

Catatan Penelitian

Penggunaan Kromatografi Tukar Ion *DEAE-Sepharose CL-6B* dalam Purifikasi Komponen Selulase *Cellulomonas CS1-17*

(The Use of Ion Exchange Chromatography of DEAE-Sepharose CL-6B in the Purification of Cellulase Components from Cellulomonas CS1-17)

M.B. TRESNAWATI PURWADARIA

Balai Penelitian Ternak, Kotak Pos 221, Bogor 16002
Tel. 0251.240752, Faks. 0251.240754, Email: Balitnak@indo.net.id

ABSTRACT

Ion exchange chromatography of DEAE-sepharose CL-6B was used to purify cellulase components from a culture filtrate of *Cellulomonas CS1-17* grown on microcrystalline cellulose (Sigmacell-20). The cellulase components were separated into three activity peaks after elution with a linear gradient of NaCl concentrations from 0 to 0.5M. The first and second peaks (I₁ and I₂) contained high activity for degradation of amorphous cellulose (CMCase), while the third peak (I₃) contained activity for degradation of microcrystalline cellulose (avicelase). In the higher concentration of NaCl (0.0 to 1.0 M) and in the same linear gradient addition the filtrate was separated into four peaks. Three peaks of II₁, II₂, and II₃ had the same activity as I₁, I₂, and I₃, while the last peak (II₄) had high CMCase activity. In this separation the resolution between II₁ and II₂ was poorer than I₁ and I₂. Therefore, in the further experiment the separation was carried out with stepwise gradients of NaCl (0.08, 0.18, 0.30 and 1.0 M). The choice of salt concentrations was based on results of the second linear gradients system. Five peaks were resolved well after the elution. Further enzyme determination shows that II₁ has high CMCase activity, II₂ has high avicelase activity, while II₄ has cellobiohydrolase activity.

Key word: ion exchange chromatography, purification of cellulase components, *Cellulomonas CS1-17*

Mikrob selulolitik dapat memproduksi selulase yang dapat menguraikan selulosa menjadi glukosa. Penguraian terjadi karena aksi sinergisme tiga komponen selulase yaitu endo- β -1,4-glukanase (EC 3.2.1.4), ekso- β -1,4-glukanase (EC 3.2.91 atau selobiohidrolase), dan β -1,4-glukosidase (EC 3.2.1.21). Endoglukanase akan memulai penguraian pada daerah amorf secara acak sehingga membentuk rantai yang terbuka untuk aktivitas selobiohidrolase, kemudian selobiohidrolase memecah molekul selobiosa dari ujung rantai. Selobiosa yang terbentuk selanjutnya dihidrolisis oleh β -glukosidase menjadi glukosa (Enari 1983, Coughlan 1985). Mekanisme ini masih sering diperdebatkan karena ditemukan pula endoglukanase yang bersifat aktif menguraikan daerah kristal (Kanda *et al.* 1976, Kanda & Nisizawa 1983, Beldman *et al.* 1985), dan dua jenis selobiohidrolase yang masing-masing aktif menguraikan daerah kristal atau amorf (Fagerstam & Pattersson 1980, Wood 1985). Henrissat *et al.* (1985) melaporkan bahwa sinergisme terjadi bila terdapat dua jenis enzim yang masing-masing aktif pada daerah kristal dan amorf.

Mekanisme penguraian selulosa pada umumnya dipelajari pada enzim kompleks yang dihasilkan cendawan. Choi *et al.* (1978) mengisolasi bakteri *Cellulomonas CS1-17* yang mampu menguraikan kapas. Untuk mempelajari penguraian

enzim yang diproduksi oleh bakteri tersebut perlu dilakukan purifikasi komponen kompleks enzim.

Beberapa kromatografi tukar ion seperti *DEAE Bio-Gel A* (Beldman *et al.* 1985), *DEAE-trisacryl M* (Prasertsan & Doelle 1986) dan *DEAE Sepharose CL-6B* (Groleau & Forsberg 1982) dapat dipakai untuk memisahkan komponen selulase *Trichoderma viride*, *Cellulomonas sp.* dan *Bacteroides succinogenes*. Pada sistem kromatografi ini komponen selulase dipisahkan berdasarkan perbedaan afinitas terhadap penukar ion. Afinitas komponen dengan penukar ion dapat dilepaskan dengan mengubah kadar garam atau pH larutan eluen (Yamamoto 1988). Selain itu sistem pengaturan perubahan kadar garam atau pH eluen baik dengan gradasi linear ataupun gradasi bertingkat dapat pula mempengaruhi jumlah komponen yang terpisah. Di sini dilaporkan bagaimana cara mengatur perubahan kadar garam untuk memisahkan komponen ekstraseluler enzim kompleks selulase *Cellulomonas CS1-17* (untuk selanjutnya disebut sebagai CS1-17).

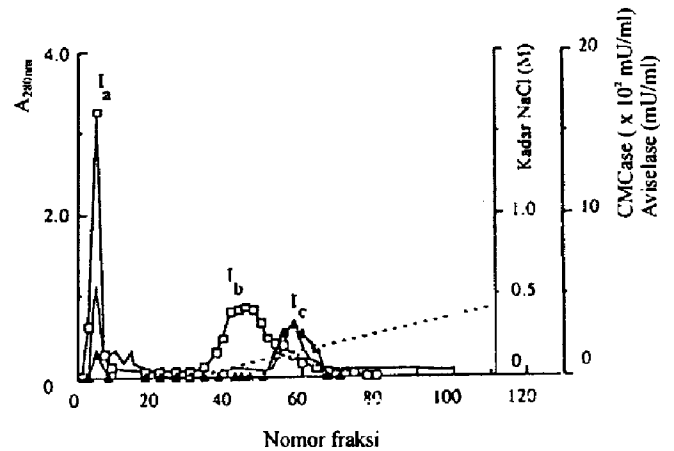
Enzim kompleks ekstraseluler diproduksi pada media PM yang mengandung sumber karbon selulosa mikro-kristal Sigmacell-20 karena substrat tersebut memproduksi komponen selulase yang paling lengkap (Purwadaria 1988). Waktu inkubasi kultur 48 jam dan filtrat dipisahkan dengan sentrifugasi pada 15,000 g pada suhu 4°C selama

2 x 20 menit, kemudian enzim dipekatkan 10 kali dengan proses ultrafiltrasi menggunakan membran *Millipore-PTGC* dengan pemotongan molekul 10,000. Pemisahan enzim kompleks CSI-17 dilakukan pada *DEAE-sepharose CL-6B* dengan perubahan kadar garam (NaCl) secara gradasi linear dan gradasi bertingkat. Untuk melihat efek pemisahan enzim kompleks ditentukan aktivitas CMCCase dan aviselase dari tiap fraksi. Aktivitas CMCCase ditentukan untuk melihat fraksi enzim yang aktif menguraikan selulosa amorf, sedangkan aviselase untuk fraksi enzim yang menguraikan selulosa mikrokristal. Metode asai kedua enzim tersebut dilakukan menurut Haggert *et al.* (1979). Selain penentuan asai enzim pada tiap fraksi ditentukan pula aktivitas spesifik dari kumpulan fraksi pada puncak aktivitas yang sama. Pada kumpulan fraksi ini ditentukan pula aktivitas pNPCase dan pNPGase. Aktivitas pNPCase ditentukan untuk melihat aktivitas selobiohidrolase (Purwadaria 1988), sedangkan aktivitas pNPGase ditentukan untuk melihat aktivitas β -glukosidase (Choi *et al.* 1978). Satu unit aktivitas enzim CMCCase dan aviselase adalah jumlah enzim yang dapat melepaskan satu mol glukosa dalam satu menit, sedangkan satu unit aktivitas pNPCase dan pNPGase adalah jumlah enzim yang dapat menguraikan satu mol nitrofenol dalam satu menit. Aktivitas spesifik diperhitungkan berdasarkan aktivitas enzim per miligram protein. Kadar protein ditentukan menurut Bradford (1976).

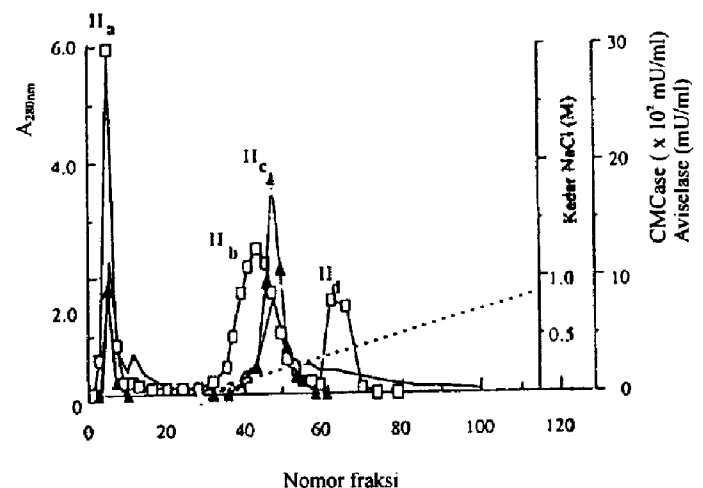
Pemisahan enzim kompleks CSI-17 dengan perubahan kadar NaCl secara gradasi linear dilakukan pada kolom berukuran 1.1 x 22.0 cm. Pemisahan dilakukan pada kolom yang relatif pendek dan berdiameter kecil karena pemisahan dengan kromatografi tukar ion tidak memerlukan kolom yang tinggi, sedangkan penggandaan skala dapat dilakukan dengan memperbesar diameter kolom. Profil elusi filtrat kultur CSI-17 yang dielusi dengan gradasi linear NaCl dari 0.0 - 0.5 M ditunjukkan pada Gambar 1. Enzim kasar selulase dipisahkan pada tiga puncak aktivitas. Puncak I_a yang dielusi selama pencucian mengandung aktivitas tinggi CMCCase dan aviselase, puncak I_b hanya mengandung aktivitas CMCCase dan puncak I_c mengandung aktivitas tinggi aviselase dan jejak aktivitas CMCCase. Kadar NaCl yang diperlukan untuk mengelusi fraksi selulase dapat ditentukan dari kromatogram. Puncak I_a dielusi pada kadar NaCl 0.08 M, sedangkan puncak I_c dielusi pada kadar NaCl 0.15 M.

Pada percobaan berikutnya enzim kasar dipisahkan juga secara gradasi linear dengan kadar NaCl yang lebih tinggi yaitu 0.0-1.0 M. Profil elusi ditunjukkan pada Gambar 2. Kadar garam yang lebih tinggi memberikan pemisahan yang berbeda yaitu empat puncak aktivitas, satu puncak mengandung CMCCase dan aviselase (II_a), dua puncak CMCCase (II_b dan II_c), dan satu puncak aviselase (II_d). Puncak II_a dielusi pada waktu pencucian, sedangkan puncak II_b, II_c, dan II_d dielusi pada kadar NaCl 0.10, 0.16, dan 0.34 M. Pada pemisahan ini setengah puncak II_c menutupi puncak II_b.

Dapat disimpulkan bahwa kadar NaCl yang lebih tinggi dapat memberikan puncak aktivitas tambahan (puncak II_a). Puncak-puncak aktivitas yang lain terbentuk pada kadar elusi NaCl yang hampir sama. Puncak I_a dan II_a yang mempunyai aktivitas CMCCase dielusi masing-masing pada NaCl 0.08 M (Gambar 1) dan 0.10 M (Gambar 2), sedangkan puncak I_c dan II_c yang mempunyai aktivitas aviselase dielusi pada NaCl 0.15 M dan 0.16 M. Walaupun demikian penggunaan kadar NaCl yang lebih tinggi mempercepat waktu elusi dan mengurangi resolusi di antara puncak II_b dan II_c.



Gambar 1. Profil elusi kultur filtrat CSI-17 pekat dengan gradasi linear kadar NaCl: 0.0 - 0.5 M. Volume kultur filtrat 2 ml, kadar protein 3.84 mg. Ukuran kolom 1.1 x 22.0 cm. Kecepatan elusi 24 ml/jam. Waktu koleksi tiap fraksi 10 menit. Bufer elusi Tris HCl 0.05 M, pH 7.2. Gradasi linear kadar NaCl 0.0 - 0.5 M dimulai setelah pencucian kolom dengan 120 ml buffer. Absorben pada 280 nm (—), CMCCase (□), aviselase (▲) dan kadar NaCl (----).



Gambar 2. Profil elusi kultur filtrat CSI-17 pekat dengan gradasi linear kadar NaCl: 0.0 - 1.0 M. Volume kultur filtrat 4 ml, kadar protein 7.68 mg. Ukuran kolom 1.1 x 22.0 cm. Kecepatan elusi 24 ml/jam. Waktu koleksi tiap fraksi 10 menit. Bufer elusi Tris HCl 0.05 M, pH 7.2. Gradasi linear kadar NaCl 0.0 - 1.0 M dimulai setelah pencucian kolom dengan 120 ml buffer. Absorben pada 280 nm (—), CMCCase (□), aviselase (▲) dan kadar NaCl (----).

Resolusi dapat dipertinggi dengan memperlambat kecepatan elusi atau mempertinggi volume pencampuran bufer NaCl untuk perbedaan gradasi yang lebih rendah. Cara yang pertama akan memperlambat total waktu pemisahan, sedangkan cara yang kedua selain memperlambat juga akan memerlukan tempat pembuatan larutan eluen gradasi yang lebih besar, terutama bila dilakukan pada skala besar. Karena itu pada percobaan berikut selain pada skala yang lebih besar juga dicoba cara yang lebih mudah dengan elusi NaCl secara gradasi bertingkat. Pada metode ini kadar NaCl tidak berubah sampai seluruh puncak terelusi sehingga akan membentuk resolusi yang lebih baik. Kadar NaCl untuk mengelusi puncak ditentukan dari percobaan pertama dan kedua. Elusi NaCl secara gradasi bertingkat digambarkan pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa elusi NaCl secara gradasi bertingkat dengan kadar NaCl 0.08, 0.18, 0.30, dan 1.00 M akan memisahkan enzim menjadi lima puncak aktivitas. Puncak III_a yang didapatkan dari pencucian kolom seperti pada elusi percobaan satu dan dua mengandung aktivitas CMCCase dan aviselase. Puncak III_b seperti pada puncak I_a pada Gambar 1 dielusi pada kadar NaCl 0.8 M mempunyai aktivitas tinggi CMCCase, walaupun berkadar protein rendah (kurva A_{280 nm}). Puncak III_c yang dielusi pada kadar NaCl 0.18 M mempunyai aktivitas aviselase dan kadar protein yang tinggi. Puncak ini seperti puncak I_c (Gambar 1) dan II_c (Gambar 2). Puncak III_d yang dielusi pada NaCl 0.34 M seperti II_d (Gambar 2) mempunyai aktivitas tinggi CMCCase. Puncak III_e mempunyai kadar protein yang tinggi, tetapi aktivitas CMCCase yang amat kecil dan aviselase yang tidak terdeteksi. Fraksi yang beraktivitas sama dikumpulkan,

dipekatkan, dan ditentukan aktivitas spesifiknya pada substrat CMC, avisel, pNPC, dan pNPG (Tabel 1).

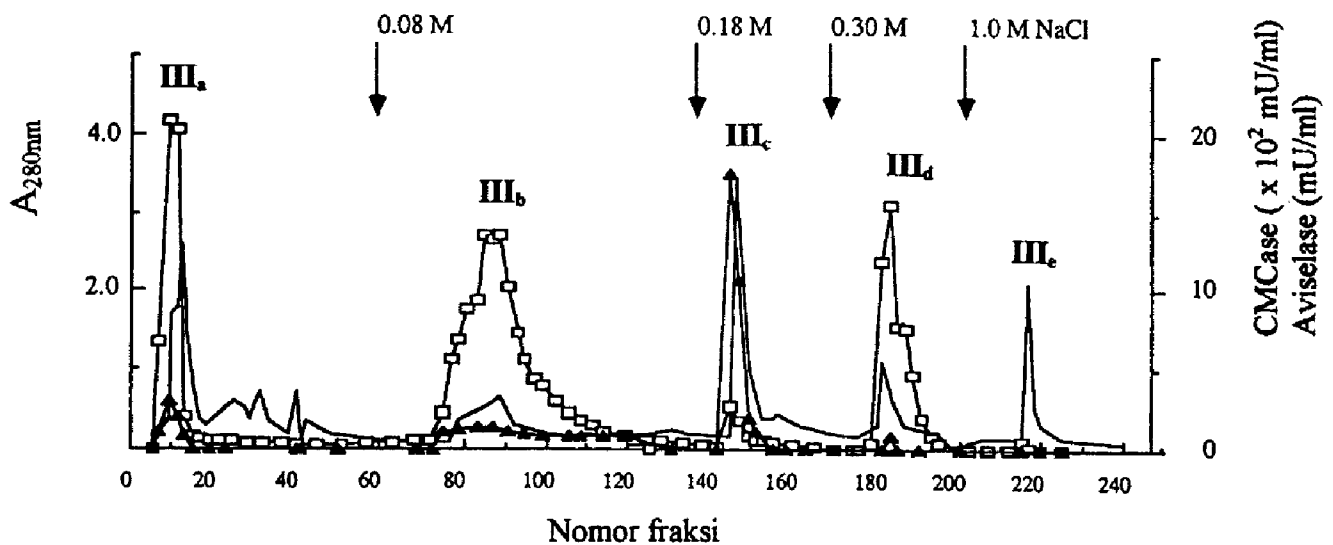
Tabel 1. Aktivitas enzim spesifik fraksi selulase kultur CSI-17 yang dipisahkan dengan gradasi kadar NaCl bertingkat

Jenis enzim*	Aktivitas enzim spesifik:			
	CMCase (x102 mU/mg protein)	Aviselase (mU/mg protein)	pNPCase (mU/mg protein)	pNPGase (mU/mg protein)
Enzim kasar	104	92	9.6	TT
Puncak III _a	268	43	70.6	TT
Puncak III _b	814	143	6.3	TT
Puncak III _c	6	50	0.2	TT
Puncak III _d	214	31	194.4	TT
Puncak III _e	29	9	17.2	TT

*Enzim dipekatkan sepuluh sampai enampuluh kali tergantung pada kadar enzim, TT: tidak terukur

Tabel 1 menunjukkan bahwa walaupun komponen selulase itu telah dipekatkan, mereka tidak dapat menguraikan pNPG. Data ini sesuai dengan Beguin & Eisen (1978) yang tidak menemukan pNPGase pada fraksi ekstraseluler *Cellulomonas* sp. Seluruh kumpulan fraksi yang dipekatkan mengandung aktivitas spesifik CMCCase, aviselase, dan pNPCase. Aktivitas CMCCase yang paling tinggi berada pada kelompok fraksi III_b, sedangkan kelompok III_d mempunyai aktivitas pNPCase yang paling tinggi.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa aktivitas aviselase yang paling tinggi terdapat pada puncak III_c, tetapi perhitungan



Gambar 3 Profil elusi kultur filtrat CSI-17 pekat dengan gradasi bertingkat kadar NaCl. Volume kultur filtrat 50 ml, kadar protein 113 mg. Ukuran kolom 3.2 x 28.0 cm. Kecepatan elusi 130 ml/jam. Waktu koleksi tiap fraksi 8 menit. Bufer elusi Tris HCl 0.05 M pH 7.2. Gradasi bertingkat dilakukan pada bufer tersebut yang mengandung kadar NaCl: 0.08, 0.18, 0.3 dan 1.0 M pada fraksi nomor: 66, 136, 171, dan 206. Absorben pada 280 nm (—), CMCCase (□) dan aviselase (▲).

enzim spesifik pada Tabel 1 menunjukkan puncak III_b yang mempunyai aktivitas aviselase yang paling tinggi. Hal ini dapat terjadi karena puncak III_b mempunyai kadar protein yang lebih tinggi sangat nyata terhadap puncak III_a (kurva A_{280nm} pada Gambar 3). Dibandingkan dengan puncak yang lain, puncak III_a mempunyai aktivitas CMC_{ase} yang sangat rendah, tetapi dapat menguraikan avisel atau selulosa kristal.

Pemisahan III dilakukan pada diameter kolom 3.2 cm dan tinggi 28.0 cm. Dibandingkan dengan kolom pada pemisahan I dan II, kolom ini mempunyai luas penampang melintang 8.5 kali lebih besar dan 1.27 kali lebih tinggi. Pada tiap pemisahan di kolom besar ini dipisahkan protein enzim sebanyak 113 mg (Gambar 3), sedangkan pada kolom kecil hanya protein enzim sebanyak 3.84 mg (Gambar 1) dan 7.8 mg (Gambar 2). Pembesaran skala tetap menghasilkan pemisahan aktivitas yang sama, atau pembesaran skala pada pemisahan tukar ion ini dapat dilakukan dengan memperbesar diameter.

Yamamoto *et al.* (1988) berpendapat bahwa pemisahan protein lebih baik dilakukan pada gradasi linear daripada gradasi bertingkat. Pada gradasi bertingkat terdapat kemungkinan adanya protein yang dapat dielusi dengan kadar garam yang lebih rendah bersatu dengan kadar garam yang lebih tinggi. Pada pemisahan enzim CS1-17 hal ini dapat dihindari karena kadar NaCl pada gradasi bertingkat ditentukan setelah gradasi linear.

Pada studi pemurnian selanjutnya kumpulan puncak III_b akan menjadi enzim Endo I yang bersifat aktif menguraikan selulosa amorf (Purwadaria 1995) puncak III_a akan menjadi enzim Endo II yang aktif menguraikan selulosa kristal (Purwadaria 1997), sedangkan puncak III_d akan menjadi selobiohidrolase (CBH I) yang aktif menguraikan selulosa amorf menjadi selooligomer, dan selanjutnya diteruskan menjadi selobiosa (Purwadaria 1993). Hasil pemisahan dengan kromatografi tukar ion *DEAE sepharose CL-6B* ini merupakan hasil yang baik karena sangat sulit untuk memisahkan enzim kompleks selulase bakteri yang memecah daerah selulosa kristal dari enzim pengurai daerah amorf. Dapat disimpulkan pula pengujian penambahan NaCl secara bertahap dimulai dengan gradasi linear dan diteruskan dengan gradasi bertingkat dapat memisahkan enzim dengan lebih baik.

Daftar Pustaka

- Beguina, P. & H. Eisen. 1978. Purification and partial characterisation of three extracellular cellulases from *Cellulomonas* sp. *Eur. J. Biochem.* 87:525-531.
- Beldman, G., M.F. Searle-vanLeeuwen, F.M. Rombouts & G.J. Voragen. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride* purification, characterisation and comparison of all detectable endoglucanases EC 3.2.1.4., exoglucanases EC 3.2.1.9.1. and glucosidases EC 3.2.1.21. *Eur. J. Biochem.* 146:301-308.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Choi, W.Y., K.D. Haggett & N.W. Dunn. 1978. Isolation of a cotton wool degrading strain of *Cellulomonas*: Mutants with altered ability to degrade cotton wool. *Aust. J. Biol. Sci.* 31:553-564.
- Coughlan, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 3:39-109.
- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. hlm. 183-223. Di dalam W.M. Fogarty (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. London: Applied Science.
- Fagerstam, L.G. & L.G. Patterson. 1980. The 1,4-β-glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM 9414. A new type of cellulolytic synergism. *FEBS Lett.* 119:97-100.
- Groleau, D. & C. W. Forsberg. 1983. Partial characterisation of the extracellular CMC_{ase} activity produced by the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* 29:504-517.
- Haggett, K.D., P.P. Gray & N.W. Dunn. 1979. Crystalline cellulose degradation by a strain of *Cellulomonas* and its mutant derivatives. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* 8:183-190.
- Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet & M. Schulein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology* 3:722-726.
- Kanda, T., K. Wakabayashi & K. Nisizawa. 1976. Purification and properties of an endocellulase and avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.* 79:977-988.
- Kubo, K. & K. Nisizawa. 1983. Purification and properties of two endo type cellulases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Ferment. Technol.* 61:383-390.
- Prasertsan, P. & H.W. Doelle. 1986. Separation and characterisation of endoglucanases from culture filtrates of *Cellulomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:326-333.
- Purwadaria, M.B.T. 1988. Purification and characterisation of a *Cellulomonas* cellulase complex. PhD thesis. Sydney: University of New South Wales.
- Purwadaria, M.B.T. 1995. Purifikasi dan karakterisasi Endoglukanase I (Endo I) yang diproduksi oleh *Cellulomonas* CS1-17, 392-402. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II, Cibinong 6-7 September 1994. Cibinong-Jakarta: Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.
- Purwadaria, M.B.T. 1997. Purification and characterisation of Endoglukanase II (Endo II) which is active on hydrolysis of microcrystalline cellulose and produced from *Cellulomonas* CS1-17. *J. Bioteknologi Pertanian* 2:14-22.
- Purwadaria, M.B.T. & P.P. Gray. 1993. Purification, characterisation and properties of an endo type mode of action of 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase from *Cellulomonas* CS1-17, hlm. 914-929. B.L., Oei, A. Buchanan & D. Fardiaz (ed.), *Development of Food Science and Technology in Southeast Asia*. Bogor: IPB Press.
- Wood, T.M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* 13:407-410.
- Yamamoto, S., K. Nakanishi & R. Matsuno. 1988. *Ion exchange chromatography of proteins*. New York: Marcel Dekker Inc.