

# PROPIEDADES DE LAS CELULASAS EXTRACELULARES DE CELLULOMONAS

H. Rodríguez y O. Volfová

Departamento de Microbiología Industrial, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 7 de julio de 1988

**ABSTRACT.** The characteristic of the extracellular cellulolytic enzymes from *Cellulomonas* sp. Ilbc cultures on bagasse pith were studied. It was observed that CMC activity varied more sharply with temperature changes than FP activity, showing both a maximum activity at 50 °C. The optimum pH were 6,5 for CMC and 7,0 for FP activity. There were differences in the behaviour of the extracellular activity with these parameters in comparison with the total culture samples. No good linear correlation was observed between endoglucanase activity and CMC or FP activity by reducing sugars. Two types of endoglucanases were detected in relation to their adsorption properties on bagasse: one "weakly bound" type and another "tightly bound" type, the later being predominant (73 %) in the complex.

**RESUMEN.** Se estudiaron las características de la actividad celulolítica extracelular de *Cellulomonas* sp. Ilbc. Se observó que la actividad CMC varía de forma más sensible con los cambios de temperatura que la actividad PF, presentando ambas una actividad máxima a 50 °C. El pH óptimo fue de 6,5 para la actividad CMC y 7,0 para PF. Hubo diferencias en el comportamiento de la actividad extracelular con estos parámetros en comparación con el total de muestras de la especie estudiada. No existió una buena correlación lineal entre la actividad endoglucanasa y la actividad CMC y PF por azúcares reductores. Dos tipos de endoglucanases fueron detectados en relación con sus propiedades de adsorción sobre bagazo. El 73 % resultó del tipo de fuerte adsorción y un 27 % de débil adsorción.

## INTRODUCCION

El complejo enzimático celulasas está compuesto por tres tipos de enzimas: las endoglucanastas (1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasas; EC 3.2.1.4); las exoglucanastas (1,4- $\beta$ -D-glucan-4celobiohidrolasas, EC 3.2.1.9.1) y las  $\beta$ -glucosidasas (1,4- $\beta$ -D-glucosidasas, EC 3.2.1.2.1).

El conocimiento de las características de este complejo enzimático reviste gran importancia en el caso de las bacterias celulolíticas, que son objeto de estudio para la producción de proteína unicelular a partir de sustratos lignocelulósicos.

Se ha determinado que la cepa *Cellulomonas* sp. Ilbc produce enzimas tanto unidas a la célula, como extracelulares y que se unen al sustrato.<sup>1</sup> Sin embargo, se conoce poco acerca del tipo de enzimas que están presentes en el complejo. Es particularmente importante el conocimiento de las enzimas extracelulares, que deben jugar un papel primario en la degradación de la celulosa.

En este trabajo se aborda el estudio de algunas características fundamentales de las celulasas extracelulares de *Cellulomonas* sp. Ilbc, tales como su comportamiento respecto a parámetros físico-químicos, la actividad endoglucanasa, así como, sus características de adsorción sobre bagazo.

## MATERIALES Y METODOS

**Microorganismos y condiciones de cultivo.** La cepa *Cellulomonas* sp. Ilbc<sup>2</sup> fue cultivada en un fermentador Biolafitte de 5 l (volumen efectivo) en medio salino "MF",<sup>3</sup> utilizando meollo de caña pre-tratado según Dunlap.<sup>4</sup> Las condiciones de crecimiento fueron: pH 6,5; temperatura 32 °C; aire 2 vvm y agitación 600 r/min.<sup>5</sup>

**Influencia de los parámetros físico-químicos.** Se utilizó el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria (donde la mayoría de las enzimas se encuentran libres en el medio<sup>1</sup>). Para la evaluación del efecto del pH, la muestra fue incubada a 50 °C a diferentes pH, empleándose tampón McIlvaine (citrate-fosfato) para pH 5,0, y tampón fosfato para los pH entre 5,5 y 8,0. Para evaluar el efecto de la temperatura, las muestras fueron incubadas a pH 6,5 para la actividad CMC y a pH 7,0 para la actividad PF, a diferentes temperaturas, en un rango entre 35 y 55 °C.

### Determinación de la actividad enzimática.

La actividad CMC se determinó incubando 0,5 mL de muestra con 2,5 mL del tampón y 2 mL de solución de CMC 1,25 % durante 30 min. La actividad PF utilizó 0,5 mL de muestra incubados con 1,5 mL del tampón y 50 mg de papel de filtro Whatman No. 1.<sup>6</sup> Para la actividad  $\beta$ -glucosidasa se incubaron 0,5 mL de muestra con 1 mL del tampón y 0,5 mL de solución de para-Nitro-fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG) 0,0136 mol/L durante 1 h. Después de la incubación, se tomaron 0,5 mL de la mezcla a los que se añadieron 9,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 mol/L, determinándose la concentración de PNP liberado por medio de la absorbancia a 420 nm. La actividad se expresa como cantidad del producto por minuto. Tanto para la actividad CMC como PF, los azúcares reductores producidos fueron determinados por el método de Somogyi-Nelson.<sup>7,8</sup>

La actividad viscosimétrica (endoglucanasa) se basó en la determinación de la disminución de la viscosidad de una solución de CMC 0,5 %, según la técnica descrita por Rabinovitch y colaboradores.<sup>9</sup>

Una UI equivale a la ruptura de 1 mol de enlaces glicosídicos de la CMC por minuto.

**Experimento de adsorción.** Se utilizó el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria. Un total de 0,5 UI de actividad endoglucanasa fueron pasados por una columna que contenía 8,1 g de bagazo molido (tamaño de partícula 125  $\mu$ ) y estabilizada con tampón fosfato pH 6,5. El efluente fue colectado en fracciones a las que se les realizó análisis de actividad endoglucanasa. Después de pasada toda la muestra, la columna fue elevada con tampón fosfato pH 6,5, continuándose la determinación de la actividad enzimática en este efluente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Efectos de los parámetros físico-químicos.** Las figuras 1 y 2 muestran el efecto de la temperatura y el pH respectivamente, sobre la actividad CMC y PF. No se detectó actividad  $\beta$ -glucosidasa en el sobrenadante, lo cual coincide con resultados anteriores para esta cepa, que produce la  $\beta$ -glucosidasa unida a las células.<sup>1</sup>

En la figura 1 se observa cómo la actividad CMC varía más marcadamente con los cambios de temperatura que la actividad PF, la cual se mantiene relativamente estable entre 40 y 55 °C. Esto

significa un comportamiento diferente de las enzimas libres en el medio con relación a la actividad del cultivo total, en el cual la actividad PF se muestra más sensible a los cambios de temperatura, como se demostró en un trabajo anterior.<sup>8</sup> Sin embargo, el valor óptimo de temperatura para ambas actividades (50 °C) es semejante al encontrado anteriormente para las enzimas totales, al igual que los valores óptimos de pH (6,5 para CMC y 7,0 para PF).

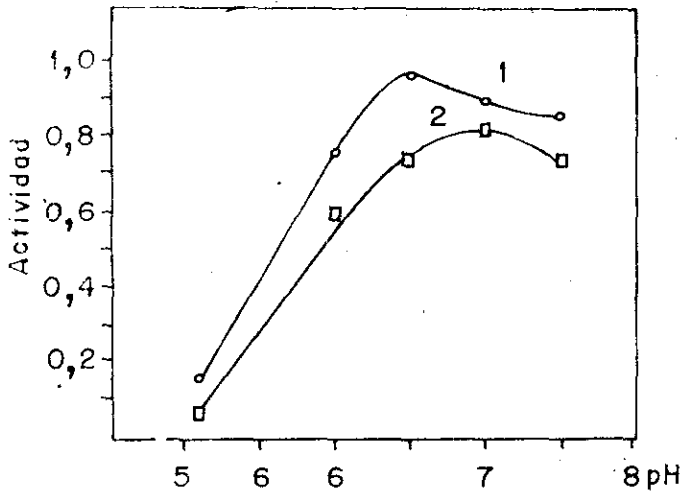


Fig. 1. Efecto del pH en la actividad extracelular  
1 Actividad CMC (U/ml · 10)  
2 Actividad PF (U/ml · 10<sup>2</sup>)

El comportamiento de la actividad CMC y PF con relación al pH, por otra parte, es muy semejante, como puede apreciarse en la figura 2.

Todo esto pone de manifiesto que en la distribución de enzimas entre las distintas fracciones (pared celular, SN, sustrato) se hace evidente la diferencia en algunos componentes unidos a la célula o al medio con relación a las enzimas libres en el SN, al mismo tiempo que existen características semejantes entre éstas y las enzimas unidas o adsorbidas.

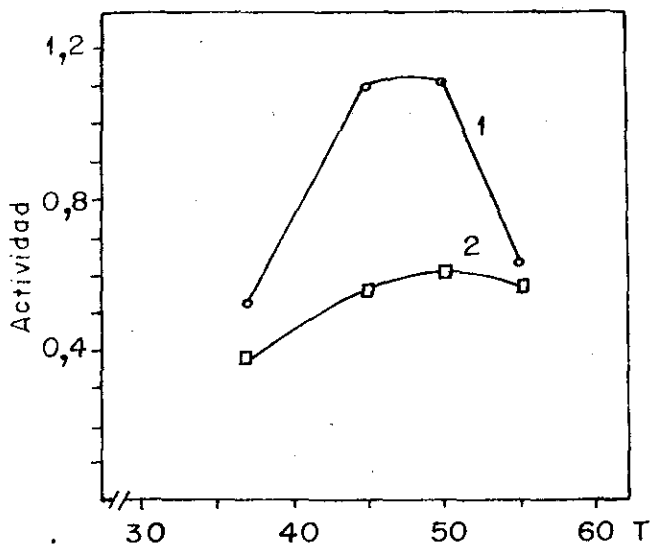


Fig. 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad extracelular  
1 Actividad CMC (U/ml · 10)  
2 Actividad PF (U/ml · 10<sup>2</sup>)

**Características de la actividad endoglucanasa.** La comparación del método viscosimétrico (medida directa de la actividad endoglucanasa) con la actividad CMC y PF por azúcares reductores ha sido sugerida por varios autores para distinguir entre las endoglucanasas.<sup>10-13</sup>

En la Fig. 3 se observa el efecto del pH sobre la actividad determinada por viscosimetría.

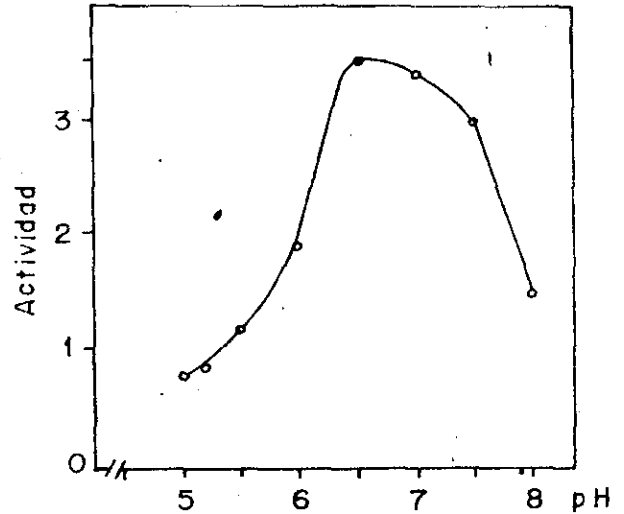


Fig. 3. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa (viscosimétrica) (U/ml · 40)

Adicionalmente, varias muestras fueron evaluadas simultáneamente para la actividad viscosimétrica y para CMC y PF (Fig. 4).

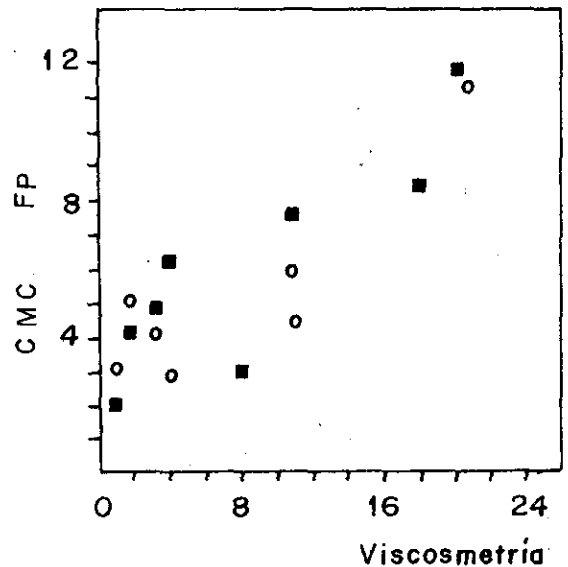


Fig. 4. Relación entre la actividad endoglucanasa (viscosimétrica) y la actividad CMC y PF  
Actividad CMC vs viscosimétrica  
Actividad PF vs viscosimétrica  
Actividad CMC y viscosimétrica: U/ml · 10<sup>2</sup>  
Actividad PF: U/ml · 10<sup>3</sup>

Los coeficientes de correlación lineal actividad viscosimétrica-CMC y actividad viscosimétrica-PF fueron 0,872 y 0,882 respectivamente, con desviaciones estándar de 0,05 y 0,001, las que pueden considerarse relativamente altas con respecto a los valores de actividad enzimática.

Estos resultados parecen indicar que en el ataque a la CMC y al papel de filtro no sólo están involucradas las endoglucanasas. Esto contrasta con los resultados de Bevers<sup>14</sup> para una cepa no identificada, quien encontró similitudes y buena correlación lineal entre la actividad viscosimétrica y la actividad CMC por azúcares reductores. Sin embargo, el presente esperado, debido a que es conocido que en la degradación de estos dos sustratos hasta azúcares reductores es necesaria la acción de los tres componentes de complejo celulasa.<sup>15,16</sup>

**Adsorción.** En la figura 5 se muestran los resultados del experimento de adsorción. El total de actividad endoglucanasa eluida de la columna fue de 0,136 UI lo cual representa el 27 % de la actividad inicial. Esto significa que un 73 % de la actividad ha permanecido unida a las partículas de bagazo, aun después del lavado con tampón y que el 27 % no se adsorbe o lo hace débilmente a este sustrato.

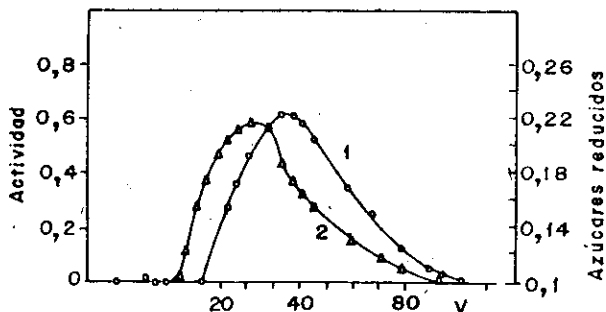


Fig. 5 Adsorción de las endoglucanasas extracelulares en una columna de bagazo

- 1 Actividad en la muestra eluida (UI/mL · 10<sup>2</sup>)
- 2 Azúcares reductores (mg/mL)
- 3 Volúmen total eluido (mL)

Klyosov<sup>13</sup> explicó resultados similares con celulasas de hongos basados en la existencia de dos tipos de celulasas: una de adsorción "reversible" y otras de adsorción fuerte o "irreversible".

En el presente caso se puede considerar, por tanto, la presencia de dos tipos de endoglucanasas extracelulares producidas por la cepa 11bc: una del tipo de "débil adsorción" o "reversible" y otra del tipo de "fuerte adsorción" o "irreversible", constituyendo

estas últimas el componente mayoritario (73 %) en el caso estudiado. Esto concuerda con la observación general de la necesidad de un estrecho contacto entre las celulasas y su sustrato para la degradación de la celulosa.<sup>17</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez H. and Volfová O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 134, 1984.
2. Osman H.G., Herrera A., Casado G., Llama F. y Bell A. *Ciencia Serie 5*, No. 9, 1972.
3. Rodríguez H., Enríquez A. and Volfová O. *Folia Microbiol.*, **28**, 163, 1983.
4. Dunlap C.E. Ph.D. Thesis. Dept. Chem. Eng., Louisiana State Univ., 1969.
5. Enríquez A. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1 423, 1981.
6. Rodríguez H. y Volfová O. *Revista de Ciencias Biológicas*, **15**, 54, 1984.
7. Nelson N. *Biol. Chem.*, **153**, 380, 1944.
8. Somogyi M. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19, 1952.
9. Ravinovitch M.L., Klyosov A.A. and Berezin I.V. *Blorg. Chem.*, **3**, 405, 1977.
10. Wood T.M. and Mc Crae S.I. *Biochem. J.*, **171**, 61, 1978.
11. Shoemaker S.P. and Brown R.D. *Biochem. Biophys. Acta*, **523**, 133, 1978.
12. Coughlan M.P. and Folan M.A. *Int. J. Biochem.*, **10**, 103, 1979
13. Klyosov A.A. *Enzyme Engineering-Future Directions*. L.B. Wigard, I.V. Berezin, A.A. Klyosov (eds), 83-165, Plenum Press, 1980.
14. Bevers J. *Agricultura*, **74**, 1, 1976.
15. Berghem L.E.R. and Pettersson L.G. *Eur. J. Biochem.*, **37**, 21, 1973.
16. Eriksson K.E. *Experientia*, **38**, 156, 1982.
17. Fan L.T. and Brardmore D.H. *Adv. Biochem. Eng.*, **14**, 101, 1980.

# OLEOZON

El aceite de girasol ozonizado presenta un marcado carácter germicida, según han demostrado las investigaciones realizadas en Cuba en los dos últimos años. Ha sido comprobada rigurosamente su eficacia contra hongos, bacterias y virus alojados en la superficie corporal, tanto de animales como de humanos. Para su aplicación se prepara también en forma de crema, lo que proporciona otra alternativa para determinadas aplicaciones tópicas.

Ambos productos en relación con el ozono gaseoso, presentan la ventaja de su estabilidad y a su vez, que pueden ser utilizados en pacientes ambulatorios sin requerirse su asistencia diaria a la consulta médica. La efectividad germicida de la crema y del aceite se garantiza por 6 meses, siempre y cuando se conserven a una temperatura inferior a los 5 grados Celsius

**PRODUCIDO Y EXPORTADO POR:  
PRODUCED AND EXPORTED BY:**



**Centro Nacional de Investigaciones Científicas**  
Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa  
Ciudad de La Habana, Cuba  
Apartados Postales 6880 y 6990  
Teléfono: 21 8066 Télex: 51 1582 CNIC CU