34,8	31,9	37,8	37-47
Сухая зарубежная (образец №2)	54,5	22,2	9,1	9-11

Таким образом, качество силосных заквасок, это не высокие титры, указанные на упаковке. Качество – это способность выживать в агрессивной среде силоса, быстро увеличивать там численность, активно производить кислоты и другие антимикробные вещества. Принуждение гнаться за высокими титрами силосных заквасок – это, с одной стороны, вынужденная мера производителей высушенных заквасок, поскольку транспортировка из-за рубежа – процесс не быстрый. С другой стороны, это еще один рекламный ход, способствующий активной торговле. Попытки создания заквасок на основе высушенных лактобактерий игнорируют факт, что при высушивании биомассы микроорганизмов, которые не образуют эндоспор, происходит либо гибель чувствительных к температуре бактерий, либо серьезные повреждения клеток, в десятки раз снижающие активность. Жидкая форма специально отселектированных заквасок производства НПК «БИОТРОФ» гарантирует потенциал бактерий к выживанию и высокому уровню метаболической активности в силосе.