

Purificación y caracterización de la celulasa Cel7A del hongo termófilo *Thielavia terrestris*

Azucena López López, Alejandro Santiago Hernández y María Eugenia Hidalgo Lara
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. C.P. 07360.
Tel. 5747-3800 ext. 4360. e-mail ehidalgo@cinvestav.mx

Celulasa, purificación, Thielavia terrestris.

Introducción. La celulosa es uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas y es la fuente de carbono no fósil más abundante y renovable en la tierra. Este polímero está compuesto de unidades repetidas de glucosa, unidos por enlaces β -1,4¹. La celulosa es degradada por la acción sinérgica de tres celulasas. Las endocelulasas, exocelulasas (celobiohidrolasas) y β -glucosidasas². Las celulasas presentan un gran potencial biotecnológico en diversas industrias, incluyendo alimentos, piensos, fabricación de vino y cerveza, agricultura, refinación de biomasa, pulpa y papel, textiles y lavandería³.

El hongo ascomiceto *T. terrestris* se aisló de composta de bagazo de caña, y fue seleccionado por su capacidad de crecer a 45 °C e hidrolizar material lignocelulósico, además de ser fuente natural de enzimas termófilas y termoestables.

El objetivo de este trabajo es purificación y caracterizar bioquímicamente la celulasa Cel7A nativa de *T. terrestris*.

Metodología. *Thielavia terrestris* se cultivó en medio basal previamente descrito (Zouari-Mechichi et al., 2006), suplementado con CMC al 0.3%, a 45 °C y 200 rpm. La celulasa Cel7A se purificó a partir del sobrenadante de cultivo del hongo por Cromatografía de Intercambio Aniónico y Cromatografía de Filtración en Gel. El análisis por PAGE-SDS de la fracción purificada presentó un peso molecular estimado de 81 kDa. se identificó mediante análisis bioinformáticos de los péptidos obtenidos de la secuenciación parcial de aminoácidos por Espectrometría de Masas. La Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 se caracterizó bioquímicamente utilizando CMC como sustrato.

Resultados. El análisis mediante SDS-PAGE de la enzima purificada mostró una banda con un peso molecular estimado de 81 kDa, como se observa en la Figura 1. La Cel7A se purificó con un factor de 10 y con una actividad específica de 8 U/mg de acuerdo a la Tabla 1. La enzima mostró máxima actividad celulolítica a pH 5.5 y 60 °C. La actividad celulolítica mejoró 67 % con la adición de 1 mM de CoCl₂. Los estudios de estabilidad a pH mostraron que la enzima conserva más del 50 % de su actividad en un intervalo de pH de 4.5 a 6.5. Se evaluó la termoestabilidad de la enzima a 50, 60 y 70 °C y se observó que la enzima conserva más del 50 % de su actividad después de dos horas de incubación tanto a 50 como a 60 °C. Adicionalmente se determinaron los parámetros cinéticos Km y Vmax de la enzima, y actualmente se están estudiando la especificidad a sustrato, y los productos principales de hidrólisis por cromatografía en capa fina, Esto último nos permitirá determinar si la enzima actúa de modo endo o exo sobre el sustrato.

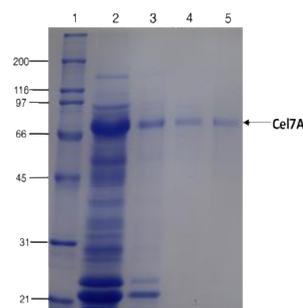


Figura 1. Resumen de Purificación de Cel7A; 1: Marcador molecular, 2: Extracto enzimático, 3: Purificación por Cromatografía de Intercambio Aniónico, 4 y 5: Cel7A purificada.

Tabla 1. Resumen de Purificación

Paso de purificación	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Sobrenadante de cultivo	368	460	0.8	100	1
Precipitación con Sulfato de Amonio (80%)	16.8	14.5	1.16	4.57	1.45
Cromatografía de Intercambio Aniónico	1.5	0.52	2.97	0.42	3.72
Cromatografía de Filtración en Gel	1.1	0.14	8.07	0.30	10.08

Conclusiones. La Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 se purificó de forma exitosa. Los péptidos obtenidos mostraron 97% de identidad con una glicosil hidrolasa de la familia 7 (GH7) de *T. terrestris* NRRL8126, y de 72 a 77% de identidad con otras celulasas fúngicas pertenecientes a la familia GH7.

Agradecimientos. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada No. CVU 561181 para el desarrollo del presente proyecto.

Bibliografía.

- Juturu y Wu (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.
- Gündüz y Calik (2016). Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 1-36.
- Wilson e Irwin (1999). Genetics and Properties of Cellulases. *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Zouari-Mechichi, Héla et al., (2006). Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 141-148.