

ФГБОУ ВО «ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Ради́ф Зея́д Хало́ф Ради́ф

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

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор Корнеева О.С.

Воронеж – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ МАННАНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАННОЗЫ.....	9
1.1 Маннаны растительного сырья	9
1.2 β - Маннаназы микробного происхождения и характеристика их физико-химических свойств.....	14
1.2.1 Продуценты β - маннаназ.....	15
1.2.2 Физико-химические свойства β -маннаназ различного происхождения.....	17
1.3 Способы получения маннозы.....	21
1.4 Характеристика биологических функций маннозы.....	23
1.5 Характеристика микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы и методы ее коррекции.....	27
Заключение.....	32
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	34
2.1 Объекты исследований.....	34
2.2 Определение активности ферментного препарата.....	34
2.2.1 Определение активности β -маннаназы.....	34
2.3 Определение степени гидролиза маннанов.....	35
2.4 Качественный и количественный анализ продуктов гидролиза маннанов.....	36
2.5 Исследование пребиотических свойств маннозы и маннозосодержащих гидролизатов <i>in vitro</i>	37
2.6 Исследование пребиотических свойств маннозы <i>in vivo</i> на мышах....	38
2.7 Влияние маннозы на факторы неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей.....	39

2.8 Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов <i>in vivo</i> на цыплятах.....	39
2.9 Общие микробиологические методы исследования.....	40
2.10 Статистическая обработка данных.....	41
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МАННОЗЫ И МАННООЛИГОСАХАРИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	42
3.1 Подбор источников маннанов из растительного сырья с целью получения маннозосодержащих гидролизатов.....	42
3.2 Выбор ферментного препарата для гидролиза маннанов растительного сырья.....	43
3.3 Разработка лабораторного регламента получения маннозы и маннозосодержащих гидролизатов.....	49
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАННОЗЫ И МАННОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТОВ.....	53
4.1 Исследование пребиотических свойств маннозы <i>in vitro</i>	53
4.1.1 Исследование влияния маннозы на рост и развитие бифидобактерий в сравнении с другими углеводами.....	53
4.1.2 Исследование влияния маннозы на выживаемость клеток <i>B. bifidum</i> на фоне антибиотика.....	57
4.1.3 Изучение типа взаимодействий <i>B. bifidum</i> с <i>E. coli</i>	58
4.2 Исследование пребиотических свойств маннозы в опытах <i>in vivo</i> на мышах.....	59
4.2.1 Микрофлора ЖКТ интактных мышей и мышей с дисбиозом...	59
4.2.2 Оценка микрофлоры ЖКТ мышей в группе «Бифидумбактерин» с маннозой.....	61
4.2.3 Оценка микрофлоры ЖКТ мышей в группе «Лактобактерин» с маннозой.....	68

4.2.4 Оценка микрофлоры ЖКТ мышей, получавших маннозу в качестве монопрепарата	74
4.3 Изучение факторов неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей.....	81
4.4 Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов в опытах <i>in vivo</i> на цыплятах.....	85
4.4.1 Микрофлора ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе.....	85
4.4.2 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,1 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом.....	86
4.4.3 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом.....	89
4.4.4 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом.....	91
РАСЧЕТ СЕБЕСТОИМОСТИ МАННОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПО ПРЕДЛАГАЕМОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
ВЫВОДЫ.....	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. Недостаток этого углевода в крови приводит к аномальному гликозилированию иммуноглобулинов с нарушенной структурой углеводной части, и также нарушению синтеза других гликопротеидов [2]. Современные научные данные свидетельствуют о том, что введение 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 -маннаназы. В настоящее время на рынке представлены коммерческие ферментные препараты β -маннаназ зарубежного производства. В рамках современных исследований по поиску и получению активных продуцентов β -маннаназ на кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ получены β -маннаназы различного происхождения, в том числе рекомбинантный фермент.

В связи с вышесказанным, разработка биотехнологии как отдельно маннозы, так и маннозосодержащих гидролизатов, содержащих маннозу и

манноолигосахариды различного состава, является актуальной. К тому же промышленное производство маннозы отсутствует как у нас в стране, так и за рубежом.

Цель диссертационной работы - разработка биотехнологии маннозы и маннозосодержащих гидролизатов, исследование 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:

- разработана биотехнология маннозосодержащих гидролизатов из древесных опилок;
- установлены оптимальные условия гидролиза глюкоманнана древесных опилок под действием β -маннаназы *B. subtilis*, обеспечивающие степень гидролиза глюкоманнана 88 %, и определен качественный и количественный состав полученных маннозосодержащих гидролизатов;

- впервые 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, основанная на ферментативном гидролизе глюкоманнанов древесных опилок β -манназой. Установленная 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 7 работ, в том числе 3 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.

ГЛАВА 1. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ МАННАНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАННОЗЫ

1.1 Маннаны растительного сырья

Растительное сырье имеет сложный химический состав и строение. В последние годы полисахариды клеточных стенок растений, представленные в основном гемицеллюлозой и целлюлозой, рассматривают в качестве источника моно- и олигосахаридов, которые могут быть получены при их ферментативном или кислотном расщеплении [3]. К гемицеллюлозам относятся маннаны - полисахариды, основная цепь которых состоит из остатков D-маннозы.

Маннаны существуют в природе в четырех основных формах. Маннан и глюкоманнан имеют линейную структуру. Маннан состоит только из остатков маннозы, а глюкоманнан образован чередующимися остатками глюкозы и маннозы. Галактоманнан состоит из остатков маннозы в основной цепи и остатков галактозы в качестве боковых групп. Галактоглюкоманнан содержит в основной цепи остатки маннозы и глюкозы, в боковой - остатки галактозы (рисунок 1.1).

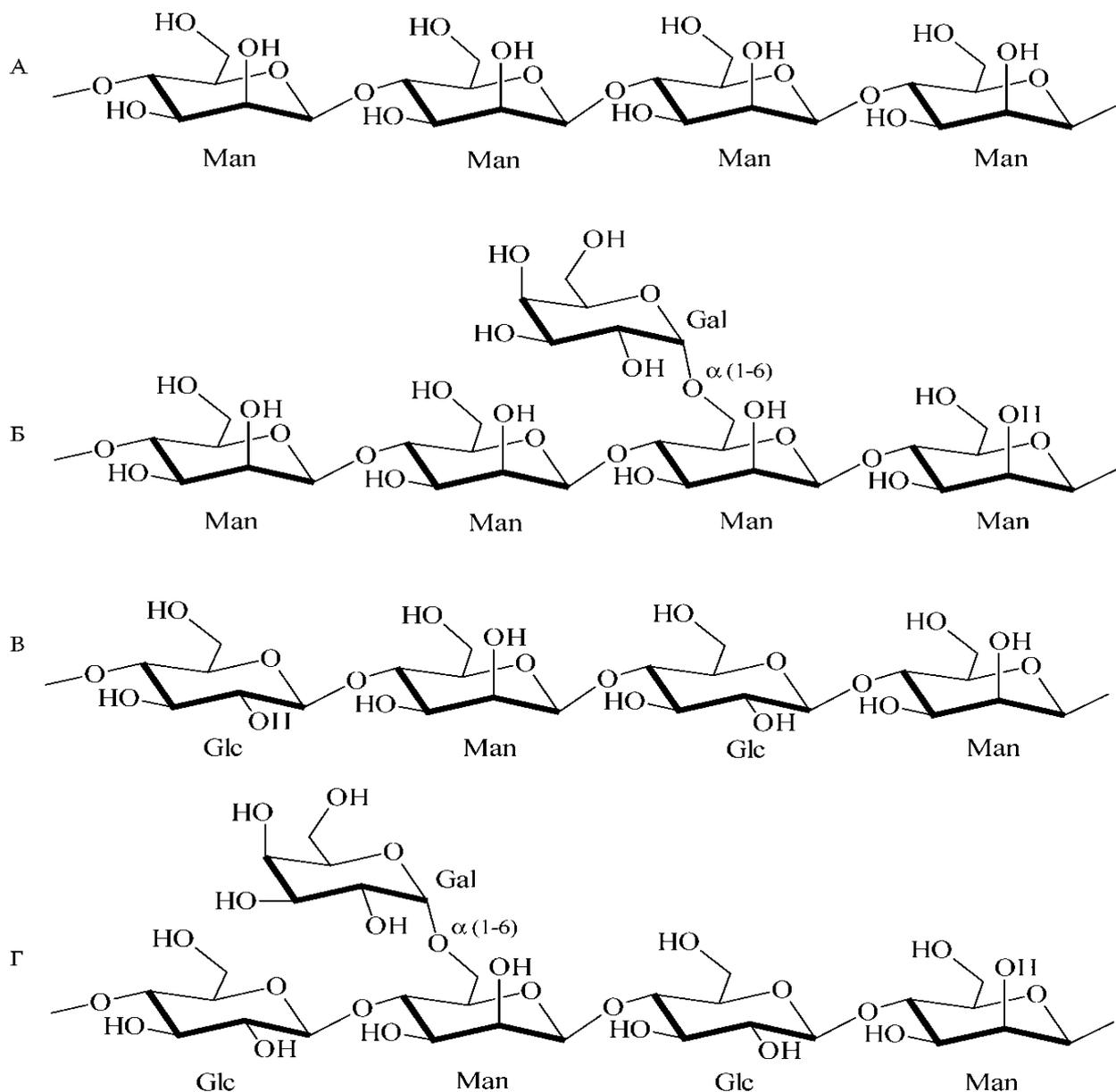


Рисунок 1.1 - Структура различных видов маннанов: А – маннан, Б – галактоманнан, В – глюкоманнан, Г – галактоглюкоманнан

В основном в молекуле маннанов остатки сахаров в основной цепи соединены между собой β -1,4-гликозидными связями, а боковые заместители с основной цепью – α -1,6-связями, однако существуют и другие структуры.

Маннаны линейной структуры являются гомополисахаридами, образованными β -D-маннопиранозными остатками, связанными между собой

1,4 связями. Они присутствуют в зеленых кофейных бобах, в красных и зеленых морских водорослях [4].

Маннаны, входящие в состав клеточной стенки дрожжей, также являются гомополисахаридами, но представляют собой разветвленный полимер (рисунок 1.2). Молекула маннана дрожжей построена из остатков α -D-маннопираноз, соединенных в основной цепи α -1 \rightarrow 6-гликозидными связями. Практически все звенья главной цепи замещены во 2-ом положении остатками α -D-маннопираноз α -1 \rightarrow 2-связями [5].

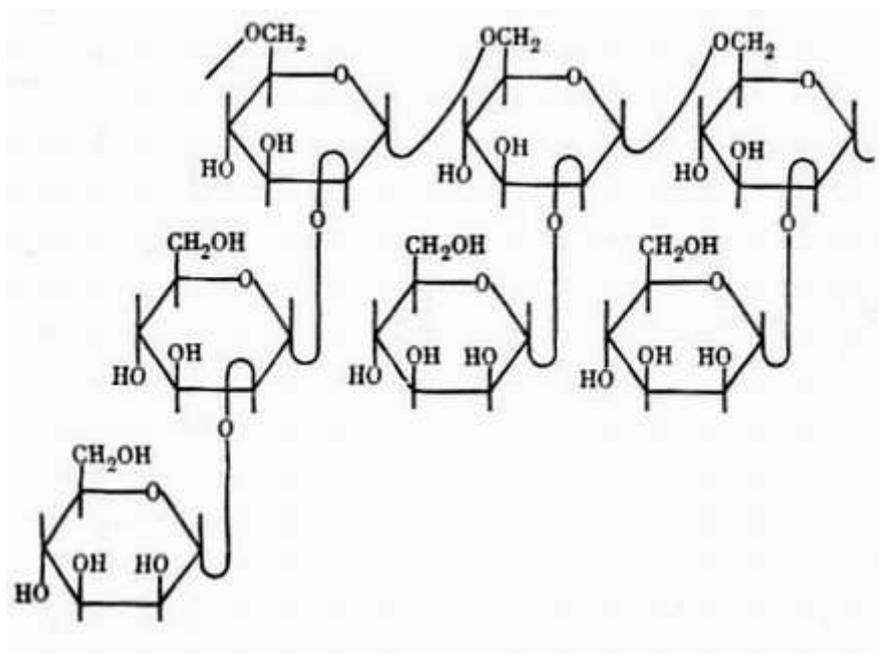


Рисунок 1.2 - Структура маннана, выделенного из дрожжей

В составе лиственной и хвойной древесины, а также луковицах лилейных найдены глюкоманнаны. Они состоят из беспорядочно расположенных и β -1,4-связанных D-маннозных и D-глюкозных остатков. Их взаимное расположение различно и нерегулярно. Иногда встречаются слаборазветвленные полимеры. Точками ветвления в них преимущественно являются глюкозные остатки, в редких случаях - маннозные звенья, однако характер связи в точках ветвления не установлен [4].

В мягкой древесине содержатся глюкоманнаны с соотношением остатков маннозы и глюкозы 3 : 1. В древесине твердых пород преобладают полисахариды с соотношением маннозы и глюкозы 1.5-2 : 1 [4].

В хвойной древесине содержание глюкоманнанов составляет около 11%, в составе гемицеллюлоз покрытосеменных растений - всего 3-5 % [6].

Глюкоманнаны присутствуют также в клубнях, корнях и луковицах растений. В клубнях *Amorphophallus konjac* содержится глюкоманнан, известный как «коньяк-маннан». Он представляет собой полисахарид, содержащий глюкозу и маннозу в отношении 2:3. Этот полимер имеет разветвленное строение, в основной цепи моносахара связаны β -1,4-гликозидными связями, концевыми группами являются как глюкозные, так и маннозные остатки [4]. Глюкоманнан также выделен из корней *Eremurus fuscus* [7], семян *Lupinus varius* [8].

Глюкоманнаны являются хорошими эмульгаторами, используются в фармацевтической практике, после частичного гидролиза могут применяться в качестве кровезаменителей. При исследовании глюкоманнанов на мышах при 10 видах злокачественных опухолей при некоторых из них был обнаружен значительный противоопухолевый эффект [9].

Галактоманнаны в большом количестве обнаружены в растениях, содержание полисахарида в них достигает 30-35%. Они являются резервными углеводами [10]. Галактоманнаны локализованы в основном в клеточных стенках эндоспермальной ткани и играют роль энергетического резерва и регулятора водного баланса семени при прорастании [11].

Галактоманнаны найдены в семенах восьми ботанических семейств, в зоне умеренного климата это цезальпиниевые, мимозовые и бобовые [11]. Галактоманнаны выделены из *Retama raetam* [12], семян *Astragalus falcatus Lam.* [13], семян некоторых представителей рода *Gleditsia* [14], плодов

верблюжьей колючки *Alhagi persarum L.* [15] и некоторых видов лишайников [16].

Галактоманнаны растений имеют следующую структуру: основная цепь состоит из 1,4-связанных β -D-маннопиранозных остатков, боковые ответвления образованы 1,6-связанными α -D-галактопиранозными остатками, присоединенными вдоль основной цепи [13]. Такое строение характерно для большинства изученных галактоманнанов (рисунок 1.3).

Галактоманнаны из различных источников имеют различия в расположении D-галактозных остатков вдоль основной цепи, а также в количестве галактозы [17].

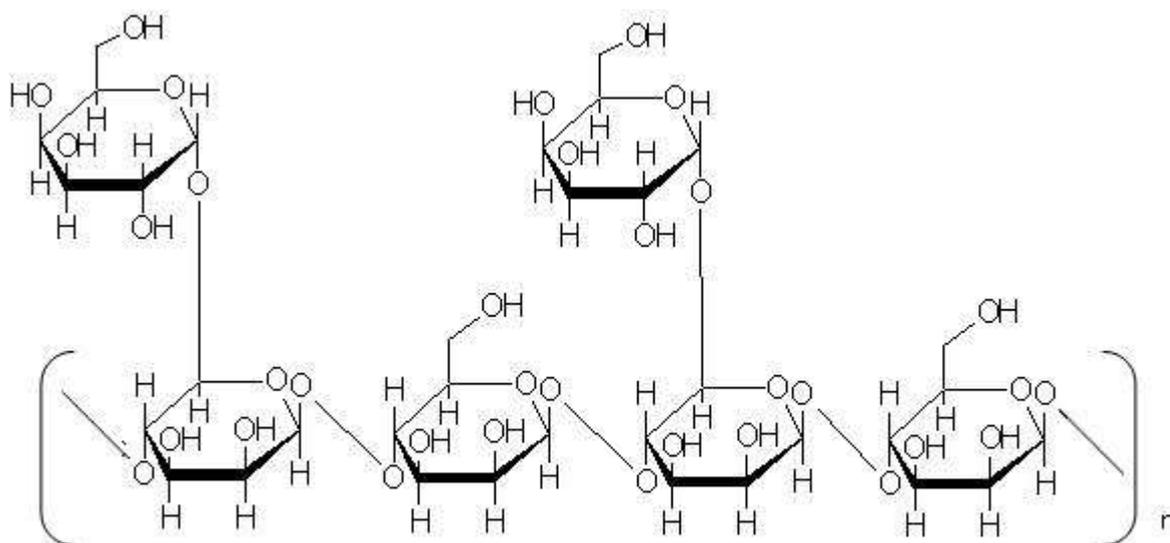


Рисунок 1.3 - Схема строения фрагмента молекулы галактоманнана

Галактоманнаны используют в текстильной, фармацевтической и пищевой промышленности как загустители, стабилизаторы эмульсий. Галактоманнаны являются растворимыми пищевыми волокнами, их рекомендовано включать в рацион лечебного питания. Галактоманнаны применяют в качестве капсулы для «адресной» доставки лекарственных веществ в толстый отдел кишечника [17].

Галактоглоукоманнаны являются основным компонентом гемицеллюлозной фракции мягкой древесины [6, 18]. Этот вид маннанов состоит из β -(1 \rightarrow 4)-D-глюкопиранозных и β -(1 \rightarrow 4)-D-маннопиранозных остатков, к которым присоединены α -(1 \rightarrow 4)-D-галактопиранозные единицы. Часть маннозных единиц частично замещено ацетильными группами у 2 и 3 углеродного атома, в среднем 1 ацетильная группа на 3-4 гексозных единицы. Соотношение маннозных, глюкозных и галактозных единиц в этих полимерах составляет в среднем 3:1:1 [4].

1.2 β - Маннаназы микробного происхождения и характеристика их физико-химических свойств

В расщеплении маннанов различной структуры принимают участие несколько ферментов. В зависимости от механизма гидролитического расщепления маннанов, галактоманнанов и глюкоманнанов они подразделяются на:

1. β -Маннозидаза (К.Ф. 3.2.1.25) (β -D-маннозид манногидролаза) - катализирует отщепление концевых невосстанавливающих β -D-маннозных остатков в β -D-маннозидах;

2. β -Маннаназа (К.Ф. 3.2.1.78) (эндо-1,4- β -маннаназа, 1,4- β -D-маннан маннаногидролаза) - неупорядоченно гидролизует 1,4- β -гликозидные связи в основной цепи молекул различных маннанов;

3. β -Глюкозидаза (К.Ф. 3.2.1.21) (1,4- β -D-глюкозид глюкогидролаза) - катализирует расщепление 1,4- β -гликозидных связей в невосстанавливающих концах олигосахаридов, образованных из глюкоманнанов и галактоглоукоманнанов под действием β -маннаназы;

4. α -Галактозидаза (К.Ф. 3.2.1.22) (мелибиаза, α -D-галактозид галактогидролаза) - гидролизует концевые невосстанавливающие α -галактозные остатки в галактоманнах и галактоглюкоманнах.

Фермент β -маннанза катализирует гидролиз β -1,4-гликозидных связей в молекуле маннанов, что является одним из основных природных способов деградации этих полимеров. Продуктами расщепления маннанов являются манноолигосахариды и манноза, которые усваиваются живым организмом и играют определенную роль в механизмах углеродного обмена.

1.2.1 Продуценты β -маннаназ

β -Маннаназы широко распространены в природе. Они обнаружены не только в микроорганизмах, но и в растениях и животных тканях. Активный энзим найден в созревающих помидорах сорта Walter, а также в семенах на стадии прорастания [19]. Фермент β -маннаназ был обнаружен в пищеварительном тракте моллюска *Littorina brevicula* и жаберной ткани голубой мидии *Mytilus edulis* [20, 21].

Большую группу продуцентов составляют микроорганизмы. Способностью к биосинтезу фермента обладают микроорганизмы различных таксономических групп: микроскопические грибы, дрожжи, бактерии.

Грибные продуценты β -маннаназ представлены в основном микроскопическими грибами рода *Aspergillus* [22, 23], *Penicillium* [24], *Trichoderma* [25], *Sclerotium* [26].

Обширную группу продуцентов β -маннаназ составляют бактерии. Способность к биосинтезу активного фермента обнаружена у штаммов бактерий рода *Bacillus* [27, 28], *Clostridia* [29], *Pseudomonas* [30].

Также β -маннаназу синтезируют актиномицеты *Streptomyces Galbus* [31] и актинобактерии *Cellulomonas fimi* [32].

Способностью синтезировать фермент обладают термофильные бактерии *Thermotoga neapolitana* 5068 [33] и гипертермофильные бактерии *Dictyoglomus thermophilum* [34].

Микроорганизмы – продуценты β -манназа представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Продуценты β -манназа

Продуцент	Литература	Продуцент	Литература
<i>Aspergillus aculeatus</i>	35	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	29
<i>Aspergillus awamori</i>	22	<i>Clostridium tertium</i>	46
<i>Aspergillus fumigatus</i>	36	<i>Clostridium thermocellum</i> F1	47
<i>Aspergillus niger</i>	37	<i>Paenibacillus</i> <i>curdlanolyticus</i>	48
<i>Bacillus circulans</i> K-1	38	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	49
<i>Bacillus</i> sp JAMB-750	39	<i>Penicillium oxalicum</i> SO	24
<i>Bacillus</i> sp. 1633	40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30
<i>Bacillus</i> sp. M50	41	<i>Rhodothermus marinus</i>	50
<i>Bacillus</i> sp. N 16-5	28	<i>Sclerotium rolfsii</i>	51
<i>Bacillus subtilis</i> B36	42	<i>Streptomyces galbus</i>	31
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	43	<i>Streptomyces lividans</i>	52
<i>Bacillus subtilis</i> SA-22	27	<i>Thermotoga neapolitana</i>	33
<i>Bacillus subtilis</i> 168	44	<i>Trichoderma harzanium</i> strain T4	53
<i>Caldibacillus</i> <i>cellulovorans</i>	45	<i>Trichoderma reesei</i>	54
<i>Cellulomonas fimi</i>	32	<i>Vibrio</i> sp.	55

Были проведены патентные исследования по продуцентам β -манназа. В качестве продуцентов манназа запатентованы штаммы мицелиальных грибов *Penicillium funiculosum* [56], *Trichoderma longibrachiatum* [57], *Aspergillus aculeatus* [58], а также бактериальные штаммы рода *Bacillus* – *B.*

amyloliquefaciens, *B. polymyxa* KT551 [59] Недостатком этих штаммов является невысокая активность β -мананназы, поэтому они не нашли широкого практического применения.

В настоящее время актуальным является не только поиск активных природных продуцентов β -мананназ, но и получение рекомбинантных штаммов продуцентов, способных синтезировать высокоактивный фермент. С этой целью предприняты попытки по клонированию маннаназных генов из разных источников и встраиванию их в бактериальные или дрожжевые микроорганизмы [42, 60, 61, 62].

1.2.2 Физико-химические свойства β -маннаназ различного происхождения

Активность ферментов зависит от таких факторов внешней среды, как температура и pH. Для каждого фермента характерны свои оптимальные значения этих факторов. Влияние температуры на активность фермента выражается в возрастании активности при увеличении температуры до определенного значения, при котором действие фермента будет наиболее интенсивным, а по мере дальнейшего повышения температуры происходит снижение активности фермента по причине его денатурации. Зависимость активности фермента от pH наблюдается вследствие амфотерной природы фермента. Молекула фермента содержит большое число функциональных групп, которые в зависимости от pH могут находиться в нескольких ионных формах, но только одна из ионных форм фермента каталитически активна.

Для ферментов из различных источников важными характеристиками являются оптимальные условия (pH и температура) их действия на субстраты, и стабильность работы в условиях, отличных от оптимальных. На активность фермента также влияют различные ионы металлов и соединения, присутствующие в системе во время ферментативной реакции. Выявление активаторов и ингибиторов ферментов является также немаловажным.

Определение субстратной специфичности является одной из главных задач при описании ферментов.

К настоящему времени получено и исследовано большое количество нативных и рекомбинантных β -маннааз. Оптимальные значения температуры и рН для ферментов различного происхождения представлены в таблице 1.2, которые показывают, что микроорганизмы синтезируют β -маннаазу с различными физико-химическими характеристиками.

Таблица 1.2 - Некоторые физико-химические свойства β -маннааз различного происхождения [63]

Микроорганизмы - продуценты β -маннааз	Оптимальные значения	
	рН	температуры, °С
<i>Aspergillus aculeatus</i>	5,0	60-70
<i>Aspergillus awamori</i>	3,0	80
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,5	60
<i>Aspergillus niger</i>	3,0	50
<i>Aspergillus oryzae</i>	6,0	40
<i>Aspergillus terreus</i>	7,5	55
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	8,0-10,0	60
<i>Bacillus AM001</i>	8,5	60-65
<i>Bacillus circulans</i> K-1	6,9	65
<i>Bacillus sp.</i> M50	6,0	50
<i>Bacillus sp.</i> N 16-5	9,5	70
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,5	70
<i>Bacillus subtilis</i>	6,0	55
<i>Bacillus subtilis</i> B36	6,4	50
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	6,2	55
<i>Bacillus subtilis</i> SA -22	6,5	70
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	6,0	85

<i>Clostridium thermocellum</i>	6,5	65
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5,0	50
<i>Rhodothermus marinus</i>	5,4	85
<i>Streptomyces galbus</i>	7,0	35
<i>Streptomyces lividans</i>	6,8	58
<i>Thermotoga maritima</i>	7,0	90
<i>Trichoderma harzianum</i>	4,5	65
<i>Trichoderma reesei</i>	3,5	70
<i>Vibrio sp.</i>	6,5	40

Литературные данные показывают, что различные таксономические группы микроорганизмов синтезируют фермент с различными физико-химическими характеристиками.

Максимальная активность β -маннаназы для большинства ферментов проявляется в диапазоне pH 5,0-7,0. Однако, рядом авторов получены β -маннаназы, у которых оптимальное значение pH менее 4,0 [53, 64]. Встречаются β -маннаназы, обладающие максимальной активностью в слабо щелочной области pH 7,0-8,0 [46], а также получены ферменты с оптимумом pH выше 8,0 [65].

Большинство известных β -маннаназ обладают максимальной активностью при температурах 50-60 °C, но встречаются β -маннаназы с оптимальной температурой действия свыше 80 °C [50].

Ряд работ направлен на исследование стабильности β -маннаназ в широком интервале pH и температуры. В работе [27] исследована стабильность β -маннаназы *Bacillus subtilis* в диапазоне pH 5,0-10,0 при разных температурах. Фермент сохранял активность при температуре 50°C в течение 4 часов, однако при 60°C за тот же период времени остаточная

активность составляла менее 50%, а при 70°C после 3 часов инкубации – менее 25%

β -Маннаназы из *Aspergillus oryzae* сохраняла 75 % активности при температуре 50 °C в течение всего 1 часа, инкубация фермента при 60 °C за тот же период времени приводила к дополнительному снижению активности на 10% [23], в то время как β -маннаназы *Rhodothermus marinus* сохраняла 87 % от максимальной активности при температуре 90 °C за тот же промежуток времени, и проявляла высокую активность при температуре 80 °C в кислой и в нейтральной области pH [50].

Одним из важнейших свойств ферментов является субстратная специфичность – уникальная способность ферментов действовать на строго определенный субстрат. Субстратная специфичность действия ферментов открывает возможности практического использования ферментов в различных областях промышленности.

β -Маннаназы из различных источников отличаются субстратной специфичностью по отношению к строению молекулы маннана. Например, β -маннаназы продуцента *Bacillus subtilis* VM9602 гидролизует глюкоманнан и галактоманнан плодов рожкового дерева и практически не гидролизует галактоманнан гуаровой камеди [66].

Действие различных β -маннаназ на маннаны одного и того же строения отличается скоростью и степенью гидролиза. Важной характеристикой является величина константы Михаэлиса K_M , которая позволяет оценить действие β -маннаназы по отношению к данному субстрату. Константа Михаэлиса характеризует сродство фермента к субстрату.

Для β -маннаназ различного происхождения определены константы Михаэлиса для маннанов различного строения, которые представлены в

таблице 1.3. Также имеются литературные данные о способности β -маннаназы гидролизовать п-нитрофенол- β -D-маннопиранозид [68].

Таблица 1.3 - Константы Михаэлиса β -маннаназ различного происхождения

Продуцент	K _M , мг/мл			Литература
	Галактоманнан гуаровой камеди	Коньяк-глюкоманнан	Галактоманнан камеди рожкового дерева	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	0,3	-	-	68
<i>Bacillus subtilis WY34</i>	11,3	2,4	3,8	69
<i>Bacillus sp.</i>	0,9	7,7	3,8	70
<i>Rhodothermus marinus</i>	3,2	-	1,9	50
<i>Trichoderma harzianum T4</i>	-	-	1.3	53
<i>Thermotoga neapolitana 5068</i>	-	-	0.23	33

Таким образом, β -маннаназы микробного происхождения проявляют специфичность к 1,4- β -гликозидной связи в молекулах различных видов маннанов, поэтому β -маннаназы могут быть использованы в биотехнологии для гидролиза маннана содержащего растительного сырья до маннозы и манноолигосахаридов.

1.3 Способы получения маннозы

Промышленные способы получения маннозы практически отсутствуют как у нас в стране, так и за рубежом.

На сегодняшний день, производство маннозы является дорогим и технологически сложным процессом, основанным на кислотном или ферментативном гидролизе растительного сырья.

Маннозу обычно получают гидролитическим расщеплением маннанов, содержащихся в кокосовой муке, гуаровой камеди, плодах рожкового дерева и других растительных продуктах.

Запатентованный «Способ получения моносахаров и их смесей» авторов Чепурного И.П. и Марченко А.И. предусматривает гидролиз измельченного углеводсодержащего сырья серной кислотой при температуре 95-135 °С в течение длительного времени. Способ не предусматривает получение отдельно маннозы [71].

Известен способ получения маннозы из семян растения рода гледичия, который предусматривает их измельчение, кислотный гидролиз измельченной массы, выделение маннозы из раствора с помощью анилина и дальнейшую длительную очистку маннозы [72].

В обоих случаях использовался кислотный гидролиз, требующий длительной очистки полученного продукта и не позволяющий получить маннозу той степени чистоты, которая позволила бы использовать ее в пищевой и фармацевтической промышленности.

Применение высокоактивных ферментов, расщепляющих маннаны растительного сырья до простых сахаров, позволяет заменить кислотный гидролиз растительного сырья на ферментативный. При использовании ферментативного гидролиза удастся повысить выход конечного продукта и сделать производство более рентабельным и экологически безопасным.

Инновации в производстве маннозы касаются, в основном, биотехнологических разработок в области новых ферментов.

Способ получения маннозы авторов Yoshikawa G. и Yano Takuma, включает обработку кокосовой муки путем нагревания с такими органическими растворителями как этанол или гексан. Следующей стадией

является гидролиз под действием β -маннаназы [73]. При этом получали смесь маннозы и манноолигосахаридов.

Также разработан способ выделения и очистки маннозы из сердцевин пальмы, основанный на каталитическом гидролизе в присутствии серной кислоты и последующей ферментацией с эндо- β -маннаназой, что обеспечивает наилучшие условия выхода маннозы [74].

Для получения маннозы предлагают использовать не только гидролитические ферменты, японскими исследователями разработана и запатентована технология получения маннозы из фруктозы с помощью изомеразы [75].

Большинство разработок в области поиска растительного сырья для получения маннозосодержащих гидролизатов связано с переработкой стеблей кукурузы, соломы злаковых, а также с переработкой мягких лиственных пород деревьев. При этом практически отсутствуют разработки в области переработки хвойной древесины, которая составляет основную долю в отходах лесопереработки в России.

Рассмотренные способы получения маннозы не могут быть рекомендованы к применению в промышленных масштабах. Они отличаются сложностью, малым выходом конечного продукта, низкой экологичностью, малодоступным или дорогостоящим растительным сырьем. Некоторые из них предусматривают или дорогостоящие способы очистки или не предусматривают получение отдельно маннозы.

1.4 Характеристика биологических функций маннозы

В результате ферментативного гидролиза маннанов образуется манноза, которая обладает рядом функциональных свойств.

Манноза относится к минорным сахарам и должна присутствовать в организме человека для синтеза гликопротеидов, гликолипидов, иммунных тел (лимфоцитов, фагоцитов). Эти углеводные структуры играют основную роль в системе рецепции между клетками.

Манноза частично синтезируется в живом организме в процессе метаболизма, за счет которого организм получает 7 – 10 % суточной потребности в этом углеводе. Остальное количество маннозы должно поступать с продуктами питания или в виде пищевой добавки. В пищевых продуктах манноза входит в состав гомогенных или гетерогенных полисахаридов, не расщепляющихся под действием кислот и ферментов желудочно-кишечным трактом человека.

Длительное снижение концентрации маннозы в крови приводит к нарушению синтеза не только клеточных рецепторов и клеточных структур, но также и к нарушениям синтеза углеводной части иммунных тел. В этом начинают синтезироваться гликопротеиды и гликолипиды с меньшим количеством молекул маннозы, что приводит к нарушению системы рецепции в сторону ее упрощения. Защитные функции организма человека против попадания чужеродных микроорганизмов и против формирования патологических клеток в этом случае снижаются. Таким образом, недостаток маннозы в организме в течение длительного времени приводит к развитию сахарного диабета, ожирения, заболеваний сердечно-сосудистой системы и щитовидной железы и, в конечном итоге, к развитию СПИДа и рака.

По результатам исследований [76] введение в рацион питания человека маннозы приводит к нормализации углеводного обмена и постепенной регенерации всех биохимических процессов в клетках.

Манноза обладает низким гликемическим индексом, не нарушает баланс сахара в крови и может безопасно применяться и для диабетиков. Современные научные данные подтверждают наличие обратной корреляции уровня маннозы и глюкозы у больных диабетом [77]. Применение маннозы

при лечении и купировании симптомов диабета может оказаться вполне эффективным. Запатентован способ лечения сахарного диабета, который предполагает введение маннозы в рацион питания больных сахарным диабетом, что приводит к ускорению и повышению эффективности лечения за счет коррекции углеводного обмена [78].

Манноза может быть использована при профилактике и лечении урологических инфекций, вызванных *E.coli* [79, 80]. Как известно, около 90% инфекций урологического тракта вызвано грамотрицательной бактерией *E.coli*. Как правило, процесс лечения воспаления почек и мочевого пузыря сопровождается применением антибиотиков и противомикробных препаратов, которые следует принимать на протяжении длительного времени с целью устранения инфекции. Манноза способна связываться с рецепторами на поверхности бактериальных клеток *E.coli* и тем самым блокировать прикрепление бактерий к поверхности клеток мочевого пузыря и мочевыводящих путей. Достаточное содержание маннозы в моче позволяет полностью блокировать манноз-специфический лектин (MBL) клеток человека и эффективно конкурировать с патогенными клеткам *E.coli* за связывание с тем же лектином MBL, предохраняя от заражения и способствуя дезагрегации уже связавшихся патогенов, а затем и выведению их из организма.

На сегодняшний день в литературе имеется достаточно большое количество работ, посвященных роли свободной маннозы в организме [81, 82]. Изучается роль маннозы в лечении ревматоидного артрита, волчанки, диабета [83, 84] и углевод-дефицитных гликопротеиновых синдромов I и II типов [2, 85, 86]. Применение маннозы при углевод-дефицитном гликопротеиновом синдроме (УДГС) I и II типов характеризуются исключительно низким содержанием маннозы в углеводных цепях гликопротеинов. При добавлении маннозы в культуру клеток пациентов, происходило снижение дефицита гликозилирования. Клинические испытания

маннозы показали, что ежедневное использование маннозы пациентами с УДГС значительно улучшало их состояние и биохимические показатели, а также защищало от вторичных дрожжевых инфекций.

Манноза обладает пребиотическими свойствами, стимулируя функционирование кишечника и селективно обеспечивая рост бифидобактерий кишечной микрофлоры человека и животных. Имеются немногочисленные данные о пребиотическом действии этого углевода [1, 87]. При этом коррекция микробиоценоза кишечника является основополагающей составляющей терапии большинства заболеваний человека.

Запатентован способ коррекции углеводного состава пищевых продуктов за счет введения маннозы в количестве 0,0001-1,0 г на 100 г продукта. Добавка маннозы способствует нормализации работы желудочно-кишечного тракта и ускорению синтеза гликопротеидов и гликолипидов в организме человека [88].

Запатентован гетерогликозид, включающий полисахаридную цепь, содержащую маннозу. Он рекомендуется для применения в качестве средства фармакологической коррекции патологических состояний центральной нервной системы [89].

Таким образом, препараты маннозы обладают противовоспалительными, пребиотическими, иммуностимулирующими свойствами. Современные научные данные о роли маннозы в живом организме говорят, что эффективная добавка маннозы является предпосылкой восстановления биохимических процессов в организме человека. Для устранения дефицита маннозы в питании человека необходимо разрабатывать новые биотехнологические способы получения как отдельно маннозы, так и комплексов минорных сахаров в определенном сбалансированном виде.

1.5 Характеристика микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы и методы ее коррекции

Микрофлора желудочно-кишечного тракта птицы представляет собой микробиологическую систему, которая обеспечивает защиту и развитие организма.

Основная роль нормальной микрофлоры кишечника заключается в обеспечении колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника, которая реализуется через механизмы ее конкуренции с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Микрофлора желудочно-кишечного тракта выполняет иммуностимулирующую, витаминизирующую, ферментативную функции, а также проявляет антимутагенное и антиканцерогенное действие [90].

Иммуномодулирующая активность нормофлоры обусловлена синтезом мурамилдипептида, оказывающего стимулирующее действие на фагоциты, и липополисахаридов, стимулирующих синтез секреторных антител, различных цитокинов и интерферона [91].

По данным отечественных и зарубежных исследований у птицы нормальная кишечная микрофлора представлена следующими микроорганизмами: *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Edwardsiella*. Наибольшее значение для организма птицы имеют колибактерии, энтерококки, лактобациллы, бифидобактерии стафилококки, клостридии, бактериоиды [92].

С первых дней жизни в желудочно-кишечный тракт цыплят попадает большое количество микроорганизмов и происходит заселение кишечника бифидобактериями, кишечными палочками и энтерококками, в течение трех суток - молочнокислыми бактериями и дрожжами.

Известно, что практически любая патология у птицы сопровождается нарушением микробиоценоза полых органов или возникновением дисбактериозов.

Дисбактериоз характеризуется снижением популяционного уровня молочнокислой микрофлоры и увеличением количества условно-патогенных микроорганизмов [93]. В результате дисбактериоза происходит изменение состава химуса и рН кишечного содержимого, нарушается водно-солевой обмен. Диарейный синдром и обезвоживание вызывают быструю гибель птицы.

В промышленном птицеводстве для профилактики желудочно-кишечных заболеваний до недавнего времени широко применяли антибиотики и другие антибактериальные вещества. Однако систематическое применение антибиотиков приводит к возникновению у микроорганизмов способности к внехромосомной передаче резистентности к этим препаратам, а также же к появлению в продуктах птицеводства остаточных количеств антибиотиков [94].

Сложившаяся ситуация в птицеводстве привела к необходимости разработки экологически безопасных препаратов нового поколения для обеспечения биологической защиты птиц. Этим требованиям отвечают пробиотические препараты, в состав которых входят живые бактерии из числа представителей нормального микробиоценоза кишечника.

В настоящее время пробиотики широко применяются в птицеводстве для стимуляции неспецифического иммунитета, профилактики и лечения кишечных инфекций, восстановления микрофлоры желудочно-кишечного тракта после лечения антибиотиками и другими химиотерапевтическими препаратами, ускорения адаптации птиц к высокоэнергетическим рационам, повышения эффективности использования корма и продуктивности птиц [95, 96].

Пробиотические препараты содержат микроорганизмы одного вида так и различные комбинации различных культур в лиофильно высушенном состоянии. Вопрос оптимального количества штаммов пробиотиков в препарате остается открытым. Есть мнение, что лучше использовать 2 или 3 пробиотических препарата, чем один многокомпонентный, в котором количество живых бактерий на момент применения может быть недостаточным. В то же время пользуются популярностью препараты, содержащие 6-8 пробиотиков, называемые «симбиотиками» или «мультипробиотиками». При создании мультипробиотических препаратов не следует ограничиваться бифидо- и лактобактериями. Целесообразным является поиск перспективных штаммов из других таксономических групп, входящих в состав представителей нормальной микрофлоры кишечника. Данный подход позволяет создавать комплексные пробиотические препараты, в которых бактерии дополняют друг друга и оказывают наиболее коррегирующее действие.

Одним из перспективных направлений в профилактике дисбактериозов, коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта и повышения сохранности птицы является применение пребиотических добавок лечебно-профилактического назначения. Использование пребиотиков повышает естественную резистентность за счет улучшения колонизации желудочно-кишечного тракта лакто- и бифидобактериями.

К пребиотикам относятся вещества, которые не гидролизуются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, достигая толстого кишечника в неизменном виде, и являются селективным субстратом для одного или нескольких представителей нормальной микрофлоры кишечника, стимулируя их рост и метаболическую активность. В толстом отделе желудочно-кишечного тракта пребиотики расщепляются микрофлорой (в основном бифидобактериями) до простых сахаров, которые используются в качестве источника энергии и трансформируются до CO_2 и органических

кислот. Последние понижая рН среды кишечника, препятствуют развитию вредных микроорганизмов и способствуют их элиминации [90].

Большинство зарубежных авторов относит к пребиотикам моносахариды, дисахариды и олигосахариды разной молекулярной массы. Наиболее изученными из них являются фруктоолигосахариды, лактулоза и инулин [90].

В качестве пребиотиков также могут выступать отдельные витамины и их производные. Например, известно селективное стимулирующее действие пантотеновой кислоты на рост бифидобактерий *in vivo* и *in vitro*. Наибольшей пребиотической активностью обладают пантетин и S-сульфопантетеин, содержащиеся в экстракте моркови [97].

К пребиотикам также относят биологически активные иммунные белки — лактоглобулины и гликопептиды, вырабатываемые в организме человека и млекопитающих [98]. Они содержатся в грудном, коровьем молоке и молозиве. Механизм бифидогенного действия биологически активных протеинов в основном реализуется за счет элиминации из кишечника микроорганизмов-конкурентов. Например, лактоферрин является железосвязывающим ферментом и препятствует патогенным бактериям в получении железа, которое необходимо им для жизнедеятельности [99].

Применение витаминов и протеинов в качестве пребиотиков является менее популярным по сравнению с олигосахаридами, одной из причин этого является их лабильность к воздействию физико-химических факторов.

К числу бифидогенных факторов, влияющих на микрофлору кишечника, относят также дрожжевые автолизаты, которые широко применяются в пищевой промышленности и в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки к основному рациону птицы [100].

В частности, в животноводстве применяются автолизаты клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, действующим веществом которых являются маннанолигосахариды, входящие в состав клеточной стенки. К

числу пребиотических добавок на основе маннанолигосахаридов зарубежного производства относятся «Био-МОС» и «Агримос», отечественные пребиотические комплексные препараты - «Кормомикс-комплекс», «Кормомикс-МОС», кормовой концентрат «СибМОС-про». Добавление данных препаратов в рацион сельскохозяйственных животных и птиц оказывает положительное влияние на показатели роста, иммунитета, а также микрофлору желудочно-кишечного тракта животных [101, 102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что маннаны содержатся в клеточных стенках и семенах многих видов растительного сырья. В зависимости от вида растений содержание маннанов и их структура различна. Перспективным источником маннанов является древесина хвойных пород, содержание маннанов в которых достигает 12 %.

К ферментам, расщепляющим маннаны различного строения, относятся β -маннаназа (К.Ф. 3.2.1.78) (эндо-1,4- β -маннаназа, 1,4- β -D-маннан маннаногидролаза), β -маннозидаза (К.Ф. 3.2.1.25) (β -D-маннозид манногидролаза), β -глюкозидаза (К.Ф. 3.2.1.21) (1,4- β -D-глюкозид глюкогидролаза), α -галактозидаза (К.Ф. 3.2.1.22) (мелибиаза, α -D-галактозид галактогидролаза).

Наиболее перспективным с точки зрения практического применения является β -маннаназа, расщепляющая внутренние (1 \rightarrow 4)- β -гликозидные связи в различных видах маннанов.

Поиск активных продуцентов β -маннаназ, а также исследование физико-химических свойств ферментов являются актуальными как для отечественных, так и зарубежных ученых. К настоящему времени охарактеризовано большое количество β -маннаназ различного происхождения, в том числе и рекомбинантных, которые отличаются по физико-химическим и каталитическим характеристикам: оптимум температуры и pH, pH- и термостабильность, субстратная специфичность.

Манноза, образуемая в результате ферментативного гидролиза, обладает рядом функциональных свойств, проявляя противовоспалительные, пребиотические, иммуностимулирующие свойства. Этот моносахарид относится к витаминоподобным сахарам, участвует в синтезе клеточных

рецепторов, входит в состав иммуноглобулинов. Недостаток маннозы в организме является начальным звеном в снижении иммунной системы.

Для устранения дефицита этого углевода в питании человека необходимо разрабатывать новые биотехнологические способы получения маннозы, а также комплексов минорных сахаров в определенном сбалансированном виде.

Существующие способы получения маннозы 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.

Современным направлением в профилактике и лечении желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы является формирование нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Этому способствует применение пробиотиков и пребиотиков - веществ, оказывающих стимулирующее действие на рост лакто- и бифидобактерий. Пробиотики уже достаточно хорошо изучены и широко применяются в ветеринарной практике, в то время как исследования пребиотических препаратов находятся еще в начальной стадии, и поиск новых веществ, обладающих пребиотическим действием, является актуальным.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

Основными объектами исследований служили:

1. Спиртоосажденные ферментные препараты: β -маннаназа *Trichoderma harzianum* F114 и рекомбинантная β -маннаназа *Bacillus subtilis*.
2. Бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum* – коммерческий препарат «Бифидумбактерин».
3. Лабораторные мыши весом 14-16 г, полученные из филиала института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.
4. Цыплята-бройлеры кросса "Смена-2" 11-суточного возраста весом 220-230 г.

2.2 Определение активности ферментного препарата

2.2.1 Определение активности β -маннаназы

Активность β -маннаназы определяли методом Сомоджи-Нельсона [103], который основан на определении количества редуцирующих сахаров, образующихся при гидролизе маннансодержащего субстрата. Концентрацию редуцирующих веществ в гидролизате находят спектрофотометрическим методом после взаимодействия сахаров с реактивами Сомоджи и Нельсона с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации редуцирующих веществ.

За единицу активности β -маннаназы принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль маннансодержащего субстрата за 1 мин в стандартных условиях.

Для определения активности β -маннаназы проводили гидролиз маннана и в полученном гидролизате определяли количество редуцирующих сахаров. Для этого к 200 мкл 1 % раствора субстрата в буфере с соответствующим рН добавляли 100 мкл раствора β -маннаназы и инкубировали в течение 20 минут при оптимальной температуре. В контрольном опыте к 200 мкл 1 % раствора субстрата добавляли 100 мкл раствора инактивированного фермента. По окончании времени гидролиза в обе пробы добавляли 1 см³ реактива Сомоджи, перемешивали и пробирки помещали на кипящую водяную баню на 20 мин, потом их охлаждали и вносили по 1 см³ реактив Нельсона. Определяли оптическую плотность раствора опытной пробы относительно контрольной при 490 нм.

Активность β -маннаназы рассчитывали по формуле (2.1):

$$A = \frac{A_0}{M \cdot n \cdot \tau} \quad (2.1)$$

где A – активность фермента, ед/г или ед/см³;

A_0 – количество редуцирующих сахаров в гидролизате, мкг;

M – молекулярная масса маннозы;

n – количество ферментного препарата (г) или культуральной жидкости (см³);

τ – время гидролиза, мин.

2.3 Определение степени гидролиза маннанов

Для определения степени гидролиза маннанов 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.

2.4 Качественный и количественный анализ продуктов гидролиза маннанов

Углеводный состав гидролизатов определяли методом тонкослойной хроматографии [104]. По окончании гидролиза реакционную смесь кипятили 10 мин для инактивации фермента и центрифугировали при 16100 g в течение 15-20 мин для отделения нерастворимых продуктов. Надосадочную жидкость, содержащую растворимые продукты гидролиза, наносили на пластины для тонкослойной хроматографии Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) размером 10×20 см. Система растворителей состояла из бутанола, этилового спирта и воды в соотношении объемных частей 5:4:3,5 соответственно.

Для обнаружения сахаров использовали орциновый реактив, состоящий из 0,2 г орцинола в 100 мл 10%-ной серной кислоты в этиловом спирте. Для проявления хроматограмму помещали в камеру с орциновым реактивом на 5-10 с, затем выдерживали при 20 °С в течение 5 мин в вытяжном шкафу, затем в сушильном шкафу при температуре 85 °С в течение 2-3 мин.

В качестве стандартов использовали маннозу и манноолигосахариды (степень полимеризации от 2 до 6) фирмы «Megazyme» (Ирландия).

Количественное определение сахаров проводили на сканирующем денситометре CAMAG TLC Scanner 3 (Швейцария) при длине волны 420 нм. Для количественной обработки полученных результатов использовали программное обеспечение WinCATS.

2.5 Исследование пребиотических свойств маннозы и маннозосодержащих гидролизатов *in vitro*

При изучении пребиотических свойств маннозы проводили культивирование бактерий *Bifidobacterium bifidum* на средах с различными сахарами.

Препарат «Бифидобактерин сухой» предварительно активизировали в питательной среде Блаурокка при температуре 37 °С в течение 24 ч и вносили в питательные среды из расчета 5 доз на 1 л среды.

Культивирование бифидобактерий проводили в анаэробных условиях при температуре 37 °С. При проведении контрольного эксперимента бифидобактерии выращивали на среде Блаурокка в модификации Г.И. Гончаровой следующего состава (г/л): пептон - 10; NaCl - 5; агар-агар - 0,75; лактоза - 10; цистеин солянокислый - 0,1; печеночный отвар. При проведении ряда опытов в питательную среду вместо лактозы добавляли следующие углеводы: инулин, маннозу, глюкозу, трегаллозу, фруктозу, маннозосодержащие гидролизаты.

Накопление биомассы бифидобактерий оценивали по оптической плотности суспензии бактерий при длине волны 590 нм [105], биохимическую активность *B. bifidum* - по изменению активной кислотности среды [105].

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.

Для изучения типа взаимодействий *Bifidobacterium bifidum* с *Escherichia coli* на средах с различными углеводами проводили модельный опыт. В полужидкую среду Блаурокка в качестве единственного источника

углерода вносили следующие углеводы: маннозу, глюкозу, фруктозу. Среды засеивали культурами *B. bifidum* и *E. coli* и инкубировали при 37 °С. Подсчет количества клеток *B. bifidum* и *E. coli* проводили на фиксированных препаратах.

2.6 Исследование пребиотических свойств маннозы *in vivo* на мышах

Изучение бифидогенных свойств маннозы при ее применении в количестве 1, 2 и 4 мг и при совместном применении маннозы в этих дозировках с коммерческими пробиотиками «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин» проводили на мышах на фоне экспериментального дисбиоза. Выбранные дозировки маннозы и количество пробиотических препаратов рассчитаны на массу мышей, исходя из рекомендуемой нормы потребления пребиотиков и пробиотиков для человека в день.

Для создания экспериментального дисбиоза использовали белых беспородных мышей массой 14-16 г, у которых с помощью антибиотика доксицилина гидрохлорида проводили деконтаминацию нормальной микрофлоры.

Исследование микрофлоры кишечника экспериментальных животных проводили по общепринятой методике [106] по 3 пробам фекальных масс от 5 мышей. Выделенные культуры микроорганизмов идентифицировали по таксономически значимым признакам для установления родовой и видовой принадлежности по разработанной нами схеме.

2.7 Изучение влияния маннозы на факторы неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей

Для изучения влияния маннозы и маннозы совместно с пробиотиками на факторы неспецифического иммунитета при коррекции экспериментального дисбиоза в сыворотках крови животных определяли уровни цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ) с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем производства «Bio-Source», Бельгия.

Для определения уровня фактора некроза опухоли TNF- α (ФНО- α) использовали коммерческий набор OptEIA™ ELISA Kit, USA.

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов проводили в цитохимическом тесте восстановления нитросинего тетразолия и с помощью люминолзависимой хемилюминесценции.

2.8 Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов *in vivo* на цыплятах

Исследование пребиотической активности маннозосодержащих гидролизатов проводили на цыплятах-бройлерах кросса "Смена-2" с 11-суточного до 29-суточного возраста в условиях экспериментальной базы ОАО «ВНИИКП» (г. Воронеж).

Были сформированы 4 опытные и контрольная группа цыплят. 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 3-х опытных групп вводили в корм маннозосодержащие гидролизаты в количестве 0,1 %, 0,5 %, и 1 % к массе корма в течение 15 дней. Четвертая группа цыплят получала обычный рацион и являлась контрольной на антибиотик.

Исследования микробиоценоза кишечника проводили у цыплят 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 [107] и рассчитывали количество микроорганизмов в 1 г фекалий (lg КОЕ/г).

2.9 Общие микробиологические методы исследования

1. 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».

2. Подсчет клеток бактерий *B. bifidum* и *E. coli* проводили на фиксированных окрашенных мазках по методу Виноградского-Шульгиной-Брига [105]. Количество бактериальных клеток в 1 мл суспензии рассчитывали по формуле (2.2):

$$N = X \cdot S_1 \cdot P / V \cdot S, \quad (2.2)$$

где X- число клеток в поле зрения;

P - разведение суспензии;

S = 0,02 мм²;

V - объем суспензии, нанесенной на предметное стекло, мл;

S₁ - площадь мазка, мкм².

2.10 Статистическая обработка данных

Опыты проводили в 3 повторностях. В таблицах и на рисунках приводятся средние арифметические значения из трех определений. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$ [108].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МАННОЗЫ И МАННООЛИГОСАХАРИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

3.1 Подбор источников маннанов из растительного сырья с целью получения маннозосодержащих гидролизатов

Использование маннанов ограничено из-за трудности их разложения на компоненты, которые могут усваиваться живыми организмами в качестве источника энергии или проявлять другие полезные свойства.

В таблице 3.1 представлены данные по содержанию маннанов в некоторых растениях, а также соотношение моносахаридов в молекуле маннана. При выборе источника растительного сырья для производства маннозы руководствовались следующими критериями:

- широкое распространение растения на территории Российской Федерации и его низкая стоимость;
- высокий процент содержания маннанов в клеточной стенке растения;
- состав маннанов (соотношение остатков маннозы, галактозы и глюкозы в молекуле маннана).

Таблица 3.1 - Содержание маннанов в некоторых растениях

Растение	Содержание маннанов, %	Соотношение моносахаридов в молекуле маннана
Рожковое дерево	35	ГАЛ: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

Как видно из таблицы, наилучшим источником маннанов среди растений, произрастающих на территории нашей страны, являются хвойные породы деревьев. Из литературных данных известно, что содержание гемицеллюлозы в твердой древесине достигает 10 %, а в древесине мягких пород до 25 %. Так, содержание маннанов в древесине ели обыкновенной составляет 11 %, при этом в состав маннанов входят остатки маннозы и глюкозы в соотношении 3,7 : 1. Ферментативная обработка маннанов такой структуры позволит получить высокий выход маннозы. Таким образом, отходы древесного производства являются доступным материалом для получения гемицеллюлозной фракции, богатой маннанами, что значительно удешевит производство маннозы в промышленных масштабах.

3.2 Выбор ферментного препарата для гидролиза маннанов растительного сырья

Был исследован процесс гидролиза глюкоманнанов древесины ели обыкновенной спиртоосажденным рекомбинантным препаратом β -маннаназы *B. subtilis* с активностью 72000 ед/г и спиртоосажденным препаратом β -маннаназы *Tr. harzianum* с активностью 2100 ед/г при оптимальных условиях действия ферментов.

Оптимальную активность рекомбинантная β -маннаназы *B. subtilis* проявляет при pH 7,0 и температуре 35°C, а β -маннаназы *Tr. harzianum* - при pH 4,5 и температуре 60°C [109, 110].

На степень деструкции полисахаридов большое влияние оказывает дозировка ферментного препарата и продолжительность гидролиза. Данные показатели являются важной характеристикой в разработке методов эффективного использования ферментных препаратов.

Для определения этих параметров гидролизу подвергались глюкоманнаны ели обыкновенной 1 %-ной концентрации. Об эффективности гидролиза судили по количеству редуцирующих веществ в пересчете на маннозу, образующихся в процессе гидролиза.

Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от дозировки ферментного препарата β -маннаназы *B. subtilis* представлена на рисунке 3.1. Фермент вносили в количестве 5-15 ед/г глюкоманнанов. Внесение фермента в количестве 5 ед/г субстрата обеспечивало гидролиз на 60 % за 3 ч. Дозировка 10 ед/г субстрата обеспечивала максимальную степень деструкции глюкоманнана – 88 % за 3 ч гидролиза. Более высокая дозировка фермента и увеличение продолжительности процесса не способствовали значительному увеличению степени гидролиза.

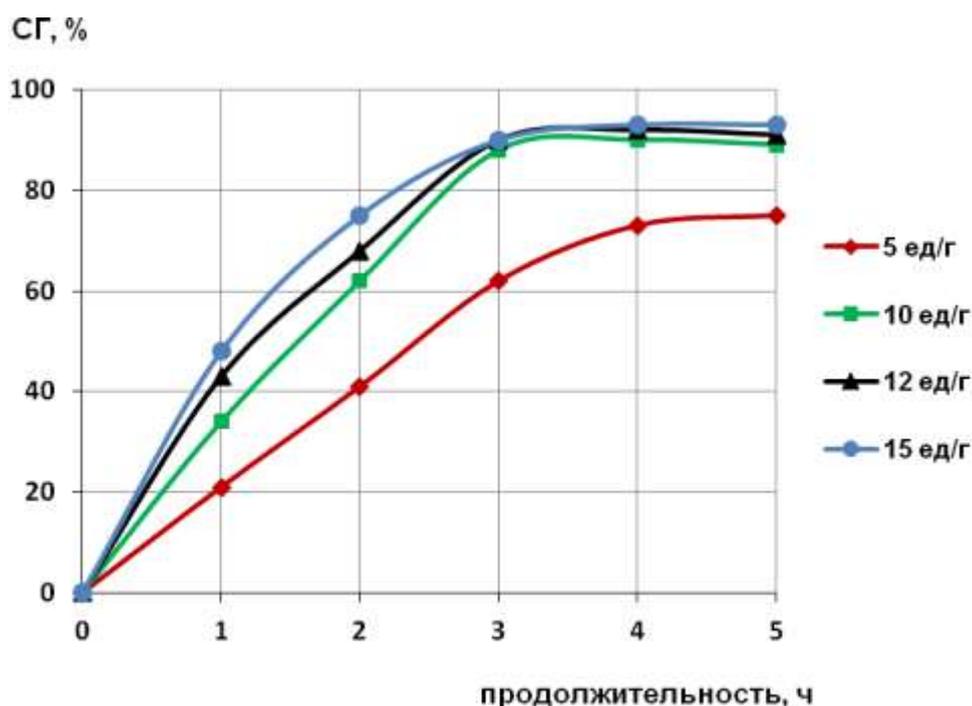


Рисунок 3.1 - Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β -маннаназы *B. subtilis* (ед/г глюкоманнана) при температуре 35 °С и pH 7,0

На рисунке 3.2 представлена зависимость степени деструкции маннанов от концентрации ферментного препарата β -маннаназы *Tr. harzianum*. Ферментный препарат вносили в количестве 5-25 ед/г глюкоманнанов. Концентрация фермента 5 ед/г глюкоманнанов обеспечивала гидролиз на 58 % за 4 ч. При увеличении дозировки препарата 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.

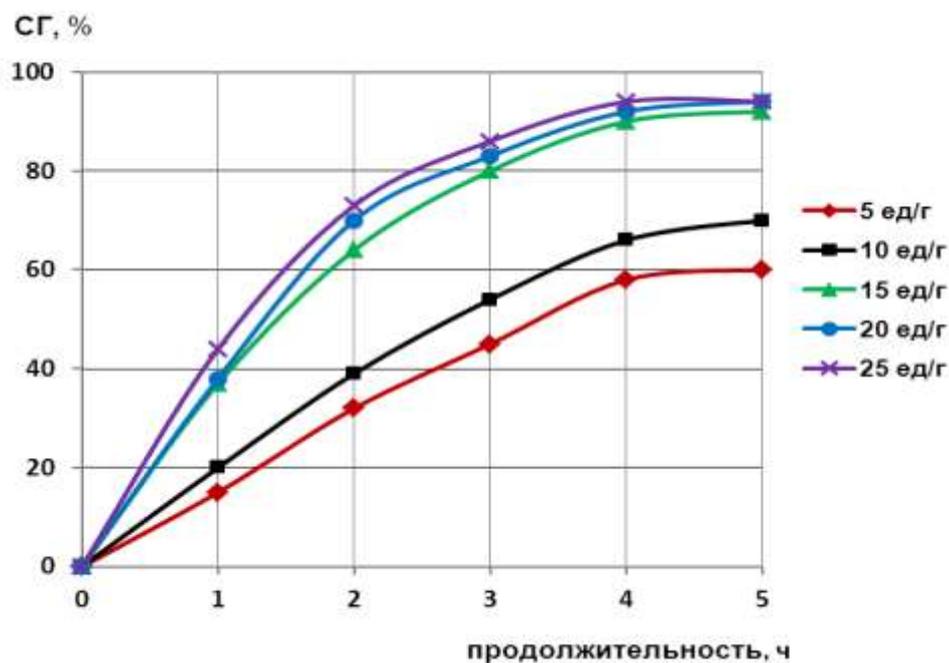


Рисунок 3.2 - Зависимость степени гидролиза глюкоманнанов от концентрации β-маннаназы *Tr. harzianum* (ед/г глюкоманнанов) при температуре 60 °С и рН 4,5

По результатам проведенных исследований были установлены рациональные параметры процесса гидролиза глюкоманнанов или обыкновенной для β-маннаназ различного происхождения. Для β-маннаназы *B. subtilis* оптимальными параметрами являются дозировка ферментного препарата 10 ед/г, продолжительность 3 ч, температура 35 °С, рН 7,0. Для β-маннаназы *Tr. harzianum* - дозировка ферментного препарата 15 ед/г, продолжительность 4 ч, температура 60 С, рН 4,5.

При гидролизе маннанов β-маннаназами различного происхождения образуются различные конечные продукты: манноолигосахариды различной молекулярной массы и манноза, которая, как правило, не является доминантным продуктом [37, 111].

Была исследована способность маннозосодержащих гидролизатов, полученных при оптимальных условиях гидролиза β -маннаназами *B. subtilis* и *Tr. harzianum*, стимулировать развитие бифидобактерий *B. bifidum*. Исследование активности гидролизатов, как единственного источника углерода в питательной среде для бифидобактерий, проводили в сравнении с инулином Raftiline и маннозой. Контролем служила среда с лактозой.

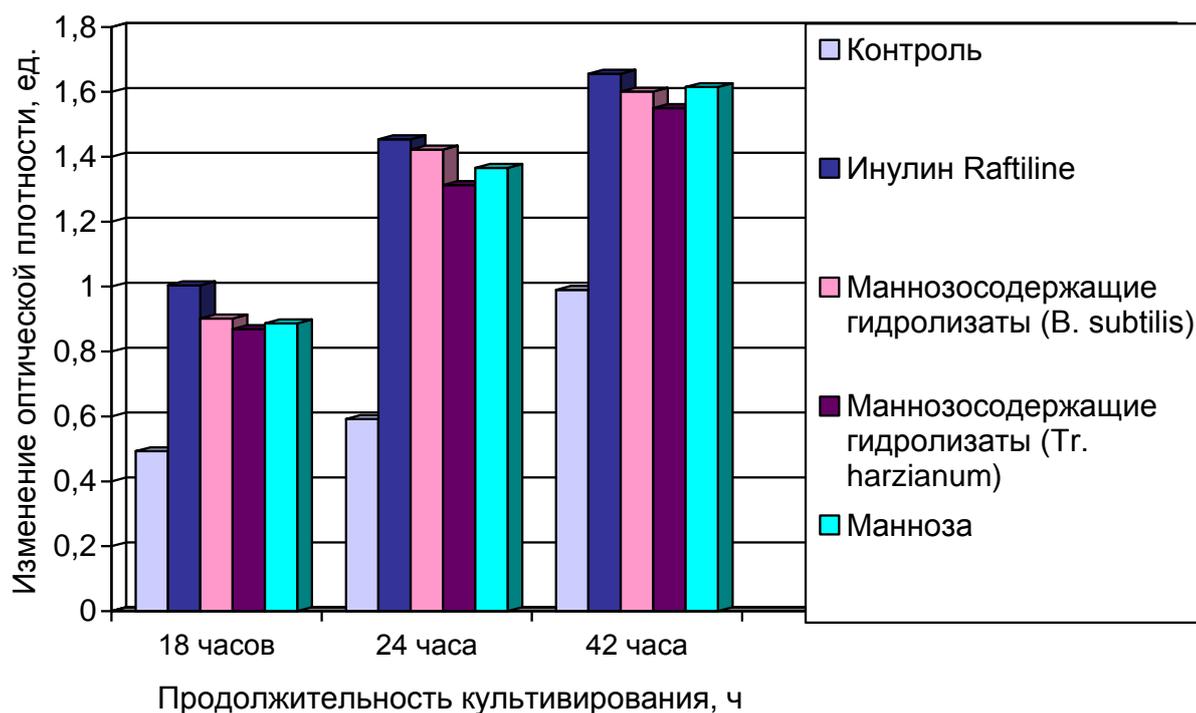


Рисунок 3.3 - Накопление биомассы бифидобактерий при культивировании на средах с маннозосодержащими гидролизатами, полученными при гидролизе β -маннаназами *B. subtilis* и *Tr. harzianum*.

Из представленных данных видно, что изученные гидролизаты обладали выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий на протяжении всего процесса культивирования, сопоставимой с активностью признанного стимулятора роста бифидобактерий инулина и не уступающей чистой маннозе, 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*.

Учитывая более 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*.

Маннозосодержащие гидролизаты, полученные при оптимальных условиях гидролиза при действии β -маннаназы *B. subtilis*, были проанализированы методом тонкослойной хроматографии с хроматоденситометрией. Хроматографический анализ (рисунок 3.4) показал наличие в составе гидролизатов маннозы, маннотриозы, маннотетрозы, маннопентозы в количестве, мг/л: 33, 48, 32, и 13 соответственно.

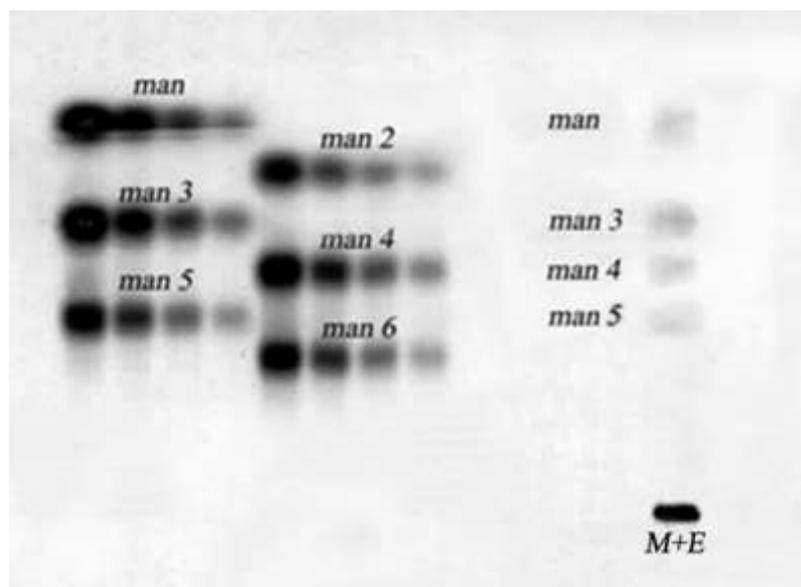


Рисунок 3.4 - Хроматограмма маннозосодержащих гидролизатов: стандарты в количестве 500, 250, 150 и 75 мг/л: man – манноза, man 2 – маннобиоза, man 3 – маннотриоза, man 4 – маннотетроза, man 5 – маннопентоза, man 6 – манногексоза; M+E – маннозосодержащие гидролизаты.

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 высокую стоимость чистой маннозы по сравнению с гидролизатами, дальнейшие исследования экономически целесообразно проводить с маннозосодержащими гидролизатами.

3.3 Разработка лабораторного регламента получения маннозы и маннозосодержащих гидролизатов из древесины ели обыкновенной

Установленные рациональные параметры процесса гидролиза глюкоманнанов древесины ели обыкновенной послужили основой для разработки лабораторного регламента получения маннозосодержащих гидролизатов. На рисунке 3.3 представлена схема производства маннозосодержащих гидролизатов из древесных опилок.

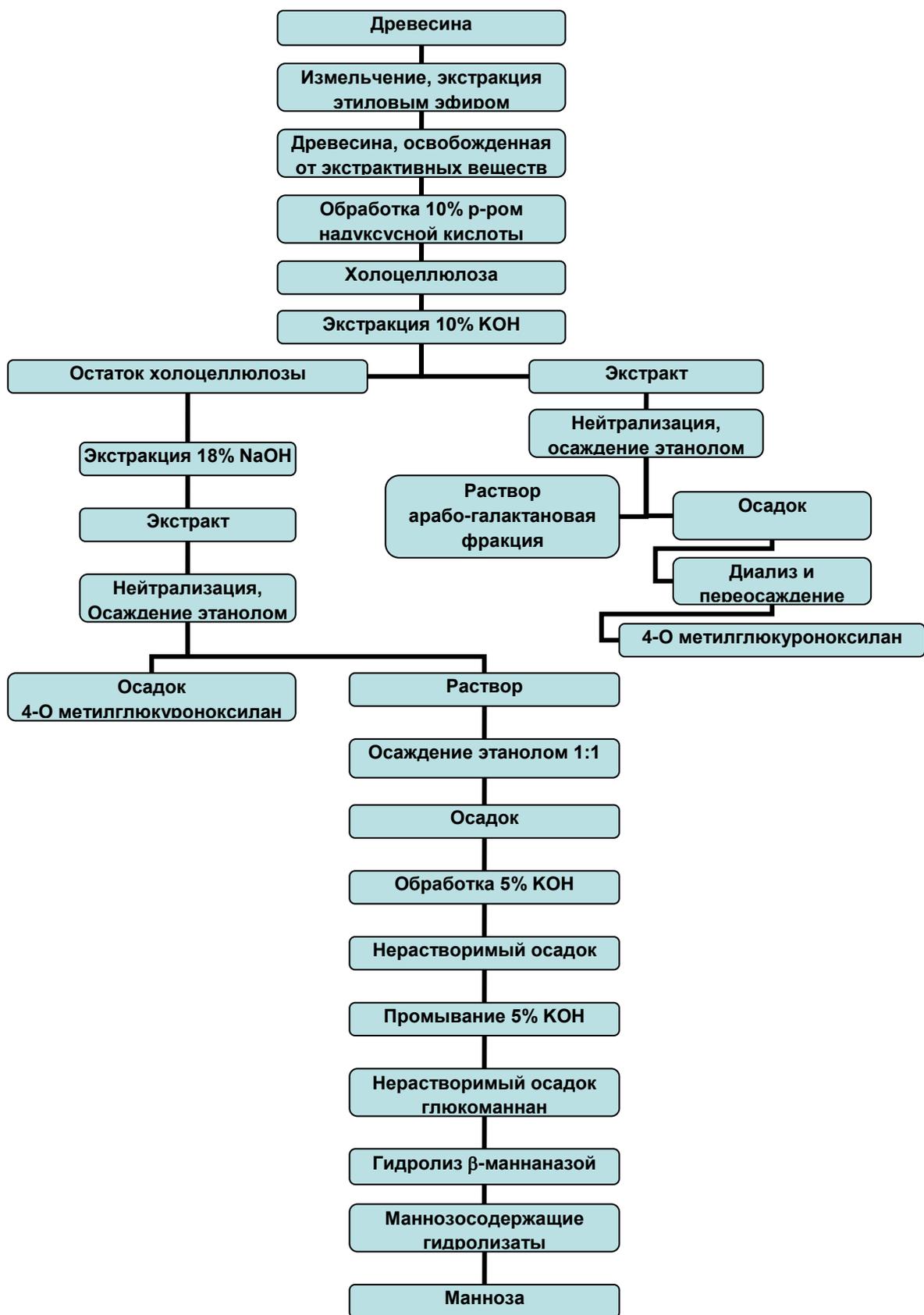


Рисунок 3.5 - Схема производства маннозосодержащих гидролизатов из древесных опилок

Получение маннозосодержащих гидролизатов

1. Подготовка растительной ткани.

Требования к древесным опилкам - частички проходят через сито с диаметром пор 2 мм, но задерживаются на сите с диаметром 0,25 мм.

Проводят предварительную экстракцию экстрактивных веществ этиловым эфиром или спирто-бензольной смесью в аппарате Сокслета.

2. Делигнификация.

Делигнификацию проводят надуксусной кислотой. Хвойные породы делигнифицируют при температуре 75-85°C с сохранением гемицеллюлозного комплекса 30 мин. Для этого 100 г сырья помещают в толстостенную колбу, вносят 1 дм³ надуксусной кислоты. Колбу со смесью помещают на водяную баню с температурой 80-90 °С. Температура смеси должна быть не менее 75°C. Смесью разбавляют водой, перемешивают, дают отстояться и фильтруют. Холоцеллюлозу на фильтре отжимают, промывают 2 раза этанолом с массовой долей 96 % и высушивают.

3. Экстракция холоцеллюлозы растворами щелочей.

Влажную холоцеллюлозу 50 г (в пересчете на сухую холоцеллюлозу) перемешивают в течение 20 мин при 25°C с 589 г водного раствора гидроксида бария (содержание $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ - 4 г). Затем в смесь вносят 925 г 18,5 % водного раствора гидроксида калия, массовая доля гидроксида калия в смеси должна быть примерно 10 %. После вторичной такой обработки в течение 20 мин при 25°C не растворившуюся холоцеллюлозу отфильтровывают, промывают 250 см³ водного раствора гидроксида бария и гидроксида калия в той же концентрации. Из фильтрата ксилан выделяют после подкисления, осаждением четырьмя объемами спирта с массовой долей 96 %. Осадок промывают спиртом и высушивают. Остаток холоцеллюлозы промывают на воронке водой, снимают с фильтра, подкисляют водным раствором уксусной кислоты и оставляют на ночь при

комнатной температуре. После этого холоцеллюлозу промывают водой до нейтральной pH среды, удаляют воду. К освобожденной от щелочи холоцеллюлозе добавляют водный раствор гидроксида натрия, доводя его концентрацию в смеси до 1 %. Смесь перемешивают 20 мин при 25°C. Оставшуюся холоцеллюлозу отделяют фильтрованием и промывают 250 см³ водного раствора гидроксида натрия с массовой долей 1 %. Фильтрат, содержащий галактоглокоманнан, обрабатывают в кислой среде 4-мя объемами спирта с массовой долей 96 %.

Влажную холоцеллюлозу после экстракции размешивают в водном растворе гидроксида натрия. Массовая доля щелочи в смеси должна составлять 15 %. После 20 мин перемешивания при 25°C не растворившуюся холоцеллюлозу отделяют фильтрованием и промывают на воронке водным раствором гидроксида натрия с массовой долей 15 %. К фильтрату добавляют насыщенный водный раствор гидроксида бария для осаждения глюкоманнана. Полученный осадок размешивают в 400 см³ уксусной кислоты 2 моль/дм³ и выделяют из кислой среды добавлением 3-х объемов этилового спирта с массовой долей 96 %. Осадок отделяют от фильтрата и высушивают.

4. Гидролиз маннанов.

Гидролиз полученных маннанов проводят β-маннаназой при оптимальных условиях действия фермента: температура 35 °C, pH 7,0, дозировка фермента 9 ед/г субстрата, продолжительность 3 ч.

5. Сушка гидролизатов.

Маннозосодержащие гидролизаты сушат на лиофильной сушилке.

Новизна технологических решений заключается в том, что впервые разработана биотехнология маннозы и маннозосодержащих гидролизатов из растительного маннансодержащего сырья, включающая выделение маннанов с последующим их гидролизом высокоактивной β-маннаназой.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАННОЗЫ И МАННОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТОВ

4.1 Исследование пребиотических свойств маннозы *in vitro*

4.1.1 Исследование влияния маннозы на рост и развитие бифидобактерий в сравнении с другими углеводами

Бифидобактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, пробиотическая функция которых обусловлена присутствием в продуктах питания пребиотиков, в основном углеводной природы. Пребиотиками бифидобактерий являются высокоуглеводистые компоненты пищи, которые не всасываются в тонком отделе кишечника, а поступают в толстый кишечник, где расщепляются бифидобактериями до моносахаридов, необходимых для построения иммуноглобулинов и нормального функционирования иммунной системы человека.

К пребиотикам углеводной природы относят моносахариды и олигосахариды разной молекулярной массы.

Пребиотические свойства маннозы оценивали по росту и развитию бифидобактерий *B. bifidum in vitro* 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 4.1). Максимальное накопление биомассы наблюдалось к 48 ч культивирования бактерий. Однако углеводы оказывали различное влияние на интенсивность роста бифидобактерий. Наилучшие показатели роста бифидобактерий обеспечивали такие углеводы, как манноза и глюкоза. Так, после 24 ч культивирования плотность культуры бифидобактерий на среде с маннозой была в 3 раза выше по сравнению с контролем (рисунок 4.2).

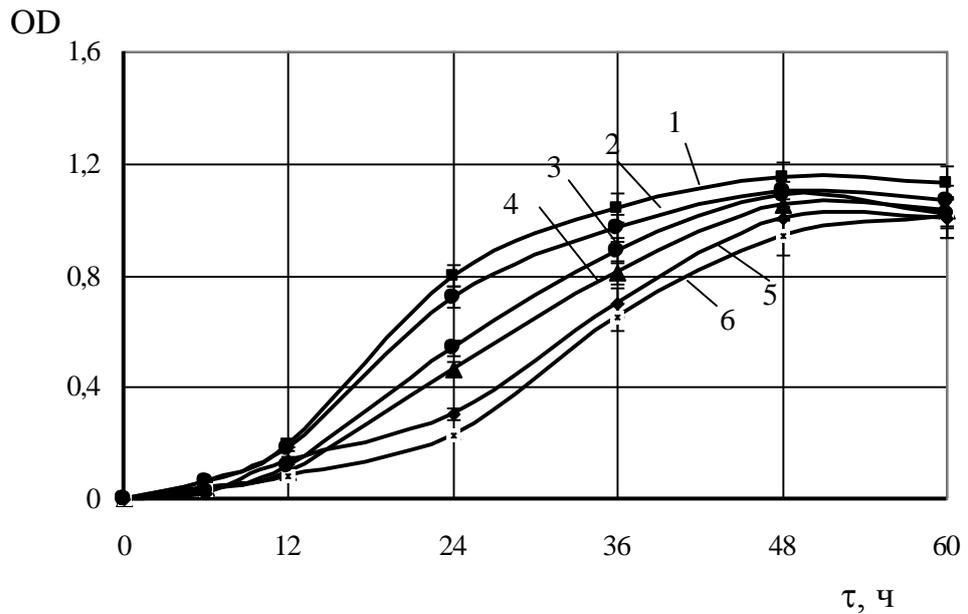


Рисунок 4.1 - Динамика роста *B. bifidum* на средах с различными углеводами: 1-манноза, 2-глюкоза, 3-фруктоза, 4-инулин из плодов топинамбура, 5-трегаллоза, 6-контроль; OD–показатель оптической плотности, τ - продолжительность процесса

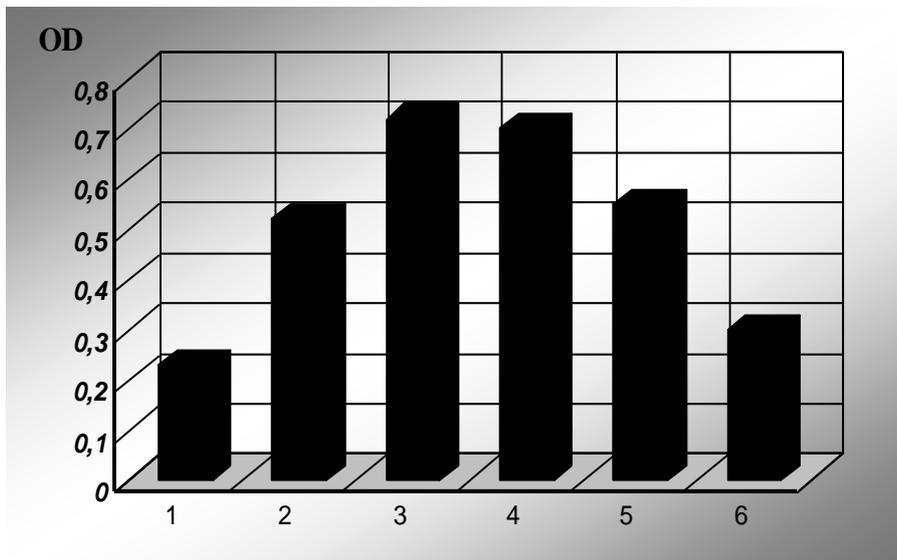


Рисунок 4.2 – Накопление биомассы *B. bifidum* после 24 ч культивирования на средах с различными углеводами: 1 - контроль, 2 –

инулин из плодов топинамбура, 3 - манноза, 4 – глюкоза, 5 - фруктоза, 6 – трегаллоза; OD – показатель оптической плотности

Интенсивность метаболических процессов у бифидобактерий оценивали по изменению рН среды в процессе культивирования, которое показывает степень преобразования сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма. Данные, представленные на рисунке 4.3, показывают корреляцию изменения рН питательных сред с ростом и развитием бифидобактерий на этих средах.

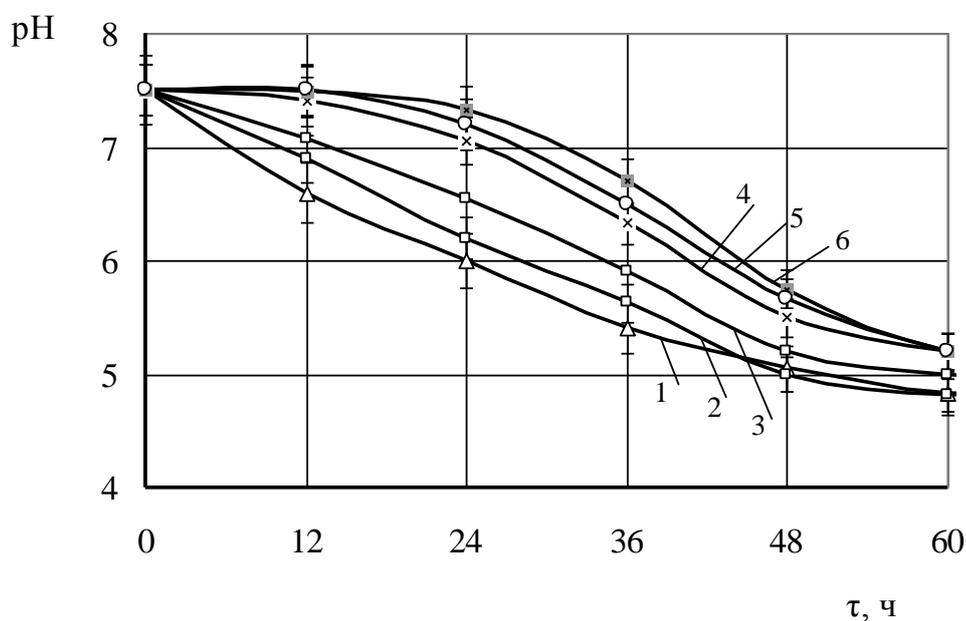
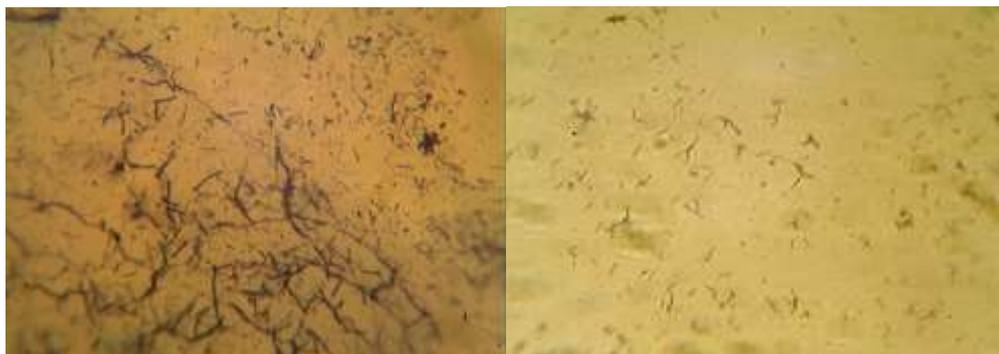


Рисунок 4.3 - Динамика изменения рН сред с различными углеводами при культивировании на них *B. bifidum*: 1-манноза, 2-глюкоза, 3-фруктоза, 4-инулин из плодов топинамбура, 5-трегаллоза, 6-контроль; τ - продолжительность процесса

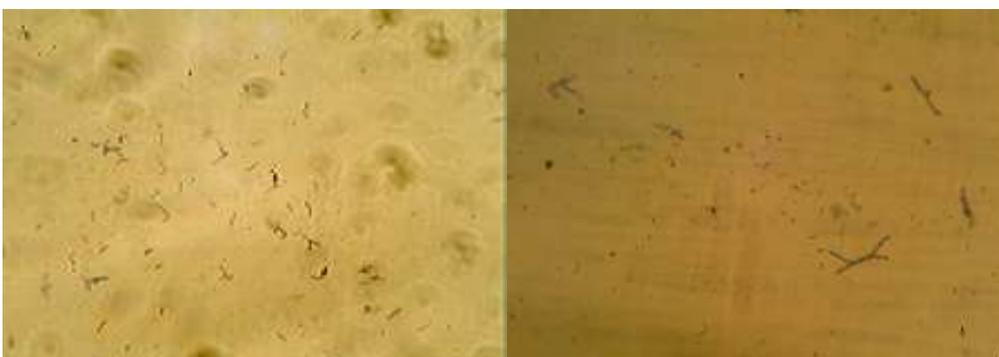
Манноза в составе питательной среды положительно влияла на морфологию вырастающих бифидобактерий, в мазках которых были более

отчетливо выражены такие ключевые признаки бифидобактерий, как утолщение и раздвоенность концов палочек, разветвленность (рисунок 4.4).



а)

б)



в)

г)



д)

Рисунок 4.4 - Интенсивность роста бифидобактерий на средах с различными углеводами (увеличение 1350 раз): а) манноза; б) глюкоза; в) фруктоза; г) трегаллоза; д) инулин

Полученные результаты показывают, что при культивировании *B. bifidum* на среде с маннозой наблюдаются высокие показатели роста бифидобактерий с хорошо развитыми ключевыми морфологическими

признаками и интенсивное накопление органических кислот, что подтверждает пребиотические свойства этого сахара *in vitro*.

4.1.2 Исследование влияния маннозы на выживаемость клеток

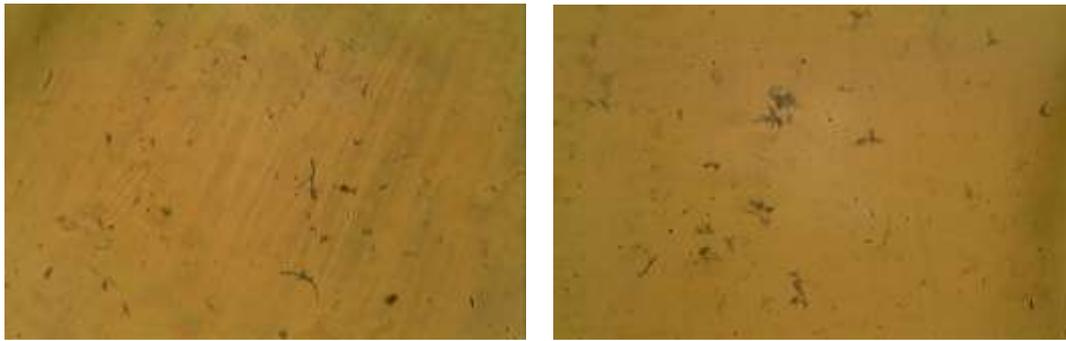
B. bifidum на фоне антибиотика

При длительном лечении антибиотиками может развиваться дисбактериоз, который является важным компенсаторным механизмом, отражающим временные или постоянные нарушения в системе общей защиты организма. В связи с этим *in vitro* изучили влияние антибиотика азитромицина на развитие и рост культуры *B. bifidum* в средах с различными сахарами.

Как показали исследования (рисунок 4.5), 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.



a)



б)

в)

Рисунок 4.5 - Интенсивность роста *B. bifidum* на средах с различными сахарами в присутствии антибиотика (увеличение 1350 раз): а) манноза; б) глюкоза; в) фруктоза

4.1.3 Изучение типа взаимодействий *B. bifidum* с *E. coli*

Количество нормируемых групп микроорганизмов в составе нормальной микрофлоры кишечника варьирует от 10 до 22. Наибольшей детализации подвергается *Escherichia coli*.

Согласно литературным данным в кишечнике здорового человека содержание бифидобактерий в норме должно составлять 10^8 - 10^{10} кл/г, а кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью - 10^7 - 10^8 кл/г.

Интерес представляет выявление типа взаимодействия бифидобактерий с основным представителем микрофлоры ЖКТ – кишечной палочкой на средах с различными углеводами. Исследования показали, что обе культуры проявляли максимальную способность к росту на средах с маннозой и глюкозой (таблица 4.1). На среде с фруктозой наблюдалось менее выраженный рост этих микроорганизмов, что говорит о снижении уровня симбиотических взаимоотношений.

Таблица 4.1 - Подсчет клеток *B. bifidum* и *E. coli* на фиксированных препаратах (кл/мл)

τ, ч	Вносимые углеводы					
	манноза		глюкоза		фруктоза	
	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>
6	$6 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
12	$2 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$
24	$3 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$
36	$7 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$
48	$4 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^7$

4.2 Исследование пребиотических свойств маннозы в опытах *in vivo* на мышах

4.2.1 Микрофлора ЖКТ интактных мышей и мышей с дисбиозом

На первом этапе работы исследована микрофлоры мышей по 3-м пробам фекальных масс от 5 животных, полученных из питомника (таблица 4.2).

Таблица 4.2 - Микрофлора мышей из питомника

Микроорганизмы	Количественное выражение микроорганизмов в пробах, (КОЕ/гр фекалий)		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac</i> ⁺	10^6	---*	10^7
<i>E.faecium</i>	10^7	10^8	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^7	10^7	10^8

<i>E.tarda</i>	---	10^6	---
<i>C.albicans</i>	10^4	10^6	10^6
<i>C.fruendii</i>	---	---	10^6
<i>Clostridium spp.</i>	10^4	---	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	---	10^{10}

Влияние маннозы на микрофлору кишечника мышей изучали на модели экспериментального дисбиоза у мышей, который вызывали введением антибиотика широкого спектра действия – доксицилина. При введении антибиотика в дозе 10 мг в течение 7 дней у мышей развивался декомпенсированный дисбиоз, при котором наблюдалось уменьшение количества бифидо- и лактобактерий и контаминация кишечника животных условно патогенной микрофлорой: среднее количество *E.coli* в фекалиях повышалось до 10^8 КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* не обнаружены, а содержание *Lactobacillus spp.* сокращалось до 10^3 КОЕ/г (таблица 4.3).

Таблица 4.3 - Микрофлора мышей с экспериментальным дисбиозом

Микроорганизмы	Количественное выражение микроорганизмов в пробах, (КОЕ/гр фекалий)			
	Норма [108]	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli</i>	10^5 - 10^6	10^8	10^8	10^8
<i>P.vulgaris</i>	10^3 - 10^4	10^9	10^8	10^9
<i>E.faecium</i>	отсутствуют	10^9	10^9	---
<i>E.faecalis</i>	отсутствуют	10^7	10^9	10^9
<i>C.albicans</i>	10^3 - 10^5	10^7	10^7	10^7
<i>Clostridium spp.</i>	менее 10^3	10^5	10^5	10^5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	менее 10^3	---	---	---
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^3	10^3	10^3

В последующих экспериментах мыши с подтвержденным дисбиозом получали перорально «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин» с маннозой в разных дозах и отдельно маннозу в аналогичных дозировках. Микрофлора ЖКТ животных изучалась через 5, 10 и 15 дней после начала введения препаратов.

4.2.2 Оценка микрофлоры мышей в группе «Бифидумбактерин» с маннозой

Состав микрофлоры ЖКТ мышей при коррекции экспериментального дисбиоза «Бифидумбактерином» с маннозой в различных дозах после 5, 10 и 15 дней начала приема, представлен в таблицах 4.4-4.12.

Таблица 4.4 – Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в количестве 1 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10 ⁶	10 ⁶
<i>E.faecium</i>	---	---	10 ⁶
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>K.pneumoniae</i>	---	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	10 ⁴
<i>Clostridium spp.</i>	---	10 ⁴	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ¹⁰

Таблица 4.5 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в дозе 2 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁸	---	---
<i>E.faecium</i>	---	10 ⁸	10 ⁸
<i>E.faecalis</i>	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	10 ⁵	10 ⁵	---
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ¹¹

Таблица 4.6 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	---	10 ⁷
<i>E.faecium</i>	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁷
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	10 ⁴	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁴	---	10 ⁴
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	---	10 ¹¹

Таблица 4.7 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в дозе 1 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10 ⁶	---
<i>E.faecium</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁴	---	10 ⁴
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	---	10 ¹⁰

Таблица 4.8 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в количестве 2 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁷	10 ⁷	Недостаточно материала
<i>E.faecium</i>	10 ⁸	10 ⁸	
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	10 ⁸	
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁵	10 ⁵	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	10 ¹¹	

Таблица 4.9 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	---	---
<i>E.faecium</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	---	10 ⁴	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹¹

Таблица 4.10 – Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 1 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁶	---	---
<i>E.faecium</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶
<i>E.faecalis</i>	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Acinetobact.</i>	10 ⁶	---	---
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	10 ⁴
<i>Streptococcus spp.</i>	---	10 ⁶	---
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁵	10 ³	10 ⁵
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	---
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹⁰

Таблица 4.11 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 2 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10 ⁷	10 ⁷
<i>E.faecium</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
<i>E.faecalis</i>	10 ⁹	---	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	10 ⁵	---
<i>Streptococcus spp.</i>	---	10 ⁶	---
<i>Clostridium spp.</i>	---	10 ³	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰

Таблица 4.12 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Бифидумбактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10 ⁶	---
<i>E.faecium</i>	10 ⁶	---	10 ⁸
<i>E.faecalis</i>	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	10 ⁵
<i>Clostridium spp.</i>	10 ³	---	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰

Динамика изменения численности *E.coli lac*⁺, *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в ЖКТ мышей при сочетанном применении пробиотического препарата «Бифидумбактерин» и маннозы в количествах 1, 2 и 4 мг в течение 15 дней исследования отражена на рисунках 4.6-4.8.

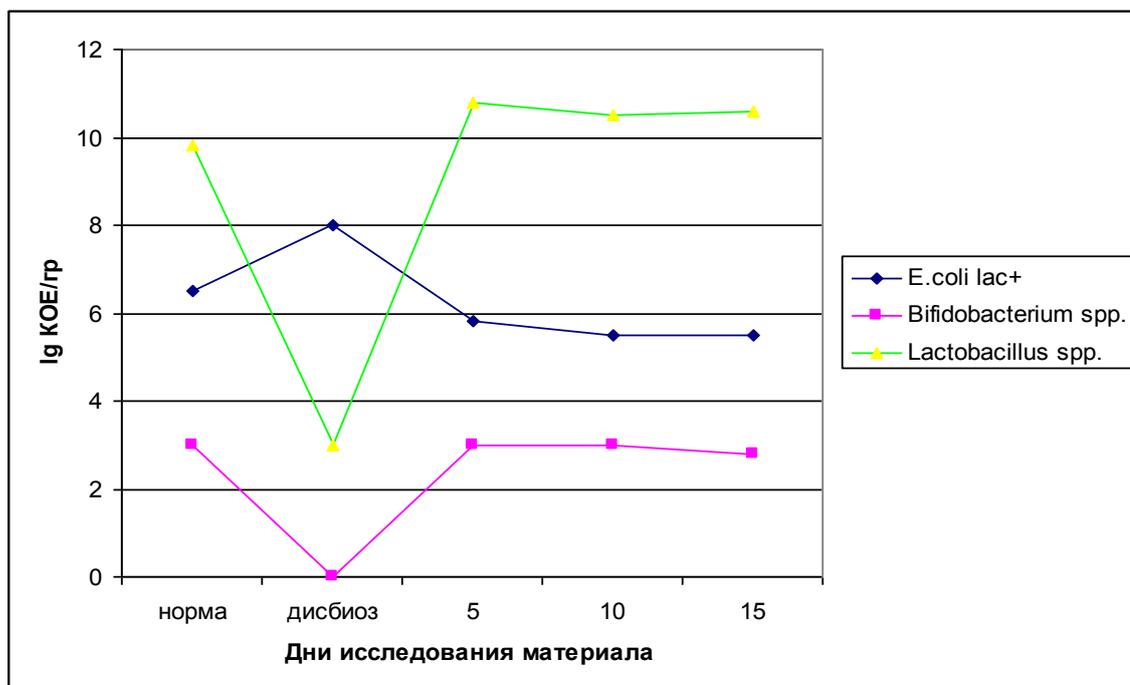


Рисунок 4.6 - Динамика изменения количества микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 1 мг и «Бифидумбактерина»

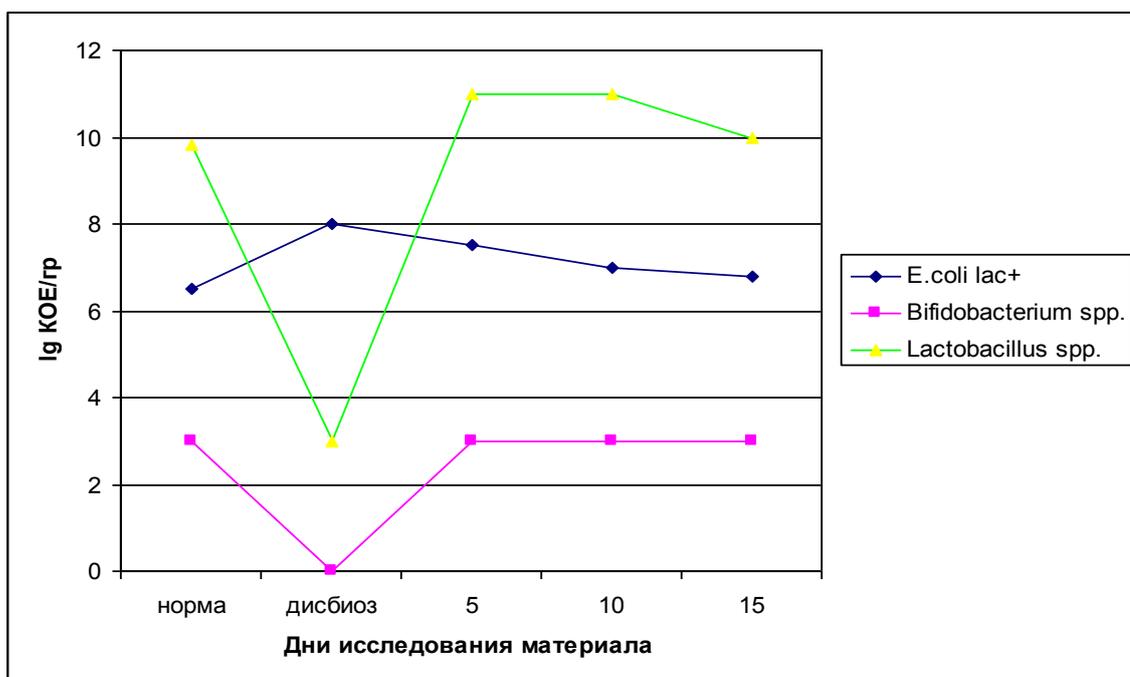


Рисунок 4.7 - Динамика изменения количества микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 2 мг и «Бифидумбактерина»

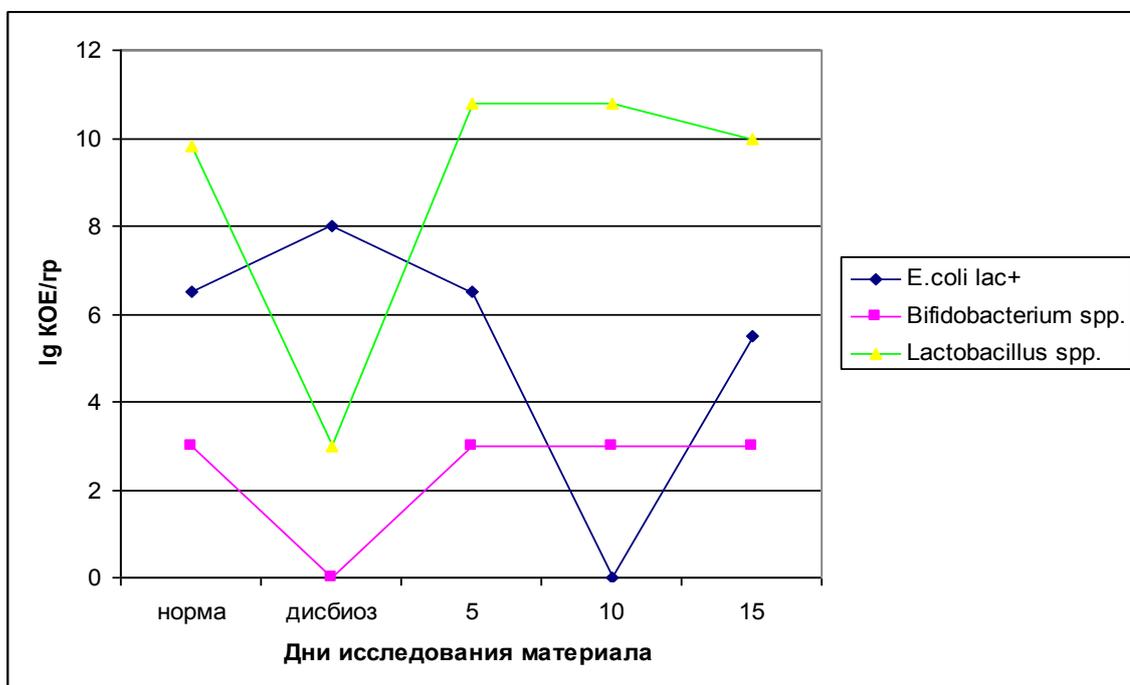


Рисунок 4.8 - Динамика изменения количества микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 4 мг и «Бифидумбактерина»

4.2.3 Оценка микрофлоры мышей в группе

«Лактобактерин» с маннозой

Состав микрофлоры ЖКТ мышей при коррекции экспериментального дисбиоза «Лактобактерином» с маннозой в различных дозах после 5, 10 и 15 дней приема, представлен в таблицах 4.13-4.21.

Таблица 4.13 – Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в количестве 1 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶
<i>E.faecium</i>	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
<i>E.faecalis</i>	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁷
<i>Staphylococcus spp.</i>	10 ⁶	---	10 ⁵
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁴	10 ⁴	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰

Таблица 4.14 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в количестве 2 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
<i>E.faecium</i>	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷
<i>E.faecalis</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷
<i>C.albicans</i>	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵

<i>Clostridium spp.</i>	---	10^3	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{10}	10^{11}

Таблица 4.15 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^6	10^7	---
<i>E.faecium</i>	10^8	10^7	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^8	10^7	10^7
<i>C.albicans</i>	10^5	10^6	10^5
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	10^4
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	---	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{10}	10^{11}

Таблица 4.16 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в количестве 1 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^5	---	10^6
<i>E.faecium</i>	10^8	10^8	10^7
<i>E.faecalis</i>	10^8	10^7	10^8
<i>C.albicans</i>	10^5	10^6	10^5
<i>P.vulgaris</i>	---	10^6	---
<i>Clostridium spp.</i>	10^4	10^4	10^5

<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{12}	10^{10}

Таблица 4.17 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в количестве 2 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^6	10^6	10^7
<i>E.faecium</i>	10^7	10^7	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^9	10^8	10^9
<i>C.albicans</i>	10^5	10^5	10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	10^5
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^4	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{12}

Таблица 4.18 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^4	---	10^5
<i>E.faecium</i>	10^7	10^8	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^8	10^8	10^8
<i>C.albicans</i>	10^5	10^6	10^5
<i>Staphylococcus spp.</i>	10^5	---	10^4
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^4	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3

<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}
---------------------------	-----------	-----------	-----------

Таблица 4.19 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 1 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^5	10^4	Недостаточно материала
<i>E.faecium</i>	10^8	10^7	
<i>E.faecalis</i>	10^8	10^8	
<i>C.albicans</i>	10^5	10^5	
<i>Staphylococcus spp.</i>	10^6	---	
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^3	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	

Таблица 4.20 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 2 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10^5	---
<i>E.faecium</i>	10^7	10^7	10^7
<i>E.faecalis</i>	10^9	---	10^7
<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	10^6	10^5	---
<i>K.pneumoniae</i>	---	---	10^5
<i>Clostridium spp.</i>	10^4	10^3	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3

<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{11}	10^{10}
---------------------------	-----------	-----------	-----------

Таблица 4.21 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней сочетанного применения маннозы в количестве 4 мг и «Лактобактерина»

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	---	10^3
<i>E.faecium</i>	10^6	10^8	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^7	10^6	10^7
<i>C.albicans</i>	10^5	10^5	10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	10^6	10^5
<i>Clostridium spp.</i>	10^4	10^4	10^5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}

Динамика изменения численности *E.coli lac⁺*, *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в ЖКТ мышей при сочетанном применении маннозы в дозах 1, 2 и 4 мг и «Лактобактерина» в течение 15 дней исследования отражены на рисунках 4.9-4.11.

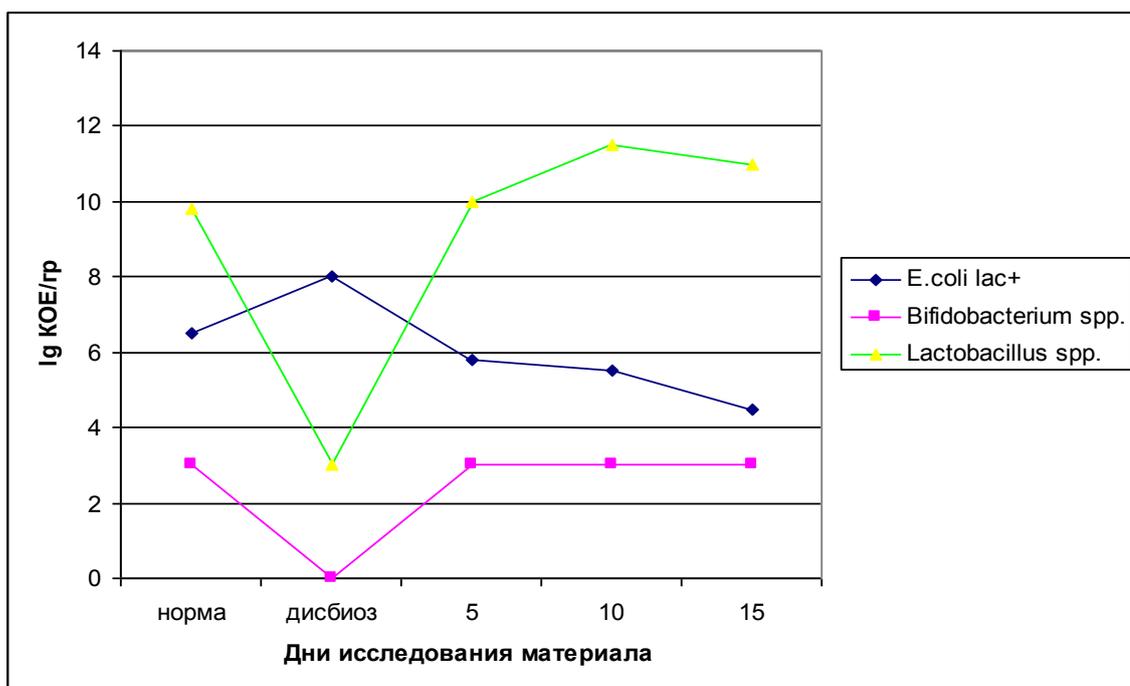


Рисунок 4.9 - Динамика изменения численности микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 1 мг и «Лактобактерина»

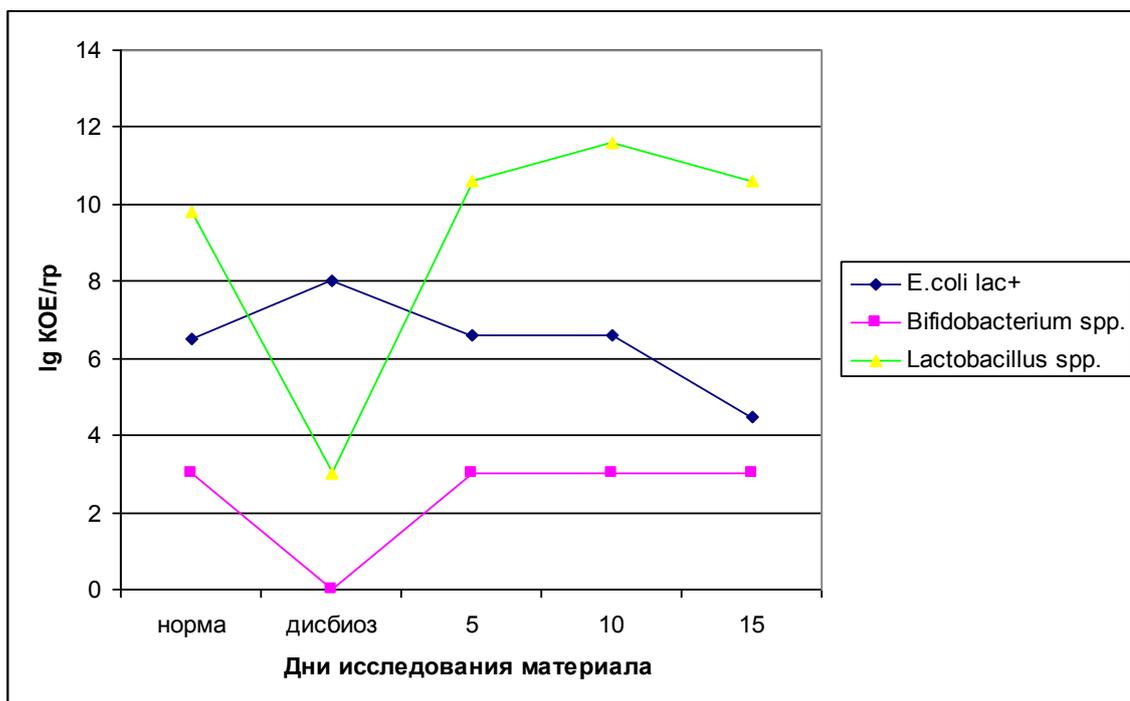


Рисунок 4.10 - Динамика изменения численности микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 2 мг и «Лактобактерина»

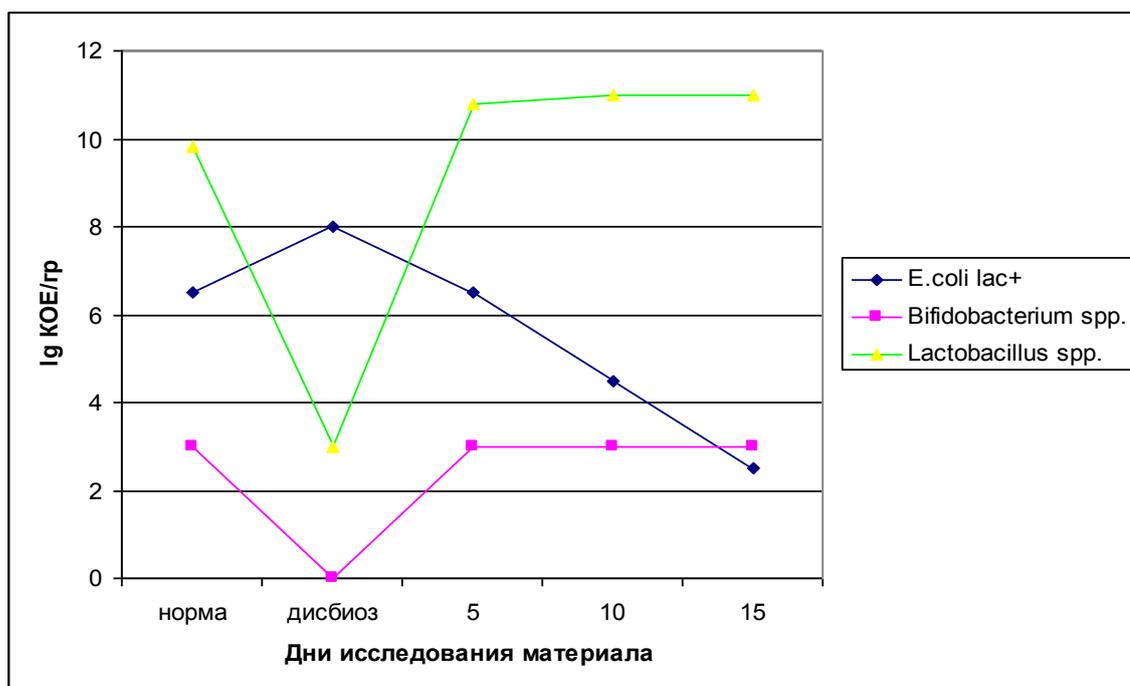


Рисунок 4.11 - Динамика изменения численности микроорганизмов при сочетанном применении маннозы в количестве 4 мг и «Лактобактерина»

4.2.4 Оценка микрофлоры мышей, получавших маннозу в качестве монопрепарата

Состав микрофлоры ЖКТ мышей при коррекции экспериментального дисбиоза манной в качестве монопрепарата в разных количествах через 5, 10 и 15 дней после начала приема, представлен в таблицах 4.22-4.30.

Таблица 4.22 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней применения маннозы в количестве 1 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E. coli lac⁺</i>	10^7	10^7	10^6
<i>E. faecium</i>	10^6	10^7	10^8
<i>E. faecalis</i>	10^7	10^9	10^7

<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>Citrobacter freundii</i>	---	---	10^7
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{11}	10^{11}

Таблица 4.23 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней применения маннозы в количестве 2 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^7	10^7	10^7
<i>E.faecium</i>	10^9	10^6	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^9	10^7	10^7
<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>P.vulgaris</i>	10^6	---	---
<i>Staphylococcus spp.</i>	10^7	10^6	10^7
<i>Clostridium spp.</i>	10^4	10^5	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}

Таблица 4.24 - Микрофлора ЖКТ мышей после 5 дней применения маннозы в количестве 4 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^7	---	10^7
<i>E.faecium</i>	---	10^8	10^6
<i>E.faecalis</i>	10^7	10^8	10^6
<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6

<i>Staphylococcus spp.</i>	10^8	---	10^4
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^5	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}

Таблица 4.25 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней применения маннозы в количестве 1 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^7	10^7	10^8
<i>E.faecium</i>	10^9	10^9	10^9
<i>E.faecalis</i>	10^9	10^9	10^9
<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>K.pneumoniae</i>	10^6	10^6	10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^5	10^5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}

Таблица 4.26 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней применения маннозы в количестве 2 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	10^6	10^8
<i>E.faecium</i>	---	10^8	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^7	10^8	10^9
<i>P.vulgaris</i>	10^6	---	---

<i>P. mirabilis</i>	---	---	10 ⁶
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹¹

Таблица 4.27 - Микрофлора ЖКТ мышей после 10 дней применения маннозы в количестве 4 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	---	---
<i>E.faecium</i>	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁸
<i>E.faecalis</i>	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸
<i>C.albicans</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	---
<i>Clostridium spp.</i>	---	---	---
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ¹³

Таблица 4.28 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней применения маннозы в количестве 1 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁶	10 ⁵	Недостаточно материала
<i>E.faecium</i>	10 ⁸	10 ⁹	
<i>E.faecalis</i>	10 ⁷	10 ⁶	

<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	
<i>Staphylococcus spp.</i>	---	---	
<i>Clostridium spp.</i>	---	10^3	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{11}	

Таблица 4.29 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней применения маннозы в количестве 2 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	10^6	10^7	10^7
<i>E.faecium</i>	10^8	10^7	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^8	10^7	10^7
<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>K.pneumoniae</i>	---	10^6	
<i>Streptococcus spp.</i>	---	10^7	10^4
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^5	10^4
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{10}	10^{11}

Таблица 4.30 - Микрофлора ЖКТ мышей после 15 дней применения маннозы в количестве 4 мг

Микрофлора	Количество микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
<i>E.coli lac⁺</i>	---	---	---
<i>E.faecium</i>	---	10^8	10^8
<i>E.faecalis</i>	10^7	10^6	10^6

<i>C.albicans</i>	10^6	10^6	10^6
<i>Staphylococcus spp.</i>	10^5	10^8	---
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	10^5	10^5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^3	10^3	10^3
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{11}	10^{11}	10^{11}

Динамика изменения численности *E.coli lac⁺*, *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в ЖКТ мышей при применении только маннозы в количествах 1, 2 и 4 мг в течение 15 дней исследования отражены на рисунках 4.12-4.14.

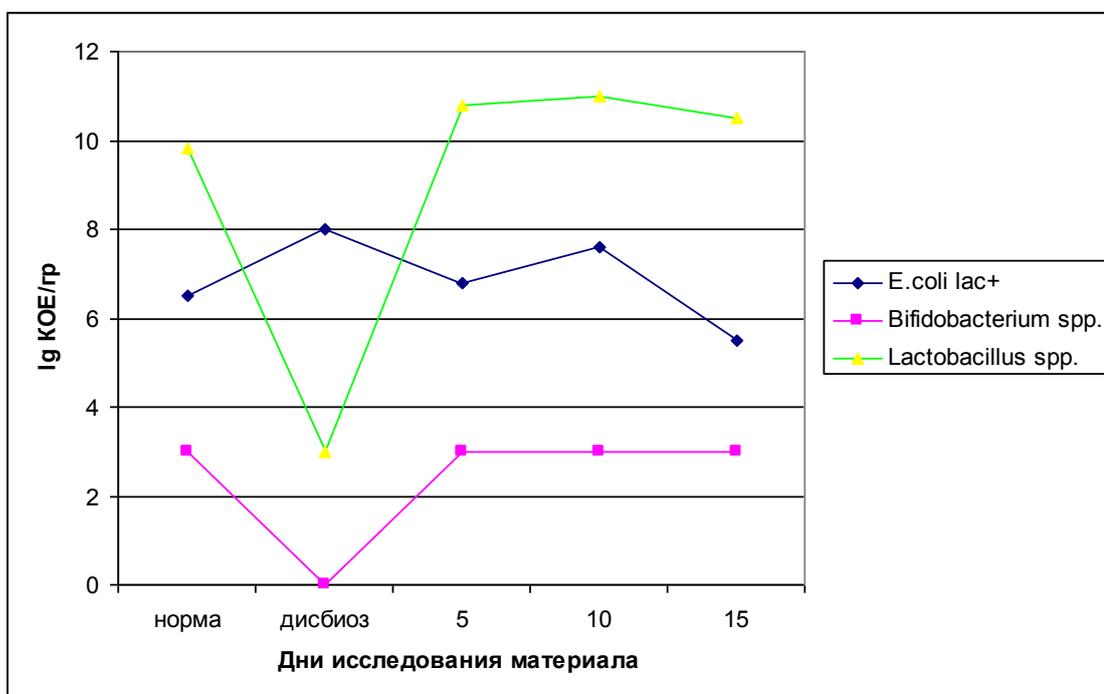


Рисунок 4.12 - Динамика изменения численности микроорганизмов при применении маннозы в количестве 1 мг

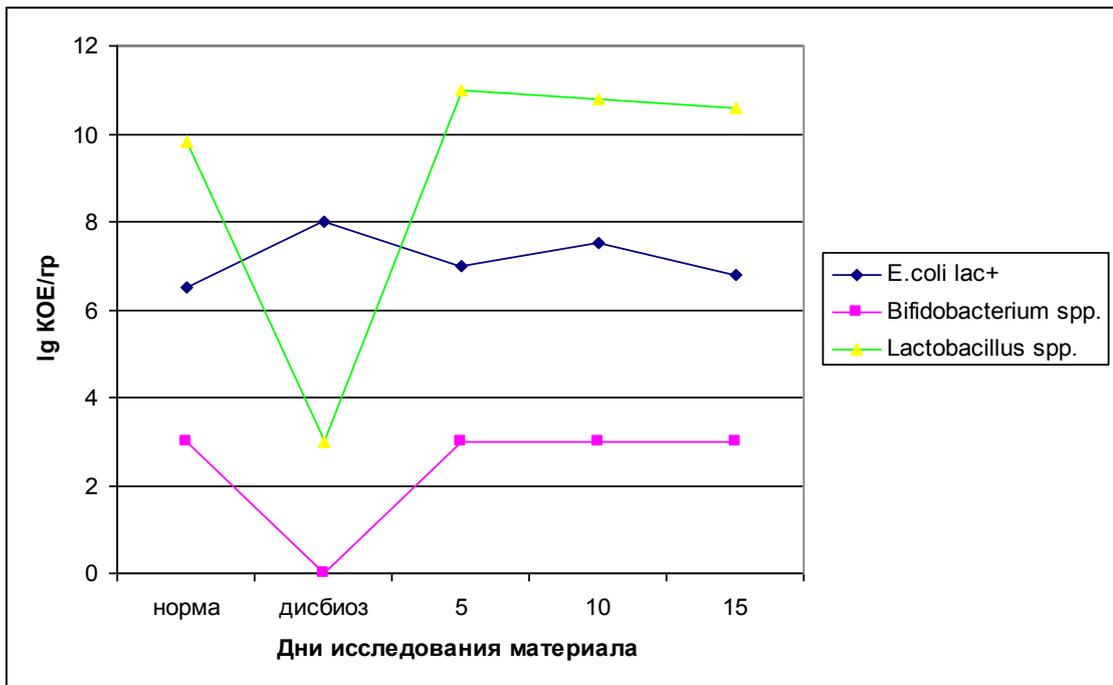


Рисунок 4.13 - Динамика изменения численности микроорганизмов при применении маннозы в количестве 2 мг

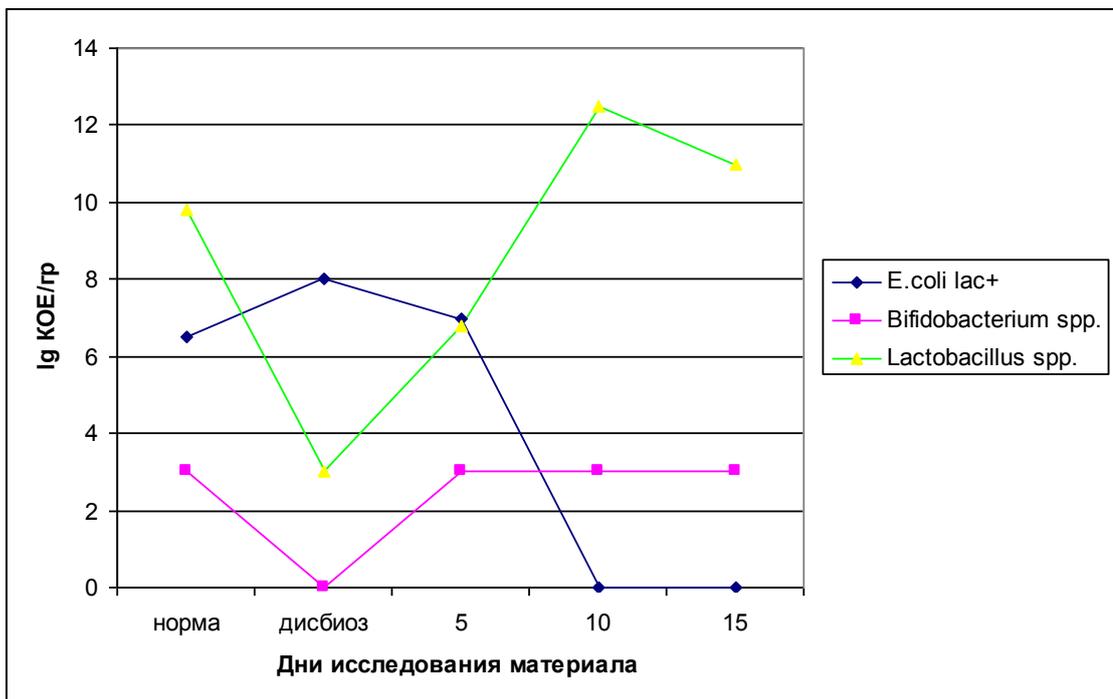


Рисунок 4.14 - Динамика изменения численности микроорганизмов при применении маннозы в количестве 4 мг

Результаты проведенных исследований показали, что эффект применения маннозы при коррекции экспериментального дисбиоза не уступает действию пробиотических препаратов «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин». Совместное использование пробиотиков и маннозы не усиливало лечебного действия. Установлена оптимальная концентрация маннозы, достаточная для коррекции дисбиоза у мышей. Применение маннозы в количестве 2 мг в течение 10 дней способствует восстановлению состава и численности индигенной кишечной микрофлоры мышей.

4.3 Влияние маннозы на факторы неспецифического иммунитета на модели экспериментального дисбиоза у мышей

С целью изучения фагоцитов лабораторных мышей, функциональная активность которых может служить показателем состояния нормальной микрофлоры ЖКТ животных, осуществляли коррекцию биотопа кишечника при экспериментальном дисбиозе с помощью маннозы и композиции маннозы с пробиотиками «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин». Контролем служили здоровые животные и животные с экспериментальным дисбиозом.

Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов лабораторных мышей при коррекции экспериментального дисбиоза маннозой в количестве 2 мг и ее композициями с пробиотическими препаратами представлена в таблице 4.31. 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 4.31 - Фагоцитарная активность 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

Также исследовали функциональное состояние нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте у здоровых животных, животных с экспериментальным дисбиозом, а также при его коррекции маннозой и ее композициями с пробиотическими препаратами (рисунок 4.15). Полученные данные показывают достоверное повышение активности нейтрофилов крови у животных с экспериментальным дисбиозом относительно здоровых мышей. Цитохимическая активность нейтрофилов крови у здоровых мышей и мышей, получавших маннозу и композиции маннозы с «Бифидумбактерином» и «Лактобактерином» при коррекции экспериментального дисбиоза, достоверно не различалась.

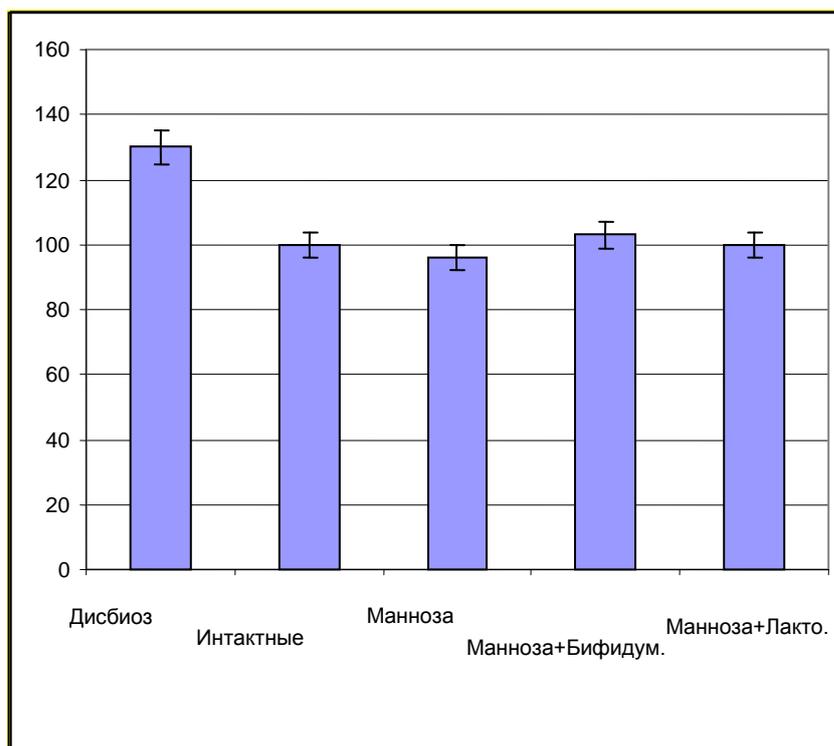


Рисунок 4.15 - Функциональное состояние нейтрофилов периферической крови при коррекции экспериментального дисбиоза (НСТ-тест, %)

При изучении факторов неспецифического иммунитета у здоровых животных, у животных с экспериментальным дисбиозом и его коррекции с помощью маннозы и маннозы совместно с пробиотиками определяли уровни цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF).

Установлено, что при пероральном введении маннозы и ее композиций с пробиотическими препаратами наблюдалось выраженное повышение количества противовоспалительного цитокина IL-10 относительно здоровых мышей и мышей с экспериментальным дисбиозом (рисунок 4.16). При коррекции экспериментального дисбиоза выбранными препаратами наблюдалось уменьшение воспалительной защитной реакции организма за счет стимулирования выработки противовоспалительного цитокина IL-10. Также отмечалось повышение содержания интерлейкина IL-1 β через 8 часов,

интерлейкина IL-6 через 12 часов, интерлейкинов IL-4 и IL-12 через 12 часов после введения препаратов.

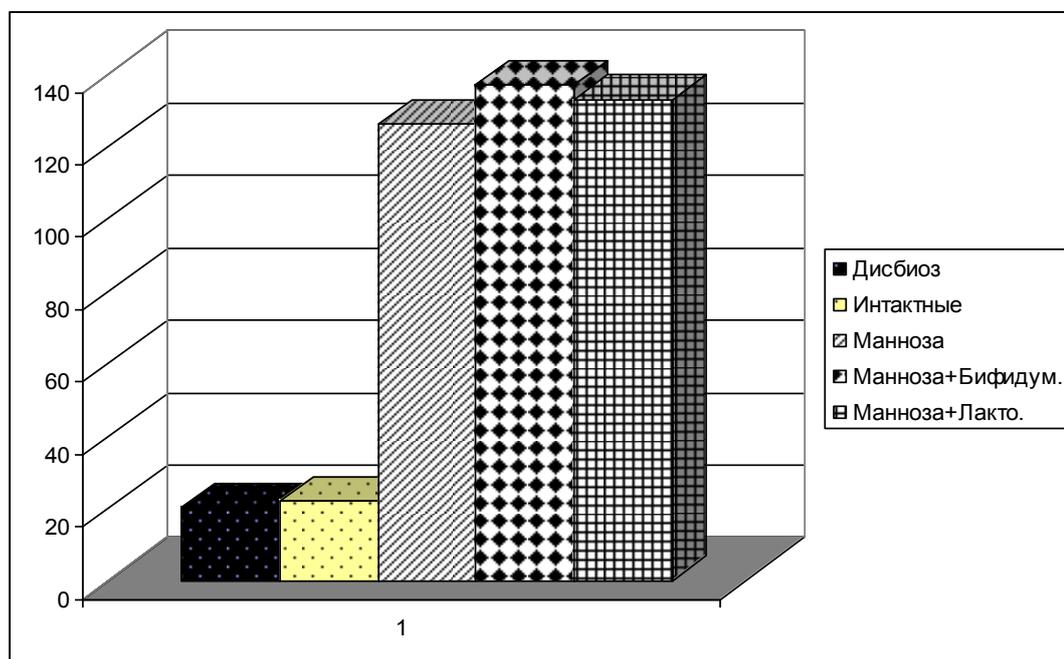


Рисунок 4.16 - Уровень цитокина IL-10 (pg/ml) при экспериментальном дисбиозе и его коррекции

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 4.17. У мышей с экспериментальным дисбиозом наблюдалось трехкратное превышение концентрации фактора некроза опухоли TNF относительно здоровых животных, что может быть расценено как системная воспалительная реакция в ответ на микробиологические нарушения в биотопе желудочно-кишечного тракта животных. При коррекции экспериментального дисбиоза маннозой и ее композициями с пробиотиками уровень провоспалительного фактора некроза опухоли достоверно снижался.

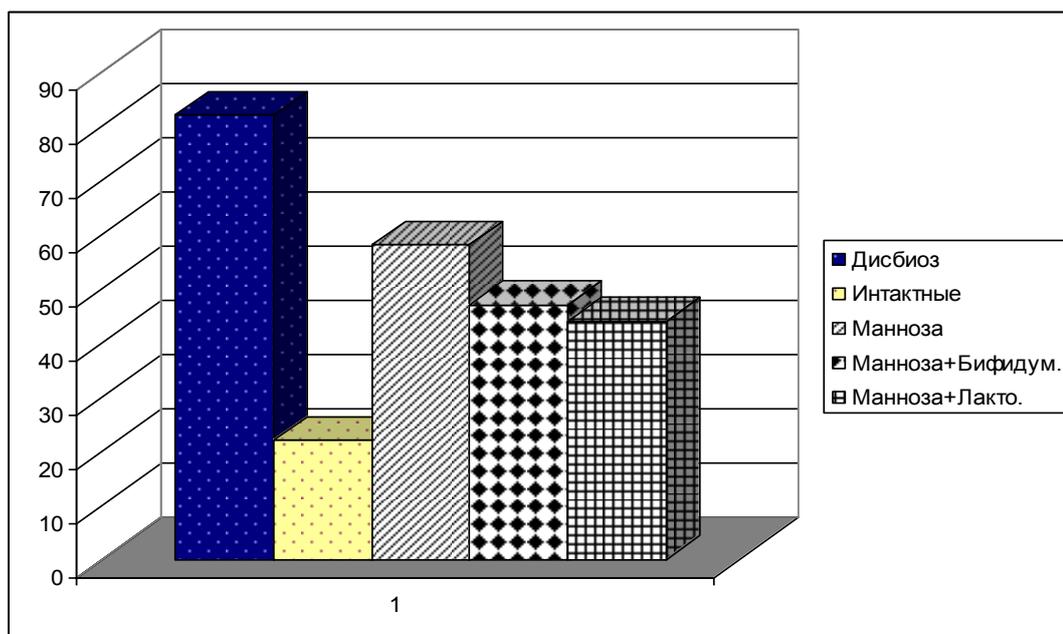


Рисунок 4.17 - Уровень (pg/ml) фактора некроза опухоли (TNF-а) при экспериментальном дисбиозе и его коррекции

Таким образом, установлена способность маннозы индуцировать экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов, которая свидетельствует об иммуностимулирующих свойствах маннозы.

4.4 Исследование пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов в опытах *in vivo* на цыплятах

4.4.1 Микрофлора ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе

Исследование пребиотической активности маннозосодержащих гидролизатов проводили на фоне индуцированного дисбиоза у опытной группы цыплят. В таблице 4.32 представлен качественный и количественный состав наиболее важных представителей микрофлоры ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе.

Таблица 4.32 - Сравнительная характеристика микрофлоры ЖКТ цыплят в норме и при дисбиозе

Микроорганизмы	Группы цыплят	
	С дисбиозом	Интактная
	Популяционный уровень микроорганизмов, lg КОЕ/г	
<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>Lactobacillus spp.</i>	5,1±0,2	7,8±0,1
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,8±0,2	9,7±0,2

Исследование микрофлоры кишечника цыплят, получавших антибиотик, выявило статистически достоверное уменьшение количества бактерий группы кишечной палочки, энтерококков, стафилококков, молочнокислых бактерий и бифидобактерий по сравнению с показателями интактных цыплят.

Таким образом, исследования микробиоценоза кишечника цыплят после применения антибиотика показали изменение популяционного уровня основных представителей кишечной микрофлоры, что свидетельствовало о наличии дисбиоза.

4.4.2 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,1 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом

Исследования микрофлоры ЖКТ цыплят показали, что добавление маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,1 % к массе корма в

течение 15 дней оказывало влияние на популяционный уровень основных представителей микробиоценоза кишечника цыплят (таблица 4.33).

Таблица 4.33 - Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,1 % к массе корма на микрофлору ЖКТ цыплят на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г фекалий				
	Группы цыплят				
	Контрольная с дисбиозом	Контрольная (интактная)	Опытная		
			Контрольное время, сутки		
5			10	15	
<i>E.coli lac⁺</i>	5,2±0,3	6,8±0,1	6,0±0,4	6,7±0,3	7,2±0,1
Сальмонеллы	3,1±0,4	2,7±0,2	3,6±0,3	3,5±0,4	3,6±0,1
Дрожжи	3,6±0,2	3,9±0,2	3,8±0,3	5,1±0,3	4,8±0,2
Стафилококки	2,4±0,3	5,0±0,3	3,8±0,2	3,2±0,4	3,5±0,3
Энтерококки	4,8±0,3	6,7±0,1	5,9±0,4	6,9±0,3	6,7±0,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,1±0,2	7,8±0,1	6,0±0,1	6,7 ±0,2	7,4±0,2
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,8±0,2	9,7±0,2	8,3±0,3	9,0±0,2	9,3±0,1

Через 5 дней кормления цыплят опытной группы кормом с добавлением 0,1 % маннозосодержащих гидролизатов количество бактерий *E. coli lac⁺* в содержимом толстого отдела кишечника оказалось достоверно выше, чем у цыплят с дисбиозом. Достоверного различия в популяционном уровне сальмонелл, дрожжей в кишечном содержимом цыплят опытной группы и двух контрольных групп не наблюдалось. Также наблюдалось достоверное повышение стафилококков и энтерококков в пробах химуса цыплят опытной группы по сравнению с показателями цыплят с дисбиозом, при этом их количество оказалось ниже, чем у цыплят интактной группы. Количество бифидобактерий и молочнокислых бактерий в кишечнике цыплят опытной группы составило 8,3±0,3 и 6,0±0,1 lg КОЕ/г соответственно,

что ниже популяционного уровня молочнокислых бактерий и бифидобактерий в кишечнике цыплят интактной группы.

Исследование микрофлоры кишечника цыплят через 10 дней после начала кормления кормом с добавлением 0,1 % маннозосодержащих гидролизатов показало достоверное увеличение количества дрожжевой микрофлоры и энтерококков до показателей, наблюдавшихся у интактной птицы. Отмечено незначительное увеличение бифидо- и лактобактерий, *E. coli lac⁺*, которое не является достоверным. Достоверного изменения популяционного уровня сальмонелл и стафилококков также не наблюдалось.

Применение корма с добавлением маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,1 % в течение 15 дней привело к дальнейшему увеличению популяционного уровня молочнокислых бактерий и бифидобактерий до $7,4 \pm 0,2$ и $9,3 \pm 0,1$ lg КОЕ/г соответственно, что являлось сопоставимым с уровнем этих микроорганизмов в кишечнике интактной птицы. Количество эшерихий и энтерококков в содержимом кишечника опытных цыплят также оказалось на уровне интактной птицы, при этом отмечен чуть повышенный уровень сальмонелл и дрожжей, пониженный уровень стафилококков относительно кишечника интактной птицы.

Следовательно, добавление к основному рациону цыплят 0,1 % маннозосодержащих гидролизатов способствует восстановлению нормального кишечного биоценоза цыплят, однако, эти изменения протекали медленно и не всегда имели статистически достоверный характер.

4.4.3 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом

Состав микрофлоры ЖКТ цыплят, получавших корм с добавлением маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 %, в течение 15 дней представлен в таблице 4.34.

Таблица 4.34 - Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 % к массе корма на микрофлору ЖКТ цыплят на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г фекалий				
	Группы цыплят				
	Контрольная с дисбиозом	Контрольная (интактная)	Опытная		
			Контрольное время, сутки		
5			10	15	
<i>E.coli lac⁺</i>	5,2±0,3	6,8±0,1	6,9±0,3	7,0±0,5	7,4±0,2
Сальмонеллы	3,1±0,4	2,7±0,2	3,6±0,4	3,6±0,4	3,4±0,1
Дрожжи	3,6±0,2	3,9±0,2	3,2±0,2	3,6±0,4	4,0±0,2
Стафилококки	2,4±0,3	5,0±0,3	3,8±0,2	4,2±0,3	4,0±0,2
Энтерококки	4,8±0,3	6,7±0,1	5,9±0,3	6,2±0,3	7,0 ±0,2
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,1±0,2	7,8±0,1	7,1±0,1	7,2±0,1	7,7±0,2
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,8±0,2	9,7±0,2	8,6±0,2	9,0±0,2	9,5±0,1

Применение корма с добавлением маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 % в рационе цыплят опытной группы в течение 5 дней способствовало достоверному увеличению в содержимом их кишечника *E.coli lac⁺* до 6,9±0,3 lg КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* до 8,6±0,2 lg КОЕ/г, *Lactobacillus spp.* до 7,1±0,1 lg КОЕ/г, а также стафилококков и энтерококков по сравнению с аналогичными показателями для цыплят с дисбиозом. Однако уровень этих микроорганизмов оказался ниже, чем в кишечнике

интактной птицы. Повышение концентрации маннозосодержащих гидролизатов в составе корма не оказало влияния на развитие сальмонелл и дрожжей, количество которых в содержимом толстого отдела кишечника птицы опытной группы достоверно не различалось со значениями, установленными у цыплят с дисбиозом.

Через 10 дней у цыплят опытной группы, получавших корм с содержанием маннозосодержащих гидролизатов 0,5 %, основные изменения в составе микробиоценоза кишечника выразились в незначительном колебании количества сальмонелл, эшерихий, лактобактерий и нарастании популяционного уровня бифидобактерий по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Через 15 дней после начала применения корма с 0,5 % маннозосодержащих гидролизатов в кишечнике цыплят опытной группы выявлены изменения популяционного уровня основных представителей ЖКТ. Количество *E.coli lac⁺* составило $7,4 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, энтерококков - $4,0 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, сальмонелл - $3,4 \pm 0,1$ lg КОЕ/г, что незначительно превосходит показатели для интактной птицы. По сравнению с интактной птицей отмечен более низкий уровень стафилококков и одинаковый уровень дрожжевой микрофлоры. Количество лактобактерий в содержимом толстого отдела кишечника цыплят составило $7,7 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, аналогичный уровень лактобактерий наблюдался в кишечнике интактной птицы. Популяционный уровень бифидобактерий в кишечном содержимом опытных цыплят достиг значения $9,5 \pm 0,1$ lg КОЕ/г, что незначительно отличается от показателей для интактной птицы.

Таким образом, введение в корм цыплятам маннозосодержащих гидролизатов в количестве 0,5 % к массе корма приводило к восстановлению популяционного уровня наиболее значимых представителей кишечного микробиоценоза. Однако динамика восстановления нормального биоценоза кишечника мало отличается от

скорости восстановления уровня нормофлоры при добавлении к корму маннанолигосахаридной добавки из расчета 0,1 %.

4.4.4 Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1 % к массе корма на микробиоценоз кишечника цыплят с экспериментальным дисбиозом

Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1 % к массе корма на количественный состав микрофлоры ЖКТ цыплят представлено в таблице 4.35.

Таблица 4.35 - Влияние маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1 % к массе корма на микрофлору ЖКТ цыплят на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г фекалий				
	Группы цыплят				
	Контрольная с дисбиозом	Контрольная (интактная)	Опытная		
			Контрольное время, сутки		
5			10	15	
<i>E.coli lac⁺</i>	5,2±0,3	6,8±0,1	7,6±0,4	7,1±0,1	6,6±0,2
Сальмонеллы	3,1±0,4	2,7±0,2	3,2±0,4	2,6±0,2	2,4±0,1
Дрожжи	3,6±0,2	3,9±0,2	4,0±0,1	4,4±0,3	4,6±0,3
Стафилококки	2,4±0,3	5,0±0,3	3,8±0,2	4,1±0,3	3,8±0,2
Энтерококки	4,8±0,3	6,7±0,1	6,9±0,3	7,0±0,1	7,3±0,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,1±0,2	7,8±0,1	8,1±0,2	8,3±0,2	8,5±0,1
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,8±0,2	9,7±0,2	9,3±0,2	9,7±0,1	9,8±0,1

Через 5 дней после начала применения маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1,0 % к массе корма в кормлении цыплят в содержимом их кишечника наблюдалось достоверное увеличение количества *E.coli lac⁺*, стафилококков, энтерококков, бифидобактерий и

лактобактерий по сравнению с уровнями этих микроорганизмов в кишечнике цыплят с дисбиозом. Достоверного изменения популяционного уровня сальмонелл и дрожжей не наблюдалось. При этом количество энтерококков и *Lactobacillus* spp. было сопоставимо с показателями для интактных цыплят, популяционный уровень *Bifidobacterium* spp. незначительно ниже, а *E.coli lac*⁺ выше контрольного значения.

Исследования микрофлоры кишечника цыплят опытной группы через 10 дней эксперимента показали незначительные изменения популяционного уровня основных представителей ЖКТ относительно предыдущего срока исследования с тенденцией к снижению для *E.coli lac*⁺ и сальмонелл и к повышению для молочнокислых бактерий и бифидобактерий. Количество лактобактерий $8,3 \pm 0,2$ lg КОЕ/г и бифидобактерий $9,7 \pm 0,1$ lg КОЕ/г относительно аналогичных показателей цыплят с дисбиозом и интактных цыплят свидетельствует о том, что применение маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1,0 % к массе корма способствует восстановлению популяционного уровня лакто – и бифидобактерий.

Применение маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1,0 % к массе корма на протяжении 15 дней привело к тому, что в ЖКТ цыплят количество *E.coli lac*⁺ составило $6,6 \pm 0,2$ lg КОЕ/г, сальмонелл - $2,4 \pm 0,1$ lg КОЕ/г, дрожжей - $4,6 \pm 0,3$ lg КОЕ/г, энтерококков - $7,3 \pm 0,3$ lg КОЕ/г. Сопоставимые количества микроорганизмов наблюдались в кишечнике интактной птицы. По сравнению с интактной птицей отмечен более низкий уровень стафилококков. В сравнении с предыдущим сроком исследования достоверного увеличения популяционного уровня молочнокислых бактерий и бифидобактерий в кишечном содержимом опытной птицы не наблюдалось. По окончании эксперимента количество *Lactobacillus* spp. составило $8,5 \pm 0,1$ lg КОЕ/г, *Bifidobacterium* spp. - $9,8 \pm 0,1$ lg КОЕ/г.

Таким образом, у птицы, получавшей маннозосодержащие гидролизаты из расчета 1,0 % к массе корма, наиболее значимые изменения количественного

состава представителей ЖКТ цыплят происходили за счет восстановления бифидо- и лактобактерий. Добавление маннозосодержащих гидролизатов в количестве 1,0 % к массе корма уже через 10 дней применения способствовало полному восстановлению популяции молочнокислых бактерий и бифидобактерий.

РАСЧЕТ СЕБЕСТОИМОСТИ МАННОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПО ПРЕДЛАГАЕМОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Разработанная нами биотехнология получения маннозы и маннозосодержащих гидролизатов основана на ферментативном гидролизе глюкоманнана древесных опилок с помощью ферментного препарата β -маннаназы *B. subtilis 168* и предназначена для применения в пищевой и кормовой промышленности. Имеющиеся на сегодняшний день на рынке импортные биологически активные добавки с содержанием маннозы имеют стоимость от 18 до 24 рублей за 1 г.

Для оценки конкурентоспособности предлагаемой технологии был произведен расчет себестоимости 1 г маннозосодержащих гидролизатов.

Таблица 5.1 – Смета затрат на производство 1 г маннозосодержащих гидролизатов

Затраты	Стоимость, руб
Стоимость глюкоманнана, в т. ч.:	2,1
стоимость исходного сырья (древесные опилки)	0,8
стоимость химических реагентов, затрачиваемых на экстракцию глюкоманнана	1,3
Стоимость ферментного препарата β -маннаназы <i>B. subtilis 168</i>	1,5
Энергоресурсы, амортизация оборудования на стадиях экстракции глюкоманнана, проведения гидролиза и сушки полученного препарата маннозосодержащих гидролизатов	4,2
Оплата труда	7,7
Итого	15,5

Таким образом, себестоимость 1 г маннозосодержащих гидролизатов при их производстве по предлагаемой технологии составляет не более 16 рублей за 1 г, что делает конкурентоспособным отечественный препарат маннозосодержащих гидролизатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения работы обоснован выбор древесины ели обыкновенной в качестве растительного сырья для получения маннозы и манноолигосахаридов.

Исследован процесс ферментативного расщепления глюкоманнана древесных опилок под действием β -маннаназы различного происхождения. Для получения маннозы и маннозосодержащих гидролизатов выбрана β -маннаназа *B. subtilis*.

Установлены оптимальные условия гидролиза глюкоманнана древесины ели обыкновенной β -маннаназой *B. subtilis*, обеспечивающие максимальную степень гидролиза. Определен качественный и количественный состав маннозосодержащих гидролизатов.

Разработана биотехнология маннозы и маннозосодержащих гидролизатов, основанная на гидролизе глюкоманнана древесных опилок под действием β -маннаназы *B. subtilis*. Достоинством предлагаемой технологии является невысокая себестоимость маннозосодержащих гидролизатов, обусловленная низкой стоимостью древесных опилок, высокой активностью спиртоосажденного фермента β -маннаназы и отсутствием необходимости выделения из гидролизатов маннозы и ее очистки.

В опытах *in vitro* и *in vivo* подтверждена пребиотическая активность маннозы. Применение маннозы в условиях экспериментального дисбиоза у мышей способствовало увеличению количества бифидо- и лактобактерий.

Исследовано влияние маннозы и ее сочетаний с пробиотиками при коррекции экспериментального дисбиоза у мышей на уровень

провоспалительного фактора некроза опухоли и содержание противовоспалительного интерлейкина IL-10.

Изучены пребиотические свойства маннозосодержащих гидролизатов в сравнении с маннозой и инулином (Raftiline) в опытах *in vitro* и установлена их пребиотическая активность.

В опытах *in vivo* на фоне экспериментального дисбиоза у цыплят выявлена бифидогенная и лактогенная активность маннозосодержащих гидролизатов.

ВЫВОДЫ

1. Ель обыкновенной является перспективным источником растительного сырья для получения маннозы и манноолигосахаридов, содержание маннанов в древесине которых 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*, обладающую более высокой каталитической активностью и скоростью расщепления глюкоманнана по сравнению с β -маннаназой *Tr. harzianum*.

3. Показано, что максимальная степень деструкции глюкоманнана древесины ели обыкновенной β -маннаназой *B. subtilis* 168 составляет 88% при оптимальных температуре и pH и дозировке фермента 10 ед/г субстрата, продолжительности гидролиза 3 ч; в гидролизатах обнаружена манноза, маннотриоза, маннотетроза, маннопентоза.

4. Применение маннозы при культивировании *B. bifidum* стимулировало их рост и развитие в большей степени, чем другие моносахариды и инулин из топинамбура, что подтверждает пребиотические свойства этого углевода.

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

6. 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.

7. 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.

8. 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance / OS Korneeva, IV Cheremushkina, AS Glushchenko, NA Mikhaïlova et al. // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 2012. - № 5. – P. 67-70.
2. Congenital disorder of glycosylation type 1b. Experience with mannose treatment / E Martín Hernández, AI Vega Pajares, B Pérez González, MJ Escay Crespo et al. // *An Pediatr (Barc).* – 2008. – Vol. 69. -№ 4. - P. 358-365.
3. Геммицеллюлозы зерна злаков и ферменты, катализирующие их расщепление / Н.А. Родионова, Л.В. Капрельянц, П.В. Середницкий, А.Ю. Килимник // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1992. – Т. 28. - вып. 5. – С. 645-664.
4. Moreira, L. R. S. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems / L. R. S. Moreira, E. X. F. Filho // *Appl Microbiol Biotechnol* – 2008. – Vol. 79. – P. 165–178.
5. Изучение строения дрожжевых α -D-маннанов методом спектроскопии С-ЯМР / П. Кочиш, Л. Маслер, Й. Шандула, А.И. Усов и др. // *Биоорганическая Химия.* – 1994. – Т.10, вып. 4. – С. 536-543.
6. Characterisation of water-soluble galactoglucomannan from Norway spruce wood and thermomechanical pulp / S. Willför et al. // *Carbohydr Polym.* - 2003. – V. 52. – P. 175–187.
7. Глюкоманнан корней интродуцированного на Урале *Eremurus fuscus* / О. В. Анулов и др. // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1995. – Т. 31. - № 1. - С. 87-91.
8. Structural of a glucomannan from *Lupinus varius* seed / O. Ishurd et al. // *Carbohydr Polym.* - 2006. – Vol. 65. – P. 410–413.
9. Targeted depletion of tumour-associated macrophages by an alendronate-glucomannan conjugate for cancer immunotherapy / X. Zhan, L. Jia,

Y. Niu, H. Qi et al. // *Biomaterials*. – 2014. - Vol. 35. - № 38 – P. 10046-10057.
doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.09.007.

10. Егоров, А.В. Состав и структура макромолекулы галактоманнана семян *Gleditsia ferox* / А.В. Егоров, Н.М. Местечкина, В.Д. Щербухин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2004. – Т.40. - вып. 3. – С. 370-375.

11. Щербухин, В. Д. Галактоманнаны отечественной флоры / В. Д. Щербухин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1993. – Т. 29. - вып. 6. – С. 803–813.

12. Structural aspects of watersoluble galactomannan from the seeds of *Retama raetam* / O. Ishurd et al. // *Carbohydr Polym*. - 2004. - Vol. 58. P. 41–44.

13. Характеристика и структура галактоманнана Астрала серпоплодного (*Astragalus falcatus* Lam.) / О. В. Анулов и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1995. – Т. 31. – №. 6. – С. 645–649.

14. Егоров, А. В. Установление первичной и тонкой структуры галактоманнана семян *Gleditsia tracanthos* f. *Inermis* L. / А. В. Егоров, Н. М. Местечкина, В. Д. Щербухин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2003. – Т. 39. – № 4. – С. 452–456.

15. Местечкина, Н. М. Изучение водорастворимых полисахаридов плодов верблюжьей колючки *Alhaagi persarum* L. / Н. М. Местечкина, К. Довлетмурадов, В. Д. Щербухин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1993. – Т. 29. – вып. 1. – С. 170–173.

16. Structural characterization of a highly branched galactomannan from the lichen *Peltigera canina* by methylation analysis and NMR-spectroscopy / S. Omarsdottir et al. // *Carbohydr Polym*. - 2006. – Vol. 63. – P. 54–60.

17. Анулов, О.В. Галактоманнаны семян бобовых отечественной флоры: Автореф... дис. канд. биол. наук. – Москва: Ин-т биохимии им. А. Н. Баха РАН, 2000. – 24 с.

18. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*) / J. Lundqvist et al. // *Carbohydr Polym.* - 2002. – Vol. 48. - P. 29–39.
19. Molecular cloning of a cDNA encoding a β -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*) / J.D. Bewley, R.A. Burton, Y. Morohashi, G.B. Fincher // *Planta.* - 1997. – Vol. 203. - № 4. – P. 454-459.
20. Endo-beta-1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action / B. Xu, P. Hagglund, H. Stalbrand, J.C. Janson // *J. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 18. – p. 267-277.
21. Purification and some properties of an endo-1,4-beta-D-mannanase from a marine mollusc, *Littorina brevicula* / I. Yamaura, Y. Nozaki, T. Matsumoto, T. Kato // *J. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 60. – P. 674-676.
22. Kurakake, M. Production of beta-mannanase and beta-mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties / M. Kurakake, T. Komaki // *Curr Microbiol.* – 2001. - Vol. 42. - № 6. – P. 377-80.
23. Production and properties of beta-mannanase by free and immobilized cells of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 / A.M. Hashem, A.M. Ismail, M.A. El-Refai, A.F. Abdel-Fattah // *Cytobios.* – 2001. – Vol. 105. – P. 115-130.
24. Production of galacto-manno-oligosaccharides from guar gum by beta-mannanase from *Penicillium oxalicum* SO / M. Kurakake T. Sumida, D. Masuda, S. Oonishi et al. // *J Agric Food Chem.* – 2006. – Vol. 54. - P. 7885-7889.
25. A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* β -mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates / P. Hagglund, T. Eriksson, A. Collén, W. Nerinckx et al. // *J. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 101. - P. 37-48.
26. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii* / A. Sachslehner, G. Foidl, N. Foidl, G. Gübitz et al. // *J. Biotechnol.* - 2000. – Vol. 80. - P. 127–134.

27. Purification and properties of *Bacillus subtilis* SA-22 endo-1,4-beta-D-mannanase / H.Y Yu, Sun Y.M, Wang W.J, Yang Y.S et al. // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* - 2003. – Vol. 19. - № 3. – P. 327–330.
28. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 / Y. Ma, Y. Xue, Y. Dou, Z. Xu et al. // *Extremophiles.* – 2004. – Vol. 8. - № 6. – P. 447–454.
29. Towards designer cellulosomes in Clostridia: mannanase enrichment of the cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum* / S. Perret, A. Bélaich, HP Fierobe, JP Bélaich et al. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* - 2004. – Vol. 186. - № 19. – P. 6544-6552.
30. A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* / K.L. Braithwaite, G.W. Black, G.P. Hazlewood, B.R. Ali et al. // *Biochem J.* - 1995. – Vol. 305. – P. 1005–1010.
31. Kansoh, A. L. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp / A. L. Kansoh, Z. A. Nagieb // *Anton. van. Leeuwenhoek.* - 2004. – Vol. 85. P. 103–114.
32. Stoll, D. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi* / D. Stoll, H. Stalbrand, R. A. Warren // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. – Vol. 65. - № 6. – P. 2598–2605.
33. Purification and characterization on extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 / G.D. Duffaud C.M. McCutchen, P. Leduc, K.N. Parker et al. // *Appl. Environ Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. - № 1. – P. 169-177.
34. Sequencing and expression of a beta-mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, and of the recombinant enzyme / M.D. Gibbs, R.A. Reeves, A. Sunna, P.L. Bergquist // *Curr Microbiol.* – 1999. – Vol. 39. - № 6. – P. 351-357.

35. Expression, cloning, purification and characterization of a beta-1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus* / S. Christgau, S. Kauppinen, J. Vind, L.V. Kofod et al. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* - 1994. - Vol. 33. - № 5 – P. 917–925.

36. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *T. lanuginosus* IMI 158749) / V. Puchart, M. Vrsanská, P. Svoboda, J. Pohl et al. // *Biochimica et biophysica Acta.* - 2004. – Vol. 1674. - № 3 – P. 239–250.

37. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a beta-mannanase / P. Ademark, A. Varga, J. Medve, V. Harjunpää et al. // *J. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 63. - № 3 – P. 199-210.

38. Yoshida, S. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an enzyme from *Bacillus circulans* K-1 that degrades guar gum / S. Yoshida, Y. Sako, A. Uchida // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1998. – Vol. 62. - № 3. – P. 514–520.

39. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme / Y. Hatada, N. Takeda, K. Hirasawa, Y. Ohta et al. // *Extremophiles.* – 2005. – Vol. 9. - № 6. – P. 497-500.

40. Pat. 6566114, US, Mannanases / M. S. Kauppinen et al.; applicant Novozymes, A/s. - № 09/339159; filing date: 24.06.1999; publication date: 20.05.2003.

41. Study on the production of beta-mannanase by *Bacillus* M50 / Y. Chen, J. Long, L. Liao, Y. Zhang et al. // *Wei Sheng Wu Xue Bao.*– 2000. – Vol. 40. - № 1 – P. 62-68.

42. A β -mannanase from *B. subtilis* B36: purification, properties sequencing, gene cloning and expression in *E. coli* / YN. Li, K. Meng, YR. Wang, B. Yao // *Z. Naturforsch (C).* - 2006. – Vol. 61. - № 11-12 – P. 840–846.

43. Cloning and sequencing of β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39 / NS. Mendoza, M. Arai, K. Sugimoto, M. Ueda et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1995. – Vol. 1243. - № 3. – P. 552-554.
44. Получение рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* – продуцента β -маннаназы / И. В. Черемушкина, Д. А. Черенков, Е. П. Анохина, Ю. А. Рыбаков и др. // *Биотехнология* – 2011. - № 5. – С. 32-37.
45. A gene encoding a novel multidomain beta-1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp / A. Sunna, MD. Gibbs, CW. Chin, PJ. Nelson et al. // *Appl. Environ Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. - № 2. – P. 664-670.
46. Kataoka, N. Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *C. tertium* KT-5A from lotus soil / N. Kataoka, Y. Tokiwa // *J. Appl. Microbiol.* – 1998 - Vol. 84. - № 3. – P. 357–367.
47. Sequence of the *Clostridium thermocellum* mannanase gene man26B and characterization of the translated product / J. Kurokawa, E. Hemjinda, T. Arai, S. Karita et al. // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2001. – Vol. 65. - № 3. – P. 548-554.
48. Pason, P. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides / P. Pason, KL. Kyu, K. Ratanakhanokchai // *Appl Environ Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. - № 4. - P. 2483-2490.
49. A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains / K.M. Cho, SY. Hong, SM. Lee, YH. Kim et al. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – Vol. 73. - № 3. – P. 618-630.
50. A highly thermostable endo-(1,4)- β -mannanase from the marine bacterium *Rhodotermus marinus* / O. Politz, M. Krahl, KK. Thomsen, R. Borriss // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53. - № 6. – P. 715-721.

51. Efficient production of mannan-degrading enzymes by the basidiomycete *Sclerotium rolfsii* / A. Sachslehner, D. Haltrich, G. Gübitz, B. Nidetzky et al. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 1998. – Vol. 70. – P. 939-953.

52. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme // N. Arcand, D. Kluepfel, FW. Paradis, R. Morosoli et al. // *Biochem J.* – 1993. – Vol. 290. – P. 857-863.

53. Franco, P. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4 / P. F. Franco, H. M. Ferreira, E. X. Filho // *Biotechnol Appl. Biochem.* - 2004. – Vol. 40. – P. 255–259.

54. Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei* / H. Stelbrand et al. // *J. Biotechnol.* - 1993. – Vol. 29. – P. 229-242.

55. Cloning, DNA sequencing, and expression of the beta- 1,4-mannanase gene from a marine, *Vibrio* sp. strain MA-138 / Y. Tamaru et al. // *J. Ferment. Bioeng.* - 1997. – Vol. 83. – P. 201–205.

56. Пат. 2287570 Российская Федерация, МПК C12N 1/14, C12N 9/42, C12R 1/80 Штамм мицелиального гриба *Penicillium funiculosum* - продуцент комплекса карбогидраз, содержащего целлюлазы, бета-глюканызы, ксиланызы, пектиназы и маннанызы / Окунев О. Н., Сеницын А. П., Черноглазов В. М., Соловьева И. В.; заявитель и патентообладатель ООО НПК "Фермтек". - № 2002132942/13; заявл. 09.12.2002.; опубл. 20.11.2006, Бюл. № 32.

57. Пат. 2195490 Российская Федерация, МПК 7 C12N1/14, C12N9/42 Штамм мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* - продуцент комплекса карбогидраз, содержащего целлюлазы, бета-глюканызы, ксиланызы, пектиназы и маннанызы / Окунев О. Н., Сеницын А. П., Черноглазов В. М., Беккаревич А.О.; заявитель и патентообладатель ООО

НПК "Фермтек". - № 2001105482/13; заявл. 28.02.2001.; опубл. 27.12.2002, Бюл. № 36.

58. Пат. 2303057 Российская Федерация, МПК C12N 1/14, C12N 9/42, C12R 1/66 Штамм мицелиального гриба *Aspergillus aculeatus* - продуцент комплекса карбогидраз, содержащего ксиланазы, бета-глюканазы, пектиназы и ксилоглюканазы / Окунев О. Н., Сеницын А. П., Черноглазов В. М.; заявитель и патентообладатель ООО НПК "Фермтек". - № 2005135021/13; заявл. 14.11.2005.; опубл. 20.07.2007, Бюл. № 20.

59. Pat. EP0851914. Purified mannanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and method of preparation / Bodie E. A., Cuevas W. A. Kantelinen A. K.; applicant GENENCOR INTERNATIONAL, INC. - № EP19960935820; filing date:13.09.1996; publication date: 11.06.2003.

60. Ethier, N. Gene Cloning, DNA Sequencing, and Expression of Thermostable b-Mannanase from *Bacillus stearothermophilus* / N. Ethier, G. Talbot, J. Sygusch // *Appl. and Envir. Microbiology*. - 1998. - Vol. 64. - № 11. - P. 4428–4432.

61. Cloning, sequence analysis and heterologous expression of a beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2 / Q. Zhang, X. Yan, L. Zhang, W. Tang // *Mol Biol (Mosk)*. - 2006. – Vol. 40. - № 3. – P. 418-424.

62. Xu, B. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene / B. Xu, D. Sellos, J.C. Janson // *J. Biochem*. - 2002. – Vol. 269. - № 6. – P. 1753-1760.

63. β -Маннаназы различного происхождения: получение, характеристика и перспективы практического применения / Д.А.Черенков, О.С. Корнеева, Е.П. Анохина, Е.Г. Новоселова и др. // *Успехи современной биологии*. – 2010. – Т. 130. - № 2. – С. 190-199.

64. Production, partial purification and properties of β -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra

paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* / C. Regalado et al. // J. Sci. Food Agric. - 2000. – Vol. 80. – P. 1343–1350.

65. Pat. № 6376445. Detergent compositions comprising a mannanase and a protease. J. P. Bettioli, M. S. Showell. 2002.

66. Li, W. Purification and characterization of an endo-beta-1, 4-mannanase from *Bacillus subtilis* BM9602 / W. Li, Z. Dong, F. Cui // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2000. – Vol. 40. - № 4. – P. 420-424.

67. Cavanagh, K. Measurement of caprine plasma beta-mannanase with a p-nitrophenyl substrate / K. Cavanagh, RW. Dunstan, MZ. Jones // Am. J. Vet Res. – 1993. – Vol. 44. – P. 681-684.

68. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (man 1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme / ME. Setati, P. Ademark, W.H. van Zyl, B. Hahn-Hagerdal et al. // Protein Expr. Purif. – 2001. – Vol. 21. – P. 105-114.

69. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34 / Z. Jiang et al. // Carbohydrate Polymers. – 2006. – V. 66. - № 1. – P. 88-96.

70. Akino, T. Characterization of three beta-mannanase of an alkalophilic *Bacillus* sp. / T. Akino; N. Nakamura; K. Horikoshi // J. Agric. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 52. – P. 773-779.

71. Пат. 2090618 Российская Федерация, МПК 6С13К13/00 Способ получения моносахаров и их смесей / Чепурной И.П., Марченко А.И.; заявитель и патентообладатель Чепурной И.П. - № 95118198/13; заявл. 26.10.1995; опубл. 20.09.1997.

72. Пат. 2065499 Российская Федерация, С13К13/00 Способ получения д-маннозы из семян растения рода гледичия / Щербухин В.Д.; Местечкина Н.М.; заявитель и патентообладатель Институт биохимии им.А.Н. Баха РАН. - № 94024334/13; заявл. 29.06.1994.

73. Pat. 2000139490, JP, Production of mannose and manooligosaccharide / Yoshikawa G., Yano T.; applicant UNITIKA LTD; FOOD MARKETING RES & INFORMATION CENTER. - № JP19980314772; filing date: 11.05.1998; publication date: 23.05.2000.

74. Pat. 2006034166, JP, Method for producing degraded product of mannan / Tanaka M., Oka K.; applicant MIYARISAN PHARMA. - № JP20040218547; filing date: 27.07.2004; publication date: 09.02.2006.

75. Pat. JPH089989, JP, Production of beta-mannosyloligosaccharide / Fujimoto, Hiroshi, Ajisaka, Katsumi; applicant MEIJI MILK PROD CO LTD. - № JP19940173151; filing date: 04.07.1994; publication date: 16.01.1996.

76. Чепурной, И.П. Питание и здоровье человека / И.П. Чепурной. - М.: Медицина, 2003. - 208 с.

77. Holmes, D. Biomarkers: Mannose levels predict insulin resistance / D. Holmes // Nat Rev Endocrinol. – 2016. – Vol. 12. - № 9. – P. 496. doi: 10.1038/nrendo.2016.119.

78. Пат. 2097041 Российская Федерация, МПК А61К 31/70 Способ лечения сахарного диабета / Чепурной И.П., Больбат К.Э.; заявитель и патентообладатель Чепурной И.П. - № 94042023/14; заявл. 22.11.1994.; опубл. 27.11.1997.

79. D-mannose: a promising support for acute urinary tract infections in women. A pilot study / L. Domenici, M. Monti, C. Bracchi, M. Giorgini et al. // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2016. – Vol. 20. - № 13. – P. 2920-2925.

80. Kranjčec, B. D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial / B. Kranjčec, D. Papeš, S. Altarac // World J Urol. – 2014. – Vol. 32. - № 1. –P. 79-84. doi: 10.1007/s00345-013-1091-6.

81. Sharma, V. Mannose metabolism: more than meets the eye / V. Sharma, M. Ichikawa, HH. Freeze // Biochem Biophys Res Commun. – 2014. – Vol. 453. - № 2. – P. 220-228. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.021.

82. The role of mannose binding lectin on fever episodes in pediatric oncology patients / F. Fekete, B. Fadgyas, É. Papp, Á. Szilágyi et al. // *Pathol Oncol Res.* – 2016. – Vol. 22. - № 1. - P. 139-143. doi: 10.1007/s12253-015-9992-x.

83. Tarelli, E. Resistance to deglycosylation by ammonia of IgA1 O-glycopeptides: implications for the beta-elimination of O-glycans linked to serine and threonine / E. Tarelli // *Carbohydr. Res.* – 2007. – Vol. 342. - № 15. – P. 2322-2325.

84. Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization / L. Huang, S. Biolsi, K. R. Bales, U. Kuchibhotla // *Anal. Biochem.* – 2006. – Vol. 349. - № 2. – P. 197–207.

85. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1b. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy / R. Niehues et al. // *J Clin Invest.* - 1998. - Vol. 101. - № 7. - P. 1414-1420.

86. de Lonlay, P. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib / P. de Lonlay, N. Seta // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – Vol. 1792. - № 9. – P. 841-843.

87. Оптимизация ферментативного гидролиза трудногидролизуемых маннанов и исследование пребиотических свойств маннозы / И.В. Черемушкина, А.С. Глущенко, Е.П. Анохина, Н.А. Чигирина и др. // *Биотехнология.* – 2010. - № 5. – С. 56-61.

88. Пат. 2096974 Российская Федерация, МПК А23L 1/29 Способ коррекции углеводного состава пищевых продуктов общего и специального назначения / Чепурной И.П., Кунижев С.М.; заявитель и патентообладатель Чепурной И.П. - № 95111145/13; заявл. 28.06.1995.; опубл. 27.11.1997.

89. Пат. 2335289 Российская Федерация, МПК А61К 31/715, А61Р 25/00 Биологически активный гетерогликозид для коррекции патологических состояний центральной нервной системы / Стовбун С. В., Литвин А. А., Якимук П. В., Сергиенко В. И.; заявитель и патентообладатель ООО «Группа

«Новые Технологии». - № 2006117376/15; заявл. 22.05.2006.; опубли. 10.12.2007, Бюл. № 34.

90. Charalampopoulos, D. Prebiotics and probiotics science and technology. V. 1. / D. Charalampopoulos, R.A. Rastall. - Springer Science & Business Media, 2009.

91. Панин, А.Н. Иммунобиология и кишечная микрофлора / А.Н. Панин, Н.И.Малик, Е.В. Малик. - М.: Аграрная наука, 1998.

92. Панин, А.Н. Формирование кишечного микробиоценоза у цыплят / А.Н. Панин, Н.И. Малик, И.П. Степаненко // Ветеринария. – 2000. - № 7. – С. 23-25.

93. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М.Д. Ардатская, С.В. Бельмер, В.П. Добрица, С.М. Захаренко и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. - № 5. - С. 13-50.

94. Воромей, Э.И. Современные взгляды на антибиотикотерапию больных животных / Э.И. Воромей, М.Л. Жолнерович // Ветеринария. – 1999. - №1. - С. 43-46.

95. Тараканов, Е.В. Новые биопрепараты для ветеринарии / Е.В. Тараканов, Т. А. Николичева // Ветеринария. – 2000. - №7. – С. 45-50.

96. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С.А. Шевелева // Вопросы питания. – 1999. - Т.68. - №2. - С. 34-38.

97. Коршунов, В.М. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника / В.М. Коршунов, Б.А. Ефимов, А.П. Пикина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2000. - №3. - С. 86-91.

98. Семенихина, В.Ф. Кисломолочные продукты нового поколения / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова // Молочная промышленность. – 1999. - №7. - С. 29-30.

99. Ziemer, C.J. An overview of probiotics, prebiotics and sinbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies / C.J. Ziemer, G.R. Gibson // *International Dairy Journal*. - 1998. - №8. - P. 473-479.
100. Крюков, В. Дрожжи в кормлении птиц / В. Крюков, В. Бевзюк // *Птицеводство*. – 1999. - №6. - С. 22-24.
101. Interaction effect of whole wheat feeding and mannanoligosaccharides supplementation on growth performance, haematological indices and caecal microbiota of cockerel chicks / AO. Oso, OY. Erinle, GA. William, ACJ. Ogunade // *Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. – 2015. – Vol. 99. - № 5. – P. 919-923. doi: 10.1111/jpn.12314.
102. Effects of supplemental mannanoligosaccharides on growth performance, faecal characteristics and health in dairy calves / C. Kara, H. Cihan, M. Temizel, S. Catik et al. // *Asian-Australas J Anim Sci*. – 2015. - Vol. 28. - № 11. - P. 1599-1605. doi: 10.5713/ajas.15.0124.
103. Somogyi, M.J. Determination of reducing sugar / M.J. Somogyi // *J. Biol. Chem*. – 1952. – Vol. 195. – P. 19-28.
104. Yoon, K.H. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli* / K.H. Yoon, S. Chung, B.L. Lim // *J. Microbiol*. - 2008. - Vol. 46. - № 3. - P. 344-349.
105. Биология и микробиология: учебное пособие / Г.П. Шуваева и др. - Воронеж. гос. технолог. акад. Воронеж, 2003. - 300 с.
106. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.1. Микрофлора человека и животных и её функции / Б.А. Шендеров. – М.: ГРАНТЬ, 1998. – 287 с.
107. Тараканов, Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы / Б.В. Тараканов. - М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
108. Грачев, Ю.П. Математические методы планирования эксперимента / Ю.П. Грачев, Ю.М. Плаксин. - М.: ДеЛи принт, 2005. - 296 с.

109. Анохина, Е.П. Разработка биотехнологии β -маннаназы на основе рекомбинантного штамма *B. subtilis* 168: Автореф... дис. канд. техн. наук. – Воронеж: ФГБОУ ВПО ВГУИТ, 2011. – 23 с.

110. Чигирина, Н.А. Биодеструкция маннанов с целью улучшения продуктов: Автореф... дис. канд. техн. наук. – Воронеж: ГОУ ВПО ВГТА, 2006. – 24 с.

111. Sachslehner, A. Purification and some properties of a thermostable acidic endo- β -1,4-D-mannanase from *Sclerotium (Athelia) rolfsii* / A. Sachslehner, D. Haltrich // FEMS Microbiol. Lett. -1999. – Vol. 177. - № 1. – P. 47-55.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ НИИВС им.
И.И. Мечникова
Зверев В. В.

« 08 02 » 2017 г.

АКТ

исследовательских испытаний применения маннозы при коррекции
экспериментального дисбиоза у лабораторных животных

Мы, нижеподписавшиеся, представители Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»: д.м.н., профессор Михайлова Н.А., к.б.н. Андропова Н.И. и представители Воронежского государственного университета инженерных технологий: д.б.н., профессор Корнеева О.С., аспирант Радиф З.Х., составили настоящий акт о том, что в период с 21.11.2016 по 01.02.2017 г. на базе лаборатории микробиологии условно патогенных бактерий ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова были проведены испытания по коррекции экспериментального дисбиоза у лабораторных мышей линии NMRI весом 14-16 г препаратом маннозы в сравнении с коммерческими пробиотиками «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин». Маннозу (в количестве 0,02 % от массы опытных животных), «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин» вводили перорально мышам на фоне экспериментального дисбиоза. Дозы препаратов рассчитывали, исходя из рекомендуемых для человека норм. Для создания экспериментального дисбиоза проводили деконтаминацию нормальной микрофлоры мышей с помощью антибиотика доксициклина гидрохлорида (таблица 1). Исследование микрофлоры кишечника экспериментальных животных проводили по 3 пробам фекальных масс от 5 мышей.

Таблица 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

Результаты исследования микрофлоры ЖКТ мышей при введении в суточный рацион питания маннозы и пробиотических препаратов «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин», представлены в таблице 2.

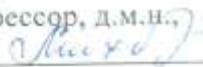
Таблица 2

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			
E.coli lac ⁻	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
Bifidobacterium spp.	10 ³	10 ³	10 ³
Lactobacillus spp.	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ¹¹
контрольное время – 10 суток			
E.coli lac ⁻	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶
Bifidobacterium spp.	10 ³	10 ³	10 ³
Lactobacillus spp.	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹¹
контрольное время – 15 суток			
E.coli lac ⁻	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶
Bifidobacterium spp.	10 ³	10 ³	10 ³
Lactobacillus spp.	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹¹

Установлено, что манноза способствовала восстановлению состава и численности индигенной микрофлоры мышей в условиях экспериментального дисбиоза уже на 5 сутки после начала ее введения, что свидетельствует об ее пребиотическом действии. Манноза оказывала такое же действие на восстановление микрофлоры мышей на фоне индуцированного дисбиоза, как и коммерческие пробиотические препараты «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин».

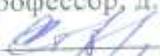
Представители ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова:

Профессор, д.м.н.,
 Михайлова Н.А.

К.б.н.
 Андропова Н.И.

Представители ФГБОУ ВО ВГУИТ:

Аспирант
 Радиф З. Х.

Профессор, д. б. н.
 Корнеева О. С.