

## NUEVO METODO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD CELULASA CON CARBOXIMETIL-CELULOSA Y ROJO DE RUTENIO

**Juan Carlos Contreras-Esquivel<sup>1</sup>, S.M. Mejía-Córdova<sup>1</sup> y R.I. Ortiz-Basurto<sup>2</sup>**

---

<sup>1</sup>Sección Polisacáridos y Polisacaridasas. Laboratorio de Bioquímica de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Campus Saltillo. Apartado Postal 252 – Código Postal 25000. Saltillo, Coahuila, México.<sup>2</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Tecnológica de Tecamachalco, El Montecillo, Tecamachalco Puebla, Puebla, México.

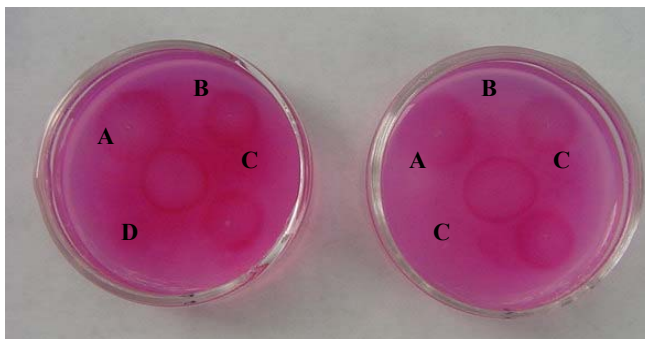
---

**Introducción.** Tradicionalmente, la sacarificación de la piña de *Agave spp.* es llevada a cabo mediante el “tatemado” o autoclavado. Otra alternativa es el uso de enzimas para degradar específicamente los polisacáridos presentes en las paredes celulares de la piña de agave. Los polisacáridos presentes en la piña de agave son la celulosa, hemicelulosa, y sustancias pécticas. Por consiguiente este material requiere un conjunto de polisacaridasas a fin de degradar estos polisacáridos a azúcares fermentables. La celulasa es una enzima clave en la degradación de celulosa en las plantas de agave. La endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, también denominada endocelulasa, carboximetil-celulasa o C<sub>x</sub> celulasa. La detección de actividad celolítica, cuando deben ser ensayadas colecciones numerosas de hongos filamentosos o preparados enzimáticos, es una rutina dificultosa si se van a utilizar métodos convencionales. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una nueva técnica de placa para detectar actividad celulasa.

**Materiales y métodos.** Se recibieron diversos preparados comerciales (A, B, C, D) enzimáticos con actividad polisacaridasa. Se compró rojo de rutenio y CM-celulosa en Sigma-Aldrich (México). La celulasa purificada fue adquirida de Megazyme, Irlanda. Los demás reactivos analíticos fueron comprados en CTR (Monterrey, México). Se preparó una solución de carboximetilcelulosa (CMC) en buffer ácido cítrico-citrato de sodio 50 mM, pH 4.5 al 0.25% (p/v). Luego se agregó agarosa en una concentración del 1% (p/v) y la mezcla se puso a ebullición durante 1 minuto. Posteriormente, la solución fue vaciada a cajas de petri y se dejaron solidificar sobre una superficie plana. En cada caja se hicieron posillos sobre el sistema gelificado CMC-agarosa para posteriormente aplicar 10  $\mu$ l de extracto de enzima diluido apropiadamente. Las placas fueron incubadas durante varias horas a 37°C. Después del tiempo de incubación la caja fue lavada 3 veces con agua destilada y luego se agregaron 5 ml de una solución de rojo de rutenio al 0.05% (p/v). La solución de rojo de rutenio fue agitada durante 10 minutos en un agitador y luego descartada. La caja de petri fue lavada tres veces con agua destilada durante 20 minutos. La actividad celulasa se evaluó relacionando el diámetro del halo, tomando como patrón una enzima con actividad celulasa purificada. La zona donde no fue hidrolizada la CM-celulosa se observó un color rojo intenso y la zona donde se presentó hidrólisis se observaron halos claros.

**Resultados y discusión.** La detección de actividad celulasa en placas de agarosa con CMC y etiquetado con rojo de rutenio permitió observar halos claros correspondientes a la degradación del biopolímero. En la Figura 1 se muestra una fotografía de las placas de CMC-agarosa, incubadas con extracto de enzima, y etiquetadas con rojo de rutenio. Puede observarse claramente que la muestra A, B, y C presentaron actividad celulasa, mientras que la muestra D no presentó dicha actividad. La presencia de actividad celulasa fue corroborada en los tres preparados por método de Somogyi-

Nelson. Para corroborar la eficacia del ensayo se utilizó una endo-ceulasa la cual fue aplicada sobre la placa de agar-CMC a diferentes concentraciones. Se observaron halos bien definidos como los presentados en la Figura 1. La actividad poligalacturonasa es detectada rutinariamente en placa con ácido poligalacturónico-agarosa y luego una tinción con rojo de rutenio<sup>1</sup>. Recientemente, Contreras-Esquivel y Voget<sup>2</sup> desarrollaron un nuevo método de detección de actividad ramnogalacturonasa con rojo de rutenio.



**Figura 1** Placas de CMC-agarosa teñidas con rojo de rutenio luego de aplicar soluciones de enzimas comerciales (por duplicado). A-D = preparados comerciales de enzimas.

Rescigno y col.<sup>3</sup> desarrollaron un método de detección de actividad celulasa. El método consiste en etiquetar a la CMC con rojo de rutenio, posteriormente el polisacárido etiquetado es precipitado con etanol y deshidratado. El polvo color violeta es luego utilizado para preparar una suspensión que es utilizada para el análisis de actividad celulasa. En nuestro caso, el método propuesto consiste en hacer reaccionar la celulosa con la CMC y luego es aplicado el colorante, la zona donde reaccionó la enzima se presentan halos claros. El rojo de rutenio produce una reacción espontánea la cual se basa en la interacción de la CMC cargada negativamente y el complejo colorido catiónico. Los fragmentos de CMC liberados por la enzima son eliminados del gel de agarosa a través de los lavados con agua destilada. Los halos claros corresponden a la zona donde la enzima reaccionó mientras que la CMC no hidrolizada es coloreada. La actividad celulasa tradicionalmente es detectada a través del sistema gelificado agarosa-CMC y luego teñido con rojo congo<sup>4</sup>. El contraste en la placa de este método, puede ser incrementado al aumentar la concentración de CMC. Este principio podría ser utilizado para detectar un sin número de polisacaridasas, considerando únicamente tener disponible un CM-polisacárido correspondiente para cada enzima; por ejemplo, CM-quitosano, CM-arabinano, CM-glucomanano, etc.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo financiero recibido por la Fundación Produce Puebla, A.C. para desarrollar el proyecto sobre aprovechamiento de agave.

#### **Bibliografía**

1. Ruijsenaars, H.J.; Hartmans, S. (2001). Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **55**:143-149.
2. Contreras-Esquivel, J.C.; Voget, C.E. (2001). Detection of rhamnogalacturonan degrading enzymes in polyarylamide gels. 11th World Congress Food Science and Technology, April 22-27, Seoul, Korea.
3. Rescigno, A.; Rinaldi, A.C.; Curreli, N.; Olianias, A.; Sanjust, E. (1994). A dyed substrate for the assay of endo-1,4- $\beta$ -glucanases. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **28**, 123-9
4. Carder, J.H. (1986). Detection and quantification of cellulase by congo red staining of substrate in a cup-plate diffusion assay. *Anal. Biochem.*, **153**, 75-79.