

DETECCION DE ACTIVIDAD PECTOLITICA EN EL CULTIVO DE LA CEPA GR4 DE *Rhizobium meliloti*

P. Martínez M.*, G. Pérez G.

Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490. Bogotá, Colombia

Keywords: Pectic Enzymes, Pectolytic activity, Rhizobial pectinases, Rhizobial hydrolases, *Rhizobium meliloti*

RESUMEN

Se ensayaron varios métodos para la obtención y purificación parcial de pectinasas a partir de sobrenadante del cultivo de la cepa GR4 de *Rhizobium meliloti*. Se describe el método con el cual se obtuvo el sobrenadante en el que se logró detectar la presencia de actividad pectolítica. Empleando una muestra comercial de enzimas pécticas (Pectinex, Novo) se estudió la estabilidad de la actividad enzimática durante el proceso de purificación parcial establecido; se observó una pérdida gradual de la actividad en función del tiempo de duración del proceso.

ABSTRACT

Several methods for obtaining and partially purifying pectinases from the supernatant of a *R. mel.* strain GR4 liquid culture were tested. The method in which pectolytic activity was detected in the supernatant is described. The stability of the enzyme(s) during the partial purification was studied using a commercial source of pectinases (Pectinex, Novo). A gradual loss of enzymatic activity was observed attributable to the prolonged time needed for the process.

INTRODUCCION

El establecimiento de una simbiosis con el *Rhizobium* en las raíces de las leguminosas conducente a la fijación de Nitrógeno, involucra una compleja secuencia de eventos como son, a grosso modo:

- Mutuo reconocimiento hospedero (leguminosa)— simbiote (*Rhizobium*).
- Penetración de la pared celular a nivel de los pelos radiculares del hospedero.
- Formación de nódulos, estructuras en las cuales ocurre la fijación de nitrógeno (1, 2).

Aunque el mecanismo exacto de penetración del pelo radicular del hospedero no se ha establecido, existen varias hipótesis para explicar el fenómeno. Una de di-

estas hipótesis sostiene la participación de enzimas pectolíticas y celulolíticas, que degradan las paredes celulares de las plantas, en el proceso de penetración del *Rhizobium* dentro de las células de los pelos radiculares de las leguminosas (1). Entre las evidencias que apoyan la anterior hipótesis se encuentran los trabajos sobre producción de enzimas hidrolíticas tanto por parte de las raíces de las leguminosas (2, 3), como por parte de algunas especies de *Rhizobium* (2, 4-6); además hay estudios estructurales que muestran la degradación de la pared celular del pelo radicular de las leguminosas, en el sitio de origen de la infección (7).

La participación de enzimas pectolíticas y celulolíticas en el proceso de penetración del *Rhizobium* dentro de las raíces de las leguminosas parece razonable, puesto que sus paredes celulares están constituidas por estructuras altamente complejas, donde intervienen pectinas y otros polisacáridos cuya estructura está siendo activamente estudiada por diversos autores (8-11). Sin embargo, existe controversia respecto al posible papel de las enzimas hidrolíticas en el proceso de infección de las leguminosas por el *Rhizobium*, debido a los resultados negativos obtenidos en algunos casos, cuando se ha intentado detectar actividad hidrolítica bien sea en las raíces de las leguminosas, o en cultivos de la bacteria (1, 12-14). No obstante, si se considera que la infección de las leguminosas por el *Rhizobium* es un proceso delicadamente balanceado, puede pensarse que una alta actividad de enzimas hidrolíticas, localizada en el sitio de la infección podría conducir a la plasmólisis del pelo radicular y subsecuentemente a una infección abortiva (4, 6). Por el contrario, bajos niveles de actividad hidrolítica podrían ser suficientes para que ocurriese la penetración de la pared celular de los pelos radiculares, sin que ocurra destrucción de las células (12, 15). Esto hace pensar, que algunos de los resultados negativos obtenidos al intentar detectar actividad hidrolítica, podrían deberse a una baja sensibilidad de las técnicas utilizadas (1).

De otro lado la acumulación de evidencia sobre la producción de enzimas hidrolíticas por parte del *Rhizobium* (2,4-6, 12), junto con la interpretación del proceso de infección hecho por Callaham y Torrey (7), sugiere la posibilidad de que las enzimas hidrolíticas involucradas en el proceso de infección, sean de origen rizobial y no procedentes de la planta (5, 7, 15). Por lo tanto, si se desea establecer el papel de dichas enzimas rizobiales en el proceso de infección de las leguminosas, primero es necesario saber si las diferentes especies de *Rhizobium* tienen la capacidad de producir tales enzimas.

La producción de enzimas pectolíticas y/o celulolíticas, capaces de degradar las paredes celulares de las plantas se reporta para *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *R. leguminosarum* bv *phaseoli*, *Bradyrhizobium japonicum* y *R. spp. (cowpea)* (2, 4-6, 12); pero no se encuentran datos sobre la producción de estas enzimas por parte de *Rhizobium meliloti*. No obstante, los resultados reportados por Martínez - Molina y Olivares sugieren positivamente que durante los primeros pasos de la infección de las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*) por la cepa GR4 de *Rhizobium meliloti*, deben estar presente estas enzimas.

Para el presente estudio se escogió la cepa GR4 de *R. meliloti*, con el fin de esta-

blecer si en efecto esta secreta al medio de cultivo enzimas con actividad pectolítica que permitan explicar el comportamiento observado por Martínez - Molina y Olivares (15) y contribuir así al estudio del posible papel de las enzimas rizobiales en el proceso de infección de las leguminosas por el *Rhizobium*.

METODOS

1. Material Biológico y Medio de Cultivo

Material Biológico: Para el presente estudio se utilizó la cepa GR4 de *R. meliloti*. Planta hospedera: *Medicago sativa*; país de origen: España; fuente: Laboratorio de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, Granada.

Medio de Cultivo: Para el crecimiento de la bacteria se empleó el medio líquido AMA: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 g; KH_2PO_4 3,0 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,64g; extracto de levadura 1,5 g; pectina NF 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g; Fe SO_4 1,1 mg; CaCl_2 2,0 mg; H_3BO_3 0,1 mg; MnSO_4 0,1 mg; MnSO_4 0,1 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,17 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,40 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.19 mg; se completó a un litro con agua destilada y se ajustó finalmente el pH a 7.0.

2. Medida de la actividad pectolítica

La actividad enzimática se determinó por el método viscosimétrico estandarizado por Pérez y Martínez (Métodos II(VI) y II(V2)) (16).

La mezcla de reacción contenía pectina NF al 0,5% (p/v) en solución tampón de acetato de sodio 0,1M pH 5,0 y enzima a una temperatura de 30°C. En el blanco de reacción se utilizó la enzima previamente inactivada por calentamiento a 90°C y la composición de la mezcla fue análoga a la anterior. Para la determinación de V_s se empleó solución tampón de pH 5,0 en lugar de sustrato y enzima inactivada utilizando el mismo volumen empleado en la mezcla de reacción y el blanco. Los tiempos de flujo de la mezcla de reacción (V_t) y el blanco (V_o) se midieron a iguales intervalos de tiempo durante determinado período de reacción. Como patrón de actividad pectolítica se utilizó la mezcla de enzimas pécticas Pectinex (Novo).

3. Establecimiento del valor mínimo de porcentaje de caída de la viscosidad aceptado como indicativo de actividad pectolítica.

Para establecer el valor mínimo de porcentaje de caída de la viscosidad (%oA) que se acepta como indicativo de actividad pectolítica en el presente estudio, se siguió el curso de la degradación enzimática de la pectina por acción de la Solución b de Pectinex*, determinando el %oA cada 15 minutos durante 120 minutos de reacción a 30°C en el viscosímetro V2. la mezcla de reacción contenía 12 mL de pectina y 0,41 mL de Solución b de Pectinex. Para el blanco de reacción y V_s se emplearon mezclas análogas a la anterior de acuerdo a lo descrito en 2.

* Solución b de Pectinex: Solución patrón de enzimas pécticas cuya concentración de proteína es de 6,7 $\mu\text{g/ml}$.

4. Establecimiento del Método para la Obtención y Purificación Parcial del Sobrenadante del Cultivo Bacterial.

Para establecer el procedimiento de obtención y purificación parcial del sobrenadante del cultivo bacterial, en el que se busca la presencia de actividad pectolítica, se ensayaron varios métodos:

- Obtención del sobrenadante del cultivo bacterial sin posterior concentración del sobrenadante (Sobrenadante SP-1).
- Eliminación de la pectina residual presente en el sobrenadante del cultivo bacterial por filtración a través de Sephadex G-200 y posterior concentración del sobrenadante 20 veces (Sobrenadante SP-2).
- Eliminación de la pectina residual presente en el sobrenadante del cultivo bacterial por precipitación con Bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA), dilución del BCTA hasta $5,8 \times 10^{-4}$ mg/ml, y posterior concentración del sobrenadante 20 veces (Sobrenadante SP-3).
- Eliminación del BCTA del sobrenadante del cultivo bacterial por filtración a través de Sephadex G-50 sin efectuar una posterior concentración del sobrenadante (Sobrenadante SP4).

En todos los casos se partió de 50 mL. de cultivo bacterial y la actividad pectolítica del sobrenadante obtenido se determinó por el método viscosimétrico (Método II(VI) (16,17).

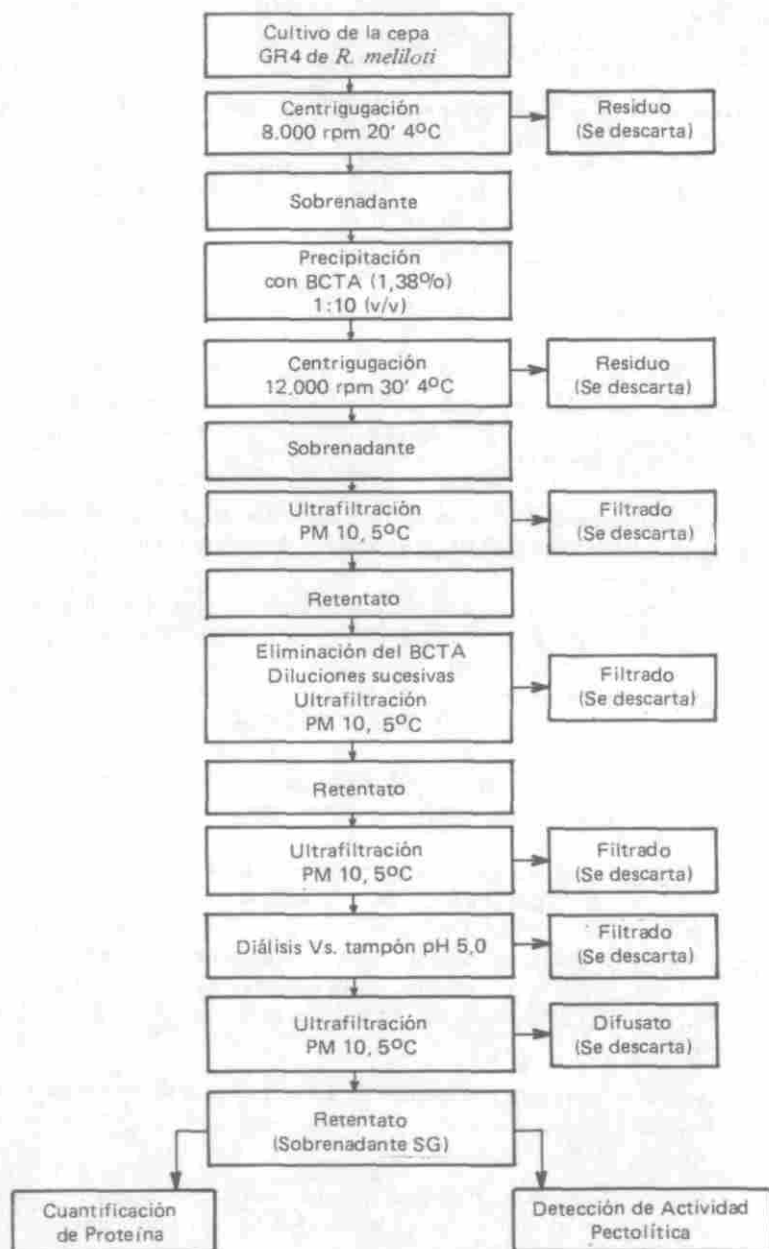
4.1. Determinación del efecto del BCTA y la azida de sodio sobre la actividad de la solución b de Pectinex.

Para estudiar el efecto de $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL. de BCTA y de 1 mg/mL. de azida de sodio sobre la actividad de la enzima patrón, se preparó la Solución b de pectinex con cada uno de estos reactivos a las concentraciones indicadas, e inmediatamente después de preparadas se determinó su actividad por el método viscosimétrico (Método II (V2)) (16) siguiendo el procedimiento indicado en el numeral 3.

4.2. Obtención y purificación parcial del sobrenadante del cultivo (SG-1) para La detección de actividad pectolítica

De acuerdo a los resultados logrados con el método utilizado para la obtención del sobrenadante SP-3 (numeral 2.4) (17) se realizaron algunas modificaciones para establecer el método de obtención y purificación parcial del sobrenadante del cultivo en el que se busca la presencia de actividad pectolítica (sobrenadante del cultivo bacterial a gran escala SG-1). El procedimiento de *R. meliloti* se realizó en un litro y medio AMA (17). La precipitación con BCTA se realizó durante 60 minutos a 4°C y al sobrenadante proveniente de esta precipitación se le adicionó azida de sodio (1mg/ml.);

Esquema 1
OBTENCION Y PURIFICACION PARCIAL DE LOS SOBRENADANTES
SG-1 Y SG-2



5. Cuantificación de Proteínas

La cuantificación del contenido de proteína de la solución de enzima patrón y de los sobrenadantes bacteriales estudiados se realizó por el método de Lowry (18).

6. Determinación de actividad pectolítica en los sobrenadantes SG-1 y SG-2

Se realizó por el método viscosimétrico (Método II(V2)) (16) en las condiciones descritas en 2. Para SG-1 la mezcla de reacción contenía 12 mL de pectina y 1,0 mL de sobrenadante, contra un blanco de reacción de composición análoga. La medida de V_s se efectuó con solución tampón y extracto enzimático (sobrenadante) inactivado. Los tiempos de flujo de la mezcla de reacción (V_t) y el blanco (V_o) se midieron durante 24 horas de reacción.

Para SG-2 (Ensayo duplicado de SG-1) la mezcla de reacción contenía 11,74 mL de pectina y 1,26 mL de sobrenadante. El blanco de reacción y V_s se prepararon como se indica en 2 y la determinación de los tiempos del flujo (V_t y V_o) se efectuó durante 26,5 horas.

7. Seguimiento de la Actividad de la Solución b de Pectinex durante el proceso de purificación parcial empleado con los sobrenadantes SG.

Con el fin de realizar un seguimiento de la actividad de la enzima patrón a partir del momento en que se adiciona el BCTA para la precipitación de pectina y durante los procesos de concentración y posterior lavado del detergente, a que se someten los sobrenadantes bacteriales SG, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el Esquema 2 (E2). El lavado del BCTA se realizó mediante sucesivas diluciones con solución tampón pH 5,0, hasta lograr una concentración final estimada de $5,4 \times 10^{-4}$ mg/mL. El retentato se concentró hasta lograr el volumen de muestra con el que se inició el proceso de lavado.

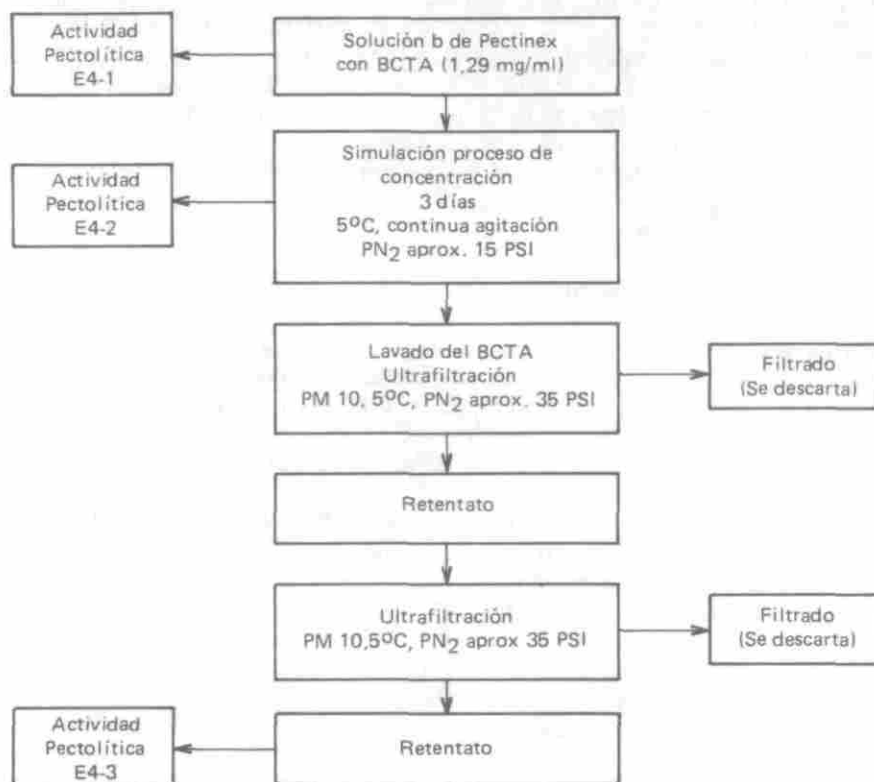
El seguimiento de la actividad de la Solución b de Pectinex durante el procedimiento E2, se realizó por segunda vez en iguales condiciones, efectuando la simulación del proceso de concentración durante un período de 10 días. En este ensayo, al igual que en el caso anterior, se realizaron las determinaciones de la actividad enzimática una vez finalizados cada uno de los procesos como se indica en el Esquema 2. La duración del proceso de lavado del BCTA en los dos ensayos fue de 6 días.

7.1. Determinación de la actividad de la Solución b de Pectinex durante el Proceso E2.

La actividad de la Solución b de Pectinex, en cada uno de los puntos señalados en el esquema 2 con las convenciones E2-1 a E2-3 y sus equivalencias a 10 días, se

Esquema 2

SEGUIMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA SOLUCIÓN b DE PECTINEX DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACION PARCIAL EMPLEADO CON LOS SOBRENADANTES SG



Cuando la simulación del proceso de concentración se realiza durante 10 días se sigue el mismo proceso y las equivalencias en cuanto a las soluciones ensayadas son las siguientes:

3 días	10 días
E2-1	E2-1
E2-2	E2-4
E2-3	E2-5

determinó por el Método II(V2) siguiendo el procedimiento indicado en el numeral 2.3.

7.2. Determinación de la actividad hemolítica de la Solución b de Pectinex durante el Proceso E2.

Con el fin de chequear la eliminación del BCTA durante el proceso de lavado de éste, se determinó la actividad hemolítica de la Solución b de Pectinex en cada uno de los puntos E2-1 a E2-5 del proceso E2: A alícuotas de 0,5 mL de muestra se les añadió NaCl sólido hasta obtener una concentración aproximada del 1% en NaCl, se agitó la solución y se adicionaron 0.5 mL de suspensión al 4% de eritrocitos humanos. En el blanco se procedió de la misma manera utilizando 0,5 mL de la solución tampón en la que se encuentran preparadas las muestras. El grado de hemólisis se observó inmediatamente preparada la muestra y al cabo de 30 y 90 minutos. Como control de la eliminación del BCTA, se determinó la actividad hemolítica sobre una alícuota de la Solución b de Pectinex con $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL de BCTA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio de Cultivo: Para el cultivo de la bacteria se empleó el medio líquido AMA, el cual contiene pectina como principal fuente de carbón, debido a que en este medio se logró un buen crecimiento de la cepa lo cual es de vital importancia cuando se desea detectar actividad pectolítica en un cultivo bacterial, dada la posibilidad de que dichas enzimas sean de tipo inducible (17).

Establecimiento del valor mínimo de porcentaje de caída de la viscosidad aceptado como indicativo de actividad pectolítica. En los trabajos realizados por Lillich y Elkan (13), Bonish (19) y Ljunggren y Fahraeus (20), sobre la presencia de enzimas pécticas tanto en cultivos de *Rhizobium* como en extractos y exudados de raíces de leguminosas, se reportan diferentes valores mínimos de porcentaje de reducción de la viscosidad del sustrato aceptados como indicativos de actividad pectolítica, dependiendo de las condiciones de trabajo. Es así como Lillich y Elkan (13) aceptan como mínimo, una reducción del 30% en la viscosidad de una solución de polipectato de sodio al 1% al cabo de 24 horas de reacción, teniendo controles que no son propiamente blancos de reacción, en los cuales el porcentaje de reducción de la viscosidad varía entre 2% y 10%. Bonish (19) por su parte, considera como evidencia de actividad pectolítica una reducción de la viscosidad mayor del 10% en una solución de pectina al 0,6% después de 22 horas de reacción. En este caso los blancos de reacción ocasionan una reducción de la viscosidad menor del 5% pero el valor del blanco no es sustraído del obtenido en la mezcla de reacción, lo cual impide conocer los valores netos de actividad; por otra parte, el trabajo no especifica si se realiza un blanco de reacción por cada muestra ensayada.

Ljunggren y Fahraeus (20) consideran como positiva la presencia de actividad pectolítica en extractos que reducen entre 10% y 11% la viscosidad de una so-

lución de pectina al 1% en 24 horas. Sin embargo, en el cálculo de dicho porcentaje no se considera un blanco de reacción.

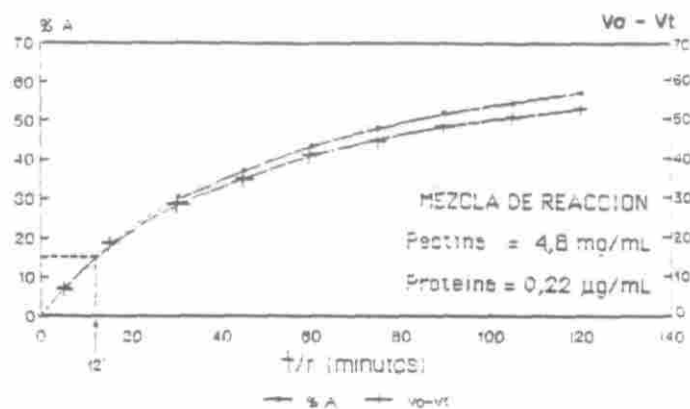
Dada la variabilidad de los criterios expuestos acerca del valor mínimo del porcentaje de reducción de la viscosidad aceptado como indicativo de actividad pectolítica, en el presente estudio se estableció dicho valor mínimo, con base en la experiencia obtenida en el trabajo con la enzima patrón. Como se observa en la Gráfica 1, la Solución b de Pectinex redujo un 57% la viscosidad de una solución de pectina NF al 0,5% a los 120 minutos de reacción; en la décima parte de este tiempo, cuando apenas está comenzando la hidrólisis, pero ha transcurrido suficiente tiempo para que la enzima se difunda en la solución, se observó un 15% de reducción de la viscosidad; este es un porcentaje de reducción de la viscosidad no muy alto, pero debido realmente a la degradación de la pectina por hidrólisis enzimática, puesto que en el seguimiento de dicha degradación se ha considerado un blanco de reacción. Además, la caída de flujo obtenida al cabo de este tiempo ($V_0 - V_t = 15$ seg), es aproximadamente 9 veces mayor que la que presenta una solución de pectina en iguales condiciones (solución al 0,5% (p/v) en solución tampón de pH 5,0 a 30°C) al cabo de 24 horas (17), lo que confirma que la caída de flujo observada en la reacción, se debe a la acción de la enzima.

Por las razones antes expuestas, en este trabajo se considerará como evidencia de actividad pectolítica, una reducción de viscosidad de por lo menos 15% al cabo de 24 horas de reacción en las condiciones descritas en 2.

Establecimiento del método para la obtención y purificación parcial del sobrenadante del cultivo bacterial. El método empleado para la obtención del sobrenadante SP-2 no resultó adecuado puesto que en dicho sobrenadante no se detectó la presencia de actividad pectolítica (17). Además, como se observa en la Gráfica 2 (a, b, c), en los sobrenadantes SP-1 y SP-4 obtenidos por diferentes métodos (numeral 4) tampoco se detectó actividad enzimática, solo en SP-3 se insinuó la presencia de actividad pectolítica (17); sin embargo, el porcentaje de reducción de la viscosidad obtenido para este sobrenadante al cabo de 24 horas de reacción (9,54%) se encuentra por debajo del valor mínimo establecido en el numeral 3.2. Esto sugiere que sería necesario efectuar una mayor concentración del sobrenadante del cultivo bacterial, con el fin de aumentar la concentración de proteína y observar posiblemente un porcentaje de reducción de la viscosidad más alto, lo cual permitiría asegurar la presencia de actividad pectolítica en el cultivo de la cepa en estudio. Lo anterior implica partir de un mayor volumen de cultivo, lo que aumenta el tiempo de manipulación del sobrenadante, por lo que se hace indispensable el uso de Azida de sodio 1% durante el proceso para evitar la contaminación por hongos que eventualmente produzcan pectinasas y/o consuman la proteína presente en el sobrenadante del cultivo bacterial. Por esta razón, se estudió el efecto de la adición de Azida de sodio (1 mg/mL) sobre la actividad de la enzima patrón.

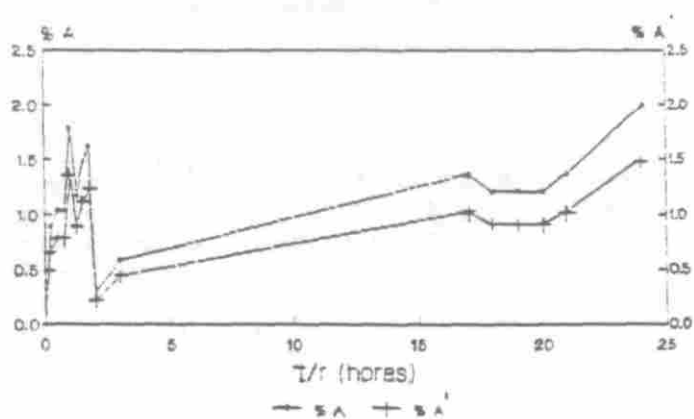
En la Gráfica 3 se observa que la Azida de sodio ocasionó una reducción del 40% al 50% en la actividad de la enzima patrón durante los primeros 45 minutos de reacción, pero de 60 minutos en adelante la actividad se incrementó signi-

Degradación enzimática de la pectina
por acción de la Solución b de Pectinex
Metodo II (V2)

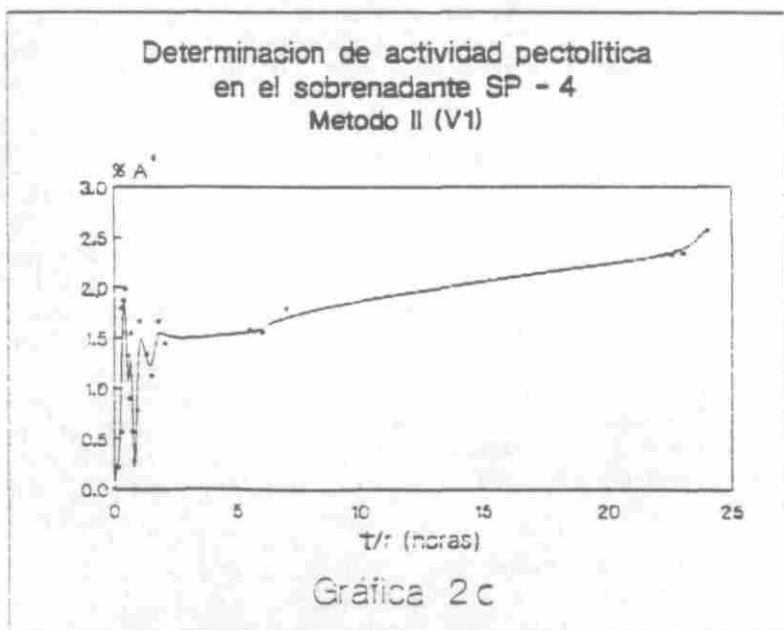
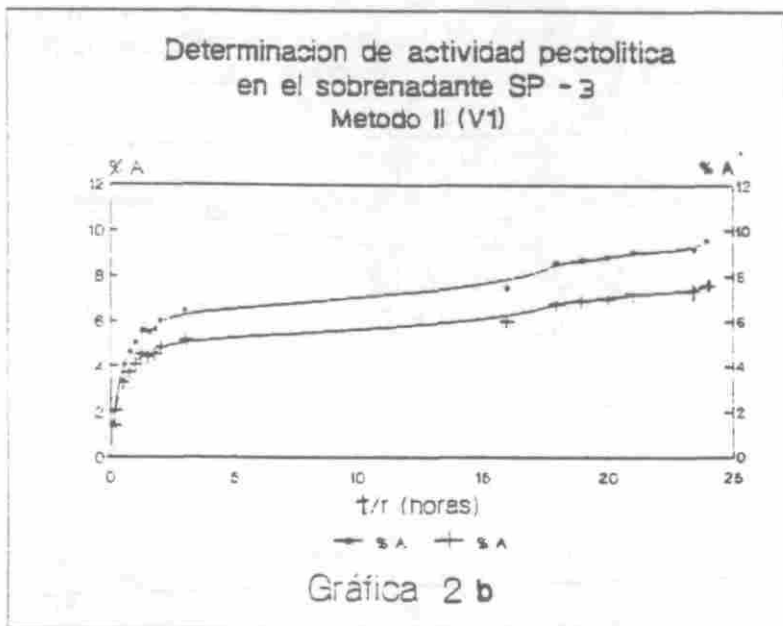


Gráfica 1

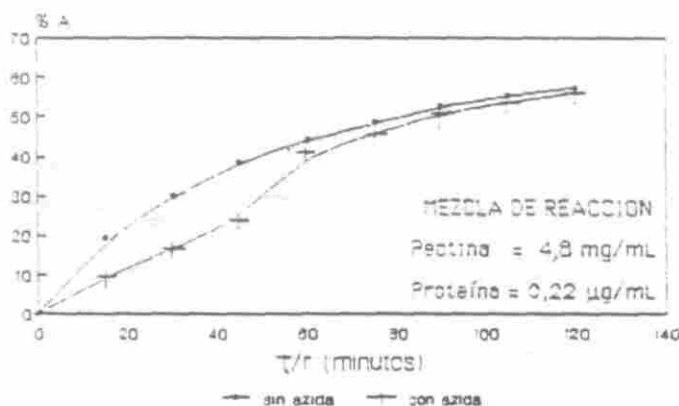
Determinación de actividad pectolítica
en el sobrenadante SP - 1
Metodo II (V1)



Gráfica 2a



Actividad de la Solución b de Pectinex
Efecto de 1.0 mg/ml de azida de sodio
Metodo II (V2)



Gráfica 3

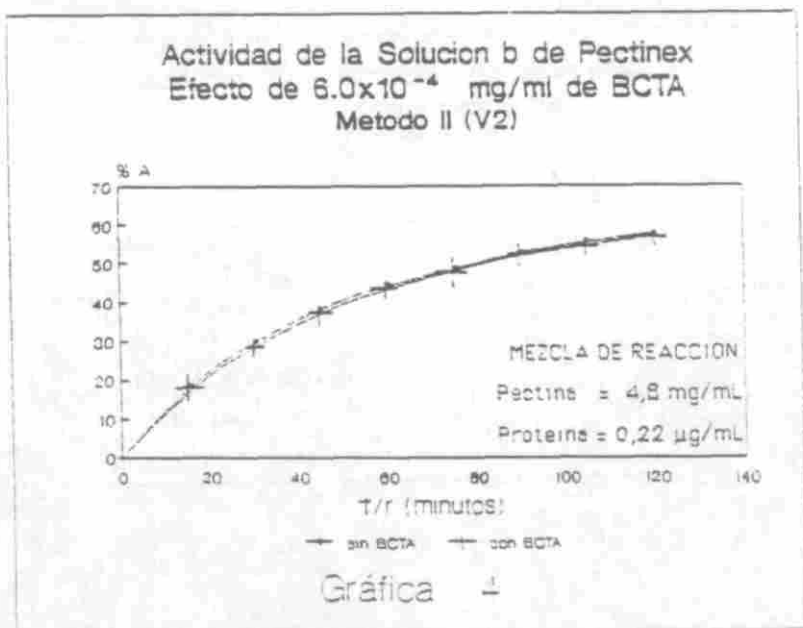
ficativamente hasta que a los 120 minutos de reacción se recuperó en su totalidad. A pesar de esta recuperación de actividad en la parte final de la reacción, se decidió eliminar la azida de sodio, antes de realizar la determinación de actividad pectolítica, de los sobrenadantes del cultivo de la cepa GR-4 de *R. meliloti* que fuesen tratados con dicho reactivo.

Con el fin de conocer el efecto del BCTA a la concentración final presente en el sobrenadante SP-3 sobre la determinación de la presencia de actividad pectolítica en él, se midió la actividad de la Solución b de Pectinex con $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL de BCTA. En la Gráfica 4 se observa que dicha concentración de detergente no afectó la actividad de la enzima; además, a esta concentración ($6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL) el BCTA no ocasionó formación de espuma que afectara la medida de los tiempos de flujo ni fue detectable en la solución enzimática, puesto que no ocasionó hemólisis de eritrocitos. De esta determinación se concluyó que la dilución del BCTA hasta aproximadamente $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL, permite determinar la presencia de actividad pectolítica sin que se presenten interferencias por parte de éste. Por esta razón, el BCTA se llevará hasta dicha concentración final, en los sobrenadantes sobre los cuales se desee determinar la presencia de actividad pectolítica.

Los resultados obtenidos hasta este momento permitieron concluir que las condiciones más adecuadas para obtener y purificar parcialmente el sobrenadante del cultivo de la cepa GR4 de *R. meliloti* y determinar si existe o no actividad pectolítica en este son:

- Cultivar la bacteria a gran escala en el medio AMA, en el que se obtienen las mejores características de crecimiento de la cepa (17) y en el que, de acuerdo con los resultados obtenidos en el sobrenadante SP-3, se insinúa la presencia de actividad pectolítica.
- Tratar el sobrenadante del cultivo con Azida de Sodio para evitar una posible contaminación durante la purificación parcial y eliminar posteriormente este reactivo, por diálisis, una vez finalizado el proceso.
- Eliminar la pectina residual presente en el sobrenadante del cultivo bacterial por precipitación con BCTA al 1,38% (p/v) en una proporción 1:10 (v/v).
- Lavar el BCTA por diluciones sucesivas, hasta obtener una concentración final aproximada de $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL.
- Concentrar el sobrenadante del cultivo bacterial parcialmente purificado más de 20 veces con respecto al volumen del sobrenadante crudo original.
- Determinar la presencia de actividad pectolítica en la solución concentrada empleando el viscosímetro V2 (16, 17) y utilizando las condiciones indicadas en el numeral 2.

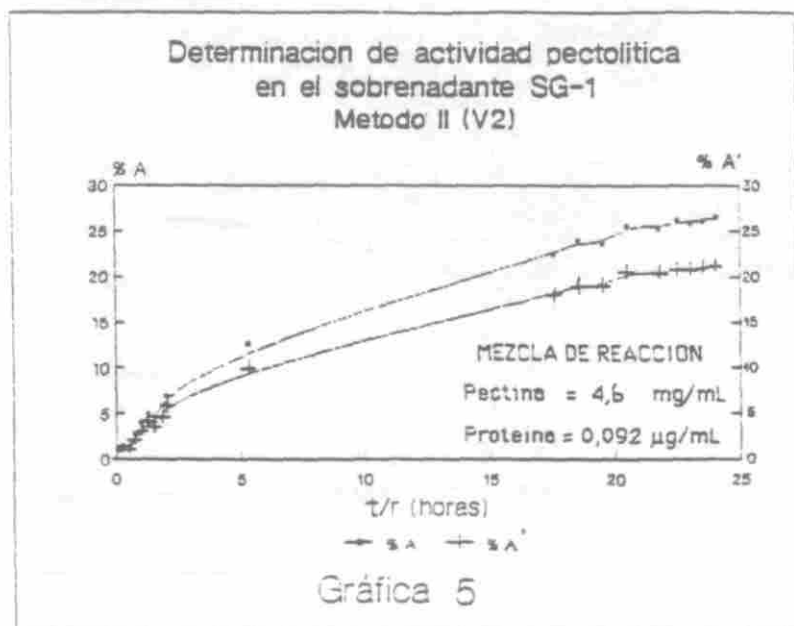
Con base en las condiciones antes descritas, para verificar si existe o no actividad pectolítica en el sobrenadante del cultivo de la cepa GR4 de *R. meliloti*, se diseñó y se llevó a cabo el procedimiento descrito en el Esquema 1 (numeral 2.4.2.), el cual permitió obtener el sobrenadante del cultivo bacterial a gran escala SG-1 parcialmente purificado.

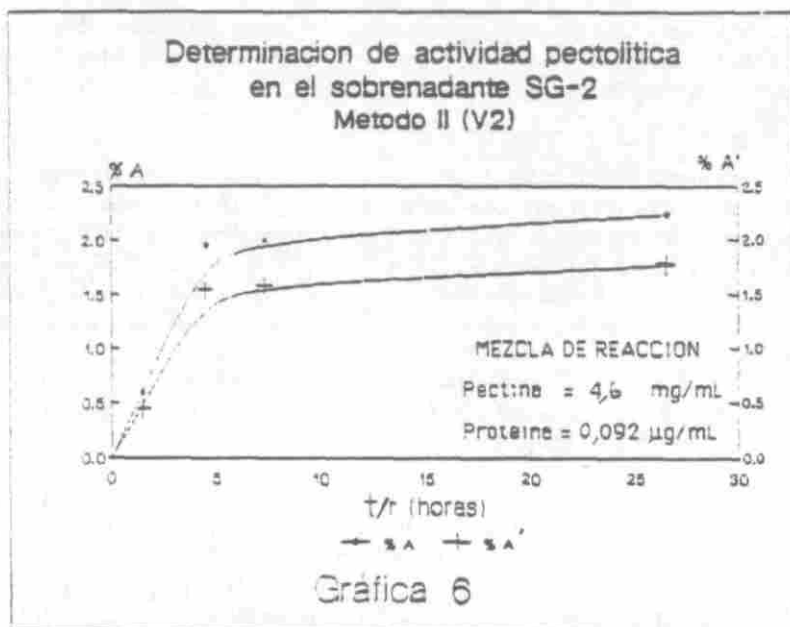


La actividad pectolítica del sobrenadante SG-1 se ensayó por el Método II (V2) (16). Los resultados de esta determinación se presentan en la Gráfica 5 en la que se observa que el sobrenadante presentó actividad pectolítica puesto que el %A alcanza, al cabo de 24 horas de reacción, un valor de 26,5% el cual es mayor que el mínimo establecido como indicativo de la presencia de actividad pectolítica.

Determinación de la presencia de actividad pectolítica en el sobrenadante SG-2. Con el fin de reproducir el resultado obtenido con el sobrenadante SG-1, se cultivó nuevamente la cepa GR4 de *R. meliloti* en el medio AMA y el sobrenadante del cultivo (SG-2) se procesó como se indica en el Esquema 1. La Gráfica 6, correspondiente a la determinación de actividad pectolítica en el sobrenadante SG-2, muestra que el porcentaje de caída de la viscosidad presentó una tendencia similar a la obtenida con el sobrenadante SG-1 (Gráfica 5), puesto que en ambos casos la viscosidad cayó más rápidamente en las primeras 5 horas de reacción; sin embargo, al cabo de este período, la caída de la viscosidad ocasionada por el sobrenadante SG-2 fue solo aproximadamente del 2.0%, mientras que la producida por el sobrenadante SG-1 fue mayor del 10%. Además, la caída de viscosidad obtenida con el sobrenadante SG-2 a las 26,5 horas de reacción, fue muy baja (2,2%) comparada con la que se obtuvo con el sobrenadante SG-1 al cabo de 24 horas (26,5%). Por consiguiente, a pesar de que la forma de la Gráfica indicó la existencia de trazas de actividad, no fue posible concluir que en dicho sobrenadante (SG-2) se detecta actividad pectolítica.

Con el fin de eliminar las posibles causas de inactivación de la(s) enzima(s) durante el proceso de obtención y purificación parcial del sobrenadante del cultivo se llevaron a cabo varios ensayos a gran escala (SG), introduciendo algunas variaciones en el proceso:





- Se utilizó el sobrenadante de un cultivo obtenido a partir de una generación de la cepa cuyas características de ineffectividad y efectividad fueron nuevamente comprobadas, puesto que si se mantenían dichas propiedades probablemente también se mantenía la capacidad de la cepa para producir enzimas pecticas.
- Con el objeto de reducir el tiempo empleado en la purificación parcial del sobrenadante:
 - a. Se precipitaron inicialmente las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo con sulfato de amonio.
 - b. Se liofilizó el sobrenadante.
- Se eliminaron los posibles fenoles presentes en el sobrenadante, por diálisis contra polivinil pirrolidona, dado que los compuestos fenólicos y sus productos de oxidación son inactivadores o inhibidores no específicos de las enzimas pecticas.
- Se utilizó presión de N_2 para efectuar los procesos de concentración y posterior lavado del BCTA a fin de evitar la posible pérdida de actividad ocasionada por el burbujeo de aire.

Sin embargo, en ninguno de los casos fue posible detectar nuevamente la presencia de actividad pectolítica (17); por tanto, se consideró conveniente realizar un seguimiento a la actividad de la enzima patrón durante el proceso de purifica-

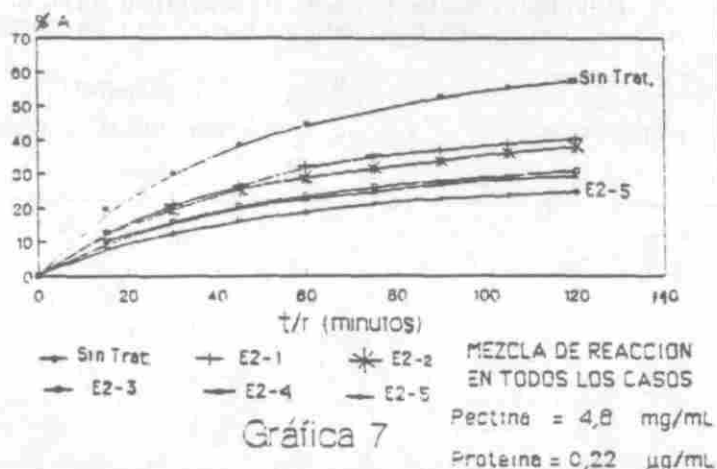
ción parcial, con el fin de esclarecer si en éste se estaban presentando pérdidas de actividad, ya que a pesar de las modificaciones realizadas con el fin de eliminar las posibles causas de inactivación, no fue factible reproducir el resultado obtenido con el sobrenadante SG-1.

Seguimiento de la actividad de la Solución b de Pectinex durante el proceso de purificación parcial empleado con los sobrenadantes SG. El seguimiento de la actividad de la Solución b de Pectinex a partir del momento en que se adiciona el BCTA para la precipitación de pectina y durante los procesos de concentración y posterior lavado del detergente utilizados con los sobrenadantes SG, se realizó en dos experimentos consecutivos en lo que el tiempo de duración del proceso total fue de 9 y 16 días respectivamente, como se indica en el Esquema 2 (numeral 2.7.). Los resultados del proceso cuya duración fue de 9 días se muestran en la Gráfica 7 como E2-1, E2-2 y E2-3. Los resultados correspondientes al proceso de 16 días se identifican como E2-1, E2-4 y E2-5.

Aunque una primera apreciación de la eliminación del BCTA la constituye la no formación de espuma durante la determinación de la actividad, para establecer si se retiró el detergente se determinó la actividad hemolítica de la Solución b de Pectinex en cada una de las Soluciones E2-1 a E2-5 señaladas en el Esquema 2. Como se ve en la Tabla 1, las muestras correspondientes a las etapas E2-1, E2-2 y E2-4, en las que el BCTA se encuentra a la concentración inicial de 1,29 mg/mL, causaron hemólisis en forma inmediata. Por el contrario, las muestras procedentes de las etapas E2-3 y E2-5, en las que el BCTA se sometió al proceso de lavado, no ocasionaron hemólisis ni aún 90 minutos después de preparada la muestra, lo que indica que en efecto el detergente se eliminó hasta una concentración bastante baja, probablemente del orden de 10^{-4} mg/mL, de acuerdo con lo estimado (17). Además, en la determinación de actividad pectolítica de dichas muestras no se presentó formación de espuma. Es de anotar, que la solución enzimática con $6,0 \times 10^{-4}$ mg/mL de BCTA, utilizada como referencia, tampoco ocasionó hemólisis de eritrocitos al cabo de 90 minutos.

Los resultados que aparecen en la Gráfica 7 muestran que el BCTA a la concentración original (1,29 mg/mL) ocasionó una reducción de la actividad de la enzima patrón de aproximadamente el 30% (E2-1), la cual se esperaba que desapareciera una vez eliminado el BCTA; sin embargo, al diluir el detergente hasta aproximadamente $5,4 \times 10^{-4}$ mg/mL (E2-3 y E2-5) la actividad de la enzima patrón no se recuperó, como se esperaba, sino que por el contrario fue aún más baja, lo que indica que entre más largo sea el proceso de concentración y posterior lavado del BCTA mayor es la pérdida de actividad que sufre la enzima. Probablemente este comportamiento se debió a que inicialmente el BCTA afectó en forma global la actividad de las enzimas presentes en la mezcla patrón (Pectinex), a pesar de que su concentración inicial (1,29 mg/mL) se encontraba por encima de la concentración crítica micelar lo cual, de acuerdo con lo citado en la literatura, evitaría una disociación o desnaturalización de las proteínas (21). Dado que se conoce muy poco acerca de las interacciones proteína-BCTA (21), no fue posible formular una explicación completamente satisfactoria de este resultado. Adicionalmente, la pérdida de actividad progresiva observada posteriormente,

Actividad de la Solución b de Pectinex durante el proceso de purificación parcial de los sobrenadantes SG



Gráfica 7

posiblemente se debió a que una o varias de las enzimas presentes en la mezcla perdieron gradualmente su actividad durante el proceso de purificación parcial, por algún factor que no fue posible determinar y por tanto la actividad original no se recuperó, a pesar de eliminar el detergente de la solución enzimática.

Si se consideran los resultados obtenidos en este ensayo, en el que al parecer las enzimas pécticas pierden actividad con el tiempo durante el proceso de purificación parcial, es probable que los resultados obtenidos con el sobrenadante SG-2 y los otros SG se debieran también a una pérdida de actividad de la(s) enzima(s) durante dicho proceso, puesto que la purificación parcial de los diferentes sobrenadantes obtenidos se demoró más tiempo que la del sobrenadante SG-1 (17).

Además, si se comparan los resultados obtenidos con los sobrenadantes SP-3 y SG-1 (Tabla 2), se observa que en el sobrenadante SP-3, en el que el factor de concentración fue de 20 y la muestra se diluyó 31 veces para la determinación de actividad pectolítica, la reducción de viscosidad obtenida a las 24 horas de reacción fue de 9,54%; por tanto, en el sobrenadante SG-1, en el que el factor de concentración fue aproximadamente 9 veces mayor y la muestra solo se diluyó 13 veces para la determinación de actividad pectolítica, era de esperar que el porcentaje de reducción de la viscosidad obtenido a las 24 horas de reacción fuera mucho mayor que el producido por el sobrenadante SP-3; sin embargo, solo se obtuvo una reducción de la viscosidad aproximadamente 3 veces mayor que la obtenida con SP-3. Esto parece indicar, que durante el procesamiento del sobrenadante SG-1 también se presentaron pérdidas de actividad, lo que apoya la hipótesis originalmente planteada, sobre la posibilidad de que las enzimas pécticas presentes en los sobrenadantes SG-2 y los demás sobrenadantes SG,

Tabla 1
**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA
 DE LA SOLUCION b DE PECTINEX DURANTE EL PROCESO E2**

MUESTRA	Hemólisis		
	Tiempo Observación (min.)		
	0	30	90
Blanco	—	—	—
Solución b Pectinex con BCTA (6.0×10^{-4} mg/mL)	—	—	—
E2-1	+	+	+
E2-2	+	+	+
E2-3	—	—	—
E2-4	+	+	+
E2-5	—	—	—

Tabla 2
**DETERMINACION DE ACTIVIDAD PECTOLITICA EN LOS
 SOBRENADANTES SP-3 y SG-1**

SOBRENADANTE	SP-3	SG-1
Factor de Concentración	20	178
Relación: Sobrenadante: sustrato en la mezcla (v/v) de reacción.	1:30	1:12
Dilución de la muestra	31 veces	13 veces
%A a las 24 horas de reacción	9,54	26,5
Proceso de purificación parcial	Aprox. 6 días	13 días

hayan perdido gran parte de su actividad durante el proceso de purificación parcial, lo que probablemente impidió su detección. Estos resultados muestran que es importante procesar el sobrenadante del cultivo bacterial en el menor tiempo posible, para evitar pérdidas de actividad que impidan la detección de enzimas pécticas probablemente presente en él.

Con base en lo antes expuesto, se concluyó que el método utilizado para la obtención y purificación parcial del sobrenadante SG-1 fue el más adecuado, puesto que a pesar de las posibles pérdidas de actividad que hayan podido presentarse, permitió detectar la presencia de actividad pectolítica en el sobrenadante del cultivo de la cepa GR4 de *R. meliloti* cultivada en el medio AMA.

De los resultados obtenidos en este trabajo se dedujo que probablemente, la controversia existente respecto a la posible participación de enzimas pécticas en el proceso de infección de las leguminosas por el *Rhizobium*, se deba, en parte, a que en los estudios respectivos se hayan presentado pérdidas de actividad de las enzimas pécticas, imposibilitándose por tanto la demostración de su existencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestros agradecimientos al Programa de Posgrado de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Química y al Instituto de Biotecnología de la misma institución, por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Vance, C.P. *Ann. Rev. Microbiol.*, **1983**, *37*, 399.
2. Verma, D.P.S.; Zogbi, V. *Plant. Sci. Lett.*, **1978**, *13*, 137.
3. Fahraeus, G.; Sahlman, K. *Annl. Acad. Reg. Sci. Upsaliensis*, **1976**, *20*, 103.
4. Hubbell, D.H.; Morales, V.M.; Umali García, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 210.
5. Martínez-Molina, E.; Morales, V.M.; Hubbell, D.H. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1979**, *38*, 1186.
6. Piazinski, J.; Rolfe, B.G. *J. Plant. Physiol.*, **1985**, *120*, 181.
7. Callaham, D.A.; Torrey, J.G. *Can. J. Bot.*, **1981**, *59*, 1647.
8. Talmadge, K.W.; Keegstra, K.; Bauer, W.D.; Albersheim, P. *Plant Physiol.*, **1973**, *51*, 158.
9. Bauer, W.D.; Talmadge, K.W.; Keegstra, K.; Albersheim, P. *Plant. Physiol.*, **1973**, *51*, 174.
10. Keegstra, K.; Talmadge, K.Y.; Bauer, W.D.; Albersheim, P. *Plant. Physiol.*, **1973**, *51*, 188.

11. Aspinall, G.O., Chemistry of Cell Wall Polysaccharides en *The Biochemistry of Plants*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1980, p. 473-500.
12. Dazzo, F.B.; Hubbell, D.H., Control of Root hair infection en *Nitrogen Fixation*. Vol 2. Rhizobium, Broughton W.J. (ed), Clarendon Press, Oxford, 1982, p. 274-310.
13. Lillich, T.T.; Elkan, G.H.; *Can. J. Microbiol.*, **1968**, *14*, 617.
14. MacMillan, J.D.; Cooke, R.C. *Can J. Microbiol.*, **1969**, *15*, 643.
15. Martínez-Molina, E.; Olivares, J. *J. Appl. Bacteriol.*, **1982**, *52*, 453.
16. Pérez, G.; Martínez, P. *Rev. Colombiana de Química*, **1990**, *19*, 13.
17. Martínez, P. Detección de actividad pectolítica en el filtrado del cultivo de algunas cepas de *Rhizobium meliloti*. Tesis de Magister Scientiae, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1988.
18. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L.; Randall, R.L. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*, 265.
19. Bonish, P.M. *Plant Soil.*, **1973**, *39*, 319.
20. Ljunggren, H.; Fahraeus, G. *J. Gen. Microbiol.*, **1961**, *26*, 521.
21. Akin, D.T.; Shapira, R.; Kinkade, J.M. *Anal. Biochem.* **1985**, *145*, 170.