

## Лекция 12

### Селекция продуцентов ферментов.

Преимущества использования микроорганизмов для создания продуцентов ферментов. Основные тенденции в развитии селекции продуцентов ферментов. Важнейшие классы ферментов, получаемых микробиологическим способом, их основные продуценты. Ферменты, гидролизующие крахмал. Протеолитические ферменты. Селекция штаммов-продуцентов важнейших ферментов. Конструирование продуцентов ферментов с помощью генетической инженерии. Конструирование продуцентов ферментов с помощью слияния протопластов. Способы создания продуцентов ферментов. Мировое производство ферментов, основные производители.

#### 12.1. Преимущества использования микроорганизмов для создания продуцентов ферментов

В настоящее время человечеству известно около 2000 ферментов, из них только две сотни получены или синтезированы как индивидуальные соединения. Вместе с тем микроорганизмы представляют большой интерес как продуценты этих соединений. Этот интерес обусловлен рядом факторов:

- метаболизм микроорганизмов (следовательно, и работа ферментных систем) отличаются высокой интенсивностью. КПД работы клеток *Azotobacter* в 200-400 раз превышает таковой у клеток печени человека;
- микроорганизмы отличаются высокой степенью прироста биомассы;
- многие микроорганизмы растут на дешевых средах (целлюлоза, углеводороды нефти, метан, метанол и т. д.);
- микроорганизмы могут продуцировать ферменты во внешнюю среду (экзоферменты) и это не требует разработок специальных технологий по их выделению;
- микроорганизмы являются источником некоторых уникальных ферментов: танназы (расщепляет дигаллат до галловой кислоты), рацемазы (превращение аминокислот), кератиназы (гидролизующей серосодержащие белки – кератины), пенициллиназы (расщепление пенициллина до пеницилловой кислоты), нитрогеназы (образование аммиака из молекулярного азота и воды);
- некоторые бактерии (термофильные) имеют оптимум роста 60-80 °С и выше, что позволяет получать на их основе термостабильные ферменты и белки. Так, экстремальный термофил *Thermus aquaticus* обладает энолазой с оптимумом действия при 90 °С. А гриб *Malbranchea pulchella* выделяет термостабильную протеиназу, сохраняющую активность при 73 °С;

- большой интерес как продуценты ферментов представляют анаэробные микроорганизмы. Использование этих организмов позволит проводить процесс в больших емкостях с высоким слоем сред;
- ферменты, продуцируемые многими микроорганизмами, являются индуцибельными. Так, синтез  $\alpha$ -галактозидазы *E. coli* индуцируется лактозой и происходит через 3 мин после ее внесения.

В настоящее время микробиологическим способом получают разнообразные ферменты (как правило, это внеклеточные ферменты – их производство относительно дешево). Всего же 90 % от объема производства ферментных препаратов составляют следующие: гидролазы, протеазы, гликозидазы, липазы и другие.

## 12.2. ФЕРМЕНТЫ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ КРАХМАЛ

Наиболее важными промышленными гидролазами являются ферменты, гидролизующие крахмал ( $\alpha$ -амилаза;  $\beta$ -амилаза; глюкоамилаза; глюкоизомераза). Их традиционными продуцентами являются бациллы.

Так, наибольшее промышленное значение для получения бактериальной  $\alpha$ -амилазы (фермента, «осахаривающего» крахмал) имеют *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*. Имеются генно-инженерные разработки продуцентов этого фермента на основе бактерий *B. subtilis*.

Японскими учеными сконструирована гибридная плазмида pTV B257, в которой структурный ген *bla*  $\beta$ -лактамазы *E. Coli* соединен с  $\alpha$ -амилазным геном *amyE*. Такой плазмидой трансформировали клетки штамма *B. subtilis*, дефектные по  $\alpha$ -амилазе. Трансформанты отличались уровнем продукции фермента на порядок превышающем синтез его у исходного штамма.  $\alpha$ -Амилаза получена также в виде промышленного препарата из *Aspergillus oryzae*, но в отличие от бациллярных амилаз, этот фермент является гликопротеином и обнаруживает более низкую термостабильность.

Широко используемая в пивоваренной и спиртовой промышленности  $\beta$ -амилаза, также получается на основе бацилл: *B. cereus*, *B. polymyxa*, *Megaterium*, а также на основе некоторых штаммов *Pseudomonas* и *Streptomyces*.

Глюкоамилаза (также гидролизующая крахмал) производится преимущественно на основе грибов, так как у бактерий практически не встречается. Ферменты из *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endomyces* преобладают на рынке, однако предпочтение отдается первому, так как ферменты на его основе более термостабильны.

Глюкоизомеразу (фермент, осуществляющий превращение глюкозы во фруктозу, что обеспечивает сладость продукта и используется в пищевой промышленности) получают на основе *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces albus*, *B. coagulans*. Появились сообщения о конструировании штамма *Saccharomyces diastolicus*, являющегося продуцентом глюкозоамилазы. Штамм получен путем слияния протопластов гаплоидных штаммов, что увеличило копияность гена STA, отвечающего за синтез глюкозоамилазы.

К классу гидролаз относятся также липазы. Из имеющих промышленное значение выделяются триацилглицеролгидролазы и ацилгидролазы, которые осуществляют гидролиз триглицеридов с образованием глицерина и жирных кислот.

Продуцентами внеклеточных липаз являются грибы из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, дрожжи *Candida* и бактерии *Pseudomonas*. Большое практическое значение имеет микробиологический синтез пенициллинамидаз, которые гидролизуют пенициллин. Фермент используется для химического синтеза замещенных пенициллинов, а также инактивации антибиотика. Наиболее эффективными продуцентами этого фермента являются штаммы *E. Coli*, *Neurospora crassa*.

Широкое применение в пищевой, деревообрабатывающей и легкой промышленности находит целлюлаза. Этот фермент, участвующий в деградации целлюлозы, получают на основе плесневых грибов *Trichoderma reesei*. Еще один фермент, участвующий в разложении целлюлозы до глюкозы –  $\alpha$ -глюкозидаза. Активными продуцентами этого фермента являются *Aspergillus spp*, а также дрожжи *Cladosporium resinae*. Специфический фермент, обладающий целлюлолитической активностью – эконаза – находит широкое применение в легкой и пищевой промышленности для редукации солода и утилизации целлюлозы. Продуценты – *Trichoderma reesei* (продуктивность – 50 000 – 80 000 ед/мл).

Промышленными продуцентами изомераз – ферментов, гидролизующих сахарозу до глюкозы и фруктозы и используемых в кондитерской и пищевой промышленности, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Продуцентами лактазы – фермента, гидролизующего лактозу до глюкозы и галактозы, являются грибы рода *Aspergillus*.

### 12.3. ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Являются самыми распространенными из всех секретируемых микробных ферментов. Микробные протеазы группируются в три класса: сериновые, металло- и кислые протеазы, которые обладают различным оптимумом активности при щелочной, нейтральной и кислой реакциях среды, соответственно.

Сериновые и металлопротеазы производятся в промышленном масштабе на основе штаммов бацилл, а кислые - из грибов (главным образом, *Mucor* и *Endothia*). Сериновые протеазы используются в производстве моющих средств для очистки одежды и по своим свойствам напоминают животный фермент трипсин. Металлопротеазы применяются в пищевой, кожевенной и пивоваренной промышленности. Кислые протеазы используются для производства сыров и имеют свойства, сходные с животным пепсином.

Следует отметить, что протеазы, ферменты гидролиза крахмала и глюкозоизомераза в целом заполняют рынок производства ферментов на 90 %. Все остальные из перечисленных ферментов составляют лишь незначительный процент.

Большое значение имеет производство очищенных ферментов для исследовательских целей, в частности, эндонуклеаз рестрикции. Ассортимент рестриктаз в мировом производстве очень широк. Большинство рестриктаз получают из штаммов *E. coli*, *B. subtilis*, *Haemophilis influenzae*, *Micrococcus spp.* и др.

#### **12.4. СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ВАЖНЕЙШИХ ФЕРМЕНТОВ**

В селекции продуцентов ферментов используются как традиционные в селекции микроорганизмов подходы (мутагенез и ступенчатый отбор на сверхсинтез), так и методы генной инженерии (получение генетических рекомбинантов и клонирование генов). Все эти методы традиционно направлены на изменение или полное снятие регуляции синтеза ферментов. Известно, что эта регуляция осуществляется на пяти основных стадиях:

- 1) связывание РНК-полимеразы и инициация транскрипции;
- 2) индукция или дерепрессия транскрипции;
- 3) катаболитная репрессия транскрипции;
- 4) связывание рибосом и стабильность мРНК;
- 5) проникновение фермента через мембрану и стенку клетки с последующим процессингом (если это внеклеточный фермент).

Мутанты по РНК-полимеразе легко выделяют с помощью селекции на антибиотикоустойчивость (например, к рифампицину или стрептолидигину). Такой подход использовался в получении продуцентов  $\alpha$ -амилазы у *B. subtilis*. Нарушение синтеза данного фермента происходило, очевидно, вследствие изменения узнавания мутировавшей РНК-полимеразой промоторов для генов  $\alpha$ -амилазы.

Индукция или репрессия ограничивают экспрессию многих оперонов внеклеточных ферментов. Соответственно мутации, приводящие к устранению потребности в индукторе либо снимающие реPRESSION, обеспечивают конститутивный синтез данного продукта. Так, фенил-в-О-галактозид можно использовать для отбора на конститутивный синтез в-галактозидазы у *E. coli*. Примером получения продуцента промышленного масштаба может служить синтез глюкоизомеразы у *Streptomyces phaeochromogenes*. Этот фермент используется для метаболизма ксилозы и ликсозы, однако ликсоз не индуцирует его синтез. Поэтому проводят отбор мутантов, выросших на среде с ликсозой, поскольку они будут иметь конститутивный синтез этого фермента.

Мутанты, нечувствительные к катаболитной реPRESSION, представляют ценность в нескольких отношениях.

Во-первых, они синтезируют ферменты на ранних стадиях ростового цикла культуры.

Во-вторых, они всегда секретируют ферменты на более высоком уровне и допускают использование дешевых субстратов. Такие мутанты получают несколькими путями:

- простой отбор мутантов на агаризованных средах, содержащих высокие концентрации глюкозы или глицерола;
- путем селекции на рост в присутствии антиметаболитов, например целлобиозы. Таким путем были получены, например, продуценты глюкозидазы из *Trichoderma*;
- отбор на способность к спорообразованию в присутствии глюкозы путем пасеризации культур. Так, мутанты *Actinomyces fradiae* дерепрессированы в отношении спорообразования в присутствии глюкозы и образуют повышенное количество сериновой протеазы благодаря мутации в области *catA*.

Что касается контроля трансляции, то существует три способа ее модифицировать:

- а) увеличить стабильность мРНК;
- б) повысить эффективность сайтов инициации трансляции;
- в) повысить элонгацию цепи.

Мутации, изменяющие секрецию ферментов, особенно полезны для повышения выхода ферментов, хотя молекулярные механизмы этих процессов редко расшифрованы. Такие мутации получают селекцией на устойчивость к различным антибиотикам, изменяющим структуру клеточной стенки. Например, по устойчивости к циклосерину, ампициллину, новобиоцину были получены продуценты у *B. subtilis*, секретирующие в 5 раз больше фермента, чем исходный штамм. Сходным образом были получены продуценты у *Fusarium* и *Trichoderma*.

## 12.5. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Для получения рекомбинантов при селекции продуцентов ферментов обычно используется техника переноса генов.

У грамотрицательных бактерий (в основном *E. coli*) применяют конъюгацию, основанную на мобилизации хромосомы с помощью конъюгативных плазмид. У других бактерий применяют трансдукцию либо транспозоновый мутагенез.

У грамположительных бактерий (*B. subtilis*) успешно применяют трансформацию. Например, в селекции промышленного штамма *B. subtilis* Marburg был использован комплексный подход. Дикий тип образовывал около 10 ед. мл<sup>-1</sup> амилазы. Его регуляторный мутант по гену *amyR3* давал амилазы в 5 раз больше. А мутант по гену *pap*, который отвечает за секрецию фермента обеспечивал увеличение выхода амилазы в 3 раза. Эти локусы были введены путем трансформации в штамм *B. subtilis* Marburg и дали усиление эффекта в 14 раз. Еще более продуктивные штаммы получают посредством мутаций на антибиотикорезистентность. Так, мутант С-108 продуцировал амилазы в 5 раз больше и протеазы в 80 раз больше, чем бактерии дикого типа. Хромосомальной ДНК из этих мутантов трансформировали указанный штамм. Продуктивность его по амилазе возросла в 1500 раз и составила 15 000 ед. мл<sup>-1</sup>.

Повышения продуктивности рекомбинантных микроорганизмов можно достигнуть путем введения высокоэкспрессируемых векторов с сильными промоторами, обеспечивающими высокий уровень транскрипции чужеродных генов. Одним из таких промоторов является *trp*-промотор. Он применялся для экспрессии генов интерферона и гормона роста. Данный промотор обладает уникальным свойством - регулируемостью. Это позволяет отделить процесс роста рекомбинантных микроорганизмов от экспрессии чужеродных генов, жизнедеятельность которых может отрицательно сказаться на росте клеток-хозяев. Тф-промотор был введен в состав рекомбинантной плазмиды, в которой ген *галактозидазы* находился под контролем этого промотора. Работу промотора можно было регулировать добавлением в среду индуктора (индолилакриловой кислоты), а также изменением концентрации триптофана в среде.

## 12.6. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

Для создания промышленных штаммов на основе грибов применяется техника слияния протопластов. Так был получен продуцент глицериндегидрогеназы при слиянии протопластов *Cellulomonas sp.* NT. Гибридный штамм обладал по сравнению с родительским в 18 раз более высокой активностью фермента. Имеются сообщения о получении высокоэффективного продуцента амилазы на основе протопластов гриба *Chalara paradoxa*.

В настоящее время широко используются возможности клонирования генов для получения высокоэффективных продуцентов ферментов. Было получено увеличение выхода амилазы из *B. amyloliquefaciens* в составе мультикопийной плазмиды, при этом число копий этого гена возросло в 50 раз.

Для увеличения экспрессии клонированных генов используют *lac*-промотор перед вводимыми генами. Чужеродный ген вводят в рестрикционный сайт плазмиды. Плазида расщепляется рестриктазой в другом сайте, после чего на нее воздействуют третьей эндонуклеазой в сайте гена *amp* и соединяют со сконструированным сборным *lac*-промотором. Этим способом была сконструирована плазида, которая определяет синтез от 10 000 до 15 000 молекул *v*-глобулина кролика на одну клетку *E. coli*.

В случае эукариотических генов это, по-видимому, гибридный сайт связывания рибосомы, включающий последовательность Шайна-Дельгарно промотора и начальный триплет из последовательности вводимого гена. Чтобы получить оптимальное положение для промотора, брешь расширяется за счет соответствующей эндонуклеазы.

Классический мутационно-селекционный подход использовался в течение многих десятилетий. Метод обогащался рядом модификаций: например, совместным воздействием разных мутагенов, действие которых заведомо направлено на разные локусы, сочетанием обработки физическим и химическим мутагеном и т. д.

## 12.7. Мировое производство ферментов, основные производители.

Анализ мировой литературы и практики в области исследований и практического применения в легкой, пищевой промышленности и сельском хозяйстве ферментных препаратов микробного происхождения показывает быстро растущий интерес к ним как в развитых, так и развивающихся странах [1-4]. Причина этого - стремление к постоянному увеличению производства биологически полноценной и безопасной пищевой продукции, которая уже включена в перечень критериев продовольственной безопасности этих стран. В этом отношении особый интерес представляют ферменты микробного происхождения.

Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства. С деятельностью ферментов человечество знакомо очень хорошо с древних времен, хотя и не догадывалось об этом. Испокон веков люди знали способы приготовления хлеба, вина, пива, сыра, различных соусов и т.п., в которых главную роль играют процессы брожения, т.е. микроорганизмы и выделяемые ими ферменты. Использование ферментов позволяет значительно ускорять технологические процессы, увеличивать выход готовой продукции, повышать ее качество, экономить ценное сырье и др. Ферменты - биологические катализаторы белковой природы, способные во много раз ускорять химические реакции, протекающие в животном и растительном мире. Для получения ферментных препаратов пищевого назначения используют органы и ткани сельскохозяйственных животных, культурные растения (ананас, соя, папайя, инжир) и специальные штаммы микроорганизмов

В настоящее время в промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, нередко улучшенные естественным или искусственным отбором; штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций; штаммы, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Часто путем отбора не удается получить высокоактивные продуценты, поэтому возникает задача изменения природы организма в нужном направлении. Для этого используют методы селекции. Природные штаммы микроорганизмов не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде такое количество нужного продукта, которое обеспечило бы низкую его стоимость и требуемый объем производства. Поэтому задачей селекции является не только усиление

природной способности микроорганизмов продуцировать определенное вещество (ферменты, антибиотики, аминокислоты и т.д.), но во многих случаях и создание продуцента «заново» из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество, но не способного его продуцировать [5-7]. Эти задачи осуществляются получением у природных штаммов наследственных изменений - мутаций, влияющих на фенотип (физиологические и морфологические признаки) клетки. Спонтанные (происходящие случайным образом) мутации помогают микробным популяциям приспособляться к новым условиям существования. Мутации приводят к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также к появлению новой способности - синтезировать вещество в избытке (сверх своих потребностей).

Для ускорения селекции используют индуцированный мутагенез, применяя мутагенные факторы физической, химической и биологической природы. К универсальным физическим мутагенам относятся ультрафиолетовое облучение (УФО), рентгеновские лучи и др.; химические факторы мутагенного воздействия - азотистый иприт, нитрозамины, четыреххлористый углерод и другие химикаты; биологическими мутагенами являются фаги (вирусы микроорганизмов). Таким образом, селекционированные штаммы микроорганизмов обладают определенными ценными наследственно закрепленными свойствами.

Значительное увеличение выпуска ферментов наметилось в последние годы в связи с бурным ростом производства биоэтанола [8-11]. Создание промышленных способов получения недорогих амилолитических ферментных препаратов произвело революционный прорыв в технологии, который повлиял на мировую экономику. С помощью современных ферментных технологий из зерна получают биоэтанол - недорогое жидкое моторное топливо, которое уже стало альтернативой бензину, что дает возможность странам, не имеющим нефтяных месторождений, стать независимыми от поставок нефти. И это еще не все, на что способны ферменты. В будущем с их помощью можно будет получать биоэтанол из целлюлозосодержащего сырья, т.е. жидкое топливо из опилок - реальность завтрашнего дня. Сегодня биотехнология, особенно производство ферментных препаратов - огромный потенциал мировой экономики

Одна из ведущих фирм по производству ферментных препаратов **датская компания Novozymes** начала в 2008 году строительство нового завода по производству ферментов для получения этанола в г. Бдэр (США). Эта компания считается непревзойденным лидером в области производства ферментов для получения этанола. Положительный пример не остается без поддержки. **Компании Dupont и Genencor, подразделение Danisco A/S** также объявили о создании совместного предприятия, которое будет выпускать биоэтанол из целлюлозосодержащего сырья, рынок которого оценивается в 75 млрд долларов.

Пищевая промышленность в этом плане тоже не стоит в стороне. Если несколько десятков лет назад ферментные препараты широко использовались только в производстве спирта, пива и сыроделии, то сейчас ферменты широко применяются в мясной, кондитерской, хлебобулочной, масложировой, не говоря уже о молокоперерабатывающей промышленности. С этой целью широко используют инновации, которые построены на таких направлениях в области получения новых ферментов и разработки современных технологий, как:

- модификация свойств индустриальных ферментов с целью повышения их активности и удешевления целевых продуктов;
- скрининг новых микроорганизмов - продуцентов ферментов;
- получение новых рекомбинантных ферментов с заданными свойствами;
- разработка пищевых нанотехнологий с использованием ферментов [12-15].

Новые технологии позволяют расширить сферу применения ферментных препаратов. На сегодняшний день можно насчитать около 15 отраслей пищевой промышленности, где с успехом используют ферменты, причем в каждой отрасли отдельная группа ферментов обеспечивает достижение конкретных целей, позволяющих либо улучшить качество продукта, либо увеличить выход данной продукции или удешевить процесс, а значит, снизить себестоимость продукции. Так, например, в хлебопечении применение ферментов способствует снижению расхода муки, улучшению качества теста, замедляет черствение, а также позволяет расширить производство охлажденного и замороженного теста, выпечка из которого пользуется большой популярностью в Европе.

В масложировой промышленности использование ферментных препаратов увеличивает выход продукции и экстракцию масла, в крахмалопаточной промышленности благодаря применению ферментов происходит увеличение выхода продукции, модификация крахмала, т.е. получение крахмала с четко заданными свойствами. Переработка зерна, пивоварение, производство молочной продукции, в частности, сыров, производство вина, соков и сокосодержащих напитков, спирта, кофе, белковых продуктов, сахара, ароматизаторов, растительных экстрактов и пектина также не обходятся без применения ферментных препаратов. Широко используются ферменты и при производстве мясных изделий для реструктурирования мяса.

Как видно, практически ни одна отрасль пищевой промышленности не обходится без использования ферментов [16]. Но это не означает, что идет тотальное, бездумное применение всего спектра ферментов. Специалисты из Европейского комитета окружающей среды считают, что на рынок должны быть допущены только те ферменты, которые действительно способны приносить пользу здоровью потребителей. В связи с этим в свод правил ЕС, которые регламентируют использование тех или иных пищевых добавок (и ферментов в том числе) были

внесены некоторые новые законы. Так, первый закон позволит ввести в действие новую разрешительную процедуру, регулиующую порядок одобрения компетентными органами оборота «новых пищевых ингредиентов со всеми производными». Другие законодательные акты в деталях разрабатывают требования, которые предъявляются в отношении каждой разновидности пищевой добавки. Окончательное решение по поводу легальности оборота того или иного вещества будет приниматься ЕС на основании соответствующего постановления Европейского агентства пищевой безопасности.

По данным ряда аналитических служб европейский рынок пищевых ферментов постоянно расширяется и наращивает свои объемы, прибавляя ежегодно 8%, и, по мнению специалистов, к 2012 году должен в денежном выражении достичь объема в 846,2 млн евро. Одно из наиболее успешно развивающихся направлений - ферменты для выпечки. По данным *Frost* и *Sullivan*, этот сегмент, занимающий около трети всего рынка пищевых ферментов, за последние пять лет вырос почти на 40%. В 2010 году объем рынка составил более 53 млн евро.

**На сегодняшний день рынок ферментов достаточно стабилен.** Главными игроками на нем остаются такие компании, как *Novozymes*, *Danisco*, *Genzyme*, *Roche*, *Allergen*, *DSM* и *BASF*. Компания *Novozymes* контролирует 46% рынка ферментных препаратов, из которых, по данным исследовательского агентства *Freedonia Group*, более 26% приходится на ферменты для пищевой промышленности. Остальная часть (36%) поделена между *Danisco*, *Genzyme*, *Roche*, *Allergen*, *DSM* и *BASF*. Рынок пищевых ферментов отмечает исключительно положительную динамику. Для сравнения: весь рынок ферментных препаратов ежегодно «подрастает» в среднем на 10%, ежегодный рост европейского рынка, обеспеченный инновационными разработками, достиг уровня 3.5%. Мировой рынок ферментов растет вместе с мировым спросом на эту продукцию. На российском и казахстанском рынках присутствует продукция практически всех мировых лидеров ферментного рынка.

Компания *Novozymes* имеет в России представительство и также продает свою продукцию через дистрибьюторов, например, фирму «Пищепромпродукт», поставляющую ферментные препараты *Novozymes* для хлебопекарных и кондитерских предприятий. Продукцию нидерландской фирмы *DSM Food Specialties* - молокосвертывающие ферменты «Фромаза» и «Максирен» — на российский рынок поставляет компания «Антагро». Крупные фирмы предлагают на рынок, как правило, широкий спектр ферментов. Фирмы, специализирующиеся на определенных отраслях пищевой промышленности, выпускают ферменты специального назначения. Крупная датская фирма *Chr.Hansen*, работающая на рынке молочной продукции, уже более 130 лет производит и реализует универсальный сычужный фермент для производства сыра. Компания по праву

считается лидером на рынке сыров, поставляя натуральные молокосвертывающие ферменты производителям сыра во всем мире.

Наряду с европейскими лидерами по производству ферментов все чаще на рынке появляются фирмы из Индии, Южной Кореи, Тайваня, Китая, чьи производства, по мнению аналитиков, влияют на повышение спроса. Так, компания «ХимПартнеры» - российское подразделение индийско-китайско-российской группы *ProPartners*, специализирующейся на международной торговле сырьевыми материалами, поставляет ферменты индийского производства для многих отраслей пищевой промышленности (пивоварения, хлебобулочной, соковой, чайной и др.).

Во всем мире уровень применения ферментов повышается с развитием и внедрением современных инновационных технологий. Что касается инновационных технологий, то Россия и Казахстан более консервативны по сравнению с европейскими странами, поэтому мы отстаем от Запада по потреблению ферментных препаратов. Так, например, в масложировой промышленности инновационные технологии использования ферментов только начинают внедряться. Такая же ситуация наблюдается в хлебопечении и в мясной промышленности. Но жизнь диктует свои законы и стремление людей к здоровому образу жизни, а значит, и потреблению здоровой и функциональной пищи, заставляет производителей постепенно наращивать обороты своего производства с использованием инновационных технологий, позволяющих использовать различные пищевые ингредиенты, в том числе и ферменты определенного направленного действия.

Однако в России недостаточно, а в Казахстане практически не развито собственное производство ферментных препаратов. Все отрасли промышленности в Казахстане предпочитают использовать импортные ферментные препараты. Это связано в первую очередь с отсутствием масштабного отечественного производства. В настоящее время в России работают только несколько заводов, выпускающих ферменты микробного синтеза, среди них завод «Восток» в Кировской области и предприятие «Сиббиофарм» в Бердске.

Из других предприятий, которые ориентированы на выпуск пищевых ферментов, следует отметить ОАО «Московский завод сычужного фермента», который существует на рынке уже 75 лет и производит свои препараты из сырья исключительно животного происхождения. Свой вклад в развитие российского рынка ферментных препаратов вкладывает ростовский завод. Он поставляет на рынок не генномодифицированную продукцию для сыроделия, которая уступает импортной в цене, но не по качеству, как считают специалисты, использующие продукцию ростовского завода.

## 12. 7. Мировое производство ферментов, основные производители.

### Профили ведущих компаний - производителей ферментов

*Представляем рейтинг ведущих компаний - производителей ферментов, подготовленный на основе исследования компании Abercade Рынок ферментов России в 2007-2009 годах. Альтернативные технологии производства ферментов, ознакомиться с содержанием которого можно в разделе сайта Биотехнологии.*

#### **Novozymes A/S**

*Novozymes Bioindustrial Russia A/S*

*Адрес: Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, Denmark*

*Телефон: +45 44 46 00 00*

*Сайт: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)*

Представительство в России отсутствует

Компания является лидером мирового рынка ферментов. По оценкам самой компании ее доля на мировом рынке составляет 47%.

В настоящий момент Novozymes A/S является безоговорочным лидером российского рынка ферментных препаратов. Доля компании на российском рынке ферментных препаратов составляет 24%.

В структуре предложения на российском рынке основная доля приходится на препараты для пищевой промышленности - 55%. Среди пищевых ферментов наиболее значимой группой являются препараты для спиртового производства (1,47 тыс. тонн). Компания поставляет на рынок такие марки ферментов для производства спирта как Pentoran, Neutrase, Maturex и ряд других.

Также значимая часть препаратов для пищевой промышленности, порядка 180 тонн, предназначена для использования в крахмалопаточной промышленности - торговые марки Shearzyme, Liquozyme, Finizym и Dextrozyme. Основная масса ферментов для крахмального производства приобретает непосредственно потребителями (ОАО ГПК «Ефремовский»).

Второй по значимости группой являются ферменты для производства СМС, на их долю приходится 45% в общем объеме продаж. Препараты этой группы представлены марками Everlase, Aquazym, Mannaway, Savinase и Renozyme. Основным дистрибьютором является ООО «Биохим».

#### **Danisco A/S**

*Представительство в России: ЗАО «Даниско»*

*Адрес: ул. Стасовой 4, офис А50, Москва*

*Телефон: + 7 (495) 935-79-50*

*Сайт: [www.danisco.com](http://www.danisco.com)*

*E-mail: [info@danisco.com](mailto:info@danisco.com)*

Danisco A/S является второй компанией по объему продаж ферментов на мировом рынке (21%), по состоянию на 2009 год. В структуру компании входят подразделения Genencor BV, одно из крупнейших мировых производств ферментов, и Finefeeds OY, подразделение, специализирующееся на производстве кормовых добавок.

На российском рынке компания также следует за Novozymes A/S. По состоянию на 2009 год на долю компании приходилось 14% рынка.

Основная доля в структуре продаж (55%) приходится на препараты для пищевой промышленности. Из них на нужды спиртовой промышленности идет порядка 535 тонн. Основные марки ферментов для спиртового производства – Amylex, Distillase, Laminex и Optimalt.

На долю препаратов для производства СМС приходится 23%. Основная торговая марка – Purafect.

Третьей по значимости группой являются кормовые ферментные добавки— 23%. Кормовые добавки выпускаются под марками Avizyme (Avizyme 1200, 1202, 1100 – комплекс на основе глюконазы, ксиланазы и протеазы, Avizyme 1300, 1302 – на основе ксиланазы и протеазы, Avizyme 1500 – на основе пектиназы, амилазы, ксиланаза и протеаза) и Fizime (на основе фитазы).

Распространением продукции Danisco A/S на территории России занимается официальное представительство ЗАО «Даниско».

### **Alltech Ltd.**

*Представительство в России: ООО «Олтек»*

*Адрес: Академика Туполева наб., д. 15, корп. 2, оф. 32, Москва*

*Телефон: +7(495) 980 71 14*

*Сайт: [www.alltech.com](http://www.alltech.com)*

Компания Alltech Ltd является крупнейшим экспортером в Россию ферментных добавок для сельского хозяйства. Доля компании по состоянию на 2009 год находилась на уровне 7%.

Alltech Ltd. выпускает линию своих полиферментных комплексов под маркой Allzyme. Все препараты из ассортимента представляют собой концентрированные ферментные комплексы с высокой ферментной активностью.

Препарат Allzyme SSF производится на основе твердофазной ферментации. В настоящий момент компания Alltech Ltd располагает двумя заводами, работающими по принципу твердофазной ферментации. Первый завод был открыт в 2000 году в мексиканском Сердане. Мощность завода составляет 2000 тонн готового продукта (Allzyme SSF) в год. Сырьем при производстве служат пшеничные отруби. В настоящий момент завод работает при полной загрузке.

Второй завод начал строиться в 2005 году в Спрингфилде (Кентукки, США). Проектная мощность завода составляет 6000 тыс. тонн готового продукта в год. Сырьем для производства также служат пшеничные отруби (wheat bran), ежегодный объем переработки которых составляет 1 млн. USD в стоимостном эквиваленте. Ожидалось, что завод начнет работу уже осенью 2009. По последним данным, завод в Спрингфилде до сих пор не запущен.

В качестве штаммов-продукентов используются *Aspergillus niger* (производит фитазу) и *Rhizopus oryzae* (производит глюкоамилазу).

Компания Alltech Ltd придерживается комплексного подхода в производстве ферментных продуктов на основе твердофазной ферментации. Был создан многоступенчатый процесс, начинающийся от научной разработки технологии в лабораторных условиях, до ее масштабирования и вывода на промышленные объемы.

Успешность технологии твердофазной ферментации дает основания Alltech продолжать разработки в этой сфере, включающие в себя разработку новых штаммов, поиск новых применений. В настоящий момент активные поиски ведутся в области повышения перевариваемости и усвояемости таких кормов как отруби, рисовая шелуха и др. побочных продуктов растениеводства. При этой отмечается, что технология твердофазной ферментации в перспективе будет применяться не только для производства ферментов, но и для других продуктов (производство этанола и других вторичных метаболитов). Поверхностное культивирование может найти широкое применение в усовершенствовании практики кормления животных.

## **Shandong Longda Bio-Products Co**

*Не имеет собственного представительства в России*

*Адрес: 3 Yibo Road, Yishui county, Shandong province, China*

*Телефон: 86-539-2251064*

*Сайт: [www.longdaenzyme.en.china.cn](http://www.longdaenzyme.en.china.cn)*

*[www.longda-enzyme.com](http://www.longda-enzyme.com)*

Shandong Longda Bioproducts Co. специализируется на производстве ферментов для промышленного использования. На российский рынок компания поставляет энзимы для спиртовой промышленности.

В 2009 году объем поставок находился на уровне 1,16 тыс. тонн, что составляет практически 10% от объема предложения на российском рынке ферментных препаратов.

Основной объем импортируемых ферментов потребляется на спиртовых предприятиях Владикавказа.

## **Kemin Europa N.V.**

*Не имеет собственного представительства в России*

*Адрес: Toekomstlaan 42 B-2200, Herentals*

*Телефон: 32 14 28 62 00*

*E-mail: [customer.contacts@kemin.com](mailto:customer.contacts@kemin.com)*

*Сайт: [www.kemin.com](http://www.kemin.com)*

Головной офис компании Kemin Industries Inc. Располагается в США. Производственные мощности расположены в США, Бельгии, Китае, Индии, Бразилии, Мексике и ряде других стран азиатского региона. На российский рынок поступает продукция из европейского филиала фирмы – Kemin Europa N.V., расположенного в Бельгии. Основными направлениями деятельности компании являются: фармацевтика, пищевые добавки, кормовые добавки и корма для домашних животных.

В России компания не имеет собственного представительства и распространением ее продукции занимаются российские компании, специализирующиеся на торговле кормовыми добавками: ООО «Агро Фуд РФ», ООО «Биоплекс» и др.

Kemin Industries Inc. является одним из пионеров российского рынка ферментов для сельского хозяйства и традиционно является одним из основных поставщиков этих продуктов на рынок. В 2009 году объем экспорта в Россию составил 4% от объема российского рынка ферментных препаратов. Показатель стоимостной оценки составляет 867 тыс. USD в ценах производителя и 3,1 млн. USD в ценах

потребителей. Ассортимент ферментной продукции представлен марками Kemzyme и Nutrikem.

Помимо ферментов, компания также представляет на рынке широкий ассортимент кормовых добавок: эубиотиков, кормовых консервантов и энтеросорбентов.

### **Framelco B.V.**

*Не имеет собственного представительства в России*

*Адрес: P.O. Box 30, NL-49-40 AA, Raamsdonkersveer, Netherlands*

*Телефон: 31 (0) 162 52 560 29*

*Сайт: [www.framelco.nl](http://www.framelco.nl)*

Framelco B.V. является нидерландской компанией, специализирующейся на производстве различных кормовых добавок. Компания не имеет собственного представительства в России, продукция распространяется через компании, занимающиеся реализацией различных кормовых добавок.

На российский рынок компания вышла в 2008 году. Компания занимает порядка 3% натурального объема рынка ферментных препаратов России.

Характерной особенностью продукта Esozim является то, что носителем в нем выступают отруби. Помимо ферментов компания также поставляет на рынок эубиотики, энтеросорбенты и др. улучшители кормов.

### **Biovet AD**

*Адрес: Болгария, 4550, г. Пештера ул. П. Ракова, 39*

*Телефон: +359 350 65619*

*E-mail: [biovet@biovet.com](mailto:biovet@biovet.com)*

*Сайт: [www.biovet.com](http://www.biovet.com)*

Компания Biovet AD является болгарским производителем кормовых добавок, ветеринарных препаратов и других активных субстанций для сельскохозяйственных животных. Фактически Biovet AD принадлежит болгарской фармацевтической компании Nuverpharma AD, которая владеет 85% акций.

По состоянию на 2009 год объем поставок на российский рынок оценивается почти в 200 тонн, что составляет 2% в общем объеме рынка ферментных препаратов России. Показатель стоимостной оценки в ценах производителя находится на уровне 1,7 млн. USD, в ценах потребителей- 6,3 млн. USD.

Ассортимент ферментных препаратов представлен линейкой под торговыми марками Кормофит и Ксибетен. Препараты представляют собой высококонцентрированные полиферментные комплексы, что определяет их высокую цену для потребителей (порядка 40\$).

### **ООО ПО «Сиббиофарм»**

*Адрес: 633004 г. Бердск, Новосибирской области, ул. Химзаводская, 11*

*Телефон: +7 (38341) 5-80-00, 5-80-23*

*E-mail: sibbio@sibbio.ru*

*Сайт: www.sibbio.ru*

ООО ПО «Сиббиофарм» является крупнейшим ферментным производством в России. Производство осуществляется на базе модернизированного оборудования Бердского завода биопрепаратов (БЗБП). Выпускаемые предприятием ферменты предназначены для использования в спиртовой промышленности и сельском хозяйстве.

В 2009 году объем производства находился на уровне 380 тонн товарных ферментных препаратов, что оценивалось в 1,7 млн. USD в ценах производителя. Значительная часть продукции отправляется на экспорт в Беларусь и другие страны СНГ - более 200 тонн ежегодно, что составляет более половины от объема выпускаемой продукции. Подобное соотношение между продукцией для внутреннего рынка и для экспорта обуславливает незначительную долю ООО ПО «Сиббиофарм» в объеме предложения на российском рынке ферментных препаратов – менее 1%.

Ассортимент предприятия включает следующие ферментные препараты для сельского хозяйства: Амилосубтилин ГЗх, Протосубтилин ГЗх, ГлюкоЛюкс-Ф и ЦеллоЛюкс-Ф, МЭК-СХ-2. Большая часть производимых ферментов обладает степенью очистки ГЗх: «Г» обозначает, что продуцент, производящий ферменты глубинного культивирования. «Зх» в названии обозначает, что активность ферментов в препарате в 3 раза выше, чем в неочищенной субстратной жидкости. Фактически препарат обладающей степенью очистки ГЗх, обладает низкими активностями ферментных препаратов, и уступает по активности ферментов большинству зарубежных аналогов. В меньшем количестве ООО ПО Сиббиофарм производятся ферменты с более высокими степенями очистки, например ЦеллоЛюкс-Ф. Такие препараты обладают высокими ферментативными активностями, и способны конкурировать с большинством ферментов иностранных производителей по качеству.

Помимо ферментных препаратов предприятие выпускает также широкий спектр продуктов для сельского хозяйства: силосные закваски, биопестициды и ряд других препаратов.

## **ЗАО «Биотехнологическая компания «Восток»**

*Адрес: . Москва, пр-т Вернадского, д.84 ГК 2 оф. 2220*

*Телефон: +7 (495) 436-02-05; 231-22-57*

*Сайт: [www.vostokbiotech.com](http://www.vostokbiotech.com)*

ЗАО «Биотехнологическая компания «Восток» являлась вторым крупнейшим биотехнологическим производством в России. Однако в 2008 году предприятие прошло процедуру банкротства, что вызвало приостановку производства. В настоящий момент компания выпускает под заказ незначительные объемы ферментных препаратов, выступая как подрядчик.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф.С.