

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ТЕХНИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

А.П. Сеницын^{1,2}, О.А. Сеницына¹, А.М. Рожкова²

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Ферментные препараты (ФП) находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства: при глубокой переработке зерна, в крахмало-паточной и спиртовой промышленности, виноделии, пивоварении, для улучшения качества хлебобулочных изделий, при производстве и реструктуризации мясо- и рыбных продуктов, получении соков и вин, растительных экстрактов и ароматизаторов, в качестве кормовых добавок при кормлении сельскохозяйственных животных и птицы, при утилизации и переработке различных отходов, при производстве топливного этанола первого и второго поколений, в качестве компонентов технических и бытовых моющих средств, в целлюлознобумажной и текстильной промышленности.

Одним из основных источников технических ферментов являются микроорганизмы – к преимуществам их использования как продуцентов ферментов относятся сравнительно короткий цикл роста, простой состав питательных сред, способность к биосинтезу как индивидуальных ферментов, так и мультиферментных систем, а также генетическая стабильность [1]. Отметим, что микроскопические грибы считаются наиболее перспективным источником технических ферментов – среди них можно найти продуценты практически всех необходимых для использования в промышленности или сельском хозяйстве ферментов [2].

Для получения грибов-продуцентов с высокой секреторной способностью используют два подхода: различные виды мутагенеза и селекции (этот подход требует больших затрат времени), а также методы генетической инженерии, которые позволяют быстро и эффективно получать высокоактивные штаммы-продуценты целевых ферментов. Кроме того, генно-инженерные подходы дают возможность целенаправленно изменять как сами штаммы-продуценты, так и свойства ферментов, например, увеличивать их стабильность и молекулярную активность [2].

В литературе описан ряд эффективных грибных экспрессионных систем «хозяин-вектор» – с использованием грибов родов *Aspergillus*, *Hypocrea* (ранее *Trichoderma*), *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophyla* (ранее *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium canescens* [3].

Путём мутагенеза и селекции нами из дикого штамма *P. verruculosum* был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221–151 [4], из которого также путем мутагенеза был создан реципиентный штамм *P. verruculosum* B1–537 ($\Delta niaD$), обладающий высокой секреторной способностью (до 50–60 г./л. внеклеточного белка). Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, что используется в качестве селекционного признака при скрининге рекомбинантных штаммов. В результате мутагенеза у штамма *P. verruculosum* B1–537 ($\Delta niaD$) снижена глюкозная катаболитная репрессия, что позволяет культивировать его, используя питательные среды, содержащие глюкозу, а также в режиме, предусматривающем подпитку глюкозой [4].

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1–537 ($\Delta niaD$) продуцирует комплекс внеклеточных целлюлаз и ксиланаз, обладающих высокой активностью; биосинтез ферментов индуцируется целлюлозой и целлоолигосахаридами.

Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках штамма *P. verruculosum* B1–537 ($\Delta niaD$), содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с регуляторными элементами гена *cbh1*, ответственного за синтез целлюлогидролазы-1, мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum*. Эти элементы представляют собой промотор и терминатор гена *cbh1*, а сигнальный пептид зависит от выбора целевого белка [4].

Ниже представлены данные, иллюстрирующие возможности использования экспрессионной системы *P. verruculosum* для получения промышленно важных ферментов.

Кормовые добавки. Помимо питательных веществ (крахмал, белки) зерно злаковых, являющееся основным компонентом кормов сельскохозяйственных животных и птицы, содержат некрахмальные полисахариды (НПС – целлюлозу, β -глюканы и ксиланы), препятствующие полному усвоению кормов. Содержание НПС в кормовом сырье варьирует в довольно широких пределах и может достигать 13–15 % его массы [5]. Для борьбы с антипитательными свойствами НПС используются кормовые ферментные добавки, в состав которых входят различные карбогидразы. В качестве ферментов гидролизующих НПС нами были выбраны эндо- β -1,4-глюканаза-1 (ЭГ1 *H. jecorina*), гомологичную эндо- β -1,4-глюканазу-2 (ЭГ2) и эндо- β -1,4-ксилазу Е (КсилЕ) *P. canescens*. ЭГ1 характеризуется высокой активностью по отношению целлюлозе, β -глюкану, ксилану и ксилоглюкану, ЭГ2 – к целлюлозе и β -глюкану, КсилЕ – по отношению к ксилану, причем белковые ингибиторы ксиланаз из злаков (типа ТАХ1, Х1Р и другие) не влияют на активность КсилЕ. Эти три фермента обладают высокой термостабильностью, что важно для сохранения их активности при гранулировании комбикормов – необходимой стадии современного кормопроизводства, которую осуществляют при повышенной температуре [2]. В результате одновременной трансформации реципиентного штамма плазмидами, несущими гены *egl1* и *egl2*, был получен штамм *P. verruculosum* продуцент ЭГ1 и ЭГ2 (с его помощью на заводе ООО «Агрофермент» производят ФП Агроцелл Плюс). При трансформации реципиентного штамма плазмидой, несущей ген *xyIE*, получили штамм-продуцент КсилЕ (на его основе там же производится ФП Агроксил Плюс). Одновременная трансформация реципиентного штамма плазмидами, несущими гены *egl2* и *xyIE*, привела к созданию штамма-продуцента ЭГ2 и КсилЕ (который используется для производства ФП Агроксил Премиум) [6,7]. Активности ФП, используемых в качестве кормовых добавок по отношению к различным субстратам, приведены в таблице 1. Полученные продуценты позволяют выпускать промышленные ФП, обладающие высокой активностью по отношению к НПС и успешно применять их в качестве кормовых добавок.

Таблица 1. Активность кормовых ферментных препаратов, производимых ООО «Агрофермент».

Ферментный препарат	Ферментативная активность, ед./г*			
	Целлюлаза (КМЦаза)	β -Глюканаза	Ксиланаза	Фитаза
Агроцелл Плюс (ЭГ1-ЭГ2)	4000	3000	400	–
Агроксил Плюс (КсилЕ)	500	500	4000	–
Агроксил Премиум (ЭГ2-КсилЕ)	3000	2500	3000	–
Агрофит	–	–	–	5000–10000
Агрофит Про	5000	2000	2000	2000

Фитаты являются запасным соединением фосфора в семенах высших растений. Из-за низкой фитазной активности в пищеварительном тракте животных и птицы эта форма фосфора является для них малодоступной в результате основная часть фосфора (50–70 %), входящего в состав кормов растительного происхождения, не усваивается. Фитаза гидролизует фитаты до неорганического фосфата и мио-инозитола и широко используется в качестве кормовой добавки для повышения пищевой ценности кормов [8].

Нами получен штамм *P. verruculosum* – продуцент фитазы *A. A. niger* (фитаза-3), который используется на заводе ООО «Агрофермент» для производства ФП Агрофит, а также Агрофит Про (смесевой препарат фитазы и ферментов, гидролизующих НПС), активности этих ФП приведены в таблице 1.

Пищевая промышленность. Ферменты находят широкое применение в пищевой промышленности, в частности для производства соков и вин. Профильные предприятия стремятся к быстрой переработке больших объемов фруктов и ягод, расширяя при этом сырьевую базу и пытаясь снизить затраты на производство соков с сохранением их качества. Однако высокое содержание пектиновых веществ в растительных клеточных стенках плодово-ягодных культур часто приводит к затрудненности сокоотдачи.

Использование ферментов для обработки плодово-ягодного сырья позволяет эффективно решать задачи интенсификации соответствующих технологических процессов. Коммерческие ФП, используемые для этого, в подавляющем большинстве случаев характеризуются высоким содержанием пектолитических ферментов, но обладают низкой активностью по отношению к целлюлозе и гемицеллюлозам.

Другие коммерческие ФП, предназначенные, например, для эффективной биоконверсии растительного сырья, имеют высокую геми- и целлюлозолитическую активность, но низкий уровень пектолитической активности [9]. Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*) секретирует комплекс целлюлаз, способных эффективно гидролизовать целлюлозу, а также гемицеллюлазы, но не имеет пектиназ. На базе этого штамма мы создали продуценты пектиназ, а также целлюлаз и ксиланаз, позволяющие получать ФП, характеризующиеся одновременно высокой пектолитической активностью, а также высокой активностью ферментов, предназначенных для деструкции других полисахаридов клеточной стенки плодово-ягодного сырья [10]. Были получены рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* – продуценты эндо – 1,4- α -полигалактуроназы (ПГ) *A. niger*, пектинлиазы (ПЕЛ) *P. canescens*, а также продуценты одновременно ПГ и ПЕЛ. При их культивировании получены лабораторные ФП, активность которых по отношению к различным субстратам приведена в таблице 2.

Таблица 2. Активность лабораторных ферментных препаратов, содержащих пектиназы, по отношению к разным субстратам.

Субстрат	Ферментативная активность, ед./мг		
	ФП B1-537	ФП ПГ	ФП ПГ-ПЕЛ
ПГК*	52 $\pm$ 1	16300 $\pm$ 200	17300 $\pm$ 200
Пектин цитрусовый	0	0	800 $\pm$ 20
МКЦ	110 $\pm$ 2	47 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2
КМЦ	6 700 $\pm$ 40	1 515 $\pm$ 5	1 085
Ксилан березовый	7 000 $\pm$ 100	2 070 $\pm$ 20	2 315

Примечание: ПГК – полигалактуроновая кислота, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, КМЦ – Na-соль карбоксиметилцеллюлозы.

ФП, полученный с помощью реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*), практически не проявлял ни полигалактуроназной, ни пектинлиазной активности, в то время как ФП ПГ-ПЕЛ обладал высокой пектинлиазной активностью (по отношению к пектину), а препараты ПГ и ПГ-ПЕЛ имели высокую полигалактуроназную активность (по ПГК). При этом рекомбинантные ФП имели заметную целлюлогидролазную активность (по МКЦ), эндоглюканазную (по КМЦ) и ксиланазную активности.

Пектолитические мультиферментные ФП были использованы для получения соков высокого качества из различных видов плодово-ягодного сырья (калины, шиповника, боярышника, клубники) [11]. Наилучшие результаты показаны для ФП, в состав которого входили ПГ и ПЕЛ: выход сусла из калины возрос на 60–70 %, из садовой клубники – на 200–300 %, из шиповника – на 50 %, из боярышника – на 20–30 % по сравнению с выходом сусла из контрольных образцов, обработка которых ферментами не проводилась.

Применение ФП ПГ-ПЕЛ позволило увеличить содержание в соке шиповника и боярышника сухих веществ, аскорбиновой кислоты, полифенольных соединений, увеличить антиоксидантную активность [11]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности использования новых ФП, в состав которых входят пектолитические, целлюлолитические и гемицеллюлолитические ферменты, в технологии производства соков из различных видов плодово-ягодного сырья.

Пектолитические мультиферментные ФП были также использованы для изготовления в лабораторных условиях плодовых вин (из рябины, черной смородины и сливы), в технологию которых была включена стадия мацерации под действием ферментов. Применение новых ФП позволило более полно раскрыть свойства, присущие различному плодovому сырью. Кроме того, удалось увеличить выход продукта из плодовой мякоти и получить легко осветляемые вина с меньшим содержанием летучих кислот и повышенной интенсивностью окраски. В ферментированном сусле было зафиксировано меньшее содержание взвесей по сравнению с контрольными образцами (без фермента), опытные образцы сусла отличались меньшей вязкостью. Ферментативная обработка мякоти позволила улучшить органолептические характеристики плодовых вин – они были более ароматными и с более насыщенным вкусом по сравнению с контрольными образцами [11].

Переработка сельскохозяйственных растений с целью получения разнообразных продуктов, в частности физиологически ценных полимеров (инулин и другие) – одно из важных направлений пищевой отрасли. Многолетнее растение топинамбур (*Helianthus tuberosus*) становится популярной сырьевой культурой, поскольку компонентом его клубней и стеблей является полисахарид инулин (β -2,1-полифруктан), содержание которого в клубнях достигает 80 % по сухому веществу. Источниками инулина могут служить также цикорий, агава, артишок и другие цветковые растения. Инулин является сырьем для производства широкого круга важных продуктов, таких как кристаллическая фруктоза, фруктозный сироп, фруктоолигосахариды, лимонная, молочная и фумаровая кислоты, а также биотопливо (биоэтанол, биобутанол) [12].

Важнейший этап переработки инулина в полезные продукты – гидролитическая конверсия в моносахариды (фруктозу и глюкозу) под действием экзоинулиназы (ИНУ). Путём трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (*AniaD*) плазмидой, содержащим ген экзоинулиназы-1 (*inul*) *A. awamori* нами был создан высокоактивный штамм-продуцент ИНУ [13]. При культивировании в лабораторных и промышленных ферментёрах экзоинулиназная активность достигала более 2500 ед./мл КЖ. Опытные партии ФП ИНУ были произведены на заводе ООО «Агрофермент» и использованы компанией ООО «ИстАгроДон» на предприятии по переработке топинамбура, расположенного на территории Особой экономической зоны «Данков» Липецкой обл.

ИНУ приводила к количественной конверсии инулина в глюкозо-фруктозный сироп (ГФС) с соотношением Глу: Фру 1:3. ИНУ обладала сахаразной (инвертазной) активностью и осуществляла гидролиз сахарозы с получением ГФС с соотношением Глу: Фру примерно 1:0,63. Кроме этого, ИНУ обладала α -галактозидазной активностью и осуществляла полную конверсию галактоолигосахаридов сои (раффинозы и стахиозы) в моносахариды (глюкозу, галактозу и фруктозу). Таким образом ИНУ является перспективным для биотехнологического применения ферментом вследствие своей высокой активности и широкой субстратной специфичности и может быть с одинаковым успехом использована для переработки инулина, получения ГФС как из инулина, так и из сахарозы, а также для деструкции галактоолигосахаридов сои [14].

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Соглашение о предоставлении гранта в форме субсидии № 075–15–2021–1071 от 28 сентября 2021 г.).

Литература

1. Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA, 3rd edition. Washington, USA: ASM Press, 2003, 760 p. ISBN 1555812244, 9781555812249
2. Синицын А.П., и др. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения промышленно важных ферментов (Обзор), Биотехнология, 2020, Т.36, № 6, С. 24–41. doi:10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41
3. Sinitsyn A.P. et al. *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strains producers of carbohydrases. In: Microorganisms in Biorefineries. Ed. Kamm B. USA: Springer, 2015, 1–19. doi: 10.1007/978-3-662-45209-7 1
4. Синицын А.П. и др. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина, способ получения штамма гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения ферментного препарата. Патент РФ 2378372, опубл. 10.09.2009
5. Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В. Антипитательные факторы кормов. Воронеж: Воронежская областная типография, 2013, 206 с. ISBN 978-5-4420-0151-8
6. Синицын А.П. и др. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии комплекса ферментов эндоглюканаз и ксиланаз в клетках гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения комплексных ферментных препаратов на его основе, предназначенных для кормопроизводства. Патент РФ 653429, опубл. 08.05.2018
7. Синицын А.П. и др. Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*. Биотехнология, 2019, 35(4), 6-14. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14
8. Misset O. Phytase. In: Handbook of Food Enzymology. Eds Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2003, 687–706. doi: 10.1590/S1516-93322004000200020
9. Mamma D., Kourtoglou E., Christakopoulos P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus processing industry. Bioresource Technology, 2008, 99(7), 2373–2383. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.018
10. Бушина Е.В., Рубцова Е.А., Рожкова А.М. и др. Создание продуцентов целлюлолитических и пектолитических ферментов на основе гриба *Penicillium verruculosum*. Прикладная биохимия и микробиология, 2015, 51(4), 402–411. doi: 10.7868/S0555109915040042
11. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодово-ягодных субстратов. Виноградарство и виноделие, 2014, 1, 36–39
12. Park J.P., Kim D.H., Kim D.S., Yun J.W. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice. Biotechnology, 1998, 20(4), 385–388. doi: 10.1023/A:1005383415013
13. Синицын А.П. и др. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* (варианты) и способ получения ферментного препарата и его использование (варианты). Патент РФ 2646136, опубл. 01.03.2018
14. Синицына О.А., Рубцова Е.А., Осипов Д.О. и др. Сравнительный анализ свойств рекомбинантных эндоинулиназы, экзоинулиназы, сахаразы и α -галактозидазы С. Биотехнология, 2022, т. 38, № 2, с. 1–12. doi: 10.31857/S0234275822020077