



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS CELU-
LASAS PRODUCIDAS POR Cellulomonas flavigena**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIA ESTHER HERRERA AGUIRRE

Iztacala 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres Rocelío y Beatriz
con todo mi amor y respeto

A mis hermanos: Rocelío, Enrique
Beatriz, Alejandro y Angélica

A la memoria de mi abuela
Beatriz Silva de Aguirre

A mis tíos, primos, cuñados y sobrinos

A mis profesores, amigos y compañeros

A Juan Pedro

A todos ellos gracias por sus enseñanzas, amor y apoyo

A G R A D E C I M I E N T O S

El presente trabajo se realizó en el Depto. de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

A la M.C. Ma. Teresa Ponce Noyola, por haberme brin dado la oportunidad de realizar este trabajo.

A el M.C. Juan Pedro Luna Arias, por su compañerismo y colaboración en el desarrollo del trabajo.

A todos los compañeros del Departamento que colaboraron de una u otra forma en el proyecto.

A cada uno de los profesores que revisaron el trabajo, gracias por sus observaciones.

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Fibras de celulosa .	5
2. Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa.	9
3. Cinética de crecimiento y producción de celulasas de <u>Cellulomonas flavigena</u> crecida en bagazo de caña al 1% .	33
4. Perfil de elución de las proteínas y la actividad celulolítica de un cultivo de <u>C. flavigena</u> (filtrado por una columna de sephadex G-100, de 100 cm ³).	42
5. Diagrama de la electroforesis en gel de poliacrilamida con desnaturalizante.	43
6. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida con desnaturalizante.	44
7. Fotografías del patron de proteínas excretadas por <u>C. flavigena</u> , y de la actividad que presentan sobre CMC.	47
8. Diagrama de los halos de actividad en geles de agar al 1% y CMC al 0.1%.	48

INDICE DE CUADROS

	Página
I Organismos productores de celulasas	6
II Aplicación de las celulasas.	11
III Pesos moleculares de celulasas aisladas de diferentes microorganismos.	12
IV Técnicas empleadas en el aislamiento de celulasas del género <u>Cellulomonas</u> .	13
V Recuperación de proteínas a partir del cultivo de <u>Cellulomonas flavigena</u> .	37
VI Recuperación de proteínas a partir de un cultivo de <u>C. flavigena</u> , después de desalar en sephadex G-25.	38
VII Celulasas producidas por <u>Cellulomonas flavigena</u> registradas en geles de CMC.	49
VIII Celulasas producidas por <u>C. flavigena</u> separadas por cromatografía de filtración (sephadex G-100).	50

A B R E V I A T U R A S

CMC-asas	Carboximetil-celulasas
DNS	Acido dinitrosalicílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MT	Millones de toneladas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PUC	Proteína unicelular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
UE	Unidades enzimáticas = Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de celobiosa por minuto
vvm	volúmen de oxígeno por volúmen de medio

Sustratos empleados para determinar actividades celulolíticas:

Para endo-glucanasas:

CMC Carboximetil-celulosa

Para endo y exo-glucanasas:

Avicel, Twen 80 (celulosas microcristalinas)

PF Panel filtro

Para exo-glucanasas:

+MUC Metilumbelifenil-celobiosido

+pNPC p-Nitrofenil-b-D-celobiósido

+Estos sustratos no son específicos para exoglucanasas

INDICE GENERAL

	Página
Resumen	I
Introducción	1
Marco Teórico	
- Celulosa	3
- Microorganismos degradadores de celulosa.	4
- Celulasas: mecanismo de acción, aplicación y multiplicidad enzimática.	
- Separación de proteínas y condiciones de estabilidad enzimática.	14
Antecedentes sobre el aislamiento de celulasas del género <u>Cellulomonas</u> .	15
Objetivos	17
Metodología	
- Microorganismo	18
- Conservación del cultivo	18
- Sustrato	18
- Composición del medio de cultivo	19
- Preparación del inóculo	19
- Cinética de crecimiento	20
- Actividad enzimática sobre carboximetil--celulosa (CMC)	20
- Actividad enzimática sobre papel filtro (P.F.)	21
- Recuperación de las enzimas	23

- Precipitación de proteínas	24
- Eliminación de sales	25
- Cromatografía de filtración en gel	25
- Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	25
- Electroforesis bidimensional	26
- Tinción para proteínas con plata	26
- Tinción para proteínas con azul de comessie	27
- Determinación de peso molecular en PAGE	28
- Identificación de actividad sobre CMC - en los geles no desnaturizantes	28
- Identificación de actividad sobre celulosa en geles de poliacrilamida	29

Resultados y Discusión

- Cinética de crecimiento y producción de celulasas	31
- Recuperación de las proteínas del caldo de cultivo	34
- Separación por cromatografía (Sephadex - G-100)	39
- Electroforesis con SDS	40
- Electroforesis bidimensional	45
- Determinación de las actividades celulo-líticas en los geles de agarosa	45

- Análisis y discusión de las actividades_ celulolíticas registradas por cromatogra- fía de filtración y en los sales de aga- rosa.	46
Conclusiones	56
Sugerencias	57
Bibliografía	58

R E S U M E N

Para la producción de proteína unicelular a partir de un cultivo de Cellulomonas flavigena creciendo en bagozo de caña, las enzimas liberadas por este microorganismo son de gran importancia. Las celulasas son parte de un -- complejo enzimático que cataliza la hidrólisis de la celulosa a glucosa. Para que se lleve a cabo este proceso, se requiere al menos de la participación de tres tipos de enzimas: la β -(1,4)-glucan-celobiohidrolasa, la β -(1,4)-glucan glucanohidrolasa y la β -glucosidasa.

Estudios preliminares sugieren que la baja disponibilidad de enzimas celulolíticas, limitan la velocidad específica de crecimiento del cultivo; un aumento en ésta, repercutiría favorablemente en la productividad y los rendimientos de proteína unicelular.

Con la idea de conocer mejor el complejo celulolítico de C. flavigena se planteó estudiar la producción de celulasas y el aislamiento de las mismas. Para cubrir estos objetivos se realizaron cinéticas de producción de enzimas para determinar el tiempo adecuado para recuperarlas, encontrándose que la mayor actividad celulolítica se alcanzó alrededor de las 26 horas en un cultivo crecido en bagozo de caña al 1%.

Una vez establecido el tiempo de cosecha, se procedió a concentrar las proteínas liberadas al medio de -- cultivo, precipitando con solventes orgánicos y sulfato -- de amonio, obteniéndose con esta sal al 60% p/v la mayor -- recuperación de proteína (63%), y de actividad sobre carboximetil-celulosa (73%) a partir del sobrenadante del -- cultivo.

Posteriormente se llevó a cabo la separación de -- las proteínas por medio de cromatografía de filtración en sephadex G-100, y por electroforesis en geles de poliacri -- lamida al 7.5% . A las proteínas separadas se les deter -- minó su actividad celulolítica, y se lograron detectar -- 4 enzimas con capacidad de hidrolizar la carboximetil-ce -- lulosa y una enzima activa sobre papel filtro. Una de -- las enzimas con actividad sobre carboximetil-celulosa pre -- sentó un peso molecular aproximado de 70,000 D, y el peso -- estimado para la celulasa con actividad sobre papel fil -- tro fué de 41,591 D.

I N T R O D U C C I O N

En base a los problemas de alimentación que existen en el mundo, se han venido realizando investigaciones en -- torno a la producción de proteína de origen no convencional. Los microorganismos resultan ser fuentes de proteínas muy - valiosas debido a su composición de amino-ácidos, a su rápi do crecimiento y a la capacidad que tienen para degradar ma teriales orgánicos muy variados. (Molina, 1980; Da Silva y_ Doelle, 1980).

Entre los diferentes sustratos que pueden ser utili zados para producir proteína unicelular destacan por su ba jo costo y alta disponibilidad los residuos lignocelulósi-- cos (De la Torre, 1981). En 1986, México tuvo una produc-- ción nacional de 75.16 millones de toneladas (MT) de resi-- duos agrícolas, entre los que figuraron en mayor cantidad - el rastrojo de maíz, el bagazo de caña y la paja de sorgo, - con una producción de 48, 11 y 6 MT respectivamente. Del vo lúmen reportado para el bagazo de caña, 9 MT se utilizan co mo combustible en los ingenios azucareros y 2 MT tienen al guna aplicación en la industria (Hurtubia y Monroy, 1986).

En el Depto. de Biotecnología y Bioingeniería del - CINVESTAV del IPN, se llevan a cabo estudios sobre la pro-- ducción de proteína unicelular (PUC) a partir de bagazo de -

caña. De la Torre (1981) aisló y seleccionó un cultivo mixto integrado por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp., en base a su productividad en cuanto a biomasa sobre este bagazo, encontrando que sólo la primera bacteria presentaba actividad celulolítica. Trabajando con el mismo sistema bacteriano, Ponce N. (1982) observó que una de las limitantes para incrementar la velocidad específica de crecimiento, y por lo tanto la productividad del proceso, es la baja disponibilidad de celulasas en el medio de cultivo.

Actualmente se lleva a cabo un proyecto de mejoramiento genético de C. flavigena, buscando por un lado la obtención de mutantes con una velocidad específica de crecimiento mayor que la de la cepa nativa (Ponce N., comunicación personal); y por otro lado, se ha trabajado con técnicas de ingeniería genética para el aislamiento y clonación de los genes de este microorganismo relacionados con la degradación de celulosa (Silva S.J., 1988).

Dado lo anterior, es necesario estudiar el complejo celulolítico de Cellulomonas flavigena, con la idea de lograr un mejor aprovechamiento de este sistema.

M A R C O T E O R I C O

La celulosa es el principal componente estructural de las plantas superiores, y la única fuente natural renovable disponible en cantidad suficiente para soportar procesos a gran escala para la producción de alimentos, combustibles y sustancias químicas. Se encuentra en gran proporción en los desechos industriales y agrícolas, llegando a ser incluso una fuente de contaminación. (Coughlan, 1985; De la Torre, 1981; Mandels, 1985).

Los residuos lignocelulósicos contienen tres principales componentes: celulosa, Hemicelulosa y lignina. Las hemicelulosas son polímeros de pentosas, sobre todo de D-xilanos con enlaces $\beta(1-4)$ y poseen cadenas laterales de arabinosa y otros azúcares. La lignina es un polímero de alcoholes aromáticos, ésta limita la acción enzimática de las celulasas por impedimento estérico, por lo que en ocasiones el sustrato es sometido a un tratamiento alcalino para dejar a la celulosa accesible al ataque enzimático (De la Torre, 1981).

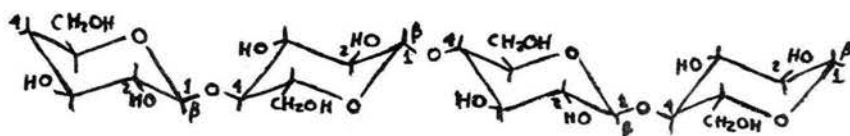
La estructura de la celulosa consiste de un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces --

β (1-4)-glucosídicos (Fig. 1). Cada residuo está girado 180° del eje principal, con respecto al residuo vecino debido a la configuración beta, pero las uniones glicosídicas están en el mismo plano, pudiendo formar estructuras ordenadas mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ellas, resultando así la celulosa cristalina, que es muy resistente al ataque enzimático y a agentes químicos. También existen regiones menos ordenadas o amorfas, siendo éstas más susceptibles a la actividad enzimática (Ryu y Mandels, 1980; Coughlan 1985).

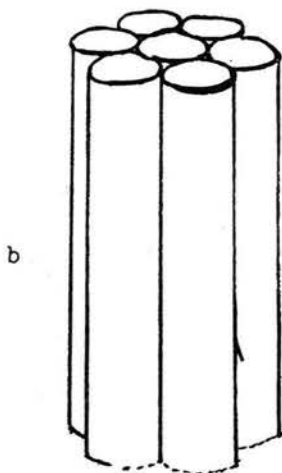
Entre los microorganismos que pueden degradar la celulosa, se encuentran los hongos y las bacterias (Cuadro I). En los primeros se encuentra muy difundida la habilidad para producir enzimas celulolíticas y son los que se han investigado más extensamente (Bisaria, 1984; Fergarty, 1983; Coughlan 1985); sin embargo, en los últimos años los estudios sobre celulasas bacterianas se han incrementado, ya que las bacterias son más prometedoras que los hongos para la producción de proteína microbiana debido a su alta tasa de crecimiento, bajo contenido de pared celular y mayor contenido de proteína total (Hazzett, 1981).

En las bacterias con capacidad celulolítica, se incluyen especies aeróbicas como las mixobacterias, acti-

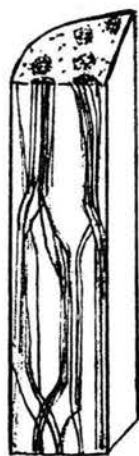
FIGURA 1. FIBRAS DE CELULOSA (Tomado de Sihtola en Bailey)



a



b



c

- a) Estructura de la celulosa
- b) Fibras unidas paralelamente por puentes de hidrógeno
- c) Sección lateral de una fibra

CUADRO I. ORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS.

BACTERIAS

Acetivibrio cellulolyticus
Bacillus
Bacteroides succinogenes
Cellulomonas
Cellulomonas flavigena
Cellvibrio vulgaris
Clostridium thermocellum
Cytophaga
Pseudomonas fluorescens
Ruminococcus albus
Sporocytophaga

Streptomyces griseus
Thermoactinomyce
Thermomonospora curvata
Thermomonospora fusca
Micromonospora
Thermomopolyspora

HONGOS

Agaricus bisporus
Aspergillus fumigatus
Aspergillus niger
Aspergillus terreus
Botryodiplodia theobromae
Chaetomium thermophilum
Eupenicillium avenicum
Fusarium solani
Humicola isolens
Macrophomina phaseolina
Pellicularia filamentosa
Penicillium funiculosum
Penicillium irensis
Polyporus adustus
Poria
Sporotrichum pulverulentum
Sporotrichum thermophile
Thermoascus aurantiacus
Trichoderma lignorum
Trichoderma koningii
Trichoderma reesei
Trichosporon cutaneum
Trichosporon pullulans

nomocetos y Pseudomonas; anaeróbios facultativos como -- Bacillus y Cellulomonas; y anaerobios estrictos como --- Clostridium y Bacterioides (Hagget, 1981; Forgarty, 1983).

Cellulomonas flavigena es un bacilo corto, Gram positivo, no presenta flagelos y es anaerobio facultativo. Las colonias que forma en medio sólido, son circulares, ligeramente elevadas, con bordes lisos, cremosas y de color amarillo claro (Ponce N. 1982).

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que forman parte de un sistema complejo que requiere de la participación sinérgica de sus componentes para que se lleve a cabo la degradación de la celulosa a glucosa; siendo necesarias para este proceso la presencia de al menos tres tipos de actividades:

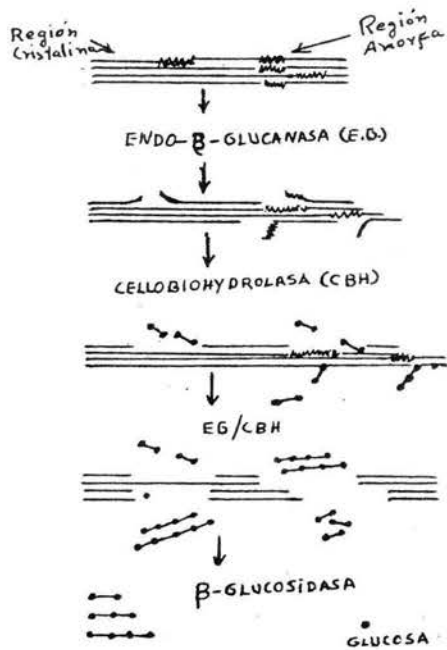
- (1) Endo- β -1,4-glucanasa o β -1,4-glucano-glucanohidrolasa (EC. 3.2.1.4.). Esta enzima hidroliza al azar a la celulosa con alto grado de polimerización y amorfa, para producir celodextrinas solubles en agua, resultando una rápida reducción de la longitud de la cadena junto con un lento incremento de los grupos reductores.

- (2) Exo- β -1,4-glucanasa o β -1,4-glucan-celobiohidrolasa (EC. 3.2.1.91). Estas celulasas remueven - las unidades de celobiosa de el extremo no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un rápido incremento en los grupos reductores con un cambio muy pequeño en la fluidez del medio.
- (3) β -1,4-glucosidasa o celobiasa (EC. 3.2.1.21). Esta enzima no es realmente una celulasas, no obstante tiene un papel muy importante en la regulación de las celulasas. Al transformar a la celobiosa en glucosa, lleva a una variación en los niveles intracelulares de estos azúcares, lo que a su vez influye en la biosíntesis de las celulasas por mecanismos de inducción, represión e inhibición.

(Gong, C. y G.T. Tsao, 1979; Ryu y Mandels, 1980).

El modelo que ha sido propuesto para la degradación de la celulosa está basado en estudios con hongos, y señala que esta actividad se lleva a cabo inicialmente por la endoglucanasa, la cual rompe al azar las microfibrillas de celulosa, promoviendo el paso de la celulosa cristalina a celulosa amorfa, además, ---

FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA CELULOSA (Cuskey, 1983)



esta enzima hidroliza azarosamente a la celulosa produciendo celodextrinas o celooligosacáridos, y sobre estos fragmentos es que actúa la exoglucanasa, rindiendo unidades de celobiosa, la cual a su vez es llevada a glucosa por la acción de la β -glucosidasa (Cuskey y col. 1983) (Fig. 2)

Las celulasas pueden ser utilizadas en general - para la producción de glucosa; en la remoción de paredes celulares; en la hidrólisis y fermentación de restos urbanos y agrícolas para rendir productos finales deseables etc. (Coughlan, 1985; Mandels, 1985). Además del importante campo de aplicación de estas enzimas (Cuadro II), se han realizado una gran cantidad de trabajos sobre las mismas con la idea de lograr una producción más eficiente y económica de PUC y combustibles (Robson, 1989).

Existe una gran multiplicidad de celulasas, aunque son funcionalmente idénticas, a menudo aparecen en diferentes formas moleculares, difiriendo en movilidad electroforética, punto isoeléctrico, contenido de azúcares y/o peso molecular (Gong y Tsao, 1979) (Cuadros III y IV). Esta variabilidad depende de la fuente de la enzima, de las condiciones del cultivo, de la edad del mismo, de la actividad proteolítica, del sustrato empleado como inductor, etc. (Gong y Tsao, 1979).

CUADRO II. APLICACION DE LAS CELULASAS (Mendels, 1985)

- Remoción de paredes celulares (protoplastos)
 - a. Liberación de contenidos celulares
 - Enzimas
 - Polisacáridos (Amar)
 - Proteínas (semillas y hojas)
 - b. Mejoramiento de vegetales secos.
(Rehidratabilidad)

- Producción de glucosa o azúcares solubles
 - a. Alimentación animal
 - Enriquecimiento del valor nutritivo de fibras alimenticias por la adición de azúcares.
 - b. Industria química
 - Producción de etanol, butanol, etc.

- Descomposición de deshechos y residuos
 - a. Composteo

CUADRO III. PESOS MOLECULARES DE CELULASAS AISLADAS DE
DIFERENTES MICROORGANISMOS

ORGANISMO	ENZIMA	PESO MOLECULAR	REF.
<u>Alternaria alternata</u>	B-glucosidasa	45,000	20
	CMC-asa	13,000	
<u>Aspergillus japonicus</u>	Endo-glucanasas		20
	CMC-asa I	12,700	
	CMC-asa II	54,000-57,000	
	CMC-asa III	76,000	
<u>Fusarium lini</u>	Endo-glucanasa	28,000	30
<u>Robillarda sp. Y-20</u>	Endo-glucanasa	59,000	38
	B-glucosidasas		
	I	76,000	
	II	54,000	
<u>Trichoderma reesei</u>	Endo-glucanasa		26
	I	20,000	
	II	40,000	
	Exo-glucanasas		
	CBH I	60,000	
	CBH II	60,000	

CUADRO IV. TECNICAS EMPLEADAS EN EL AISLAMIENTO DE CELULASAS DEL GENERO *Cellulomonas*

ORGANISMO	CELULASAS	PESO MOLECULAR	TECNICAS	REFERENCIA
<i>Cellulomonas fermentans</i>	Endoglucanasas CFA CFB	40,000 57,000	Cromatografía de Intercambio iónico. Cromatografía líquida - de alta resolución.	1
<i>Cellulomonas</i> sp	Endoglucanasas Celulasa I CB CA	118,000 49,000-52,000 53,500	Cromatografía de columna con Sephadex G-25 y G-200, y en Biogel P-150 Ultrafiltración (PM-10) Crom. de intercambio iónico con Sephadex-DEAE-A-50.	2
<i>Cellulomonas</i> sp	Endoglucanasas I II III IV V VI	62,944 44,355 62,944 76,880 142,914 120,572	Ultrafiltración (PM-10) Cromatografía de intercambio iónico DEAE-Trisacril M y DEAE-Sephadex A-50.	27
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Endoglucanasa	40,000	Cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-100 y Sephadex G-75.	37

Las metodologías usadas para la separación de proteínas son muy variadas y estas técnicas pueden incluir fraccionamiento con sales, con solventes orgánicos, sepraciones con membranas, geles de filtración, de absor-ción, electroforesis, cromatografías, etc. (Benninger, -1984). La elección de las técnicas y de los tratamien-tos que se van a aplicar para la separación de una mues-tra proteica, dependen de las características de la mis-ma y de la disponibilidad de los materiales.

Las enzimas son proteínas relativamente frá-giles que tienden a la desnaturalización e inactivación bajo condiciones inadecuadas, por lo que no pueden ser sometidas a los tratamientos violentos que son usados fre-cuentemente en química orgánica (ácidos fuertes, altas temperaturas, reactivos fuertes). Para evitar la desnaturalización deben considerarse cuidadosamente los proce-sos que se van a emplear al trabajar con enzimas. (Pixon, 1977).

Las condiciones de estabilidad varían en las dife-rentes enzimas, pero en general deben ser evitadas las temperaturas altas, es recomendable no exponerlas a temperaturas arriba de la corporal; muchas purificaciones son llevadas a cabo a 0°C. También debe evitarse el uso de soluciones ácidas o alcalinas, ya que la mayoría de las enzimas son inactivadas a pH menores de 5 y mayores de 9.

Los solventes más apropiados para la separación de las enzimas a nivel de células, se refieren a bajas concentraciones. El fraccionamiento de las células por alcohol o acetona para la obtención de gránulos de células congeladas no debe considerarse como un método de purificación de la enzima por la mezcla del solvente con el sustrato (Diaper, 1970).

A B T E C T O R I A P A R T I

En un estudio realizado por el autor Cellulomonas, B&W y J. Liger (1971), se efectuó una extracción extracelular; una fracción (C-1) y dos fracciones de celulosa (CA y CB); éstas últimas se purificaron alcohólicamente. Las tres enzimas se comportaron como endoenzimas con pesos moleculares de 118,000 D para C-1, entre 40,000 y 50,000 D para CA y de 59,200 D para CB. Las técnicas empleadas para su obtención se mencionan en el cuadro IV.

Barnes y col. (1986) aislaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución, dos endo-celulasas a partir de un cultivo de Cellulomonas farringtonii.

Los pesos moleculares reportados para estas enzimas fueron de 40,000 D para la endo-glucanasa CFA y de 57,000 D para la endoglucanasa CFB. Por otro lado, Prasertan P. y H.W. Doelle (1986) reportaron la separación y caracterización de las celulasas de un filtrado de cultivo de Cellulomonas sp. en el que encontraron seis diferentes componentes con actividad de endoglucanases con pesos moleculares entre 44,000 y 143,000 D. (Tabla IV).

En relación específicamente con Cellulomonas --- flavigena, Thayer D.W. y col. (1984) purificaron parcialmente de un cultivo de este microorganismo (clave ATCC--482), una carboximetil celulasa con un peso molecular de 40,000 D. por medio de cromatografías de exclusión molecular en Bio-Gel P-100 y Sephadex G-75.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar parcialmente las -
celulasas que forman el complejo enzimático
co liberado por Cellulomonas flavigena --
creciendo en bagazo de caña.

Objetivos Particulares:

- I. Determinar la cinética de crecimiento
y producción de enzimas celulolíticas
de C. flavigena.
- II. Aislar el complejo enzimático extra
celular mediante el uso de sales --
y/o solventes orgánicos.
- III. Definir la actividad y peso molecu-
lar de las enzimas recuperadas.

M E T O D O L O G I A

Microorganismo. Se utilizó la cera silvestre de Cellulomonas flavigena, aislada a partir del cultivo mixto integrado por Xanthomonas sp. y C. flavigena claves CPBB-b-532 y ATCC-31920. (De la Torre, 1981)

Conservación del cultivo. El cultivo se mantuvo en tubos con medio mineral, agar al 2%, carboximetil-celulosa al 1% y extracto de levadura al 0.02 % (De la Torre, 1981). Una vez que se sembró, se incubaron los tubos a 37°C por 48 horas, y se conservaron en refrigeración entre 2° y 4°C. La resiembra de los mismos se realizó cada mes.

Sustrato. Se utilizó bagazo de caña, tratado previamente con NaOH al 2% (De la Torre, 1981). Después de lavado y secado se pasó a través de una malla # 20 en un molino de cuchillas (Arthur H. Thomas CO. Scientific Apparatus).

Composición del medio de cultivo

Agua de la llave	1000	ml
Barazo de caña	10	g
Biotina	10^{-2}	mg
Tiamina	1	mg
NaCl	5.5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5	g
$^+\text{(PO}_4\text{)}^{-3}$	3.5	g
CaCl_2	0.1	g
MgSO_4	0.1	g

* Los fosfatos se prepararon mezclando H_3PO_4 al 85% y KOH (en lentejas), hasta llevar a la solución a un pH = 7. Todas las sales fueron grado industrial.

Preparación del inóculo. En un matraz de 500 ml se colocaron 100 ml del medio de cultivo, y se le agregó una suspensión celular de C. flavigena obtenida a partir de un tubo de conservación. La mezcla se incubó a 37°C por 48 horas, con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo anterior, se inoculó un segundo matraz en una relación 10% v/v, y se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación por 24 horas.

Cinética de crecimiento. Se realizaron tres cinéticas, para las cuales se utilizó un fermentador ---- (IH-Engineering C^o LTD) de 3 litros de capacidad, el -- cual fué inoculado a partir de un cultivo de 24 horas, en una relación 10% v/v. Las condiciones de operación fueron: 300 rpm, 0.5 vvm y 37^oC. El muestreo se realizó aproximadamente cada 4 horas hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria.

El crecimiento se cuantificó indirectamente por la turbidez presentada por las muestras, a una longitud de onda de 660 nm. Previamente se realizó una curva tipo de la absorbancia a 660 nm, con respecto a la biomasa del cultivo filtrado en una cámara millimétrica con una membrana tipo HA-0.45 μ m.

Determinación de Actividad Enzimática. En cada muestra colectada se midió la actividad celulolítica --- por medio de la técnica de Mandels, como se indica (Ponce, 1982):

Actividad sobre carboximetil-celulosa (CMC)

Reactivos:

- a) Solución de CMC al 1% en regulador Tris-HCl
0.05 M pH = 7.2

- b) Reactivo de Acido Dinitrosalicílico (DNS)
- c) Regulador Tris-HCl 0.05 M pH = 7.2

Procedimiento:

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml de la solución de ONC y 0.5 ml de la muestra enzimática; la mezcla se agitó y se incubó a 50°C por tres minutos. - La reacción se detuvo con 3 ml del reactivo de DNS. -- Los tubos se colocaron en baño María durante 5 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron a 10 ml con agua destilada. La absorbancia de las muestras se leyó a 550 nm. teniendo un blanco de reactivos y uno con la muestra enzimática.

Actividad sobre papel filtro (EE)

Reactivos:

- a) Solución reguladora Tris-HCl 0.05 M pH = 7.2
- b) Tiras de papel Whatman # 1 de 1 x 6 cm.
- c) Reactivo de DNS

Procedimiento:

Se mezcló 1 ml de la muestra enzimática y 1 ml del regulador, se agregó una tira de papel y se incubó durante 30 minutos a 45°C. La reacción se detuvo con la adición de 3 ml del reactivo de DNS, se puso a ebullición por 5 min., se dejó enfriar y se aforó a 10 ml con agua destilada. La absorbancia se leyó a 550 nm. De la misma forma se prepararon un blanco de enzima y un blanco de sustrato.

Las actividades celulolíticas se reportaron en unidades enzimáticas (U.E.), con U.E. = a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ M de celobiosa por minuto. Los análisis se realizaron por triplicado.

Recuperación de las enzimas. Una vez crecido -- el cultivo en las condiciones seleccionadas, se filtró a través de una malla de nylon para recuperar el bacazo residual. El sustrato recuperado se lavó con agua destilada y ésta se agregó al caldo de cultivo para su centrifugación, la cual se llevó a cabo a 13,000 rpm y 4° C por 30 min., para trabajar con las enzimas solubles. En el sobrenadante que se obtuvo se evaluaron las actividades enzimáticas como se describió anteriormente, y se midió la cantidad de proteína por el método de Lowry, modificado por Herbert y col., (1971).

Precipitación de proteínas. Se procedió a recuperar las proteínas probando 3 vehículos para la precipitación; las concentraciones de los solventes orgánicos, se eligieron en base a trabajos previos realizados por Ponce N. (comunicación personal).

1) Etanol. El solvente se agregó al extracto enzimático en una relación 2:1 y se dejó precipitar por 3 horas. La precipitación se realizó en una muestra, por triplicado.

2) Acetona. Se probaron dos relaciones solvente-muestra : 4:1 y 3:1, dejándose precipitar por 3 horas. Se emplearon dos muestras independientes y por triplicado cada una de éstas.

3) Sulfato de amonio. Se emplearon 3 concentraciones diferentes: 14, 36 y 60% p/v. La sal se agregó al sobrenadante, se mezcló y se dejó precipitar durante toda la noche. Para cada uno de los porcentajes se emplearon dos muestras independientes con tres repeticiones para cada caso.

En todos los casos el precipitado se recuperó centrifugando las muestras a 10,000 rpm por 10 minutos y se resuspendió en un volumen conocido de regulador Tris-HCl 0.05 M pH = 7.2 . Todas las precipitaciones se llevaron a cabo a 4°C.

Eliminación de sales. Las muestras precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fueron desaladas a través de una columna de Sephadex G-25 de 2 x 20 cm., utilizando como eluyente el mismo regulador empleado para la resuspensión.

Cromatografía de filtración en gel. Se montó una columna con Sephadex G-100, de 50 cm. x 1.6 cm. la cual se equilibró con regulador Tris-HCl 0.05 M pH=7.2. Se colocaron 5 ml de la muestra proteica y se eluyó con el mismo regulador, recogiendo fracciones de 10 ml. El proceso se llevó a cabo a 4°C. A estas fracciones se les determinó la absorbancia a 280 nm. en un espectrofotómetro Per in Elmer - 3A.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. (Laemmli, 1979). Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 7.5%, tanto en condiciones desnaturantes como sin SDS. Se aplicó un voltaje de 50 voltios mientras la muestra estaba en el gel concentrador (pH=6.8) y una vez que alcanzó el gel separador (pH=8.8) se aumentó a 100 voltios. Este voltaje se aplicó hasta que el colorante estuvo a 0.5 cm aproximadamente del borde inferior del gel.

Electroforesis bidimensional.

Se corrió primeramente un gel en condiciones no desnaturalizantes, con 30 μ l de muestra, posteriormente se recortó la banda del corrimiento, y se suavizó por 15 minutos en una solución solubilizadora con SDS al 6.5%. Después se colocó la banda recortada en la parte superior de un gel con SDS para su corrimiento en segunda dimensión. Se aplicó un voltaje constante de 30 voltios.

Tinción con plata para proteínas. Se siguió una metodología en base a una combinación de las técnicas descritas por los proveedores de Bio-Rad, y por Wray W. y col. (1981), como se indica:

Reactivos:

- a) Metanol : Ac. acético 40:10 % v/v.
- b) Etanol : Ac. acético 10:5 % v/v.
- c) AgNO_3 al 0.8%, NaOH e NH_4OH . (Se disolvieron - 0.8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua desionizada y se agregó gota a gota en una mezcla de 21 ml de NaOH al 0.36% y 1.4 ml de NH_4OH - 14.8 M. La solución se aforó a 100 ml). La solución se preparó al momento de usarse.
- d) Revelador. Se mezclaron 2.5 ml de ácido cítrico al 1% con 0.25 ml de formaldehído al 38% y se aforó a 500 ml. (La solución debe de ser fresca).
- e) Acido acético al 5%.

Procedimiento:

El gel se sumergió toda la noche en la solución (a), después se cambió a la solución (b) por 15 minutos; enseguida se realizaron dos lavados con agua desionizada por 15 minutos cada uno. Una vez enjuagado el gel se agregó la solución de plata por 15 minutos, agitándose -- aproximadamente a 50 rpm, se lavó el gel con agua desionizada por 10 minutos y se sumergió en el revelador hasta que aparecieron las bandas (aproximadamente 15 min.), en este momento el gel se lavó con agua y el desarrollo del color se detuvo con ácido acético al 5%.

Tinción para proteínas con azul de coomassie. Se siguió la técnica citada por Maizel, (1971).

- 1) El gel se sumergió en una solución de azul de coomassie al 0.2% con ácido acético al 7% y metanol al 30% por un período de 2 horas.
- 2) Posteriormente se hicieron varios lavados -- del gel con una solución de ácido acético:metanol 7:30 % v/v.

Determinación de peso molecular en electroforesis en gel de poliacrilamida. Los estándares empleados para determinar los pesos moleculares fueron: Albúmina de bovino (66,000 D), Ovoalbúmina (45,000 D), Gliseraldehído_3-fosfato deshidrogenasa (36,000 D), Anhidrasa carbónica (29,000 D), Tripsinógeno (24,000 D), Inhibidor de Tripsina (20,100 D) y α -lactalbúmina (14,200 D) de la marca -- SIGMA, y se corrieron independientemente de las muestras enzimáticas, en un gel de acrilamida al 7.5% bajo las -- mismas condiciones mencionadas para la electroforesis -- con SLS.

Identificación de actividad sobre CMC en los geles no desnaturalizantes. Se prepararon geles de agarosa tipo I (Sigma) al 1% y CMC al 0.1% en regulador Tris-HCl 0.05 M pH=7.2, después se empalmaron en geles de poliacrilamida con las muestras corridas en condiciones no desnaturalizantes. Se envolvieron en papeles húmedos y se ensayaron diferentes tiempos de incubación de 30, 45 y 60 minutos a 50°C en una estufa Lab-Line Instruments, Inc. Una vez incubado el gel de agarosa, se sumergió en una solución al 0.1% de rojo congo por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el rojo congo y se adicionó NaCl 1 M durante 15 minutos, se removió el NaCl y finalmente para contrastar los halos de hidrólisis se agregó HCl 0.1 N para virar a un tono azul. --- Mac Kenzie, y col. (1984). (Seis muestras independientes).

Identificación de actividad sobre celulosa en geles de poliacrilamida. Se empalmó un gel de poliacrilamida corrido en condiciones no desnaturalizantes con un gel de agarosa al 1% y solka-floc⁺ al 0.1%, se cubrieron con papeles húmedos y se incubaron entre 45°C y 48°C durante ocho días, período durante el cual el gel fué observado cada 24 horas para localizar halos de hidrólisis de celulosa. Mac Kenzie y col.(1984).

Se trabajaron tres muestras independientes con una sólo repetición.

+ polvo de celulosa

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N

Cinética de crecimiento y producción de celulasas

Las cinéticas realizadas con Cellulomonas flavizena crecidas en bagazo de caña al 1%, se realizaron con el objeto de elegir el momento adecuado para obtener las enzimas celulolíticas del caldo del cultivo.

En la Figura 3 se muestra la curva logística encontrada, donde se pueden apreciar una fase de adaptación -- del microorganismo de aproximadamente 4 horas seguida de la fase de crecimiento exponencial con una duración de aproximadamente 28 horas, y finalmente la fase estacionaria que se alcanzó alrededor de las 32 horas.

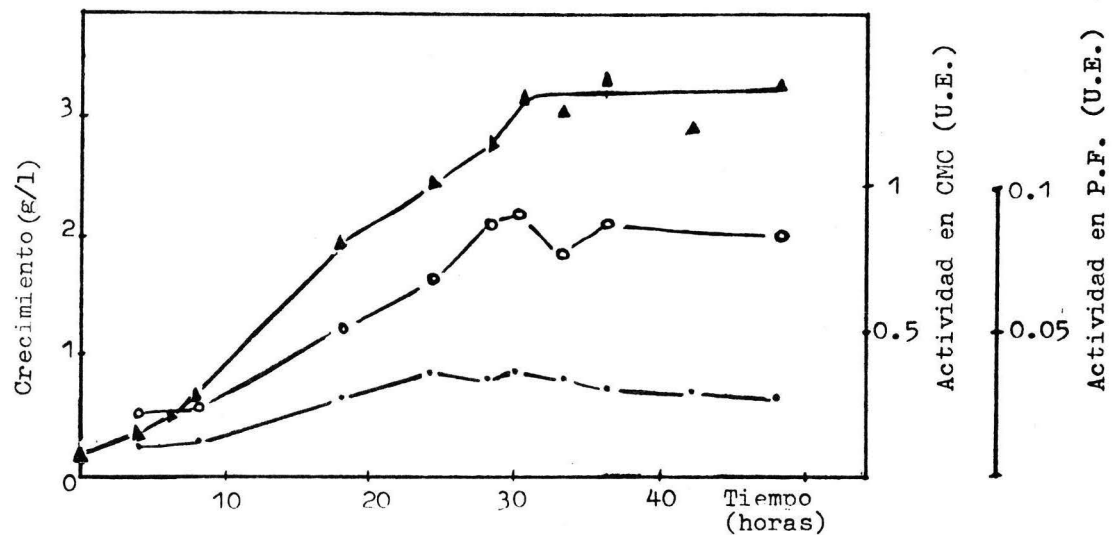
En la misma gráfica podemos ver que la actividad celulolítica se presentó desde el inicio del crecimiento hasta la fase final del mismo; sin embargo la actividad enzimática sobre CMC alcanzó su máximo nivel a partir de las 28 horas, mientras que la mayor actividad sobre P.F. se manifestó desde las 24 horas.

La velocidad específica de crecimiento del cultivo se determinó linearizando los puntos de la fase expo-

nencial entre las 4 y las 30 h., resultando una velocidad específica de crecimiento de 0.108 gramos de biomasa en un litro de cultivo, por hora. (Coeficiente de correlación --- 0.995).

En base a los resultados obtenidos se ontó por separar a las celulasas del caldo del cultivo en un período comprendido entre las 28 y 32 horas de crecimiento.

FIGURA 3. CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE CELULASAS DE --
Cellulomonas flavigena CECIDA EN BAGAZO DE CAÑA AL 1% .



Crecimiento g/l

Actividad en CMC

Actividad en P.F.

U.E. = Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de celobiosa por minuto.

Recuperación de las proteínas del caldo de cultivo

Una vez seleccionado el tiempo de crecimiento en el cual se iba a realizar la recuperación de las enzimas, se procedió a probar diferentes agentes de precipitación.

Como se puede observar en el Cuadro V, a partir de la precipitación con etanol en una relación 2:1, se obtuvo una recuperación de proteínas del 39.6% y de actividad sobre CMC del 18.86 %, resultando una pérdida de la actividad específica del 52%. Esta disminución en la actividad se debió probablemente a un ligero incremento en la temperatura lo cual pudo propiciar la desnaturalización de las proteínas en la mezcla con etanol.

Cuando se precipitó con acetona en una relación 3:1, se recobró un 28% de proteínas y un 49.8% de actividad sobre CMC, mientras que al aumentar el volumen del solvente a una relación de 4:1, se encontró una disminución de estos porcentajes de recuperación tanto en la proteína como en la actividad. Al emplearse este solvente se observó la formación de un paquete debido a la agregación de las proteínas como resultado de la disminución del grado de ionización de los grupos R de las mismas.

Este paquete presentó problemas para su resuspensión en el regulador debido probablemente a que la temperatura de trabajo fué de 4°C para evitar la desnaturalización de las enzimas.

Jamil y col. (1988) trabajando con C. flaviscena, lograron identificar 4 endoglucanasas en el sobrenadante al precipitar las proteínas con acetona al 80% v/v, sin embargo estos autores no mencionan sus eficiencias de recuperación.

Por otro lado, cuando se utilizó el sulfato de amonio en las diferentes concentraciones como agente precipitante, la recuperación tanto de proteínas como de actividad sobre CMC se incrementó al aumentar la concentración de la sal; obteniéndose el 63% de la proteína original y el 73% de la actividad sobre CMC después de desalar las muestras proteicas precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% p/v (aproximadamente 98% de saturación). (Cuadro VI)

No obstante haberse obtenido una actividad específica mayor al precipitar con acetona, se seleccionó la precipitación con sulfato de amonio debido a que presentó altos porcentajes de recuperación y se resuspendió fácilmente, mientras que el paquete formado por la precipitación con acetona no se resuspendió homogéneamente hacien

do difícil la manipulación de la muestra, además de que al correrla en PAGE quedó retenida en el punto de aplicación en el gel.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el presente trabajo con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a las tres concentraciones probadas, son superiores a los de Vaidya y col. (1984), quienes precipitaron las proteínas de un cultivo de Fusarium lini con sulfato de amonio al 20%. Ellos recuperaron el 4.1% de proteína y el 12.3% de actividad sobre CMC logrando una actividad específica mayor, lo cual los llevó a la separación de una sola endoglucanasa.

Macris (1984), trabajando con un cultivo de Alternaria alternata logró recuperar hasta un 80% de actividad sobre CMC al precipitar con sulfato de amonio al 80% de saturación, sin embargo su recuperación de proteína fué relativamente baja (39%) lo cual pudo incrementar la actividad específica. Por otro lado Sounder y Chandra (1988) lograron recuperar hasta un 92% de actividad sobre CMC, de un cultivo del hongo mesofílico Humicola grisea Fv al adicionar la misma sal al 60% p/v con una recuperación del 78% de proteína.

Cabe mencionar que a la fecha no hay reporte sobre recuperación de proteínas de C. flavigena con esta sal.

CUADRO V. RECUPERACION DE PROTEINAS A PARTIR DEL CULTIVO DE Cellulomonas flavigena.

PROCESO	PROTEINA	ACTIVIDAD	ACTIVIDAD	RECUPERACION		ACTIVIDAD
	TOTAL (mg)	TOTAL/CMC (U.E.)	ESPECIFICA	PROTEINA	Y ACTIVIDAD/CMC	ESPECIFICA
Sobrenadante original (10 ml)	4.79	8.12	1.69	100	100	100
Precipitación con:						
Etanol (2:1) (4ml)	1.9	1.532	0.806	39.66	18.86	47.69
Sobrenadante original	3.68	6.13	1.66	100	100	100
Precipitación con:						
Acetona (4:1) (4ml)	0.736	1.58	2.14	20	25.77	128.91
Acetona (3:1) (4ml)	1.036	3.064	2.95	28.15	49.98	177.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ 14% (4 ml)	0.568	1.384	2.43	15.43	22.57	146.38
(NH ₄) ₂ SO ₄ 36% (4ml)	0.776	1.984	2.55	21.08	32.36	153.61
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60% (4 ml)	2.296	4.316	1.87	62.39	70.4	112.65

U.E. = Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de celobiosa por minuto.

CUADRO VI. RECUPERACION DE PROTEINAS A PARTIR DE UN CULTIVO DE Cellulomonas flavigena, DESPUES DE DESALAR EN SEPHADEX G-25

PROCESO	PROTEINA TOTAL(mg)	ACTIVIDAD TOTAL /CMC (U.E.)	ACTIVIDAD/CMC ESPECIFICA	RECUPERACION PROTEINA	ACTIVIDAD/CMC	ACTIVIDAD ESPECIFICA
Sobrenadante original (66 ml)	29.634	46.134	1.55	100	100	100
Precipitación con: (NH ₄) ₂ SO ₄ al 98% de saturación (60% p/v). Desalado por columna de Sephadex G-25. (Dilución 23 ml.)	18.906	34.017	1.79	63.7	73.7	115.4

U.E. = Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de celobiosa por minuto.

Separación por cromatografía (Sephadex G-100)

Una vez que fueron desleídas las proteínas, se procedió a separar la muestra por medio de una cromatografía de filtración. Después de la separación, se midió la cantidad de proteína en las fracciones colectadas; y para poder detectar las actividades enzimáticas, fue necesario concentrar las fracciones, por ultrafiltración con una membrana EE-10.

El patrón de elución obtenido se muestra en la figura 4, donde se puede observar la presencia de 3 picos de actividad sobre CMC, denominados I, II, y IV; y 3 pequeños picos de actividad sobre P.F., señalados como I, II, y III. En los picos I y II, coinciden ambas actividades, mientras que los picos III y IV, presentan actividad únicamente sobre P.F. o CMC, respectivamente.

No obstante las actividades detectadas, la separación de proteínas no fue completa, ya que se puede observar solapamiento de los valles de los picos obtenidos, (Figura 4). Esto pudo deberse principalmente, a una mala distribución de la muestra en la columna de sephadex, como resultado, por un lado, de que el volumen de elución del primer pico de actividad que aparece, coincide con el

volúmen vacío de la columna y, por lo tanto, con el volúmen de exclusión molecular del sephadex empleado; y, por otro lado a la alta viscosidad de la muestra, en relación con el eluyente (2.2), la cual es además una limitante para las cantidades de proteína que pueden trabajarse en el corrimiento. (Manual sobre cromatografía de filtración de Pharmacia Chemicals)

Electroforesis con SDS

Las muestras correspondientes a los picos con actividad celulolítica definidos en la cromatografía (Figura 4), fueron corridas en una electroforesis con SDS (Figuras 5 y 6), donde se observaron los siguientes patrones:

En la muestra del pico I, se observan dos bandas de proteína con pesos moleculares de 20,000 D, pesos que no concuerdan con el volúmen de elución de la muestra, -- que como ya se mencionó, corresponde al volúmen vacío de la columna y por lo tanto, el peso molecular de la enzima filtrada debería de ser aproximadamente igual o mayor a las 100,000 D. En base a lo anterior, y aunado a que en los carriles donde se corrieron las muestras, se presenta una zona de barrido de proteínas, es posible que la enzima esté formada además de las bandas mencionadas, por ---

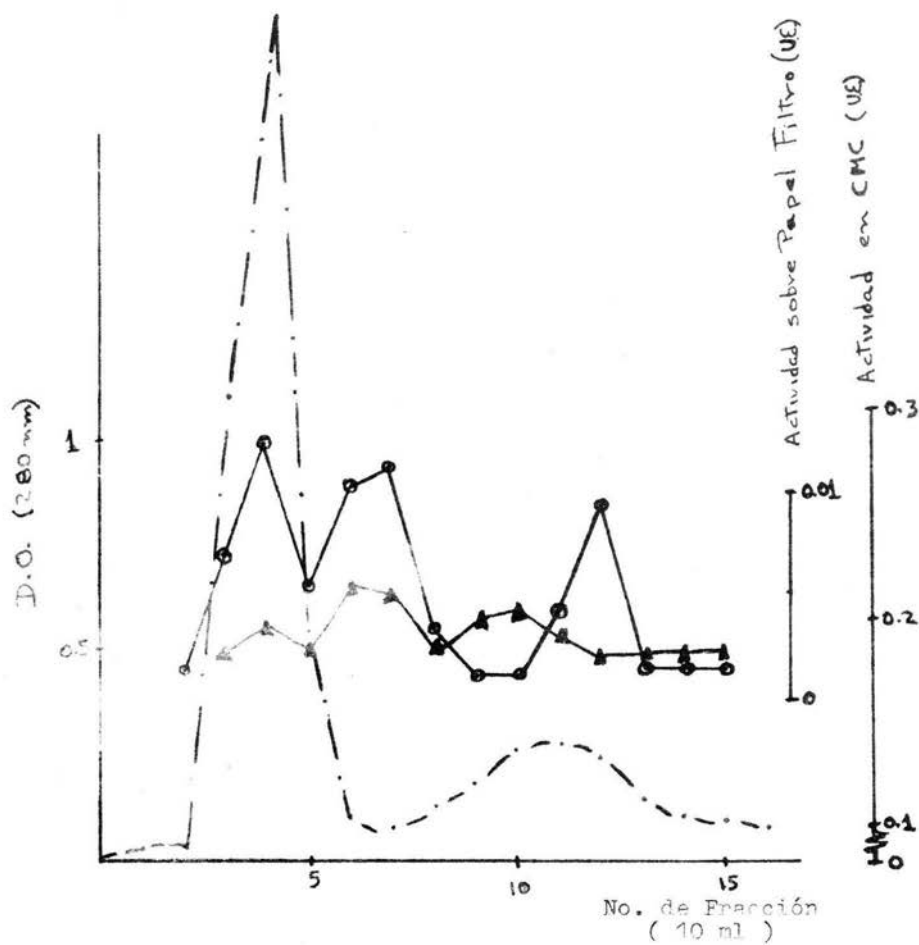
otras subunidades con un peso molecular mayor, que no alcanzaron a definirse en el barrido.

La muestra correspondiente al pico II, presenta una banda ancha con un peso molecular estimado de 35,000 D. En base a que el volumen de elución de esta muestra, está muy cercano al del pico I, y a que en la electroforesis corrida, esta banda se alcanza a observar también con las bandas del primer pico, su peso molecular deba de ser mayor; por lo que es muy probable que esta enzima esté formada por dos subunidades, con pesos moleculares semejantes, por lo cual aparecen como una sola banda.

En la muestra del pico III, aparece una banda con un peso molecular de aproximadamente 41,500 D, hay que recordar que esta muestra presentó únicamente trazas de actividad sobre P.F. La muestra del pico IV no alcanzó a definirse claramente en el gel, por lo que no fue posible determinar su peso molecular.

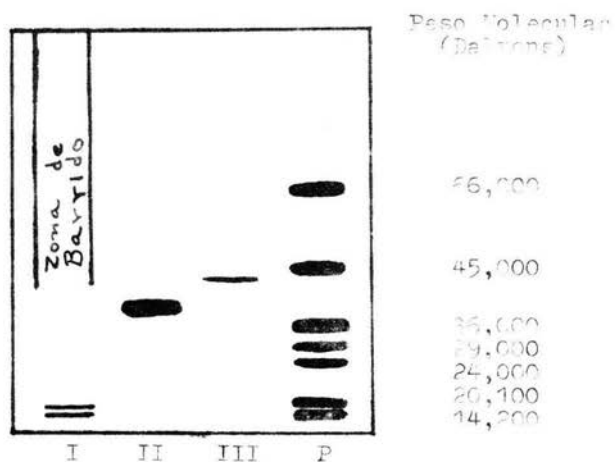
Como se pudo observar en el análisis anterior, los pesos moleculares se estimaron en base a los estándares de proteína, mencionados en la metodología, y a los volúmenes de elución de las proteínas en la columna de sephadex G-100.

FIGURA 4. PERFILES DE ELUCION DE LAS PROTEINAS Y LA ACTIVIDAD --
 CROMATOGRAFICA DE UN CULTIVO DE Cellulomonas flavigena



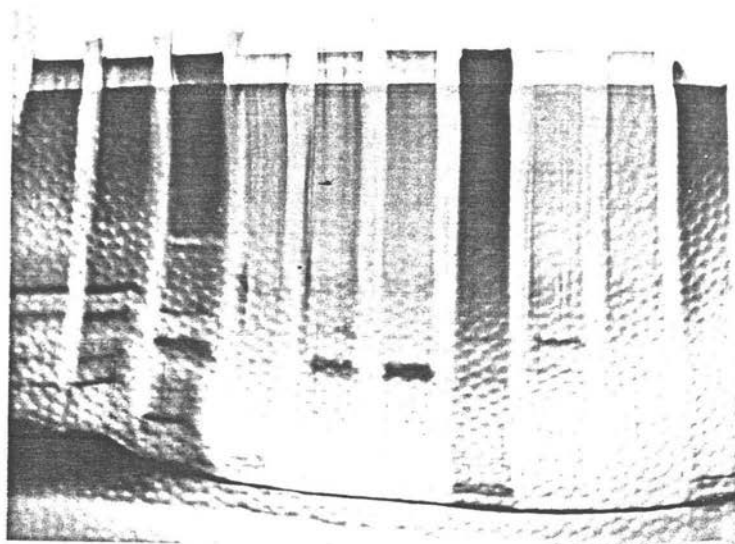
Proteínas (D.O.) - - - - -
 Actividad en CMC ● - ● - ●
 Actividad en P.F. ▲ - ▲ - ▲
 Volúmen de la columna de sephadex G-100 (100 cm³)

FIGURA 5. DIAGRAMA DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE -
 POLIACRILAMIDA CON DESNATURALIZANTE (SLS)



Las muestras con actividad celulolítica del cultivo de Cellulomonas flavigens obtenidas a partir de cromatografía de filtración, se corrieron en PAGE-SDS al 7.5%. La numeración de los carriles corresponde a los números de los picos con actividad celulolítica; en el carril P, se muestran los patrones de peso molecular para las proteínas (Siema).

FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA
CON DESNATURALIZANTE (SDS)



S. O. IV III II I III II I

Las muestras con actividad celulolítica del cultivo de Cellulomonas flavigera obtenidas a partir de Cromatografía de filtración, se corrieron en PAGE-SDS al 7.5%. La numeración de los carriles corresponde a los números de los ríos con actividad celulolítica de la figura 4; y el sobrenadante original se observa en los tres primeros carriles.

Electroforesis bidimensional

No se observó ningún bandeo. El frente con el colorante migró perfectamente, sin embargo al revelarse el gel, únicamente se observó el patrón de proteínas -- (Sigma), lo cual indicó una tinción correcta, mientras que las muestras no se detectaron. Es probable que la muestra se haya eluido al sumergir el gel de la primera corrida, en la solución solubilizadora con SDS al 6.6%; o, que la concentración de la muestra corrida no haya sido suficiente para detectarse en la tinción.

Determinación de las actividades celulolíticas en los geles.

Las muestras empleadas para detectar las actividades enzimáticas fueron concentradas a partir del sobrenadante original del cultivo de C. flavigena por dos vías diferentes: por ultrafiltración a través de una membrana PM-10, y por el procedimiento de precipitación --

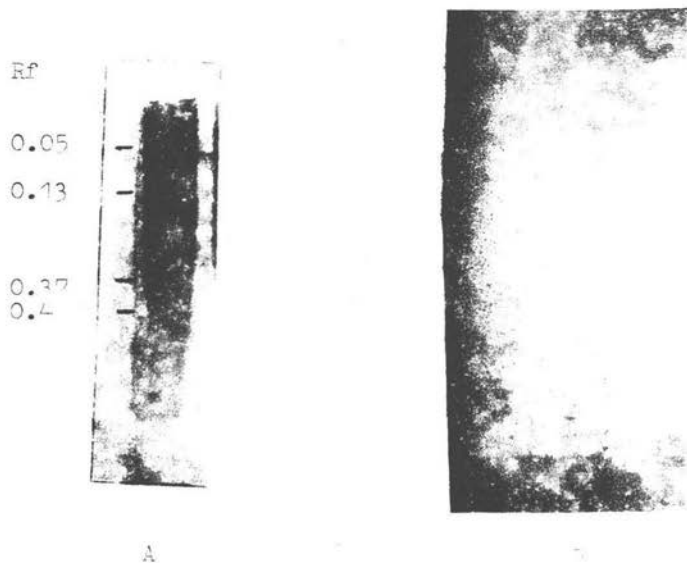
con sulfato de amonio y desalado en sephadex G-25 ya descritos. En todas las muestras probadas el patrón de actividad enzimática encontrado fué el mismo.

Actividad sobre celulosa. No pudo observarse en el gel de agar y solka floc aún después de 8 días de incubación entre los 45° y 48°C, probablemente debido a los niveles bajos de actividad de exocelulasas.

Actividad sobre CEC. Se logró detectar inicialmente como una banda corrida en la mitad superior del gel, al incubar las muestras de 40 ul por 60 minutos. Con la idea de definir cuáles bandas de proteína correspondían con la actividad se probaron diferentes volúmenes de muestra así como tiempos de incubación y se lograron identificar cuatro bandas activas sobre CEC con Rf. de 0.055, --- 0.13, 0.37 y 0.4 respectivamente (Figuras 7 y 8).

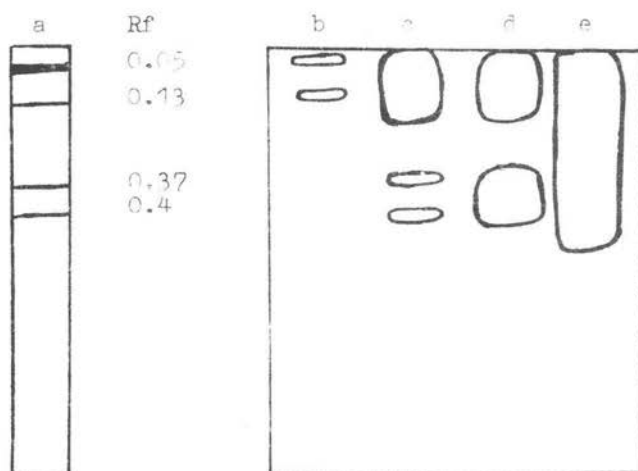
Así, resumiendo del análisis de actividades enzimáticas tenemos por un lado, de una muestra corrida en electroforesis sin desnaturalizante se detectaron 4 bandas -- con actividad sobre CEC en los geles de agarosa, y por otro lado en base a la separación por cromatografía de filtración de una muestra precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tenemos tres diferentes fracciones con esta actividad, dos de las cuales presentan actividad sobre el P.F. y una celulasa -- que aparentemente sólo actúa sobre P.F. (Cuadros VII y VIII)

FIGURA 7. FASEOGRAMA DE UNO DE LOS COMPONENTES DE LA ACTIVIDAD
 LADA POR Callitriche flaviflora EN LA
 ACTIVIDAD DE UNO DE LOS COMPONENTES DE LA



- A) Perfil de proteínas detectado por PLOT
 no desnaturalizante.
- B) Actividad sobre DMO después de 50 minutos
 de incubación a 50°C.

FIGURA 8. DIAGRAMA DE LOS PUNTOS DE ACTIVIDAD EN
 GELES DE AGAR AT 4,5 x CMC al 0.1% .



- a) Perfil de las proteínas excretadas por Callinectes flavipes detectadas por PAGE no manufestándose, que coinciden con la actividad de la CMC.
- b) Actividad observada después de 30 minutos de incubación a 50°C, con 10 ml de muestra.
- c) Actividad observada después de 45 minutos de incubación a 50°C, con 20 ml de muestra.
- d) Actividad después de 60 minutos de incubación a 50°C, con 20 ml de muestra.
- e) Actividad observada después de 60 minutos de incubación a 50°C, con 40 ml de muestra.

CUADRO VII. CELULASAS PRODUCIDAS POR *Cellulomonas flavigena*
REGISTRADAS EN GELES DE CMC.

CMC-asas	R_f
1	0.05
2	0.13
3	0.37
4	0.4

CUADRO VIII. CELULASAS PRODUCIDAS POR *Cellulomonas flavigena*
 SEPARADAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION --
 (SEPHADEX G-100).

PESO MOLECULAR (Daltons)	CMC-asas	ACTIVIDAD s/P.F.
100,000 ^{**}	+	+
70,000	+	+
n.d. [*]	+	-
41,500	-	+

* n.d. no detectado en la electroforesis.

**Este peso molecular se estimó en base al volumen de elución
 en la columna de sephadex G-100.

Los pesos moleculares estimados en este trabajo - para las enzimas liberadas por C. flavigena, se encuentran entre los valores reportados por otros autores tanto para sistemas fúngicos como para sistemas bacterianos (Cuadros III y IV).

El número de CMC-asas encontrado (4) en el presente informe coincide con los resultados obtenidos por Béguin y Eisen (1978) quienes encontraron 4 CMC-asas en el caldo de un cultivo de Cellulomonas sp. crecido en polvo de celulosa como fuente de carbono. Por otra parte Jamil y col. (1988) cultivaron a C. flavigena en extracto de levadura, Avicel y Twen 80, y encontraron 7 fracciones activas sobre CMC libres en el sobrenadante y sólo 4 CMC-asas unidas al sustrato, explicando a las fracciones libres adicionales como probable resultado de proteólisis.

La existencia de enzimas tanto con actividad de endo- β -1,4-glucanasas como de exo- β -1,4-glucanasas ha sido reportada por varios autores. Pétré y col. (1986) purificaron una endoglucanasa de Clostridium thermocellum producida en E. coli por el gene cel G, que presenta además trazas de actividad sobre p-nitrophenyl-b-D-cellobiosido (pNPC) (sustrato que es usado para identificar actividad de exo-glucanasas. La enzima purificada tiene un

peso molecular de 39,000 D mientras que la celulasa producida directamente por la cera de C. thermocellum, corresponde a 40,000 D debido probablemente a glicosilación.

En cuanto al género Cellulomonas, Gilkes y col. (1984) trabajando con C. fimi ATCC-484, encontraron una endoglucanasa de 56,000 D que puede degradar también --- nNPC, MUC y xilana. En 1986 Prasertsan y Doelle separaron por cromatografía de intercambio iónico, a partir de un cultivo de Cellulomonas sp., 6 diferentes endoglucanasas que a su vez presentaron actividad de exoglucanasas.

Bagnara y col. (1986) a partir de las celulasas producidas por C. fermentans, analizaron la actividad de las mismas y encontraron que tres de las bandas obtenidas al correr una PAGE no desnaturalizante fueron activas tanto sobre CMC como en Avicel. Otros autores que mencionan la presencia de 3 diferentes fracciones con actividad de exo y endo-glucanasas son Rodríguez y col. (1988) quienes analizaron por HPLC el sobrenadante de un cultivo de Cellulomonas sp. II bc, crecido en bagazo de caña, y observaron tres picos de actividad sobre CMC sobrenuestrados a otros tres con actividad sobre P.F.

Los reportes mencionados así como lo encontrado en el presente trabajo apoyan la hipótesis de que algunas endoglucanasas pueden forrar la hidrólisis de celulosa cristalina como resultado de la formación de complejos enzima-sustrato a lo largo de las microfibrillas, debilitándose los enlaces de hidrógeno entre las cadenas glucosídicas lo que lleva a un cambio conformacional de la celulosa, permitiéndose de esta manera la hidrólisis de los enlaces covalentes (Hofsten, B.V., 1975).

Al respecto, Mayer y col. (1987) realizaron estudios con celulosomas del género Clostridium y observaron que la distancia promedio de las subunidades de proteína más grandes que forran un celulosoma es de 4 nm, aproximadamente igual a la longitud de un celooligosacárido de cuatro unidades de celobiosa. Ellos postularon que al solaparse una cadena de celulosa en una cadena de subunidades del celulosoma puede ocurrir un corte múltiple y simultáneo, lo que generaría celooligosacáridos de 4 unidades de celobiosa, de la misma forma cadenas con subuni

... más pequeñas podrían producir recueños
... celotriosas o celobiosas, explicando
se de esta manera la saccharificación completa de celulosa a
partir de un sistema compuesto por endo- β -1,4-glucanasas,
sin un requerimiento de actividad de exo- β -1,4-glucanasas.

En cuanto a la presencia de glucanasas con actividad
específica de exo-glucanasas en algunas bacterias, los
recursos no son comunes, por haberse existido algunos
que revelan la existencia de exoglucanasas en las --
fuentes de bacterias anaerobias. Por un lado Saddler y
col. (1984) encontraron en el sobrenadante de un cultivo
de Acetivibrio cellulolyticus una enzima de 28,000 D de-
nominada exoglucanasa C-1; y en 1986 Bacteria y col. reve-
laron la existencia de una exoglucanasa al analizar el -
sobrenadante de un cultivo de Gallibacterium fermentans. -
La actividad de exo-glucanasas se determinó en ambos ca-
sos en base a su capacidad para hidrolizar Avicel, sien-
do de 2.4×10^{-3} U.I./ml para la celulosa producida por
G. fermentans y entre 2 a 3 U.I./ml para la producida
por A. cellulolyticus. U.I. = μ mol de glucosa libera-
dos por hora.

No obstante los informes sobre la presencia de -
actividad de exoglucanasas en las citas mencionadas, así

como la encontrada en el sobrenadante de C. flavisena en este trabajo, es necesario recordar que no existe un sustrato específico para determinar esta actividad, por lo que para definir si una enzima es una $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glucanasa}$ debe procederse a su purificación para analizar posteriormente los productos que forman durante la hidrólisis de celooligosacáridos. (Robson, 1969) .

CONCLUSIONES

- 1) Las mayores actividades celulolíticas en el sobrenadante del caldo de cultivo de C. flavirena se alcanzaron en la fase logarítmica tardía de crecimiento, lográndose la mayor actividad sobre carboximetil celulosa a partir de las 28 horas, mientras que la mayor actividad sobre papel filtro se observó desde las 24 horas. La actividad detectada en P.F. fué mucho menor que la registrada sobre CMC.
- 2) De los agentes probados para la precipitación de proteínas, el sulfato de amonio al 60% p/v fué el que rindió la mayor recuperación de las mismas, y ofreció un patrón representativo de las CMC-asas del sobrenadante original, detectado en gels de agarosa al 1% y CMC al 0.1% .
- 3) En el sobrenadante del cultivo de Cellulomonas flavirena crecido en barazo de caña al 1%, se encontraron 4 actividades enzimáticas sobre CMC y una sobre P.F.

SUGERENCIAS

- 1) Recuperar las celulasas adsorbidas al sustrato y compararlas con las celulasas que se encuentran libres en el sobrenadante.
- 2) Concentrar los sobrenadantes originales por -- ultrafiltración.
- 3) Para efectos de purificación de las enzimas, - se podrían montar columnas de mayor volumen; y utilizar otros soportes, como el Bio-Gel, y/o_ soportes con afinidad por las enzimas como la_ concanavalina A-sebrosa.
- 4) Purificar la celulasas con actividad sobre na-- nel filtro, para definir posteriormente, si es una endo o exo- β -(1,4)-glucanasa.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Basnara, C., C. Gaudin y J.P. Belaich. (1986). Purification and partial characterization of two extracellular - endoglucanases from Cellulomonas fermentans. Biochemical and Biophysical Research Communications. - 140: 219-229.
- 2) Béguin, P. y H. Eisen. (1978). Purification and partial -- characterization of three extracellular cellulases_ from Cellulomonas sp. Eur. J. Biochem. 87: 525-531.
- 3) Bisaria, V.S. y T.K. Ghose. (1981). Biodegradation of cellululosic materials. Enzyme. Microb. Technol. - - - 3: 89-104.
- 4) Couchler, L.P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnology and Genetic Engineering - Reviews. 3: 10-108.
- 5) Cuskey, S.M., B.S. Montenegro y D.F. Eveleigh. (1983). Liquid fuel developments. Ed. Donald L. Wise CRC Press USA pag. 32-43.
- 6) Da Silva, E.J. y E.W. Doelle. (1980). Microbial technology and its potential for developing countries. Process Biochemistry 15: 3
- 7) De la Torre M. (1981). Producción de proteínas alimenticias_ de origen unicelular en residuos lignocelulósicos._

Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México.

- 8) Dixon, M., y E.C. Webb. (1979). Enzymes. 3a. ed. Longman Group Ltd. Great Britain.
- 9) Forggarty, W.M., (ed). (1983). Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers LTD. London and New-York.
- 10) Gong, C.S. y G.T. Tsao. (1979). Cellulase and Biosynthesis Regulation. Annual Reports on Fermentation -- Processes. 3: 111-140.
- 11) Gilkes, N.R., M.L. Iamsonford, D.G. Kilburn, R.C. Miller y R.A.J. Warren. (1984). Mode of action and --- substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. J. Biol. Chem. 259(16): 10455 -- 10459.
- 12) Hasgett, K. (1981). Bacterial degradation of cellulose. - Thesis Ph. D University of New South Wales Australia School of Biotechnology.
- 13) Herbert, D., P.S. Phipps, y J.R.E. Strange. (1974). Chemical analysis of microbial cells. Methods in microbiology. Ed. by J.R. Norris, J.D.W. Ribbons. Academic Press. New York.
- 14) Hofsten, B.V. (1975). Topological effects in enzymatic -- and microbial degradation of highly ordered poly-

sacaridos. In: Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Edited by Bailey M., T.M. Emari -- and M. Linko. pages. 281-293.

- 15) Hurtubia J. y O. Monroy. (1986). Utilización de residuos agroindustriales en América Latina y el Caribe. Memorias del Taller Regional EUNMA (CEAL) CEFILACBA.
- 16) Jamil, A.S., S.N. Akhtar, K.N. Malik y E.A. Naz. (1988). Production of free and substrate-bound cellulases of Cellulomonas flavigena. Enzyme. Microb. Technol. 10: 628-634.
- 17) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. -- Nature. 227: 680-683.
- 18) Lehninger, A.L. (1984). Biocímica. 2a. ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- 19) MacKenzie, C.F., y A.L. Williams. (1984). Detection of cellulase and xylanase activity in isoelectric-focused gels using agar substrate gels supported on plastic film. Can. J. Microbiol. 30: 1522-1526.
- 20) Macris, B.F. (1984). Production and characterization of cellulase and β -glucosidase from a mutant of Alternaria alternata. Applied and Environmental Microbiology. 47(3): 560-565.
- 21) Maizel, J.V. Jr. (1971). Meth. Vir. 5: 179

- 22) Fandels, M. (1985). Applications of cellulases. *Biochemical Society Transaction*. 13: 414-416.
- 23) Mayer, F., M.P. Coughlan, Y. Mori y L.G. Ljunsdahl. --- (1987). *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2785-2792.
- 24) Molina, E.O. (1980). Producción de proteína unicelular usando como fuente de hidratos de carbono mécula de bagazo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán (Argentina).
- 25) Pétré, D., J. Millst, R. Loncin, P. Béguin, H. --- J.P. Aubert. (1986). Purification y propiedades of endoglucanase G of Clostridium thermocelum producido in Escherichia coli. *Biochimie*. 68: 687-695.
- 26) Enari T. K. (1983). Microbial cellulases. In: Microbial enzymes and biotechnology. Edited by: Forarty M... Applied Science Publishers LTD. London and New York.
- 27) Prasertsan, P. y H.W. Doelle. (1986). Separation and characterization of endoglucanases from culture filtrates of Cellulomonas sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 326-333.
- 28) Ponce N. T. (1982). Estudio de la dinámica de un cultivo mixto preparado en bagazo de caña. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México.
- 29) Ramendra K.K., S. Dube, y D.K. Dube. (1988). Extracellu

- lar cellulolytic enzyme system of Aspergillus japonicus : 3 . Isolation, purification and characterization of multiples forms of endoglucanase. Enzyme. Microb. Technol. 10: 100-109.
- 30) Robson, L.M. y G.H. Chamblis. (1989). Cellulases of bacterial origin. Enzyme. Microb. Technol. 11: 526-544.
- 31) Rodríguez, M. Q. Velasco y A. Klysov. (1988). Characterization of the cellulase complex from Cellulomonas grown on hemicellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 304-307.
- 32) Ryu, D.Y., y M. Mandels. (1980). Cellulases: biosynthesis and application. Enzyme. Microb. Technol. 2: 91-102.
- 33) Saddler, J.N., y A.M. Khan. (1981). System enzymatic cellulolytic of Acetivibrio cellulolyticus. Can. J. Microbiol. 27: 288-294.
- 34) Sjöholm, H. y I. Nordin. (1975). The structure and properties of cellulose. In: Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Edited by Bailey M., - T. J. Egan y M. Linko. pass. 9-21.
- 35) Silva-Sánchez, J., M. Salcedo, C. Montañez, J. Knowles y T.T. Teeri. (1988). Molecular cloning of cellulolytic enzyme genes from Cellulomonas flavigena in E. coli. J. Biotech. 8: 249-256.

- 36) Soundar y T.S. Chandra. (1988). Production of cellulase and detection of avicel-adsorbing carboxymethyl-cellulase a mesophilic fungus Hemicola grisea Fb. Enzyme. Microb. Technol. 10: 368--374.
- 37) Thayer, D.W., S.V. Lowther, y J.G. Phillips. (1984). - Cellulolytic activities of strains of the genus Cellulomonas. International Journal of Systematic Bacteriology 34: (4) : 432-438.
- 38) Uzile, M., y T. Sasaki. (1987). Purification and properties of cellulase enzyme from Robillarda sp. Y-20. Enzyme. Microbiol. Technol. 9: 459-465.
- 39) Vaidya, M., R. Seeta, C. Mishra, V. Deshpande, y M. -- Rao. (1984). A rapid and simplified procedure -- for purification of a cellulase from Fusarium lini. Biotechnol. Bioeng. 26: 41-45.
- 40) Wray, W., T. Boulikas, P. Wray, y R. Hancock. (1981). - Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 118: 197-203.