

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ МАННАНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ: ВЫБОР ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИФИДОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИЗАТОВ

З. Х. Радиф, Е. П. Анохина, Ю. П. Синюкова, О. С. Корнеева

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Поступила в редакцию 30.08.2018 г.

Аннотация. К веществам, способным стимулировать рост бифидобактерий и обладающим пребиотической активностью, относятся моносахариды, дисахариды и олигосахариды разной степени полимеризации. Особый интерес как зарубежных, так и отечественных исследователей в последние годы вызывают «минорные сахара», в частности манноза – структурный элемент полисахаридов маннанов, входящих в состав клеточной стенки растений, и маннолигосахариды – продукты неполного гидролиза маннанов. Перспективным способом получения маннозы и маннолигосахаридов является ферментативная деструкция маннанов β -маннаназой – ферментом, расщепляющим внутренние β -1,4-гликозидные связи в основной цепи молекулы маннанов. Промышленное производство маннолигосахаридов отсутствует как у нас в стране, так и за рубежом.

В работе проведен сравнительный анализ каталитической активности β -маннаназы *B. subtilis* и *Tr. harzianum* и установлены рациональные параметры ферментативного гидролиза глюкоманнанов ели обыкновенной. Установлено, что максимальная степень деструкции глюкоманнана древесины ели обыкновенной наблюдалась при ферментативном гидролизе β -маннаназой *B. subtilis* при pH 7,0, температуре 35 °C через 3 ч после внесения фермента в количестве 10 ед/г субстрата и β -маннаназой *Tr. harzianum* в дозировке 15 ед/г глюкоманнана при pH 4,5, температуре 60 °C через 4 ч. Проведенная методом тонкослойной хроматографии оценка качественного и количественного состава полученных гидролизатов показала наличие в составе гидролизатов маннозы, маннотриозы, маннотетрозы, маннопентозы в количестве, мг/л: 33, 48, 32, и 13 соответственно.

Культивирование бактерий *Bifidobacterium bifidum* на средах с различными углеводами показало, что полученные маннозосодержащие гидролизаты обладали выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий *B. bifidum* и не уступали по действию известному коммерческому пребиотику – инулину.

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

Ключевые слова: β -маннаназы, гидролиз глюкоманнана, маннозосодержащие гидролизаты, бифидобактерии, пребиотик

В настоящее время повышенный интерес вызывают вещества, способные стимулировать рост бифидобактерий и обладающие пребиотической и антиоксидантной активностью [1–4]. К числу таких веществ относят моносахариды, дисахариды и олигосахариды разной степени полимеризации [5–7]. Наиболее изученными из них являются фруктоолигосахариды, лактулоза и инулин [8]. В последние годы ряд исследований

направлен на изучение свойств «минорных сахаров», в частности маннозы из-за множества ее биологических функций [9–12]. Манноза – это структурный элемент полисахаридов маннанов, входящих в состав клеточной стенки растений и некоторых дрожжей. Пребиотические свойства маннозы подтверждены в опытах *in vitro* и *in vivo* [13]. В то же время мало изученными остаются свойства маннолигосахаридов – продуктов неполного гидролиза маннанов. Перспективным способом получения маннозы и маннолигосахаридов является ферментативная деструкция маннанов

β -маннаназами – ферментами, расщепляющими внутренние β -1,4-гликозидные связи в основной цепи молекулы маннанов [14–15]. Промышленное производство манноолигосахаридов отсутствует как у нас в стране, так и за рубежом.

Цель работы – подбор ферментного препарата β -маннаназы для получения маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья, обладающих бифидогенной активностью.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе применяли полученные на кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ спиртоосажденные ферментные препараты: рекомбинантную β -маннаназу *B. subtilis* с активностью 72000 ед/г и β -маннаназу *Tr. harzianum* с активностью 2100 ед/г [16].

Выделение глюкоманнанов из древесины ели обыкновенной проводили по описанной методике [17].

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 [18], по количеству которых рассчитывали степень гидролиза маннанов.

Оценку качественного и количественного состава гидролизатов проводили методом тонкослойной хроматографии с хроматодегситометрией. Анализ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) размером 10x20 см. Пластинки промывали метанолом (восходящий метод) до верхнего края, высушивали и активировали при 1200С в течение 20 мин в сушильном шкафу. В качестве подвижной фазы использовали смесь, состоящую из бутанола, этилового спирта и воды (5:4:3.5). Идентификацию маннозосодержащих гидролизатов проводили по маннозе (Sigma) и стандартным манноолигосахаридам со степенью полимеризации 2-6 фирмы «Megazyme» (Ирландия). Количественное определение углеводов осуществляли на сканирующем денситометре TLC Scanner 3 фирмы CAMAG (Швейцария) при длине волны 420 нм с использованием программного обеспечения WinCATS.

Для исследования бифидогенной активности маннозосодержащих гидролизатов *in vitro* проводили культивирование бактерий *Bifidobacterium*

bifidum. Выращивание бифидобактерий осуществляли 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 эффективности действия различных углеводов на рост *B. bifidum* в питательную среду поочередно включали инулин из цикория (Raftiline), маннозу и маннозосодержащие гидролизаты в качестве единственного источника углерода. Накопление биомассы бифидобактерий оценивали по оптической плотности суспензии бактерий при длине волны 590 нм [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что на степень деструкции полисахаридов большое влияние оказывает дозировка ферментного препарата и продолжительность гидролиза. При исследовании процесса гидролиза глюкоманнанов древесины ели обыкновенной спиртоосажденным рекомбинантным препаратом β -маннаназы *B. subtilis* при pH 7.0 и температуре 35 °С выявлена зависимость степени гидролиза маннана от дозировки ферментного препарата β -маннаназы, который вносили в количестве 5–15 ед/г субстрата (рис. 1). Установлено, что дозировка 10 ед/г субстрата обеспечивала максимальную степень деструкции глюкоманнана 88 % за 3 ч гидролиза. Дальнейшее повышение концентрации ферментного препарата было нецелесообразным, так как не приводило к значительному увеличению степени гидролиза маннана.

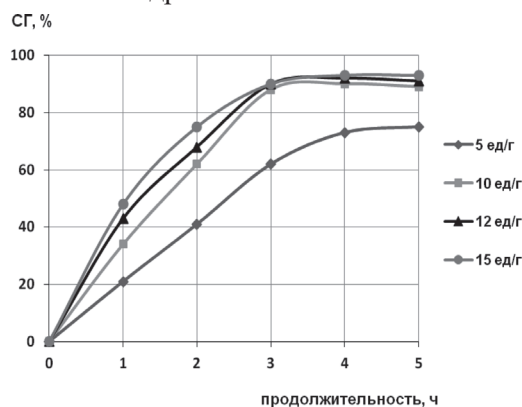


Рис. 1. Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β -маннаназы *B. subtilis* (ед/г глюкоманнана) при температуре 35 °С и pH 7.0

Динамика ферментативной деструкции маннанов β -маннаназой *Tr. harzianum* представлена на рисунке 2. Ферментный препарат вносили в количестве 5-25 ед/г маннанов. Максимальная степень деструкции маннанов 90 % наблюдалась при дози-

ровке ферментного препарата 15 ед/г глюкоманнана при pH 4.5, температуре 60 °С за 4 ч. Дальнейшее увеличение концентрации фермента в реакционной смеси нецелесообразно, так как это не приводило к видимому увеличению степени гидролиза.

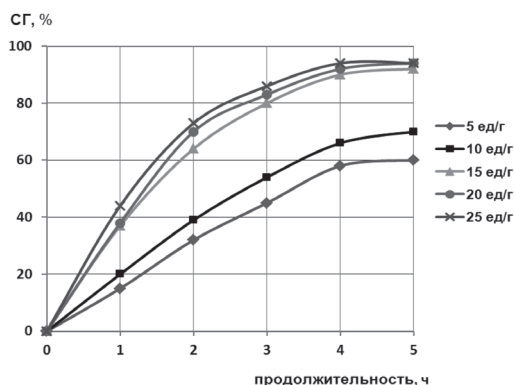


Рис. 2. Зависимость степени гидролиза глюкоманнана от концентрации β-маннаназы *Tr. harzianum* (ед/г глюкоманнана) при температуре 60 °С и pH 4.5

Результаты исследования способности маннозосодержащих гидролизатов, полученных при оптимальных условиях гидролиза β-маннаназой *B. subtilis* и *Tr. harzianum*, стимулировать развитие бифидобактерий *B. bifidum*, представлена на рис. 3. 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.



Рис. 3. Накопление биомассы бифидобактерий при культивировании на средах с различными углеводами

Из представленных данных видно, что полученные гидролизаты обладали выраженной способностью стимулировать рост бифидобактерий на протяжении всего процесса культивирования, были сопоставимы с активностью признанного стимулятора роста бифидобактерий – инулина и не уступали по активности маннозе, однако гидролизаты, полученные при гидролизе глюкоманнана под действием β-маннаназы *B. subtilis*, обладали

более выраженной пребиотической активностью по сравнению с продуктами гидролиза глюкоманнана β-маннаназой *Tr. harzianum*.

При гидролизе маннано β-маннаназами микробного происхождения образуются конечные продукты: манноолигосахариды различной молекулярной массы и манноза, которая, как правило, не является доминантным продуктом [14]. Хроматографический анализ маннозосодержащих гидролизатов, полученных при оптимальных условиях гидролиза глюкоманнана или обыкновенной β-маннаназой *B. subtilis*, показал наличие в составе гидролизатов маннозы, маннотриозы, маннотетрозы, маннопентозы в количестве, мг/л: 33, 48, 32, и 13 соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований были установлены рациональные параметры процесса гидролиза глюкоманнана 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, pH 7.0. Для β-маннаназы *Tr. harzianum* – дозировка ферментного препарата 15 ед/г, продолжительность 4 ч, температура 60 °С, pH 4.5.

Полученные маннозосодержащие гидролизаты способствовали накоплению биомассы бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* при внесении их в среду культивирования бактерий и не уступали по действию известному коммерческому пребиотику – инулину, что свидетельствует об их бифидогенной активности.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korneeva O.S., Cheremushkina I.V., Glushchenko A.S., Mikhailova N.A., Baturo A.P., Romanenko É.E., Zlygostev S.A. // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2012. Vol. 5. P. 67-70.
2. Anokhina E.P., Shuvaeva G.P., Radif Z.K. Korneeva O.S. // International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2016. Vol. 11, no 3/4. P. 137-140.
3. Черенков Д.А., Анохина Е.П., Кирьянова С.В., Корнеева О.С. // Вестник Воронежского го-

сударственного университета инженерных технологий. 2012. № 1. С. 151-153.

4. Санина Т.В., Кирьянова С.В., Черемушкина И.В., Корнеева О.С. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 141-143.

5. Kurakake M. Sumida T., Masuda D., Oonishi S. // J Agric Food Chem. 2006. Vol. 54. P. 7885-7889.

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

7. 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.

8. Charalampopoulos D., Rastall R.A. // Prebiotics and Probiotics Science and Technology. V 1. Springer Science & Business Media. 2009.

9. Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J., Leal Pérez F., Manzanares López-Manzanares J., Ugarte Pérez M., Pérez-Cerdá Silvestre C. // An Pediatr (Barc). 2008. Vol. 69 (4). P. 358-365.

10. Kranjčec B., Papeš D., Altarac S. // World J Urol. 2014. Vol. 32 (1). P. 79-84 (doi: 10.1007/s00345-013-1091-6).

11. Sharma V., Nayak J., DeRossi C., Charbono A., Ichikawa M., Ng B.G., Grajales-Esquivel E., Srivastava A., Wang L., He P., Scott D.A., Russell

J., Contreras E., Guess C.M., Krajewski S., Del Rio-Tsonis K., Freeze H.H. // FASEB J. 2014. Vol. 28. P. 1854-1869.

12. Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J. // An Pediatr (Barc). 2008. Vol. 69. № 4. P. 358-365.

13. Черемушкина И.В., Глущенко А.С., Анохина Е.П., Чигирин Н.А. // Биотехнология. 2010. № 5. С. 56-61.

14. Черенков Д.А., Корнеева О.С., Анохина Е.П., Новоселова Е.Г. // Успехи современной биологии. 2010. Т. 130. № 2. С. 190-199.

15. Jiang Z. // Carbohydrate Polymers. 2006. V. 66. № 1. P. 88-96.

16. Черемушкина И.В., Черенков Д.А., Анохина Е.П., Рыбаков Ю.А. // Биотехнология. 2011. № 5. С. 32-37.

17. Пат. 2392332, RU, C1 C13K13/00, A23L1/0528 Способ получения маннанов из растительного сырья / Корнеева О.С., Глущенко А.С., Черемушкина И.В., Черенков Д.А., Слепокуров А.А. № 2008149923/13; Заяв. 18.12.2008; Опубл. 20.06.2010, Бюл. № 17.

18. Полюгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003. 376 с.

19. Shuvaeva G.P. Biologiya i mikrobiologiya. [Biology and Microbiology]. Voronezh. 2003. (in Russian).

20. Sharma V., Ichikawa M., Freeze H.H. // Biochem Biophys Res Commun. 2014. Vol. 453. no 2. P. 220-228.

Воронежский государственный университет инженерных технологий

Ради́ф З. Х., аспирант, кафедра биохимии и биотехнологии

Тел.: +7 952 100-38-82

E-mail: zeyadkhalouf@mail.ru

Анохина Е. П., к.т.н. доцент, кафедра биохимии и биотехнологии

Тел.: +7 906 680-62-22

E-mail: katya_anoh@mail.ru

Корнеева О. С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и биотехнологии

E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

«БУЗ ВО Борисоглебская РБ»

Синюкова Ю. П. заведующая кабинетом УЗД.

Тел.: +7 910 344-72-30

Voronezh state university of engineering technologies

Radif Z. Kh., post-graduate student, department of biochemistry and biotechnology,

Ph.: +7 952 100-38-82

E-mail: zeyadkhalouf@mail.ru

Anokhina E. P., PhD., associate professor, department of biochemistry and biotechnology

Ph.: +7 906 680-62-22

E-mail: katya_anoh@mail.ru

Korneeva O. S., PhD., DSci., Full Professor, department of biochemistry and biotechnology

E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

BUSH IN Borisoglebskaya RB

Yulia P. Sinyukova, Head of the UZD Cabinet

Ph.: +7 910 344-72-30

ENZYMAL DESTRUCTION OF MANNANES OF THE PLANT RAW MATERIAL: SELECTION OF THE ENZYME PREPARATION AND INVESTIGATION OF BIFIDOGENIC ACTIVITY OF HYDROLYSATES

Z. Kh. Radif, E. P. Anokhina, Yu. P. Sinyukova, O. S. Korneeva

Voronezh state university of engineering technologies

Abstract. Substances capable of stimulating the growth of bifidobacteria and possessing prebiotic activity include monosaccharides, disaccharides, and oligosaccharides of different degrees of polymerization. In recent years, «minor sugars», in particular mannose, a structural element of the polysaccharides of mannans, which are part of the plant cell wall, and mannooligosaccharides, products of incomplete hydrolysis of mannans, have been of particular interest to both foreign and domestic researchers. A promising way to produce mannose and mannooligosaccharides is the enzymatic destruction of mannans by β -mannanases, enzymes that break down the internal β -1,4-glycosidic bonds in the main chain of the mannans molecule. Industrial production of mannooligosaccharides is absent both in our country and abroad.

A comparative analysis of the catalytic activity of β -mannanase of *B. subtilis* and *Tr. harzianum* and established rational parameters of the enzymatic hydrolysis of glucomannan spruce. It was established that the maximum degree of glucomannan destruction of spruce wood was observed during enzymatic hydrolysis with β -mannanase of *B. subtilis* at pH 7.0, temperature of 35 °C after 3 hours after adding the enzyme in an amount of 10 units / g of substrate and β -mannanase *Tr. harzianum* at a dosage of 15 u/g glucomannan at a pH of 4.5 and a temperature of 60 °C after 4 hours. An assessment of the qualitative and quantitative composition of the hydrolysates obtained by thin-layer chromatography showed the presence of mannose, mannotriosis, mannotetroses, mannophenose in the amount of mg/l: 33, 48, 32, and 13, respectively.

Cultivation of the *Bifidobacterium bifidum* bacteria on media with different carbohydrates showed that the obtained mannose-containing hydrolysates had a pronounced ability to stimulate the growth of *B. bifidum* bifidobacteria and were not inferior in effect to the well-known commercial prebiotic, inulin.

Considering the high catalytic activity of recombinant β -mannanase of *B. subtilis* and the more pronounced ability of oligosaccharides obtained under the action of this enzyme to stimulate the growth of bifidobacteria, it is expedient to use *B. subtilis* β -mannanase to obtain mannose-containing hydrolysates.

Keywords: β -mannanase, glucomannan hydrolysis, mannose-containing hydrolysates, bifidobacteria, prebiotic

REFERENCES

1. Korneeva O.S., Cheremushkina I.V., Glushchenko A.S., Mikhailova N.A., Baturo A.P., Romanenko É.E., Zlygostev S.A., Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol., 2012, Vol. 5, P. 67-70.
2. Anokhina E.P., Shuvaeva G.P., Radif Z.K. Korneeva O.S., International Journal of Probiotics and Prebiotics, 2016, Vol. 11, no 3/4, P. 137-140.
3. Cherenkov D.A., Anokhina E.P., Kir'yanova S.V., Korneeva O.S., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologij, 2012, № 1, S. 151-153.
4. Sanina T.V., Kir'yanova S.V., Cheremushkina I.V., Korneeva O.S., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, 2011, № 1, S. 141-143.
5. Kurakake M., Sumida T., Masuda D., Oonishi S., J Agric Food Chem., 2006, Vol. 54, P. 7885-7889.
6. Pat. 2000139490, JP, Production of mannose and mannooligosaccharide / Yoshikawa G., Yano T.; applicant UNITIKA LTD; FOOD MARKETING RES
7. 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.
8. Charalampopoulos D., Rastall R.A., Prebiotics and Probiotics Science and Technology, V 1, Springer Science & Business Media, 2009.
9. Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J., Leal Pérez F., Manzanares López-Manzanares J., Ugarte Pérez M., Pérez-Cerdá Silvestre C., An Pediatr (Barc), 2008, Vol. 69 (4), P. 358-365.
10. Kranjčec B., Papeš D., Altarac S., World J Urol., 2014, Vol. 32 (1), P. 79-84 (doi: 10.1007/s00345-013-1091-6).
11. Sharma V., Nayak J., DeRossi C., Charbono A., Ichikawa M., Ng B.G., Grajales-Esquivel E., Srivastava A., Wang L., He P., Scott D.A., Russell

J., Contreras E., Guess C.M., Krajewski S., Del Rio-Tsonis K., Freeze H.H., FASEB J., 2014, Vol. 28, P. 1854–1869.

12. Martín Hernández E., Vega Pajares A.I., Pérez González B., Ecay Crespo M.J., An Pediatr (Barc), 2008, Vol. 69, № 4, P. 358-365.

13. Cheremushkina I.V., Glushchenko A.S., Anohina E.P., Chigirina N.A., Biotekhnologiya, 2010, № 5, S. 56-61.

14. Cherenkov D.A., Korneeva O.S., Anohina E.P., Novoselova E.G., Uspekhi sovremennoj biologii, 2010, T. 130, № 2, S. 190-199.

15. Jiang Z., Carbohydrate Polymers, 2006, V. 66, № 1, P. 88-96.

16. Cheremushkina I.V., Cherenkov D.A., Anohina E.P., Rybakov Yu.A., Biotekhnologiya, 2011, № 5, S. 32-37.

17. Pat. 2392332, RU, C1 C13K13/00, A23L1/0528 Sposob polucheniya mannanov iz rastitel'nogo syr'ya / Korneeva O.S., Glushchenko A.S., Cheremushkina I.V., Cherenkov D.A., Slepokurov A.A. № 2008149923/13; Zayav. 18.12.2008; Opubl. 20.06.2010, Byul. № 17.

18. Polygalina G.V., Cherednichenko V.S., Rimareva L.V. Opredelenie aktivnosti fermentov. Spravochnik. M.: DeLi print, 2003, 376 c.

19. Shuvaeva G.P. Biologiya i mikrobiologiya. [Biology and Microbiology], Voronezh, 2003. (in Russian).

20. Sharma V., Ichikawa M., Freeze H.H., Biochem Biophys Res Commun., 2014, Vol. 453, no 2, P. 220-228.