

На правах рукописи

Радиф Зеяд Халоф Радиф

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ МАННОЗЫ И
МАННОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Научный руководитель: **Корнеева Ольга Сергеевна**
доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии и биотехнологии, проректор по НИД ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Официальные оппоненты: **Волкова Галина Сергеевна**
доктор технических наук, профессор, заведующая лабораторией биотехнологии органических кислот, пищевых и кормовых добавок ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Канарская Зося Альбертовна
кандидат технических наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Пряхина»**

Защита состоится 13 июня 2019 г. в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://muctg.ru>.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2019г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 999.095.03 , к.т.н.

И. В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время повышенный интерес вызывают «минорные» сахара, в связи с их уникальной биологической ролью. Одним из таких веществ является манноза, которая входит в состав иммуноглобулинов, участвует в синтезе гликопротеидов, обладает пребиотическим действием [Komeeva et al, 2012]. Недостаток этого углевода в крови приводит к аномальному гликозилированию иммуноглобулинов с нарушенной структурой углеводной части, и также нарушению синтеза других гликопротеидов [Hernández et al, 2008]. Современные научные данные свидетельствуют о том, что добавление маннозы в рацион питания является предпосылкой восстановления биохимических процессов в живом организме и улучшения его иммунного статуса.

Манноза в пищевых продуктах присутствует в виде гомогенных или гетерогенных полисахаридов, в том числе растительного происхождения. Перспективным способом получения маннозы и манноолигосахаридов является ферментативная деструкция маннанов – полисахаридов гемицеллюлозной фракции клеточных стенок растений. Ферментами, расщепляющими внутренние β -1,4-гликозидные связи в основной цепи молекул маннанов, являются β -маннаказы. На рынке представлены коммерческие ферментные препараты β -маннаказ зарубежного производства. В рамках современных исследований по поиску и получению активных продуцентов β -маннаказ на кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ получены β -маннаказы различного происхождения, в том числе рекомбинантный фермент.

Способы получения маннозы и манноолигосахаридов запатентованы в основном зарубежными учеными: Yoshikawa (2000), Tanaka (2006), Hiroyuki Kanatani (2009) и другими. Как правило, они основаны на кислотном или ферментативном гидролизе различного растительного сырья и имеют следующие недостатки: малодоступность растительного сырья, невысокий выход конечного продукта, низкая экологичность, дорогостоящие способы очистки конечного продукта. В связи с этим разработка биотехнологии как отдельно маннозы, так и маннозосодержащих гидролизатов, содержащих маннозу и манноолигосахариды различного состава, является актуальной задачей. К тому же, промышленное производство маннозы отсутствует как у нас в стране, так и за рубежом.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы заключалась в разработке биотехнологии маннозы и маннозосодержащих гидролизатов, исследовании их пребиотических свойств в опытах *in vitro* и *in vivo*, а также влияния маннозы на факторы неспецифического иммунитета опытных животных.

Для достижения поставленной цели были сформулированы **следующие задачи:**

- подбор источников маннанов из растительного сырья;
- выбор ферментного препарата для получения маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья;
- разработка лабораторного регламента получения маннозосодержащих гидролизатов;

- исследование пребиотических свойств маннозы *in vitro* и *in vivo*;
- изучение влияния маннозы на факторы неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей;
- исследование пребиотической активности маннозосодержащих гидролизатов в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна. Установлены оптимальные условия гидролиза глюкоманнана древесных опилок β -маннаназой *B. subtilis*, обеспечивающие степень гидролиза глюкоманнана 88 %, и определен качественный и количественный состав полученных маннозосодержащих гидролизатов. Установлено, что маннозосодержащие гидролизаты стимулировали развитие *B. bifidum* в большей степени, чем манноза и не уступали по действию известному коммерческому пребиотику инулину. Показана способность манноолигосахаридов различной степени полимеризации к нормализации микрофлоры ЖКТ цыплят-бройлеров с экспериментальным дисбиозом.

Практическая значимость. Разработана биотехнология маннозы и маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья. Выявленная способность маннозосодержащих гидролизатов индуцировать экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов свидетельствует об их иммуностимулирующих свойствах и говорит о перспективах использования гидролизатов в качестве иммуностимуляторов. Восстановление состава и численности основных представителей индигенной кишечной микрофлоры при введении в основной рацион цыплят-бройлеров с антибиотикоассоциированным дисбиозом маннозосодержащих гидролизатов свидетельствует о перспективах их применения для коррекции микробиоценоза ЖКТ цыплят. Маннозосодержащие гидролизаты представляют интерес для пищевой и кормовой промышленности для получения функциональных продуктов и кормовых добавок с иммуностимулирующим и пребиотическим действием.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на отчетных научных конференциях преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ (г. Воронеж, 2015-2017 гг.); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (г. Ялта, 2016).

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликовано 8 работ, в том числе 4 в журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов (2 главы), заключения, выводов, списка использованных источников, приложений и представлена на 116 страницах машинописного текста. Иллюстративный материал включает 25 рисунков и 40 таблиц. Библиография включает 111 наименований, в т. ч. 75 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы и определены основные направления исследования.

ГЛАВА I. Ферментативная деструкция маннанных растительного сырья и биологические свойства маннозы. Представлен обзор литературных данных по теме исследований. Рассмотрены различные продуценты β -маннаназ, физико-химические свойства продуцируемых ферментов. Проанализированы способы получения маннозы, отмечена перспективность ферментативного гидролиза. Представлена характеристика биологических функций маннозы и манноолигосахаридов – продуктов деструкции маннанных. Охарактеризована микрофлора желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы, показана возможность ее коррекции при применении веществ пребиотического действия.

ГЛАВА II. Объекты и методы исследований. Объектами исследования служили: спиртоосажденные ферментные препараты: β -маннаназы *Trichoderma harzianum* F114 и рекомбинантная β -маннаназы *Bacillus subtilis*; бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum* – коммерческий препарат «Бифидумбактерин»; лабораторные мыши массой 14-16 г, полученные из филиала института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; цыплята-бройлеры кросса "Смена-2" 11-суточного возраста массой 220-230 г.

За единицу активности β -маннаназы принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль маннансодержащего субстрата за 1 мин в стандартных условиях. Количество редуцирующих сахаров в гидролизате определяли методом Сомоджи-Нельсона.

Определение степени гидролиза маннанных. Для определения степени гидролиза маннанных реакцию смесь, состоящую из 200 мкл 1 % раствора субстрата в соответствующем буфере и 100 мкл фермента, инкубировали при оптимальной температуре в течение 5 часов. Через каждый час в реакционной смеси определяли редуцирующие сахара, используя при этом калибровочную кривую, построенную по стандартным растворам маннозы. По количеству образовавшихся восстанавливающих сахаров рассчитывали степень гидролиза субстрата.

Определение качественного и количественного состава маннозосодержащих гидролизатов проводили методом тонкослойной хроматографии. Для идентификации сахаров в качестве стандартов использовали маннозу и манноолигосахариды (степень полимеризации от 2 до 6) фирмы «Megazyme» (Ирландия). Количественное определение углеводов проводили на сканирующем денситометре CAMAG TLC Scanner 3 (Швейцария) при длине волны 420 нм. Для количественной обработки полученных результатов использовали программное обеспечение WinCATS.

Исследование пребиотической активности маннозы и маннозосодержащих гидролизатов *in vitro* проводили при культивировании бактерий *Bifidobacterium bifidum* на средах с этими углеводами в сравнении с инулином, глюкозой, трегаллозой, фруктозой. Выращивание бифидобактерий проводили в анаэробных условиях при температуре 37 °С на среде Блаурокка в модификации Г.И. Гончаровой. Накопление биомассы бифидобактерий оценивали по

оптической плотности суспензии бактерий при длине волны 590 нм, биохимическую активность *B. bifidum* - по изменению активной кислотности среды. Для исследования влияния маннозы на рост и развитие культуры бифидобактерий в присутствии антибиотика проводили культивирование бифидобактерий на средах с различными углеводами с добавлением антибиотика азитромицина, дозу которого рассчитывали, исходя из рекомендаций по его применению.

Исследование пребиотических свойств маннозы *in vivo* на мышях проводили путем перорального введения мышам возрастающих доз маннозы (1, 2 и 4 мг) и при совместном применении маннозы в этих дозировках с коммерческими пробиотиками «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин» на фоне экспериментального дисбиоза. Выбранные дозировки маннозы и количество пребиотических препаратов рассчитаны на массу мышей, исходя из рекомендуемой нормы потребления пребиотиков и пробиотиков для человека в день. Для создания экспериментального дисбиоза белым беспородным мышам проводили деконтаминацию нормальной микрофлоры с помощью антибиотика доксицилина гидрохлорида. Исследование микрофлоры кишечника экспериментальных животных проводили по общепринятой методике по 3 пробам фекальных масс от 5 мышей.

Изучение влияния маннозы на факторы неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей проводили при его коррекции маннозой и ее сочетаний с пребиотическими препаратами. Уровни цитокинов (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-g) в сыворотках крови животных определяли с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем производства «Bio-Source», Бельгия. Для определения уровня фактора некроза опухоли TNF-a (ФНО-a) использовали коммерческий набор ОртЕIА™ ELISA Kit, USA. Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов проводили в цитохимическом тесте восстановления нитросинего тетразолия и с помощью люминолзависимой хемиллюминесценции.

Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов *in vivo* на цыплятах проводили в условиях экспериментальной базы ОАО «ВНИИКП» (г. Воронеж). У цыплят опытных групп индуцировали экспериментальный дисбиоз путем введения в течение 2-х дней в корм антибиотика гентамицина в количестве 40 мг на кг живой массы. Цыплята контрольной группы получали обычный рацион без антибиотика. Через день после отмены корма с антибиотиком цыплятам опытных групп вводили в корм маннозосодержащие гидролизаты (0,1 %, 0,5 %, и 1 % к массе корма) в течение 15 дней. Микробиоценоз кишечника цыплят исследовали через 5, 10 и 15 дней применения маннозосодержащих гидролизатов по пробам фекалий 5 цыплят из каждой группы. Состав микрофлоры ЖКТ цыплят определяли по общепринятой методике и рассчитывали количество микроорганизмов в 1 г фекалий (lg КОЕ/г).

Общие биохимические и микробиологические методы исследований. Накопление биомассы клеток определяли нефелометрическим методом при длине волны 590 нм, величину рН - потенциометрически. Микроскопирование микроорганизмов проводили на световом микроскопе Микмед – 1 (ОАО «Ломо»,

Россия). Фотографии получены с использованием цифровой камеры – окуляра DCM-130 (1300K pixels, USB 2), программное обеспечение «ScopePhoto». Подсчет клеток бактерий *B. bifidum* и *E. coli* проводили на фиксированных окрашенных мазках по методу Виноградского-Шульгиной-Брига.

Статистическая обработка результатов. Все определения проводили в трех повторностях. В диссертации обсуждаются средние результаты серии экспериментов, обеспечивающие 95 % точности по статистическим критериям.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА III. Разработка биокаталитической технологии маннозы и манноолигосахаридов из растительного сырья.

Подбор источников маннана из растительного сырья с целью получения маннозосодержащих гидролизатов. Маннаны - полисахариды гемицеллюлозной фракции клеточных стенок растений, состоящие преимущественно из остатков D-маннозы, также в состав могут входить глюкоза и галактоза. Основными критериями при выборе растительного сырья для получения маннозы являлись широкое распространение растения на территории РФ и его низкая стоимость; высокий процент содержания маннана в клеточной стенке растения; состав маннана (соотношение остатков маннозы, галактозы и глюкозы в молекуле маннана). Как видно из таблицы 3.1, наилучшим источником маннана среди растений, произрастающих на территории нашей страны, являются хвойные породы деревьев.

Так, наибольшее количество маннана находится в древесине сосны и ели обыкновенной (12 и 11 % соответственно), однако маннаны древесины ели содержат маннозу и глюкозу в соотношении 3,7:1. Ферментативный гидролиз маннана такой структуры позволит получить высокий выход маннозы. Кроме того, отходы древесного производства являются широко доступными, что значительно удешевит производство маннозы в промышленных масштабах.

Таблица 3.1 - Содержание маннана в некоторых растениях

Растение	Содержание маннана, %	Соотношение моносахаридов в молекуле маннана
Рожковое дерево	35	ГАЛЕ:МАН 1:2
Осина	2	МАН:ГЛЮ 1,7:1
Липа	1,8	МАН:ГЛЮ 2,1:1,1
Вяз	2,2	МАН:ГЛЮ 1,7:1
Ель обыкновенная	11	МАН:ГЛЮ 3,7:1
Сосна	12	МАН:ГЛЮ:ГАЛ 1,7:1:0,26
Кедр сибирский	9,8	МАН:ГЛЮ 3,5:1
Лиственница	10	МАН:ГЛЮ:ГАЛ 11,2:4:1,1
Туга канадская	6,2	МАН:ГЛЮ:ГАЛ 3:1:0,1
Красный клевер (семена)	3,8	МАН:ГЛЮ:ГАЛ 1,1:1:0,25
Гледичия обыкновенная (семена)	4,2	МАН:ГЛЮ 3,2:1,2

Выбор ферментного препарата для гидролиза маннанов растительного сырья. Был исследован процесс гидролиза маннанов древесины ели обыкновенной спиртоосажденными ферментными препаратами β -маннаназы *B. subtilis* и *Tr. harzianum* при оптимальных условиях действия ферментов: pH 7,0 и 35°C и pH 4,5 и 60°C соответственно.

На рис. 1 представлена зависимость степени гидролиза глюкоманнана от дозировки ферментного препарата β -маннаназы *B. subtilis*. Фермент вносили в количестве 5-15 ед/г маннанов. При дозировке фермента 5 ед/г субстрата степень гидролиз составила 60 % за 3 ч. Увеличение количества фермента до 10 ед/г субстрата обеспечивало максимальную степень деструкции глюкоманнана – 88 % за 3 ч гидролиза. Более высокая дозировка фермента и увеличение продолжительности процесса не способствовали значительному

СГ, %

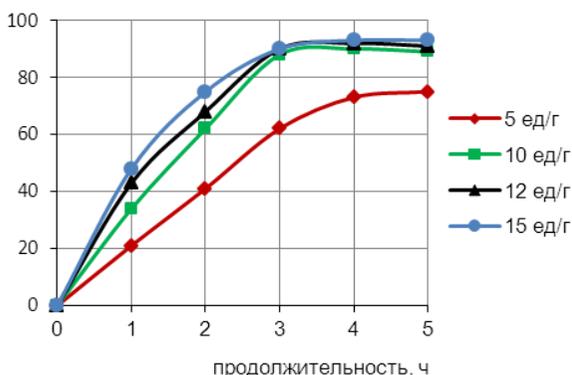


Рисунок 1 - Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β -маннаназы *B. subtilis* (ед/г глюкоманнана) при температуре 35 0С и pH 7,0

СГ, %

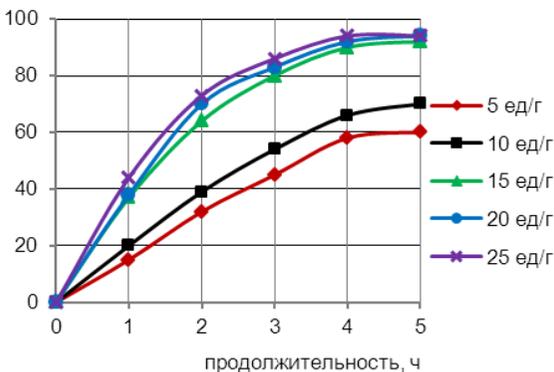


Рисунок 2 - Зависимость степени гидролиза глюкоманнанов от концентрации β -маннаназы *Tr. harzianum* (ед/г глюкоманнанов) при температуре 60 0С и pH 4,5

Динамика ферментативной деструкции маннанов от концентрации ферментного препарата β -маннаназы *Tr. harzianum* представлена на рисунке 2. Ферментный препарат вносили в количестве 5-25 ед/г маннанов. Количество

фермента 5 ед/г субстрата обеспечивало гидролиз на 58 % за 4 ч. При увеличении концентрации фермента до 10 ед/г степень гидролиза за это время составила около 70 %. Дозировка 15 ед/г обеспечивала максимальную степень деструкции маннанов – 90 %. Более высокая концентрация фермента не способствовала значительному увеличению степени гидролиза. увеличению степени гидролиза.

В результате исследований были установлены рациональные параметры процесса гидролиза маннанов ели обыкновенной: для β -маннаназы *B. subtilis* дозировка ферментного препарата 10 ед/г, продолжительность 3 ч; для β -маннаназы *Tr. harzianum* - дозировка ферментного препарата 15 ед/г, продолжительность 4 ч.

Известно, что маннозосодержащие гидролизаты обладают пребиотическими свойствами, поэтому была исследована их способность стимулировать развитие бифидобактерий. Изученные гидролизаты обладали выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий на протяжении всего процесса культивирования, сопоставимой с активностью признанного пребиотика – инулина, и не уступали чистой маннозе (рисунок 3). Однако гидролизаты, полученные при гидролизе глюкоманнана под действием β -маннаназы *B. subtilis*, обладали более выраженной пребиотической активностью по сравнению с продуктами гидролиза β -маннаназы *Tr. harzianum*.

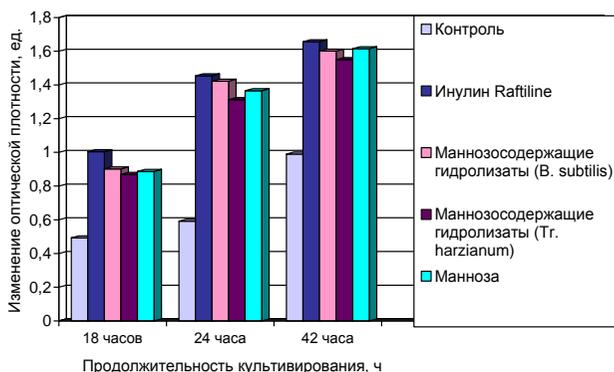


Рисунок 3 - Накопление биомассы бифидобактерий при культивировании на средах с маннозосодержащими гидролизатами, полученными при гидролизе β -маннаназы *B. subtilis* и *Tr. harzianum*

Учитывая высокую каталитическую активность рекомбинантной β -маннаназы *B. subtilis* и более выраженную способность полученных под действием этого фермента маннозосодержащих гидролизатов стимулировать рост бифидобактерий, целесообразно для получения маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья использовать β -маннаназу *B. subtilis*.

Хроматографический анализ маннозосодержащих гидролизатов, полученных при оптимальных условиях гидролиза β -маннаназой *B. subtilis*, показал наличие в

составе гидролизатов маннозы, маннотриозы, маннотетрозы, маннопентозы в количестве, мг/л: 33, 48, 32, и 13 соответственно (рисунок 4).

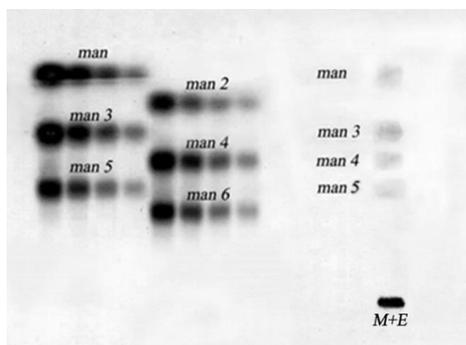


Рисунок 4 - Хроматограмма маннозосодержащих гидролизатов: стандарты в количестве 500, 250, 150 и 75 мг/л: man – манноза, man 2 – маннобиоза, man 3 – маннотриоза, man 4 – маннотетроза, man 5 – маннопентоза, man 6 – манногексоза; M+E – маннозосодержащие гидролизаты

Сравнительная характеристика способности маннозы и маннозосодержащих гидролизатов стимулировать развитие бифидобактерий на средах с этими углеводами показала, что бифидогенная активность маннозосодержащих гидролизатов не уступает маннозе. Учитывая более высокую стоимость получения чистой маннозы по сравнению с гидролизатами, дальнейшие исследования экономически целесообразно проводить с маннозосодержащими гидролизатами.

Установленные рациональные параметры процесса гидролиза глюкоманнанов древесины ели обыкновенной послужили основой для разработки лабораторного регламента получения маннозосодержащих гидролизатов.

ГЛАВА IV. Исследование биологических свойств маннозы и маннозосодержащих гидролизатов

Исследование пребиотических свойств маннозы *in vitro*.

Пребиотические свойства маннозы оценивали по росту и развитию бифидобактерий *B. bifidum* в сравнении с другими углеводами: глюкоза, фруктоза, инулин из плодов топинамбура, трегаллоза. Данные по динамике роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами показали, что микроорганизмы способны к росту на всех вариантах сред (рисунок 5).

Максимальное накопление биомассы наблюдалось к 48 ч культивирования бактерий. Наилучшие показатели роста бифидобактерий обеспечивали такие углеводы, как манноза и глюкоза. Интенсивность метаболических процессов у бифидобактерий оценивали по изменению pH среды в процессе культивирования, которое показывает степень преобразования сахаров в органические кислоты, как конечные продукты метаболизма. Показано, что изменение pH питательных сред коррелировало с ростом и развитием бифидобактерий на этих средах (рисунок 6).

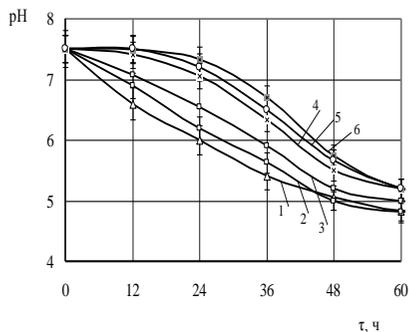
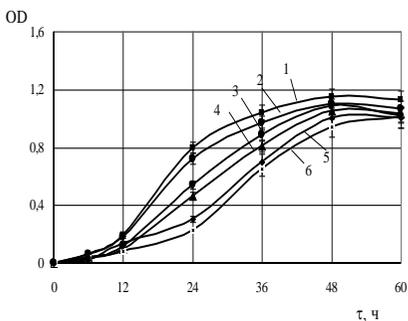


Рисунок 5 - Динамика роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами: 1-манноза, 2-глюкоза, 3-фруктоза, 4-инулин из плодов топинамбура, 5-трегаллоза, 6-контроль; OD-показатель оптической плотности

Рисунок 6 - Динамика изменения pH сред с различными углеводами при культивировании на них *B. bifidum*: 1-манноза, 2-глюкоза, 3-фруктоза, 4-инулин из плодов топинамбура, 5-трегаллоза, 6-контроль

Было изучено влияние антибиотика азитромицина на развитие и рост культуры *B. bifidum* на средах с различными сахарами. Как показали исследования, бифидобактерии сохраняли свои морфологические свойства на средах с маннозой, глюкозой и фруктозой. Однако количество их на среде с маннозой превышало этот показатель в двух других образцах. Полученные результаты позволяют предположить, что манноза повышает резистентность бифидобактерий в присутствии антибиотика.

Исследование пребиотических свойств маннозы в опытах *in vivo* на мышях. Пребиотические свойства маннозы изучали в сравнении с коммерческими пробиотиками «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин» на фоне экспериментального дисбиоза, который характеризовался элиминацией нормальной микрофлоры и контаминацией кишечника опытных животных условно-патогенной микрофлорой. Так среднее количество *Escherichia coli* в фекалиях повышалось до 10^8 КОЕ/г, *Bifidobacterium bifidum* не обнаруживались при посеве совсем, а содержание *Lactobacillus acidophilus* снижалось до 10^3 КОЕ/г (таблица 4.1).

Таблица 4.1 - Сравнительная оценка микрофлоры опытных партий мышей

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/г фекалий		
	норма	мыши из питомника	мыши с дисбиозом
<i>E. coli lac</i> ⁺	10^5-10^6	10^6	10^8
<i>Bifidobacterium spp.</i>	менее 10^3	10^3	не обнаружены
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{10}	10^3

Разовое пероральное введение в рацион мышей моносахарида маннозы в возрастающих ее концентрациях от 0,01 до 0,04 % показало, что применение маннозы в дозировке 0,02 % от массы тела опытных мышей в условиях экспериментального

дисбиоза приводило к увеличению количества бифидобактерий и стимулировало рост молочнокислых бактерий.

Результаты исследования микробиоценоза мышей при введении в суточный рацион питания маннозы в количестве 0,02 % от массы тела опытных мышей и пробиотических препаратов «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин» представлены в таблице 4.2.

Применение маннозы в количестве 0,02 % от массы тела опытных мышей приводило к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий в условиях экспериментального дисбиоза уже на 5 сутки после начала введения, что свидетельствует о ее пребиотическом действии. Манноза оказывала такое же действие на восстановление микрофлоры мышей на фоне индуцированного дисбиоза, как и коммерческие пробиотические препараты «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин».

Таблица 4.2 - Влияние маннозы и пробиотиков на микрофлору мышей на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/г фекалий при внесении в рацион		
	маннозы	бифидумбактерина	лактобактерина
контрольное время – 5 суток			
<i>E.coli lac⁺</i>	10^7	10^6	10^5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}
контрольное время – 10 суток			
<i>E.coli lac⁺</i>	10^7	10^7	10^6
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{11}	10^{11}
контрольное время – 15 суток			
<i>E.coli lac⁺</i>	10^6	10^7	10^6
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{10}	10^{11}

Изучение факторов неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей. Функциональная активность фагоцитов является показателем состояния нормальной микрофлоры ЖКТ животных. Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов лабораторных мышей при коррекции экспериментального дисбиоза маннозой в количестве 2 мг и ее композициями с пробиотическими препаратами представлена в таблице 4.3.

У животных, получавших только маннозу и маннозу с «Лактобактерином», показатель фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов соответствовал здоровым животным, в то время как применение маннозы с «Бифидумбактерином» не изменяло показатель фагоцитарной активности, который соответствовал уровню животных с экспериментальным дисбиозом.

Таблица 4.3 - Показатели фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов при коррекции экспериментального дисбиоза маннозой и ее композициями с пробиотическими препаратами

Группы животных	Фагоцитарное число (ФЧ)
Контроль 1 - Здоровые животные	6,6±0,5
Контроль 2 - Животные с экспериментальным дисбиозом	5,6±0,4
Опытная 1- Животные, получавшие маннозу	7,3±0,6
Опытная 2- Животные, получавшие маннозу и «Бифидумбактерин»	5,8±0,1
Опытная 3 - Животные, получавшие маннозу и «Лактобактерин»	6,6±0,7

Исследование уровня цитокинов у здоровых мышей, у мышей с экспериментальным дисбиозом, а также при его коррекции показало, что при пероральном введении маннозы и ее сочетаний с пробиотиками наблюдалось выраженное повышение содержания противовоспалительного цитокина IL-10 относительно интактных животных и животных с экспериментальным дисбиозом (рисунок 7). Также отмечалось повышение содержания интерлейкина IL-1b через 8 часов, интерлейкина IL-6 через 12 часов, интерлейкинов IL-4 и IL-12 через 12 часов после введения препаратов.

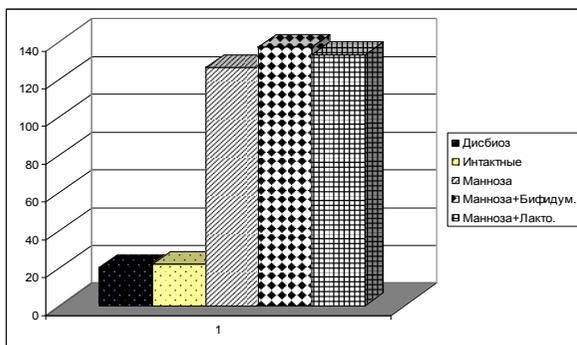


Рисунок 7 - Уровень цитокина IL-10 (pg/ml) при экспериментальном дисбиозе и его коррекции

Ключевым провоспалительным медиатором системного действия является фактор некроза опухоли TNF, содержание которого в сыворотке крови при экспериментальном дисбиозе и его коррекции маннозой и маннозой совместно с пробиотиками представлено рисунке 8. У мышей с экспериментальным дисбиозом наблюдалось трехкратное превышение концентрации фактора некроза опухоли TNF относительно здоровых животных. Выбранные препараты способствовали снижению уровня провоспалительного фактора некроза опухоли и коррекции экспериментального дисбиоза. Способность маннозы индуцировать экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов свидетельствует об иммуностимулирующих свойствах маннозы.

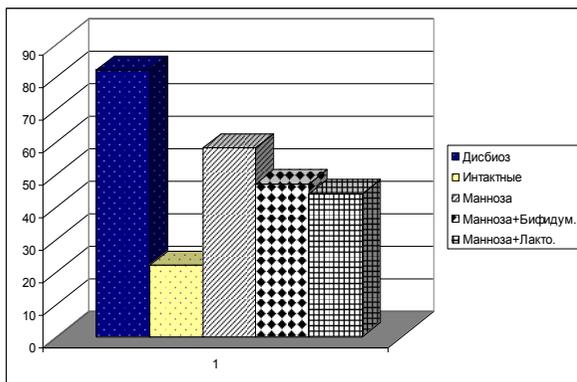


Рисунок 8 - Уровень фактора некроза опухоли (TNF-а) (pg/ml) при экспериментальном дисбиозе и его коррекции

Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов в опытах *in vivo* на цыплятах. Исследование пребиотической активности маннозосодержащих гидролизатов проводили на фоне индуцированного дисбиоза у опытной группы цыплят. Нормальная микрофлора ЖКТ сельскохозяйственных птиц, как известно, включает следующие микроорганизмы: *Bacteroides*, *Esherichia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*. В таблице 4.4 представлен качественный и количественный состав наиболее важных представителей микрофлоры ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе.

Таблица 4.4 - Сравнительная характеристика микрофлоры ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г фекалий	
	цыплята опытной группы с дисбиозом	цыплята интактной группы
<i>E. coli lac+</i>	5,2±0,3	6,8±0,1
Сальмонеллы	3,1±0,4	2,7±0,2
Дрожжи	3,6±0,2	3,9±0,2
Стафилококки	2,4±0,3	5,0±0,3
Энтерококки	4,8±0,3	6,7±0,1
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,8±0,2	9,7±0,2
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,1±0,2	7,8±0,1

После внесения в корм антибиотика выявлено статистически достоверное уменьшение количества основных представителей кишечной микрофлоры, что свидетельствовало о наличии дисбиоза.

При введении в корм цыплятам с экспериментальным дисбиозом маннозосодержащих гидролизатов наиболее значимые изменения количественного состава представителей ЖКТ цыплят происходили за счет восстановления бифидо- и лактобактерий, при этом наблюдались незначительные колебания популяционного уровня сальмонелл, энтерококков, стафилококков и дрожжевой микрофлоры.

Применение маннозосодержащих гидролизатов во всех испытанных дозах приводило к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий уже на 5 сутки, а полное восстановление их популяций наблюдалось на 10 сутки при внесении добавки в количестве 1 % к массе корма. Внесение в рацион цыплят маннозосодержащих гидролизатов (1 % к массе корма) в течение 15 дней практически не изменяло указанных показателей, однако снижало количество бактерий группы кишечной палочки до $6,6 \pm 0,2$ lg КОЕ/г фекалий.

Расчет себестоимости маннозосодержащих гидролизатов по предлагаемой технологии. Для оценки конкурентоспособности предлагаемой технологии был произведен расчет себестоимости 1 г маннозосодержащих гидролизатов из древесных опилок. Себестоимость маннозосодержащих гидролизатов при их производстве по предлагаемой технологии составляет не более 16 рублей за 1 г.

ВЫВОДЫ

1. Перспективным источником растительного сырья для получения маннозы и манноолигосахаридов является ель обыкновенная, содержание маннанов в древесине которой составляет 11 %; при этом в состав маннанов входят остатки маннозы и глюкозы в соотношении 3,7 : 1.

2. Для получения маннозы и манноолигосахаридов из глюкоманнана древесных опилок целесообразно использовать β -маннаназу *B. subtilis* 168, обеспечивающую максимальную степень деструкции глюкоманнана 88% при оптимальных температуре и pH и дозировке фермента 10 ед/г субстрата, продолжительности гидролиза 3 ч; в гидролизатах обнаружена манноза, маннотриоза, маннотетроза, маннопентоза.

3. Маннозосодержащие гидролизаты стимулировали развитие *B. bifidum* в большей степени, чем манноза и не уступали по действию известному коммерческому пребиотику – инулину (Raftiline).

4. Применение маннозы в дозировке 2 мг в условиях экспериментального дисбиоза способствовало увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий в содержимом кишечника опытных мышей, что свидетельствует о пребиотическом действии маннозы.

5. При коррекции экспериментального дисбиоза маннозой и ее сочетаний с пробиотиками уровень провоспалительного фактора некроза опухоли достоверно снижался, и наблюдалось выраженное повышение содержания противовоспалительного интерлейкина IL-10, что свидетельствует об иммуностимулирующих свойствах маннозы.

6. Внесение маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1 % к массе корма при экспериментальном дисбиозе у цыплят обеспечивало полное восстановление популяций бифидобактерий и лактобактерий за 10 суток, что показывает возможность применения маннозосодержащих гидролизатов для коррекции микробиоценоза ЖКТ цыплят.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Раdif З.Х., Анохина Е.П., Синюкова Ю.П., Корнеева О.С. Ферментативная деструкция маннанов растительного сырья: выбор ферментного препарата и исследование бифидогенной активности гидролизатов // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 3. С. 199-204.

2. Раdif З.Х.Р., Анохина Е.П., Корнеева О.С. Выбор ферментного препарата для получения маннозосодержащих гидролизатов с пребиотической активностью // Вестник ВГУИТ. - 2017. - Т. 79. № 3. - С. 159–163. doi:10.20914/2310-1202-2017-3-159-163.

3. Investigation of the prebiotic properties of mannose-containing hydrolysates / E. P. Anokhina, G. P. Shuvaeva, Z. K. Radif and O. S. Korneeva // International Journal of Probiotics and Prebiotics. – 2016. - Vol. 11. - № ¾. - P. 137-140.

4. Разработка биотехнологий гликозидаз и исследование их физико-химических свойств с целью применения в отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности / О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, З.Х.Р. Раdif // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. - 2014. - № 2. - С. 69-73.

Материалы конференций

5. Раdif З.К., Анохина Е.П., Корнеева О.С. Исследование состава гидролизатов при расщеплении маннанов β-маннаназами различного происхождения // Материалы IV международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. - 2016. - № 3 - С. 75.

6. Свиридова Т.В., Зияд Калоф, Корнеева О.С. Переработка нетрадиционного растительного сырья путем микробного синтеза // Материалы LIV отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2015 год. Ч.1. – Воронеж: ВГУИТ, 2016. – С. 131.

7. Раdif З.Х., Корнеева О.С. Ферментативный способ переработки трудногидролизующих растительных полисахаридов // Материалы LIII отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2014 год, посвященной 85-летию ВГУИТ. Ч.1. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. - С. 160.

8. Раdif З.Х., Анохина Е.П., Корнеева О.С. Биотехнология маннозы и манноолигосахаридов из растительного сырья и исследование их биологических свойств // Материалы LV отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2016 год. Ч.1. – Воронеж: ВГУИТ, 2017. - С. 102.

Подписано в печать Формат 60 x 84 1/16

Усл. печ. л. 1,00. Тираж 100 экз. Заказ

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет
инженерных технологий»
(ФГБОУВО «ВГУИТ»)

Отдел полиграфии ФГБОУВО «ВГУИТ»

Адрес университета и отдела полиграфии:

394036, Воронеж, пр. Революции, 19