

## ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В РОССИИ: СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ, ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

А.П. Сеницын<sup>1,2</sup>, А.М. Рожкова<sup>1,2</sup>, С.А. Курзеев<sup>1</sup>, Н.В. Цурикова<sup>3</sup>, О.А. Сеницына<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>ВНИИ Пищевой биотехнологии – филиал ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи РАН, Москва, Россия

Ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Источниками технических ферментов служат животные, растения и микроорганизмы различных таксономических групп – как прокариоты (грамотрицательные и грамположительные бактерии), так и эукариоты (дрожжи, грибы). К преимуществам микроорганизмов как продуцентов ферментов относится короткий цикл роста, относительно простой состав питательной среды и дешевизна её компонентов, способность к биосинтезу как одного (преобладающего) фермента, так и мультиферментных систем [1].

Микроскопические грибы считаются наиболее перспективным источником технических ферментов. Для реализации экономически оправданного производства ферментов важно иметь грибы-продуценты с высокой секреторной способностью. Увеличение продуктивности обеспечивается с помощью двух подходов – первый заключается в использовании различных видов мутагенеза и селекции (обычно проводят ряд последовательных стадий мутагенеза). Второй основан на использовании методов генетической инженерии, которые позволяют быстро и эффективно модифицировать исходные высокоактивные штаммы-продуценты с целью получения целевых ферментов или ферментных комплексов. Манипуляции с ДНК клетки-хозяина или внесение в ДНК этой клетки экзогенного генетического материала дают возможность целенаправленно изменять как сами штаммы-продуценты, так и свойства белков «интереса» – например, увеличивать их стабильность и ферментативную активность [2].

В последние десятилетия был создан ряд грибных экспрессионных систем «хозяин-вектор» с высоким уровнем секреторной способности, что позволяет проводить биосинтез целевых ферментов или ферментных систем. Для этого используют грибы родов *Aspergillus*, *Hypocrea* (ранее *Trichoderma*), *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophyla* (ранее *Chrysosporium lucknowense*) и *Penicillium canescens* [3].

С помощью серии последовательных шагов неупорядоченного мутагенеза с последующей селекцией из дикого штамма *Penicillium verruculosum* нами был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* В221-151 [11], из которого далее, также путем мутагенеза, получили реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta niaD$ ), сохранивший высокую секреторную способность предшественника (до 50–60 г/л внеклеточного белка). Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, принимающую участие в ассимиляции нитратного азота, что используется в качестве селекционного признака при скрининге рекомбинантных штаммов.

Важной особенностью реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta niaD$ ) является то, что он продуцирует комплекс внеклеточных целлюлаз, которые по своей гидролитической активности превосходят аналоги, получаемые при использовании штаммов рода *Hypocrea*, в том числе те, которые применяются в промышленном производстве ферментов [12]. Кроме того, в результате мутагенеза у штамма *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta niaD$ ) снижена глюкозная катаболитная репрессия, что даёт возможность культивировать его в питательной среде, содержащей глюкозу, а также в режиме, предусматривающем подпитку глюкозой. Биосинтез целлюлаз этого штамма индуцируется целлюлозой и целлоолигосахаридами.

Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках реципиентного штамма гриба *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta niaD$ ) содержит целевую кодирующую последовательность, функционально связанную с регуляторными элементами гена *cbh1*, ответственного за синтез целлюобиогидролазы-1 (ЦБГ1), – мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum*. Эти элементы представляют собой промотор и терминатор гена *cbh1*, а сигнальный пептид зависит от выбора целевого белка [3].

Ниже проанализирована возможность использования экспрессионной системы *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta niaD$ ) для получения и производства некоторых промышленно важных ферментов.

**Кормовые добавки.** Зерна злаковых культур, широко используемых для производства кормов в животноводстве и птицеводстве (пшеница, рожь, овес, ячмень) помимо питательных веществ (крахмал, белки) содержат некрахмальные полисахариды (НПС) – целлюлозу,  $\beta$ -глюканы и ксиланы, являющихся причиной неполного усвоения кормов. Моногастричные животные, а также птицы не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве для повышения усвояемости кормов в качестве добавок используют ферментные препараты (ФП), в состав которых входят целлюлазы,  $\beta$ -глюканазы и ксиланазы.

В качестве ферментов, гидролизующих НПС, мы выбрали эндо- $\beta$ -1,4-глюканазу-1 (ЭГ1) *H.jecorina*, гомологичную ЭГ2 и эндо- $\beta$ -1,4-ксилазазу Е (КСИЛЕ) *P.canescens*. ЭГ1 характеризуется высокой активностью по отношению целлюлозе,  $\beta$ -глюкану, ксилану и ксилоглюкану, ЭГ2 – к целлюлозе и  $\beta$ -глюкану, КСИЛЕ – по отношению к ксиланам. Эти ферменты активны в широком диапазоне рН и температуры, в том числе при физиологическом значении этих параметров (рН 3 и 7 и 37–38°C), характеризуются высокой стабильностью при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), а также высокой термостабильностью в условиях гранулирования комбикормов (80-90°C). Нужно отметить, что злаковые белковые ингибиторы ксиланаз (типа ТАХ1, Х1Р и другие) не влияют на активность КСИЛЕ.

В результате одновременной трансформации реципиентного штамма *P.verruculosum* В1-537 (*DeltaD*) плазмидами, несущими гены *egl1* и *egl2*, был получен штамм-продуцент ЭГ1 и ЭГ2 [14]. При его культивировании в лабораторных ферментерах выход ферментов достигает 1800 единиц эндо- $\beta$ -1,4-глюканазной активности в 1 мл культуральной жидкости (КЖ). При трансформации плазмидой, несущей ген *xyIE*, получили штамм-продуцент КСИЛЕ, который продуцирует в лабораторных ферментерах не менее 3500 единиц ксиланазной активности в 1 мл КЖ. Одновременная трансформация плазмидами, несущими гены *egl2* и *xyIE*, привела к созданию штамма-продуцент ЭГ2 и КСИЛЕ, который позволяет получить в КЖ до 1200 ед/мл эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы и 3500 ед/мл ксиланазы.

ФП, полученных с помощью штаммов-продуцентов ЭГ1 и ЭГ2 («Агроцелл Плюс»), КСИЛЕ («Агроксил Плюс»), и ЭГ2 и КСИЛЕ («Агроксил Премиум»), выпускают в настоящее время на заводе по производству ферментов «Агрофермент» и применяют для кормления цыплят-бройлеров и поросят [4].

Фитаты (соли *D-мио*-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфорной кислоты) являются запасным соединением фосфора в семенах высших растений. Из-за низкой фитазной активности в пищеварительном тракте для моногастричных животных и птиц, эта форма фосфора является недоступной для них, в результате основная часть фосфора (50–70%) не усваивается. Кроме того, фитиновая кислота связывается с катионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , с белками и липидами, образуя малорастворимые соединения, что значительно снижает питательную ценность кормов. Фитаза гидролизует фитаты до неорганического фосфата и *мио*-инозитола и широко используется в качестве кормовой добавки для повышения пищевой ценности кормов.

Нами получен штамм *P.verruculosum* – продуцент гетерологичной фитазы *A.niger*, который при культивировании в лабораторных ферментерах позволил получать высокие уровни фитазной активности в КЖ (несколько тысяч ед/мл). Фитаза А проявляет активность в широких диапазонах рН (от 2 до 7) и температуры (25-75°C), фермент характеризуется высокой термостабильностью. Кормовые ФП, содержащие фитазу А («Агрофит»), а также содержащий КСИЛЕ и фитазу А («Агрофит Плюс») выпускают в настоящее время на заводе «Агрофермент» [4].

**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 снижая затраты на производство соков с сохранением их качества, основными критериями которого являются органолептические показатели, а также высокий уровень экстрактивных веществ. Достоинства готовых соков заключаются в их привлекательном внешнем виде, прозрачности, устойчивости при хранении, возможности их концентрирования без опасения желирования продукта [5].

Высокое содержание пектиновых веществ в растительных клеточных стенках плодово-ягодных культур часто приводит к затрудненности сокоотдачи, снижению качеств соков, уменьшению сроков хранения. В настоящее время наиболее перспективным направлением считается обработка плодово-ягодного сырья ферментами, позволяющими максимально эффективно решить задачи интенсификации технологических процессов. Коммерческие ФП, используемые для обработки пектинсодержащих материалов, в подавляющем большинстве случаев имеют высокую пектолитическую активность, но не обладают активностью по отношению к целлюлозе и гемицеллюлозам, формирующим клеточную стенку растительного сырья. Реципиентный штамм *P.verruculosum* В1-537 (*DeltaD*)

продуцирует комплекс целлюлаз, а также ксиланазы, хотя в продуцируемых им ферментах нет пектиназ. На базе этого штамма мы создали продуценты пектиназ: пектинлиазы *P.canescens* и эндо- $\alpha$ -1,4-полигалактуроназы *A.niger*, причём они одновременно продуцировали целлюлазы и ксиланазы. Это позволило получить ФП, предназначенных для эффективного гидролиза природных пектин-, целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих субстратов [6], которые были использованы для получения соков высокого качества из различных видов плодово-ягодного сырья (калины, шиповника, боярышника, клубники). Выход суслу из калины возрос на 60–70%, из садовой клубники – на 200–300%, шиповника – на 50%, боярышника – на 20–30% по сравнению с выходом суслу из контрольных образцов, обработка которых ферментами не проводилась. Было существенно увеличено содержание аскорбиновой кислоты и полифенольных веществ в соке шиповника и боярышника, повышена антиоксидантная активность соков.

Пектолитические (мультиферментные) ФП были также использованы для изготовления плодовых вин (из рябины, черной смородины и сливы) в технологию которых была включена стадия ферментативной мацерации [7]. 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 суслу отличались меньшей вязкостью. Ферментативная обработка мякоти позволила улучшить органолептические характеристики плодовых вин – они были более ароматными и обладали более насыщенным вкусом по сравнению с контрольными образцами. Отметим, что опытные партии ФП пектиназ были выпущены заводом «Агрофермент» («Пектозим»).

Переработка сельскохозяйственных растений с целью получения разнообразных продуктов, в частности физиологически ценных полимеров (инулин и другие) – одно из важных направлений пищевой отрасли. В этом отношении особого внимания заслуживает многолетнее растение топинамбур (*Helianthus tuberosus*), которое благодаря уникальному составу биополимеров становится популярной сырьевой культурой в пищевой промышленности не только России, но и других стран. Топинамбур мало подвержен болезням, требует минимального ухода, не боится засухи и холода, а также может произрастать практически на любых почвах. Источниками инулина могут служить также цикорий, агава, артишок и другие цветковые растения. Инулин является сырьем для производства широкого круга биотехнологически важных продуктов, таких как кристаллическая фруктоза, фруктозный сироп, фруктоолигосахариды (ФОСы), лимонная, молочная и fumarовая кислоты, а также биотопливо (биоэтанол, биобутанол) [8].

Важнейший этап переработки инулина в полезные продукты – гидролитическая конверсия в моносахариды под действием экзоинулиназы, гидролизующей по процессивному механизму концевые  $\beta$ -2,1-фруктозидные связи инулина и сахарозы. Нами был создан высокоактивный штамм *P.verruculosum* – продуцент гетерологичной экзоинулиназы *A.awamori* [9]. При культивировании в лабораторных ферментерах экзоинулиназная активность в КЖ достигала уровня 2500 ед/мл. Использование ФП экзоинулиназы позволило осуществить полную конверсию инулина корней топинамбура и получить гидролизат с содержанием фруктозы и глюкозы в соотношении примерно 3:1. Был также создан рекомбинантный штамм *P.verruculosum* – продуцент гетерологичной эндоинулиназы *A.niger*, этот фермент используется для получения ФОСов, обладающих пребиотической активностью. Опытные партии ФП экзо- и эндоинулиназы были выпущены заводом «Агрофермент» («Топилаза Экзо» и «Топилаза Эндо»).

**Охрана окружающей среды.** Как уже отмечалось, мицелиальные грибы занимают лидирующую позицию в качестве объектов биотехнологического производства. В качестве промышленных продуцентов наиболее часто используют грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Hypocrea*. В процессе ферментации в качестве отхода образуется большое количество грибного мицелия – например, в результате производства лимонной кислоты на основе штамма *A.niger* в мире образуется до 0,34 млн тонн мицелия в год. Лишь небольшой процент биомассы мицелия идет на корм скоту. Грибная биомасса не подлежит длительному хранению и является источником загрязнения окружающей среды; наиболее распространенным способом ее утилизации является сжигание [9].

Клеточная стенка мицелиальных грибов состоит из гликопротеинов и полисахаридов, главным образом хитина,  $\beta$ -глюканов и  $\beta$ -маннанов. Представляется, что способ ферментативной деструкции полисахаридов клеточной стенки мицелиальных грибов позволяет осуществить экологически и экономически оправданный процесс переработки биомассы грибного мицелия. На основе реципиентного штамма *P.verruculosum* В1-537 ( $\Delta$ *niaD*) нами созданы высокоактивные штаммы-продуценты ферментов, разрушающих полисахариды клеточной стенки мицелиальных грибов –

гетерологичных эндо- $\beta$ -1,4-хитиназы и эндо- $\beta$ -1,3-глюканазы (ламинариназы) *M.thermopila* и эндо- $\beta$ -1,4-маннаназы *T.reesei* [10]. Обработка смесевыми ФП хитиназы, ламинариназы и маннаназы биомассы мицелия микроскопических грибов, используемых в промышленной биотехнологии (*T.reesei*, *P.verruculosum*, *A.awamori*) париводила к его разрушению и существенному уменьшению объёма, что свидетельствует о перспективности использования этих ФП для конверсии и утилизации отходов микробиологической промышленности. Опытные партии этих ФП были использованы в производственном цикле завода «Агрофермент» для утилизации биомассы мицелия грибных штаммов – продуцентов производимых там технических ферментов.

Способность бактерий объединяться в организованные сообщества – биоплёнки и, таким образом, защищаться от неблагоприятных факторов внешней среды, является основной причиной, препятствующей действию антибактериальных препаратов (биоцидов), как антибиотиков, так и различных дезинфицирующих средств. Биоплёнки формируются за счёт экзополисахаридного матрикса (ЭПМ), липополисахаридов, белков и нуклеиновых кислот бактерий; в состав ЭПМ входят декстраны, альгинаты,  $\alpha$ -и  $\beta$ -глюканы. Возможным подходом к уничтожению бактерий, находящихся в состоянии биоплёнок, является применение ферментов, способных разрушать полисахариды ЭПМ и, тем самым, разрушать протективный барьер бактерий для проведения дальнейших процедур – их уничтожения с помощью биоцидов, или для проведения диагностирования. На основе реципиентного штамма *P.verruculosum* В1-537 (*DniaD*) нами созданы высокоактивные штаммы – продуценты карбогидраз, разрушающих полисахариды ЭПМ – альгинат-лиазы, эндо- $\alpha$ -1,3-глюканазы (мутаназы), эндо- $\beta$ -1,6-глюканазы (пустуланазы), а также эндо- $\alpha$ -1,6-декстраназы [11]. Была доказана высокая активность ФП, содержащих эти ферменты в отношении биопленок различных грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий, установлено также, что для достижения максимальной эффективности разрушения биоплёнок на абиотических поверхностях следует использовать смеси указанных выше ФП в сочетании с биоцидами и другими функциональными и технологическими компонентами, увеличивающими биоцидную активность. Опытные партии ФП, предназначенные для разрушения ЭПМ биоплёнок были выпущены заводом «Агрофермент».

**Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования  
(Соглашение 075-03-2025-057/3 от 17.04.2025).**

#### Литература

1. Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd ed. Washington: ASM Press, 2003. 760 p.
2. Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. The Fungi. 2nd ed. USA: Academic Press, 2001. P. 225–530. ISBN 9780127384467.
3. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Рожкова А.М. 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
4. Сеницын А.П., Короткова О.Г., Рубцова Е.А. и др. Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 4. С. 6–14. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14
5. Фруктовые и овощные соки. Технология, химия, микробиология, экспертиза, значение и нормативное регулирование / под ред. У. Шобингера, А.Ю. Колесниковой. СПб.: Профессия, 2004. 639 с. ISBN 5-93913-062-3.
6. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодово-ягодных субстратов // Вино и виноделие. 2012. № 1. С. 20–21.
7. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Использование новых мультиферментных комплексов в производстве фруктовых вин // Известия ТСХА. 2015. Вып. 5. С. 123–131.
8. Chi Z.-M., Zhang T., Cao T.-S. et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses // Bioresource Technology. 2011. Vol. 102. № 6. P. 4295–4303. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.086
9. Волков П.В., Сеницына О.А., Федорова Е.А. и др. Выделение и свойства рекомбинантных инулиназ *Aspergillus* sp. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 5. С. 611–621. doi: 10.1134/S0006297912050094
10. Середа А.С., Великорецкая И.А., Осипов Д.О. и др. Ферментные комплексы для разрушения клеточной стенки мицелиальных грибов – продуцентов промышленных ферментов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3 (2). С. 31–35. doi: 10.31040/2222-8349-2018-2-3-31-35
11. Романова Ю.М., Тутельян А.В., Сеницын А.П. и др. Ферменты из группы карбогидраз разрушают структуру матрикса биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий // Медицинский алфавит. 2019. № 4 (34). С. 40–45. doi: 10.33667/2078-5631-2019-4-34(409)-40-45