

«Пушкинский научный центр биологических исследований»
Российской академии наук



Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

HTS-технология получения ферментных препаратов

А.В. Лисов^{1,2}, О.В. Белова¹, З.А. Лисова¹, В.А. Самойленко¹,
Ж.И. Андреева-Ковалевская¹, М.В. Захарова¹, А.М. Шадрин¹,
А.А. Леонтьевский^{1,2}

¹ ИБФМ РАН

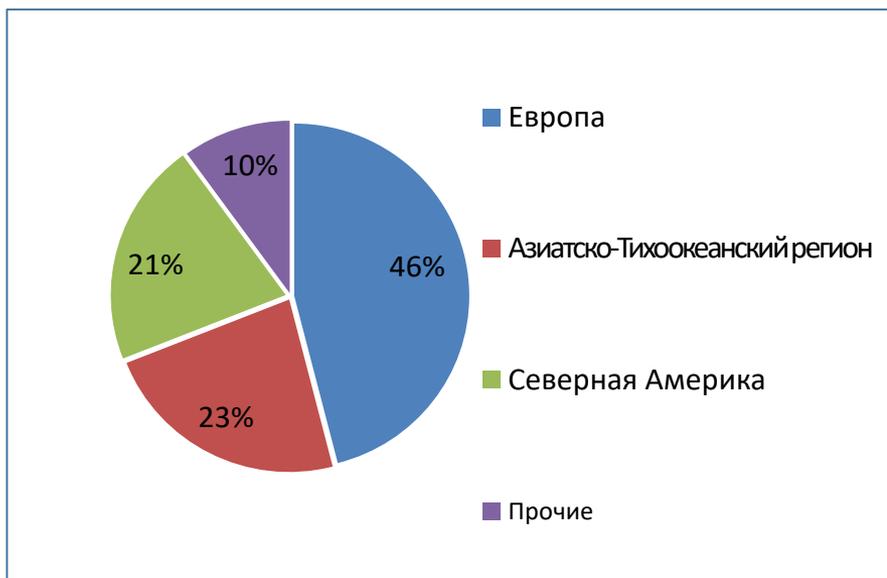
² Пушкинский государственный естественно-научный институт

Пушино, «Царьград», 5 октября 2018 г.

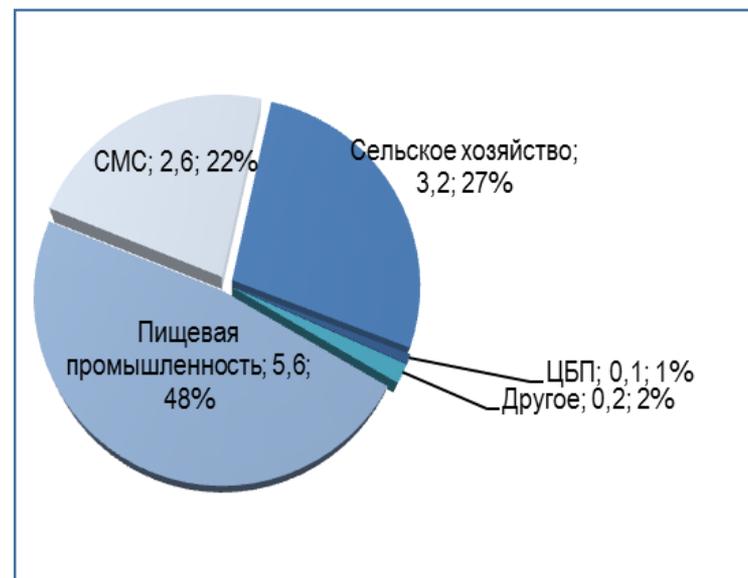


Обзор рынка ферментных препаратов

Структура мирового рынка



Структура импорта в РФ (тыс. т., %)



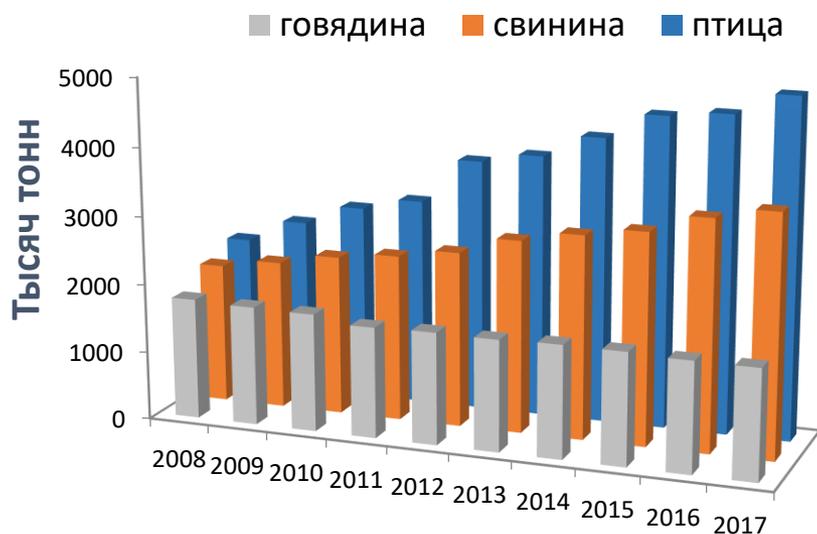
Источник: Государственная таможенная служба, оценки экспертов; расчеты ООО «Новус»

- Доля РФ не превышает 0.1% мирового рынка
- Общий объем рынка РФ 12-14 тыс. т., 100-120 млн USD
- Общий объем производства в РФ не превышает 3 тыс. тонн.
- Импортная продукция составляет 96-98% объема рынка
- Рост мирового рынка 5-7 % в год, в РФ – 7-10% в год

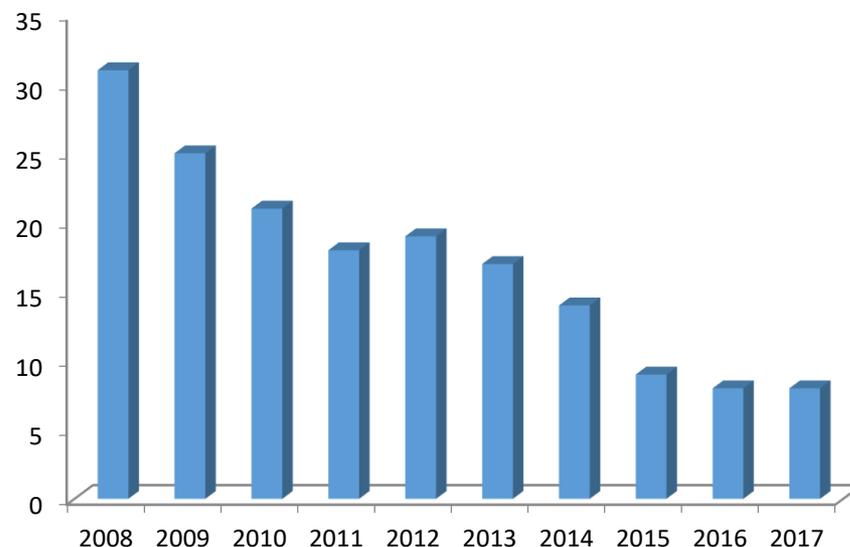
Рост потребности в ферментных препаратах для производства кормов



Динамика производства мяса в РФ



Доля импорта мяса в РФ



Источник: Росстат, Abercade consulting

В ближайшие пять лет потребление кормов должно увеличиться на 40%

Схема разработки технологии получения новых ферментных препаратов





Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ)



- Поддерживает более 20 тыс. штаммов микроорганизмов, входит в число крупнейших в мире, является уникальным ресурсом геномов и культур для развития биотехнологии и медицины
- Имеет собственную информационную базу данных
- Интегрирована в международную сеть коллекций культур.

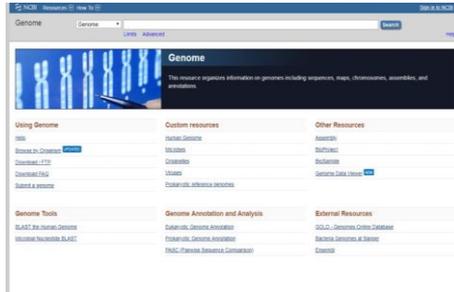


Схема отбора целевых генов



GenBank

Всероссийская коллекция микроорганизмов

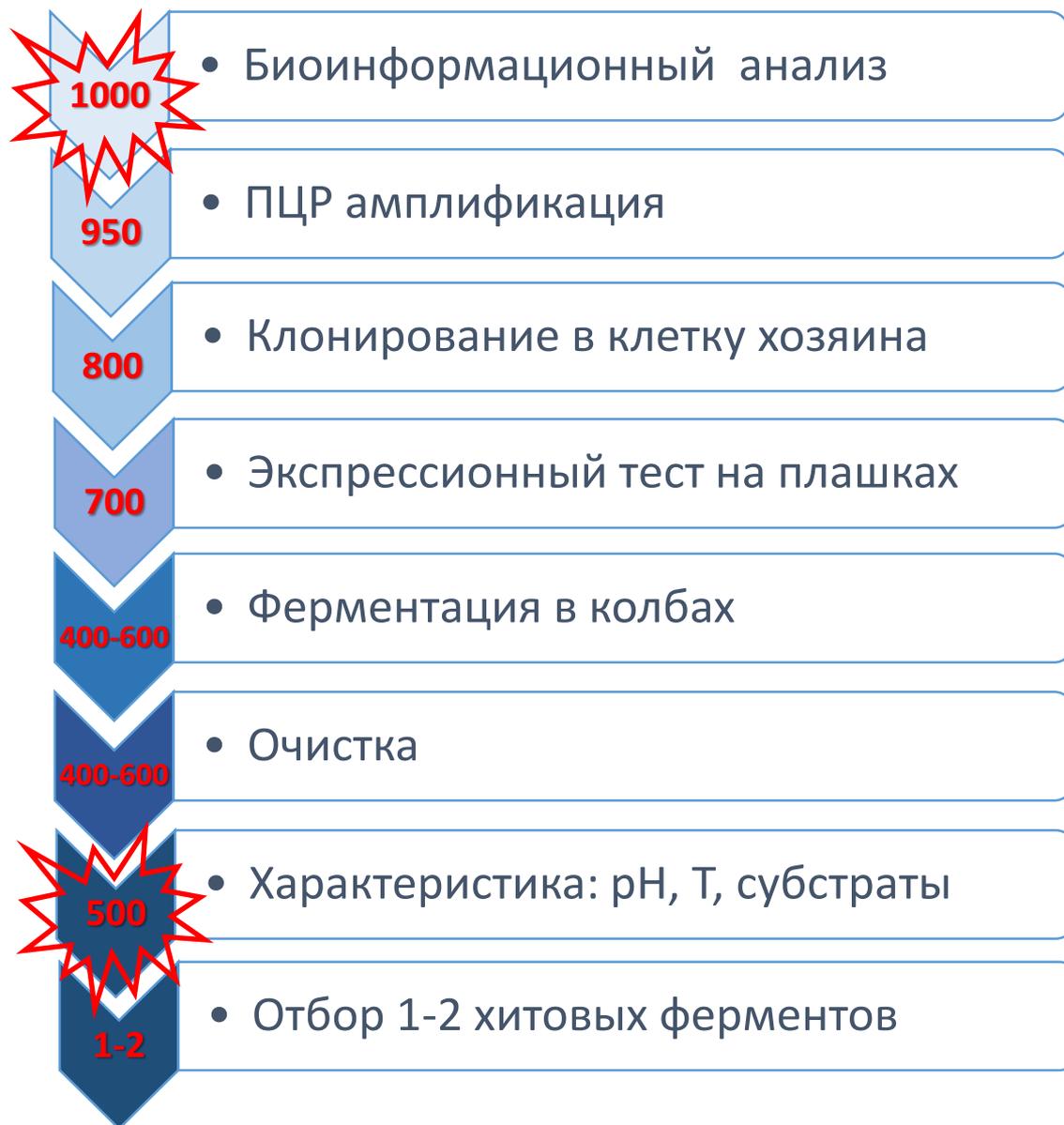


Поиск специфических доменов белков и предсказание вида активности

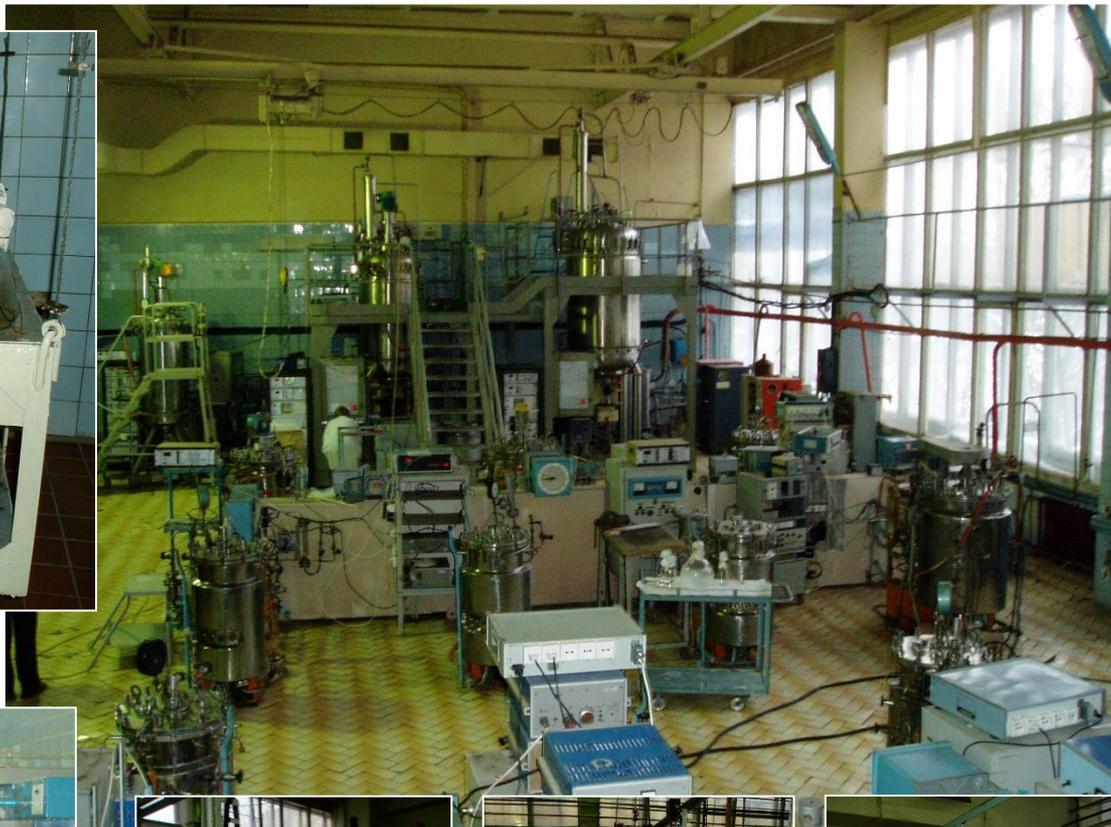
Отбор генов ферментов с потенциально интересной активностью



HTS-технология получения ферментных препаратов



Опытно-технологическая установка ИБФМ РАН



Пример разработки технологии получения ферментных препаратов для кормообработки



1. Отбор целевых генов в геномах микроорганизмов: 23 штамма ⇒ 377 генов

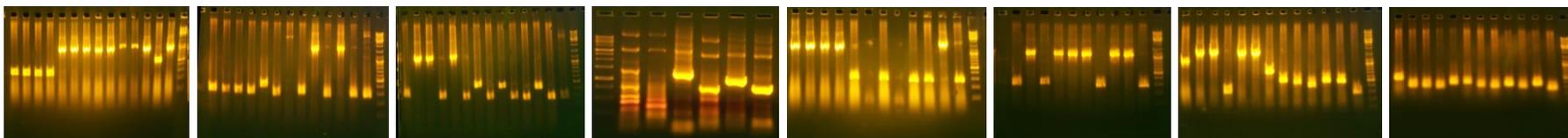
Lactobacillus brevis BKM B-572
Rhodococcus rhodnii BKM Ac-1187
Streptomyces sulphureus BKM Ac-1820
Streptomyces clavuligerus BKM Ac-602
Streptomyces fulvissimus BKM Ac-994
Streptomyces bottropensis BKM Ac-1755

Streptomyces venezuelae BKM Ac-589
Streptomyces mobaraensis BKM Ac-928
Streptomyces prunicolor BKM Ac-992
Streptomyces albus BKM Ac-35
Thermomonospora curvata BKM Ac-1241
Cellulophaga lytica BKM B-1433

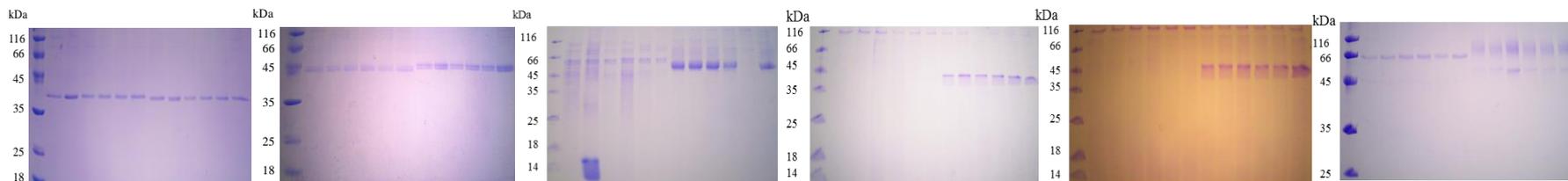
Cellulomonas flavigena BKM Ac-1137
Saccharomonospora viridis BKM Ac-681
Saccharopolyspora erythraea BKM Ac-1189
Saccharopolyspora rectivirgula BKM Ac-810
Saccharothrix espanaensis BKM Ac-1969
Nocardioopsis prasina BKM Ac-1880

Nocardioopsis halotolerans BKM Ac-2519
Nocardioopsis alba BKM Ac-1883
Meiothermus ruber BKM B-1258
Bacillus licheniformis BKM B-59
Bacillus pumilus BKM B-B-23

2. Нарботка генов с помощью ПЦР и клонирование генов: 377 генов ⇒ 153 клон



3. Экспрессия ферментов в *Pichia pastoris*: 153 клон ⇒ продукция 73 белков



4. Ферментация в колбах, очистка, характеристика: 73 белка ⇒ отобрано 3 лучших фермента

5. Отработка рентабельной технологии: выход целевых ферментов 20 г/л

6. Получение конечного препарата: сушка, иммобилизация ⇒ сохранение свойств при хранении

Пример разработки технологии получения ферментных препаратов для кормообработки

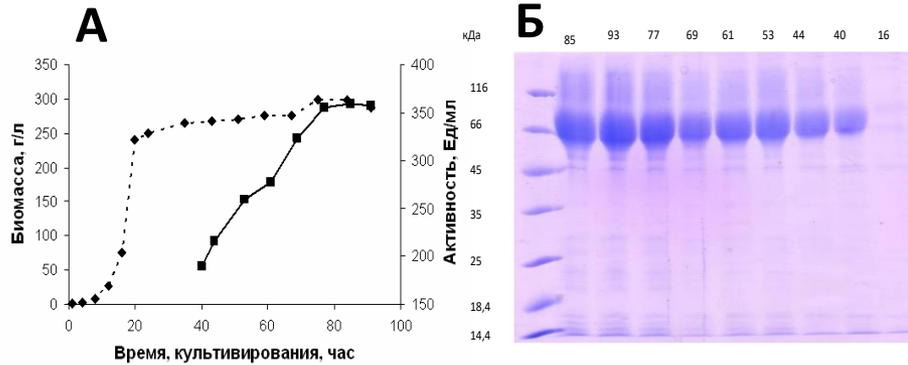


Рисунок 1. **А** – SDS-ПААГ электрофорез продукции бета-глюканазы. Цифры сверху - время культивирования в часах. **Б** – Продукция ксиланазы (сплошная линия) и накопление биомассы рекомбинантного продуцента (пунктир).

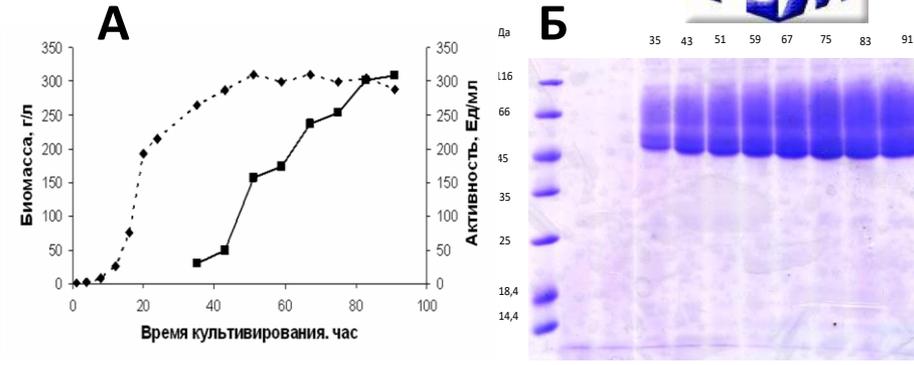


Рисунок 2. **А** – SDS-ПААГ электрофорез продукции целлюлазы. Цифры сверху - время культивирования в часах. **Б** – Продукция ксиланазы (сплошная линия) и накопление биомассы рекомбинантного продуцента (пунктир).

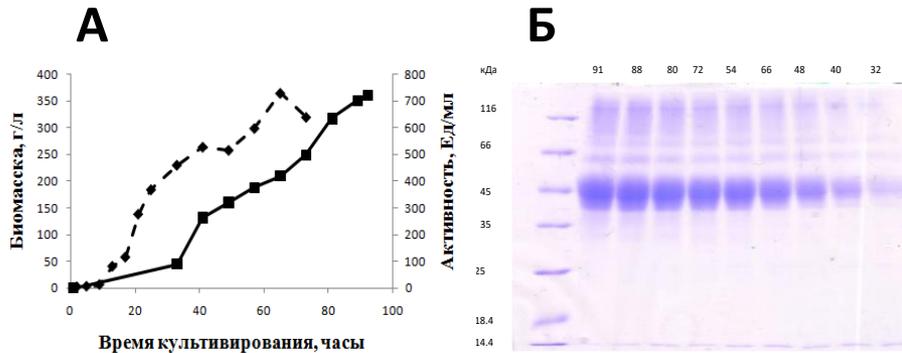


Рисунок 3. **А** – SDS-ПААГ электрофорез продукции ксиланазы рекомбинантным продуцентом. Цифры сверху указывают время культивирования в часах. **Б** – Продукция ксиланазы (сплошная линия) и накопление биомассы рекомбинантного продуцента (пунктир).

Разработана технология получения препарата для улучшения питательных свойств кормов

- Активность ферментов (Ед/г, не менее):
 - ксиланаза – 12 000;
 - бета-глюканаза – 8 000;
 - целлюлаза – 6 000.
- Более 50% активности сохраняется при нагревании до 3 ч при 80°C.
- Максимум активности при рН 5-7.
- Выход ферментов – 18-20 г/л.

Отходы производства?



❖ «Хинон-содержащая оксидоредуктаза»



- Секретируется во внеклеточное пространство
- Содержит кофактор пирролохинолинхинон
- Способен связываться с полисахаридами (целлюлоза, ксилан, бета-глюканы)

❖ «Бифункциональная целлюлаза/пектин-лиаза»

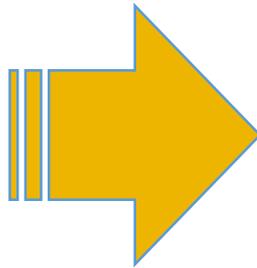


- Секретируется во внеклеточное пространство
- Относится к двум классам ферментов – гидролазам и лиазам
- Обладает целлюлазной/бета-глюканазной и пектин-лиазной активностью

❖ «Протеаза с полисахарид-связывающим доменом»



- Секретируется во внеклеточное пространство
- Синтезируется в виде неактивного предшественника
- Связывается с клеточными стенками, содержащими аминокислоты (хитин, пептидогликан)





Спасибо!