

УДК 577.113.083
© Коллектив авторов, 2017

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕНУКЛЕИНИЗИРОВАННОЙ БИОМАССЫ И ФРАГМЕНТОВ ДНК И РНК ПУТЕМ ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ БИОМАССЫ БАКТЕРИЙ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* ШТАММА ГБС 15

К.А. Тимошенко

к.т.н., зав. нанотехнологической лабораторией, ООО «МИП «Биотехнологический центр» (Москва)
E-mail: ch3cooch2ch3@yandex.ru

А.А. Красноштанова

д.х.н., профессор, кафедра биотехнологии, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)

В.А. Быков

д.т.н., профессор, академик РАН, эксперт-консультант, ООО «ГИПРОБИОСИНТЕЗ» (Москва)

Установлены условия наиболее полного выделения фрагментов ДНК и РНК из биомассы *Methylococcus capsulatus*. Изучен физико-химический состав денуклеинизированной биомассы *Methylococcus capsulatus*, полученной после процесса экстракции фрагментов нуклеиновых кислот из нативной биомассы.

Ключевые слова: *Methylococcus capsulatus*, экстракция, фрагменты ДНК, РНК, ультрафильтрация, лиофильная сушка, распылительная сушка.

В настоящее время достаточно остро стоит вопрос использования природного газа не только как источника энергии, но и как сырья для получения микробной биомассы *Methylococcus capsulatus*, которая может применяться в качестве кормового и пищевого белка [1–3], биологически активных метаболитов, а также фрагментов ДНК и РНК [4–6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовали параметры экстракции фрагментов нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и получения денуклеинизированной биомассы *Methylococcus capsulatus* штамма ГБС 15. Исследования проводились в ООО «МИП «Биотехнологический центр», учрежденном ФГБНУ ВИЛАР и ООО «ГИПРОБИОСИНТЕЗ». Полученная биомасса содержала 10–11 масс. % (здесь и далее массовых процентов) фрагментов ДНК и РНК, от общего количества в них сухих веществ $10 \pm 1\%$ (включая связанную воду).

Для определения концентрации фрагментов ДНК и РНК использовали методику Спирина с измерением оптической плотности при длинах волн 270 и 290 нм [7]. Концентрацию сахаров определяли фенол-серным методом. Вязкость получаемых экстрактов устанавливали стеклянными вискозиметрами ГОСТ 10028-81 [8].

Процесс экстракции исследовали и оптимизировали по температуре экстрагирующего раствора с определением выхода фрагментов ДНК и РНК (иными словами, нуклеиновых компонентов биомассы метанокисляющих бактерий).



Рис. 1. Экстракционная установка

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракцию нуклеиновых компонентов (рис. 1) проводили при температуре 80 °С и рН 9 в присутствии однозамещенного ортофосфата аммония (1 моль/л); содержание биомассы при этом составляло 10–11 масс. %. В результате наблюдалось увеличение вязкости суспензии, полученной в процессе экстракции (с 5–6 до 20–25 мм²/с), за счет присутствия полисахаридов, что значительно затрудняет дальнейшую ее переработку с получением дenuклеинизированной биомассы.

С целью предотвращения этого явления был использован кислотный гидролиз минеральными кислотами при рН 3–4, который проводился как перед экстракцией нуклеиновых компонентов (НК), так и после нее. В случае предобработки увеличился выход нуклеиновых компонентов (рис. 2,а) и значительно снизилась вязкость обработанного экстракта до 10–11 мм²/с. Эта закономерность сохранилась и для экстракции, проводимой при 70 °С (рис. 2,б). Разница состояла лишь в общем снижении выхода НК до 65%.

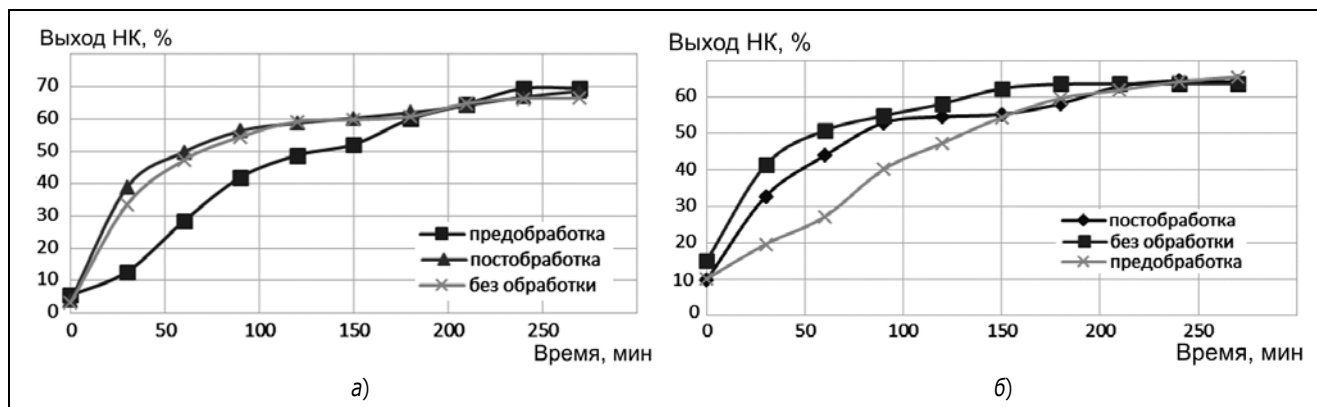


Рис. 2. Графики зависимости выхода НК от продолжительности процесса при содержании биомассы 10–11%: а – при 80°С; б – при 70 °С

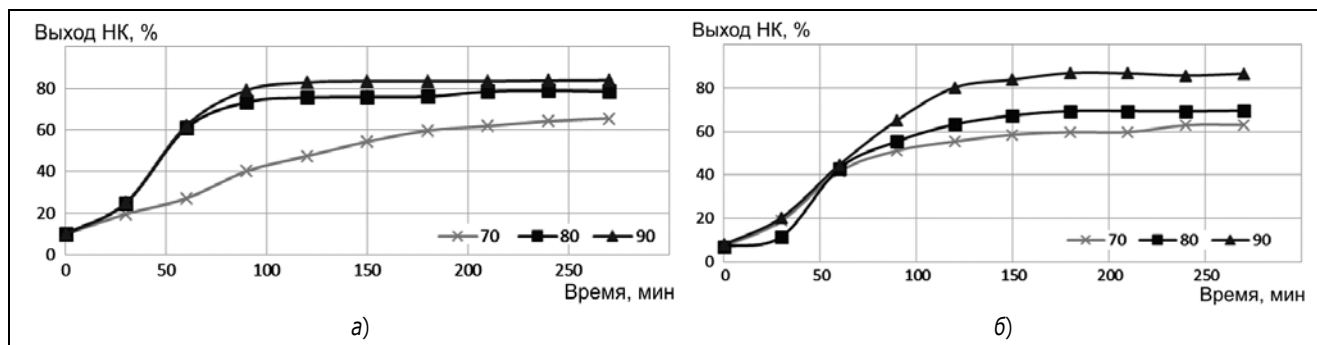


Рис. 3. Графики зависимости выхода НК от продолжительности процесса в среде однозамещенного (а) и двузамещенного (б) ортофосфата аммония

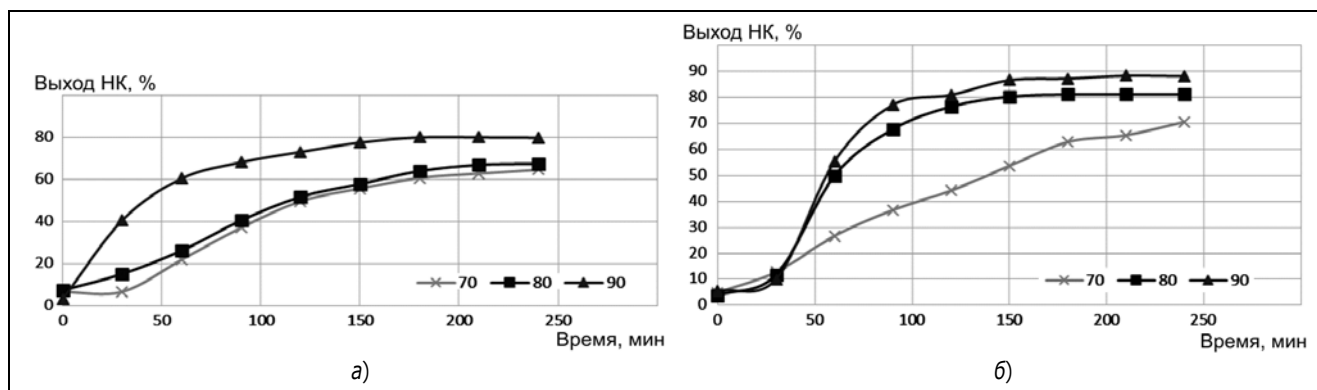


Рис. 4. Графики зависимости выхода НК от продолжительности процесса в среде однозамещенного (а) и двузамещенного (б) ортофосфата калия

В случае использования однозамещенного ортофосфата аммония (рис. 3,а) максимальный выход нуклеиновых компонентов достигается при обработке при 90 °С и составляет не менее 82%. Выход при экстрагировании при 80 °С чуть ниже – 75–78%, при этом экстракция при 70 °С позволяет выделить только 65% нуклеиновых компонентов. Из данных, приведенных на рис. 3,б (экстракция с использованием двузамещенного ортофосфата аммония), видно, что, как и в предыдущем случае, наиболее полное извлечение нуклеиновых компонентов достигается при 90 °С и составляет не менее 89%, а при 80 и 70 °С выход нуклеиновых компонентов снижается и составляет 70 и 60% соответственно.

Данные рис. 4,а, полученные при экстракции с использованием однозамещенного ортофосфата калия, также подтверждают, что наиболее эффективная экстракция нуклеиновых компонентов наблюдается при 90 °С и достигает 80%, а степень их извлечения – при 70 и 80 °С и составляет 63–66%. При использовании двузамещенного ортофосфата калия (см. рис. 4,б) эффективность экстракции при 80 °С выше, чем в предыдущем случае и составляет 80%, однако это на 10% ниже, чем в случае обработки при 90 °С.

Таким образом, наиболее эффективная денуклеинизация бактериальной биомассы наблюда-

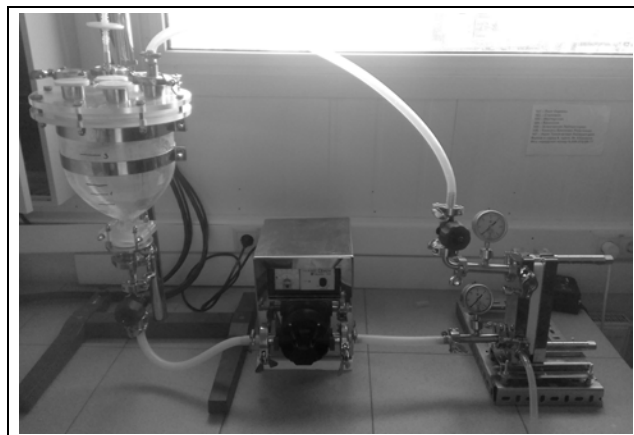


Рис. 5. Ультрафилтрационная установка

ется при 90 °С, и в зависимости от присутствующей соли извлечение нуклеиновых компонентов составляет от 80 до 90%. При этом двузамещенные соли ортофосфорной кислоты (соли аммония и калия) способствуют экстракции нуклеиновых компонентов эффективнее однозамещенных.

Денуклеинизированная биомасса была получена после процесса экстракции из нативной биомассы методом ультрафилтрации (рис. 5) и высушена на распылительной (образец № 1) и лиофильной (образец № 2) сушилках. Характеристика полученных образцов приведена в таблице.

Таблица. Физико-химический состав денуклеинизированной биомассы *Methylococcus capsulatus*, полученной после процесса экстракции из нативной биомассы при 90 °С в присутствии двузамещенного ортофосфата калия

| Исследуемый образец | Влажность, % | Зола, % | Общий белок, % | НК, % | Запах | Цвет |
|------------------------------------|--------------|---------|----------------|-------|----------------------|-----------------------------------|
| Образец № 1 (распылительная сушка) | 4–5 | 5–6 | 69–72 | 2–3 | Легкий копченый | От светло-серого до бежевого |
| Образец № 2 (лиофильная сушка) | 3–4 | 6–7 | 69–72 | 2–3 | Слабый специфический | От бежевого до светло-коричневого |

ВЫВОДЫ

Наиболее полное выделение фрагментов ДНК и РНК из биомассы *Methylococcus capsulatus* достигается при температуре 90 °С в присутствии двузамещенного ортофосфата калия. При этом в остающейся денуклеинизированной биомассе содержание белковых компонентов остается на исходном уровне при минимальном содержании нуклеиновых компонентов, а содержание золы снижается с 8–9 до 4–5%, что делает денуклеинизированную биомассу более ценным и безопасным источником пищевого белка в сравнении с нативной кормовой биомассой *Methylococcus capsulatus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Skrede A., Berge G.M, Storebakken T., Herstad O., Aarstad K.G., Sundstøl F. Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon // *Animal Feed Science and Technology*. 1998. P. 103–116
2. Matassa S., Boon N., Pikaar I., Verstraete W. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint // *Microbial Biotechnology*. 2016. V. 9. Is. 5. P. 568–575.
3. Romarheim Odd H., Landsverk Thor, Mydland Liv T., Skrede Anders, Overland Margareth. Cell wall fractions from *Methylococcus capsulatus* prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Aquaculture*. 2013. V. 402–403. P. 13–18.
4. Skrede A., Mydland L T., Overland M. Effects of growth substrate and partial removal of nucleic acids in the

- production of bacterial protein meal on amino acid profile and digestibility in mink // *Animal Feed Science and Technology*. 2009. V. 18. P. 689–698.
5. Федянина Л.Н., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М., Каленик Т.К., Блинов Ю.Г. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе нуклеиновых кислот различного // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2007. № 4. С. 9–12
 6. Тимошенко К.А. Выделение нуклеиновых компонентов из бактериальной биомассы в процессе ее комплексной переработки: Дисс. ... канд. техн. наук: 03.01.06. Щёлково: Научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. 2016. 168 с.
 7. Государственная фармакопея Российской Федерации Изд. XIII. ОФС.1.7.2.0018.15 Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах. 2015.
 8. ГОСТ 10028-81 Вискозиметры капиллярные стеклянные. Технические условия (с Изменениями № 1, 2). М.: Изд-во стандартов. 1983.

Поступила 22 июня 2017 г.

THE GETTING OF THE DENUCLEARIZING BIOMASS AND DNA AND RNA FRAGMENTS BY A DEEP PROCESSING OF A BIOMASS OF BACTERIA *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* STRAIN GBS 15

© Authors, 2017

K.A. Timoshenko

Ph.D. (Eng.), Head of Nanotechnology Laboratory, LLC MIP BIOTECHNOLOGICAL CENTER (Moscow)

E-mail: ch3cooch2ch3@yandex.ru

A.A. Krasnoshtanova

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Faculty of Biotechnology, Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)

V.A. Bykov

Dr.Sc. (Eng.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Expert Consultant, LLC GIPROBIOSINTEZ (Moscow)

Currently, there is the issue of the use of natural gas not only as energy source but also as raw materials for the production of the microbial biomass *Methylococcus capsulatus*, which can be used as feed and food protein, a biologically active metabolites, as well as DNA and RNA fragments. In this work, the parameters of the extraction of nucleic acid fragments (DNA, RNA) and receive denuclearizing biomass of *Methylococcus capsulatus* strain GBS 15 were studied. Also the physico-chemical composition of the denuclearizing biomass *Methylococcus capsulatus* obtained after the extraction of nucleic acid fragments from native biomass was investigated.

Key words: *Methylococcus capsulatus*, extraction, DNA fragments, RNA, ultrafiltration, freeze-drying, spray drying.

REFERENCES

1. Skrede, A., Berge, G. M., Storebakken, T., Herstad, O., Aarstad K. G., F. Sundstøl Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon // *Animal Feed Science and technology*. 1998. P. 103–116.
2. Matassa S, Boon N, Pikaar I, Technical W. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint // *Microbial Biotechnology*. 2016. V. 9. Is. 5. P. 568–575.
3. Odd H. Romarheim, Thor Landsverk, Liv T. Mydland, Anders Skrede, Overland Margareth. Cell wall fractions from *Methylococcus capsulatus* prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Aquaculture*. 2013. V. 402-403. P. 13–18.
4. Skrede A., L T. Mydland, Overland M. Effects of growth substrate and partial removal of nucleic acids in the production of bacterial protein meal on amino acid profile and digestibility in mink // *Animal Feed Science and Technology*. 2009. V. 18. P. 689–698.
5. Fedyanina, L. N., Besednova N. N., Epstein L. M., Kalenik T. K., Blinov Yu. G. drugs and biologically active food additives on the basis of nucleic acids of different // *Pacific medical journal*. 2007. No. 4. S. 9–12.
6. Timoshenko, K. A. Isolation of the nucleic components from the bacterial of biomass in the process of complex processing: dissertation of candidate of technical Sciences: 03.01.06 / All-Russian Research and Technological Institute of Biological Sciences Industry of RAAS. Shchelkovo. 2016. P.168.
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation Ed. XIII. FFS.1.7.2.0018.15 Determination of nucleic acids by the method of Spirina in immunobiological medicines. 2015.
8. GOST 10028-81 Viscometers glass capillary. Specifications (with Amendments No. 1, 2). М.: Publishing house of standards. 1983.