

SEPARACION DE LAS CELULASAS EXTRACELULARES DE *CELLULOMONAS* POR CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

H. Rodríguez y O. Volfová

Departamento de Microbiología Industrial, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba e Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias, Praga, Checoslovaquia

Recibido: 18 de diciembre de 1985

Recibido: 3 de Abril de 1986

ABSTRACT. The separation of the extracellular cellulases from *Cellulomonas* sp. Ilbc grown on sugar cane bagasse pith was carried out by means of high performance liquid chromatography. Samples were analysed both from exponential and stationary phase of growth. The eluted fractions were monitored by the evaluation of absorbance at 280 and 254 nm, pH, conductivity and cellulolytic activity. Four main peaks were obtained showing cellulolytic activity. It was found that the composition of the extracellular cellulases presents certain variations with the cultivation conditions and growth phase of the culture. Most of the peaks exhibited both carboxymethylcellulase and filter paper activity, due to the unespecificity of these enzymatic assays.

RESUMEN. Se realizó la separación de las enzimas celulasas de *Cellulomonas* sp. Ilbc cultivada en meollo de caña, empleando la cromatografía líquida de alta presión. Se analizaron muestras tomadas en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento. Las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica fueron evaluadas mediante la absorbancia a 254 y 280 nm, el pH, la conductividad y la actividad celulolítica. Se obtuvieron 4 picos fundamentales con actividad celulolítica. Se observó que la composición de las celulasas extracelulares en estos cultivos presentó ciertas variaciones en dependencia de las condiciones de cultivo y fase de crecimiento. En la mayor parte de los picos se detectó tanto actividad carboximetilcelulasa como actividad papel de filtro debido a la inespecificidad del método de determinación enzimática.

INTRODUCCION

La caracterización del complejo enzimático involucrado en la degradación de los materiales lignocelulósicos es de suma importancia para el conocimiento de estos procesos.

El sistema celulasa consiste fundamentalmente de 3 tipos de enzimas: La exo- β -1,4-glucanasa, la endo- β -1,4-glucanasa y la β -glucosidasa. El número de componentes del complejo, sin embargo, varía el microorganismo, las condiciones de cultivo y el sustrato utilizado, entre otros factores¹.

En bacterias se ha descrito la separación de algunos componentes del complejo en varias especies^{2,3,4}. En los últimos años, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) combinada con la determinación de la actividad enzimática en las fracciones obtenidas, se ha evidenciado como un procedimiento eficiente y rápido para la separación de los componentes del sistema celulasa^{5,6}.

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización por la HPLC de las celulasas extracelulares de *Cellulomonas* sp. Ilbc cultivada en meollo de caña.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo. La cepa de *Cellulomonas* sp. Ilbc fue cultivada en zaranda y en fermentador a 32 °C y pH 6,5 en meollo 1 % como fuente de carbono. Los medios de cultivo han sido descritos en un trabajo precedente⁷.

Preparación de la muestra. Las muestras fueron tomadas en la fase exponencial de un cultivo en zaranda y en la fase estacionaria de un cultivo fermentador, después de lo cual fueron filtradas empleando fritas de porosidad No. 1. La suspensión celular fue centrifugada a 14 000 g durante 10 min.

Los sobrenadantes fueron concentrados por ultracentrifugación a 4°C (Presión de N entre 0,2 y 0,3 MPa) siendo dializados por 24 h en agua destilada a 4°C y posteriormente liofilizados.

Los liofilizados fueron conservados a 4°C hasta su empleo en la cromatografía.

Separación de las enzimas. La HPLC se basó en procedimiento establecido por Hostomská y Mikes⁵, utilizando el derivado iónico del gel Spheron DEAE-1 000 (producido por Lachema, Brno, Checoslovaquia).

La cromatografía se realizó en una columna de vidrio de (0,2 • 0,008) m con una presión entre 0,5 y 2,5 MPa. La velocidad de flujo a través de la columna fue de 2,0 mL/min para la muestra del fermentador y de 1,5 mL/min la muestra del cultivo en zaranda. Las fracciones fueron colectadas a intervalos de 60 s.

La muestra consistió en 40 mg de la preparación liofilizada, disueltos en 0,5 mL de "buffer" A, la que fue eluida gradualmente de la forma siguiente:

- 10 mL del "buffer" A
- 15 mL del "buffer" A + 15 mL del "buffer" B
- 30 mL del "buffer" B + 30 mL del "buffer" C

"Buffers":

A ácido cítrico 0,005 mol/L, NaOH, pH 5,0 x = 0,5 mS

B ácido cítrico 0,100 mol/L, NaOH, pH 5,0 x = 8,0 mS

C ácido cítrico 0,250 mol/L, NaOH NaCl 1 mol/L, pH 5,0, x = 6,0 mS

El proceso de separación cromatográfica fue evaluado continuamente por la medición de la absorbancia a 254 y 280 nm, el pH y la conductividad en las muestras colectadas. La proteína en las fracciones fue estimada por el método de Kalcvar⁹, según la expresión:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{254}$$

Determinación de la actividad enzimática. Las actividades papel de filtro (PF), carboximetilcelulasa (CMC) y β -glucosidasa se determinaron según el método descrito con anterioridad⁹. Ellas se expresan en UI (μ mol del producto/min).

La concentración de proteína en los liofilizados fue determinada por el método de Lowry y colaboradores¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad celulolítica de las muestras liofilizadas antes de la separación cromatográfica se muestra en la Tabla I. Para la determinación de la actividad se disolvieron 60 mg del liofilizado en 10 mL de agua destilada para la muestra de zaranda y 50 mg en 10 mL para la muestra del fermentador.

TABLA I
Actividad celulolítica de las muestras liofilizadas antes de la separación cromatográfica

Origen de la muestra	Carboximetilcelulasa		Papel de filtro		β -glucosidasa	
	UI/mL (10^3)	UI/mg* (10^3)	UI/mL (10^3)	UI/mg* (10^3)	UI/mL (10^3)	UI/mg* (10^3)
Zaranda	67,6	13,5	41,2	8,3	0	0
Fermentador	10,2	1,7	18,9	3,1	0	0

* Actividad por mg de células en base a peso seco

Se puede apreciar una actividad específica menor en el caso del cultivo en el fermentador, lo cual es lógico, ya que se trata de un cultivo en fase estacionaria, donde la lisis celular produce una mayor liberación de proteínas al medio.

No se detectó actividad β -glucosidasa en los sobrenadantes, lo cual coincide con resultados obtenidos anteriormente⁹ sobre la localización de esta enzima unida a la pared celular en esta cepa. Los resultados de la separación cromatográfica para la muestra de cultivo en zaranda se resumen en la Tabla II.

Los resultados de la determinación de las actividades CMC y PF en cada una de estas fracciones se ilustran en la figura 1.

Como puede observarse, se obtuvieron 4 picos con actividad CMC y 3 picos con actividad PF.

De los picos con actividad CMC, tres exhiben también una apreciable, aunque menor, actividad PF.

La Tabla III muestra los resultados obtenidos al evaluar la conductividad, concentración de proteínas y el pH para las fracciones correspondientes a la muestra del cultivo en fermentador.

La representación gráfica de las actividades PF y CMC de las fracciones se muestran en la figura 2.

TABLA II
Parámetros del proceso de separación cromatográfica para la muestra de cultivo en zaranda

Fracción	pH	Conductividad (mS)	Proteína (mg/mL)	Actividad enzimática	
				PF (UI/mL)	CMC (10^3)
0	5,75	0,85	0,051	0,0	0,0
1	5,26	1,02	—	54,4	81,2
2	—	—	0,222	47,6	40,8
3	5,34	0,92	0,195	0,0	19,6
4	—	—	0,068	10,9	26,8
5	5,22	0,78	0,032	0,0	42,0
6	—	—	0,011	0,0	13,2
7	5,24	0,79	0,008	17,7	48,0
8	5,24	0,79	0,087	15,0	80,4
9	5,92	4,50	0,158	29,9	84,0
10	—	—	0,229	0,0	46,6
11	5,99	5,70	0,137	12,2	62,4
12	—	—	0,240	0,0	94,8
13	6,16	5,80	0,378	50,3	63,6
14	—	—	0,336	1,36	43,2
15	5,60	10,50	0,268	21,8	16,0
16	—	—	0,204	1,36	10,4
17	5,14	15,0	0,167	8,2	14,9
18	—	—	0,171	15,0	12,0
19	4,97	22,3	0,170	0,0	9,6
20	—	—	0,162	4,1	0,0
21	4,96	31,0	0,333	2,7	0,0
22	—	—	0,687	1,36	0,0
23	4,96	38,9	0,245	0,0	0,0
24	—	—	0,257	0,0	0,0
25	4,95	44,8	0,482	0,0	0,0
26	—	—	0,291	0,0	0,0

PF papel de filtro
CMC carboximetilcelulasa

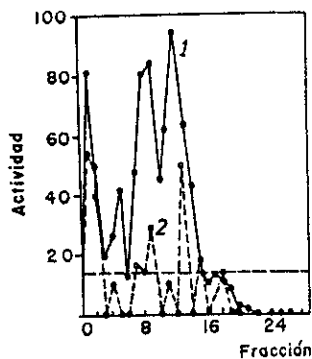


Fig. 1.

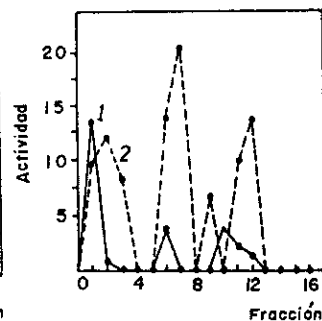


Fig. 2.

Fig. 1. Cromatograma obtenido por HPLC correspondiente a las celulasas extracelulares de *Cellulomonas* sp. Ilbc, provenientes de un cultivo en zaranda sobre meollo de caña, en fase exponencial de crecimiento

1. Actividad carboximetilcelulasa en las fracciones (UI/mL $\cdot 10^3$)
2. Actividad papel de filtro en las fracciones (UI/mL $\cdot 10^3$)

Fig. 2. Cromatograma obtenido por HPLC correspondiente a las celulasas extracelulares de *Cellulomonas* sp. Ilbc, provenientes de un cultivo en fermentador sobre meollo de caña, en fase estacionaria de crecimiento

1. Actividad carboximetilcelulasa en las fracciones (UI/mL $\cdot 10^3$)
2. Actividad papel de filtro en las fracciones (UI/mL $\cdot 10^3$)

En este caso se pueden observar 3 picos con actividad CMC, dos de ellos con valores relativamente bajos de actividad y 4 picos de actividad PF.

TABLA III
Parámetros del proceso de separación cromatográfica para la muestra del cultivo en el fermentador

Fracción	pH	Conductividad (mS)	Proteína (mg/mL)	Actividad enzimática (UI/mL 10 ³)	
				PF	CMC
0	5,78	—	0,000	0,0	0,0
1	5,76	1,06	0,035	9,5	13,6
2	—	—	0,094	12,2	0,8
3	5,34	0,78	0,030	8,16	0,0
4	—	—	0,000	0,0	0,0
5	5,40	0,71	0,007	0,0	0,0
6	—	—	0,005	13,6	3,6
7	5,85	2,90	0,050	20,4	0,0
8	—	—	0,036	0,0	0,0
9	6,14	6,10	0,236	6,8	0,0
10	—	—	0,480	0,0	4,0
11	6,31	11,3	0,269	9,5	2,4
12	—	—	0,252	13,6	1,6
13	6,41	15,9	0,169	0,0	0,0
14	—	—	0,192	0,0	0,0
15	5,15	18,0	0,155	0,0	0,0
16	5,07	21,3	0,160	0,0	0,0

PF papel de filtro

CMC carboximetilcelulasa

El primer pico de actividad CMC contiene una alta actividad PF. Por su parte, otros 2 picos de actividad PF presentan bajos valores de actividad CMC.

Al parecer, como se aprecia en las figuras 1 y 2, la composición de las celulasas extracelulares de esta cepa presenta ciertas variaciones en dependencia del estado fisiológico del cultivo.

Los cultivos en fase estacionaria muestran una actividad PF mayor con relación a la actividad CMC, al contrario de lo observado en las muestras de la fase exponencial.

A la vez, al parecer, una forma de actividad CMC

col.¹² en la separación de celulasas de *Thermoactinomyces sp.* por focalización isoelectrica y por Saddler y Khan¹³, para las enzimas de *Acetivibrio cellulolyticus*, entre otros.

Este hecho, parece originarse más que por una separación imperfecta, por la inespecificidad del método utilizado para la determinación de la actividad enzimática el que involucra la determinación de los azúcares reductores producidos a partir del PF y la CMC. En realidad, éstos constituyen el producto tanto de la acción de uno o varios componentes indistintamente, aunque cada tipo de enzima actuará ciertamente con diferente eficiencia.

En cuanto a la cantidad de componentes obtenida, se pudo observar un número de enzimas relativamente pequeño.

Algunos autores, utilizando otros métodos de separación, han encontrado para algunas especies bacterianas, una cantidad mayor de componentes. Sin embargo, se ha determinado que éstos no son más que productos de fraccionamiento de los componentes fundamentales, quizás durante el proceso mismo de separación, debido a la acción de proteasas o por la pérdida de la parte glicosídica, como fue demostrado por Yoshikawa y col.¹⁴ para las *Pseudomonas* y por Langosford y col.¹ para las *Cellulomonas*.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede plantear que la HPLC resultó un método apropiado para la separación de las celulasas de *Cellulomonas*, así como para el estudio del efecto de diferentes factores, tales como la edad y las condiciones del cultivo, sobre las variaciones en los componentes del sistema enzimático.

BIBLIOGRAFIA

- Langosford M. L., Gilkes N. R., Wakardmk W. W., Kilburn D. G., Miller R. C. and Warner R. A. J. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1 367, 1984.
- Berguin P. and Eisen H. *Eur. J. Biochem.* 87, 525, 1978.
- Yamane K., Susuki H., Hirotsani., Osawa H. and Nisizawa H. *J. Biochem.* 67, 9, 1970.
- Ramasamy R. and Verachter H. *J. Gen. Microbiol.* 117, 181, 1980.
- Hostomská Z. and Mikeš O. *J. Chromatograph.* 267,