

В. И. Фисинин<sup>1</sup>, И. И. Чеботарев<sup>2</sup>, И. Н. Никонов<sup>3,5</sup>, Л. А. Ильина<sup>3</sup>,  
Г. Ю. Лаптев<sup>3</sup>, Н. Г. Машенцева<sup>4</sup>

## ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИЗИНПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Поступила в редакцию 20.10.2014. Принята к печати 26.11.2014.

В статье представлены данные о влиянии микрофлоры кишечника на усвоение лизина при вводе в рационы питания пробиотического препарата. Показано, что микроорганизмы кишечника по-разному влияют на усвояемость лизина. Ряд видов молочнокислых бактерий — представителей полезной микрофлоры кишечника — может негативно влиять на доступность лизина. Для создания новых пробиотических препаратов необходимо определять их влияние не только на микробиоценозы, но и на усвоение питательных веществ и биологически активных соединений.

*Ключевые слова:* пробиотики, микрофлора кишечника, продуценты лизина

В настоящее время одним из подходов для профилактики и терапии ряда заболеваний человека и животных является применение биопрепаратов на основе пробиотических бактерий. Необходимо отметить, что одной из проблем при применении пробиотиков является взаимодействие микроорганизмов, входящих в состав препарата, с микробиоценозами желудочно-кишечного тракта. К другой проблеме можно отнести возможное влияние пробиотического организма на метаболизм БАВ (а.к., пептидов, полисахаридов и др.), необходимых для полноценного функционирования организма.

Наиболее ярко эти проблемы можно выявить в модельных опытах на продуктивных животных. При интенсивном ведении животноводства биологически полноценное кормление является решающим фактором получения высокой продуктивности сельскохозяйственных

животных. При этом предусматривается обеспечение животных не только качественными белковыми и энергетическими кормами, но и лимитирующими а.к., витаминами, микроэлементами, антиоксидантами, ферментными препаратами и другими биологически активными и минеральными веществами.

В настоящее время для повышения полноценности растительных комбикормов широко используются добавки синтетических а.к. Среди незаменимых а.к. лизин занимает особое место. Он входит в состав структурных тканевых белков и белковых ферментов, способствует улучшению пищеварения, играет важную роль в формировании костяка, повышении продуктивности, оказывает благотворное влияние на воспроизводительные функции.

В настоящее время во многих странах в рационах птицы и моногастричных животных, свиней, используют кормовые добавки на основе бактерий, продуцирующих а.к. и другие жизненно необходимые вещества [1 – 3]. Одним из наиболее плодотворных путей использования полезных форм микроорганизмов в животноводстве является использование пробиотиков. Комбикорма-концентраты для моногастричных животных и птицы, в состав которых входят только компоненты растительного происхождения, как правило, дефицитны по содержанию первой лимитирующей а.к. — лизину [4].

На практике комбикормовые производства решают эту проблему вводом в состав комбикормов компонентов животного происхожде-

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства», 141300 Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицегоградская, 10.

<sup>2</sup> ООО «Биореактор», 114142 Московская обл., г. Щелково, ул. Комарова, 18.

<sup>3</sup> ООО «БИОТРОФ+», 196602 Санкт-Петербург, Пушкин, Малиновская ул., 8. лит. А, пом. 7-Н.

<sup>4</sup> ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств», 125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11.

<sup>5</sup> ilnikonov@yandex.ru

ния, а также синтетического или микробного лизина. Однако это в значительной степени удорожает стоимость комбикормов.

Другим подходом к решению данной проблемы является разработка биопрепаратов (пробиотиков), которые при их применении в составе комбикормов способны синтезировать лизин в желудочно-кишечном тракте животных [4].

Одним из важнейших и многочисленных обитателей кишечника является *Escherichia coli*, хорошо изученная в генетическом отношении бактерия [5]. Имеющиеся исследования показали возможность сознательного приживления сконструированных штаммов *E. coli* K-12, продуцентов биологически активных соединений в желудочно-кишечном тракте животных, на определенный промежуток времени [5].

Известен штамм *E. coli*, являющийся продуцентом лизина, который перспективен для использования при откорме моногастричных животных и птицы в составе кормовой добавки [4]. Также известен штамм бактерии *E. coli*, отобранный селекцией на основе не усваивающего сахарозу штамма *E. coli* K-12, VL-613, введением генов сахароза-6-фосфотрансферазной системы (сахарозная РТС) [6].

В настоящее время для кормления сельскохозяйственных животных и птицы используются пробиотики, входящие в состав комбикормов, на основе микроорганизмов, относящихся к видам *Bacillus pantothenicus*, *Ruminococcus albus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*.

Однако микробиоценоз кишечника представляет собой достаточно большое по количеству и сложное по структуре сообщество видов микроорганизмов. Микрофлора желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы представлена, главным образом, бактериями. Бактерии находятся между собой и с организмом-хозяином во взаимоотношениях различного рода (антагонизм, симбиоз и др.). Бактерии могут влиять на усвояемость питательных веществ кормов.

В связи с этим цель работы — установить взаимосвязи между видовым сообществом микробиоценоза кишечника птицы и усвояемостью незаменимой а.к. лизина. Полученные результаты будут являться основой для создания пробиотического биопрепарата на основе бактерии-продуцента лизина.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе ГНУ ВНИТИП Россельхозакадемии был поставлен модельный опыт для выявления закономерностей между усвояемостью а.к. организмом птицы и составом микробного сообщества ее желудочно-кишечного тракта. Исследования проведены в условиях вивария ГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП» Россельхозакадемии на цыплятах-бройлерах кросса «Кобб Авиан 48».

Для проведения опыта в суточном возрасте были сформированы 4 группы цыплят (методом аналогов) по 40 голов в каждой. Цыплят-бройлеров выращивали с суточного до 37-дневного возраста в клеточных батареях Big Dutchman. Технологические параметры выращивания бройлеров соответствовали рекомендациям по работе с кроссом «Кобб Авиан 48». Цыплят кормили сухими рассыпными комбикормами без ограничений. Поили также без ограничений. Схема опыта представлена в табл. 1.

В качестве пробиотика использовали кормовую добавку «Целлобактерин-Т», («БИОТРОФ», Россия). Усвояемость а.к. и других веществ оценивали в ходе балансовых опытов. Состав микробиоценоза тонкого кишечника желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы изучали молекулярно-генетическим методом на основе T-RFLP-анализа.

ДНК из содержимого тонкого отдела кишечника выделяли экстракцией фенолом/хлороформом и очисткой раствором цетилтриметиламмоний бромидом. ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК бактерий проводили с использованием праймеров: 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на

Таблица 1. Схема опыта на цыплятах-бройлерах

Группа	Количество голов	Характеристика рационов
1 контрольная	40	Комбикорм с питательностью согласно рекомендациям фирмы «Кобб Авиан 48», сбалансированный без учета усвояемости а.к. (ОР 1)
2 контрольная	40	Комбикорм с питательностью согласно рекомендациям фирмы «Кобб Авиан 48», сбалансированный с учетом усвояемости а.к. (ОР 2)
3 опытная	40	ОР 1 + пробиотик
4 опытная	40	ОР 2 + пробиотик

5'-конце (флуорофор D4-WellRed); 1492R (TACGGHTACSTTGTACGACTT). Амплифицированный фрагмент выделяли из агарозного геля с помощью раствора 3 М гуанидина тиоционата. Рестрикцию ампликонов проводили с помощью рестриктаз *Hae*III, *Hha*I и *Msp*I («Fermentas», Латвия) в течение 2 ч при 37 °С. После окончания рестрикции ДНК из реакционной смеси осаждали этанолом, растворяли в SLS (Beckman Coulter, США) с добавлением маркера молекулярного веса 600 п.н. (Beckman Coulter) и разделяли в условиях капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией с использованием автоматического секвенатора SEQ8000 (Beckman Coulter). Размеры пиков и их площади вычисляли с использованием программного блока Fragment Analysis (Beckman Coulter). Для идентификации пиков T-RFLP-граммы для трех эндонуклеаз (*Hae*III, *Hha*I и *Msp*I) обрабатывали с помощью программы Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного и корреляционного анализов по Лакину [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 приведена усвояемость а.к. организмом птицы (на основе балансовых опытов), из данных которой видно, что усвояемость ряда а.к. может зависеть от варианта опыта. В частности, усвояемость лизина зависит от состава

рациона. Наибольшая усвояемость отмечена для вариантов птицы, получавших комбикорма, сбалансированные с учетом усвояемости а.к.

Таблица 2. Усвояемость аминокислот организмом птицы (в %)

Аминокислота	Группа			
	1	2	3	4
Лизин	84,01*	86,4*	83,6*	87,4*
Гистидин	78,0*	78,1*	75,3	77,6*
Аргинин	87,1*	88,2*	86,2*	88,3*
Аспарагиновая	80,3*	82,1*	81,4	81,9*
Треонин	75,2*	78,9*	78,5*	82,0*
Серин	79,4*	79,7*	80,0*	81,7*
Глутаминовая	90,4*	91,9*	90,4*	90,8*
Пролин	82,3*	86,5*	82,3	84,8*
Глицин	63,5*	63,6*	61,9*	67,3*
Аланин	75,8*	71,2*	65,9*	68,8*
Цистин	77,2*	78,7*	66,8*	71,8*
Валин	72,2*	76,6*	73,5*	76,8*
Метионин	87,3*	88,1*	84,1*	86,0*
Изолейцин	78,3	81,1*	80,2*	83,1*
Лейцин	82,3	85,2*	83,8*	84,8*
Тирозин	73,0*	75,3*	76,6*	73,2*
Фенилаланин	83,1*	83,4*	82,8*	83,4*

Здесь и в табл. 3, 4:  $p \leq 0,05$ ; \* — достоверные различия в опытах при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 3. Таксономический состав микробиоценозов тонкого кишечника бройлеров[d3], (в %)

Микроорганизм	Группа			
	1	2	3	4
Сем. <i>Bifidobacteriaceae</i>	0,43 ± 0,01*	1,77 ± 0,05*	0	0,22 ± 0,001*
Сем. <i>Ruminococcaceae</i>	4,43 ± 0,07*	10,99 ± 0,3*	31,68 ± 0,45*	29,93 ± 0,9*
Сем. <i>Lactobacillaceae</i>	14,72 ± 0,6*	14,33 ± 0,4*	1,31 ± 0,03*	3,29 ± 0,15*
Сем. <i>Clostridiaceae</i>	5,18 ± 0,07*	2,06 ± 0,08*	0,08 ± 0,001*	0,4 ± 0,001*
Сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	0,05 ± 0,003*	0,88 ± 0,001*	0,93 ± 0,03*	0,07 ± 0,001*
Сем. <i>Bacillaceae</i>	0,11 ± 0,008*	1,45 ± 0,03*	0	0,02 ± 0,001*
Род <i>Fusobacterium</i>	0,79 ± 0,02*	0,36 ± 0,002*	1,74 ± 0,06*	8,63 ± 0,12*
<i>Eubacterium</i>	0	0,3 ± 0,002*	1,15 ± 0,06*	1,53 ± 0,06*
<i>Proteobacteria</i>	3,35 ± 0,13*	0,3 ± 0,001*	0,29 ± 0,003*	0,04 ± 0,001*
<i>Burkholderia</i>	4,53 ± 0,18*	0,39 ± 0,002*	0	0,35 ± 0,005*
<i>Helicobacter</i>	0,03 ± 0,001*	0,18 ± 0,002*	5,78 ± 0,08*	3,32 ± 0,12*
<i>Actinobacteria</i>	4,06 ± 0,08*	19,32 ± 0,6*	9,77 ± 0,09*	16,13 ± 0,5*
<i>Mycoplasma</i>	0	0	0	1,42 ± 0,01*
<i>Selenomonas</i>	0	0	0	0,67 ± 0,01*
Некультивируемые бактерии	62,32 ± 1,5*	47,67 ± 0,8*	47,27 ± 1,2*	33,98 ± 1,03*

В табл. 3 представлены основные группы микроорганизмов, обитающих в кишечнике бройлеров. Данные о составе микробиоценоза получены методом T-RFLP-анализа. Всего в вариантах опыта выявлено 228 видов бактерий (пиков на T-RFLP-грамме). Существенную долю по количеству видов и по общей численности занимают некультивируемые бактерии. Установлено, что микробные сообщества кишечника бройлеров зависят не столько от типа рациона, сколько от ввода корректирующего микрофлору фактора – пробиотика.

Установлено, что ввод пробиотика увеличивает численность полезных целлюлозолитических бактерий (сем. *Ruminococcaceae*). Также ввод пробиотика повлиял на общую численность некультивируемых бактерий.

Данные корреляционного анализа между присутствием доминирующих видов микроорганизмов (доля не менее 1 %) и усвояемостью лизина представлены в табл. 4, из которых видно, что ряд бактерий может оказывать существенное влияние на усвоение лизина организмом птицы. Высокие (свыше –0,8) отрицатель-

Таблица 4. Корреляции между присутствием доминирующих видов бактерий и усвояемостью лизина

Пик	Микроорганизм	Коэффициент корреляции	Пик	Микроорганизм	Коэффициент корреляции
52,64	Некультивируемые бактерии	-0,65*	137,29	<i>Streptomyces</i> sp.	0,98*
55,73	<i>Bacteroides plebeius</i> , <i>Bacteroides coprophilus</i>	-0,61*	138,1	Некультивируемые бактерии	0,81*
56,81	Некультивируемые бактерии	-0,94*	139	Некультивируемые бактерии	0,43*
57,73	Некультивируемые бактерии	-0,66*	140	<i>Bifidobacterium</i> sp.	0,60*
59,22	<i>Bacteroidales oral clone</i>	0,21*	141	Некультивируемые бактерии	0,71*
60	<i>Bacteroides vulgatus</i>	-0,81*	142	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,95*
65,68	Некультивируемые бактерии	-0,44*	143	<i>Lactobacillus</i> sp.	0,96*
66,78	Некультивируемые бактерии	-0,55*	143,49	<i>Lactobacillus</i> sp.	-0,92*
67,89	Некультивируемые бактерии	-0,80*	144	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,96*
69	Некультивируемые бактерии	-0,83*	145,45	<i>Lactobacillus</i> sp.	-0,39*
70,02	Некультивируемые бактерии	-0,37*	146,15	<i>Lactobacillus</i> sp.	-0,21*
71	Некультивируемые бактерии	0,81*	147,56	Некультивируемые бактерии	0,24*
72,08	Некультивируемые бактерии	0,82*	148,33	Некультивируемые бактерии	0,40*
73,47	Некультивируемые бактерии	0,74*	149,37	Некультивируемые бактерии	0,62*
75,45	Некультивируемые бактерии	0,88*	150,3	Некультивируемые бактерии	0,28*
76,11	Некультивируемые бактерии	0,87*	151,39	Некультивируемые бактерии	0,88*
77,5	Некультивируемые бактерии	0,92*	152,77	Некультивируемые бактерии	0,88*
78,92	Некультивируемые бактерии	0,95*	153,65	<i>Sphingobacterium faecium</i>	-0,06*
80,07	Некультивируемые бактерии	0,98*	154,47	<i>Cytophaga</i> sp.	0,26*
100,35	<i>Bifidobacterium</i> sp.	0,98*	156,1	Некультивируемые бактерии	0,54
105,19	Некультивируемые бактерии	0,94*	203,94	Некультивируемые бактерии	-0,82
109,51	<i>Brevibacterium linens</i>	0,87*	236,74	Некультивируемые бактерии	-0,89*
113	<i>Bacillus</i> sp.	-0,01*	247,22	<i>Microbacterium</i> sp.	0,36*
114,84	<i>Bacillus</i> sp.	-0,61*	248,5	<i>Microbacterium</i> sp.	-0,81*
116,74	<i>Pandoraea</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp.	0,95*	365	Некультивируемые бактерии	-0,66*
129,98	Некультивируемые бактерии	0,75*	533	<i>Lactobacillus</i> sp.	-0,89*
131	Некультивируемые бактерии	-0,54*	535	<i>Lactobacillus</i> sp.	0,13*
132,76	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,73*	539,55	<i>Lactobacillus</i> sp.	0,05*
134	<i>Paenibacillus</i> sp.	0,19*	544	<i>Lactobacillus</i> sp.	-0,51*
135,65	Некультивируемые бактерии	0,82*	545,49	<i>Lactobacillus</i> sp.	0,67*
136,33	Некультивируемые бактерии	-0,31*	602,97	Некультивируемые бактерии	-0,39*
136,74	Некультивируемые бактерии	0,98*			

ные коэффициенты корреляции отмечены для некультивируемых бактерий (пики 56,81; 67,89; 69; 203,94) *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus* sp., *Microbacterium* sp.

Отмечены высокие положительные корреляции с усвоением лизина у некультивируемых бактерий (пики 71; 72,08; 75,45; 76,11; 77,5; 80,07; 135,65; 151,39; 152,77). Обнаружено, что виды молочнокислых бактерий (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus* sp.) также положительно влияют на усвояемость лизина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микроорганизмы кишечника по-разному влияют на усвояемость лизина. Ряд видов молочнокислых бактерий — представителей полезной микрофлоры кишечника — могут негативно влиять на доступность лизина. По-видимому, молочнокислые бактерии используют лизин для собственного метаболизма, «объедая» организм хозяина — птицы. Поэтому для создания новых пробиотических препаратов на основе бактерий, представителей микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных, целесообразно подбирать штаммы-продуценты лизина.

Установлено, что ввод пробиотика увеличивает численность полезных целлюлозолитических бактерий семейства *Ruminococcaceae* и уменьшает общую численность некультивируемых бактерий.

Использование штаммов-продуцентов лизина в пробиотических препаратах позволяет

гарантировать максимальную доступность незаменимой а.к. для организма птицы, хорошую конверсию корма и здоровье птицы.

Работа выполнена в рамках соглашения с Министерством образования и науки Российской Федерации о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. № 14.579.21.0021.

## СПИСОК ССЫЛОК

1. Barrow P. A., Brooker B. E., Fuller R., Newport M. J. / J. Appl. Bacteriol. 1980. V. 49. P. 147 – 154.
2. Кабисов Р., Цугкиев Б., Хозиев А. Мурзабеков А. / Птицеводство. 2010. № 5. С. 40 – 41.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 350 с.
4. Чеботарев И. И., Эрнст Л. К., Самуйленко А. Я., Фисинин В. И., Панин А. Н., Лаптев Г. Ю., Школьников Е. Э. Штамм *Escherichia coli* — продуцент лизина, способ получения кормовой добавки, содержащей данный штамм, композиция, полученная этим способом, и способ кормления моногастричных животных и птиц. Патент RU 2347807[d1], 2009.
5. Эрнст Л. К., Лаптев Г. Ю. Использование рекомбинантных и нереккомбинантных микроорганизмов для оптимизации микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. — М.: Россельхозакадемия, 2002. — 68 с.
6. Лившиц В. А., Дорошенко В. Г., Машико С. В., Ахвердян В. З., Козлов Ю. И. Штамм *Escherichia coli* — продуцент аминокислоты (варианты) и способ получения аминокислот (варианты). Патент RU 2212447[d2], 2003.

## APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF PROBIOTIC BASED ON LYSINE-PRODUCING BACTERIA

V. I. Fisinin<sup>1</sup>, I. I. Chebotarev<sup>2</sup>, I. N. Nikonov<sup>3,5</sup>, L. A. Ilina<sup>3</sup>, G. Yu. Laptev<sup>3</sup>, N. G. Mashentceva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> All Russia Poultry Research Technology Institute, 10, Ptitcegradskaya street, Sergiev Posad Moscow region, 141300

<sup>2</sup> Bioreaktor Limited, 18, Komarova ulitsa, Schelkovo Moscow region, 114142

<sup>3</sup> BIOTROPН+ Limited, 8, Malinovskaya ulitsa, Saint-Petersburg, Pushkin, 196602

<sup>4</sup> Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoye shosse, Moscow, 125080

<sup>5</sup> ilnikonov@yandex.ru

The article presents data on the effect of intestinal microflora on the absorption of lysine when typing in the diets of probiotic preparation. It is shown that intestinal microorganisms have different effects on the digestibility of lysine. A number of species of lactic acid bacteria — representatives of beneficial intestinal flora, may have a negative impact on the availability of lysine. To create a new probiotic preparations necessary to determine their impact not only on the microbiocenosis, but also on the absorption of nutrients and biologically active compounds.

**Keywords:** probiotics, intestinal microflora, producers of lysine.