

Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions

Producción de xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 en condiciones de fermentación sumergida

Madyu M. Matos¹, Aymara Valdivia¹, Zoraya Rodríguez², R. Boucourt², María A. Brizuela³,
Yadileiny Portilla⁴, Yasmery Rubio¹ and Hector L. Ramírez¹

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, km 3 ½, Matanzas, Cuba

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba

³Universidad Tecnológica de La Habana. José Antonio Echevarría CUJAE. Calle 114 #1901/ Ciclovía y Rotonda.

Marianao. La Habana. Cuba. Código Postal 19390

⁴Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, Madrid, España

Email: madyu.matos@umcc.cu

Production of xylanases from microorganisms is useful for animal feeding. The objective of this research was to evaluate the xylanase production ability of *Bacillus subtilis* E44 strain under submerged fermentation conditions. Bacteria were inoculated in Petri dishes with beech xylan (1 %), and the production of xylanases was determined at 24, 48, 72 and 96 h. The formation of clear zones around the colonies after the revelation with Congo red 0.5 %, confirmed the production of enzymes by the strain, and the highest hydrolysis halo (24.7 mm \pm 0.57) was obtained at 72 h. Power index showed significant differences for the evaluated times, the best was 4.59 at 72 h. Cellular growth and xylanase production by *B. subtilis* E44 under submerged fermentation was evaluated for 24 hours in a minimum medium with beech xylan salts and nutrient broth. The maximum activity of xylanases was 0.326 U/mL, at the end of the exponential phase of the culture in a minimum medium of salts plus xylan and 0.130 U/mL in a nutrient broth. Maximum production of xylanases was obtained at 12 h during the submerged fermentation and coincides with the decrease of proteolytic activity of *Bacillus subtilis* E44. The results show the ability of *Bacillus subtilis* E44 of expressing xylanase enzymes with the use of beech xylan as a carbon source under submerged culture conditions. These enzymes could improve quality of diets used for monogastric animals.

Keywords: *enzymes, hydrolysis halo, power index, enzyme activity*

Xylanases (β 1,4endo-xylanases; EC 3.2.1.8) are enzymes involved in xylan degradation. They hydrolyze internal links β (1 \rightarrow 4) among xylose molecules, producing a mixture of xylooligosaccharides with different sizes. The ability of degrading xylan is widely distributed among microorganisms, which have different enzymes with a specific action for the complete degradation of this substrate (Chakdar *et al.* 2016).

Among the microbial groups, bacteria and fungi are provided with powerful xylanolytic equipment (Chakdar *et al.* 2016). *Bacillus* genus species are the most used (Banka *et al.* 2014) because they represent high growth rates that allow shorter fermentation times, have great ability for extracellular secretion of heterologous proteins and are included within the microorganisms

La producción de xilanasas a partir de microorganismos es de gran utilidad para la alimentación animal. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de producción de xilanasas por la cepa *Bacillus subtilis* E44, en condiciones de fermentación sumergida. La bacteria se inoculó en placas Petri con xilano de haya (1 %). La producción de xilanasas se determinó durante 24, 48, 72 y 96 h. La formación de zonas claras alrededor de las colonias, después del revelado con rojo congo 0.5 %, confirmó la producción de la enzima por la cepa. El mayor halo de hidrólisis (24.7 mm \pm 0.57) se obtuvo a las 72h. El índice de potencia mostró diferencias significativas para los tiempos evaluados, el mayor fue de 4.59 a las 72 h. En el transcurso de la fermentación sumergida, el crecimiento celular y la producción de enzimas xilanasas por *B. subtilis* E44 se evaluó durante 24 h, en medio mínimo de sales con xilano de haya y en caldo nutriente. La máxima actividad xilanasa fue de 0.326 U/mL al final de la fase exponencial del cultivo en medio mínimo de sales más xilano y 0.130 U/mL en caldo nutriente. La máxima producción de xilanasas se obtuvo a las 12 h durante la fermentación sumergida, y coincide con la disminución de la actividad proteolítica por *Bacillus subtilis* E44. Los resultados muestran la capacidad de *Bacillus subtilis* E44 para expresar enzimas xilanasas con la utilización de haya como fuente de carbono, en condiciones de cultivo sumergido. Estas enzimas podrían mejorar la calidad de las dietas empleadas en la alimentación de animales monogástricos.

Palabras clave: *enzimas, halo de hidrólisis, índice de potencia, actividad enzimática.*

Las xilanasas (β 1,4endoxilanasas; EC 3.2.1.8) son enzimas implicadas en la degradación del xilano. Hidrolizan los enlaces internos β (1 \rightarrow 4) entre moléculas de xilosa y dan lugar a una mezcla de xilo oligosacáridos de diferente tamaño. La capacidad de degradar xilano está ampliamente distribuida entre los microorganismos que poseen diferentes enzimas con acción específica para la degradación completa de este sustrato (Chakdar *et al.* 2016).

Entre los grupos microbianos, las bacterias y hongos están dotados de poderosas maquinarias xilanolíticas (Chakdar *et al.* 2016). Las especies del género *Bacillus* son las más utilizadas para estos fines (Banka *et al.* 2014), ya que presentan altas tasas de crecimiento que permiten tiempos cortos de fermentación, poseen gran capacidad para la secreción extracelular de proteínas heterólogas y se incluyen entre los microorganismos

considered as GRAS (Generally Regarded as Safe) by ADF (Gupta *et al.* 2015).

Xylanases are very important at biotechnological level. For example, they have commercial use in paper and textile industry, in the production of detergents, for improving beer and wine fermentation (Chakdar *et al.* 2016) and, mainly, in food industry, with the bioconversion of cellulosic materials for poultry, with better digestion and nutrient absorption (Schoenlechner *et al.* 2013 and Hahn-didde and Purdum 2014).

The objective of this research was to evaluate the xylanase production ability of *Bacillus subtilis* E44 strain under submerged fermentation conditions.

Materials and Methods

Microbial culture. *Bacillus subtilis* E44 strain was used from the Laboratorio de Microbiología of the Facultad de Ciencias Agropecuarias of the Universidad de Matanzas, preserved at -30 °C in glycerol.

Culture media. A minimum medium of salts (MS) was used and the mineral solution was composed by (%): NaCl-0.1; KH₂PO₄-0.3; K₂HPO₄-0.6; MgSO₄-0.12; peptone-0.5 and yeast extract-0.3. The pH was fitted at 7.5 with KOH 1mol L⁻¹.

Broth and agar nutrients were prepared according to indications of the manufacturer (BioCen, Centro de Biopreparados).

Inoculum preparation. From the culture preserved in glycerol at -30 °C, bacteria were cultivated in a nutrient broth and incubated for 16h at 28 °C in a shaker at 110rpm. Cellular suspension was cultivated in nutrient agar and preserved at 4 °C. Using these cells, the pre-inoculum was prepared in 50mL of nutrient broth, incubated at 28 °C in a shaker at 110rpm for 16 h up to obtaining an optical density (OD 600nm = 0.8) equivalent to a concentration of 1x10⁸ cfu/mL.

Qualitative evaluation of xylanase production. Petri dishes were prepared with MS medium plus 1 % of beech xylan (Sigma-Aldrich). Dishes were inoculated by deep culture from the culture of *Bacillus subtilis* E44, and were incubated at 28 °C for 24, 48, 72 and 96 h. For revealing hydrolysis halo, dishes were cover by a solution of Congo red at 0.5 %, for 5 min, followed by three washes in a solution of NaCl 1molL⁻¹. Power index (PI) was calculated by the relation between the diameter of hydrolysis zone and the diameter of the colony. Diameters were measured with a vernier caliper (Suertek cap brand. Sensitivity of ± 0.02 mm). The experiment was performed by triplicate.

Submerged fermentation. The experiment was conducted in flasks of 250 mL containing 50 mL of culture media: 1) nutrient broth (NB) and 2) minimum medium of salts plus beech xylan at 0.5%, as carbon source (MS+X). The pH was fitted at 7.5 before sterilizing at 121°C for 15 min. Flasks were inoculated with a cellular suspension of 1x10⁸ cfu/mL

considerados GRAS (Generalmente Regardado Como Seguro) por la FAD (Gupta *et al.* 2015).

Las xilanasas son de gran interés desde la perspectiva biotecnológica. Se destaca su empleo comercial en la industria papelera, textil, en la producción de detergentes y en la mejora de la fermentación de cervezas y vinos (Chakdar *et al.* 2016) y, principalmente, en la industria alimentaria, en la bioconversión de materiales celulósicos en alimentos para aves de corral, con mejores tasas de digestión y absorción de nutrientes (Schoenlechner *et al.* 2013 y Hahn-didde y Purdum 2014).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de producción de xilanasas por la cepa *Bacillus subtilis* E44 en condiciones de fermentación sumergida.

Materiales y Métodos

Cultivo microbiano. Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* E44, conservada a -30 °C en glicerol, procedente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas.

Medio de cultivo mínimo de sales (MS). La solución mineral (%) estuvo compuesta por NaCl-0.1; KH₂PO₄-0.3; K₂HPO₄-0.6; MgSO₄-0.12; peptona-0.5 y extracto de levadura-0.3. Se ajustó el pH 7.5 con KOH 1mol L⁻¹.

El caldo y el agar nutriente se prepararon según indicaciones del fabricante (BioCen, Centro de Biopreparados).

Preparación del inóculo. A partir del cultivo, conservado en glicerol a -30°C, la bacteria se cultivó en caldo nutriente y se incubó durante 16 h a 28 °C en zaranda a 110 rpm. La suspensión celular se sembró en cuñas de agar nutriente y se conservó a 4 °C. A partir de estas células, se preparó el preinóculo en 50 mL de caldo nutriente. Se incubaron a 28 °C en zaranda, a 110 rpm, durante 16 h, hasta obtener densidad óptica (D.O 600nm = 0.8) equivalente a concentración de 1 x 10⁸ ufc/mL.

Evaluación cualitativa de la producción de xilanasas. Se prepararon placas Petri, con medio de MS más 1 % de xilano de haya (Sigma-Aldrich). Las placas se inocularon por siembra a profundidad, a partir del cultivo de *Bacillus subtilis* E44. Se incubaron a 28 °C durante 24, 48, 72 y 96 h. Para el revelado de los halos de hidrólisis, las placas se cubrieron con disolución de rojo congo a 0.5 %, durante 5 min. Posteriormente, se lavaron por tres veces con una disolución de NaCl 1molL⁻¹. El índice de potencia (IP) se calculó por la relación entre el diámetro de la zona de hidrólisis y el diámetro de la colonia. Los diámetros se midieron con pie de rey Vernier (marca Suertek cap. Sensibilidad de ± 0,02 mm). El experimento se realizó por triplicado.

Fermentación sumergida. El experimento se realizó en matraces de 250 mL, que contenían 50 mL de los medios de cultivo: 1) caldo nutriente (CN) y 2) medio mínimo de sales más xilano de haya a 0.5 % como fuente de carbono (MS+X). El pH se ajustó a 7.5, antes de esterilizar a 121 °C, durante 15 min. Los frascos se inocularon con suspensión celular de 1 x 10⁸ ufc/mL

(O.D 600nm= 0.8) of *Bacillus subtilis* E44, relation 1:10 (v/v) and were incubated in a shaker at 110 rpm for 24 h at 37 °C.

Determination of growth kinetics. An amount of 5 mL was taken in intervals of two hours for the first 12 hours in both cultures, absorbance (OD) at 600 nm was measured, and later centrifuged at 10 000 rpm for 15 min at 4 °C. Supernatant was used for evaluating the activity of xylanase and protease enzymes.

Values of growth specific speed (μ) were determined as the slope of polynomials belonging to the exponential phase of dispersion curves, obtained from the growth kinetics of *B. subtilis* E44 in the evaluated culture media, with the use of fit method of Microsoft Excel program. Using these values, duplication time was calculated (td).

$$td = \ln 2 / \mu$$

Determination of xylanase enzymes activity. The activity of xylanase enzymes was determined according to the method described by Bailey *et al.* (1992). A unit of enzymatic activity is defined as the amount of enzyme required to produce 1 μ mol of xylose per minute.

Determination of protease enzymes activity. The activity of protease enzymes was determined according to the method Anson (1938). A unit of enzymatic activity is defined as the amount of enzyme required to produce 1 μ mol of tyrosine per minute.

Statistical analysis. Statistical procedures were carried out with the use of InfoStat software (Di Rienzo *et al.* 2012). For the treatment of power indexes (PI), an analysis of variance was performed according to a completely randomized design and Duncan (1955) test was applied, for $P < 0.05$. Values of tables and graphs belong to the mean of three repetitions.

Results and Discussion

Production of xylanase enzymes by *Bacillus subtilis* E44 in the presence of beech xylan (1%) as the only carbon source was evident by the presence of clear zones around the colonies after Congo red revealing. This colorant shows strong interactions with polysaccharides joined by β 1,4 links. With the hydrolysis of these compounds, interactions between colorant and polysaccharides are lost and, at the same time, the coloration of the halo belonging to the area in which bacteria secreted xylanases.

Bacillus subtilis E44 showed a great xylanolytic activity at 24, 48, 72 and 96 h. Diameters of hydrolysis halos showed values between 10 and 25 mm for the evaluated times (table 1). The highest value was obtained at 72 h of incubation with 24.7 mm. these results coincide with those obtained by Akhavan *et al.* (2011), with the evaluation of 40 strains of *Bacillus mojavensis* that generated halos with diameters between 18 and 35 mm after coloration with Congo red. On the other hand, Tork (2013) selected 13 xylanases-producing strains, isolated

(D.O 600nm= 0.8) de *Bacillus subtilis* E44, relación 1:10 (v/v). Posteriormente, se incubaron en zaranda a 110 rpm durante 24 h a 37 °C.

Determinación de la cinética de crecimiento. Se tomaron 5 mL, a intervalos de dos horas, durante las primeras 12 h en ambos cultivos. Se midió la absorbancia (DO) a 600 nm y posteriormente, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para evaluar la actividad de las enzimas xilanasas y proteasas.

Los valores de velocidad específica de crecimiento (μ) se determinaron como la pendiente de los polinomios, que correspondió a la fase exponencial de las curvas de dispersión, obtenidas de la cinética de crecimiento de *B. subtilis* E44 en los medios de cultivo evaluados, con el uso del método de ajuste en el programa Microsoft Excel. A partir de estos valores, se calculó el tiempo de duplicación (td): $td = \ln 2 / \mu$

Determinación de la actividad de enzimas xilanasas. La actividad de las enzimas xilanasas se determinó según método descrito por Bailey *et al.* 1992. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de xilosa por minuto.

Determinación de la actividad de enzimas proteasas. La actividad de las enzimas proteasas se determinó mediante el método de Anson (1938). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de tirosina por minuto.

Análisis estadístico. Los procedimientos estadísticos se realizaron con el uso del software InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012). Para el tratamiento de los índices de potencia (IP) se realizó un análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado y se aplicó la dócima de Duncan (1955), para $P < 0.05$. Los valores que se muestran en las tablas y figuras corresponden a la media de tres repeticiones.

Resultados y Discusión

La producción de enzimas xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 en presencia de xilano de haya (1%), como única fuente de carbono, se evidenció por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias después del revelado con rojo congo. Este colorante muestra fuertes interacciones con polisacáridos unidos por enlaces β 1,4. Al producirse la hidrólisis de estos compuestos, las interacciones entre el colorante y los polisacáridos se pierden y a su vez, la coloración del halo correspondiente al área en la que la bacteria secretó las xilanasas.

Bacillus subtilis E44 mostró gran actividad xilanólítica a las 24, 48, 72 y 96 h. Los diámetros de los halos de hidrólisis mostraron valores entre 10 y 25 mm para los tiempos evaluados (tabla 1). El mayor valor se obtuvo a las 72 h de incubación con 24.7 mm. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Akhavan *et al.* (2011), al evaluar 40 cepas de *Bacillus mojavensis*, que generaron halos con diámetros comprendidos entre 18-35 mm después de la tinción con rojo congo. Tork (2013) seleccionó 13 cepas productoras de xilanasas, aisladas de diferentes muestras, que exhibieron halos

from different samples, which showed halos between 13 and 22 mm of diameter around the colonies.

entre 13-22 mm de diámetro alrededor de las colonias. Varios autores utilizan este método para evaluar,

Table 1. Qualitative evaluation of xylanase enzymes of *Bacillus subtilis* E44, in beech xylan as the only carbon source

Time (h)	Φ Hydrolysis halo (mm) ± SD	Φ Colony (mm) ± SD
24	11.1 ± 0.11	4.1 ± 0.58
48	19.8 ± 0.57	5.8 ± 1.15
72	24.3 ± 0.57	5.3 ± 0.01
96	22.6 ± 1.73	8.5 ± 0.58

Several authors use this method for a rapid evaluation of extracellular enzyme production by microorganisms (Braga *et al.* 2014 and Chafla *et al.* 2016). Even Cayetano-Cruz *et al.* (2016), evaluated the expression of recombinating genes of xylanase (xyn 11 A) in *Pichia pastoris* through the use of the technique in clones obtained with xylan agar as substratum.

Table 2 shows the analysis of variance of calculated power indexes (PI). The highest PI was obtained at 72 h and coincides with the time in which the highest halo of hydrolysis was obtained. At 96 h, there is a decrease of PI. However, diameter of the colony obtained in this time is superior regarding the value of hydrolysis halo (table 1). This decrease of PI could be associated to the increase of colony diameter due to sporulation of *B. subtilis* E44, period in which there are no increments of nutrient intake (Milian 2009).

de una manera rápida, la producción de enzimas extracelulares por los microorganismos (Braga *et al.* 2014 y Chafla *et al.* 2016). Incluso, Cayetano-Cruz *et al.* (2016) evaluaron la expresión de genes recombinantes de xilanasas (xyn 11 A) en *Pichia pastoris* mediante la aplicación de la técnica en los clones obtenidos con agar xilano como sustrato.

La tabla 2 muestra el análisis de varianza de los índices de potencia (IP) calculados. El mayor IP se obtuvo a las 72 h, y coincide con el tiempo en el que se obtuvo el mayor halo de hidrólisis. A las 96 h, hubo disminución del IP. Sin embargo, el diámetro de la colonia obtenido en este tiempo fue superior respecto al valor del halo de hidrólisis (tabla 1). Esta disminución del IP podría estar asociada al aumento del diámetro de la colonia, debido a la esporulación de *B. subtilis* E44, período en el que no se observa incremento en el consumo de nutrientes (Milian 2009).

Table 2. Power index obtained for *Bacillus subtilis* E44, in beech xylan as the only carbon source

Variable	Time (h)				SE and Sig.
	24	48	72	96	
Power index	2.69 ^a	3.41 ^b	4.59 ^c	2.68 ^a	±0.0944 P<0.0001

^{a, b, c} Different letters indicate significant differences for P < 0.05

Results indicate that xylanase enzyme production by *Bacillus subtilis* E44 depends on time, in the qualitative essay in dishes. This indicator has also been used by other authors in the selection of cellulases (Chafla *et al.* 2016) and feruloyl esterase (Braga *et al.* 2014) in fungi isolated from different sources. Values obtained in this study surpass those reported by the previously mentioned authors.

Kinetics of *Bacillus subtilis* E44 growth in the studied media cultures appears in figure 1. In the medium nutrient broth culture (NB), the exponential phase starts very early and it lasts up to 4 hours. From this moment, the phase of deaccelerating of growth begins. However, in the medium MS+X, the exponential phase started at 4 hours and lasted up to 12 h.

This performance may be related to differences in the composition of both media. NB contains glucose,

Los resultados indican que la producción de enzimas xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 depende del tiempo en el ensayo cualitativo en placas. Chafla *et al.* (2016) también utilizaron este indicador en la selección de celulasas. Asimismo, Braga *et al.* (2014) lo emplearon en la selección de feruloil esterasa en hongos aislados de diferentes fuentes. Los valores obtenidos en este estudio superan los informados por los autores antes mencionados.

La cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* E44 en los medios de cultivo evaluados se muestra en la figura 1. En el medio de cultivo caldo nutriente (CN), la fase exponencial comienza muy temprano y se extiende hasta las 4 h. A partir de este tiempo, se inicia la fase de desaceleración del crecimiento. Sin embargo, en el medio MS+X, la fase exponencial comenzó a las 4 h y se extendió hasta las 12 h.

Este comportamiento se podría asociar a las diferencias existentes en la composición de ambos medios. El CN

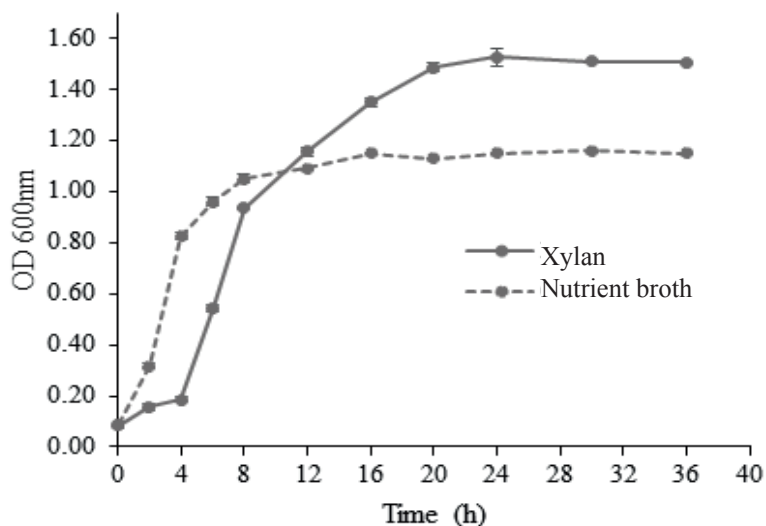


Figure 1. Growth kinetics of *Bacillus subtilis* E44 in nutrient broth and in a medium of salts plus beech xylan

which guarantees the availability of a simple carbon source in the medium and it is easy to use by bacteria. In the MS+X, which only carbon source is beech xylan, polysaccharides show complex structures that need, for their degradation, enzymes synthesized by bacteria and later use hydrolysis products as carbon source, which occurs during the logarithmic phase.

The graphic performance of growth is similar to the obtained values of specific growth speed (table 3). Once the exponential phase in the MS+X medium begins, time of duplication is superior to that obtained in the NB medium, which confirms the xylanolytic ability of the strain.

Milián (2009) compared two culture media for the production of *B. subtilis* E44 with values of specific growth speed of 0.66 h^{-1} in a traditional culture media and 1.00 h^{-1} in an optimized culture media with national components.

Similar results were reported by Ho (2015), with

contiene glucosa, que garantiza la disponibilidad de una fuente de carbono simple en el medio y de fácil utilización por la bacteria. En el medio MS+X, cuya única fuente de carbono es el xilano de haya, los polisacáridos presentan estructuras complejas, que precisan de enzimas sintetizadas por la bacteria para su degradación. Luego se emplean los productos de hidrólisis como fuente de carbono, lo que ocurre durante la fase logarítmica.

El comportamiento gráfico del crecimiento se corresponde con los valores de velocidad específica de crecimiento (tabla 3). Una vez que se inicia la fase exponencial en el medio MS+X, el tiempo de duplicación es superior al obtenido en el medio CN. Esto confirma la capacidad xilanólítica de la cepa.

Milián (2009) comparó dos medios de cultivo para la producción de *B. subtilis* E44, con valores de velocidad específica de crecimiento de 0.66 h^{-1} , en un medio de cultivo tradicional y 1.00 h^{-1} en el medio optimizado, a partir de componentes nacionales.

Table 3. Specific growth speed of *Bacillus subtilis* E44 strain in NB and MS+X culture media

Culture media	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	R^2	td
NB	0.56	0.99	1.24
MS+X	0.38	0.97	1.72

the evaluation of different agro-industrial residues as carbon source and beech xylan as control for xylanase production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 during submerged fermentation. Beech xylan was used as positive control and showed remarkable increases of xylanase activity, while barley peel was used for evaluating growth of the bacteria and activity of these enzymes.

When analyzing growth kinetics (figure 1) and xylanase activity detected during growth (figure 2), it is observed a correspondence between both profiles.

Resultados similares informó Ho (2015), al evaluar diferentes residuos agroindustriales como fuente de carbono y xilano de haya como control para la producción de xilanasas por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 durante la fermentación sumergida. El xilano de haya, que se utilizó como control positivo, mostró notable incremento en la actividad de las xilanasas, mientras que la cáscara de cebada se usó para evaluar el crecimiento de la bacteria y la actividad de dichas enzimas.

Al analizar la cinética de crecimiento (figura 1) y la actividad de las xilanasas durante el crecimiento (figura

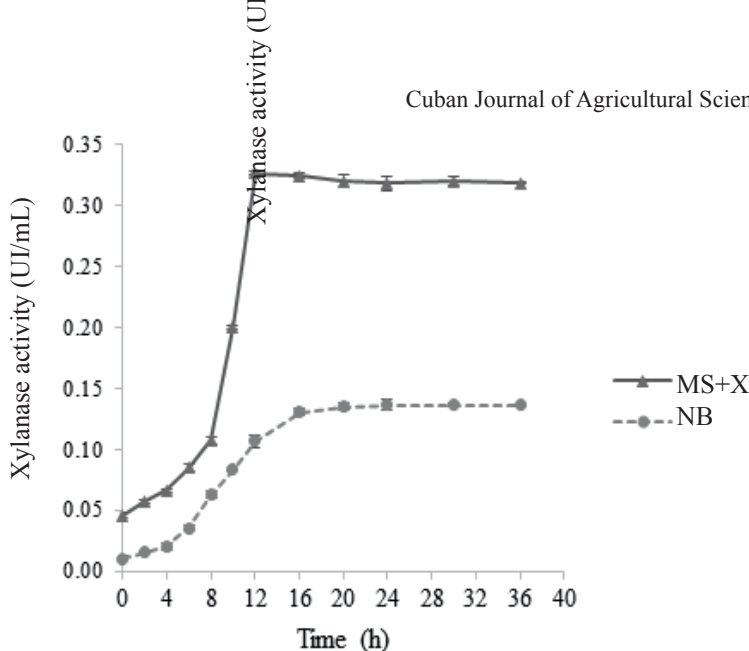


Figure 2. Xylanase activity of the enzymatic preparation in broth and medium of minimum salts plus beech xylan

Xylanase activity increases since the first hours, the maximum value was detected at the end of exponential phase and maintains high during the stationary phase. Abo-State *et al.* (2013) reported a direct correlation between microbial growth profile and production of xylanases and cellulases in *Bacillus* species. Likewise, Ho (2015) informed a correlation between microbial biomass and the expression of xylanases in *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

One of the major limitations in extracellular enzyme production from species of *Bacillus* genus is susceptibility of these proteins to degradation by proteolytic enzymes (Westers *et al.* 2006). The evaluation of proteolytic activity during growth of *B. subtilis* E44 and its relation with xylanases in the MS+X medium is shown in figure 3.

During the exponential phase of growth, there is an exponential increase of protease activity with a sudden increase at the end of the exponential phase and begins to decrease rapidly after 12 h. This decrease of proteases may be related to processes of

2), se observó correspondencia entre ambos perfiles. La actividad de las xilanasas se incrementa desde las primeras horas. El máximo valor se encontró al final de la fase exponencial y se mantiene elevada durante la fase estacionaria. Abo-State *et al.* (2013) informaron una correlación directa entre el perfil del crecimiento microbiano y la producción de xilanasas y celulosas en especies de *Bacillus*. De la misma manera, Ho (2015) refirió correlación entre la biomasa microbiana y la expresión de xilanasas en *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Una de las mayores limitaciones en la producción de enzimas extracelulares a partir de especies del género *Bacillus*, es la susceptibilidad de estas proteínas a la degradación por enzimas proteolíticas (Westers *et al.* 2006). La evaluación de la actividad proteolítica durante el crecimiento de *B. subtilis* E44 y su relación con las xilanasas en el medio MS+X se muestra en la figura 3.

Durante la fase exponencial del crecimiento hubo incremento exponencial de la actividad proteasa, con aumento brusco al final de la fase exponencial, que comienza a disminuir drásticamente después de las

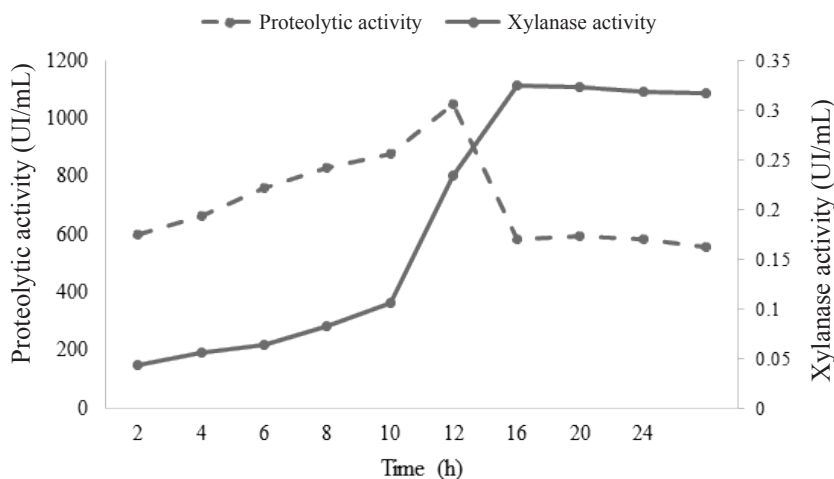


Figure 3. Relation between proteolytic activity (UI/mL) enzymes and xylanase activity of the enzymatic preparation in a MS+X medium

own deactivation.

These results agree with statements of Sevinc and Demirkan (2011), who reported a strain that produces proteases and the maximum activity occurs at the end of exponential growth phase.

Proteases have important functions in the quality control of denaturalized proteins or with conformational defects after post-translational events (Westers *et al.* 2008). Peptidases are constitutively expressed and temporarily have different affinities for pre-protein secreting systems (Ling *et al.* 2007), which constitutes one of the main problems in the production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*.

These results suggest that protease production is directly related to the exponential growth of culture, characterized by an increase of cellular metabolism and protein synthesis. Cristina *et al.* (2004) reported similar results in a culture of *Bacillus* sp. SMIA-2, where protease production reached the maximum value at 9 h and later started to decrease.

Out of the results obtained in the present research, *Bacillus subtilis* E44 produces xylanase enzymes able to degrade beech xylan and use simple sugar obtained during their growth and development. Difference between times of maximum expression of proteases and xylanases may be used to increase yields of xylanase enzymes during submerged fermentation of *Bacillus subtilis* E44 in a MS+X culture medium.

It is concluded that *Bacillus subtilis* E44 produces xylanase enzymes with the use of xylan as carbon source. These enzymes could be used in diets with high fiber content in monogastric animals.

Acknowledgements

Thanks to the cooperation of the Department of Biomathematics of the Institute of Animal Science with the statistical analysis.

12 h. Esta disminución de las proteasas podría estar relacionada con procesos de inactivación de las mismas.

Estos resultados concuerdan con lo referido por Sevinc y Demirkan (2011), quienes informaron una cepa productora de proteasas. Según informan estos autores, el máximo de actividad ocurre al final de la fase de crecimiento exponencial.

Las proteasas desempeñan importantes funciones en el control de la calidad de proteínas desnaturalizadas o con defectos conformacionales, después de eventos post-traduccionales (Westers *et al.* 2008). Las peptidasas se expresan de forma constitutiva y tienen, temporalmente, diferentes afinidades por los sistemas secretores de pre-proteínas (Ling *et al.* 2007), lo que constituye uno de los principales problemas en la producción de proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis*.

Estos resultados sugieren que la producción de proteasas está directamente relacionada con el crecimiento exponencial del cultivo, caracterizado por el incremento del metabolismo celular y la síntesis proteica. Cristina *et al.* (2004) informaron resultados similares en un cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2, en el que la producción de proteasas alcanzó el máximo a las 9 h y comenzó a disminuir posteriormente.

A partir de obtenido en este estudio, se puede afirmar que *Bacillus subtilis* E44 produce enzimas xilanasas, capaces de degradar el xilano de haya, y utilizar los azúcares simples obtenidos durante su crecimiento y desarrollo. La diferencia en los tiempos de máxima expresión entre proteasas y xilanasas se podría utilizar para incrementar los rendimientos de las enzimas xilanasas durante la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis* E44 en el medio MS+X.

Se concluye que *Bacillus subtilis* E44 produce enzimas xilanasas, al utilizar el xilano como fuente de carbono. Estas enzimas se podrían aplicar en dietas con elevado contenido de fibra en animales monogástricos.

Agradecimientos

El colectivo de autores agradece la colaboración del Departamento de Matemática del Instituto de Ciencia Animal por el análisis estadístico realizado.

References

- Abo-State, M., Ghaly, M. & Abdellah, E. 2013. Optimization of Cellulase(s) and Xylanase Production by Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* Isolates. *American-Eurasian J. Ari. & Environ. Sci.*, 13(4): 553-564.
- Akhavan Sepahy, A., Ghazi, S., & Akhavan Sepahy, M. 2011. Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Research*, Article ID 593624, ISSN: 2090-0414, DOI: 10.4061/2011/593624.
- Anson, ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin, *Journal of Genetics & Physiology*, 22: 79-89.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. 1992. Inter laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270, ISSN: 01681656.
- Banka, A.L., Guralp, S.A., & Gulari, E. 2014. Secretory expression and characterization of two hemicellulases, xylanase, and b-xylosidase, isolated from *Bacillus subtilis* M015. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174:2702-2710, ISSN: 08854513.
- Braga, C. M. P., Delabona, P. da S., Lima, D. J. da S., Paixão, D. A. A., Pradella, J. G. da C. & Farinas, C. S. 2014. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. *Bioresource Technology*, 170,

- 316–324, ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.115.
- Cayetano-Cruz, M., Itzel, A., Santos, P. D. L., García-huante, Y., Santiago-hernández, A., Pavón-orocho, P. & Hidalgo-lara, M. E. 2016. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source : Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 112: 161–169. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.014>
- Chafra, A. L., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Espín, J., & Silva, L. 2016. Isolation , selection and characterization of cellulolytic fungi from cocoa (*Theobroma cacao* L.) hull Aislamiento , selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.), *Cuban Journal of Agricultural Science*. 50(3): 411–420, ISSN: 2079-3480.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. 2016. Bacterial xylanases : biology to biotechnology. *Biotechnology*, 6(2): 1–15, ISSN: 2190-5738, DOI: 10.1007/s13205-016-0457-z.
- Cristina, W., Lelis, M., & Martins, L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 91–96, ISSN: 15178382.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. INFOSTAT. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>. [Consulted: 08/10/2015]
- Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*. 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Gupta, V., Garg, S., Capalash, N., Gupta, N. & Sharma, P. 2015. Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanases by co-culturing of *Bacillus sp.* and *B. halodurans* for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38:947–956, ISSN: 16157605, DOI: 10.1007/s00449-014-1340-0.
- Hahn-didde, D. & Purdum, S. E. 2014. The effects of an enzyme complex in moderate and low nutrient-dense diets with dried distillers grains with solubles in laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*. 23:23-33, <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00764>.
- Ho, H. L. 2015. Xylanase Production by *Bacillus subtilis* Using Carbon Source of Inexpensive Agricultural Wastes in Two Different Approaches of Submerged Fermentation (SmF) and Solid State Fermentation (SsF). *Journal of Food Processes & Technology*, 6(4), ISSN:21577110, DOI: 10.4172/2157-7110.1000437.
- Ling, L.F., Zi, R.X., Wei, F.L., Jiang, B.S., Ping, L. & Chun, X.H. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances*. 25:1-12, ISSN: 07349750.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Schoenlechner, R., Szatmari, M., Bagdi, A. & Tömösközi, S. 2013. Optimization of bread quality produced from wheat and proso millet (*Panicum miliaceum* L.) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. *Food Science and Technology* 51: 361–366, ISSN:12267708.
- Tork, S., Aly, M. M., Alakilli, S. Y., & Al-Seeni, M. N. 2013. Production and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus subtilis* XP10 isolated from marine water. *African Journal of Biotechnology*.12(8): 780–790, ISSN: 1684-5315, <http://doi.org/10.5897/AJB11.4144>.
- Westers, H., Westers, L., Darmon, E., van Dijl, J.M., Quax, W.J., Zanen, G. 2006. The CsxRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *FEBS J*, 273:3816-3827.
- Westers L, Westers H, Zanen G, Antelmann H, Hecker M, Noone D, Devine KM, Maarten JD and Quax WJ. 2008. Genetic or chemical protease inhibition causes significant changes in the *Bacillus subtilis* exoproteome. *Proteomics*. 8:2704-2713.

Received: May 3, 2018