

# Estudio preliminar de producción de enzima dextranasacarasa recombinante Dsr-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD en cultivo discontinuo

Keyla Tortoló-Cabañas<sup>1</sup>, Catherine Sain-Hubert<sup>2-3</sup>, Elisabeth Bodo<sup>2-3</sup>, Ruben Werquin<sup>2-3</sup>, Benoit Moreau<sup>4</sup>, Amanda Montes-Álvarez<sup>1</sup> y Reinaldo Fraga-Vidal<sup>1\*</sup>

1. Departamento de Alcohol, Levadura y Alimento Animal, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

\*[reynaldo.fraga@icidca.azcuba.cu](mailto:reynaldo.fraga@icidca.azcuba.cu)

2. Biotechnology Unit (Meurice R & D), Brussels, Belgium.

3. Department of Bioprocess Development and Applied Microbiology (LABIRIS), Brussels, Belgium.

4. Department of Green Chemistry and Biobased Products (HEPH-Condorcet) Ath, Belgium.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la agitación a 300 y 500 rpm sobre el crecimiento de *Bacillus megaterium* MS941 (pRFBm1) y la producción de una variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD de 145 kDa, en fermentación discontinua, en un biorreactor con medio 2XYT, se mantuvo constante el suministro de oxígeno en 30 %. Al trabajar con una agitación de 300 rpm, el crecimiento microbiano fue dos veces mayor en comparación con la condición a 500 rpm. Igualmente, la producción de DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD se favoreció y se obtuvieron valores de 49,87 UI.L<sup>-1</sup> en la fracción celular y 124,6 UI.L<sup>-1</sup> en la fracción sobrenadante.

**Palabras clave:** dextranasacarasa, fermentación, velocidad de agitación, DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD.

## ABSTRACT

The effect of agitation at 300 and 500 rpm on the growth of *Bacillus megaterium* MS941 (pRFBm1) and the production of a dextransucrase truncated variant enzyme DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD of 145 kDa, in discontinuous fermentation in a bioreactor with 2XYT medium, keeping the oxygen supply constant at 30 %, was evaluated. When working with an agitation of 300 rpm the microbial growth was 2 fold higher compared to the condition at 500 rpm. Likewise, the production of DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD was favored, obtaining values of 49, 87 IU.L<sup>-1</sup> in the cellular fraction and 124,6 IU.L<sup>-1</sup> in the supernatant fraction.

**Key words:** dextransucrase, fermentation, stirring rate, DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD.

## INTRODUCCIÓN

*B. megaterium* ha adquirido un creciente interés para la producción de proteína extracelular (1,2). En comparación con otros hospederos más reconocidos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* exhibe muchas ventajas que lo posicionan a la vanguardia de nuevos proyectos investigativos. Tal es el caso de la producción de proteínas recombinantes, donde se han obtenido buenos rendimientos (3-6).

Las dextranasacarasas son enzimas extracelulares, que pueden encontrarse también asociadas a la célula (7), producidas por bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* y se emplean para

sintetizar varios tipos de glucanos con diferentes tamaños y estructuras (8); por ejemplo, la dextrana que es un polímero ampliamente usado en la industria farmacéutica y de los cosméticos (9,10).

Adicionalmente, cuando se trabajan procesos microbianos el mezclado del fluido afecta la fisiología celular y la producción de metabolitos (11), por ello es necesario evaluar las mejores condiciones que garanticen buenos resultados. De ahí que el objetivo de este trabajo sea la evaluación preliminar del crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1), que porta el gen que codifica para la variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, y su producción en fermentaciones discontinuas, a dos velocidades de agitación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo empleado

La cepa utilizada para todos los estudios es *Bacillus megaterium* MS941\_(pRFBm1), perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del ICIDCA, que está modificada genéticamente para la producción de una variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD de 145 kDa, inducida por la presencia de xilosa en el medio de cultivo. Es una cepa deficiente de la proteasa alcalina NprM (1), con resistencia a la tetraciclina portada por el plásmido pRFBm1.

La cepa es mantenida en glicerol al 15 % (v/v), a -80 °C. Generalmente, durante el desarrollo de los experimentos se mantiene mediante siembras periódicas en placas de LB agar, con tetraciclina cuya composición consiste en extracto de levadura (5 g.L<sup>-1</sup>), triptona (10 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (10 g.L<sup>-1</sup>) y tetraciclina (10 µg.mL<sup>-1</sup>); todos los componentes, a excepción del antibiótico, fueron esterilizados a 121 °C, durante 20 minutos. La tetraciclina fue añadida al medio estéril a partir de una solución a 10 000 µg.ml<sup>-1</sup> en alcohol absoluto. Posterior a una incubación a 37 °C, durante 24 horas, se conservaron los cultivos en refrigeración, a temperaturas entre 2 y 5 °C.

### Preparación de los inóculos

A partir de una placa con medio LB agar con tetraciclina se transfiere una colonia a un matraz de 500 mL de capacidad nominal, que contiene 50 mL de medio 2XYT (Extracto de levadura 10 g.L<sup>-1</sup>; Triptona 16 g.L<sup>-1</sup>; NaCl 5 g.L<sup>-1</sup> y tetraciclina de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, preparado en Tris-HCl 100 mM, pH 6.4) durante 16 h, a 37 °C y 175 rpm.

### Crecimiento de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) y producción de enzima dextranasacarasa (DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD)

Se evaluó el comportamiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1), en cuanto a crecimiento microbiano y producción de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, en modo de operación discontinuo. Se inocularon los fermentadores BIOSTAT C Plus de 10 L de capacidad nominal, con volumen efectivo de 5 L, con una relación de inoculación de 1 % (v/v).

La fermentación se llevó a cabo en medio 2XYT, durante 24 h, se mantuvo el pH a 6,5 y la temperatura en 37 °C, hasta el momento de realizar la inducción, que queda establecida cuando el cultivo alcanza valores de densidad óptica a 600nm (DO<sub>600nm</sub>), entre 0.3 y 0.4. La inducción consiste en la adición de xilosa, a una concentración de 0.5 % (v/v), a partir de este momento se disminuye la temperatura hasta 25 °C hasta la hora final del proceso. La saturación de oxígeno se mantuvo en 30 % y se evaluó el efecto de la agitación a 300 y 500 rpm en el crecimiento microbiano y la producción de la enzima dextranasacarasa

### **Determinación del crecimiento**

El crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm, en espectrofotómetro

### **Determinación de materia seca gravimétrica (MSG)**

Se tomó una muestra por triplicado del caldo fermentado y se centrifugó a 10 000 x g, durante 10 minutos, para separar la biomasa producida. Se lavó esta biomasa con agua destilada y se centrifugó nuevamente. La biomasa se colocó en la estufa a 105 °C por un tiempo de 24 h, para garantizar la sequedad total de la muestra.

Los resultados se expresaron como ganancia neta de biomasa, que se determina por la diferencia entre las horas finales e iniciales de la fermentación.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Para la detección cualitativa de la presencia de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD se empleó un sistema XCellSureLock™ Mini-Cell, con geles (3-8 % Bis Tris Gel). Utilizando antioxidante, tampón de corrida, agente reductor y tampón de carga NuPAGE (Invitrogen). El tampón de carga se preparó con el agente reductor y, posteriormente, se mezcló con la muestra en proporción 1:3, respectivamente. Se aplicaron en el gel 25  $\mu$ L de muestra y la electroforesis se llevó a cabo durante, aproximadamente, 1 h a 150 Volts. Al finalizar, para detectar formación de dextrana, el gel fue sometido a 3 lavados, durante 20 minutos en agitación orbital con una solución tampón de 50 mMNaAc (pH 5.4), Tritón X-100 0.1 % (v/v),  $\text{CaCl}_2$  0.05 g.L<sup>-1</sup>, posteriormente se sumergió en una solución de sacarosa al 10 % (p/v) en el mismo tampón y se incubó a 30 °C durante toda la noche; se visualizó, a simple vista, la aparición de bandas de dextrana de color blanco. Para colorearlas se empleó el reactivo de Schiff. En todas las corridas electroforéticas se incluyó el patrón de proteínas de alto peso molecular (PageRulerPrestainedProteinLadder, ThermoScientific).

### **Determinación de actividad enzimática dextranasacarasa**

Las fracciones celulares se suspendieron en una solución tampón acetato de sodio 50 mM (pH 5.4),  $\text{CaCl}_2$  0.05 g.L<sup>-1</sup>, Tritón X-100 0.1 % (v/v) y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de realizar el análisis.

Las reacciones enzimáticas se ensayaron a 40 °C, en tampón acetato de sodio 20 mM (pH 5.4),  $\text{CaCl}_2$  a 0.05 g.L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,1 % (v/v) y una solución de sacarosa a 100 g.L<sup>-1</sup>, en un volumen total de reacción de 5 mL. Se determinó la fructosa liberada, mediante Kit enzimático ENZYTEC (12).

Se define como 1 unidad internacional (UI) la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu$ mol de fructosa, en un minuto, bajo las condiciones ensayadas.

### **Procesamiento estadístico de los resultados**

Los resultados fueron procesados, primeramente, por el programa Microsoft Excel 2010. Los valores de ganancia neta de biomasa, adicionalmente fueron analizados mediante ANOVA Simple, con el empleo del programa Statgraphics Centurion versión XVI.II.

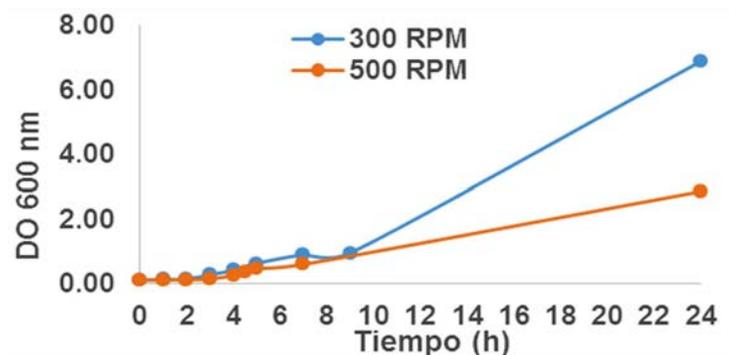
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En estudios anteriores se ha evaluado la temperatura del proceso y se ha establecido como la mejor condición la combinación entre 37 y 25 °C, empleada en este trabajo para la producción de

DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD recombinante, sin producir graves afectaciones en el crecimiento celular (datos no mostrados).

Se conoce que la agitación es un parámetro que garantiza la homogeneización en el biorreactor, tanto de nutrientes como de la temperatura y el pH fijado, durante el proceso. Pudiera pensarse que a mayor agitación se verán favorecidas las respuestas de interés, en este caso, crecimiento microbiano y producción de enzima. Sin embargo, una agitación excesiva puede resultar inconveniente para ambas. En este sentido, hay autores que refieren que la agitación puede crear fuerzas de corte que producen cambios morfológicos, así como variaciones en el crecimiento de algunos microorganismos (13). Por ello, es necesario estudiar las condiciones óptimas en cada caso.

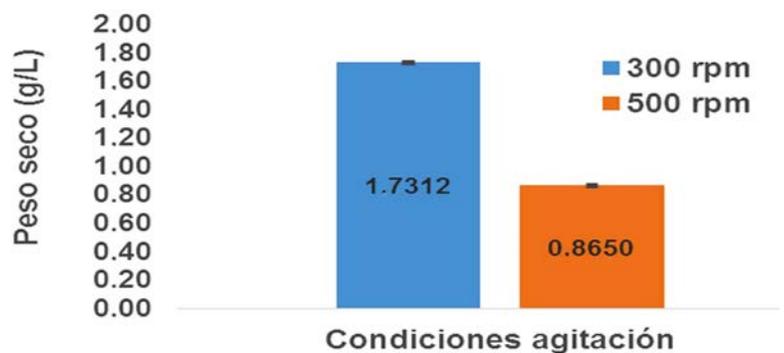
En la figura 1 se presentan las curvas de crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) ante las velocidades de agitación evaluadas (300 y 500 rpm), medidas como el incremento en la densidad óptica a 600 nm. Se observa que el microorganismo alcanza mayores valores de densidad óptica cuando la agitación en el fermentador se mantiene en 300 rpm. Para ambas condiciones de trabajo, durante las 3 primeras horas el cultivo se mantiene en fase de adaptación. Luego se comporta con un discreto incremento hasta la hora 8 o 10 y, a partir de entonces, se perfila la fase exponencial, la cual se hace más evidente para la condición de 300 rpm, sin haber concluido esta, al menos durante las 24 horas del estudio.



**Figura 1.** Crecimiento de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) en cultivo discontinuo, a 300 y 500 rpm, manteniendo la saturación de oxígeno en 30 %.

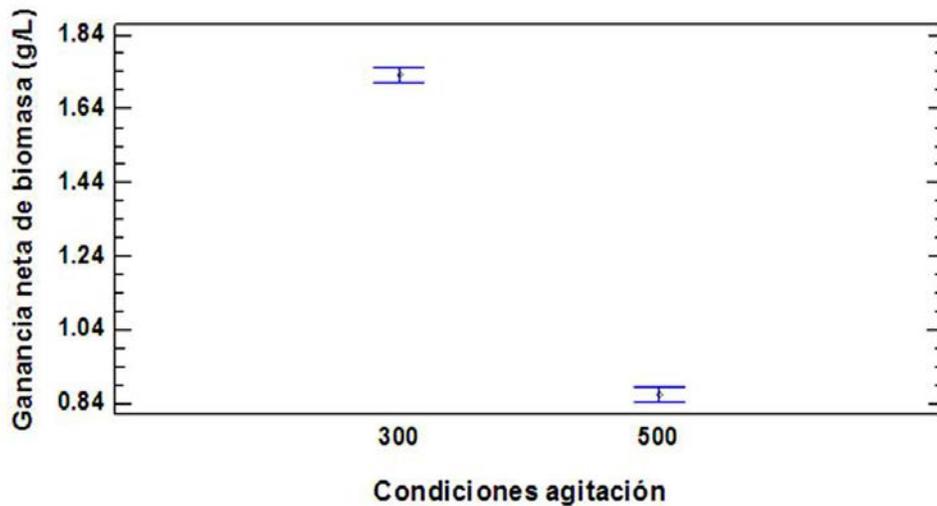
El resultado anterior es corroborado con la determinación de la materia seca gravimétrica, expresada en la figura 2 como la ganancia neta de biomasa, la cual contempla la diferencia entre la hora final e inicial del cultivo. En este caso la ganancia neta de biomasa, al trabajar en la condición de 300 rpm, duplica a la que se obtiene a 500 rpm, por lo que es favorable la disminución de la agitación en este proceso.

**Figura 2.** Representación de la ganancia neta de biomasa expresada sobre la base de la materia seca gravimétrica.



Adicionalmente, los valores medios de la ganancia neta de biomasa, expresados en base seca fueron analizados mediante un procedimiento de ANOVA Simple, para detectar o no la existencia de diferencias significativas entre ellos. En la figura 3, se presenta el gráfico de medias, correspondiente a dicho análisis. Según estos resultados se puede plantear que existen diferencias significativas

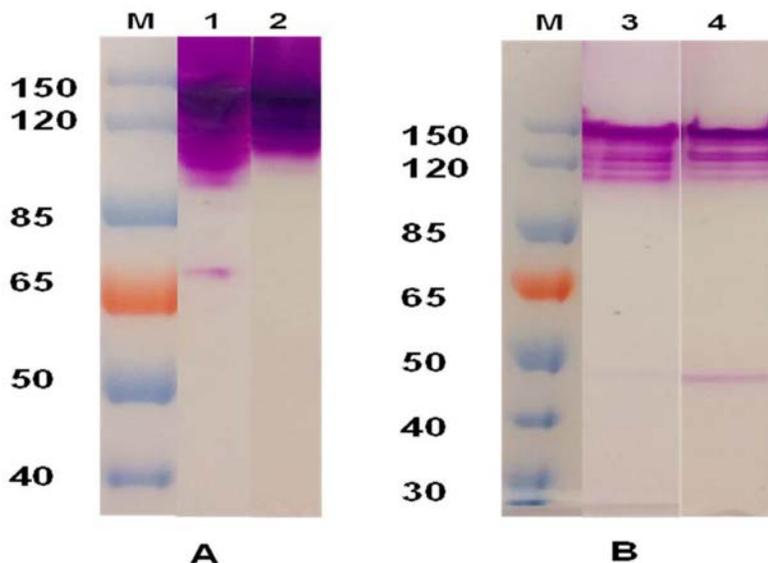
entre las condiciones de agitación evaluadas, con un valor-P menor que 0.05 (0.0001), con un nivel de confianza de 95 %, al aplicar la prueba de múltiples rangos, con el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.



**Figura 3.** Gráfico de medias, con empleo del método de LSD de Fisher.

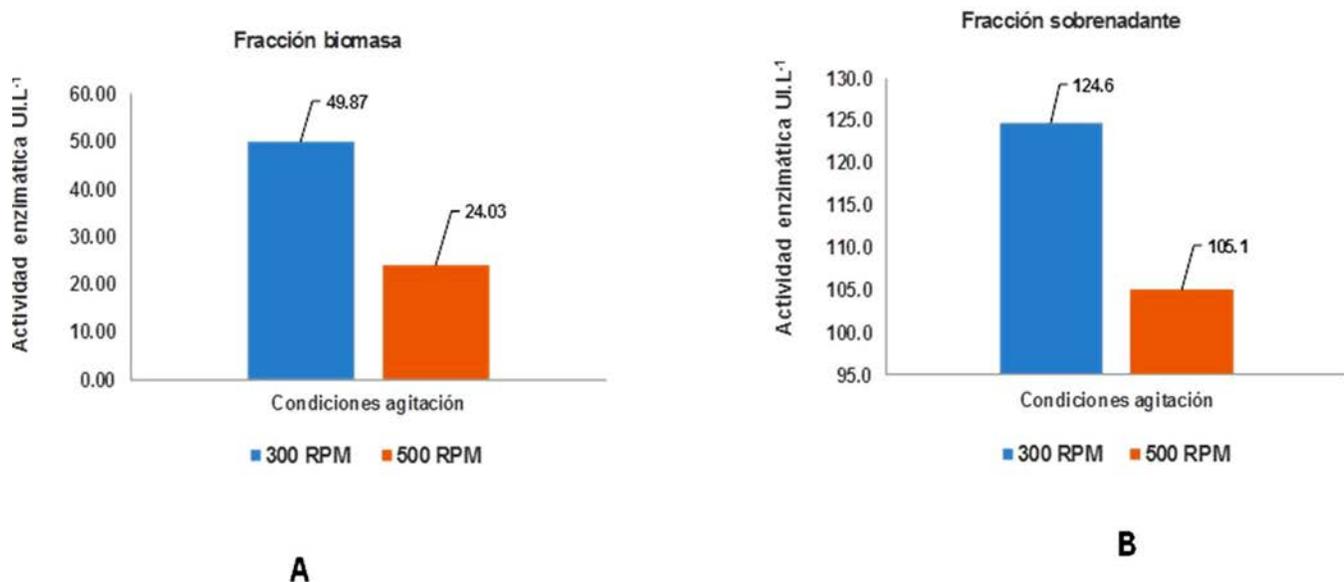
Según Potumarthi *et al.* (14), el crecimiento y la producción de proteasas alcalinas en *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, se afectaron al trabajar a velocidades de agitación por encima de 300 rpm, al cabo de 72 horas de cultivo, incluso cuando se evaluaron diferentes niveles de aireación en el mismo sistema (1, 2 y 3 vvm) (14).

En la figura 4 se muestra el zimograma para ambas fracciones celulares (biomasa y sobrenadante). La fracción biomasa (figura 5A) se empleó 10 veces concentrada, razón por la cual la banda correspondiente es más intensa que las que se obtienen para la fracción sobrenadante (figura 5B). Resulta evidente la degradación proteolítica sufrida por la DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, en la fracción sobrenadante (figura 5B), a pesar de que la cepa empleada carece de la proteasa extracelular NprM (1). Malten *et al.* (5) encontraron el mismo fenómeno al emplear este hospedero para producir la dextranasacarasa DSR-S. Es de destacar la detección de una banda a la altura de los 65 kDa, para la fracción biomasa, cuando se trabaja a 300 rpm y 30 % de  $pO_2$  (línea 1 figura 5A) y una banda a la altura de los 50 kDa en la fracción sobrenadante, al trabajar a 500 rpm y 30 % de  $pO_2$ ; para ambos casos, la aparición de dichas bandas demuestra la presencia activa de lo que pudiera ser una dextranasacarasa de menor peso molecular, aunque es necesario demostrar dicha teoría.



**Figura 4.** Zimograma para las fracciones biomasa (A), concentrada 10 veces y sobrenadante (B) con agitación a 300 y 500 rpm y el porcentaje de saturación de oxígeno ( $pO_2$ ) al 30 %. La línea M representa el patrón de peso molecular en ambos geles. Línea 1, biomasa de condición 300 rpm y 30 %  $pO_2$ . Línea 2, biomasa de condición 500 rpm y 30 %  $pO_2$ . Línea 3, sobrenadante de condición 300 rpm y 30 %  $pO_2$ , y, línea 4, sobrenadante de condición 500 rpm y 30 %  $pO_2$ .

La figura 5 muestra la cuantificación de la actividad enzimática en las fracciones biomasa y sobrenadante, para las condiciones de agitación evaluadas en este estudio. En el caso de la fracción biomasa, la actividad detectada se corresponde con la enzima asociada a la pared celular de la cepa de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1).



**Figura 5.** Actividad enzimática dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, expresada en UI.L<sup>-1</sup> para las fracciones biomasa y sobrenadante con agitación a 300 y 500 rpm y el porcentaje de saturación de oxígeno (pO<sub>2</sub>) al 30 %.

Tal y como se muestra en la figura, a la condición de agitación de 300 rpm, se consiguen mayores valores de actividad enzimática DSR-F - $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, tanto en la fracción asociada en la biomasa como en el sobrenadante. En el caso de la fracción biomasa los niveles de enzima expresados en UI.L<sup>-1</sup> son casi dos veces superiores a 300 rpm. Sin embargo, para la fracción sobrenadante, la superioridad de esta condición resulta más bien ligera.

Conviene destacar que el modo de fermentación por lotes no es el más comunicado en la literatura para la obtención de enzimas dextranasacarasas, sino que los mejores resultados son informados al emplear sistemas de fermentación incrementados. Tal hecho es demostrado por Malten *et al.* (5), que emplean un cultivo discontinuo incrementado para alcanzar elevadas densidades celulares (80 g.L<sup>-1</sup>) y, por consiguiente, detectan mayores actividades enzimáticas (28600 U.L<sup>-1</sup>) en un sistema, a partir de *B. megaterium* MS941, produciendo la dextranasacarasa DSR-S, a pesar de trabajar a 500 rpm y 37 °C, durante, 36 horas de cultivo.

A pesar de que los niveles de enzima obtenidos asociados a la biomasa son inferiores (2.5 veces) a los del sobrenadante, al trabajar a 300 rpm, estos últimos no se consideran del todo positivos, lo que coincide con informes de Hollman *et al.* (15), los cuales consideran que el tamaño de esta proteína (180 kDa) puede dificultar su secreción al medio de crecimiento, a pesar de que la variante truncada de DSR-F (DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD) es más pequeña (145 kDa), este mismo hecho pudiera también estar limitando la secreción al sobrenadante de la enzima.

## CONCLUSIONES

El aumento de la agitación en el proceso de fermentación discontinuo, bajo las condiciones de estudio, afecta el crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941, tanto como a la producción y secre-

ción de la enzima dextranasacarasa DSR-F- $\Delta$ SP- $\Delta$ GBD, por lo que se considera conveniente trabajar a velocidades de agitación de 300 rpm. Las mayores concentraciones de enzima se obtienen en la fracción sobrenadante, aunque se detecta la enzima asociada a la biomasa. Estos resultados sugieren emprender nuevos estudios para determinar la velocidad de agitación óptima para el crecimiento de la cepa y la producción de la enzima de interés; así como la relación de este parámetro con la aireación del sistema.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wittchen, K.D., Meinhardt, F. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: p. 871-877, 1995.
2. Schmidt, F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: p. 363-372, 2004.
3. Burger, S.; Tatge, H.; Hofmann, F.; Genth, H.; Just, I., Gerhard, R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem Biophys Res Commun* 307: p. 584-588, 2003.
4. Barg, H.; Malten, M.; Jahn, M.; Jahn, D. Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*. In: Barredo, J.L. (Ed.), *Microbial Processes and Products*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp: 165-184, 2005.
5. Malten, M.; Hollman, R.; Deckwer, W.; Jahn, D. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* 89: p. 206-218, 2005
6. Biedendieck, R.; Beine, R.; Gamer, M.; Jordan, E.; Buchholz, K.; Seibel, J. Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: p. 1062-1073, 2007.
7. Leemhuis, H.; Pijning, T.; Dobruchowska, J.M.; van Leeuwen, S.S.; Kralj, S.; Dijkstra, B.W.; Dijkhuizen, L. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology* 163: p. 250-272, 2013.
8. Seymour, F.R.; Knapp, R.D. Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera that contain 3-O- $\alpha$  glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points or in consecutive linear position. *Carbohydr Res* 81: p. 105-129, 1980.
9. Alsop, R.M. Industrial production of dextrans. In *Progress in industrial microbiology*. Pp. 1-44. Amsterdam, 1983.
10. Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.M.; Vignon, M.; Monsan, P. Characterization of the different glucosyltransferase activities excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl Environ Microbiol* 64: p1298-1302, 1998.
11. Enfors, S.O.; Jahic, M.; Rozkov, A.; Xu, B.; Hecker, M.; et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology* 85: p175-185, 2001.
12. Protocolo de actividad enzimática, Kit ENZYTEC.
13. Mittal, G.S. *Food Biotechnology: Techniques and Applications*. Lancaster: Technomic Publishing Co., New York, 1992.
14. Potumarthi, R.; Subhakar, CH., Jetty, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal* 34: p 185-192, 2007.
15. Hollman, R.; Malten, M.; Biedendieck, R.; Yang, Y.; Wang, W.; Jahn, D.; Deckwer, W.D. *Bacillus megaterium* as a Host for Recombinant Protein Production. *Eng. Life. Sci* 6: p 470-474, 2006.