

## PROCEDURE FOR THE HIGH LEVEL RECOMBINANT DEXTRANASE PRODUCTION

Efraín Rodríguez, Kosara Sánchez, Hernán Roca, Bianca García, José Cremata and Julio Delgado

Center of Genetic Engineering and Biotechnology, P.O. Box 6162, Havana, Cuba.

### Introduction

The production of industrial enzymes using gene technology and its correspondent new production technologies offers several benefits including the utilization of safe, well studied host micro-organism and very strong promoters in short scale and large capacity production plants at reduced costs (1). The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is able to produce large quantities of heterologous proteins under regulation of the alcohol oxidase promoter during growth on methanol (2, 3). We present here a procedure for recombinant dextranase production using the yeast *P. pastoris* which has integrated to its chromosome this gene under the alcohol oxidase promoter. The amount of secreted enzyme to the medium reaches 3.5 g/L.

### Materials and Methods

The powerful transformant of recombinant yeast *P. pastoris*, producer of fungal dextranase, was selected in shake flask culture and then it was studied in 5 L fermenter using a minimal salts medium and molasses as carbon source at initial growth phase. The scale up process was carried out in a 75 and 300 L fermenters. The stability of secreted to the supernatant enzyme was studied, and established its final formulation. The efficiency of the product was probed in a Cuban sugar factory. A cost estimate for a 250 tons production plant was done.

### Results and Discussion

On shake flask study 16 different clones were analyzed during 120 h in 1 % of methanol and the best producer reached 100 EUA/mL (approx. 0.1 g of enzyme/litre). The 5 L fermentation process was developed maintaining the oxygen dissolved tendency to decrease by the way of change of the methanol flow in the second production phase. The methanol flow was started at 2 g/Lh and once the tendency showed to increase then the flow was increased in 0.5 g/Lh up to 4 g/Lh. The amount of secreted dextranase to the culture broth reached 3 500 EUA/mL after 110 h (Figure 1). The level of purity of the enzyme in the supernatant is shown in Figure 2. The scale up process was carried out by the same strategy and showed a similar level of secreted enzyme at the same time in both 75 and 300 L fermenters (Figure 1). The stability of the enzyme in the supernatant was checked at 4 and 30 °C with the addition of 0.05 % sodium benzoate.

The enzyme proved to be stable in these conditions and the total activity still remained the same after one year. A rate of 0.029 L of enzyme solution per ton of cutting cane was determined as necessary to be used in a problematic Cuban sugar factory. The cost estimate of 1 L of enzymatic solution is USD \$6.52 in a new production plant with a capital investment of 7.7 millions and a recover time of invested capital is 1.7 years.

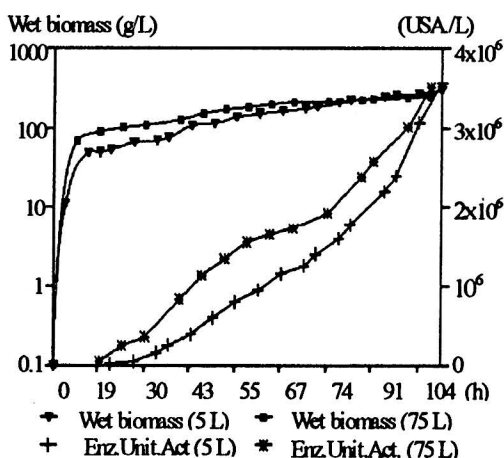


Figure 1. 5 and 75 L fermentations.

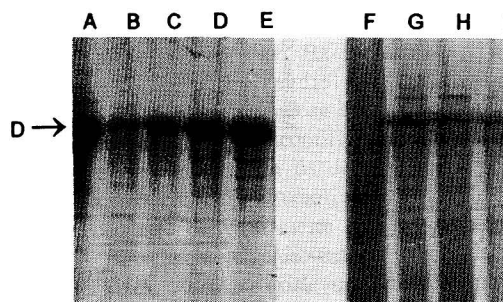


Figure 2. 75 L fermentation. (PAGE 10 %) (D-Dextranase). A) Dextranase from *P. minioluteum*. B, C, D, E) Culture supernatant of 26, 38, 62 and 110 h of fermentation. F, G, H, I) Biomass of 26, 38, 62 and 110 h of fermentation.

1. EA Falch. Industrial Enzymes-Development in Production and Application. *Biotechnology Advances* 1991; 9(4): 643-658.

2. RS Siegel, RA Brierley. Methylotrophic yeast *P. pastoris* Produced in High-Cell-Density Fermentations with High Cell Yields as Vehicle for Recombinant Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;34:403-404.

3. JM Cregg, TS Vedvick, WC Raschke. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *P. pastoris*. *Bio/Technology* 1993; 11:905-910.

## ESTRATEGIA DE ESCALADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE $\alpha$ -AMILASA

Mario Canales, Eduardo Ramos y Antonio Enríquez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado Postal 6162, C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

### Introducción

La enzima  $\alpha$  amilasa ha sido expresada eficientemente en la levadura *Pichia pastoris* (1, 2). En nuestro Centro se ha desarrollado una tecnología para su obtención (3). En este trabajo se expone la estrategia seguida en el escalado de la producción y la secuencia de procesos *scale up /scale down* realizada para llegar a un esquema productivo económicamente factible.

### Materiales y Métodos

#### Cepa

Se utilizó la cepa MPA 3625 en la cual fue clonado el gen que expresa la enzima  $\alpha$ -amilasa recombinante.

#### Medios de cultivo

Para la etapa de propagación se utilizó un medio salino suplementado, con glucosa como fuente de carbono. Durante la etapa de producción se utilizó un medio que contiene sales de amonio, urea y miel final de caña, hasta una concentración de azúcares reductores de 60 g/L como fuente de carbono. La expresión se indujo por adición de metanol.

#### Determinaciones de azúcares reductores

Fueron realizadas utilizando el método descrito por Miller (4).

#### Determinaciones de actividad enzimática

Se utilizó el mismo método empleado por Margolles, et al. (1).

#### Recobrado de la enzima

Los procesos de cosecha de biomasa se efectuaron en centrifugas de pomos a 10 300 xg a pequeña escala y en centrifugas de discos a 10 600 xg para la escala piloto. La filtración se realizó en un filtro prensa de 0,8 m<sup>2</sup> de superficie filtrante y la concentración en un rotoevaporador al vacío a 50 °C.

### Resultados y Discusión

Se optimizó un esquema de fermentación en 5 L de volumen efectivo, que fue escalado hasta 200 L, en el que se logró obtener 1 000 uAE/mL (2,1 g/L de enzima) en 80 h de fermentación, con una productividad de 12,5 uAE/L h y un consumo de metanol de 1,82 mL/L de cultivo. Se diseñó a partir de los resultados una secuencia de pasos de recobrado de

la enzima que incluyeron: la separación de la biomasa por centrifugación, la filtración del crudo enzimático y su concentración en un rotoevaporador al vacío. Se establecieron las operaciones en planta piloto y se obtuvieron los índices fundamentales de pérdidas de cada operación que permitieron diseñar y evaluar económicamente la tecnología propuesta a diferentes capacidades.

La Figura 1 muestra la influencia que sobre el costo de producción y el plazo de recuperación de la inversión tiene la capacidad de producción elegida. Para capacidades inferiores a 5 000 t/año, el costo de producción es mayor que la ganancia, para un precio estimado de la enzima de 3 000 \$/t. Como consecuencia los plazos de recuperación de la inversión son superiores a los 4 años, aumentando hasta 17 cuando la capacidad disminuye a 1 000 t anuales.

Del estudio de la demanda en nuestro país se estimó una capacidad necesaria para la planta entre 1 000 y 2 000 t anuales. Se analizó la tecnología propuesta y se concluyó que el proceso limitante era la fermentación, y que por ello el porcentaje de utilización del equipamiento de recobrado era bajo. Se

1. Margolles E, et al. *Biotecnología Aplicada* 1992;9:38-47.

2. Paifer E, et al. *Yeast* 1994;10:1415-1419.

3. Chico E. Trabajo de Diploma 1992.

4. Miller GL. Use of dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-428.

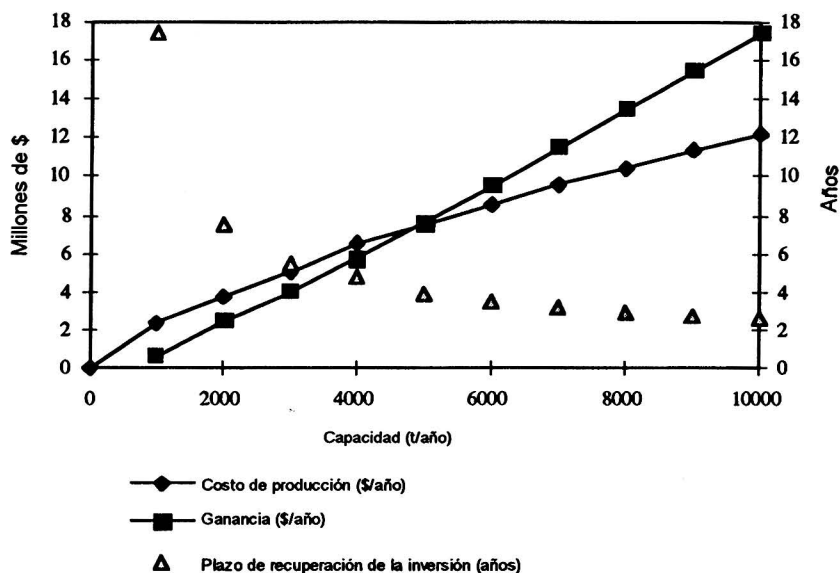


Figura 1. Costo de producción, ganancia económica y plazo de recuperación de la inversión contra capacidad de producción para la tecnología inicial.