

Выбор ферментного препарата для получения маннозосодержащих гидролизатов с пребиотической активностью

Зейд Х. Радиф	¹	Zeyadkhalouf@mail.ru
Екатерина П. Анохина	¹	katya_anoh@mail.ru
Ольга С. Корнеева	¹	korneeva-olgas@yandex.ru

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

Реферат. Манноза и манноолигосахариды обладают рядом функциональных свойств, что подтверждает необходимость исследования их получения. Манноза, являясь незаменимым углеводным компонентом иммуноглобулинов, проявляет противовоспалительные, пребиотические, иммуностимулирующие свойства и может быть использована для профилактики и лечения различных патологических состояний. Манноолигосахариды обладают пребиотической и антиоксидантной активностью. Потенциальный источник маннозы и манноолигосахаридов - маннаны растительного сырья, ферментативная обработка которых является перспективным и экологически безопасным способом их получения. В качестве растительного сырья для выделения маннаноов выбрана древесина ели обыкновенной. Было исследовано влияние дозировки ферментных препаратов β -маннаназы *B. subtilis* и *Tr. harzianum* и продолжительности гидролиза на эффективность гидролиза маннаноов древесины ели обыкновенной. Установлены рациональные параметры процесса гидролиза маннаноов 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, pH 7.0. Для β -маннаназы *Tr. harzianum* - дозировка ферментного препарата 15 ед/г, продолжительность 4 ч, температура 60 °С, pH 4.5. Была исследована способность маннозосодержащих гидролизатов, полученных при ферментативном гидролизе маннаноов, стимулировать развитие бифидобактерий *in vitro* в сравнении с инулином Raftiline и маннозой. Изученные гидролизаты обладали выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий на протяжении всего процесса культивирования, сопоставимой с активностью признанного стимулятора роста бифидобактерий инулина. Однако гидролизаты, полученные под действием β -маннаназы *B. subtilis*, проявляли более выраженную пребиотическую активность по сравнению с гидролизатами, полученными при гидролизе маннаноов β -маннаназой *Tr. harzianum*. Таким образом, высокая каталитическая способность β -маннаназы *B. subtilis* расщеплять маннаны древесины ели и более выраженная способность гидролизатов стимулировать рост бифидобактерий делают предпочтительным использование этого фермента для получения маннозосодержащих гидролизатов из хвойной древесины.

Ключевые слова: маннан, хвойная древесина, β -маннаназ, гидролиз, манноза, манноолигосахариды, пребиотическая активность

The choice of enzyme preparation for mannose containing hydrolyzates with prebiotic activity obtaining

Zeyad Kh. Radif	¹	Zeyadkhalouf@mail.ru
Ekaterina P. Anokhina	¹	katya_anoh@mail.ru
Olga S. Korneeva	¹	korneeva-olgas@yandex.ru

¹ Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

Summary. Mannose and mannooligosaccharides have a number of functional properties, which confirms the need to study their obtaining. Mannose, being an indispensable carbohydrate component of immunoglobulins, exhibits anti-inflammatory, prebiotic, immunostimulating properties and can be used for the prevention and treatment of various pathological conditions. Mannooligosaccharides have prebiotic and antioxidant activity. Potential source of mannose and mannooligosaccharides is mannans of plant raw materials, enzymatic treatment of which is a promising and environmentally safe way of their obtaining. As a plant raw material for mannans selection spruce wood was chosen. The effect of the dosage of enzymatic preparations of β -mannanase *B. subtilis* and *Tr. harzianum* and hydrolysis duration on the efficiency of the hydrolysis of spruce wood mannans were investigated. Rational parameters of the process of mannan hydrolysis for β -mannanases of various origins were established. For β -mannanase *B. subtilis* optimal parameters are the dosage of the enzyme preparation 10 U / g, duration 3 hours, temperature 35° C, pH 7.0. For β -mannanase *Tr. harzianum* the following characteristics were used: dosage of enzyme preparation 15 U / g, duration 4 hours, temperature 60° C, pH 4.5. The ability of mannose containing hydrolysates obtained during fermentative hydrolysis of mannans to stimulate the development of bifidobacteria *in vitro* in comparison with inulin Raftiline and mannose was investigated. The hydrolysates studied had a pronounced ability to stimulate the growth of bifidobacteria throughout the entire cultivation process, comparable to the activity of the recognized growth promoter of inulin bifidobacteria. However, the hydrolysates obtained by *B. subtilis* β -mannanase showed more pronounced prebiotic activity compared to the hydrolysates obtained in the hydrolysis of mannans with β -mannanase *Tr. harzianum*. Thus, the high catalytic ability of *B. subtilis* β -mannanase to split spruce wood mannans and the more pronounced ability of hydrolysates to stimulate the growth of bifidobacteria make it preferable to use this enzyme to produce mannose containing hydrolysates from spruce wood..

Keywords: mannan, spruce wood, β -mannanase, hydrolysis, mannose, mannooligosaccharides, prebiotic activity

Для цитирования

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

For citation

Radif Z.H., Anokhina E.P., Korneeva O.S. The choice of enzyme preparation for mannose containing hydrolyzates with prebiotic activity obtaining. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2017. vol. 79. no. 3. pp. 159–163. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2017-3-159-163

Введение

В последние годы особый интерес вызывают минорные сахара и их полимеры: манноза и манноолигосахариды. Манноза является незаменимым углеводным компонентом иммуноглобулинов и других биологически активных веществ, обладает пребиотическим действием [1]. Исследования показали, что этот углевод выполняет важную роль в живом организме [2, 3], и может быть использован для профилактики и лечения урологических инфекций [4], диабета [5] и углевод-дефицитных гликопротеиновых синдромов I и II типов [6].

Манноолигосахариды наряду с маннозой обладают пребиотической активностью [7], а также проявляют антиоксидантную активность [8].

Манноза в виде гомогенных или гетерогенных полисахаридов входит в состав клеточных стенок растений и некоторых дрожжей. Наиболее перспективным и экологически безопасным способом получения маннозы и манноолигосахаридов является ферментативный гидролиз маннанов клеточных стенок растений.

Ферментами, гидролизующими внутренние β -1,4-гликозидные связи в маннанах, являются β -маннаназы. Ранее получены β -маннаназы грибного и бактериального происхождения, способные расщеплять гликозидные связи в маннанах, но обладающие разными физико-химическими свойствами и специфичностью к гидролизуемой связи.

Цель данного исследования состояла в подборе ферментного препарата β -маннаназы для получения маннозосодержащих гидролизатов с пребиотической активностью из растительного сырья.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили спирто-осажденные ферментные препараты: рекомбинантная β -маннаназы *B. subtilis* с активностью 72000 ед/г и β -маннаназы *Tr. harzianum* с активностью 2100 ед/г.

Выделение маннанов из растительного сырья проводили по описанной методике [9].

Для определения степени гидролиза маннанов реакционную смесь, состоящую из 200 мкл 1 % раствора субстрата в соответствующем буфере и 100 мкл раствора фермента разной концентрации, выдерживали при оптимальной температуре действия фермента в течение 5 часов. Через каждый час в реакционной смеси определяли редуцирующие сахара по методу Сомоджи-Нельсона [10], по количеству которых рассчитывали степень гидролиза маннанов.

Для изучения пребиотических свойств маннозосодержащих гидролизатов *in vitro* проводили культивирование бактерий *Bifidobacterium bifidum*.

Коммерческий препарат «Бифидобактерин сухой» предварительно растворяли и активизировали в питательной среде Блаурокка при температуре 37 °С в течение 24 ч. Его вносили в подготовленные для культивирования питательные среды в количестве 5 доз на 1 л среды.

Выращивание бифидобактерий проводили в анаэробных условиях при температуре 37 °С на среде Блаурокка (г/л): пептон - 10; NaCl - 5; агар-агар - 0,75; лактоза - 10; цистеин солянокислый - 0,1; печеночный отвар, pH 7,5. Для определения бифидогенной активности различных углеводов в питательную среду вместо лактозы вносили инулин, маннозу, маннозосодержащие гидролизаты.

Накопление биомассы бифидобактерий оценивали по оптической плотности суспензии бактерий при длине волны 590 нм [11].

Результаты и обсуждение

Маннаны – полисахариды, состоящие преимущественно из остатков D-маннозы. Также в состав маннанов различной структуры входят глюкоза и галактоза. Маннаны входят в состав гемицеллюлоз клеточных стенок растений. По литературным данным содержание гемицеллюлозы в твердой древесине составляет 10 %, а в древесине мягких пород - 25 %. Наиболее перспективным растительным сырьем, содержащим гемицеллюлозную фракцию, богатую маннанами, является древесина хвойных пород деревьев. Содержание маннанов в древесине хвойных деревьев представлено в таблице 1.

Таблица 1.

Содержание маннанов в древесине хвойных пород деревьев

Table 1.

The mannans content in softwood wood

Растение The pant	Содержание маннанов, % The mannans content, %	Соотношение углеводов в маннанах The ratio of carbohydrates in mannan
Ель обыкновенная Common spruce	11	MAN:ГЛЮ 3,7:1 MAN: GLU 3,7:1
Сосна Pine	12	MAN:ГЛЮ:ГАЛ 1,7:1:0,26 MAN:GLU:GAL 1,7:1:0,26
Кедр сибирский Siberian cedar	9,8	MAN:ГЛЮ 3,5:1 MAN: GLU 3,5:1
Туга канадская Canadian tuga	6,2	MAN:ГЛЮ:ГАЛ 3:1:0,1 MAN:GLU:GAL 3:1:0,1

Так, наибольшее количество маннанов находится в древесине сосны и ели обыкновенной (12 и 11 % соответственно), однако в древесине ели соотношение маннозы и глюкозы составляет 3,7:1, следовательно, ферментативный гидролиз маннанов такой структуры позволит получить высокий выход маннозы. Таким образом, ель обыкновенная является перспективным источником маннанов для получения маннозосодержащих гидролизатов. Кроме того отходы древесного производства являются широко доступными, что значительно удешевит производство маннозы в промышленных масштабах.

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

Эффективность ферментативного гидролиза полимеров зависит от ряда факторов, важными из которых являются дозировка ферментного препарата и продолжительность гидролиза.

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

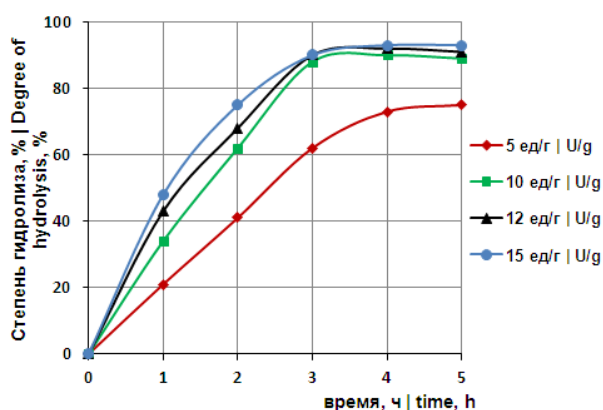


Рисунок 1. Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β -маннаназы *B. subtilis* (ед/г глюкоманнана) при температуре 35 °C и pH 7,0

Figure 1. The dependence of the degree of hydrolysis of glucomannan on the concentration of β -mannanase *B. subtilis* (U / g glucomannan) at 35 °C and pH 7.0

Динамика ферментативной деструкции маннанов при разной концентрации ферментного препарата β -маннаназы *Tr. harzianum* представлена на рисунке 2. Ферментный препарат вносили в количестве 5-25 ед/г маннанов. Количество фермента 5 ед/г субстрата обеспечивало гидролиз на 58 % за 4 ч. При увеличении концентрации фермента до 10 ед/г степень гидролиза за это время составила около 70 %. Дозировка 15 ед/г обеспечивала максимальную степень деструкции маннанов – 90 %. Более высокая концентрация фермента не способствовала значительному увеличению степени гидролиза.

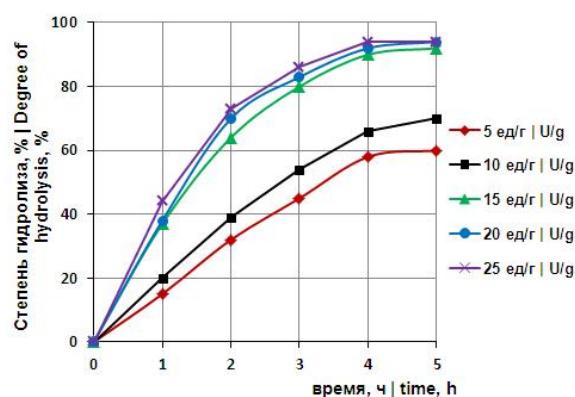


Рисунок 2. Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β -маннаназы *Tr. harzianum* (ед/г глюкоманнана) при температуре 60 °C и pH 4,5

Figure 2. The dependence of the degree of hydrolysis of glucomannan on the concentration of β -mannanase *Tr. harzianum* (U / g glucomannan) at 60 °C and pH 4,5

Таким образом, были установлены рациональные параметры процесса гидролиза маннанов ели 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 °C, pH 7,0. Для β -маннаназы *Tr. harzianum* - дозировка ферментного препарата 15 ед/г, продолжительность 4 ч, температура 60 °C, pH 4,5.

В результате гидролиза маннанов β -манназами различного происхождения образуются различные конечные продукты: манноолигосахариды различной молекулярной массы и манноза.

Известно, что маннозосодержащие гидролизаты обладают пребиотическими свойствами, поэтому была исследована способность маннозосодержащих гидролизатов, полученных при оптимальных условиях гидролиза β -манназами *B. subtilis* и *Tr. harzianum*, стимулировать развитие бифидобактерий. 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.

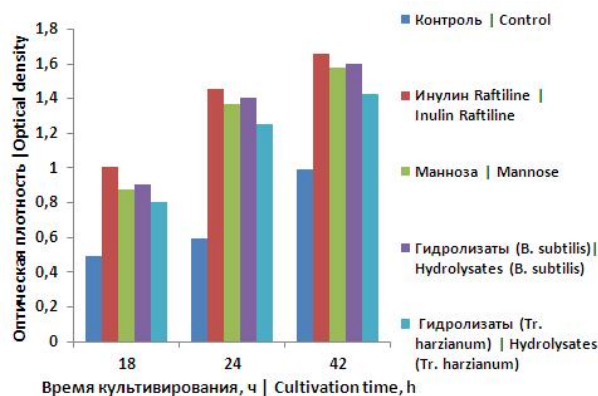


Рисунок 3. Накопление биомассы бифидобактерий при культивировании на средах с маннозосодержащими гидролизатами

Figure 3. The accumulation of biomass of bifidobacteria during cultivation on media with mannose-containing hydrolysates

Из представленных данных видно, что изученные гидролизаты обладают выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Korneeva O. S, Cheremushkina I. V, Glushchenko A. S, Mikhailova N. A. et al. Prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2012. № 5. P. 67-70.
- 2 Sharma V., Ichikawa M., Freeze H. H. Mannose metabolism: more than meets the eye // Biochem Biophys Res Commun. 2014. V. 453. № 2. P. 220-228. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.021.
- 3 Fekete F., Fadgyas B., Papp É., Szilágyi Á. et al. The role of mannose binding lectin on fever episodes in pediatric oncology patients // Pathol Oncol Res. 2016. V. 22, № 1, P. 139-143. DOI: 10.1007/s12253-015-9992-x.
- 4 Kranjčec B., Papeš D., Altarac S. D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial // World J Urol. 2014. V. 32, № 1, P. 79-84. DOI: 10.1007/s00345-013-1091-6.
- 5 Пат. 2097041, RU, C1 A61K 31/70. Способ лечения сахарного диабета / Чепурной И.П., Больбат К.Э.; заявитель и патентообладатель Чепурной И.П. № 94042023/14; Заявл. 22.11.1994.; Оpubл. 27.11.1997.
- 6 Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J. et al. Congenital disorder of glycosylation type 1b. Experience with mannose treatment // An Pediatr (Barc). 2008, V. 69, № 4, P. 358-365.
- 7 Anokhina E. P., Shuvaeva G. P., Radif Z. K., Korneeva O. S. Investigation of the prebiotic properties of mannose-containing hydrolysates // International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2016, V. 11, № 3/4, P. 137-140.
- 8 Черенков Д.А., Анохина Е.П., Кирьянова С.В., Корнеева О.С. Антиоксидантная активность продуктов гидролиза природных полимеров (маннана и фукоидана) // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2012. № 1. С. 151-153.
- 9 Пат. 2392332, RU, C1 C13K13/00, A23L1/0528. Способ получения маннанных из растительного сырья / Корнеева О.С., Глушченко А.С., Черемушкина И.В., Черенков Д.А., Слепокуров А.А. № 2008149923/13; Заявл. 18.12.2008; Оpubл. 20.06.2010, Бюл. № 17.

на протяжении всего процесса культивирования, сопоставимой с активностью признанного стимулятора роста бифидобактерий инулина и не уступающей чистой маннозе. При этом гидролизаты, полученные под действием β -маннаназы *B. subtilis*, обладали более выраженной пребиотической активностью по сравнению с гидролизатами, полученными при гидролизе маннана β -маннаназой *Tr. harzianum*, о чем свидетельствует увеличение прироста биомассы бифидобактерий.

В результате проведенных исследований установлено, что применяемые ферментные препараты β -маннаназы способны гидролизовать маннаны древесины ели обыкновенной. Однако, маннозосодержащие гидролизаты, образующиеся под действием β -маннаназы *B. subtilis*, обеспечивали больший прирост биомассы бифидобактерий, что свидетельствует о целесообразности применения этого фермента для получения гидролизатов с пребиотической активностью из хвойной древесины.

REFERENCES

- 10 Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003. 376 с.
- 11 Санина Т.В., Кирьянова С.В., Черемушкина И.В., Корнеева О.С. Исследование бифидогенной активности фукозы и ее полимеров // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 141-143.
- 1 Korneeva O. S, Cheremushkina I. V, Glushchenko A. S, Mikhailova N. A. et al. Prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2012, no 5, pp. 67-70.
- 2 Sharma, V., Ichikawa M., Freeze H. H. Mannose metabolism: more than meets the eye. Biochem Biophys Res Commun. 2014, vol. 453, no 2, pp. 220-228. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.021.
- 3 Fekete F., Fadgyas B., Papp É., Szilágyi Á. et al. The role of mannose binding lectin on fever episodes in pediatric oncology patients. Pathol Oncol Res. 2016, vol. 22, no 1, pp. 139-143. DOI: 10.1007/s12253-015-9992-x.
- 4 Kranjčec B., Papeš D., Altarac S. D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. World J Urol. 2014, vol. 32, no 1, pp. 79-84. DOI: 10.1007/s00345-013-1091-6.
- 5 Chepurnoy I. P., Bolbat K. E. Sposob lecheniya saharnogo diabeta [The method of treatment of diabetes mellitus]. Patent RF, no 2097041, 1997. (in Russian).
- 6 Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J. et al. Congenital disorder of glycosylation type 1b. Experience with mannose treatment. An Pediatr (Barc). 2008, vol. 69, no 4, pp. 358-365.
- 7 Anokhina E. P., Shuvaeva G. P., Radif Z. K., Korneeva O. S. Investigation of the prebiotic properties of mannose-containing hydrolysates. International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2016, vol. 11, no 3/4, pp. 137-140.

8 Cherenkov D. A., Anokhina E. P., Kiryanova S. V., Korneeva O. S. The antioxidant activity of the products of hydrolysis of natural polymers (mannan, and fucoidan). *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologiy* [Proceedings of Voronezh State University of Engineering Technology], 2012, no. 1, pp. 151-153. (in Russian)

9 Korneeva O. S., Gluschenko A. S., Cheremushkina I. V., Cherenkov D. A. et al. Sposob polucheniya mannanov iz rastitelnogo syrya [The method of obtaining mannans from plant material]. Patent RF, no 2392332, 2010. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Зеяд Х. Радиф аспирант, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, Zeyadkhalouf@mail.ru

Екатерина П. Анохина к.т.н. доцент, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, katya_anoh@mail.ru

Ольга С. Корнеева д.б.н., профессор, зав. кафедрой, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, korneeva-olgas@yandex.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Зеяд Х. Радиф обзор литературных источников по исследуемой проблеме, провёл эксперимент, написал рукопись

Екатерина П. Анохина корректировала рукопись статьи до подачи в редакцию, несёт ответственность за плагиат

Ольга С. Корнеева консультация в ходе исследования

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 25.08.2017

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 09.09.2017

10 Polygalina G. V., Cherednichenko V. S., Rimareva L. V. Opreделение aktivnosti fermentov. Spravochnik. [Determination of enzyme activity. Directory]. Moscow, DeLi print, 2003. 300 p. (in Russian)

11 Sanina T. V., Kiryanova S. V., Cheremushkina I. V., Korneeva O. S. The study bifidogenic activity fucose and its polymers. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya* [Herald of the Voronezh state University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2011, no. 1, pp. 141-143. (in Russian)

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Zeyad Kh. Radif graduate, department of biochemistry and biotechnology, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, Zeyadkhalouf@mail.ru

Ekaterina P. Anokhina candidate of technical sciences, associate professor, department of biochemistry and biotechnology, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, katya_anoh@mail.ru

Olga S. Korneeva doctor of biological sciences, professor, department of biochemistry and biotechnology, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, korneeva-olgas@yandex.ru

CONTRIBUTION

Zeyad Kh. Radif review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, wrote the manuscript

Ekaterina P. Anokhina corrected the manuscript before filing in editing and is responsible for plagiarism

Olga S. Korneeva consultation during the study

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 8.25.2017

ACCEPTED 9.9.2017