

17.943

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



* 5 3 0 9 5 7 0 3 3 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE
ENDOGLUCANASA III DE *Trichoderma reesei* QM9414

TESIS DOCTORAL
por
RICARDO MACARRON LARUMBE

Directores:

Dra. Carmen Acebal Sarabia

Dra. M^a Pilar Castellón Borreguero

MADRID, JUNIO DE 1992

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de las Facultades de Ciencias Biológicas y de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de las Dras. Carmen Acebal y M^a Pilar Castellón, a quienes agradezco su apoyo incondicional y su valiosa amistad.

Gran parte de los resultados aquí expuestos se han obtenido en el Laboratorium voor Biochemie de la Universidad de Gante (Bélgica) bajo la tutela del Dr. Marc Claeysens, cuya entusiasta colaboración ha sido fundamental para la conclusión de esta Tesis.

También deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

- a los Dres. M^a Isabel de la Mata, Juan Manuel Domínguez y Pilar Estrada, compañeros de laboratorio, por su inestimable ayuda a lo largo de tantos años y su estímulo constante; a Angeles por haber hecho muy llevadero el agotador trabajo con el HPLC.*
- al Dr. José G. Gavilanes Franco, director del Departamento, y a los demás compañeros y profesores del Departamento por su cordialidad y buena disposición para echarme una mano cuando ha hecho falta.*
- al Dr. Jos Van Beeumen (Lab. Microbiologie, Universidad de Gante) por haber realizado el análisis de péptidos con enorme interés y dedicación.*
- a los Dres. Göran Pettersson y Jerry Ståhlberg del Biomedical Center de la Universidad de Uppsala (Suecia) por su gran ayuda en el inicio de este trabajo.*
- al Dr. Bernard Henrissat (CNRS, Grenoble) por cederme amablemente los estudios de homología.*
- al Dr. Eric Messens (Lab. Genetika, Universidad de Gante) por haberme facilitado el uso del detector "Photo Diode Array".*
- al Dr. Peter Tomme, a Madeleine Obreno y a Jules Vermeulen (Lab. Biochemie, Universidad de Gante) por su colaboración; a ellos, a Marc y Edith, y a los demás compañeros de Gante (Wilson, Marco, Bernd, Roberto, etc) por haber conseguido con su cariño, que me sintiera como en casa.*

INDICE

INTRODUCCION	1
1. APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DE LA CELULOSA	2
1.1. Naturaleza de los residuos lignocelulósicos	3
1.2. Hidrólisis enzimática de celulosa	4
2. MICROORGANISMOS CELULOLITICOS	5
3. CELULASAS DE <i>Trichoderma reesei</i>	6
3.1. Especificidad de sustrato	8
3.2. Mecanismo de la hidrólisis enzimática de la celulosa	9
3.3. Regulación de la síntesis de celulasas	11
3.4. Relación estructura-función en celulasas	12
3.5. Manipulación genética de <i>T. reesei</i> y de sus celulasas	16
4. ESTUDIOS PREVIOS SOBRE ENDOGLUCANASA III DE <i>T. reesei</i>	17
5. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	18
MATERIALES Y METODOS	20
1. MATERIALES	21
2. FERMENTACION DEL HONGO	21
2.1. Mantenimiento de la cepa	21
2.2. Medio de producción de celulasas	22
2.3. Inóculo	22
2.4. Crecimiento del hongo	22
3. PURIFICACION DE EG III	23
3.1. Precipitación con sulfato amónico	23
3.2. Cromatografía en DEAE-Sepharose a pH 7.0	23
3.3. Cromatografía en Ultrogel Aca-44	25
3.4. Cromatografía en DEAE-Sepharose a pH 6.5	25

4. DETERMINACIONES ANALITICAS	25
4.1. Cuantificación de proteína	25
4.2. Valoración de azúcares reductores	25
4.3. Valoración de glucosa	26
4.4. Separación y análisis de celooligosacáridos y derivados por HPLC	26
5. ENSAYOS ENZIMATICOS. ANALISIS DE DATOS	27
5.1. Actividad y adsorción sobre celulosa microcristalina (Avicel)	27
5.2. Actividad sobre carboximetilcelulosa (CMC)	27
5.3. Actividad sobre sustratos cromofóricos: CNP(Glc) ₃ y MeUmb(Glc) ₃	28
5.4. Actividad sobre celooligosacáridos	28
5.5. Actividad sobre mananos	28
5.6. Actividad sobre xilano	29
5.7. Actividad β-glucosidasa	29
6. TECNICAS ELECTROFORETICAS	29
6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	29
6.2. Isoelectroenfoque analítico	30
6.3. Curva de titulación	30
6.4. Localización de actividades enzimáticas en los geles	30
7. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE EG III	30
7.1. Determinación de la masa molecular	30
7.2. Determinación del punto isoeléctrico	31
7.3. Análisis de aminoácidos	31
7.4. Centrifugación analítica	31
7.5. Rotura con bromuro de cianógeno	31
7.6. Determinación de grupos sulfhidrilo libres	32
8. EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA CINETICA ENZIMATICA	32
9. MODIFICACION QUIMICA DE EG III	33
9.1. Modificación con dietilpirocarbonato (DEPC)	33
9.2. Modificación con tetranitrometano (TNM)	33
9.3. Modificación con carbodiimidias (EDC y EAC)	33
9.4. Modificación con N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ)	33
9.5. Modificación con reactivo K de Woodward (RKW)	34
9.6. Estudios de protección	34

10. MODIFICACION DE TRIPTOFANOS CON N-BROMOSUCCINIMIDA (NBS)	34
10.1. Reacción con NBS	34
10.2. Cálculo del número de Trp oxidados	35
10.3. Preparación de formas de EG III con distinto grado de oxidación (W_{1ox} y W_{2ox})	35
10.4. Estudios de termoestabilidad	35
10.5. Espectros de dicroísmo circular	35
11. MARCAJE DE AFINIDAD DE EG III CON 4',5'-EPOXIPENTIL- β -CELOBIOSIDO (EPO5)	36
11.1. Reacción de inactivación de EG III con epoxialquil β -celobiósidos	36
11.2. Preparación de EPO5-EG III	36
12. ANALISIS DE PEPTIDOS	36
12.1. Digestión con tripsina	36
12.2. Digestión con proteasa V8	36
12.3. Separación de péptidos por HPLC	36
12.4. Secuenciación amino-terminal	37
12.5. Determinación de la masa molecular	37
RESULTADOS	38
1. PURIFICACION E IDENTIFICACION DE EG III	39
1.1. Purificación de EG III	39
1.2. Propiedades moleculares de EG III	42
1.3. Efecto de pH, temperatura y fuerza iónica en la estabilidad y actividad de EG III	44
2. ESPECIFICIDAD Y MODO DE ACCION DE EG III	44
2.1. Actividad sobre sustratos cromofóricos	44
2.1.1. Estudios de partición con metanol	46
2.2. Actividad sobre celooligosacáridos	48
2.3. Actividad sobre sustratos celulósicos	49
2.4. Actividad sobre mananos	50

3. IDENTIFICACION DE RESIDUOS ESENCIALES DE EG III	52
3.1. Efecto del pH y la temperatura en la cinética de una reacción catalizada por EG III	52
3.2. Modificación de histidinas con dietilpirocarbonato (DEPC)	53
3.3. Modificación de tirosinas con tetranitrometano (TNM)	53
3.4. Modificación de triptófanos con N-bromosuccinimida (NBS)	54
3.4.1. Extensión y especificidad de la modificación	55
3.4.2. Protección con ligandos	56
3.4.3. Efecto de la modificación en la actividad catalítica y en la capacidad de adsorción a celulosa	57
3.4.4. Efecto de la modificación en la termoestabilidad y estructura secundaria	59
3.4.5. Identificación de un residuo de Trp esencial en el dominio de unión a celulosa	60
3.4.6. Identificación de un residuo de Trp esencial en el dominio catalítico	64
3.5. Modificación de grupos carboxilo con agentes químicos específicos	66
3.6. Modificación de un carboxilo esencial con el marcador de afinidad 4',5'-epoxipentil- β -celobiósido (EPO5)	67
3.6.1. Inactivación de EG III por epoxialquil β -celobiósidos. Efecto de la longitud del brazo aglicónico	68
3.6.2. Especificidad de la inactivación	68
3.6.3. Cinética de la inactivación por EPO5	69
3.6.4. Dependencia con el pH de la inactivación por EPO5	71
3.6.5. Identificación del grupo carboxilo esencial unido a EPO5	71
APENDICE. Análisis cinético de la hidrólisis enzimática de sustratos con dos vías alternativas de ataque.	74

DISCUSION	76
1. PURIFICACION Y PROPIEDADES MOLECULARES DE EG III	77
2. ESPECIFICIDAD Y MODO DE ACCION DE EG III	78
2.1. Modelo de organización en subsitios del centro activo	79
2.2. Mecanismo cinético	80
2.3. Actividad sobre mananos	80
3. RESIDUOS DE TRIPTOFANO ESENCIALES	81
4. IDENTIFICACION DE DOS GRUPOS CARBOXILO ESENCIALES:	
MECANISMO QUIMICO DE EG III	85
4.1. Estudios de pH: Glu218	85
4.2. Marcaje de afinidad: Glu329	85
4.3. Mecanismo químico de EG III	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFIA	91

ABREVIATURAS

Avicel	celulosa microcristalina para cromatografía en capa fina
CBH	celobiohidrolasa, 1,4-β-D-glucan celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)
CMC	carboximetilcelulosa
CNBr	bromuro de cianógeno
CNP	2-cloro-4-nitrofenol
CNPGlc	2'-cloro-4'nitrofenil-β-D-glucósido
CNP(Glc) ₂	2'-cloro-4'nitrofenil-β-celobiósido
CNP(Glc) ₃	2'-cloro-4'nitrofenil-β-celotriósido
DEAE	dietilaminoetilo
DEPC	dietilpirocarbonato
DTE	1,4-ditioeritritol
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DUC	dominio de unión a celulosa
EAC	1-etil-3-(4-azonio-4,4-dimetilpentil)-carbodiimida
EDC	1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida
EEDQ	N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína
EG	endoglucanasa, 1,4-β-D-glucan glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4)
EG III W _{nox}	endoglucanasa III con <i>n</i> Trp oxidados por NBS
EPO3	2',3'-epoxipropil-β-celobiósido
EPO4	3',4'-epoxibutil-β-celobiósido
EPO5	4',5'-epoxipentil-β-celobiósido
EPO5-EGII	endoglucanasa III unida a pentil-β-celobiósido
GuHCl	cloruro de guanidinio
HCA	análisis de secuencias proteicas por grupos hidrofóbicos ("hydrophobic cluster analysis")
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IAAm	iodoacetamida
LBG	goma de algarroba (<i>Ceratonia siliqua</i>), galactomanano ("locust bean gum")
MES	ácido 2-N-morfolin-etanosulfónico
MeUmb	4-metilumbeliferona
MeUmbGlc	4'-metilumbeliferil-β-D-glucósido
MeUmb(Glc) ₂	4'-metilumbeliferil-β-celobiósido
MeUmb(Glc) ₃	4'-metilumbeliferil-β-celotriósido
NBS	N-bromosuccinimida
PDMS	espectroscopía de masas de desorción de plasma ("plasma desorption mass spectrometry")
Proteasa V8	endoproteinasa Glu-C (EC 3.4.21.19) de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa V8
RKW	reactivo K de Woodward, N-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato
SDS	dodecilsulfato sódico
TNM	tetranitrometano

INTRODUCCION

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la Naturaleza. Su potencial energético ha sido aprovechado desde tiempos remotos por numerosos organismos; más recientemente ha atraído la atención de los biotecnólogos, que estudian los medios para utilizarla como fuente de combustibles y otros productos químicos de interés industrial.

La investigación en este campo comenzó en los años 50, cuando el equipo de los Drs. Reese y Mandels, del Ejército de los Estados Unidos, evaluó la capacidad celulolítica de más de 14 000 microorganismos. La finalidad de su trabajo era determinar las causas de la degradación de los materiales celulósicos (uniformes, cordajes, tiendas) observada durante la Segunda Guerra Mundial, en las unidades militares desplegadas en el Pacífico.

A partir de la crisis del petróleo de los años 70, el estudio de la hidrólisis de la celulosa pasó a ser una línea de investigación prioritaria en muchos países, habida cuenta de sus potencialidades como fuente de energía alternativa, renovable y limpia. Pronto se hizo evidente, que la viabilidad económica de esta alternativa energética estaba seriamente limitada por la falta de conocimientos básicos sobre los complejos mecanismos biológicos que operan en la celulolisis. El interés de los gobiernos en la financiación de esta línea de investigación decreció en los años 80; sin embargo, el empeño de microbiólogos, bioquímicos y genéticos por resolver las incógnitas planteadas en este atractivo campo de investigación ha permitido la continuidad del proyecto.

Teniendo siempre en el horizonte la idea original de aprovechar la celulosa como fuente de energía, otras aplicaciones industriales se han derivado del conocimiento adquirido a lo largo de estos años. Actualmente las enzimas celulolíticas se emplean en la elaboración de detergentes para lavar ropa, y en la clarificación de vinos y cervezas (Pokorny y col., 1990); el dominio de unión a celulosa presente en muchas celulasas constituye una interesante herramienta biotecnológica, que puede facilitar la purificación o la inmovilización de cualquier proteína por fusión a nivel génico (Ong y col., 1989); la enorme capacidad de producción de celulasas de algunos mutantes de microorganismos celulolíticos puede ser aprovechada para la secreción eficiente de proteínas heterólogas (Teeri y col., 1990).

1. APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DE LA CELULOSA

La producción anual de celulosa por fotosíntesis se estima en 4×10^{10} Tm (Coughlan, 1985). De esta cantidad sólo un 2% es aprovechada por el hombre mediante combustión u otros procesos industriales (Vega y col., 1983); el resto se desecha en forma de residuos, o escapa al control humano. Cerca de un 20% de esta biomasa no utilizada (unas 8×10^9 Tm, con un contenido energético próximo a 3×10^{18} J), podría recuperarse como materia prima para la producción de combustibles, alimentos u otros productos químicos de interés (Detroy y Julian, 1982). Para este fin, es esencial la degradación de la celulosa hasta glucosa, pero las características estructurales de este polisacárido y su asociación con hemicelulosa y lignina dificultan enormemente su hidrólisis.

1.1. Naturaleza de los residuos lignocelulósicos

La celulosa forma parte de las paredes de las células vegetales en íntima asociación con lignina y hemicelulosas, constituyendo en conjunto la denominada lignocelulosa. La proporción de estos polímeros varía según el origen del residuo lignocelulósico considerado.

La **celulosa** está formada por cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. El grado de polimerización, es decir, el número de restos de glucosa que forman una molécula de celulosa, puede oscilar entre 50 y 15 000 (Gilbert y Tsao, 1983). Las moléculas de glucosa se encuentran en conformación de silla, giradas 180° cada una con respecto a la siguiente. Por ello, desde un punto de vista estereoquímico, es la celobiosa la unidad que se repite (Fig. 1).

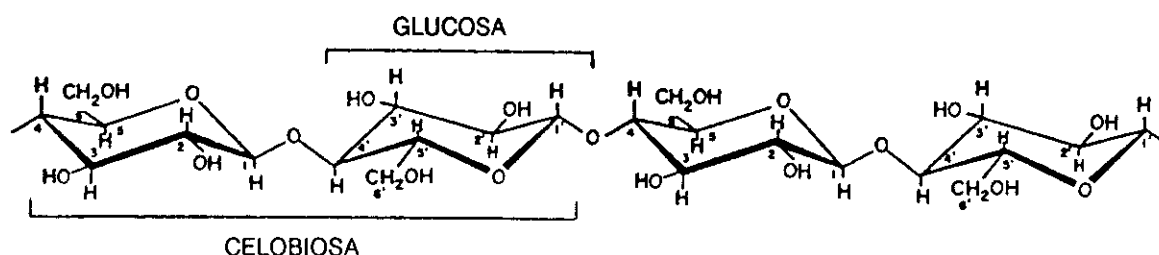


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.

Las cadenas de celulosa se unen mediante puentes de hidrógeno, formando microfibrillas, en las que las moléculas de celulosa se disponen en ordenación antiparalela (Lützen y col., 1983). A su vez, varias microfibrillas se agrupan en fibrillas, cuya agregación da origen a las fibras de celulosa. Esta estructura se mantiene gracias a un elevado número de puentes de hidrógeno y de interacciones de van der Waals, que proporcionan en conjunto una unión muy fuerte, haciendo a la fibra de celulosa insoluble y muy resistente al ataque químico.

Aunque no se conoce exactamente la estructura fibrilar de la celulosa, todos los modelos propuestos coinciden en señalar la existencia de regiones cristalinas, con alto grado de ordenación, que se alternan con regiones amorfas, menos ordenadas (Cowling y Kirk, 1976; Fan y col., 1987). La proporción en que aparecen varía según el origen de la celulosa y el tratamiento a que se someta.

La **hemicelulosa** esta constituida por varios heteropolisacáridos de composición distinta en cada planta. Los más abundantes son xilanos, mananos y galactanos. Se trata de polímeros cortos y en general ramificados, incapaces de agregar, y por tanto, susceptibles de hincharse y dispersarse fácilmente en agua. Su función principal en la pared vegetal es la de unir la celulosa y la lignina. (Fan y col., 1987).

La **lignina** es un polímero muy complejo y de elevado peso molecular. Se forma por deshidrogenación enzimática de alcoholes derivados del fenilpropano, seguida por una polimerización no controlada, lo que hace que la lignina no tenga una estructura definida, ni siquiera en una misma especie vegetal (Barceló y col., 1987).

El papel de la lignina es cementar los polisacáridos de la pared vegetal y actuar como barrera de la degradación microbiana del material lignocelulósico (Blanch y Wilkes, 1983). La íntima unión de la lignina al armazón vegetal es un impedimento para la hidrólisis de celulosa,

de la que sólo se consigue separar mediante tratamientos energéticos. Su propia hidrólisis requiere severas condiciones debido a su compleja estructura química.

1.2. Hidrólisis enzimática de celulosa

La hidrólisis de la celulosa hasta glucosa puede realizarse enzimática o químicamente. La **hidrólisis enzimática** ha sido investigada intensamente en los últimos 20 años. Hasta el momento no se ha instalado ninguna planta industrial para hidrolizar celulosa por vía enzimática; no obstante, existen plantas piloto en Japón (Fan y col., 1987) y Francia (Pourquié y col., 1988), y la tecnología desarrollada está muy cercana al umbral de viabilidad comercial.

La **hidrólisis química** implica generalmente el uso de ácidos. En 1913 se instaló en Carolina del Sur (EEUU) una planta para hidrolizar por esta vía desechos procedentes de una serrería. La fábrica se cerró a raíz de la caída de los precios del azúcar. En Alemania, durante la Segunda Guerra Mundial, se empleó la hidrólisis ácida para la obtención de azúcar (Fan y col., 1987).

La sacarificación de residuos lignocelulósicos por vía enzimática requiere un **pretratamiento** para aumentar la susceptibilidad de los mismos a la hidrólisis. Sin un pretratamiento adecuado, la biodegradación de la lignocelulosa es lenta y con un bajo rendimiento en azúcares fermentables (Dale, 1987). La hidrólisis química es ventajosa en este aspecto ya que no es necesario pretratar la materia prima. Sin embargo, la hidrólisis enzimática presenta varias ventajas sobre la química: las **celulasas**, enzimas que llevan a cabo la degradación de la celulosa, no forman productos secundarios; al final del proceso no se requiere una neutralización del producto; los costes se reducen porque las temperaturas de trabajo son suaves, no hay necesidad de emplear materiales resistentes a la corrosión, y el rendimiento en glucosa es mayor (Fan y col., 1987).

El producto de la hidrólisis, la **D-glucosa**, tiene múltiples posibilidades de uso:

- Refinada, puede destinarse a la industria alimentaria.
- Se puede transformar por isomerización en fructosa, que es un potente edulcorante.
- Puede ser sustrato para **procesos fermentativos** que rinden:
 - etanol
 - biomasa microbiana
 - biopolímeros
 - productos químicos y fármacos tales como antibióticos, L-aminoácidos, ácido cítrico, acetona, butanol, etc.

En la Figura 2 se esquematiza el proceso global de sacarificación de lignocelulosa para obtener productos de interés industrial. Los gastos de producción de las enzimas celulolíticas suponen una importante partida de los costes del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos. Avanzar en el conocimiento de las celulasas, de su biosíntesis, propiedades y mecanismo de acción, seleccionar buenos productores y buenas técnicas de producción, ha abaratado esta biotecnología hasta hacerla casi competitiva con otras tecnologías empleadas en la producción de azúcares (fundamentalmente la hidrólisis de almidones). Para que llegue a ser aplicable industrialmente debe continuar el esfuerzo investigador que acabará por desvelar las incógnitas que rodean a este complejo proceso biológico: ¿cuáles son los mecanismos celulares de regulación de la biosíntesis de celulasas?, ¿qué papel desempeña cada tipo de celulasa en la degradación de celulosa?, ¿cuál es la causa del sinergismo encontrado entre algunas celulasas?, ¿existe algún factor, todavía no identificado, que disgrege las fibrillas de celulosa para hacerla más susceptible al ataque enzimático?.

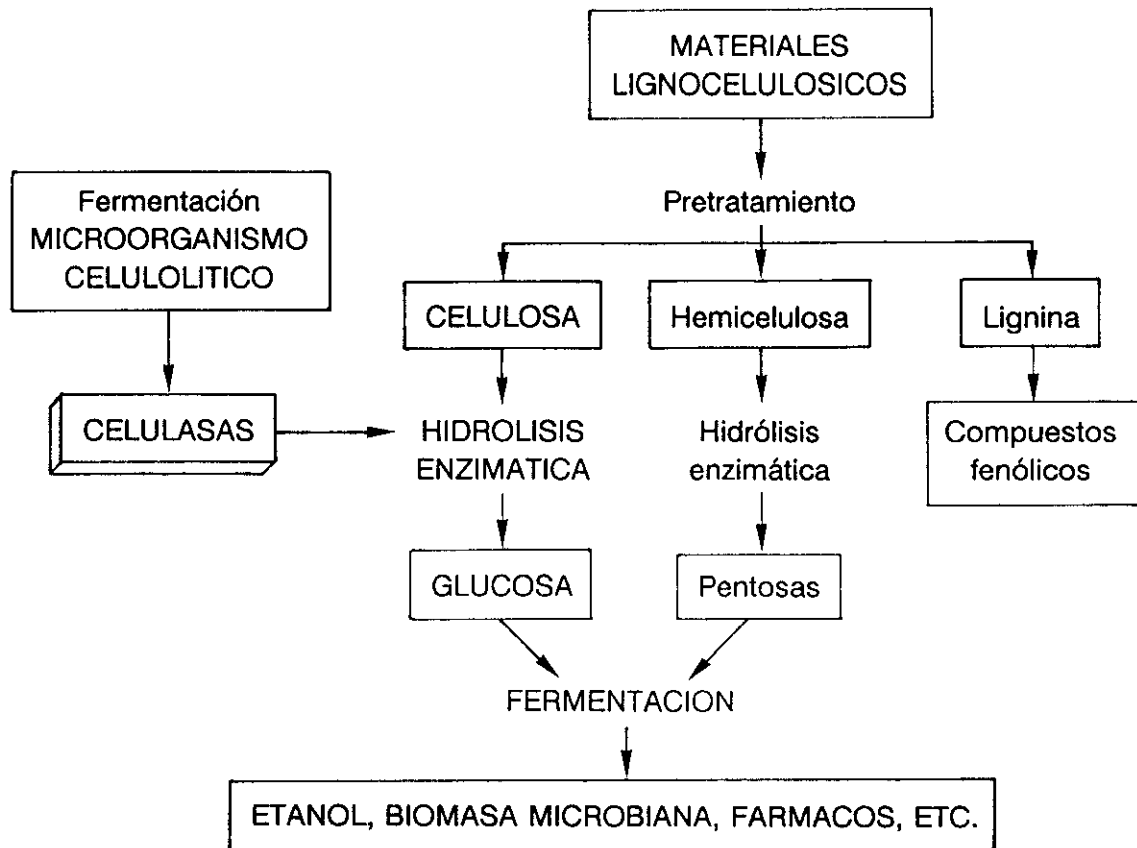


Figura 2. Esquema del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos. El aprovechamiento de hemicelulosa y lignina incidiría favorablemente en el balance económico global.

2. MICROORGANISMOS CELULOLITICOS

La degradación natural de la celulosa es llevada a cabo por numerosos microorganismos. Entre éstos hay bacterias y hongos, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos. En la Tabla I se recogen los microorganismos celulolíticos mejor caracterizados.

Todos los organismos capaces de degradar celulosa cristalina secretan un conjunto de celulasas con diferentes especificidades y modo de acción, que actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa (Béguin, 1990). Dicho conjunto se ha venido denominando sistema o complejo celulasa. Esta última denominación es confusa ya que sólo en ciertas bacterias anaerobias las enzimas celulolíticas se agrupan en complejos multienzimáticos extracelulares; el caso más conocido es el de *Clostridium thermocellum* que secreta un complejo celulolítico con 14-18 polipéptidos distintos, formando una estructura muy estable denominada celulosoma (Lamed y Bayer, 1988).

Tabla I. Microorganismos celulolíticos más estudiados (Robson y Chambliss, 1989; Coughlan y Ljungdahl, 1988).

BACTERIAS	HONGOS
· <i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	· <i>Aspergillus</i> spp.
· <i>Bacillus</i> spp.	· <i>Fusarium solani</i>
· <i>Cellulomonas</i> spp.	· <i>Neocallimastix frontalis</i>
· <i>Clostridium</i> spp.	· <i>Penicillium</i> spp.
· <i>Erwinia chrysanthemi</i>	· <i>Schizophyllum commune</i>
· <i>Microbispora bispora</i>	· <i>Sporotrichum pulverulentum</i>
· <i>Ruminococcus albus</i>	· <i>Talaromyces emersonii</i>
· <i>Streptomyces</i> spp.	· <i>Trichoderma</i> spp.
· <i>Thermonospora</i> spp.	

Uno de los microorganismos celulolíticos más extensamente estudiados ha sido el hongo aerobio y mesófilo *Trichoderma reesei* (e.g. Kubicek y col., 1990a). Se aisló en 1944 en la isla de Bougainville (Nueva Guinea), dentro de una prospección realizada por el cuerpo científico del Ejército de los Estados Unidos, que estudiaba la alarmante degradación de los tejidos de algodón (tiendas, vestimenta, cordajes) en las unidades desplegadas en el Pacífico Sur. Inicialmente se clasificó como *T. viride*. E. Simmons consideró que se trataba de una nueva especie, y la bautizó en 1977 con su denominación actual, en honor de Elwyn T. Reese, pionero en el estudio de las celulasas junto con su colaboradora Mary Mandels; ambos seleccionaron este hongo, entre 14 000 microorganismos, por su extraordinaria capacidad celulolítica (Simmons, 1977; Reese y Mandels, 1984).

T. reesei secreta el sistema enzimático celulasa en cantidades importantes, siendo capaz de hidrolizar totalmente celulosa cristalina; sus enzimas son estables durante varios días a 45°C y pH 5. De la estirpe original "QM 6a" se han derivado por mutaciones al azar mediante distintas técnicas (UV, nitrosoguanidina, acelerador lineal, dietil sulfato, radiación) más de 50 cepas superproductoras (El-Gogary y col., 1990). La estirpe estudiada en nuestro laboratorio (Acebal y col., 1985) y empleada en la realización del presente trabajo es la QM 9414. Data de 1971 y ha sido una de las más intensamente investigadas por bioquímicos y genéticos, a pesar de que actualmente se dispone de cepas mejores productoras de celulasas (Pourquié y col., 1988).

3. CELULASAS DE *Trichoderma reesei*

Las celulasas de origen fúngico se han agrupado tradicionalmente en tres categorías: **celobiohidrolasas** (CBH; exoglucanasas; EC 3.2.1.91), que atacan las moléculas de celulosa por su extremo no reductor, liberando secuencialmente subunidades de celobiosa; **endoglucanasas** (EG; EC 3.2.1.4), que rompen al azar enlaces internos de las moléculas de celulosa; β -

glucosidasas (EC 3.2.1.21), que hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular. En sentido estricto sólo las EGs y CBHs se consideran celulasas; las β -glucosidasas participan indirectamente en la degradación de celulosa al hidrolizar celobiosa que inhibe a las CBHs.

La composición del sistema celulasa de *T. reesei* ha sido estudiada por diferentes grupos de investigación, con resultados generalmente contradictorios en cuanto al número de enzimas y sus propiedades moleculares (M, pI) (Griztali y Brown, 1979; Shoemaker y col., 1983; Bhikhabhai y col., 1984; Schülein, 1988). La confusión en este punto se ha debido a varias causas:

- existencia real de varios genes; hasta el momento se han clonado en *E. coli* y secuenciado los genes de dos CBHs, CBH I (Teeri y col., 1983) y CBH II (Chen y col., 1987), y de dos EGs, EG I (Penttilä y col., 1986) y EG III (Saloheimo y col., 1988); otra EG, denominada "EG de bajo peso molecular" (EG LMW) ha sido caracterizada y parece no tener relación con ninguna de las dos secuenciadas (Ülker y Sprey, 1990).

- modificaciones post-traduccionales de los productos génicos, tales como proteolisis (Ståhlberg y col., 1988), glicosilación o desamidación. Se han descrito varias isoenzimas para cada una de las enzimas mencionadas, que aparecen tardíamente en los caldos de cultivo del hongo (Messner y col., 1988; Biely, 1990).

- dificultades en la purificación y caracterización de las diferentes celulasas debido a la similitud de sus masas moleculares (en el intervalo de 50 a 60 kDa) y de sus puntos isoeléctricos (de 3.5 a 6.5) (EG LMW es la única con propiedades peculiares) (Biely, 1990), a su naturaleza glicoproteica (Bhikhabhai y col., 1984), a la utilización tardía de sustratos que permiten la detección específica de cada actividad celulolítica (Claeyssens, 1988), y a la capacidad de agregar de algunas de ellas (Sprey y Lambert, 1983; Domínguez y col., 1992).

La composición del sistema celulasa de *T. reesei* ha quedado establecida como se recoge en la Tabla II, después del Congreso Internacional Tricel 89 (Kubicek y col., 1990a).

Tabla II. Composición del sistema celulasa de *Trichoderma reesei* (Biely, 1990; Ülker y Sprey, 1990).

ENZIMA	M ^a (kDa)	pI ^b	% ch ^c (% (p/p))
<u>Celobiohidrolasas</u>			
CBH I	62 (58)	3.4-3.9	6
CBH II	59 (50)	4.4-6.5	18
<u>Endoglucanasas</u>			
EG I	51 (46)	3.3-4.4	10
EG III	50 (42)	3.8-6.7	15
EG LMW	25	7.5	0

^a Los valores entre paréntesis representan la masa deducida a partir de la secuencia de la proteína.

^b Intervalo de puntos isoeléctricos de las distintas isoenzimas.

^c Porcentaje de carbohidratos.

3.1. Especificidad de sustrato

La clasificación de las celulasas como endoglucanasas o celobiohidrolasas se ha basado clásicamente en su capacidad para hidrolizar sustratos celulósicos de distinta naturaleza; las enzimas activas sobre celulosas sustituidas solubles, carboximetilcelulosa (CMC), e inactivas sobre celulosa cristalina, Avicel, se consideraban EGs, y CBHs aquellas capaces de hidrolizar Avicel pero no CMC. La simple división en dos subgrupos de las enzimas celulolíticas es insuficiente para explicar fenómenos como el sinergismo entre algunos componentes del sistema, o la razón de ser de varios genes para cada tipo de enzima. Se hace necesaria, en consecuencia, una diferenciación más rigurosa de las celulasas en función de su especificidad de sustrato; ésta ha sido posible gracias al empleo de sustratos de baja masa molecular: celodextrinas (Pereira y col., 1988), y derivados cromofóricos de celooligosacáridos (Claeyssens, 1988). Las especificidades frente a metilumbeliferil β -glicósidos de las principales celulasas de *T. reesei* se recogen en la Figura 3.

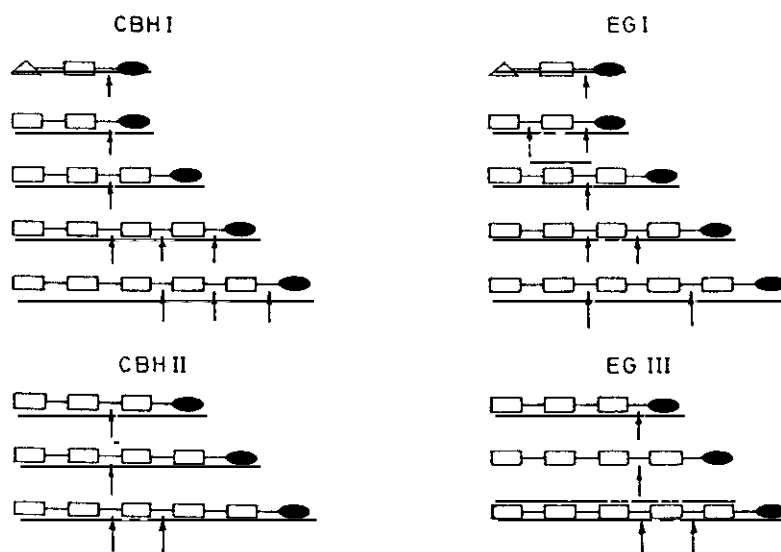


Figura 3. Principales puntos de ataque de las celulasas de *T. reesei* a 4-metilumbeliferil- β -glicósidos derivados de celooligosacáridos y lactosa. Los productos se analizaron por HPLC. Símbolos: \square , residuos de β -galactopiranosilo; \square , residuos de β -glucopiranosilo; \bullet , grupos 4-metilumbeliferilo. (van Tilbeurgh y col., 1988).

Los sustratos cromofóricos son, además, de gran utilidad en la detección específica de las celulasas en geles de isoelectroenfoque o de electroforesis en condiciones no desnaturizantes (van Tilbeurgh y Claeyssens, 1985), así como en el estudio del mecanismo cinético de estas enzimas, imposible con los sustratos poliméricos clásicos por las dificultades que entraña su ensayo, y la no linealidad de las curvas de dilución enzimática correspondientes (Sharrock, 1988).

La multiplicidad de celulasas ha sido explicada por algunos autores teniendo en cuenta la rotación de 180° que presenta, en la molécula de celulosa, cada residuo de glucosa respecto del siguiente. Cada enlace glucosídico es estéricamente distinguible del siguiente, y, en consecuencia, podría haber dos tipos de EG y dos tipos de CBH, con distinta estereoespecificidad (Wood y col., 1988). Esta teoría no es válida, al menos en el caso de *T. reesei* (Sinnot, 1990).

La capacidad de algunas celulasas para degradar sustratos no celulósicos es un dato llamativo; EG I posee actividad xilanasa (Biely y col, 1991), EG I y EG III son activas sobre manano (Fig. 12, pág. 40) y ambas CBHs hidrolizan β -glucanos, que contienen enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4), más eficazmente que celulosa (Enari y Niku-Paavola, 1987). Hay que tener en cuenta que el sustrato natural del hongo es lignocelulosa y no celulosa pura. En los caldos de cultivo se encuentran además de celulasas, xilanasas (Biely, 1990) y mananasas (Fig. 12, pág. 40). Esclarecer el mecanismo de acción de una mezcla enzimática tan compleja sobre un sustrato igualmente complejo parece, hoy por hoy, lejano; no obstante, es el único camino para dilucidar inequívocamente la función biológica de cada componente.

3.2. Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa

El primer modelo para explicar el mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa fue propuesto por Reese en 1950 ; según este modelo, la celulosa sería activada por un factor de hinchamiento o activador, enzima no hidrolítica C_1 ; a continuación actuaría una enzima hidrolítica C_x ; la celobiosa y otros celooligosacáridos producidos, serían hidrolizados hasta glucosa por β -glucosidasa (Fig. 4) (Reese y col., 1950).

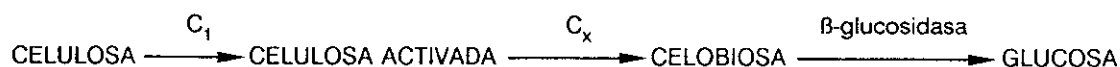


Figura 4. Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa según el modelo de Reese (Reese y col., 1950).

Pocos años después, Gilligan y Reese describieron por primera vez el **sinergismo** entre las enzimas celulolíticas en la digestión de la celulosa (Gilligan y Reese, 1954); la hidrólisis de sustratos insolubles por una combinación de EGs y CBHs es mucho más efectiva que lo que cabría esperar de la suma de sus capacidades hidrolíticas individuales (Mandels y Reese, 1964; Henrissat y col., 1985). Las bases moleculares del sinergismo no están aclaradas; el grado de sinergismo depende de la composición de las mezclas enzimáticas empleadas (Henrissat y col., 1985). También se ha observado sinergismo entre CBH I y CBH II (Henrissat y col., 1985), y en algunos casos ausencia de sinergismo entre CBH I y EG I (Niku-Paavola y col., 1986). CBH I parece actuar como una endoglucanasa en estas situaciones, o cuando hidroliza β -glucanos (Henrissat y col., 1985).

El análisis de la **adsorción** de las celulasas a las fibras de celulosa es fundamental en el estudio cinético de la hidrólisis, ya que es un prerrequisito para que tenga lugar la reacción (Fan y col. 1987). La capacidad de adsorción varía de una enzima a otra (Woodward y col. 1988; Kyriacou y col., 1989), y también es distinta la afinidad de cada celulasa por las distintas regiones presentes en el sustrato (Nieves y col., 1991). La adsorción debe jugar un papel importante en los fenómenos de sinergismo.

Probablemente, en la degradación de celulosa participan también otras enzimas como la celobiosa-oxidasa, detectada en caldos de cultivo de otros hongos, que oxida celobiosa y celodextrinas a sus correspondientes ácidos aldónicos. Una función de esta enzima puede ser la oxidación del extremo reductor formado tras la acción de una EG, evitando que el enlace pudiera formarse de nuevo por transglucosilación. La celobiono-lactona no sólo se ha encontrado en caldos de cultivo de *T. reesei*, sino que además es un potente y específico inductor de la síntesis de celulasas (Iyayi y col., 1989). La formación de fibras cortas de celulosa en los

primeros estadios de la celulolisis es dependiente de oxígeno (Vaheri, 1982).

Ninguno de los modelos propuestos (Montenecourt y Eveleigh, 1979; Enari y Niku-Paavola, 1987; Coughlan y Ljungdahl, 1988; Wood y col., 1988) explica todos los datos experimentales de que se dispone actualmente, y parece probable que cada tipo de sustrato sea hidrolizado de un modo distinto, por una combinación particular del arsenal de enzimas de que dispone el hongo (Knowles y col., 1988). Tampoco se puede descartar la existencia de alguna enzima o factor no enzimático (C_1 en el modelo de Reese), cuya detección no haya sido aún posible por la carencia de un método adecuado para ello (Wood, 1985).

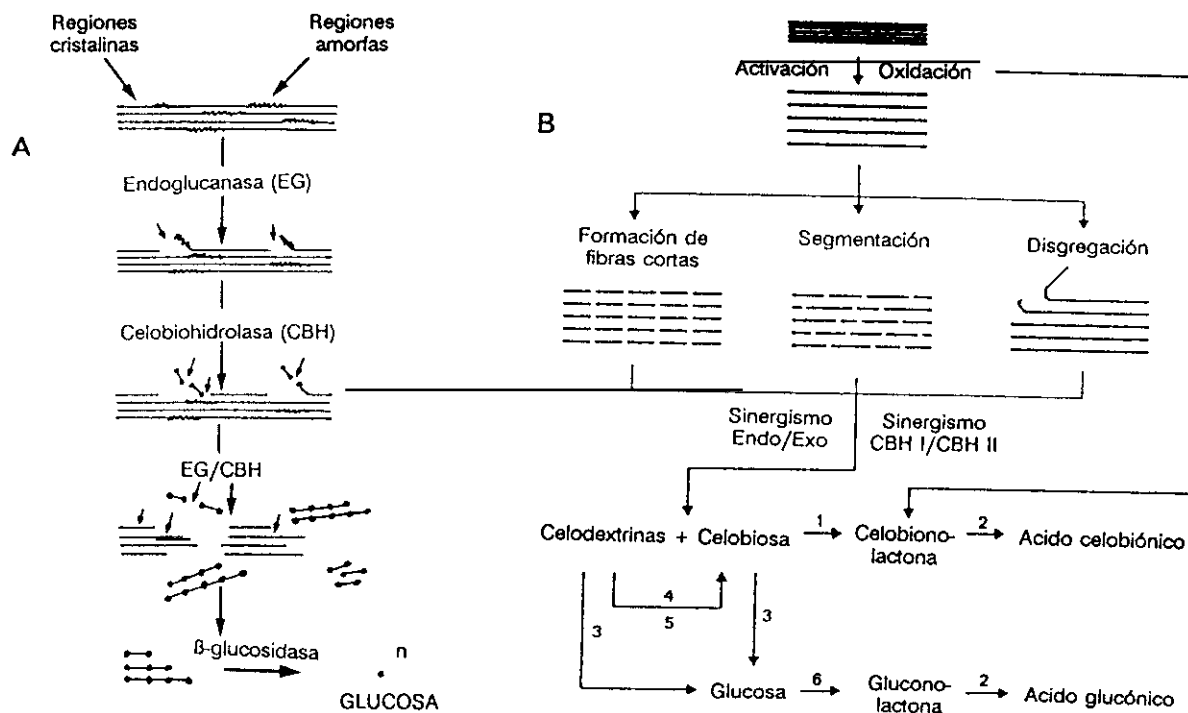


Figura 5. Modelos del mecanismo de hidrólisis enzimática de celulosa. **A)** Modelo de Montenecourt (Montenecourt y Eveleigh, 1979); **B)** Modelo de Coughlan (Coughlan y Ljungdahl, 1988, modificado). (1), celobiosa oxidasa/deshidrogenasa; (2), lactonasa; (3), β -glucosidasa; (4), endoglucanasa; (5), celobiohidrolasa; (6), glucosa oxidasa.

El modelo de Montenecourt (Fig. 5A) (Montenecourt y Eveleigh, 1979), se acepta generalmente como una simplificación válida del mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Béguin, 1990); las endoglucanasas efectuarían el ataque inicial por las regiones amorfas del sustrato, creando extremos libres sobre los que actuarían las celobiohidrolasas. La acción sinérgica de EGs y CBHs se repetiría hasta solubilizar totalmente la celulosa; la β -glucosidasa aceleraría la reacción al hidrolizar hasta glucosa, las celodextrinas y celobiosa liberadas por las celulasas.

Sin embargo, otros modelos como el de Enari (Enari y Niku-Paavola, 1987), postulan que el ataque inicial a las fibras de celulosa corre a cargo de las CBHs. El mecanismo real de hidrólisis debe parecerse más al esquema propuesto por Coughlan (Fig. 5B) (Coughlan y Ljungdahl, 1988), que contempla la participación de otros factores, y hace especial hincapié en la activación inicial de la celulosa (volvemos de nuevo a la hipótesis de Reese) por una o más

vías alternativas. Estudios de microscopía electrónica han demostrado la capacidad de CBH I para disgregar las fibras de celulosa (Chanzy y col., 1983).

3.3. Regulación de la síntesis de celulasas

T. reesei secreta celulasas cuando hay celulosa en el medio de cultivo, siguiendo el principio de economía celular; pero, ¿cómo un sustrato insoluble puede inducir la síntesis de proteínas?. Más de treinta años después de que fuera planteada esta cuestión (Mandels y Reese, 1960), tenemos un conocimiento tan sólo aproximado de los mecanismos de inducción (Kubicek y col., 1990b). En la Figura 6 se esquematizan los mecanismos que regulan la síntesis de celulasas.

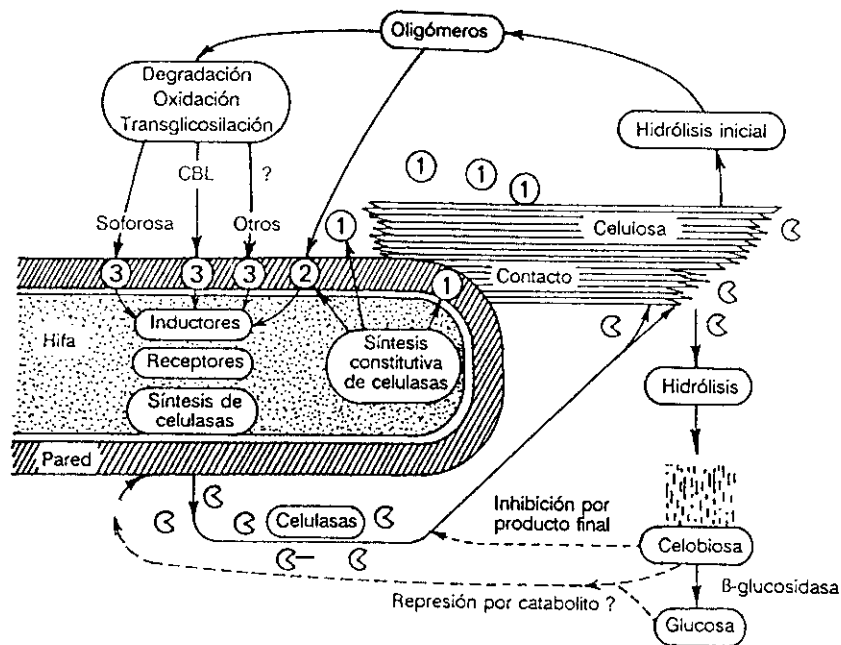


Figura 6. Modelo de la regulación de la síntesis de celulasas en *T. reesei*. (1) celulasas constitutivas; (2) β-glucosidasa unida a membrana; (3) β-disacárido permeasa; CBL, 1,5-celobionolactona. (El-Gogary y col., 1990, modificado).

La existencia de niveles basales de celulasas constitutivas ha sido descrita por varios grupos (El-Gogary y col., 1989; Messner y Kubicek, 1991); también ha quedado establecido su papel fundamental en la inducción de la síntesis de celulasas (El-Gogary y col., 1989). Se ha postulado la necesidad de un contacto físico entre la celulosa y la pared miceliar para que se inicie la hidrólisis del polímero (Binder y Ghose, 1978); parece probable que las celulasas detectadas en las paredes del conidio (CBH I y, especialmente CBH II) actúen como sensores para detectar la presencia de celulosa en el medio y disparar el mecanismo inductivo (Messner y col., 1991).

Los oligómeros producidos por el ataque inicial de las celulasas constitutivas son hidrolizados por β-glucosidasa. Existe una β-glucosidasa constitutiva, ligada a la membrana plasmática, y esencial para la inducción de la síntesis de celulasas (Kubicek, 1987). La actividad transglucosilasa de esta enzima provoca la formación de soforosa (β-(1→2)-glucobiosa), inductor de la síntesis de celulasas (Mandels y col., 1962). La soforosa también se puede formar extracelularmente por transglucosilación catalizada por otras celulasas como EG I (Claeyssens

y col., 1990a). La presencia de inductores adicionales ha sido propuesta por varios autores, debido a que la soforosa no induce la síntesis de todo el sistema celulasas (Sternberg y Mandels, 1979; Messner y col., 1988). Ni celobiosa, ni celooligosacáridos de mayor grado de polimerización parecen tener capacidad inductora (Kubicek y col., 1990b). Sin embargo, la 1,5-celobionolactona se ha revelado como un potente inductor de la formación de celulasas (Iyayi y col., 1989); la celobionolactona procede probablemente de la acción conjunta de una celulosa oxidasa y de una CBH.

La entrada en la célula de los inductores formados en el medio extracelular es posible a través de una β -disacárido permeasa localizada en la pared del hongo (Fritscher y col., 1990). Se desconoce la naturaleza de los receptores que transducen el efecto inductor. Recientes estudios (Messner y Kubicek, 1991) demuestran que la regulación de la síntesis de celulasas tiene lugar sobre la transcripción y no sobre la traducción como se había propuesto con anterioridad (Nisizawa y col., 1972). Dichos estudios descartan, por otra parte, que la represión por catabolito sea un mecanismo regulador de la síntesis de celulasas, como se aceptaba tradicionalmente (Kubicek y col., 1990b).

3.4. Relación estructura-función en celulasas

Las principales celulasas de *T. reesei* (CBH I, CBH II, EG I y EG III) comparten una arquitectura común: el centro activo se localiza en un dominio o núcleo catalítico; uno de los extremos de la proteína consiste en un dominio de unión a celulosa; ambos dominios se unen mediante una bisagra glicosilada (Fig. 7) (Claeyssens y Tomme, 1990). Más de 60 celulasas y xilanasas de diverso origen han sido clonadas y secuenciadas. Muchas de estas β -glicanasas presentan una organización similar a la descrita para las celulasas de *T. reesei* (Gilkes y col., 1991).

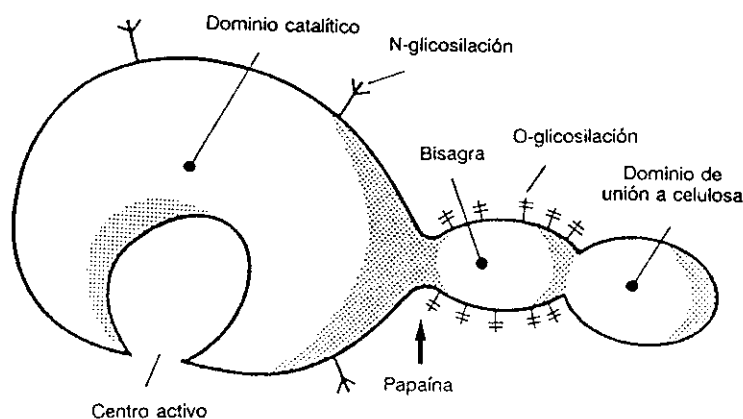


Figura 7. Modelo de estructura tridimensional de una enzima celulolítica de *T. reesei* (Knowles y col., 1987). Se señala el punto de ataque proteolítico por papaína en CBH I y CBH II (Claeyssens y Tomme, 1990).

Los **dominios** o **núcleos catalíticos** comprenden la mayor parte de cada celulasa de *T. reesei* (unos 300 aminoácidos). Análisis por proteólisis limitada de CBH I y CBH II (Tomme y col., 1988), y el estudio del núcleo catalítico de EG III aislado del caldo de cultivo del hongo (Ståhlberg y col., 1988), permitieron demostrar que los núcleos catalíticos pueden actuar como entidades independientes conservando intacta su capacidad para hidrolizar sustratos solubles;

disminuye drásticamente, en cambio, su actividad sobre celulosa nativa, de lo que se deduce que el núcleo contiene el centro activo de la enzima, pero no el sitio de unión a celulosa. El análisis por grupos hidrofóbicos (HCA, Gaboriaud y col., 1987) de las secuencias conocidas de celulasas (cerca de 50) ha permitido clasificar en seis familias sus núcleos catalíticos, a pesar de la aparente diversidad entre las celulasas de distinto origen o incluso procedentes de un mismo organismo (en *T. reesei* sólo CBH I y EG I exhiben un alto grado de homología) (Henrissat y col., 1989; Gilkes y col., 1991). En esta clasificación EG III queda incluida en la familia A, la más numerosa; CBH II está encuadrada en la familia B; CBH I y EG I pertenecen ambas a la familia C (Tabla III).

Tabla III. Clasificación en familias de las celulasas en función de la homología determinada por HCA de sus núcleos catalíticos (Henrissat y col., 1989). El análisis de secuencias publicadas con posterioridad a este trabajo ha supuesto la incorporación de nuevos miembros a cada familia (Gilkes y col., 1991).

Familia	Código	Enzima	Organismo
A	A ₁	EG	<i>Bacillus subtilis</i>
	A ₂	EG C	<i>Clostridium thermocellum</i>
	A ₃	EG III	<i>Trichoderma reesei</i>
	A ₄	EG E	<i>Clostridium thermocellum</i>
	A ₅	EG B	<i>Clostridium thermocellum</i>
	A ₆	EG	<i>Bacillus sp.</i> strain 1139
	A _{7, A₈}	EG	<i>Bacillus sp.</i> strain N-4 (genes pNK1 and pNK2)
	A ₉	EG Z	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
	A ₁₀	EG I	<i>Schizophyllum commune</i>
	B	B ₁	CBH II
B ₂		EG A	<i>Cellulomonas fimi</i>
B ₃		EG	<i>Streptomyces sp.</i> (KSM-9)
C	C ₁	CBH I	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	C ₂	CBH I	<i>Trichoderma reesei</i>
	C ₃	EG I	<i>Trichoderma reesei</i>
D	D ₁	EG	<i>Cellulomonas uda</i>
	D ₂	EG A	<i>Clostridium thermocellum</i>
E	E ₁	EG D	<i>Clostridium thermocellum</i>
	E ₂	EG	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
F	F ₁	CBH	<i>Cellulomonas fimi</i>
	F ₂	Xyn Z	<i>Clostridium thermocellum</i>
	F ₃	Xyn	<i>Cryptococcus albidus</i> *

El alineamiento de secuencias en cada familia revela la existencia de algunos aminoácidos ácidos o básicos conservados que deben ser esenciales bien para la actividad enzimática, bien para mantener la estructura tridimensional de la proteína (Henrissat y Mornon, 1990). Estudios de modificación química y mutagénesis dirigida permiten determinar la función de dichos aminoácidos. Por el momento se ha identificado un carboxilo esencial en CBH I, implicado probablemente en la unión del sustrato o en la estabilización del complejo enzima-sustrato

(Tomme y Claeysens, 1989; Mitsuishi y col., 1990). En EG I, el carboxilo homólogo parece tener una implicación más directa en el fenómeno catalítico (Mitsuishi y col., 1990). Las glicosidasas, como muchas hidrolasas, actúan por catálisis ácido-base general; en la gran mayoría de las glicosidasas cuyo mecanismo catalítico es conocido (lisozima, β -galactosidasa, amilasa) al menos un grupo carboxilo participa directamente en la catálisis (Sinnot, 1990).

Estudios de resonancia magnética nuclear de la reacción de hidrólisis de sustratos de bajo peso molecular catalizada por celulasas de distintas familias han reforzado la validez de la clasificación antes comentada; las homología detectadas entre miembros de una misma familia responden a similitudes en la topología del centro activo, y en consecuencia su estereoespecificidad es la misma. Las celulasas de las familia A (EG III), C (EG I y CBH I) y F actúan con retención de la configuración del carbono anomérico, es decir, los productos son β -glicósidos como los sustratos, mientras que las encuadradas en las familias B (CBH II) y E, invierten la misma (Knowles y col., 1988; Claeysens y col., 1990b; Barras y col., 1992; Gebbler y col., 1992).

Los núcleos catalíticos de CBH I y CBH II han sido cristalizados (Bergsfors y col., 1989), y la estructura tridimensional del segundo ha podido ser determinada por difracción de rayos X (Fig. 8) (Rouvinen y col., 1990); consiste en un barril α/β formado por 7 láminas β paralelas, conectadas por α -hélices; dos de las horquillas que unen láminas β y α -hélices, se extienden a modo de túnel para facilitar la unión del sustrato. El sitio activo está constituido por los extremos C-terminal de las láminas β , al igual que en otras enzimas de estructura parecida (triosa fosfato isomerasa). Los aminoácidos esenciales para la catálisis parecen ser dos aspárticos. Ambos están situados en el mismo lado del sitio activo, como cabía esperar de la estereoquímica de la reacción enzimática.

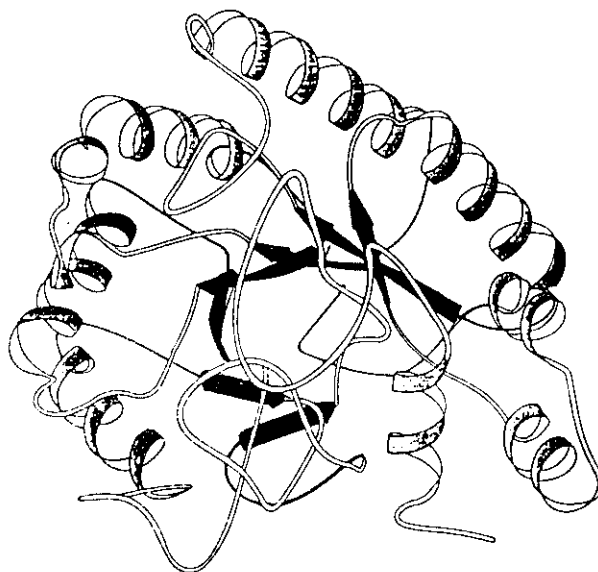


Figura 8. Representación esquemática de la estructura tridimensional del núcleo catalítico de CBH II (Teeri y col., 1990).

La función de la **bisagra glicosilada** (Fig. 7, pág. 12) es la de conectar el núcleo catalítico y el dominio de unión a celulosa. Se trata de un nexo flexible lo que ha impedido la cristalización de celulasas intactas. Es una región rica en prolinas y aminoácidos hidroxilados. Estos últimos están fuertemente glicosilados, y las prolinas intercaladas pueden ayudar al empaquetamiento de las cadenas de azúcares, como ocurre en otras glicoproteínas (Allen, 1983); la función de la glicosilación ha sido objeto de muchas conjeturas, pero estudios con celulasas clonadas en *E. coli* (no glicosiladas en consecuencia) o hiperglicosiladas en *Saccharomyces cerevisiae* han desechado cualquier papel en la actividad enzimática (Knowles y col., 1990). La O-glicosilación es necesaria para la secreción de celulasas en *T. reesei* (Kubicek y col., 1990b); su presencia además protege del ataque proteolítico (Claeyssens y Tomme, 1990). Las bisagras son regiones bien conservadas en las cuatro celulasas de secuencia conocida de *T. reesei*; se denominan bloques B, y en el caso de CBH II aparece duplicada (Fig. 9).

Los **dominios de unión a celulosa** (DUC) de CBH I, CBH II, EG I y EG III de *T. reesei*, se corresponden con los denominados bloques A, regiones bien conservadas en todas ellas, pero situadas en el extremo N-terminal de la proteína en unas y en el C-terminal en otras (Fig. 9). Contienen unos 30 aminoácidos, en contraste con los casi 100 de los DUC de origen bacteriano (Gilkes y col., 1991). Entre los aminoácidos conservados en los DUC de *T. reesei*, hay cuatro cisteínas que forman dos puentes disulfuro, dos glutaminas y cuatro residuos aromáticos; estos últimos son fundamentales para la unión a celulosa (Tomme, 1991). El DUC de CBH I se preparó por síntesis química, y su estructura fue determinada por resonancia magnética nuclear bidimensional; tiene forma de cuña, con una cara hidrofóbica y otra hidrofílica en la que tres tirosinas se disponen a modo de tren de aterrizaje para interactuar con la superficie de la celulosa (Kraulis y col., 1989). La posibilidad de que el DUC, además de unirse a celulosa, tenga capacidad para solubilizarla haciendo una labor de zapa previa a la hidrólisis ha sido postulada por el grupo de Knowles (Knowles y col., 1988). En el caso del DUC de *Cellulomonas fimi* tal supuesto ha sido confirmado por estudios de microscopía electrónica (Din y col., 1991), y muy probablemente el de *T. reesei* posea la misma capacidad de disgregación.

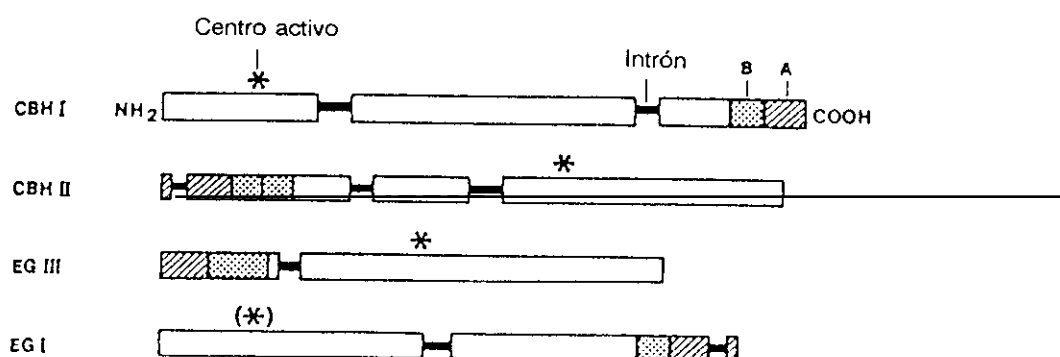


Figura 9. Representación esquemática de las celulasas de *T. reesei*. El dominio de unión a celulosa (bloque A) conecta mediante una bisagra (bloque B) con el dominio catalítico, donde se localiza el centro activo (*). (Knowles y col., 1988).

Como los núcleos catalíticos, los DUC de diferentes microorganismos han sido clasificados en familias de acuerdo con su grado de homología. Pero, al contrario de lo que sucedía con los primeros, dentro de las celulasas de un microorganismo sólo se encuentran DUC de una misma familia. Este hecho parece indicar que los DUC se unieron a los núcleos catalíticos en una etapa tardía de la evolución de las celulasas (Béguin, 1990). Las celulasas proceden

probablemente de un número limitado de secuencias progenitoras, que han evolucionado por fusión y/o translocación de dominios; los DUC guardan relación con secuencias conservadas en otras proteínas que interactúan con polisacáridos como lectinas, amilasas y quitinasas (Gilkes y col., 1991).

Aparte de sus implicaciones en la hidrólisis de celulosa, los DUC se perfilan como una interesante herramienta biotecnológica. La fusión a una proteína de interés por ingeniería genética puede facilitar su purificación e inmovilización (Fig. 10); la viabilidad de esta idea ha sido ya probada con una β -glucosidasa de *Agrobacterium* sp. y fosfatasa alcalina de *E. coli* (Ong y col., 1989).

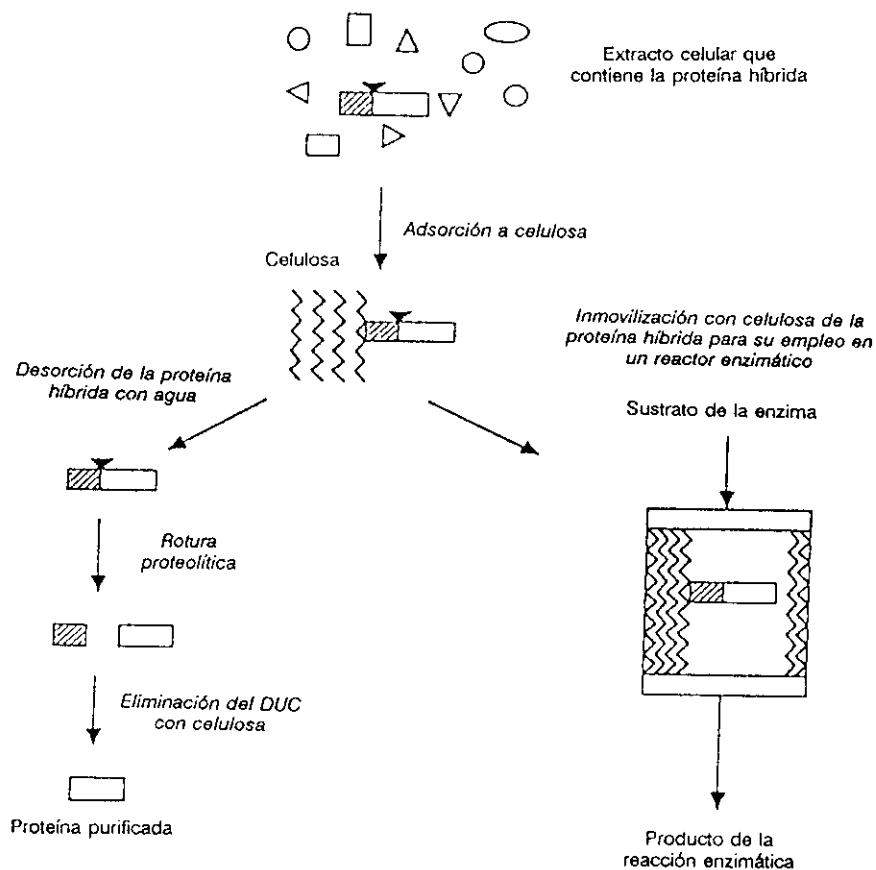


Figura 10. Esquema de las posibles aplicaciones de los dominios de unión a celulosa (DUC) en la purificación e inmovilización de proteínas. La proteína de interés se fusiona a un DUC () por ingeniería genética. La proteína híbrida tiene un sitio específico de rotura proteolítica () (Ong y col., 1989).

3.5. Manipulación genética de *T. reesei* y de sus celulasas

La viabilidad industrial de la hidrólisis enzimática de celulosa no depende simplemente de la producción a gran escala de celulasas, sino que requiere, además, profundizar en la investigación básica del proceso, hasta dilucidar cómo actúan las celulasas. Así, se podrán diseñar mezclas de enzimas adecuadas para cada tipo de sustrato. La ingeniería genética aporta

las herramientas adecuadas para trabajar en esta dirección; las celulasas "a la carta" se pueden preparar siguiendo dos estrategias: mezclar celulasas puras producidas por separado, o desarrollar nuevos microorganismos capaces de producir la mezcla de interés (Teeri y col., 1990). Ya se han obtenido cepas de *T. reesei* con niveles alterados de alguna de sus celulasas (Mäntylä y col., 1989).

Entre las desventajas que presentan las celulasas de *T. reesei* respecto a ciertas celulasas de otros microorganismos hay que señalar su termostabilidad moderada, su baja actividad específica sobre celulosa nativa, y su bajo contenido en β -glucosidasa (Klyosov, 1988). Este último punto se puede subsanar por la vía antes comentada. La mejora de las propiedades catalíticas y de la estabilidad térmica debe emprenderse por ingeniería de proteínas, cuyo desarrollo requiere un conocimiento exhaustivo de los aminoácidos esenciales de cada enzima.

Algunas cepas de *T. reesei* se encuentran entre los microorganismos con mayor capacidad de secreción (hasta 40 g/l) de una sola proteína, CBH I, de cuyo gen existe una sola copia en el genoma del hongo (El-Gogary y col., 1990); resulta muy prometedora la posibilidad de usar el promotor de dicho gen para mejorar la producción de hormonas, enzimas y proteínas en general con aplicaciones biotecnológicas (industriales, clínicas, alimentarias, etc). Por el momento el único intento de producción heteróloga en *T. reesei*, por la vía indicada, ha llevado a la obtención de células transformadas que secretan relativamente altos niveles de quimosina, correctamente procesada y enzimáticamente activa (Teeri y col., 1990).

4. ESTUDIOS PREVIOS SOBRE ENDOGLUCANASA III DE *T. reesei*

Entre los componentes mayoritarios del sistema celulasa de *T. reesei*, EG III ha sido el menos estudiado; su correspondiente gen (*egl3*) y su cDNA fueron clonados y secuenciados (la secuencia de EG III se muestra en la Figura 49 (pág. 84), y además se realizó una caracterización parcial de la enzima purificada a homogeneidad (Saloheimo y col., 1988). Se trata de una glicoproteína ácida; sus principales propiedades físico-químicas así como su composición aminoacídica se recogen en la Tabla IV.

En EG III, como en CBH II, el dominio de unión a celulosa (bloque A) y la bisagra O-glicosilada (bloque B) se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína. El dominio catalítico ha sido aislado en caldos de cultivo del hongo, producto de la degradación natural de la proteína; el punto de ataque proteolítico está entre Thr-61 y Ser-62 en el bloque B. El núcleo resultante tiene una M = 38 kDa, un pI = 4.4, y un contenido en carbohidratos de un 4 %. En la secuencia de EG III existe un único punto de posible N-glicosilación, Asn-Phe-Thr, en la posición 103-105 (Ståhlberg y col., 1988).

Se ha descrito la existencia de una isoenzima de EG III denominada "A 1:2", con igual masa pero distinto pI que el producto génico original, y que aparece probablemente por desamidación de éste (Ståhlberg y col., 1988).

EG III ha sido encuadrada en la familia A de celulasas (Tabla III), que comprende hasta el presente 27 celulasas, la mayoría de origen bacteriano (Gilkes y col., 1991). Una endoglucanasa del hongo *Schizophyllum commune* guarda una estrecha homología con EG III (Saloheimo y col., 1988). Ambas forman la subfamilia A₅ (Béguin, 1990).

En cuanto a sus propiedades catalíticas, sólo se han determinado los patrones de rotura de algunos sustratos cromofóricos (Fig. 3, pág. 8); EG III es la única celulasa de *T. reesei* que hidroliza el enlace heterosídico del 4-metilumbeliferilcelotriósido (Saloheimo y col., 1988). EG III, como todas las enzimas de la familia A analizadas hasta la fecha, actúa con retención de la configuración del carbono anomérico del sustrato (Gebbler y col., 1992).

Tabla IV. Composición de aminoácidos y principales características de EG III (Saloheimo y col., 1988).

Aa	Nº	%
Arg	10	2.5
Lys	6	1.5
His	5	1.3
Asp	19	4.8
Glu	6	1.5
Asn	30	7.6
Gln	25	6.3
Trp	11	2.8
Tyr	14	3.5
Phe	13	3.3
Cys	12	3.0
Met	4	1.0
Ser	42	10.6
Thr	44	11.1
Gly	43	10.8
Pro	19	4.8
Ala	28	7.1
Val	22	5.5
Ile	21	5.3
Leu	23	5.8
Total	397	100

Contenido en carbohidratos = 15 % (p/p)

M (SDS-PAGE) = 48 kDa

M (teórica)^a = 49.8 kDa

pI = 5.5

$\epsilon_{280} = 77\ 000\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$

^a Masa molecular calculada a partir de la composición de aminoácidos y el contenido de carbohidratos

5. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

El conocimiento profundo de las características estructurales y catalíticas de cada componente del sistema celulasa, ha sido señalado como un requisito imprescindible para llegar a dilucidar el mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa, y por ende, conseguir que este proceso sea viable a nivel industrial (Béguin, 1990).

En este sentido, nuestro laboratorio emprendió hace algunos años el estudio del sistema celulasa de *Trichoderma reesei* QM 9414. Caracterizada exhaustivamente la endoglucanasa I

(Domínguez, 1991) y la β -glucosidasa (de la Mata, 1992), consideramos interesante abordar la caracterización de endoglucanasa III; se trata del componente del sistema menos estudiado, probablemente por dificultades en su purificación.

El trabajo se ha desarrollado de acuerdo con el siguiente esquema:

1. Purificación y caracterización estructural de endoglucanasa III.

- Desarrollo del método de purificación.
- Determinación de los parámetros físico-químicos (M, pI, titulación, parámetros hidrodinámicos).
- Estudio del efecto de pH, temperatura y fuerza iónica sobre la estabilidad y la actividad de la enzima.

2. Especificidad de sustrato. Modo de acción.

- Actividad sobre sustratos cromofóricos. Estudios de partición con metanol.
- Actividad sobre celooligosacáridos.
- Actividad sobre sustratos celulósicos.
- Actividad sobre mananos.

3. Identificación de aminoácidos esenciales.

- Estudios del efecto del pH y la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la reacción enzimática. Determinación de valores de pK de grupos ionizables.
- Estudios de modificación química con agentes específicos.
- Identificación de residuos esenciales de triptófano, susceptibles de oxidación por N-bromosuccinimida.
- Identificación de un carboxilo esencial por marcaje de afinidad.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

El **microorganismo** empleado en la presente investigación, *Trichoderma reesei* cepa QM9414, fue suministrado por Mycological Services (EEUU). La paja de trigo procedía de una finca de la provincia de Madrid.

Soportes cromatográficos: DEAE-Sepharose CL-6B y Sephadex G-25 son productos de Pharmacia (Suecia); Ultrogel AcA 44 era de LKB (Suecia), actualmente absorbida por Pharmacia, que comercializa un gel con similares propiedades: Sephacryl S100 HR.

Sustratos: 4'-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, CMC (viscosidad media, grado de sustitución 0.8), celobiosa, D-glucosa y xilano se obtuvieron de Fluka (Suiza), Avicel de Merck (Alemania), y LBG de Sigma (EEUU). Los siguientes sustratos fueron proporcionados gentilmente por el Dr. M. Claeysens (Universidad de Gante, Bélgica), quien los preparó de acuerdo con métodos descritos en las referencias adjuntas: celooligosacáridos (van Tilbeurgh y col., 1982), metil- β -glicósidos (Wolfson y Hag, 1964), 2'-cloro-4'-nitrofenil- β -glicósidos y 4'-metilumbeliferil- β -glicósidos (Claeysens, 1988), excepto MeUmb procedente de Sigma (EEUU) y MeUmb(Glc)₃ de Lambda (Austria).

Proteínas: los patrones de masa molecular eran de Pharmacia (Suecia) y los de punto isoelectrico de Biorad (EEUU). Albúmina de suero bovino y proteasa V8 se obtuvieron de Sigma (EEUU) y tripsina de Serva (Alemania). El núcleo catalítico de EG III, purificado de acuerdo con el método descrito por Saloheimo y col. (1988), fue amablemente cedido por el Dr. G. Pettersson (Universidad de Upsala, Suecia).

Reactivos específicos para modificación química: DTNB, TNM, DEPC, EDC, EAC y RKW procedían de Sigma (EEUU), EEDQ de Fluka (Suiza), y NBS de Aldrich (Bélgica); este último se recrystalizó dos veces a partir de solución acuosa antes de su uso. EPO3 y EPO4 fueron gentilmente donados por el Dr. P. B. Høj (Universidad La Trobe, Bundoora, Australia), y EPO5 por el Dr. M. Claeysens (Universidad de Gante, Bélgica); estos productos se sintetizaron siguiendo el método de Høj, Rodríguez, Stick y Stone (Høj y col, 1989).

Todos los demás reactivos y disolventes empleados eran de grado analítico, o superior en casos que así lo requerían (productos para HPLC).

2. FERMENTACION DEL HONGO

2.1. Mantenimiento de la cepa

La cepa se ha mantenido a corto y medio plazo mediante resiembras en placas Petri con medio agar-patata (Haynes y col., 1955), incubadas en estufa de cultivo a 28°C durante 7 a 10 días (hasta que se observa abundante esporulación) y conservadas en nevera a 4°C. Las resiembras se han efectuado cada 30 días. El cultivo se ha mantenido a largo plazo mediante inmersión en parafina.

2.2. Medio de producción de celulasas

Las condiciones óptimas de fermentación de *T. reesei* QM9414 para la producción de celulasas, utilizando paja de trigo como fuente de carbono, fueron determinadas con anterioridad en nuestro laboratorio (Acebal y col., 1986). El medio empleado tiene la siguiente composición:

KH ₂ PO ₄	8.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.40 g
Urea	0.30 g
Tween 80	2.00 g
Peptona	1.00 g
Disolución de oligoelementos ^(*)	1.00 ml
CaCl ₂	0.79 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.30 g
Agua destilada hasta 1000 ml; el pH se ajusta a 5.5.	

(*)La disolución de oligoelementos contiene:

FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.57 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.82 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	4.33 g
HCl	5.00 ml
Agua destilada hasta 500 ml.	

Como fuente de carbono se ha empleado paja de trigo molida y tamizada, con un tamaño de partícula inferior a 0.177 mm. La concentración de paja en el medio de cultivo era 25 g/l.

La fermentación se realiza en matraces Erlenmeyer de 250 ml. En cada uno de ellos se introducen 100 ml de medio de cultivo y 2.5 g de paja. A continuación se esteriliza en autoclave (1 kg/cm², 120°C, 30 min).

2.3. Inóculo

A un cultivo de resiembra en placa Petri se añaden unos 10 ml de solución salina (9 g/l de NaCl) estéril. La placa se agita ligeramente con objeto de obtener una suspensión de esporas; ésta se transvasa a un matraz Erlenmeyer con unos 15 ml de solución salina estéril. La concentración de esporas se determina por recuento en una cámara de Neubauer; la inoculación del medio de cultivo se lleva a cabo introduciendo en cada matraz un volumen de suspensión que contenga ~ 4 · 10⁶ esporas.

2.4. Crecimiento del hongo

Los matraces inoculados se introducen en una incubadora (New Brunswick, EEUU) termostatzada y provista de agitación rotatoria. La fermentación tiene lugar a 33°C durante las primeras 50 h, y a 29°C hasta el final del proceso (duración total, 7 días); la agitación se

mantiene constante a 200 rpm. El crecimiento del hongo se observa por aparición de un micelio en forma de cinta, adherido a las paredes del matraz.

Finalizada la fermentación se añade 1 ml de azida sódica (20 g/l) por cada litro de medio, y se centrifuga a 1 500 g durante 15 min, con el fin de eliminar los restos de paja y el micelio del hongo. El sobrenadante constituye el denominado "caldo crudo".

3. PURIFICACION DE EG III

La purificación de EG III a partir del caldo crudo se ha realizado de acuerdo con el procedimiento esquematizado en la Figura 11.

3.1. Precipitación con sulfato amónico

A un volumen determinado de caldo crudo (normalmente 500 ml) se añade lentamente sulfato amónico finamente pulverizado hasta alcanzar un 20 % (p/v) de saturación. Después de 30 min de agitación en frío (~ 4°C) la mezcla se centrifuga a 12 000 g durante 20 min. Al sobrenadante obtenido se le añade sulfato amónico para llegar a un 60 % de saturación, y tras 30 min de agitación en frío se centrifuga en las condiciones antes descritas, desechándose el sobrenadante.

El sedimento resultante se resuspende en el mínimo volumen posible de agua destilada (unos 30 ml) y se procede a su **desalado** mediante cromatografía en una columna de Sephadex G-25 Medium (5.5x20 cm) equilibrada en agua; se recogen fracciones de 7.5 ml, y se juntan para su liofilización las que contienen proteína (apreciable a simple vista por su íntima asociación con pigmentos presentes en el medio de cultivo), que es excluida de la columna. La elución de la sal se detecta con cloruro bórico, ya que el sulfato bórico es insoluble y forma un precipitado blanco.

3.2. Cromatografía en DEAE-Sepharose a pH 7.0

El residuo seco procedente de la precipitación salina se resuspende en un volumen mínimo (10 ml) de tampón fosfato sódico 5 mM, pH 7.0 con azida sódica (0.2 g/l); tras centrifugación (3 000 g, 10 min) se aplica en una columna de DEAE-Sepharose CL-6B de 2.6x42 cm, equilibrada en el mismo tampón. La elución se lleva a cabo sucesivamente con 500 ml del tampón de equilibrado, 250 ml de un gradiente lineal de NaCl (0-500 mM) en el mismo tampón, y 250 ml de tampón con NaCl 500 mM. El flujo se mantiene constante a 60 ml/h con una bomba peristáltica (Pharmacia, Suecia). Se recogen fracciones de 6 ml, en las que se determinan actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. La concentración de proteína se estima por lectura de la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones correspondientes al segundo pico de actividad CMCasa se reúnen, y se concentran, primero por ultrafiltración (unidad 202 de Amicon, EEUU, con membrana PM-10 de Diaflo, EEUU) y finalmente por evaporación a vacío (Univap de Uniscience, Reino Unido).

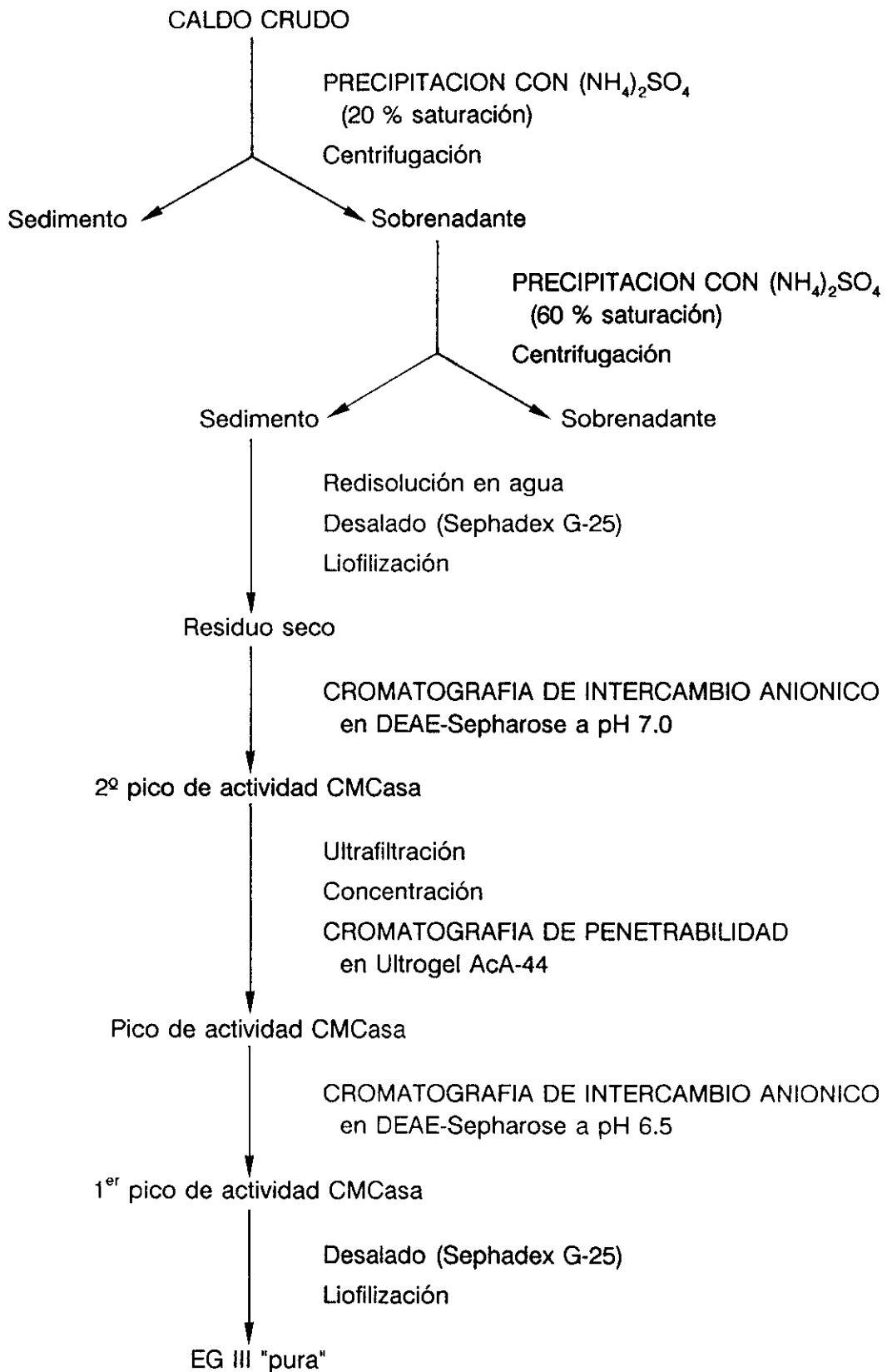


Figura 11. Esquema del procedimiento de purificación de EG III.

3.3. Cromatografía en Ultrogel Aca-44

El concentrado (3 ml) de EG III procedente de la cromatografía anterior se aplica en una columna de Ultrogel AcA-44 (1.6x95 cm) equilibrada en imidazol-HCl 8mM, pH 6.5 con azida sódica (0.2 g/l). La elución se lleva a cabo con el mismo tampón, a un flujo de 10 ml/h. Se recogen fracciones de 2 ml en las que se determina actividad sobre CMC y absorbancia a 280 nm.

3.4. Cromatografía en DEAE-Sepharose a pH 6.5

El pico de actividad CMCasa de la cromatografía de penetrabilidad se carga en una columna de DEAE-Sepharose Cl-6B equilibrada en imidazol-HCl 8mM, pH 6.5 con azida sódica (0.2 g/l). La columna se lava con 50 ml de este tampón, antes de aplicar un gradiente lineal de NaCl (200 ml, 0-300 mM). El flujo se mantiene a 30 ml/h, y se recogen fracciones de 3 ml en las que se determina actividad sobre CMC y absorbancia a 280 nm.

El primer pico de actividad CMCasa, correspondiente a EG III, se concentra hasta unos 10 ml por evaporación a vacío, y se desala en columnas de Sephadex G-25 equilibradas y eluidas con agua destilada (columnas PD-10, Pharmacia, Suecia). La proteína así purificada, y libre de sales, se liofiliza.

4. DETERMINACIONES ANALITICAS

4.1. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en los distintos pasos del proceso de purificación se ha determinado por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), empleando albúmina de suero bovino como patrón. En el caldo crudo y el precipitado con sulfato amónico, antes de la valoración, se precipita con ácido tricloroacético al 10 % (p/v) (de la Mata, 1992) con el fin de eliminar los compuestos fenólicos procedentes de lignina que interferirían en la determinación de proteína al reducir el reactivo de Folin.

La concentración de EG III, una vez purificada, se ha determinado por espectrofotometría teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar a 280 nm ($77\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) descrito previamente (Saloheimo y col., 1988). En la cuantificación del núcleo catalítico se ha empleado un valor de $\epsilon_{280} = 62\,700$ calculado a partir de su composición de aminoácidos (Ståhlberg y col., 1988) y considerando $\epsilon_{280}\text{Trp} = 5\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280}\text{Tyr} = 1\,100\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.2. Valoración de azúcares reductores

Se ha seguido el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959; Domínguez, 1991) con glucosa como patrón. En las muestras en que era de esperar una baja concentración de azúcares se han añadido 100 μg de glucosa antes de la adición del reactivo (Wood y Bhat, 1988) y la lectura de absorbancia se ha realizado a 540 nm (en lugar de a 640 nm), con el objeto de aumentar la sensibilidad.

4.3. Valoración de glucosa

La valoración específica de D-glucosa se ha llevado a cabo por el método de la D-glucosa oxidasa-peroxidasa, utilizando un preparado comercial (Boehringer Mannheim, Alemania), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4. Separación y análisis de celooligosacáridos y derivados por HPLC

Los productos de la degradación enzimática de **celooligosacáridos** y sus **derivados metilados**, se han separado en un sistema HPLC (Waters, EEUU) con una columna Rsil Polyol (0.46x25 cm) de Biorad (EEUU). La elución se lleva a cabo con acetonitrilo:agua (60:40) en condiciones isocráticas (flujo de 1 ml/min) y los azúcares se detectan por cambios en el índice de refracción del eluyente (detector R401 de Waters, EEUU). El producto correspondiente a cada pico en los cromatogramas se identifica por su tiempo de retención característico (Tabla V); la cuantificación se realiza por interpolación de la altura en una curva patrón específica para cada producto.

Tabla V. Tiempos de retención de los distintos celooligosacáridos ((Glc)_n) y sus derivados 1-metilados (Me-(Glc)_n) en las condiciones cromatográficas descritas.

<u>Azúcar</u>	<u>t_r (min)</u>	<u>Azúcar</u>	<u>t_r (min)</u>
Glc	4.4	Me-Glc	3.8
(Glc) ₂	5.0	Me-(Glc) ₂	4.2
(Glc) ₃	5.6	Me-(Glc) ₃	4.7
(Glc) ₄	6.3	Me-(Glc) ₄	5.3
(Glc) ₅	7.2		

Los derivados cromofóricos de celotriosa **MeUmb(Glc)₃** y **CNP(Glc)₃** y los productos de su hidrólisis catalizada por EG III se han analizado por HPLC en un sistema Beckman (EEUU) computerizado (System Gold), con una columna Spherisorb NH₂ (0.46x25 cm) suministrada por Tecnokroma (España). La elución se realiza en isocrático en el caso de CNP(Glc)₃ (50 % acetonitrilo, 50 % fosfato sódico 1 mM, pH 7.3; flujo 0.3 ml/min), y en gradiente en el caso de MeUmb(Glc)₃ (100 % acetonitrilo a 70 % acetonitrilo, 30 % agua, en 3 min, con un flujo de

Tabla VI. Tiempos de retención de MeUmb(Glc)₃ y CNP(Glc)₃ y de sus productos de degradación en las condiciones cromatográficas descritas.

<u>Producto</u>	<u>t_r (min)</u>	<u>Producto</u>	<u>t_r (min)</u>
CNP	6.81	MeUmb	3.31
CNPGlc	7.12	MeUmbGlc	3.70
CNP(Glc) ₂	7.49	MeUmb(Glc) ₂	4.28
CNP(Glc) ₃	8.90	MeUmb(Glc) ₃	4.68

2 ml/min). Los derivados cromofóricos se detectan por absorbancia a 313 nm (detector System Gold 166 de Beckman, EEUU). El producto correspondiente a cada pico en los cromatogramas se identifica por su tiempo de retención característico (Tabla VI); la cuantificación se realiza por interpolación del área en una curva patrón específica para cada producto.

5. ENSAYOS ENZIMATICOS. ANALISIS DE DATOS

A lo largo del proceso de purificación de EG III la actividad enzimática se ha expresado en unidades internacionales (UI), que equivalen a micromoles de producto (azúcares reductores en la mayoría de los sustratos ensayados) liberados por minuto de incubación.

5.1. Actividad y adsorción sobre celulosa microcristalina (Avicel)

En la determinación de la actividad Avicelasa de eluidos cromatográficos, a 1 ml de muestra se añade 1 ml de Avicel (20 g/l) en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 4.8. La incubación se realiza a 50°C durante 1 h; la reacción se detiene por inmersión en baño de hielo; la mezcla de ensayo se centrifuga (5 000 g, 10 min) para eliminar el sustrato no hidrolizado, y en el sobrenadante se valoran azúcares reductores (apartado 4.2, pág. 25).

Los productos de la hidrólisis de Avicel (10 g/l) catalizada por EG III (8 μ M) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0 a 37°C, se han analizado por HPLC (apartado 4.4, pág. 26). Antes de su inyección en el cromatógrafo, las muestras (140 μ l) extraídas a distintos tiempos de incubación se concentran por evaporación a vacío hasta 20 μ l.

La **adsorción** a Avicel de muestras de EG III se ha determinado como se describe a continuación: 100 μ l de EG III (0.6 μ M) se añaden a un volumen igual de Avicel (20 g/l), y la mezcla se incuba a 4°C (para evitar la hidrólisis del sustrato) durante 30 min, con agitación continua; transcurrido este tiempo se centrifuga (5 000 g, 10 min) y la enzima no adsorbida se cuantifica por valoración de la actividad sobre CNP(Glc)₃ del sobrenadante.

5.2. Actividad sobre carboximetilcelulosa (CMC)

La actividad CMCasa se ha determinado a 50°C, en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 4.8 con CMC (10 g/l) y una dilución adecuada de la muestra enzimática a valorar (volumen total, 2 ml). Tras 10 min de incubación la reacción se detiene por inmersión en baño de hielo, y se determina la concentración de azúcares reductores liberados (apartado 4.2, pág. 25).

Para la determinación de las constantes cinéticas, EG III (60 nM) se incuba a 30°C o a 50°C con varias concentraciones de CMC (entre 2 y 20 g/l) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0. Después de 2, 4, 6, 8 y 10 min se toman alícuotas en las que se determina la concentración de azúcares reductores (apartado 4.2, pág. 25). Los valores de K_m y k_{cat} se han calculado por ajuste, mediante un programa informático de regresión lineal (Cornish-Bowden, 1976), de los datos de velocidad inicial para cada concentración de sustrato a la ecuación de Hanes-Woolf:

$$S/v = K_m/(k_{cat} \cdot [E]_0) + S/(k_{cat} \cdot [E]_0) \quad (1)$$

donde S es la concentración de sustrato, v es la velocidad inicial, y $[E]_0$ es la concentración inicial de enzima.

5.3. Actividad sobre sustratos cromofóricos: CNP(Glc)₃ y MeUmb(Glc)₃

La hidrólisis de estos sustratos catalizada por EG III tiene lugar por dos vías alternativas según el modo de unión al centro activo de la enzima; el correspondiente análisis cinético, basado en los datos experimentales obtenidos, se desarrolla más adelante (Apéndice, pág. 74). La vía de hidrólisis que conduce a la liberación del cromóforo (CNP o MeUmb) resulta adecuada para evaluar la actividad de EG III.

La liberación de CNP ($pK_a = 5.5$) a partir de CNP(Glc)₃ se ha determinado en continuo, por espectrofotometría, a valores de pH ligeramente ácidos (Claeysens, 1988); los ensayos se realizan con CNP(Glc)₃ 0.5 mM y EG III 0.5-2 μ M, en tampón McIlvaine (0.1 M citrato sódico/fosfato sódico) pH 5.6 (volumen total, 200 μ l). Esta mezcla se incuba a 25°C, y la absorbancia a 405 nm se registra cada 20 s (espectrofotómetro DU-8 de Beckman, EEUU).

La formación de MeUmb a partir de MeUmb(Glc)₃ se ha cuantificado por fluorimetría (Claeysens, 1988); la mezcla de ensayo, con una concentración 100 μ M de sustrato y 25 a 100 nM de enzima, en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0, se incuba a 25°C; a 1, 2, 3, 4 y 5 min se toman alícuotas de 100 μ l a las que se adiciona 900 μ l de glicocola 0.2 M, pH 10.2 para detener la reacción y permitir la ionización de MeUmb ($pK_a = 7.2$). La concentración de MeUmb se determina midiendo la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 455$ nm) e interpolando en una recta patrón que debe actualizarse cada vez que se realiza una tanda de medidas. El fluorímetro empleado ha sido un MPF-44 E de Perkin-Elmer (EEUU).

El análisis de las dos vías alternativas de ataque enzimático se ha efectuado por HPLC (apartado 4.4, pág. 26); concentraciones variables de sustrato (MeUmb(Glc)₃ 25-200 μ M; CNP(Glc)₃ 50-500 μ M) se incuban a 25°C con EG III 50 nM, en tampón piridina/ácido acético 10 mM, pH 5.0; a distintos tiempos (5, 10, 15, 20 y 25 min) se toman alícuotas de 50 μ l y se adicionan a 50 μ l de acetonitrilo, inyectándose en el cromatógrafo 20 μ l de esta solución. Los valores de las constantes cinéticas teóricas se determinan por ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones (10) y (11) (pág. 74), mediante un programa de regresión no lineal (BMDP-AR BMDP Statistical Software, EEUU). Los valores de las constantes aparentes se determinan sustituyendo los valores teóricos en las ecuaciones (12), (13) y (14) (pág. 74).

En los **estudios de partición con metanol** se siguen los protocolos descritos, pero la mezcla de ensayo contiene además metanol (u otro alcohol) en la concentración deseada (normalmente 2.5 M).

5.4. Actividad sobre celooligosacáridos

Los productos de la hidrólisis de celooligosacáridos (10 mM) catalizada por EG III (200 nM) a 37°C en tampón piridina/ácido acético 10 mM, pH 5.0, se han analizado por HPLC (apartado 4.4, pág. 26). La liberación de D-glucosa a partir de celotriosa y celobiosa se ha determinado con mayor precisión (apartado 4.3, pág. 26) permitiendo la evaluación de los parámetros cinéticos correspondientes por ajuste a la ecuación (1) como se ha descrito anteriormente (apartado 5.2, pág. 27).

5.5. Actividad sobre mananos

El sustrato empleado más frecuentemente ha sido LBG, galactomanano, que se prepara del siguiente modo: una suspensión de LBG (20 g/l) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0

se mantiene en agitación durante 24 h, a temperatura ambiente, y seguidamente se centrifuga (5 000 g, 20 min) para eliminar el sustrato no solubilizado. La concentración real de LBG es, en consecuencia, menor de la nominal.

En la determinación de la actividad mananasa de eluidos cromatográficos, a 100 μ l de muestra se añade 1 ml de LBG (10 g/l) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0. La incubación se realiza a 50°C durante 1 h; la reacción se detiene por inmersión en baño de hielo y se valoran azúcares reductores (apartado 4.2, pág. 25).

Para la determinación de las constantes cinéticas, EG III (600 nM) se incubaba a 50°C con varias concentraciones de LBG (entre 2 y 18 g/l) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0. Después de 5, 10, 15, 20 y 25 min se toman alícuotas en las que se determina la concentración de azúcares reductores (apartado 4.2, pág. 25). Los valores de K_m y k_{cat} se han calculado por ajuste de los datos de velocidad inicial para cada concentración de sustrato a la ecuación (1) (apartado 5.2, pág. 27).

Los productos de la hidrólisis de LBG (galactomanano) y glucomananano (20 g/l) catalizada por EG III (8 μ M) en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0 a 37°C, se han analizado por HPLC (apartado 4.4, pág. 26). Antes de su inyección en el cromatógrafo, las muestras (140 μ l) extraídas a distintos tiempos de incubación se concentran hasta 20 μ l, por evaporación a vacío.

5.6. Actividad sobre xilano

En la determinación de la actividad xilanasa de eluidos cromatográficos, a 1 ml de muestra se añade 1 ml de xilano (40 g/l) en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 6.0. La incubación se realiza a 37°C durante 20 min; la reacción se detiene por inmersión en baño de hielo. La mezcla de ensayo se centrifuga (5 000 g, 10 min) para eliminar el sustrato no hidrolizado, y en el sobrenadante se valoran azúcares reductores (apartado 4.2, pág. 25).

5.7. Actividad β -glucosidasa

En la determinación de la actividad β -glucosidasa de eluidos cromatográficos, la mezcla de ensayo (2 ml) contiene 4-nitrofenil β -D-glucopiranosido 5 mM en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 4.8 y una dilución adecuada de la muestra a valorar. La incubación se realiza a 50°C durante 10 min; la reacción se detiene por inmersión en baño de hielo, y se adiciona NaOH 0.1 M (3 ml) para determinar la concentración de 4-nitrofenol por lectura de la absorbancia a 405 nm.

6. TECNICAS ELECTROFORETICAS

6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Se ha realizado en geles al 10 % (p/v) de acrilamida, según el método descrito por Laemmli (1970) y modificado por Chappmann y col. (1976). El equipo empleado ha sido un sistema vertical de placas (20x20 cm) SE 600 de Hoeffer (EEUU). Las proteínas se han visualizado por tinción con azul Coomassie.

6.2. Isoelectroenfoque analítico

Se ha llevado a cabo con geles de poliacrilamida preparados con anfólitos de pH 3.5 a 9.5, Ampholine PAG, producto comercial de Pharmacia (Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo empleado ha sido un Multiphor de LKB (Suecia). Las proteínas se han visualizado por tinción con azul Coomassie.

6.3. Curva de titulación

Se ha realizado en un equipo Phast System de Pharmacia (Suecia) con geles de isoelectroenfoque de pH 3 a 9, preparados por Pharmacia para este sistema. El procedimiento experimental empleado ha sido el propuesto por el fabricante: un gel de isoelectroenfoque se somete a un campo eléctrico para establecer un gradiente de pH; seguidamente se aplica la proteína en una línea perpendicular al gradiente creado, y que pasa por el centro del gel; finalmente se lleva a cabo una electroforesis aplicando un campo eléctrico entre los extremos del gel paralelos a la línea de aplicación. Las proteínas se han visualizado por tinción con azul Coomassie o con nitrato de plata.

6.4. Localización de actividades enzimáticas en los geles de isoelectroenfoque

En los geles de titulación con el pH antes de la detección de actividades enzimáticas se lava el gel en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0 durante 5 min.

La actividad sobre **MeUmb(Glc)₃** se ha localizado siguiendo el método descrito por Saloheimo y col. (1988): finalizado el isoelectroenfoque se rocía el gel con una solución 1 mM de MeUmb(Glc)₃ en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0; la liberación de MeUmb se hace patente iluminando el gel con una lámpara UV.

La actividad sobre **LBG** se ha localizado mediante incubación del gel a 50°C, durante 25 min con una réplica de agar (20 g/l) con LBG (4 g/l) en acetato sódico 0.1 M, pH 5.0; a continuación la réplica se lava sucesivamente con etanol al 50 % (v/v) y NaCl 1 M, y se sumerge en una solución de rojo Congo (2 g/l); transcurridos 45 min se lava dos veces con NaCl 1 M, apareciendo entonces bandas claras donde el sustrato ha sido hidrolizado.

7. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE EG III

7.1. Determinación de la masa molecular

Se ha realizado por medio de electroforesis en SDS, así como por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA-44. En el primer caso las proteínas empleadas como patrón han sido: α -lactoalbúmina de bovino (14.4 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocito de bovino (30 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa) y fosforilasa *b* de músculo de conejo (94 kDa). En el segundo se han empleado los mismos patrones excepto α -lactoalbúmina, sustituida por citocromo *c* de corazón de caballo (12.3 kDa). En el cálculo del volumen de exclusión de la columna ($V_0 = 65.9$ ml) se ha utilizado azul de dextrano, y en la determinación del volumen total ($V_t = 184.4$ ml), 4-nitrofenol. El coeficiente de partición K_{av} se define como: $(V_{\text{elución}} - V_0)/(V_t - V_0)$.

7.2. Determinación del punto isoeléctrico

Se ha llevado a cabo por comparación de la posición en la que se estabiliza EG III con la de patrones de pI conocido: ficocianina (azul), 4.65; B-lactoglobulina B, 5.10; anhidrasa carbónica bovina, 6.00; anhidrasa carbónica humana, 6.50; mioglobina equina (marrón), 7.00; mioglobina de ballena (marrón), 8.05; α -quimotripsina, 8.80; y citocromo *c* (rojo), 9.60.

7.3. Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos se ha determinado con un analizador automático Durrum D-500, después de hidrólisis ácida de las proteínas en HCl 6 M con fenol 2 g/l, a 110°C durante 24 h.

7.4. Centrifugación analítica

Los parámetros hidrodinámicos de EG III se han determinado empleando una ultracentrífuga analítica MSE Centriscan 75 equipada con un sistema óptico de *schlieren*. Dos soluciones de EG III de distinta concentración (0.6 y 1.2 mg/ml) en acetato sódico 0.2 M, pH 5.0 se introdujeron en sendas celdillas de 400 μ l de capacidad; la centrifugación se llevó a cabo a 38 500 rpm (4 034 rad/s), a 20°C, durante 3 h, registrándose gráficos de *schlieren* cada hora. El valor del coeficiente de sedimentación *s* se ha calculado a partir de la representación de la posición del máximo en los gráficos, *r*, a cada tiempo, *t*, de acuerdo con la función:

$$s = (1/\omega^2) \cdot d(\ln r)/dt \quad (2)$$

donde ω es la velocidad angular.

El valor de $s_{20,w}$ se ha obtenido introduciendo factores correctores para la viscosidad y la densidad (Tanford, 1961). La razón friccional f/f_0 se ha evaluado utilizando las ecuaciones de Svedberg (3) y Stokes (4):

$$M = s \cdot N \cdot f / (1 - \nu \cdot \rho) \quad (3)$$

y

$$f_0 = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot [3 \cdot M \cdot \nu / (4 \cdot \pi \cdot N)]^{1/3} \quad (4)$$

considerando los valores de masa molecular, *M* (49.8 kDa), y volumen específico parcial, ν (0.702 ml/g) previamente descritos (Ståhlberg y col., 1988).

7.5. Rotura con bromuro de cianógeno

EG III (1 mg) se disolvió en 200 μ l de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8 con GuHCl 6 M. Tras reducir (5 μ l de DTE 0.5 M, atmósfera de N_2 , 15 h) y carboximetilar (9 μ l de IAAM 0.5 M, 30 min) la proteína, se eliminaron las sales y se cambió el disolvente a ácido acético al 50 % (v/v) en una columna de Sephadex G-25 (PD 10 de Pharmacia, Suecia); a continuación la muestra se liofilizó y se resuspendió en 50 μ l de ácido fórmico al 70 % (v/v). A esta solución se añadieron 10 μ l de CNBr 0.5 M, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad; transcurridas 15 h se secó en atmósfera de N_2 , y se resuspendió en tampón de muestras de electroforesis (SDS), aplicándose en un gel de poliacrilamida con una concentración del 18 % (p/v) de acrilamida.

7.6. Determinación de grupos sulfhidrilo libres

La determinación de cisteínas libres se realizó con el reactivo de Ellman (DTNB) de acuerdo con el método descrito por Habeeb (1972).

8. EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Se ha estudiado el efecto del pH y la temperatura en la reacción de liberación de MeUmb a partir de MeUmb(Glc)₃, catalizada por EG III. Las cinéticas se han realizado de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 5.3 (pág. 28), fijando la concentración de enzima en 50 nM, y variando el pH de la mezcla de ensayo entre 4.0 y 6.3 (intervalo de estabilidad de la enzima), y la temperatura entre 30 y 55°C (límite superior de termoestabilidad). En los tampones empleados en este estudio (50 mM acetato sódico/50 mM fosfato sódico ajustados al pH deseado con NaOH o HCl) se ha mantenido constante la fuerza iónica en 0.2 M, mediante la adición de cantidades apropiadas de NaCl, calculadas con la ayuda de un programa informático (Ellis y Morrison, 1982). La constante de especificidad (k_{cat}/K_m) de la reacción a cada pH y temperatura se ha determinado por ajuste de los datos de velocidad inicial a la ecuación (16) (pág. 74), mediante un programa de regresión lineal.

Los valores de pK_a a cada temperatura se han calculado por ajuste de los datos de constante de especificidad a la ecuación (5), mediante un programa BMDP-AR (BMDP Statistical Software, EEUU) de regresión no lineal:

$$k_{cat}/K_m = c/(1 + K_a/[H^+]) \quad (5)$$

donde c es el valor máximo teórico de k_{cat}/K_m , K_a es la constante de disociación de un grupo de la enzima que está protonado en la forma activa de la misma, y $[H^+]$ es la concentración molar de protones.

La entalpía de ionización (H_{ion}) se ha determinado por ajuste de los datos de pK_a a distintas temperaturas a la ecuación (6):

$$pK_a = \Delta H_{ion}/(2.3 \cdot R \cdot T) + b \quad (6)$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y b una constante.

9. MODIFICACION QUIMICA DE EG III

9.1. Modificación con dietilpirocarbonato (DEPC)

EG III 4 μM se incubó a temperatura ambiente en distintos tampones (MES 50 mM, pH 6.5; fosfato sódico 100 mM, pH 6.0) con DEPC 0.5-2.5 mM (la solución madre de DEPC era 50 mM en etanol puro); a distintos tiempos, hasta 30 min, se tomaron alícuotas de 10 μl a las que se adicionaron 50 μl de imidazol 2 mM en tampón McIlvaine pH 5.6. La actividad residual sobre $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ (liberación de CNP) se determinó después de añadir 100 μl de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ 1 mM en tampón McIlvaine pH 5.6, y se comparó con la de un control incubado sin DEPC.

La concentración efectiva de la partida de DEPC empleada se determinó por el método descrito por Miles (1977).

9.2. Modificación con tetranitrometano (TNM)

EG III 4 μM se incubó a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, con TNM 5 mM (solución madre de TNM, 80 mM en etanol puro); a distintos tiempos, hasta 2 h, se tomaron alícuotas de 10 μl a las que se adicionaron 50 μl de cisteína 1.25 mM en tampón McIlvaine pH 5.6. La actividad residual sobre $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ (liberación de CNP) se determinó después de añadir 100 μl de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ 1 mM en tampón McIlvaine pH 5.6, y se comparó con la de controles incubados sin TNM.

9.3. Modificación con carbodiimidias (EDC y EAC)

EG III 4 μM se incubó a temperatura ambiente en distintos tampones (MES 50 mM, pH 5.1 ó 5.6; fosfato sódico 50 mM, pH 3.1 ó 4.5; piridina-HCl 100 mM, pH 4.0) con concentraciones de carbodiimida (EAC o EDC) de hasta 10 mM; a distintos tiempos, hasta 3 h, se tomaron alícuotas de 10 μl a las que se adicionaron 50 μl de tampón McIlvaine pH 5.6. La actividad residual sobre $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ (liberación de CNP) se determinó después de añadir 100 μl de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ 1 mM en tampón McIlvaine pH 5.6, y se comparó con la de controles incubados sin carbodiimida.

Para comprobar si la falta de inactivación en estas condiciones se debía a la reversión por agua de la modificación covalente de un grupo carboxilo esencial (Hoare y Koshland, 1967), la incubación también se efectuó en presencia de ester etílico de glicina (4 mM), nucleófilo alternativo capaz de hacer irreversible la supuesta modificación.

9.4. Modificación con N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ)

EG III 4 μM se incubó a temperatura ambiente en distintos tampones (MES 50 mM, pH 5.1 ó 5.6; fosfato sódico 50 mM, pH 3.1 ó 4.5; piridina-HCl 100 mM, pH 4.0) con concentraciones de EEDQ de hasta 10 mM; a distintos tiempos, hasta 3 h, se tomaron alícuotas de 10 μl a las que se adicionaron 50 μl de tampón McIlvaine pH 5.6. La actividad residual sobre $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ (liberación de CNP) se determinó después de añadir 100 μl de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ 1 mM en tampón McIlvaine pH 5.6, y se comparó con la de controles incubados sin EEDQ.

9.5. Modificación con reactivo K de Woodward (RKW)

EG III 4 μM se incubó a temperatura ambiente en distintos tampones (MES 50 mM, pH 4.5, 5.1, 5.6 ó 6.4; fosfato sódico 50 mM, pH 3.1 ó pH 6.0) con concentraciones de RKW de hasta 10 mM; a distintos tiempos, hasta 3 h, se tomaron alícuotas de 10 μl a las que se adicionaron 50 μl de tampón McIlvaine pH 5.6. La actividad residual sobre CNP(Glc)₃ (liberación de CNP) se determinó después de añadir 100 μl de CNP(Glc)₃ 1 mM en tampón McIlvaine pH 5.6, y se comparó con la de controles incubados sin RKW.

Para determinar el número de carboxilos modificados cuando se alcanza la inactivación total de la proteína se procedió a incubar EG III 10 μM con RKW 100 mM en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.0. El pH se mantuvo constante a 6.0 mediante adición continua de NaOH 0.5 M (la hidrólisis espontánea del reactivo K acidifica la mezcla de reacción) con una microjeringuilla montada en un nonius, de forma que cada giro de la rueda del nonius provocaba la adición de 1 μl de NaOH al medio de reacción (1 ml), en el cual se había introducido el electrodo de un pHmetro para poder seguir la evolución del pH. Transcurridos 30 min la enzima estaba totalmente inactivada, y entonces se separó del exceso de reactivo mediante dos pasos cromatográficos sucesivos en Sephadex G-25 (columna PD 10 de Pharmacia, Suecia) equilibrada y eluida con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.3. A continuación se registraron los espectros UV (360 a 240 nm) de la muestra de EG III modificada, y de una muestra control tratada del mismo modo pero en ausencia de RKW. El número de carboxilos modificados se determinó considerando el coeficiente de extinción molar a 340 nm ($7\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Shina y Brewer, 1985) del fenol cromofórico que se incorpora al grupo carboxilo como consecuencia de la reacción de modificación (Pétra, 1971).

9.6. Estudios de protección

En aquellos casos en que se observó inactivación de la enzima, se realizaron experimentos de protección del centro activo de EG III, preincubando 5 min la solución enzimática con celobiosa 250 mM antes de la adición del modificador. Simultáneamente se trataron muestras control de la enzima sin celobiosa. El procedimiento experimental empleado en estos estudios es por lo demás igual al especificado para cada uno de los reactivos ensayados.

10. MODIFICACION DE TRIPTOFANOS CON N-BROMOSUCCINIMIDA (NBS)

10.1. Reacción con NBS

La oxidación de residuos de Trp de EG III con NBS se ha llevado a cabo siguiendo esencialmente el método descrito por Spande y Witkop (1967). Una solución de EG III 9.1 μM en acetato sódico 50 mM, pH 5.0 se pipetea en dos cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico (1 ml en cada una), colocando una en la célula de referencia y la otra en la de muestra, de un espectrofotómetro de doble haz (Uvikon 810 de Kontron, Suiza); la temperatura se mantiene a 15°C con un baño de agua termostatizado. Se registra el espectro de diferencia entre 330 y 230 nm, y se toman alícuotas de 20 μl de cada cubeta; a continuación se añaden 20 μl de NBS 0.15 mM (en agua destilada) a la solución "muestra", y se agita rápidamente; en la solución "referencia" se añaden 20 μl de agua en lugar del reactivo. Después de 2 min se registra el

espectro de diferencia, se extraen alícuotas de 20 μl y se diluyen con L-triptófano 0.1 mM en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0 (volumen necesario para que la concentración de enzima sea 1.2 μM) para eliminar cualquier NBS remanente. La adición del oxidante (agua) se sucede por este procedimiento hasta que la solución de proteína modificada se enturbia. Finalmente se determinan las actividades sobre MeUmb(Glc)₃ y CNP(Glc)₃, así como la capacidad de adsorción a Avicel, de las alícuotas de enzima tomadas.

El mismo método se sigue para la modificación del núcleo catalítico de EG III, o en los experimentos de protección con ligandos.

10.2. Cálculo del número de Trp oxidados

El número de Trp oxidados (n_{Wox}) en cada estadio de modificación m se ha calculado de acuerdo con la fórmula empírica propuesta por Spande y Witkop (1967):

$$n_{\text{Wox}} = -\Delta A_{280} \cdot 1.31 / (5\,500 \cdot [E]_m) \quad (7)$$

donde A_{280} es la diferencia de absorción a 280 nm entre la proteína modificada y el control (solución "referencia"), 1.31 es un factor de corrección empírico, 5 500 es el coeficiente de extinción molar del Trp a 280 nm, y $[E]_m$ es la concentración de proteína tras m ciclos de modificación; cada ciclo supone una dilución 980/1000 de la solución precedente y en consecuencia $[E]_m = [E]_0 \cdot (980/1000)^m$.

10.3. Preparación de formas de EG III con distinto grado de oxidación (W_{1ox} y W_{2ox})

Para profundizar en el estudio de la modificación de EG III con NBS ha sido necesario preparar cantidades mayores de enzima con distintos grados de oxidación. EG III W_{1ox} y W_{2ox} se obtienen por adición de 10 μl de NBS 1.5 y 3 mM, respectivamente, a 90 μl de EG III 100 μM en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0. Análogamente se prepara la forma W_{1ox} del núcleo catalítico de EG III a partir de éste.

10.4. Estudios de termoestabilidad

Alícuotas de 150 μl de soluciones de EG III intacta, W_{1ox} y W_{2ox} (concentración 3.4 μM , en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0) se incubaron a distintas temperaturas durante 30 min; el tratamiento térmico se para por inmersión en baño de hielo. La actividad residual se determinó con CNP(Glc)₃ como sustrato, y se comparó con la de muestras no incubadas.

10.5. Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (250-200 nm) se registraron por triplicado para cada muestra (concentración de proteína 3.4 μM , tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0) con un dicrografo Jobin Yvon Mark III (Francia) dotado de una lámpara de xenon de 250 W. La velocidad de barrido fue de 0.5 nm/s, la sensibilidad de $5 \cdot 10^{-6}$; las muestras se dispusieron en una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico.

Los valores de elipticidad se expresan como elipticidad molar por residuo, que se calcula teniendo en cuenta que la masa molecular media por residuo de EG III es 106.2 Da, según se deduce de su composición de aminoácidos. El cálculo de los valores de elipticidad, así como el de estructura secundaria se han realizado mediante el programa informático CDPROT desarrollado por Menéndez-Arias y col. (1988).

11. MARCAJE DE AFINIDAD DE EG III CON 4',5'-EPOXIPENTIL- β -CELOBIOSIDO (EPO5)

11.1. Reacción de inactivación de EG III con epoxialquil β -celobiósidos

Los experimentos de inactivación de EG III con epoxialquil β -celobiósidos en general, y con EPO5 en particular, se han llevado a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo experimental (los detalles concretos de cada experiencia se especifican en Resultados): EG III 0.8 μ M en tampón McIlvaine pH 4.6 se incubaba a 37°C con inhibidor; a distintos tiempos se toman alícuotas de 10 μ l de la mezcla de reacción y se diluyen en 0.5 ml de MeUmb(Glc)₃ 100 μ M en acetato sódico 0.1 M, pH 5.0 para determinar la actividad residual.

11.2. Preparación de EPO5-EG III

La identificación del grupo carboxilo de la proteína al que se une EPO5, ha requerido la preparación de grandes cantidades de EG III con EPO5 covalentemente unido, que se han obtenido por incubación de 1 ml de enzima 20 μ M en tampón McIlvaine pH 4.6 con EPO5 7 mM, a 37°C hasta inactivar totalmente EG III (dos días). La preparación de EPO5-EG III se diluye con agua (hasta 3.5 ml) y se concentra por ultrafiltración (Centricon 10 de Amicon, EEUU); este lavado se repite otra vez para eliminar el tampón y el exceso de epóxido. En paralelo, se preparan controles sin inhibidor.

12. ANALISIS DE PEPTIDOS

12.1. Digestión con tripsina

Las muestras de EG III (300 μ l con una concentración 10 μ M, en tampón bicarbonato amónico 0.4 M, pH 7.8 con urea 8 M) se reducen (DTE 1.5 mM, 10 min a 50°C) y carboximetilan (IAAm 3 mM, 15 min a 37°C). Después de diluir (1/4) con agua, se añaden 45 μ g de tripsina. La mezcla se incubaba durante 10 h a 37°C, y el digerido resultante se inyecta directamente en el sistema HPLC (apartado 12.3).

12.2. Digestión con proteasa V8

Las muestras de EG III (300 μ l con una concentración 10 μ M, en tampón bicarbonato amónico 50 mM, pH 7.8 con GuHCl 6 M) se reducen (DTE 1.5 mM, 10 min a 50°C) y se diluyen (1/4) con tampón sin GuHCl. Seguidamente se añaden 30 μ g de proteasa V8 y se incubaba durante 10 h a 37°C. Los péptidos resultantes se carboximetilan (IAAm 2 mM, 15 min a 37°C) antes de su inyección en el sistema HPLC (apartado 12.3).

12.3. Separación de péptidos por HPLC

Los péptidos derivados de la proteólisis de EG III y sus derivados oxidados (NBS) o marcados con EPO5, se han separado por HPLC en fase reversa en un sistema Waters (EEUU)

con una columna C₄ modelo 214 TP-54 (0.46x25 cm) de Vydac (EEUU). La elución se realiza con un gradiente lineal del 5 al 70 % de acetonitrilo en agua, con ácido trifluoroacético al 1 % (v/v) (concentración constante), a un flujo de 1 ml/min. La detección de péptidos se lleva a cabo con un Photo Diode Array (Waters, EEUU), almacenando en una memoria electrónica, cada 5 s, espectros de absorción (190-320 nm) del eluido. Los péptidos seleccionados para su posterior análisis se concentran por evaporación a vacío hasta unos 20 µl, y se conservan a -20°C.

12.4. Secuenciación amino-terminal

La determinación de la secuencia amino-terminal de los péptidos seleccionados se ha llevado a cabo con un secuenciador automático de fase gaseosa 477A (Applied Biosystems, EEUU), acoplado a un analizador de PTH-aminoácidos 120A (Applied Biosystems, EEUU). El procedimiento empleado ha sido el recomendado por el fabricante. Las muestras se cargan en filtro de fibra de vidrio (GFC de Whatman, EEUU) tratado con ácido trifluoroacético puro, y se recubren con una solución acuosa de polibreno (3 mg).

12.5. Determinación de la masa molecular

La masa molecular de los péptidos seleccionados se ha determinado por espectrometría de masas siguiendo la técnica denominada de desorción de plasma ("plasma desorption mass spectrometry", PDMS), prolijamente descrita por Macfarlane (1990). El aparato empleado ha sido un Analizador de Biopolímeros BIO ION 20 de Applied Biosystems (EEUU), y el procedimiento experimental el descrito por el fabricante. Los espectros se registraron para 1 millón de cuentas de fisión de la fuente (californio²⁵²).

El error máximo en la determinación de la masa molecular de péptidos por este método, es del 0.2 %. El método es válido para péptidos de hasta 50 kDa.

RESULTADOS

1. PURIFICACION E IDENTIFICACION DE EG III

1.1. Purificación de EG III

La caracterización de cualquier proteína requiere la disponibilidad de muestras de la misma con un grado de pureza óptimo (normalmente > 95 %). En el caso de las celulasas este requisito cobra especial importancia, debido a la gran cantidad de enzimas con similares aptitudes catalíticas presentes en el material de partida, y al sinergismo observado entre ellas.

La purificación de EG III a partir de caldos de cultivo de *Trichoderma reesei* QM 9414 se ha llevado a cabo siguiendo el esquema de la Figura 11 (pág. 24). La evaluación cuantitativa del proceso de purificación se recoge en la Tabla VII.

Tabla VII. Purificación de endoglucanasa III

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad CMCase			
			Actividad total (UI)	Actividad específica (UI/mg)	Rendimiento (actividad) (% total)	Factor de purificación
Caldo crudo	500	430	11695	27.2	100	1.0
Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	341	7395	21.7	63	0.8
DEAE-Sepharose pH 7.0	86	5.7	1634	287	14	10.6
Ultrogel AcA-44	31	3.5	1200	343	10	12.6
DEAE-Sepharose pH 6.5	29	2.5	866	346	7	12.7

El primer paso cromatográfico sobre DEAE-Sepharose CL-6B a pH 7.0 permite separar las distintas celulasas y hemicelulasas presentes en el caldo de cultivo del hongo (Fig. 12A). EG III eluye isocráticamente, aunque es retenida parcialmente en la columna. El análisis electroforético del pico de actividad CMCase correspondiente a EG III revela la presencia de varios contaminantes de distinta masa molecular (Fig. 13), por lo que el siguiente paso de purificación es una cromatografía de penetrabilidad sobre Ultrogel AcA-44 (Fig. 12B). La preparación resultante muestra una única banda de proteína en electroforesis en presencia de SDS (Fig. 13); sin embargo, cuando se analiza por isoelectroenfoque se revela la existencia de dos isocomponentes (Fig. 14A), ambos activos sobre el sustrato cromofórico específico MeUmb(Glc)₃ (Fig. 14B). El componente más básico (pI = 5.1) se identificó con EG III y el más ácido (pI = 4.6) con la isoenzima "A 1:2", previamente descritas (Saloheimo y col., 1988), mediante comparación de sus características estructurales (M, pI, composición de aminoácidos, mapas peptídicos tras rotura con CNBr) con muestras procedentes del laboratorio del Dr. Pettersson (Universidad de Upsala, Suecia). Posteriormente la secuenciación de fragmentos corroboró la identidad de EG III, purificada a partir del caldo de cultivo de *T. reesei* crecido con paja de trigo, como producto del gen *egl3* (Saloheimo y col., 1988). EG III se separa de su

isoenzima A 1:2 en cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE-Sepharose CL-6B a pH 6.5 (Fig. 12C).

La muestra de EG III resultante (factor de purificación ~ 13, rendimiento del 7 % respecto a la actividad CMCasa total del caldo de cultivo) parece homogénea en los análisis electroforéticos (Fig. 13) y por isoelectroenfoque (Fig. 14A); la curva de titulación (Fig. 16 y Fig. 23, pág. 51) y los experimentos de velocidad de sedimentación (ultracentrifugación), en los que se detecta un único pico simétrico (no mostrado) demuestran igualmente el alto grado de purificación alcanzado.

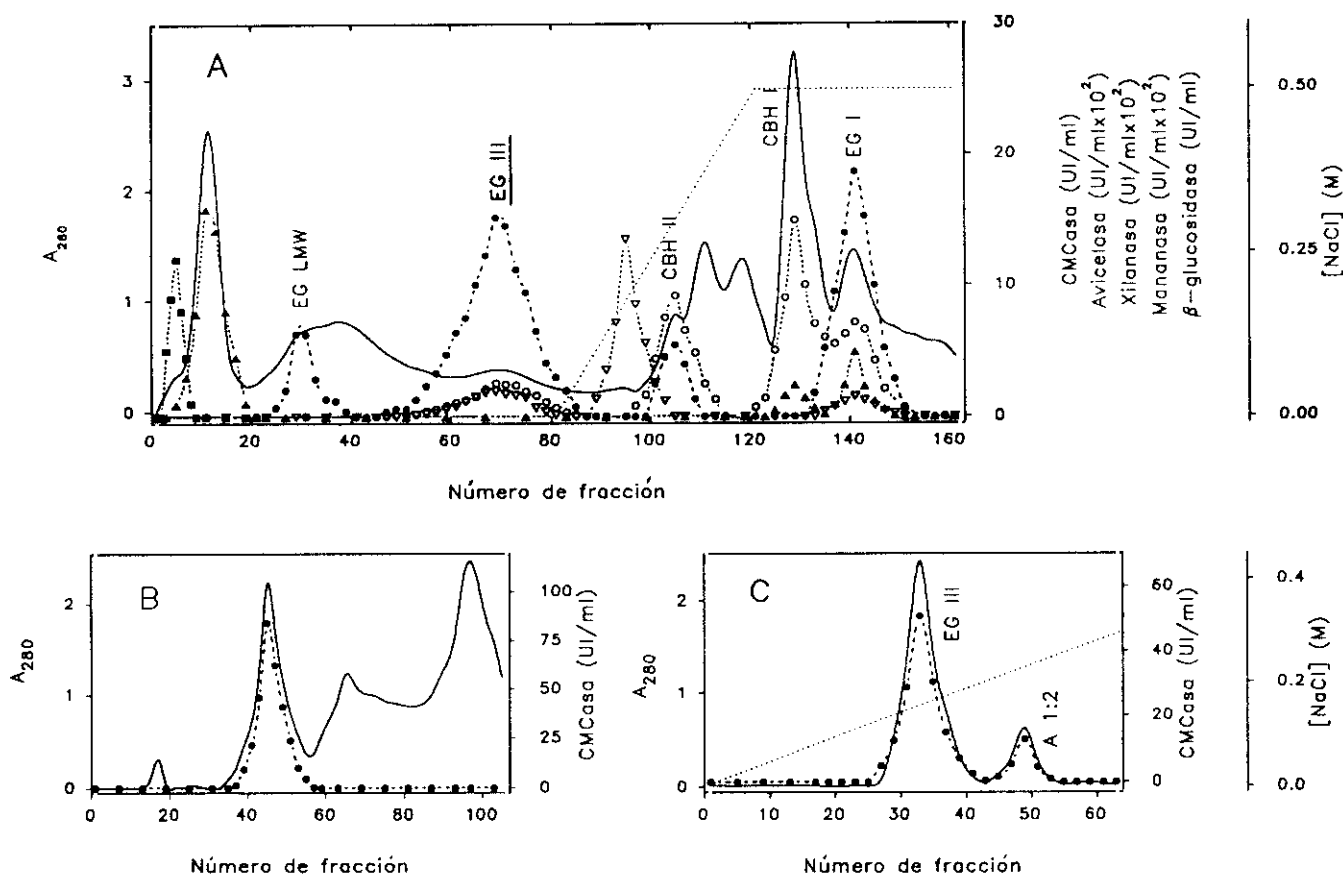


Figura 12. Purificación de EG III. (A), perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose CL-6B a pH 7.0 (tampón fosfato sódico 5 mM). (B), perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA 44. (C), perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose CL-6B a pH 6.5 (tampón imidazol-HCl 8 mM). Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos (pág. 23 y sgtes.). Símbolos: (—), A_{280} ; (■—■), actividad β -glucosidasa; (▲—▲), xilanasa; (●—●), CMCasa; (▽—▽), mananasa; (○—○), avicelasa; (—), $[NaCl]$.

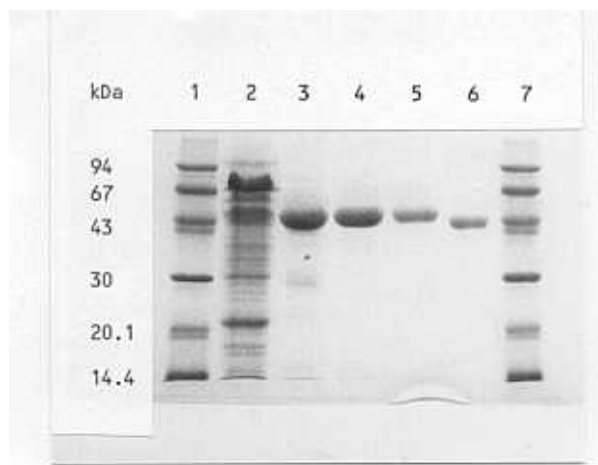


Figura 13. Análisis del proceso de purificación de EG III por electroforesis en gel de poliacrilamida (10 % de acrilamida) en presencia de SDS. Tinción con azul de Coomassie. Calle 2, precipitado con sulfato amónico (50 μg); calle 3, eluído de DEAE-Sepharose a pH 7.0 (20 μg); calle 4, eluído de Ultrogel AcA 44 (15 μg); calle 5, eluído de DEAE-Sepharose a pH 6.5 (10 μg); calle 6, eluído de DEAE-Sepharose a pH 6.5 (10 μg), no tratado con DTE; calles 1 y 7, patrones de masa molecular conocida.

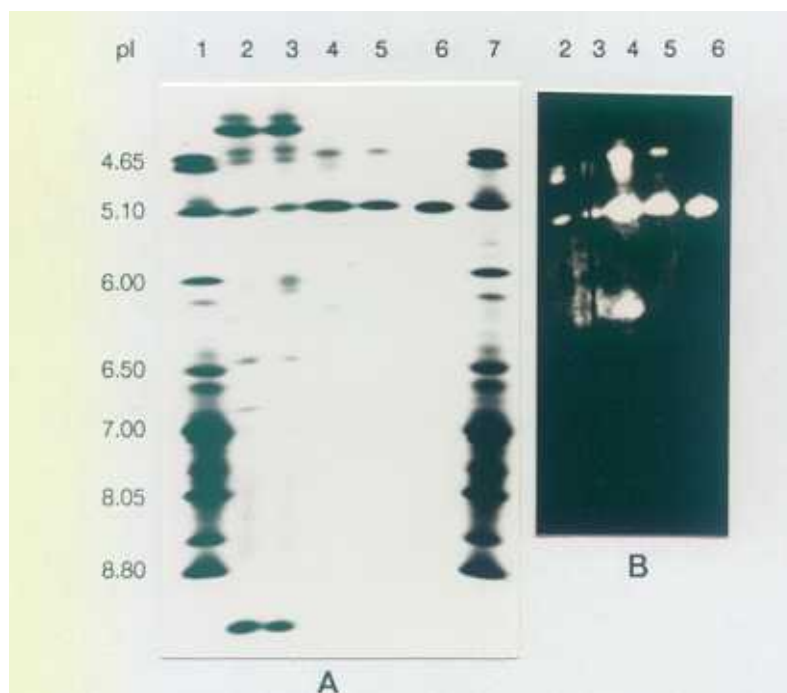


Figura 14. Análisis del proceso de purificación de EG III por isoelectroenfoque analítico (intervalo de pH de 3.5 a 9.5). (A), tinción de proteínas con azul de Coomassie. (B), detección por fluorescencia de actividad sobre MeUmb(Glc)₃. Calle 2, sobrenadante del caldo de cultivo (100 μg); calle 3, precipitado con sulfato amónico (100 μg); calle 4, eluído de DEAE-Sepharose a pH 7.0 (40 μg); calle 5, eluído de Ultrogel AcA 44 (30 μg); calle 6, eluído de DEAE-Sepharose a pH 6.5 (20 μg); calles 1 y 7, patrones de punto isoléctrico conocida.

1.2. Propiedades moleculares de EG III

Durante el proceso de purificación e identificación de EG III se han determinado sus principales parámetros moleculares:

a) **Masa molecular:** por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se ha obtenido un valor de 48 kDa, mientras que por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA 44 el valor calculado es 50 kDa. En ambos casos la determinación se ha efectuado con proteínas patrón de M conocida (Fig. 15).

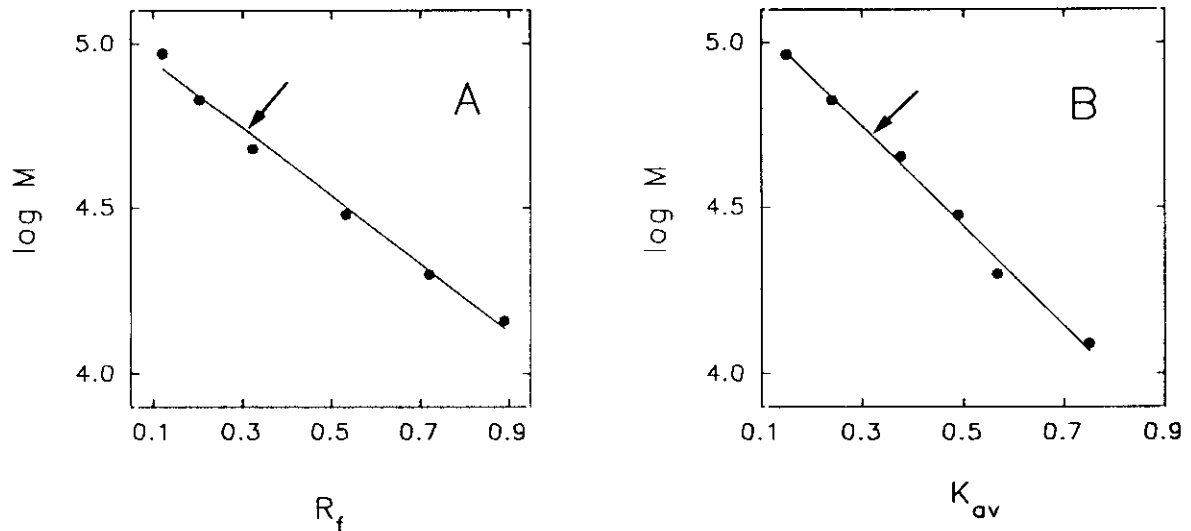


Figura 15. Determinación de la masa molecular de EG III. (A), por electroforesis en presencia de SDS. (B), por cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA 44. La flecha indica, respectivamente, el valor de R_f y el de K_{av} de la enzima.

b) **Punto isoelectrónico:** se ha determinado por isoelectroenfoque analítico (Fig. 14A) utilizando patrones de pI conocido. El valor obtenido, 5.1, difiere del descrito por Saloheimo y col. (1988), 5.6; esta discrepancia no obedece a diferencias reales entre la proteína estudiada en nuestro laboratorio y el producto del gen *egl3* (Saloheimo y col., 1988), sino a una corrección del valor de pI de EG III, cuyas causas se detallan más adelante (pág. 77, Discusión).

c) **Titulación:** EG III exhibe una baja carga neta a valores de pH por encima de su pI (Fig. 16).

d) **Parámetros hidrodinámicos:** por ultracentrifugación analítica se han determinado los valores del coeficiente de sedimentación, $s_{20,w}^0 = 3.66$ S, y de la razón friccional, $f/f_0 = 1.48$. Este último corresponde a una molécula muy asimétrica; por analogía con otras celulasas de *T. reesei* (Claeysens y Tomme, 1990) se puede asimilar a un elipsoide prolato, que tendría una relación axial de aproximadamente 8.

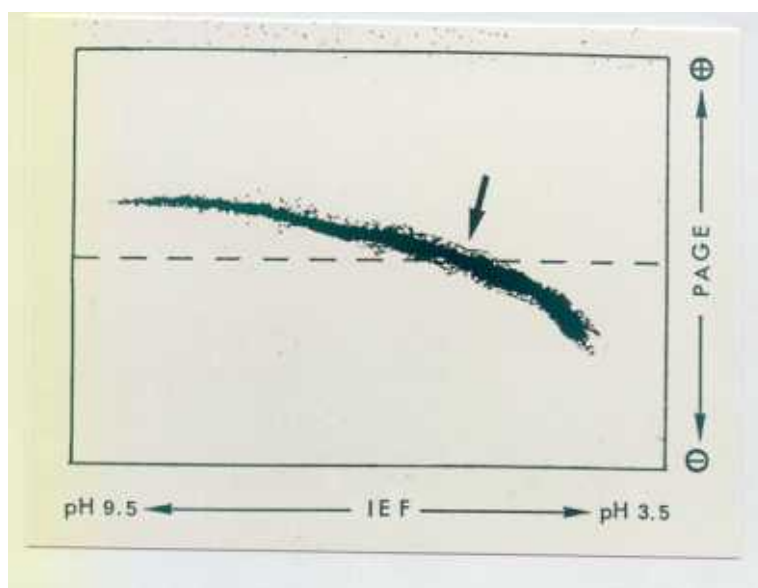


Figura 16. Titulación de EG III. En un gel de isoelectroenfoque (pH 3.5-9.5, Phast System de Pharmacia, Suecia) en el que se había establecido un gradiente de pH (1ª dimensión), se aplicaron 5 μ g de EG III (línea discontinua); seguidamente el gel se sometió a electroforesis (2ª dimensión). Tinción con azul Coomassie. La flecha indica el punto isoeléctrico de EG III.

Tabla VIII. Características moleculares de EG III.

PARAMETRO	VALOR CALCULADO	VALOR DESCRITO (REFERENCIA)
M (PAGE-SDS) (kDa)	48	48 (Saloheimo y col., 1988)
M (Cromatografía de penetrabilidad) (kDa)	50	--
pI	5.1	5.5 (Ståhlberg y col., 1988) 5.6 (Saloheimo y col., 1988)
$s_{20,w}^0$ (S)	3.66	3.70 (Ståhlberg y col., 1988)
f/f_0	1.48	1.47 (Ståhlberg y col., 1988)
Contenido en carbohidratos (% (p/v))	ND	15 (Saloheimo y col., 1988)
Cisteínas libres	0	--

ND, no determinado

e) **Determinación de grupos sulfhidrilo libres:** la incubación de EG III (6 μ M) en condiciones desnaturizantes (pH 8.3, GuHCl 3 M) con exceso del reactivo de Ellman (DTNB) (0.2 mM) no condujo a ningún aumento apreciable de la absorbancia a 410 nm. Teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar a 410 nm (13 600 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) del ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico producto de la reacción de DTNB con Cys (Lundblad y Noyes, 1984), la existencia de un grupo sulfhidrilo libre en la enzima hubiera supuesto, en las condiciones

descritas, un aumento de absorbancia de 0.08 unidades (0.16 si se considera que siendo par el número de Cys de la proteína, se encontrarían reducidas de dos en dos).

Se puede concluir que las 12 Cys presentes en EG III se encuentran formando 6 puentes disulfuro. La existencia de cistinas en EG III es evidente por el cambio de migración observado en electroforesis en SDS cuando la muestra no se trata con DTE (Fig. 13, pág. 41).

La similitud entre las características moleculares determinadas y las recogidas en la escasa literatura sobre EG III (Saloheimo y col., 1988; Ståhlberg y col., 1988) queda patente en la Tabla VIII.

1.3. Efecto de pH, temperatura y fuerza iónica en la estabilidad y actividad de EG III

EG III es estable en el intervalo de pH 3.0-8.0 a 30°C, pero sólo entre pH 4.0 y 6.3 a 55°C (Fig. 17A). A pH 5.0 la enzima se inactiva a temperaturas por encima de 60°C, aunque retiene un 90 % de actividad cuando se incuba a 65°C durante 30 min (Fig. 17B). A 50°C y pH 5.0 EG III es estable durante 10 min en presencia de concentraciones de NaCl hasta 0.25 M.

El pH óptimo para la actividad está en el amplio margen de 4.0 a 5.0 para casi todos los sustratos ensayados (Fig. 17D). Sólo la actividad CMCasa presenta un máximo a un valor concreto en ese intervalo, a pH 4.8. Cuando se emplea MeUmb(Glc)₃ como sustrato la actividad es máxima a 70°C (Fig. 17E,) y, por otra parte, decae progresivamente al aumentar la fuerza iónica del tampón (Fig. 17F).

2. ESPECIFICIDAD Y MODO DE ACCION DE EG III

El conocimiento de la especificidad y modo de acción de cada enzima del sistema celulasa de *T. reesei* es imprescindible para avanzar en la comprensión del mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa, así como para diseñar mezclas adecuadas para el tratamiento de cada tipo particular de material lignocelulósico (Teeri y col., 1990).

2.1. Actividad sobre sustratos cromofóricos

La capacidad de EG III para hidrolizar MeUmb(Glc)₃ liberando el fluoróforo MeUmb es única entre las celulasas de *T. reesei* (Fig. 3, pág. 8) (van Tilbeurgh y col., 1988). Este sustrato proporciona un método de detección de EG III muy sensible. Alternativamente, cuando las condiciones de ensayo lo permiten, se puede valorar por colorimetría y en continuo la liberación del cromóforo CNP ($pK_a = 5.5$) a partir del sustrato CNP(Glc)₃ (Claeyssens, 1988).

El análisis por HPLC de los productos de hidrólisis ha revelado la existencia de otro punto de ataque enzimático en cada uno de los sustratos mencionados (Fig. 18). El estudio cinético de estas reacciones se ha basado en el Esquema I (Apéndice, pág. 74). En resumen, la formulación desarrollada permite calcular los parámetros cinéticos (aparentes y teóricos) de cada vía de hidrólisis siempre que se determine la aparición de los dos posibles productos cromofóricos (CNP y CNPGlc, o MeUmb y MeUmbGlc), mientras que la medida de un solo producto (normalmente MeUmb o CNP) limita los cálculos a los parámetros aparentes de esa vía y a su constante de especificidad teórica (los términos "aparente" y "teórico" se definen en el Apéndice, pág. 74).

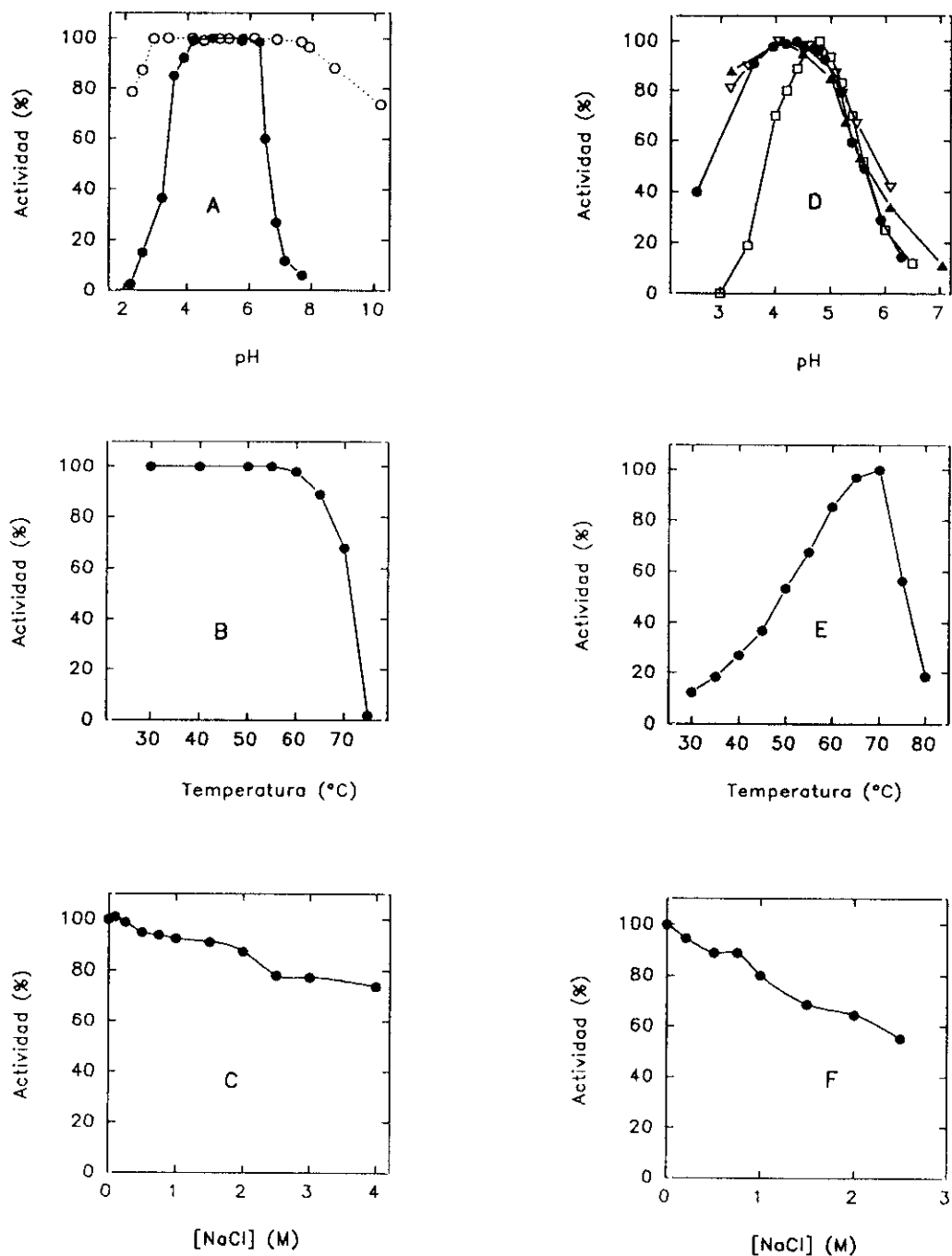


Figura 17. Estabilidad y actividad de EG III frente a pH, temperatura y fuerza iónica. (A), estabilidad frente al pH a 30°C, 5 min (○—○) y a 55°C, 5 min (●—●). (B), estabilidad frente a la temperatura a pH 5.0, 30 min. (C), estabilidad frente a la fuerza iónica a pH 5.0, 50°C. (D), variación con el pH de la actividad sobre CMC (□—□), celotriosa (▲—▲), MeUmb(Glc)₃ (●—●), CNP(Glc)₃ (▽—▽). (E), variación con la temperatura de la actividad sobre MeUmb(Glc)₃. (F), variación con la fuerza iónica de la actividad sobre MeUmb(Glc)₃.

Las constantes cinéticas para la hidrólisis de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ y $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$ se incluyen en la Figura 18. El principal producto de la reacción enzimática es $\text{CNP}(\text{Glc})$ para $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ como sustrato, y MeUmb para $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$. Esta diferencia en el patrón de rotura se debe a las distintas afinidades de los restos cromofóricos y de glucosa de estos sustratos, por los subsitios de unión de la enzima como reflejan los valores de K_m .

Algunos datos concernientes a la hidrólisis catalizada por EG III de 4'-metilumbeliferil derivados de celotetraosa y celopentaosa se incluyen en la Figura 18. La inhibición por producto (los celooligosacáridos liberados son buenos sustratos de la enzima) impide ahondar en el estudio cinético de estos sustratos.

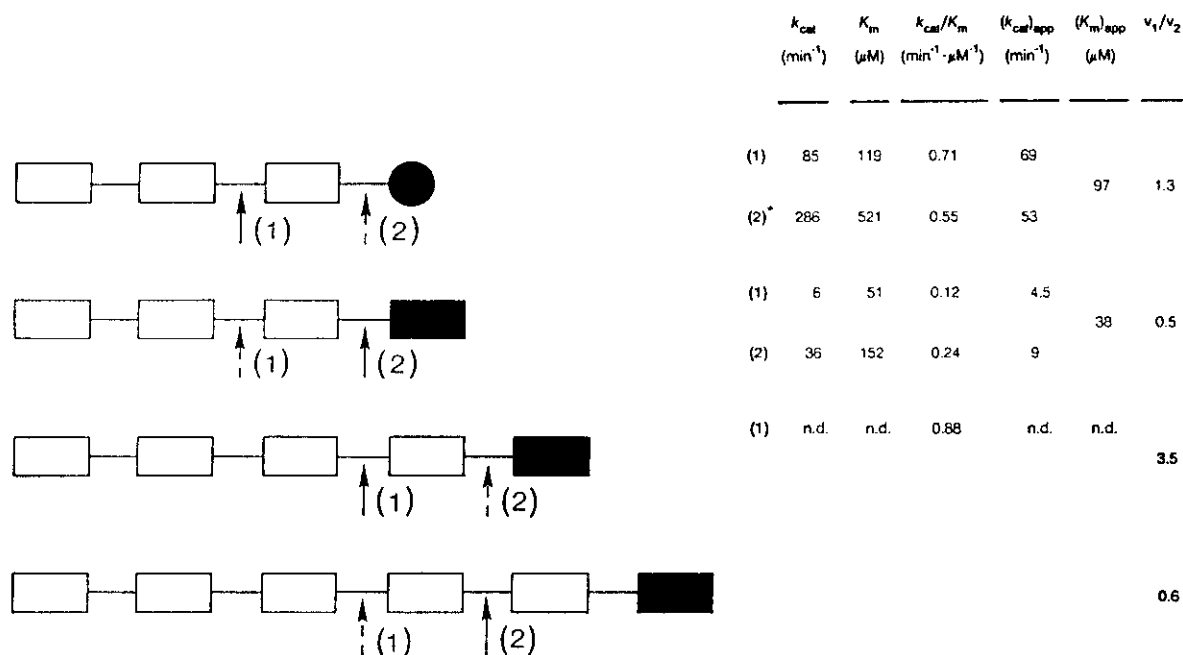


Figura 18. Hidrólisis de sustratos cromofóricos catalizada por EG III. Los parámetros cinéticos (pH 5.0, 25°C) se determinaron como se describe en Materiales y Métodos (pág. 28). Símbolos: (●), CNP ; (■), MeUmb ; (□), residuo de glucosa. Las flechas indican los enlaces hidrolizados (las de trazo discontinuo señalan puntos secundarios de hidrólisis).

(*) Los valores de k_{cat} y K_m de esta reacción son aproximados ya que en este caso no se cumple la premisa de que la glicosilación de la enzima sea el paso limitante de la reacción.

2.1.1. Estudios de partición con metanol

EG III es capaz de transferir restos glicosídicos no sólo a agua, sino también a nucleófilos alternativos tales como alcoholes de bajo peso molecular, como muchas otras glicosidasas que actúan con retención de la configuración anomérica (Sinnot, 1990). El etanol, y sobre todo el metanol, son nucleófilos más efectivos que el agua, y en consecuencia aceleran reacciones en las cuales la desglicosilación es el paso limitante (Fersht, 1985).

En la Figura 19A se puede observar el incremento en la liberación de CNP a partir de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ provocado por la adición de alcoholes; sin embargo, la hidrólisis de $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$ no varía por la presencia de metanol hasta 2.5 M y disminuye progresivamente al aumentar la

concentración del mismo (Fig. 19B). El espectro de absorción UV de EG III no se altera por la presencia de metanol 2.5 M (~10 % (v/v)), pero concentraciones mayores causan la desnaturalización o precipitación de una fracción significativa de proteína, como señala el aumento de absorbancia a longitudes de onda por encima de 300 nm, consecuencia de la aparición de turbidez en la muestra.

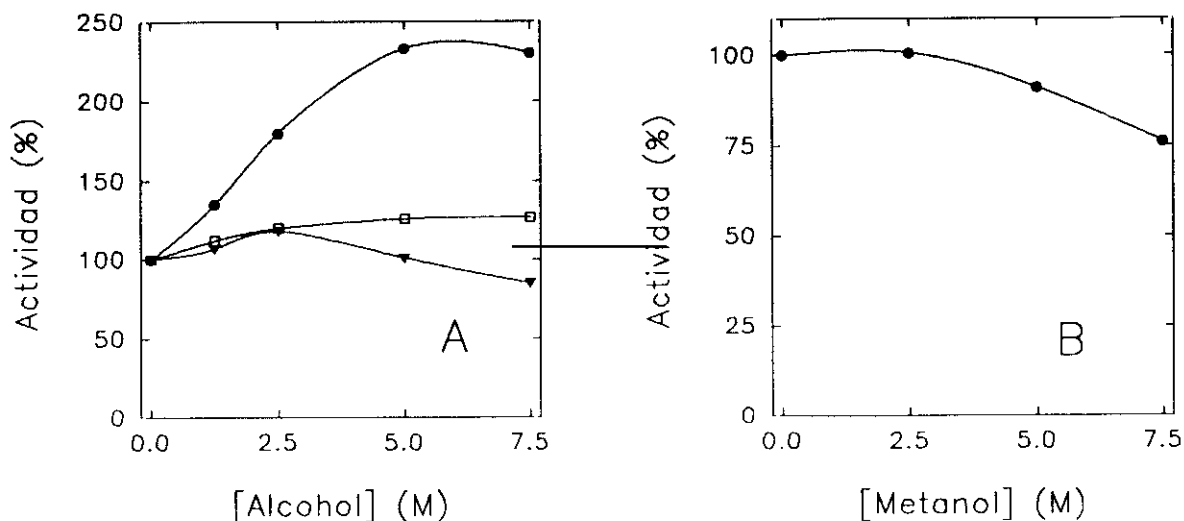


Figura 19. Efecto de la adición de alcoholes en la actividad enzimática de EG III. (A), efecto de metanol (●—●), etanol (□—□) y 1-propanol (▼—▼) en la liberación de CNP a partir de CNP(Glc)₃. (B), efecto de metanol en la liberación de MeUmb a partir de MeUmb(Glc)₃.

El análisis por HPLC de la reacción de EG III con MeUmb(Glc)₃ y CNP(Glc)₃, en presencia de metanol 2.5 M, revela que la razón entre productos de metanolisis y de hidrólisis es constante (Tabla IX); este dato permite concluir que los intermediarios celobiosil- y celotriosil-enzima, son comunes en la rotura de ambos sustratos (Fersht, 1985). Ninguna de las vías de ataque enzimático se altera por la presencia de metanol en el caso de MeUmb(Glc)₃; en cambio, la liberación de CNP a partir de CNP(Glc)₃ se acelera notablemente mientras que la vía alternativa de rotura de este sustrato no varía (Tabla IX).

Tabla IX. Variación de los parámetros cinéticos de las reacciones de EG III con CNP(Glc)₃ y MeUmb(Glc)₃, por la adición de metanol 2.5 M.

Sustrato	Producto	Me-(Glc) ₂ /(Glc) ₂	Me-(Glc) ₃ /(Glc) ₃	(K _{cat}) _{MeOH} /K _{cat}	(K _m) _{MeOH} /K _m	(v _{x-Glc} /v _x) _{MeOH}	v _{x-Glc} /v _x
CNP(Glc) ₃	CNPGlc	0.39	—	0.9	1.0	0.6	1.3
	CNP	—	0.41	2.1	0.9		
MeUmb(Glc) ₃	MeUmbGlc	0.44	—	1.0	1.1	0.5	0.5
	MeUmb	—	0.43	1.0	1.1		

De estos hechos se infiere que el paso limitante de la reacción es la desglicosilación de EG III en la rotura del enlace heterosídico de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$, y en todos los demás casos, la glicosilación de la enzima. En la Figura 20 se esquematizan los experimentos de partición comentados con el fin de hacer más comprensible al lector la interpretación de los mismos.

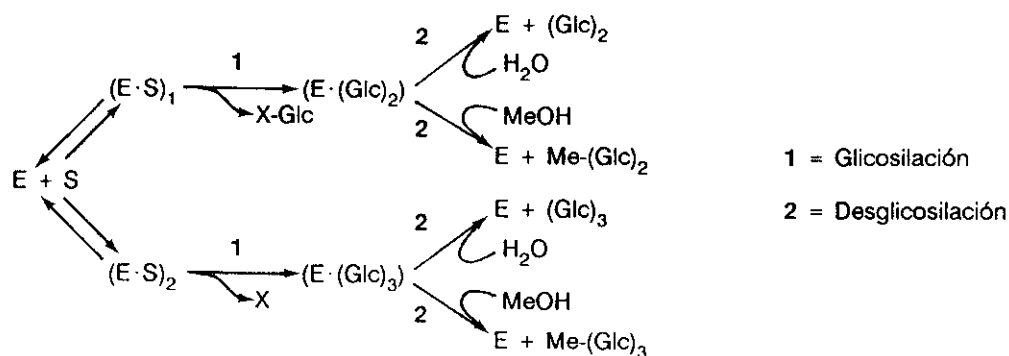


Figura 20. Esquema de los experimentos de partición de EG III con los sustratos cromofóricos $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ y $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$. X es CNP cuando S es $\text{CNP}(\text{Glc})_3$, y MeUmb cuando S es $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$.

2.2. Actividad sobre celooligosacáridos

Los patrones de hidrólisis de celodextrinas catalizada por EG III han sido determinados por HPLC, y se ilustran en la Figura 21. Debido a la baja sensibilidad del método de detección empleado (refractómetro), las concentraciones iniciales de sustrato han sido forzosamente ≥ 10 mM sin duda muy superiores a los valores de K_m correspondientes; en consecuencia, los valores de k_{cat} mostrados no son más que velocidades de desaparición del sustrato a una concentración 10 mM del mismo, y deben considerarse meramente orientativos. Sólo en el caso de celotriosa y celobiosa la determinación de glucosa se ha realizado por un método más sensible (glucosa oxidasa/peroxidasa), y los parámetros cinéticos se han calculado con la precisión adecuada.

La **adición de metanol** (2.5 M) al medio de reacción ha hecho posible la determinación de ciertos puntos de ataque enzimático mediante la detección de los metil-celooligosacáridos formados. Así se han establecido patrones de rotura, de otro modo ambiguos; por ejemplo con celopentaosa como sustrato se forman celobiosa y celotriosa, pero ¿cuál de los productos contiene el extremo reductor del sustrato?. El equívoco se resuelve al añadir metanol y detectarse metil-celotriosa pero no metil-celobiosa, lo cual indica que la celobiosa procede del extremo reductor de la celopentaosa, liberándose como primer producto de la reacción. Es precisamente celopentaosa el único sustrato de los ensayos cuya hidrólisis se acelera (unas dos veces) en presencia de metanol. La falta de sensibilidad del método de detección, antes comentada, ha impedido profundizar en el estudio de este hecho.

EG III no parece tener **actividad transglicosilasa**, habida cuenta de que no se han detectado productos de mayor masa molecular que el sustrato considerado, incluso después de prolongada incubación de la enzima con altas concentraciones de celooligosacáridos.

La celobiosa ha resultado ser un mal sustrato de EG III (Fig. 21); la posibilidad de que esta actividad se debiera a contaminación por β -glucosidasa en la preparación de EG III ha sido descartada al no observarse inhibición en presencia de δ -gluconolactona, potente y específico

inhibidor de β -glucosidasa. La celobiosa se ha empleado como **inhibidor competitivo** en reacciones con otros sustratos de EG III, y no se han observado alteraciones en los patrones de hidrólisis de ninguno de ellos. Con celobiosa 50 mM la inhibición de la actividad sobre MeUmb(Glc)₃ 100 μ M o CNP(Glc)₃ 500 μ M es de un 10 y un 50 %, respectivamente. Por otra parte, concentraciones de glucosa de hasta 200 mM no inhiben la actividad de EG III.

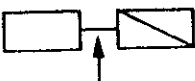


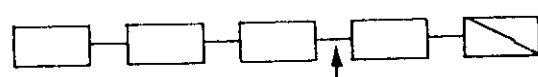


	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	v_1/v_2
	2	20	0.1	
	15	1	15	0.4
	800*	n.d.	n.d.	1.8
	200*	n.d.	n.d.	
	500*	n.d.	n.d.	0.9
	500*	n.d.	n.d.	0.3

Figura 21. Hidrólisis de celooligosacáridos catalizada por EG III. Los parámetros cinéticos (pH 5.0, 37°C) se determinaron como se describe en Materiales y Métodos (pág. 28). Símbolos: (\square), restos de glucosa; (\square), resto de glucosa con el carbono anomérico libre; (Me), grupo metilo. Las flechas indican los enlaces hidrolizados (las de trazo discontinuo señalan puntos secundarios de hidrólisis).

(*) velocidad de desaparición de sustrato para una concentración inicial 10 mM.

2.3. Actividad sobre sustratos celulósicos

Como corresponde a una endoglucanasa típica, EG III hidroliza eficazmente derivados solubles de celulosa como CMC ($K_m = 5 \text{ mg/ml}$, $k_{cat} = 36 \text{ s}^{-1}$, a pH 5.0 y 30°C) provocando una drástica disminución de la viscosidad de la mezcla de ensayo, concomitante con la liberación de extremos reductores. No obstante, CMC no es un sustrato adecuado para estudios cinéticos ya que la curva de actividad frente a concentración de enzima no es lineal (Fig. 22A). Este hecho se debe a la complejidad del sustrato, mezcla heterogénea de polímeros con distintos grados de carboximetilación y tamaño, en el que hay enlaces con distinto grado de accesibilidad para la enzima.

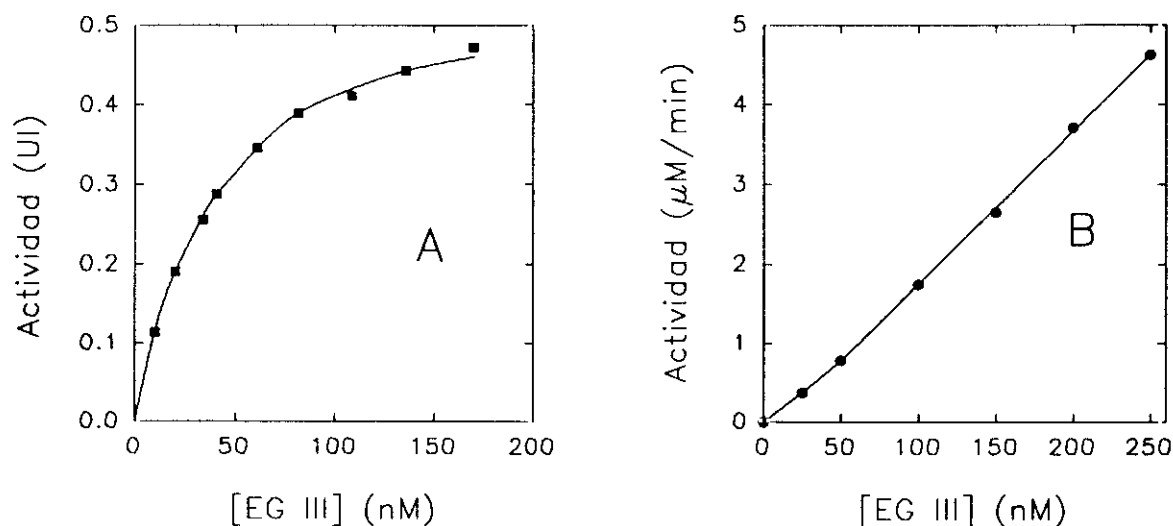


Figura 22. Variación de la actividad con la concentración de enzima. (A), CMC como sustrato (pH 5.0, 30°C). (B), MeUmb(Glc)₃ como sustrato (pH 5.0, 30°C).

La capacidad de adsorción de EG III a celulosa microcristalina (**Avicel**) fue descrita por Ståhlberg y col. (1988), que además demostraron que esta propiedad dependía de un dominio de unión a celulosa diferenciado del núcleo catalítico de la enzima. A pesar de su capacidad de adsorción a Avicel, EG III hidroliza sólo una pequeña fracción de este sustrato, que corresponde probablemente a regiones amorfas del mismo (Henrissat y col., 1985).

La hidrólisis de Avicel catalizada por EG III ha sido analizada por HPLC. Sólo glucosa y celobiosa se han detectado como productos de la reacción. Después de 1 h de incubación a pH 5.0 y 37°C (EG III 8 μM, Avicel 10 mg/ml) se determinaron unas concentraciones 0.1 mM de glucosa y 0.2 mM de celobiosa; a las 22 h de incubación las concentraciones fueron 0.5 mM y 0.3 mM respectivamente. Estos azúcares pueden proceder directamente de la acción enzimática sobre el sustrato o de la degradación de celooligosacáridos de mayor tamaño previamente formados.

2.4. Actividad sobre mananos

La comparación por análisis de grupos hidrofóbicos (HCA) de secuencias de celulasas de la familia A (Henrissat y col, 1989) y mananasas de distinto origen, reveló un grado sorprendente de similitud entre ambos grupos de enzimas (comunicación personal del Dr. B. Henrissat, CNRS-Grenoble, Francia); en la familia A también se incluye una mananasa de *Caldocellum saccharolyticum* (ver Figura 48, pág. 83). Por este motivo se sospechó que EG III pudiera exhibir actividad mananasa. Si bien se trata de una capacidad catalítica secundaria (con una constante de especificidad mucho menor que las correspondientes a sustratos celulósicos), se ha podido demostrar inequívocamente que EG III hidroliza este tipo de hemicelulosa. En el caldo de cultivo de *T. reesei* existe, además, una mananasa específica (Fig. 12A, pág. 40).

En la Figura 23 se muestra la curva de titulación de EG III, junto con la réplica de actividad mananasa; la única proteína observada, EG III, es activa sobre manano. Ante la posibilidad de que la celulasa estuviera acomplejada con una mananasa contaminante, o bien

poseyera dos centros activos, se estudió el efecto sobre la actividad mananasa de inhibidores específicos para la actividad celulolítica: metil-celobiosa (inhibidor competitivo) y 4',5'-epoxipentil-celobiósido (EPO5, marcador de afinidad) (Tabla X). Asimismo, se comprobó el efecto inhibitor del manano sobre la actividad celulasa (Tabla XI). Todos los resultados obtenidos apuntan a que ambas actividades residen en un mismo centro catalítico de EG III.

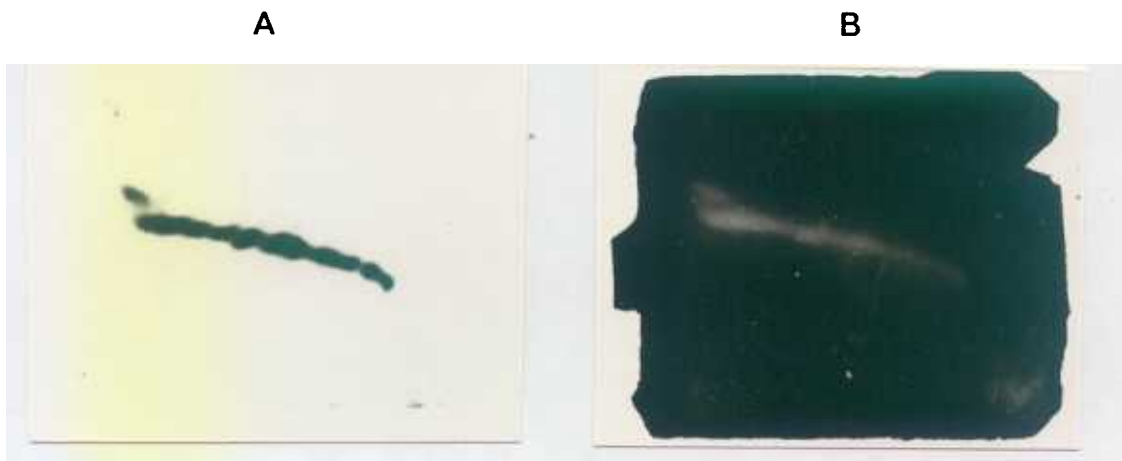


Figura 23. Curva de titulación de EG III (5 µg) y réplica de actividad mananasa. (A), tinción de proteínas con nitrato de plata. (B), réplica de actividad sobre LBG; tinción negativa con rojo Congo.

El análisis por HPLC de los productos de degradación enzimática de dos tipos de manano ha revelado que EG III rinde manobiosa como producto principal, y que es más activa sobre galactomanano que sobre manano (Tabla XII).

Inhibidor	Actividad celulasa (CMC)	Actividad mananasa (LBG)
EPO5 10 mM	Inh. irreversible	Inh. irreversible
Me-(Glc) ₂ (K _i)	10 mM	15 mM

Tabla X. Comparación entre la inhibición de las actividades mananasa y celulasa de EG III por inhibidores específicos de celulasas

Tabla XI. Comparación entre los parámetros cinéticos de las actividades mananasa y celulasa de EG III.

Parámetro	Manano (LBG)	Celulosa (CMC)
K _i ^a (g/l)	1.2	1.0
K _m ^b (g/l)	9.0 ± 0.8	7.0 ± 0.5
k _{cat} ^b (10 ⁻² ·min ⁻¹)	8.6 ± 0.4	82.6 ± 1.9

^a CNP(Glc)₃ como sustrato a pH 5.6 y 20°C.

^b pH 5.0, 50°C.

Producto	Sustrato	
	Galactomanano	Manano
Manosa	0.7 mM	0.6 mM
Manobiosa	0.8 mM	1.0 mM
Manotriosa	1.3 mM	0.6 mM
Manotetraosa	0.4 mM	-
Manopentaosa	0.2 mM	0.2 mM

Tabla XII. Productos de la hidrólisis de mananos (20 g/l) catalizada por EG III (8 μ M), analizados por HPLC, después de 3 h de incubación a 37°C y pH 5.0.

La notable discrepancia entre los valores de K_m y K_i (inhibición del sustrato $\text{CNP}(\text{Glc})_3$) que se observan en la Tabla XI, tanto para LBG como para CMC, se puede explicar por las diferentes condiciones de pH y temperatura en las que se han determinado ambos parámetros; además debe tenerse en cuenta que el significado a nivel molecular de K_m para un sustrato soluble clásico como $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ es necesariamente distinto del que corresponde a sustratos poliméricos y heterogéneos como son CMC y LBG.

3. IDENTIFICACION DE RESIDUOS ESENCIALES DE EG III

La identificación de los residuos fundamentales para la unión del sustrato y/o la actividad catalítica de una enzima es imprescindible para dilucidar el mecanismo químico de su acción, y abre el camino a su hipotética mejora por la incipiente y prometedora vía de la ingeniería de proteínas.

3.1. Efecto del pH y la temperatura en la cinética de una reacción catalizada por EG III

Se ha estudiado la dependencia con el pH de la constante de especificidad de la reacción de hidrólisis de $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$ catalizada por EG III. De las dos vías posibles de ataque enzimático (Fig. 18, pág. 46) se ha seguido la que conduce a la liberación de MeUmb, producto que permite una valoración sencilla y precisa mediante fluorimetría. El estudio se ha limitado al intervalo de pH de 4.0 a 6.3, en el que la enzima es estable incluso a altas temperaturas (Fig. 17A, pág. 45). Previamente se analizó por HPLC la posibilidad de que el patrón de hidrólisis del sustrato dependiera del pH; no se observaron cambios en la relación $v_{\text{MeUmb}(\text{Glc})_3}/v_{\text{MeUmb}}$ dentro del intervalo de pH 3.5-6.5.

A todas las temperaturas estudiadas (entre 30 y 55°C), la curva de pH del logaritmo de la constante de especificidad muestra una forma similar, con una caída en la región más básica del intervalo de pH considerado, cuya pendiente es -1 (Fig. 24A). Esto indica que la reacción enzimática depende del estado de ionización de un residuo de la proteína, que debe estar protonado para que tenga lugar la catálisis. El valor estimado para el pK_a de dicho residuo es 5.46 ± 0.03 a 55°C. La variación de este valor con la temperatura ha permitido determinar la entalpía de ionización correspondiente que ha resultado ser -15.9 ± 2.6 J/mol (Fig. 24B), apuntando a un grupo carboxilo como responsable de este pK_a (Cleland, 1977).

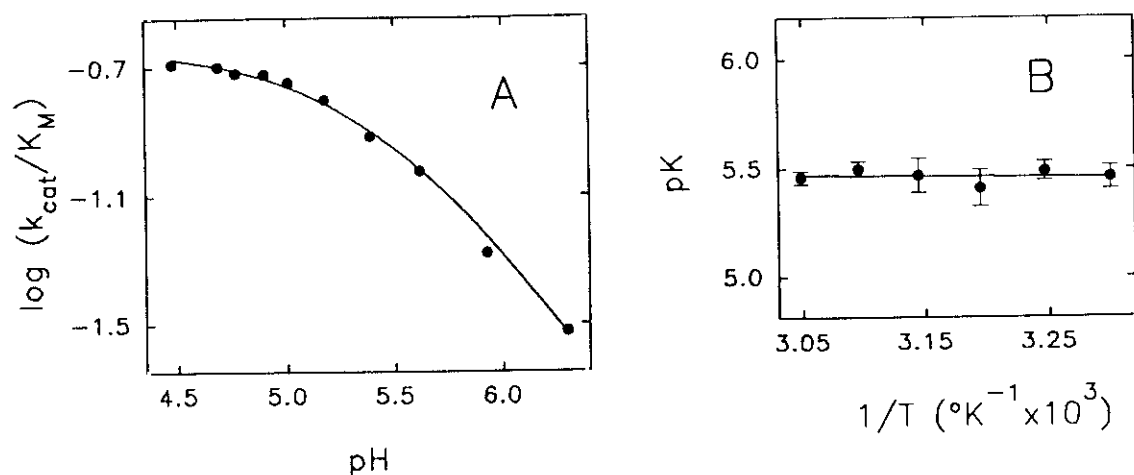


Figura 24. Efecto del pH y la temperatura en la constante de especificidad de la hidrólisis de MeUmb(Glc)₃ catalizada por EG III. (A), variación con el pH del $\log(k_{cat}/K_m)$ a 55°C. (B), dependencia de la temperatura del valor de pK_a calculado a partir de los perfiles de pH de $\log(k_{cat}/K_m)$.

3.2. Modificación de histidinas con dietilpirocarbonato (DEPC)

Los estudios de homología entre celulasas de la familia A (Henrissat y col., 1989) señalan la existencia de dos residuos de histidina conservados, que en la secuencia de EG III corresponden a His173 e His288. La posible implicación de residuos de histidina en la actividad de la enzima ha sido estudiada con DEPC, reactivo específico del anillo imidazol (Miles, 1977). No se ha observado inactivación de EG III después de incubación con exceso de DEPC, en distintos tampones (MES 50 mM, pH 6.5; fosfato sódico 100 mM, pH 6.0). Un resultado similar se obtuvo para EG I de *S. commune* (Clarke y Yaguchi, 1985), celulasa más estrechamente "emparentada" con EG III de entre las de secuencia conocida (Béguin, 1990). No obstante, la ausencia de inactivación por DEPC no excluye la posibilidad de que una o las dos His conservadas en la familia A sea(n) esencial(es) en EG III; por causas indeterminadas podría(n) ser inaccesible(s) al reactivo.

3.3. Modificación de tirosinas con tetranitrometano (TNM)

La existencia de residuos aromáticos, especialmente Trp y Tyr, que participan en la unión de azúcares es frecuente en proteínas capaces de interactuar con carbohidratos (Quioco, 1986). El estudio de la modificación con TNM de CBH I de *T. reesei* apunta a la participación en la catálisis de un residuo de Tyr (Tomme, 1991).

La incubación de EG III con exceso de TNM (pH 8.3, temperatura ambiente) provoca una lenta inactivación de la enzima (Fig. 25). La presencia de un ligando (celobiosa) en concentraciones saturantes no previene la pérdida de actividad, aunque se desconoce si la enzima es capaz de unir celobiosa a valores tan básicos de pH. En consecuencia, la modificación con TNM no permite adelantar ninguna conclusión sobre el papel de los residuos de tirosina en EG III.

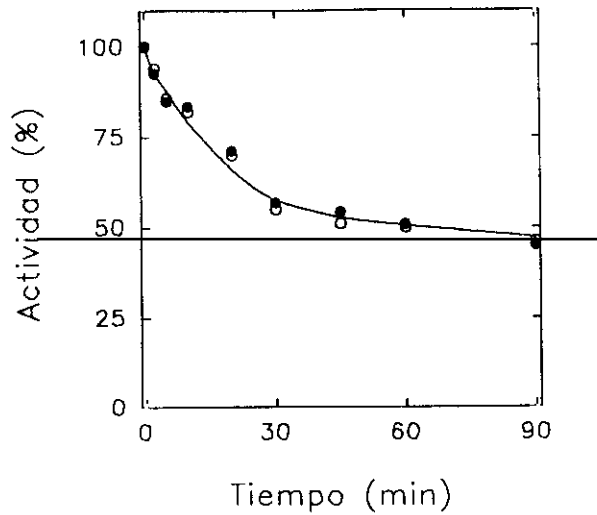


Figura 25. Inactivación de EG III por TNM (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3 a temperatura ambiente ([TNM]/[EG III] ≈ 1000). La incubación se realizó en ausencia de ligandos (●-●), o en presencia de celobiosa 100 mM (○-○).

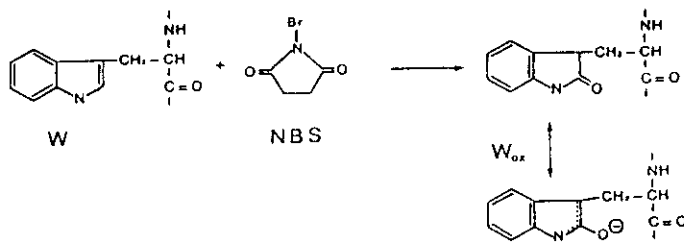


Figura 26. Reacción de oxidación de Trp por NBS (Lundblad y Noyes, 1984).

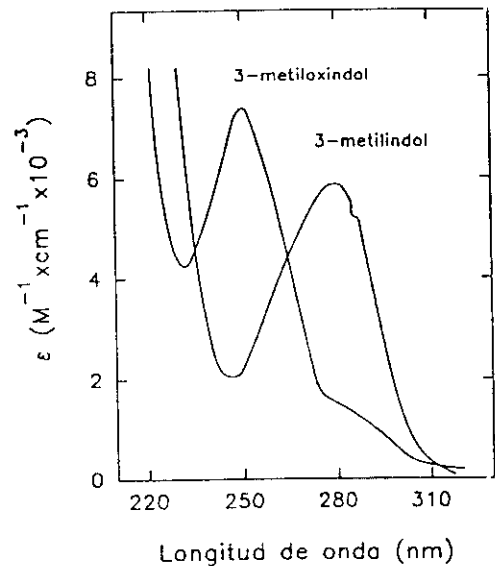


Figura 27. Espectros de absorción de indol y oxindol (Spande y Witkop, 1967).

3.4. Modificación de triptófanos con N-bromosuccinimida (NBS)

La oxidación de triptófano por NBS (Fig. 26) es una reacción muy rápida que se puede cuantificar fácilmente por espectroscopía, merced a la diferencia entre los espectros de absorción del indol y el oxindol (Fig. 27) (Spande y Witkop, 1967). Este reactivo ha sido profusamente empleado en la modificación de proteínas, con el fin de estudiar la función biológica de residuos de triptófano (Lundblad y Noyes, 1984).

A continuación se detalla el estudio de modificación de EG III por NBS, que ha permitido identificar dos Trp esenciales con distinta localización, uno en el dominio de unión a celulosa y el otro en el centro activo de la enzima.

3.4.1. Extensión y especificidad de la modificación

La adición sucesiva de pequeñas alícuotas de NBS conduce a la progresiva oxidación de residuos de Trp, como se muestra en la Figura 28: la absorbancia disminuye a 280 nm, y a la vez aumenta a 250 nm, indicando la formación de oxindolalanina (Spande y Witkop, 1967).

La oxidación de Trp es lineal con respecto a la cantidad de reactivo añadido (Fig. 29A); después de modificar 3 residuos de Trp, tras la adición de 4.5 moles NBS/mol EG III, la adición de más NBS hace que se enturbie la solución de proteína. Un fenómeno similar se ha observado con frecuencia en otras proteínas como por ejemplo: α -quimotripsina (Spande y col., 1966), aglutinina de germen de trigo (Privat y col., 1976) o lisozima (Green y Witkop, 1964).

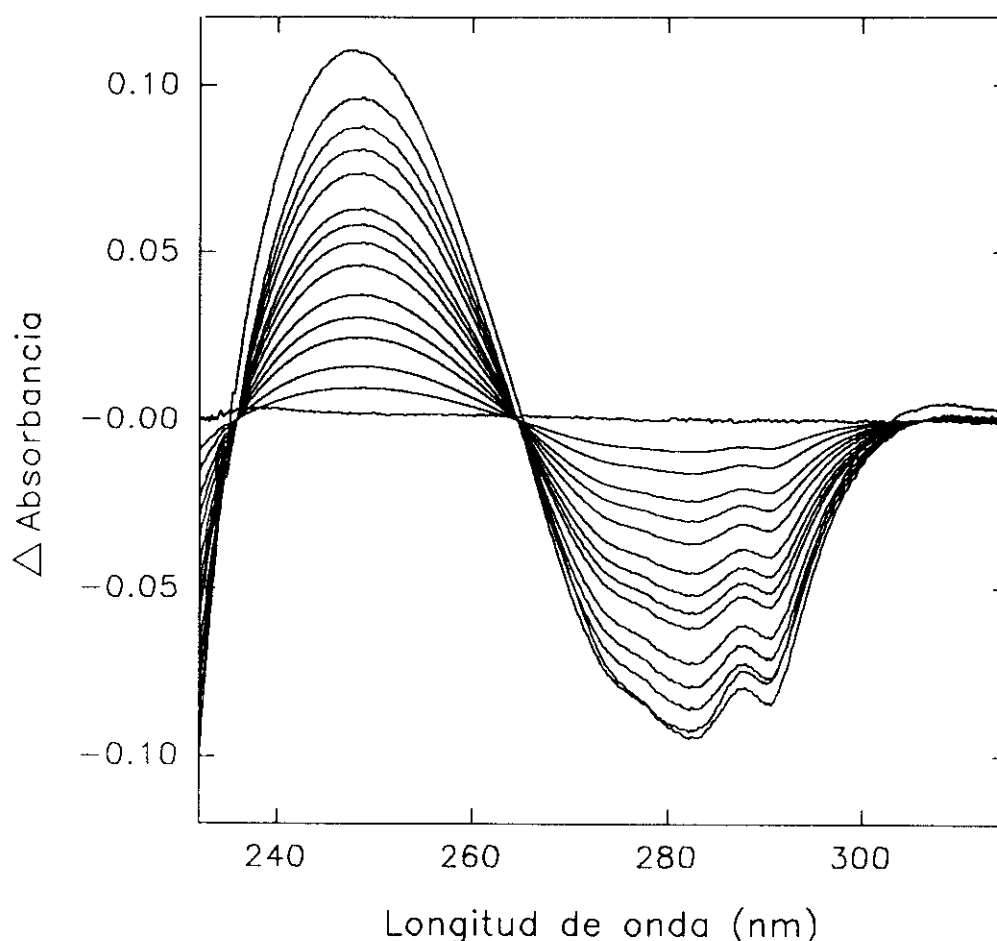


Figura 28. Espectros de diferencia de EG III inducidos por la oxidación con NBS. Los espectros se tomaron 1 min después de cada adición del reactivo (20 μ l, 0.15 mM en agua) a la solución de EG III (1 ml, concentración inicial 9.1 μ M; en acetato sódico 50 mM, pH 5.0) de la cubeta de muestra. A la solución de enzima contenida en la cubeta de referencia se le añadía agua en lugar de NBS. Antes de cada adición de NBS (agua) se recogían alícuotas de 20 μ l para ensayos de actividad. La temperatura se mantuvo a 15°C.

La reacción de NBS con proteínas en las condiciones empleadas se limita normalmente a la oxidación de residuos de Trp, pero cabe la posibilidad de que este modificador oxide las cadenas laterales de otros residuos: Tyr, Cys, Met o His, o bien, que rompa enlaces peptídicos en los que intervengan Trp, Tyr o His (Spande y Witkop, 1967; Lundblad y Noyes, 1984).

En el presente estudio la especificidad del ataque del NBS por los residuos de Trp está fuera de toda duda porque el exceso de reactivo requerido es muy bajo, 1.5 moles NBS por mol de Trp oxidado, igual que el encontrado para la oxidación del ester metílico de N-acetil-L-triptófano, que se emplea como compuesto modelo, y uno de los más bajos entre los descritos en la bibliografía para distintas proteínas (Lundblad y Noyes, 1984). Datos adicionales a favor de la especificidad de la reacción son: el mantenimiento a lo largo de la modificación, del punto isobéptico a 264 nm (Fig. 28) que indica que no hay oxidación de Tyr (Ohnishi y col., 1980), y la ausencia de Cys libres en EG III (pág. 43).

La integridad de la estructura primaria de la enzima después de la modificación se comprobó por electroforesis en SDS; muestras de EG III con 1 (W_{1ox}), 2 (W_{2ox}) ó 3 Trp oxidados (W_{3ox}) migraron como una sola banda a igual distancia que la proteína nativa.

3.4.2. Protección con ligandos

Cuando la reacción de EG III con NBS se lleva a cabo en presencia de celooligosacáridos en concentraciones saturantes, la modificación de Trp requiere mayores cantidades de reactivo. Por ejemplo, la adición al medio de reacción de metil- β -celotetraósido 10 mM aumenta la tasa de consumo de NBS de 1.5 moles/mol de Trp oxidado (control) a 2.9 moles/mol (Fig. 29). El mismo efecto se observa con celotriosa 10 mM o celobiosa 100 mM, mientras que la presencia de glucosa 100 mM no altera el curso de la modificación, como era de esperar porque no es un ligando de la enzima.

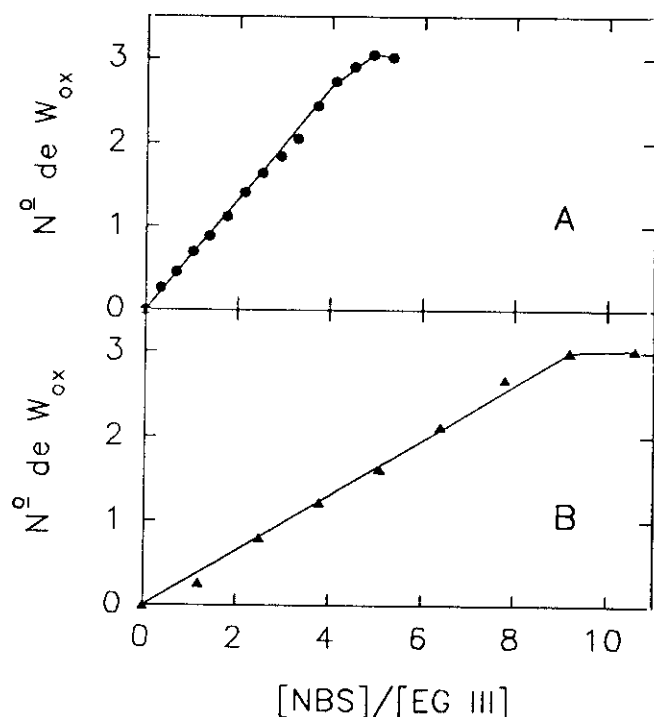


Figura 29. Correlación del número de Trp oxidados por molécula de EG III y la concentración de NBS. El número de Trp oxidados se calcula a partir de la disminución de absorbancia a 280 nm como se describe en Materiales y Métodos (pág. 35). La modificación se llevó a cabo: (A), en ausencia de ligandos o (B), en presencia de metil- β -celotetraósido 10 mM.

Ensayos preliminares con el ester metílico de N-acetil-L-triptófano mostraron que los azúcares empleados en los estudios de protección no interferían en la reacción del anillo indólico con NBS.

La prevención parcial de la modificación por celooligosacáridos sugiere que los Trp oxidados por NBS están localizados en, o cerca, del sitio de unión de cualquiera de los dominios de EG III (catalítico y de unión a celulosa).

3.4.3. Efecto de la modificación en la actividad catalítica y en la capacidad de adsorción a celulosa

La modificación de EG III con NBS provoca primero una disminución de la capacidad de adsorción a celulosa (coincidente con la oxidación de un primer residuo de Trp) (Fig. 30A), y seguidamente afecta a la actividad catalítica con un efecto dispar sobre la hidrólisis de dos sustratos (Fig. 30B).

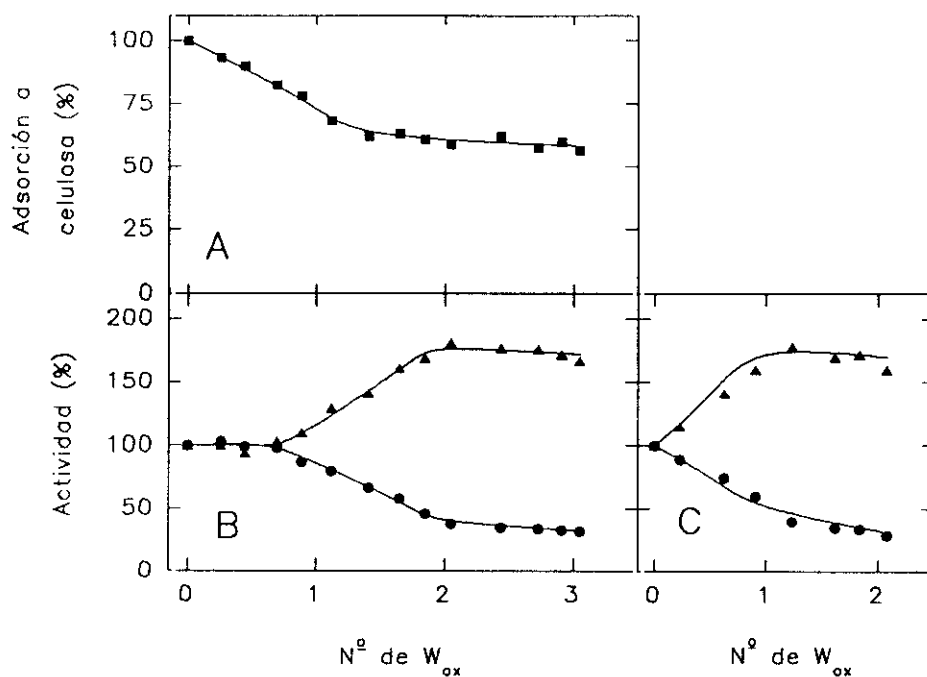


Figura 30. Efecto de la oxidación de Trp en la actividad y adsorción a celulosa de EG III. En muestras con distinto grado de modificación se han determinado las siguientes propiedades: (A), adsorción a Avicel de EG III; (B), actividad de EG III sobre $CNP(Glc)_3$ (▲) y $MeUmb(Glc)_3$ (●); (C), actividad del núcleo catalítico de EG III sobre $CNP(Glc)_3$ (▲) y $MeUmb(Glc)_3$ (●).

Teniendo en cuenta que la **capacidad de adsorción a celulosa** depende del dominio de unión a celulosa (DUC) de EG III (Ståhlberg y col., 1988), el primer residuo de Trp oxidado parece estar situado en dicho dominio a juzgar por la disminución de la cantidad de enzima adsorbida a Avicel concomitante con la modificación de este residuo (Fig. 30A). Para corroborar esta hipótesis se ha modificado el núcleo de EG III (carente de DUC); después de oxidar 2 Trp

la solución proteica se tornaba turbia (fenómeno observado en EG III tras oxidación de 3 Trp), y los cambios en la actividad hidrolítica observadas en EG III cuando se oxida un segundo residuo de Trp eran evidentes en el núcleo con la oxidación de un primer Trp (Fig. 30C). Se confirma, en consecuencia, la localización en el DUC del primer residuo oxidado por NBS en la enzima no truncada. La capacidad de adsorción a Avicel se reduce pero no se elimina a resultas de la conversión de este Trp a oxindolalanina (Fig. 31). La oxidación ulterior de más residuos de Trp no afecta a la adsorción (Fig. 30A).

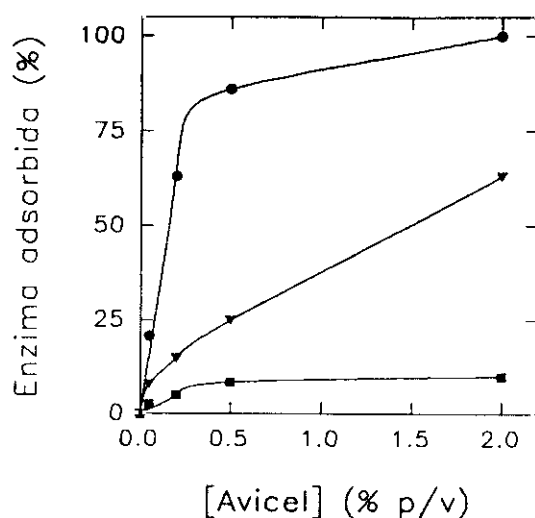


Figura 31. Efecto de la oxidación del primer Trp en la capacidad de adsorción a celulosa. EG III intacta (●—●), W_{1ox} EG III (▼—▼), y el núcleo de EG III (■—■), en una concentración 0.6 μ M, se incubaron a 4°C con diferentes concentraciones de Avicel. Una vez alcanzado el equilibrio (30 min) se determinó la fracción de enzima no adsorbida.

La oxidación de un segundo residuo de Trp afecta sensiblemente a la **actividad catalítica** de EG III (Fig. 30B). El patrón de hidrólisis de CNP(Glc)₃ y MeUmb(Glc)₃ cambia drásticamente en la proteína modificada, siendo opuesto el efecto en cada uno de los sustratos (Tabla XIII). La actividad sobre celotriosa, celotetraosa y celopentaosa se reduce un 65 % aproximadamente (a una concentración 10 mM de sustrato), sin variación de los patrones de rotura, como consecuencia de la oxidación de este segundo Trp. Los parámetros cinéticos para la hidrólisis de CMC por EG III intacta y W_{2ox} se muestran asimismo en la Tabla XIII; la modificación afecta a la K_m pero no a la k_{cat}. Todos los cambios observados apuntan a que el residuo de Trp considerado participa en la unión del sustrato.

Las muestras modificadas en presencia de ligandos mostraron los mismos cambios en adsorción y actividad con respecto al grado de oxidación de Trp, que han sido comentados para la proteína modificada en ausencia de ligandos.

El tercer residuo de Trp accesible al NBS antes de la desnaturalización de la proteína es también protegido de la modificación por celooligosacáridos (Fig. 29, pág. 56); sin embargo, su oxidación no produce ningún efecto observable en las propiedades enzimáticas de EG III. Desconocemos si este residuo tiene alguna implicación funcional, difícil de estudiar después del gran cambio provocado por la oxidación del "segundo" residuo de Trp, o si está localizado cerca, o en el centro activo, sin participar en la unión del sustrato; también podría no tener relación alguna con el centro activo, e interactuar inespecíficamente con los ligandos empleados.

Tabla XIII. Efecto de la oxidación del segundo Trp en las propiedades catalíticas de EG III. Los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} corresponden a la hidrólisis de CMC (30°C, pH 5.0) y las relaciones de velocidad a la rotura de $CNP(Glc)_3$ y $MeUmb(Glc)_3$ (25°C, pH 5.0).

Enzima	K_m ($mg \cdot ml^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($ml \cdot mg^{-1} \cdot s^{-1}$)	$v_{CNP(Glc)_3}/v_{CNP}$	$v_{MeUmb(Glc)_3}/v_{MeUmb}$
Nativa	0.48 ± 0.02	36.3 ± 0.7	75.6	1.3	0.5
W_{2ox}	0.78 ± 0.06	35.1 ± 1.6	45.0	0.3	0.8

3.4.4. Efecto de la modificación en la termoestabilidad y estructura secundaria

La **estabilidad térmica** de EG III W_{2ox} es ligeramente menor que la de la proteína nativa o W_{1ox} (Fig. 32). En cualquier caso, después de incubación a 60°C durante 30 min, la muestra W_{2ox} retiene un 95 % de actividad.

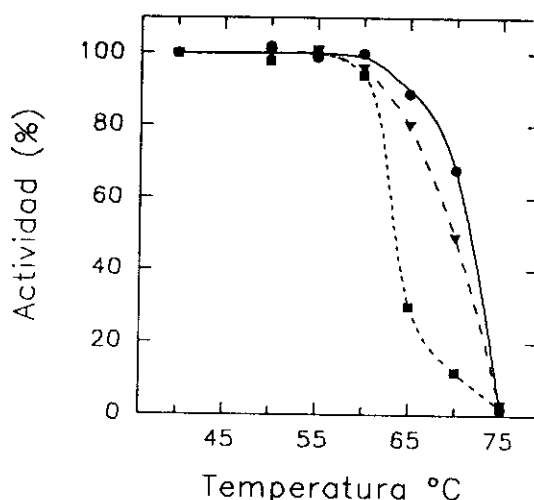


Figura 32. Termoestabilidad de EG III intacta y modificada con NBS. Muestras ($3.4 \mu M$) de EG III intacta (●—●), W_{1ox} (▼—▼), y W_{2ox} (■—■) se incubaron a distintas temperaturas a pH 5.0 (acetato sódico 50 mM) durante 30 min. La actividad residual se determinó a 25°C con $CNP(Glc)_3$ como sustrato.

Los espectros de **dicrófismo circular** en el ultravioleta lejano de EG III nativa y con distintos grados de oxidación (W_{1ox} y W_{2ox}) se muestran en la Figura 33. La semejanza entre los tres espectros indica que la modificación no afecta a la estructura secundaria de la proteína. La posibilidad de que EG III sufra un cambio conformacional a consecuencia de la oxidación de dos de sus residuos de Trp parece descartable a la vista de los resultados comentados en este

apartado. Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular de EG III indica un alto contenido de hélice α y, sobre todo, estructura β , como ocurre en otras celulasas: EG I de *T. reesei* (Domínguez, 1991), CBH II de *T. reesei* (Rouvinen y col., 1990), y EG D de *Clostridium thermocellum* (Juy y col., 1992).

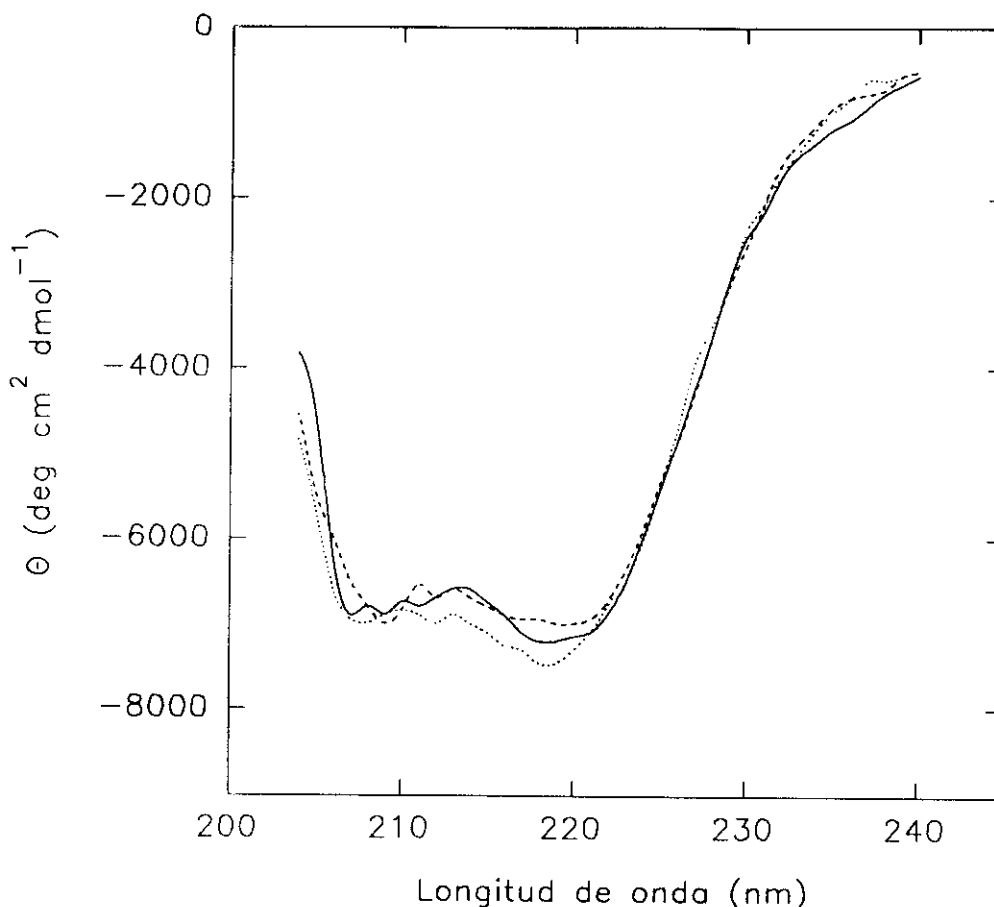


Figura 33. Espectros de dicroísmo circular de EG III intacta (—), W_{1ox} (----), y W_{2ox} (·····). Las muestras estaban en acetato sódico 50 mM, pH 5.0.

3.4.5. Identificación de un residuo de Trp esencial en el dominio de unión a celulosa

Muestras de EG III intacta, W_{1ox} y W_{2ox} , así como del núcleo de EG III intacto y W_{1ox} fueron digeridas con tripsina, y los hidrolizados resultantes se analizaron por HPLC en fase reversa empleando como detector un Photodiode Array (Waters), que permite determinar de modo continuo espectros del eluido de la columna. En la Figura 34 se han superpuesto los cromatogramas a 214 nm correspondientes a EG III no oxidada y W_{2ox} . Se señalan las zonas del mapa peptídico en las cuales se aprecian diferencias entre la enzima no modificada y oxidada con NBS.

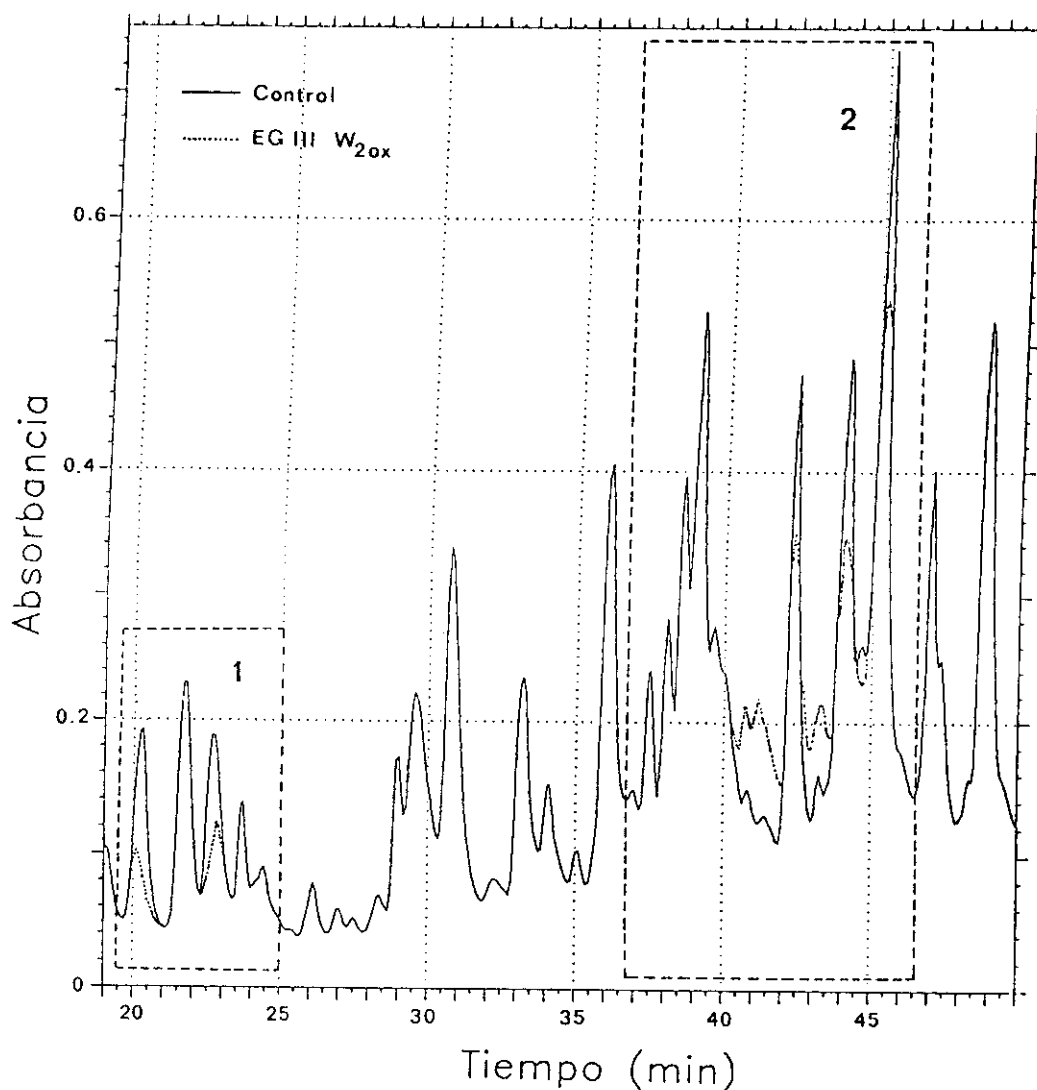


Figura 34. Comparación de los mapas tripticos de EG III no modificada y W_{2ox} . Se muestra el perfil de absorbancia a 214 nm correspondiente al control, sobre el que se señalan en trazo discontinuo las diferencias observadas en el perfil correspondiente a EG III W_{2ox} . En la región "1" se observan cambios correspondientes a la oxidación del primer Trp (también observados en W_{1ox}), mientras que la oxidación del segundo Trp se hace notar en la región "2".

La oxidación del primer residuo de Trp, esencial para la adsorción a celulosa, conduce a la disminución de dos picos ("a" y "b") en la región "1" (Fig. 35A y B). La comparación de los perfiles de elución de EG III no modificada y W_{1ox} , y del núcleo de EG III no modificada (Fig. 35C) permite deducir que un péptido procedente del DUC, presente en los picos a_0 y b_0 del digerido de EG III nativa, no aparece en a_1 y b_1 del digerido de EG III W_{1ox} ni en a'_0 y b'_0 del núcleo no modificada; en el primer caso a consecuencia del tratamiento con NBS, y en el segundo porque el núcleo carece de DUC. En la misma posición coeluye al menos un contaminante en cada pico, como demuestra el análisis espectral ilustrado en la Figura 35 (D y E).

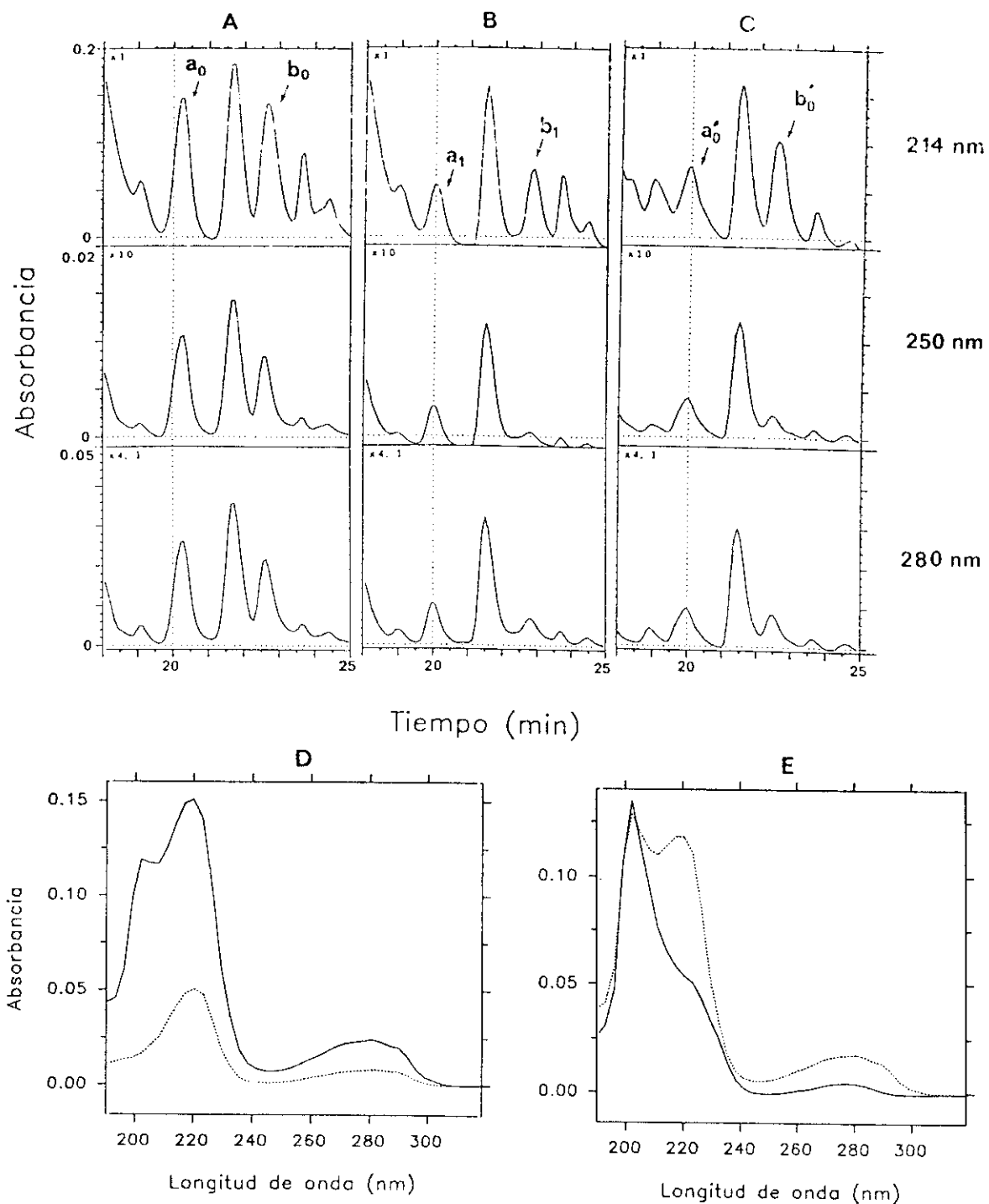


Figura 35. Comparación de los mapas peptídicos en la región "1" de: (A), EG III no modificada; (B), EG III W_{10x} ; (C), núcleo catalítico no modificado. Análisis espectral de los picos: (D), "a", y (E), "b", procedentes del digerido de EG III no modificada (línea continua) y de EG III W_{10x} (línea discontinua).

El análisis del pico b_0 por PDMS (Fig. 36) señala la presencia de varios péptidos, siendo el mayoritario uno de masa 835.0 Da y el segundo más abundante, otro de masa 1155.5 Da. Estos resultados, combinados con los de secuenciación de b_0 y b_1 (Tabla XIV) han permitido

identificar el componente principal de b_0 como el péptido Gly6-Trp13 (M teórica: 834.7 Da) procedente del DUC, y uno de los contaminantes como un producto de la autólisis de la tripsina (Ser126-Lys136, M teórica 1153.3 Da). Los datos obtenidos en el análisis de "a" son confusos, porque se trata de una mezcla compleja de péptidos; es posible, además, que el péptido del DUC presente en a_0 pueda estar bloqueado por piroglutámico, correspondiente al extremo N-terminal de EG III (Saloheimo y col., 1988).

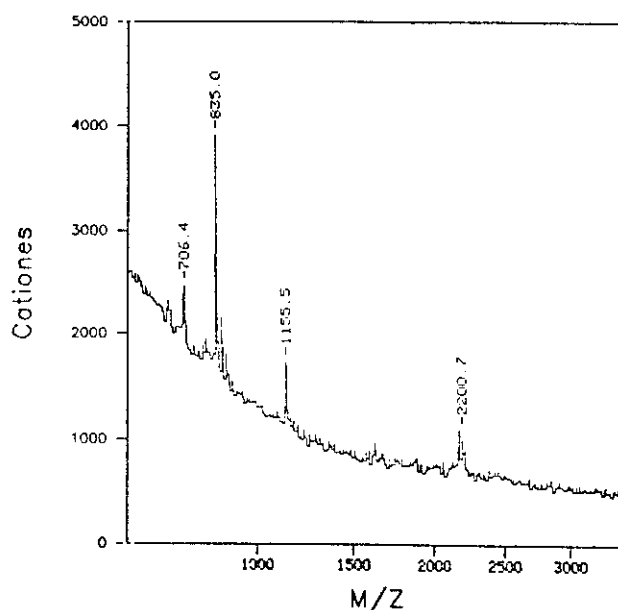


Figura 36. Espectro de PDMS del pico b_0 , procedente de la digestión triptica del control (EG III no modificada). Los números indican la masa en Da correspondiente a las señales detectadas.

Tabla XIV. Datos obtenidos del análisis del pico "b". La secuencia de EG III (Saloheimo y col., 1988) se muestra en la Figura 49 (pág. 84); la de la tripsina bovina fue determinada por Walsh y Neurath (1964). (xxx indica que no se ha detectado en esa posición el aminoácido esperado, de acuerdo con la secuencia deducida).

Pico	M por PDMS, Da	Secuencia N-terminal	Péptido identificado (M teórica, Da)
b_0	835.0 (1155.5, 706.4)	Gly-Gln-xxx-Gly-Gly-Ile-Ser-xxx-Gly-Thr-Ser-Tyr-	Gly6-Trp13 de EG III (834.7) Ser126-Lys136 de tripsina (1153.3)
b_1	1154.9 (706.2)	Ser-xxx-Gly-Thr-Ser-Gly-Asn-Leu-Thr-Leu-	Ser126-Lys136 de tripsina (1153.3) No identificado

La secuencia del péptido del DUC identificado, Gly6-Trp13, indica que la rotura proteolítica es de tipo quimotriptico (entre un aminoácido aromático y otro cualquiera) y no triptico (entre Lys o Arg y cualquier aminoácido). La preparación de tripsina utilizada (Ref. nº 37260 de Serva, Alemania), contiene ~0.5 % de quimotripsina (catálogo del proveedor), y la elevada proporción tripsina:EG III empleada en la digestión (1:10) ha supuesto la adición de cantidades de quimotripsina suficientes como para obtener fragmentos quimotripticos tras un

largo tiempo de incubación (10 h) a 37°C. Condiciones más suaves (1:25, 1:10 4 h) no dieron resultados satisfactorios, y la quimotripsina pura, también ensayada para la digestión de EG III (1:25, 1:100), produjo gran cantidad de pequeños péptidos (observada por electroforesis en SDS), de complicado análisis.

La ausencia del péptido Gly6-Trp13 en los digeridos de EG III tratada con NBS puede ser debida a la oxidación del Trp5 o bien del Trp13. La quimotripsina parece incapaz de romper un enlace peptídico en el que la oxindolalanina aporte el grupo carboxilo. Esta suposición se basa en el hecho de que en el mapa "tríptico" de EG III W_{1ox} no se observan nuevos picos (respecto al mapa del control) que contengan oxindol. Si la proteasa no rompiera tras el $Trp_{ox}5$, el péptido generado, Gln1-Trp13, incluiría la Thr3, residuo muy probablemente glicosilado (Saloheimo y col., 1988); análogamente si NBS oxidara el Trp13, y no hubiese rotura tras este residuo, se formaría un péptido (Gly6-Pro30) en el que dos residuos, Ser26 y Thr27, parecen estar glicosilados (Saloheimo y col., 1988). Tanto en un caso como en otro los péptidos glicosilados producirían en el volumen de exclusión con restos de proteasa y EG III no hidrolizados, haciendo imposible su identificación. En cambio, si la proteasa reconociera como diana un enlace peptídico en el que el grupo carboxilo fuera aportado por oxindolalanina, el péptido Gly6-Trp13 aparecería en el mapa tríptico de EG III W_{1ox} , con igual tiempo de retención que en el mapa del control si el Trp5 fuera el modificado por NBS, o ligeramente antes si lo fuera el Trp13.

Los DUC de las distintas celulasas de *T. reesei* presentan un alto grado de similitud; poseen cuatro residuos aromáticos (cuya importancia en la interacción proteína-polisacárido ya ha sido comentada en la pág. 53) conservados en todos ellos (ver Fig. 47, pág. 82). En consecuencia, es de esperar que la función de dichos residuos y su localización espacial en el DUC sea semejante. La estructura tridimensional del DUC de CBH I ha sido determinada por resonancia magnética nuclear bidimensional (Kraulis y col., 1989); la Tyr466, equivalente al Trp5 en EG III, se sitúa en un plano hidrofílico expuesta al solvente, mientras que la Tyr474 homóloga al Trp13 de EG III forma parte del corazón hidrofóbico del DUC. Por lo tanto, el Trp5 debe ser el susceptible de oxidación por NBS.

3.4.6. Identificación de un residuo de Trp esencial en el dominio catalítico

La comparación de los mapas peptídicos de EG III no modificada y EG III W_{2ox} revela profundos cambios en la región "2" (Fig. 37). Hay picos que disminuyen ("c", "d") y picos que aparecen como consecuencia de la oxidación del segundo Trp: "e", "f", "g" y "h"; estos últimos poseen un máximo de absorbancia a 250 nm, característico del oxindol (Fig. 27, pág. 54) y no absorben a 280 nm (máximo de absorbancia del anillo de indol). El espectro del péptido f_2 , el más abundante de entre los que aparecen *de novo*, refleja su contenido en oxindol (Fig. 38).

Los mismos cambios se encuentran al comparar los mapas peptídicos del núcleo de EG III no modificado y W_{1ox} .

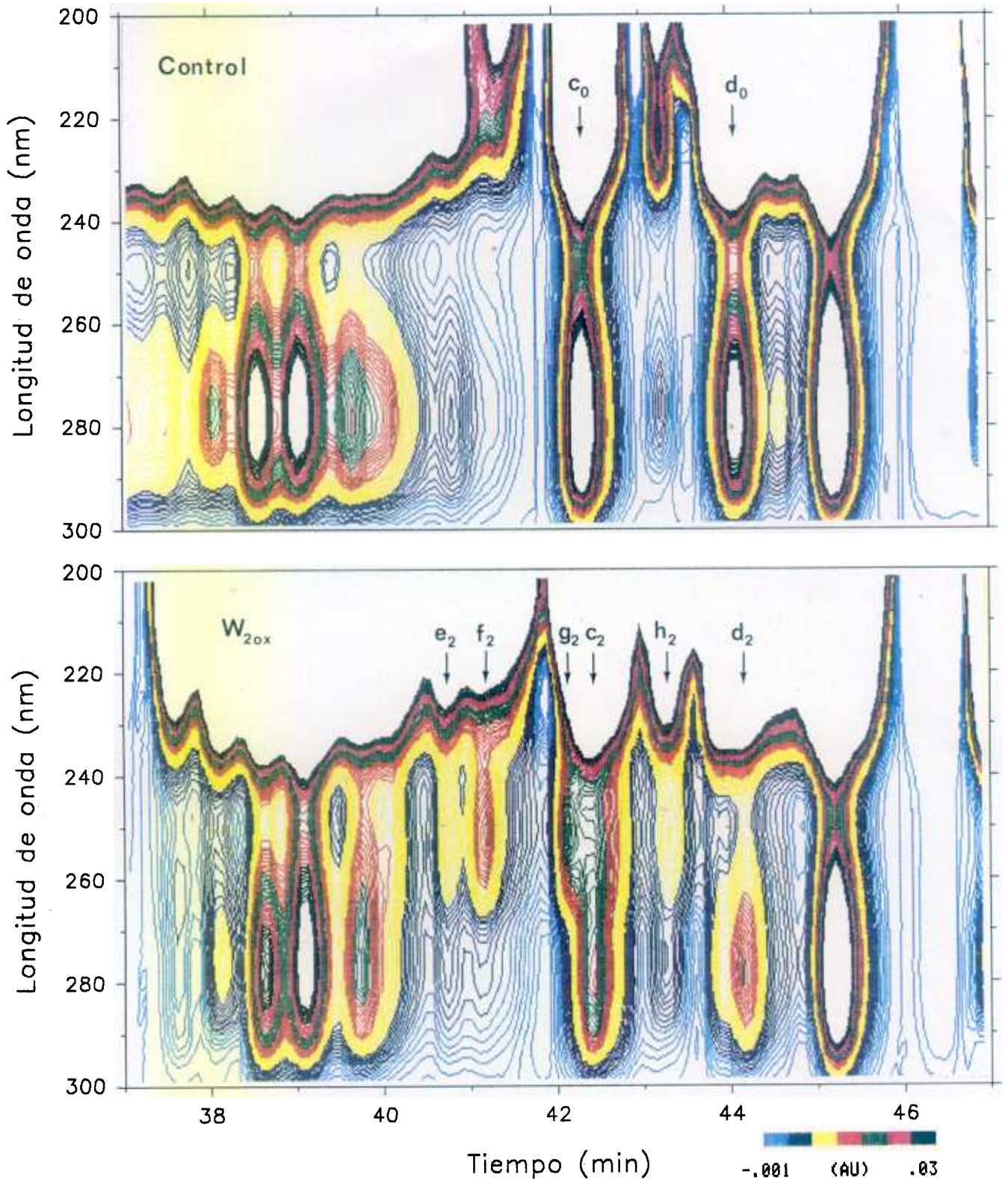


Figura 37. Comparación de los *mapas topográficos* ("contour maps") de la región "2" de EG III no modificada (control) y W_{2ox} . El *mapa topográfico* resulta de la proyección ortogonal de un mapa tridimensional en el que el eje x representa tiempo, y longitud de onda, y z absorbancia. La equidistancia entre *curvas de nivel* es de 0.0005 unidades de absorbancia; el color blanco indica valores de absorbancia fuera de escala.

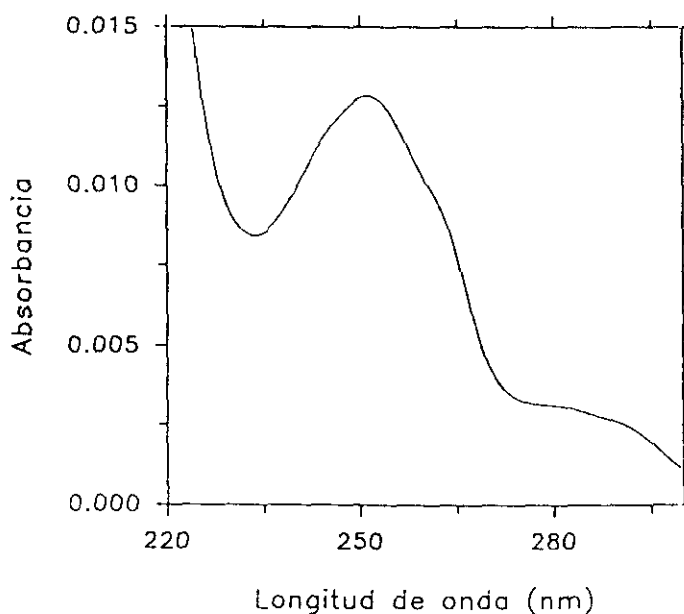


Figura 38. Espectro de absorción del péptido f_2 procedente de la hidrólisis triptica de EG III W_{2ox} .

En la tabla XV se recogen los datos obtenidos en el análisis de algunos de los péptidos señalados. Todos los resultados apuntan inequívocamente al residuo Trp255 como el segundo en ser oxidado por NBS. La importancia funcional de este grupo situado en el centro activo de EG III es coherente con su alto grado de conservación en las distintas celulasas de la familia A (Fig. 48, pág. 83).

Tabla XV. Datos más relevantes de los péptidos relacionados con la oxidación del segundo Trp. La secuencia de EG III se muestra en la Figura 49 (pág. 84).

Pico	M por PDMS, Da	Secuencia N-terminal	Péptido identificado (M teórica, Da)
c_0	1464.3 (2407.3)	No determinada	Ile248-Phe263 de EG III (1462.6)
d_0	No determinada	Ile-Ser-Leu-Pro-Gly-Asn-Asp-Trp-Gln-	Ile248-? de EG III
f_2	1478.7 (1639.6)	Ile-Ser-Leu-Pro-Gly-Asn-Asp-Trp _{ox} -Gln-	Ile248-Phe263 de EG III W_{2ox} (1478.6)

3.5. Modificación de grupos carboxilo con agentes químicos específicos

En todas las glicosidasas estudiadas hasta la fecha se ha demostrado la participación de al menos un grupo carboxilo en el fenómeno catalítico. En el caso de las que retienen la configuración del carbono anomérico, la catálisis tiene lugar con el concurso de un grupo ácido que facilita la salida del primer producto o aglicón, y de un carboxilato que actúa como nucleófilo que estabiliza el intermediario glicosil-enzima, normalmente mediante la formación de un enlace covalente con el ión carboxonio (Sinnot, 1990). Recientemente se ha demostrado que EG III pertenece a esta clase de glicosidasas (Gebbler y col., 1992); los estudios de pH

(pág. 52) señalan la existencia de un carboxilo esencial que debe estar protonado. Con el fin de identificar este residuo y el nucleófilo que presumiblemente posee EG III en su centro activo, se ha procedido a la modificación de la enzima con agentes químicos específicos de grupos carboxilo.

En la Tabla XVI se recogen los resultados de los intentos de inhibición realizados con carbodiimidias (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, EDC, y yoduro de 1-etil-3-(4-azonio-4,4-dimetilpentil)-carbodiimida, EAC), con N-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato (reactivo K de Woodward, RKW), y con N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ). Únicamente el reactivo K de Woodward es capaz de inactivar EG III, pero en unas condiciones extremas. A pesar de que la celobiosa protege de la inactivación por este reactivo, lo cual indica que un grupo modificado pudiera estar en el centro activo de la enzima, no se ha profundizado en el estudio de esta reacción de modificación debido a que el exceso de reactivo necesario para observar inhibición invalida cualquier conjetura acerca de la selectividad y especificidad de la modificación, y a que al ser 12 el número de carboxilos modificados en la enzima inactiva, es inviable la identificación de un hipotético residuo esencial entre ellos.

Tabla XVI. Estudios de modificación de EG III con reactivos específicos de grupos carboxilo.

Modificador	Tampón	Exceso de reactivo ^a	% Inhibición ^b	Observaciones
EDC/EAC	Fosfato pH 3.1	2500	0	En todos los casos se han hecho ensayos con y sin ester etílico de glicina.
	Piridina pH 4.0	2500	0	
	MES pH 5.1	2500	0	
	MES pH 5.6	500	0	
EEDQ	Fosfato pH 3.1	2500	0	
	Piridina pH 4.0	2500	0	
	MES pH 5.1	2500	0	
	MES pH 5.6	2500	0	
RKW	Fosfato pH 3.1	2500	25	
	Fosfato pH 6.0	2500	40	
	MES pH 4.5	5000	30	
	MES pH 5.1	5000	45	
	MES pH 5.6	5000	60	
	MES pH 6.4	5000	50	

^a [reactivo]/[EG III]

^b después de 1 h de incubación a temperatura ambiente

3.6. Modificación de un carboxilo esencial con el marcador de afinidad 4',5'-epoxipentil-β-celobiosido (EPO5)

El empleo de marcadores de afinidad, esto es, dirigidos específicamente al centro activo de una enzima, supone una valiosa herramienta para la identificación de aminoácidos esenciales (Eyzaguirre, 1987). En muchos estudios sobre la función de grupos carboxilo ha sido de gran utilidad el acoplamiento de un sustrato o análogo a un epóxido (Lundblad y Noyes, 1984). En el caso de las glicosidasas, esta aproximación ha permitido identificar carboxilos esenciales en lisozima de clara de huevo de ganso (Eshdat y col., 1973), *lacZ* β-galactosidasa de *E. coli*

(Herchen y Legler, 1984), β -glucosidasa ácida de humanos (Dinur y col., 1986), y otras (Legler, 1990).

3.6.1. Inactivación de EG III por epoxialquil β -celobiósidos. Efecto de la longitud del brazo aglicónico

EG III es inactivada por los tres epoxialquil β -celobiósidos ensayados: 2',3'-epoxipropil β -celobiósido (EPO3), 3',4'-epoxibutil β -celobiósido (EPO4), y 4',5'-epoxipentil β -celobiósido (EPO5) (Fig. 39). La actividad disminuye exponencialmente con el tiempo, y depende significativamente de la longitud del brazo aglicónico. Las velocidades relativas de inhibición, calculadas a partir de las pendientes de las rectas obtenidas en la representación semilogarítmica que se muestra en la Figura 39B, son: EPO3:EPO4:EPO5 = 0.1:0.2:1.

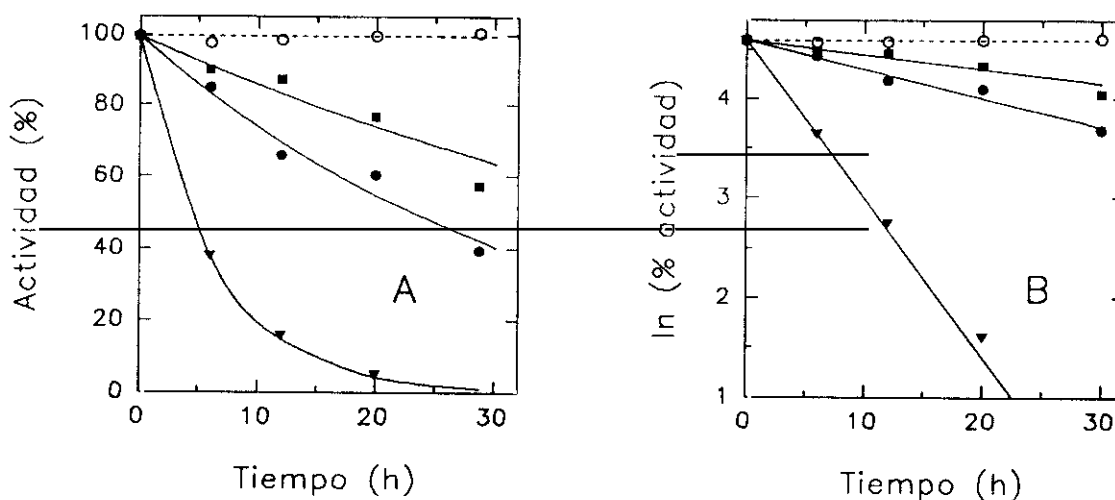


Figura 39. Inactivación de EG III por epoxialquil β -celobiósidos de diferente longitud del brazo aglicónico. EG III ($0.8 \mu\text{M}$) en tampón McIlvaine pH 4.6 se incubó a 37°C en presencia de EPO3 (■—■), EPO4 (●—●), y EPO5 (▼—▼) a una concentración 2.5 mM en todos los casos, o en ausencia de inhibidores (○--○). (A), representación directa de la inactivación; (B), representación semilogarítmica.

3.6.2. Especificidad de la inactivación

El hecho de que la inactivación con epoxialquil β -celobiósidos dependa de la longitud de la cadena aglicónica indica que el inhibidor reacciona con un aminoácido del centro activo de la enzima, o de sus proximidades. Más datos corroboran esta idea: inositol-epóxido no ejerce efecto inhibitorio alguno (el inositol no es ligando de la enzima), y la celobiosa, inhibidor competitivo de EG III, protege a la enzima de la inactivación por EPO5 (Fig. 40). La tasa de inhibición con EPO5 10 mM fue 3.5 veces menor en presencia de celobiosa 150 mM.

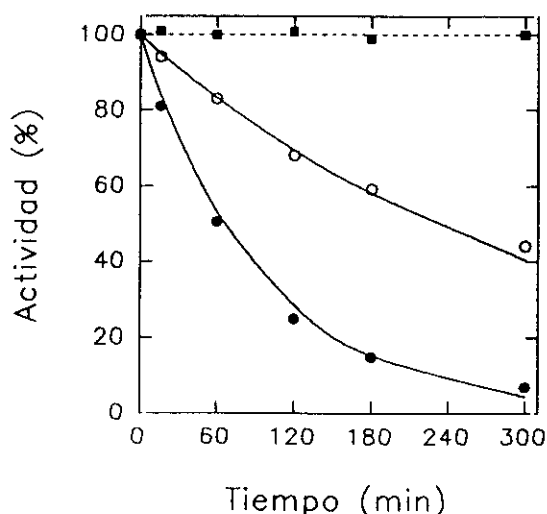


Figura 40. Efecto protector de la celobiosa sobre la inhibición por EPO5. EG III (0.8 μM) en tampón McIlvaine pH 4.6 se incubó a 37°C con EPO5 (10 mM) en ausencia (●—●) o presencia (○—○) de celobiosa 150 mM. (■—■), control sin inhibidor.

3.6.3. Cinética de la inactivación por EPO5

Siendo EPO5 el inhibidor más efectivo de los ensayados, se ha escogido para profundizar en el estudio de la modificación específica del centro activo de EG III.

La representación semilogarítmica de la actividad residual frente al tiempo para diferentes concentraciones de inhibidor se muestran en la Figura 41A; de las pendientes de las rectas obtenidas se calculan las constantes de primer orden de la inactivación (k_{app}), cuya dependencia de la concentración de EPO5 ha resultado ser hiperbólica (Fig. 41B). Esta cinética de saturación es la esperada para un marcador de afinidad, que se une a la enzima formando un complejo disociable enzima-inhibidor como paso previo a la inactivación irreversible, según se indica en la ecuación (8):



donde $E \cdot I$ es un complejo reversible entre la enzima y el inhibidor, y $E-I$ es la enzima inactivada por unión covalente al inhibidor (Eyzaguirre, 1987). Cuando la concentración de inhibidor es muy superior a la de enzima, como es el caso, y asumiendo que k_2 es mucho menor que k_{-1} , se cumple la ecuación (9):

$$k_{app} = (k_2 \cdot [I]) / ([I] + K_d) \tag{9}$$

donde k_{app} se determina, como ya se ha indicado, a partir de la ecuación $\ln (E(t)/E_0) = -k_{app} \cdot t$, siendo $E(t)$ la actividad residual a tiempo t , y E_0 la actividad enzimática inicial; K_d es la

constante de disociación del complejo E·I (Kitz y Wilson, 1962). Del ajuste de los datos representados en la Figura 41B a la ecuación (9) se han obtenido los siguientes valores para K_d y k_2 :

$$K_d = 30 \text{ mM}$$

$$k_2 = 35 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

El orden de la reacción de inactivación se ha determinado, de acuerdo con Levy y col. (1963), a partir de la representación de $\log(k_{app})$ frente a $\log([EPO5])$ (Fig. 41C). La pendiente de la recta obtenida es 0.8, indicando que la inactivación depende de la unión covalente de una molécula de inhibidor por molécula de enzima.

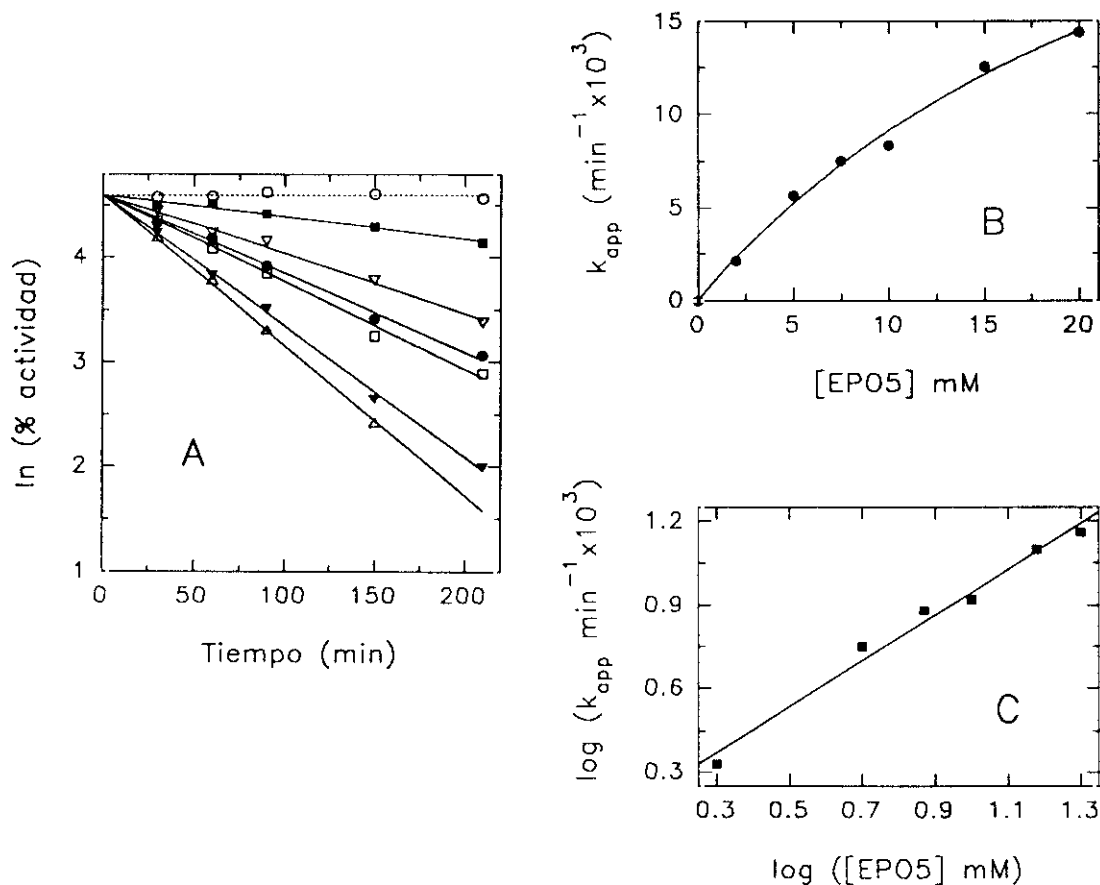


Figura 41. Cinética de la inactivación de EG III por EPO5. (A), la enzima (0.8 μM) se incubó (pH 4.6, 37°C) con EPO5 2 mM (■—■), 5 mM (▽—▽), 7.5 mM (●—●), 10 mM (□—□), 15 mM (▼—▼), y 20 mM (△—△), o sin inhibidor (○—○). (B), variación de k_{app} con la concentración de EPO5; la línea continua se ha deducido a partir de los datos experimentales (●), por ajuste a la ecuación (9). (C), determinación del orden aparente de la reacción de inactivación; la recta se ha dibujado a partir del ajuste por regresión lineal de los datos experimentales (■).

3.6.4. Dependencia con el pH de la inactivación por EPO5

En la Figura 42 se observa la similitud entre la variación con el pH de la actividad de EG III sobre celotriosa, y la inactivación de la enzima por el marcador de afinidad.

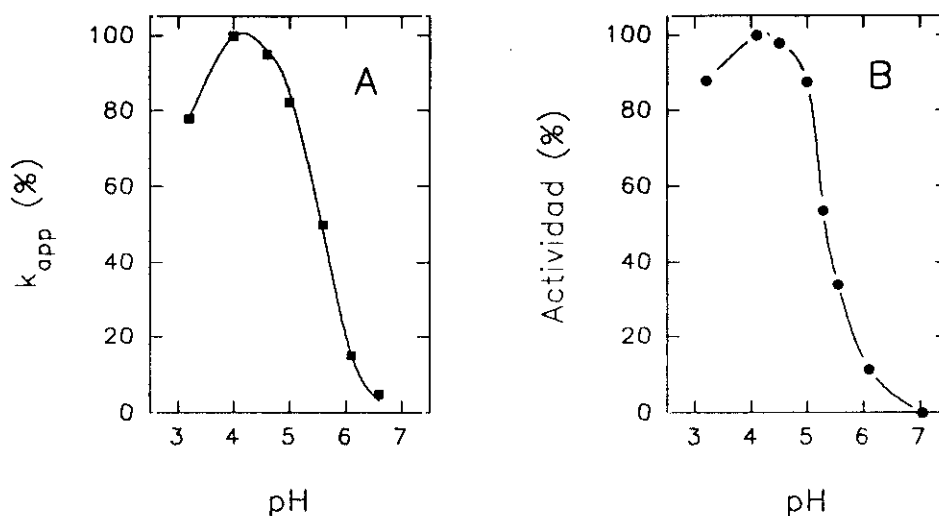


Figura 42. (A), Dependencia con el pH de la velocidad de inactivación de EG III por EPO5. La enzima (0.8 μ M) se incubó con EPO5 5 mM a 37°C, en tampones (McIlvaine) de distinto pH. La actividad residual se determinó a intervalos de tiempo apropiados, y las correspondientes k_{app} se calcularon de la representación semilogarítmica de actividad residual frente al tiempo. (B), variación con el pH de la actividad de EG III sobre celotriosa.

3.6.5. Identificación del grupo carboxilo esencial unido a EPO5

Para la identificación del grupo carboxilo unido a EPO5 se ha procedido a la digestión de muestras de EG III control y EPO5-EG III, con proteasa V8, en condiciones de rotura específica por enlaces Glu-X (tampón bicarbonato amónico 50 mM, pH 7.8). Esta proteasa puede romper también enlaces Asp-X en otras condiciones (fosfato sódico o potásico 50 mM, pH 7.8) (Drapeau, 1977). Si el marcador se ha unido a un residuo de Glu, es de esperar que la enzima proteolítica sea incapaz de romper tras ese residuo provocando la desaparición teórica de dos picos, y la aparición de uno nuevo, compendio de los dos anteriores. La comparación de los mapas peptídicos obtenidos (Fig. 43) confirma la desaparición de dos picos ("A" y "B") pero en el cromatograma correspondiente a EPO5-EG III no se observa ningún pico nuevo. La desaparición de B se aprecia mejor en los *mapas topográficos* de la Figura 44. La disminución de "C" en el mapa de EPO5-EG III no es repetitiva; en experiencias paralelas no se han observado cambios en ese pico. En la Tabla XVII se muestran los datos correspondientes al análisis de los péptidos "A" y "B".

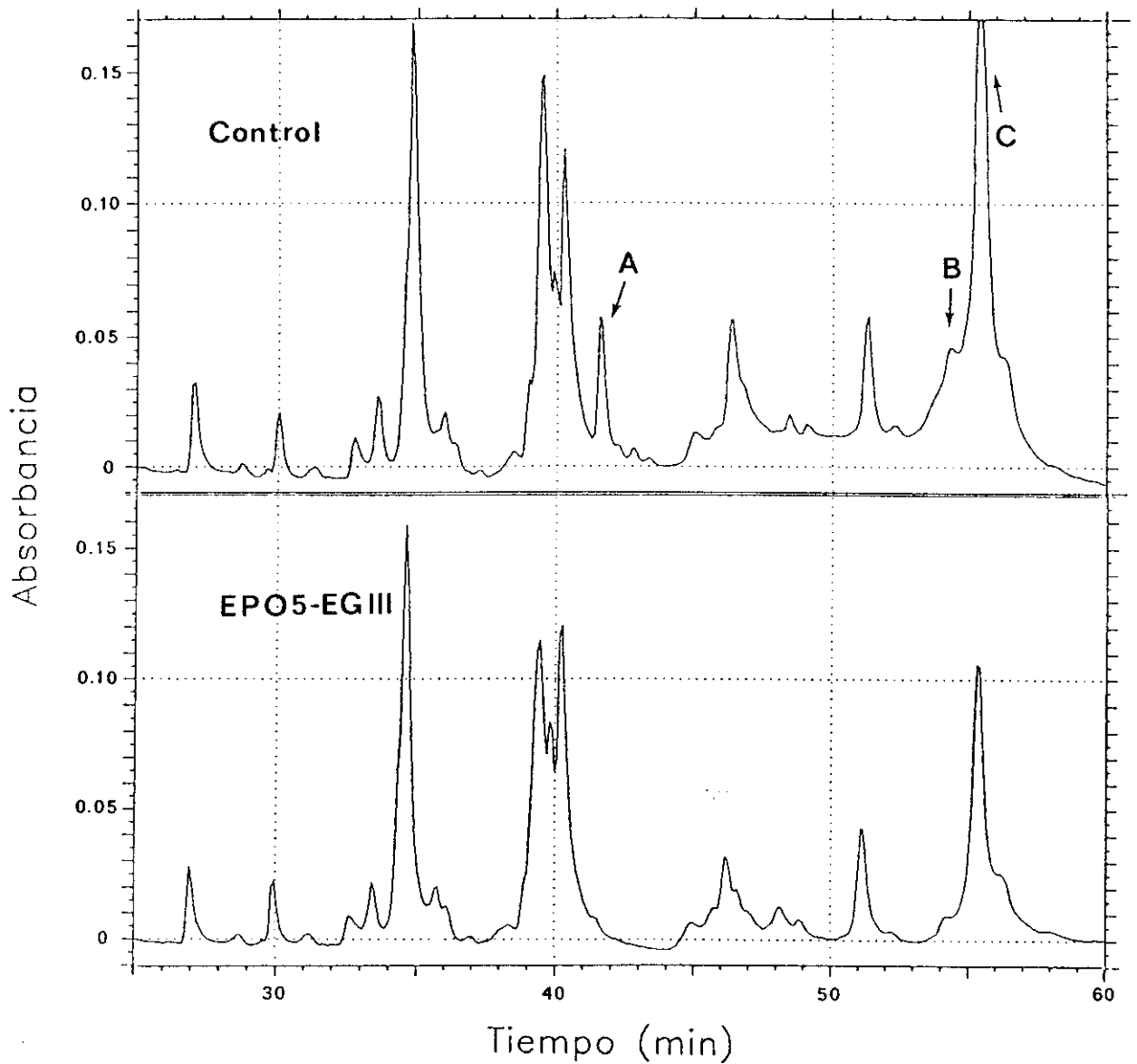


Figura 43. Comparación de los perfiles de elución (A_{214}) de los hidrolizados de EG III no modificada (control) y EPO5-EG III, obtenidos por digestión con proteasa V8.

Tabla XVII. Datos de masa y secuencia de los péptidos "A" y "B". La secuencia de EG III se muestra en la Figura 49, pág. 84).

Pico	M por PDMS, Da	Secuencia N-terminal	Péptido identificado (M teórica, Da)
A _{control}	3207.3	Cys-Thr-Thr-Asn-Asn-Ile-	Cys302-Glu329 de EG III (3207.4)
B _{control}	No determinado	Asp-Gly-Ala-Phe-Ser-Pro-Leu-	Asp308-? de EG III

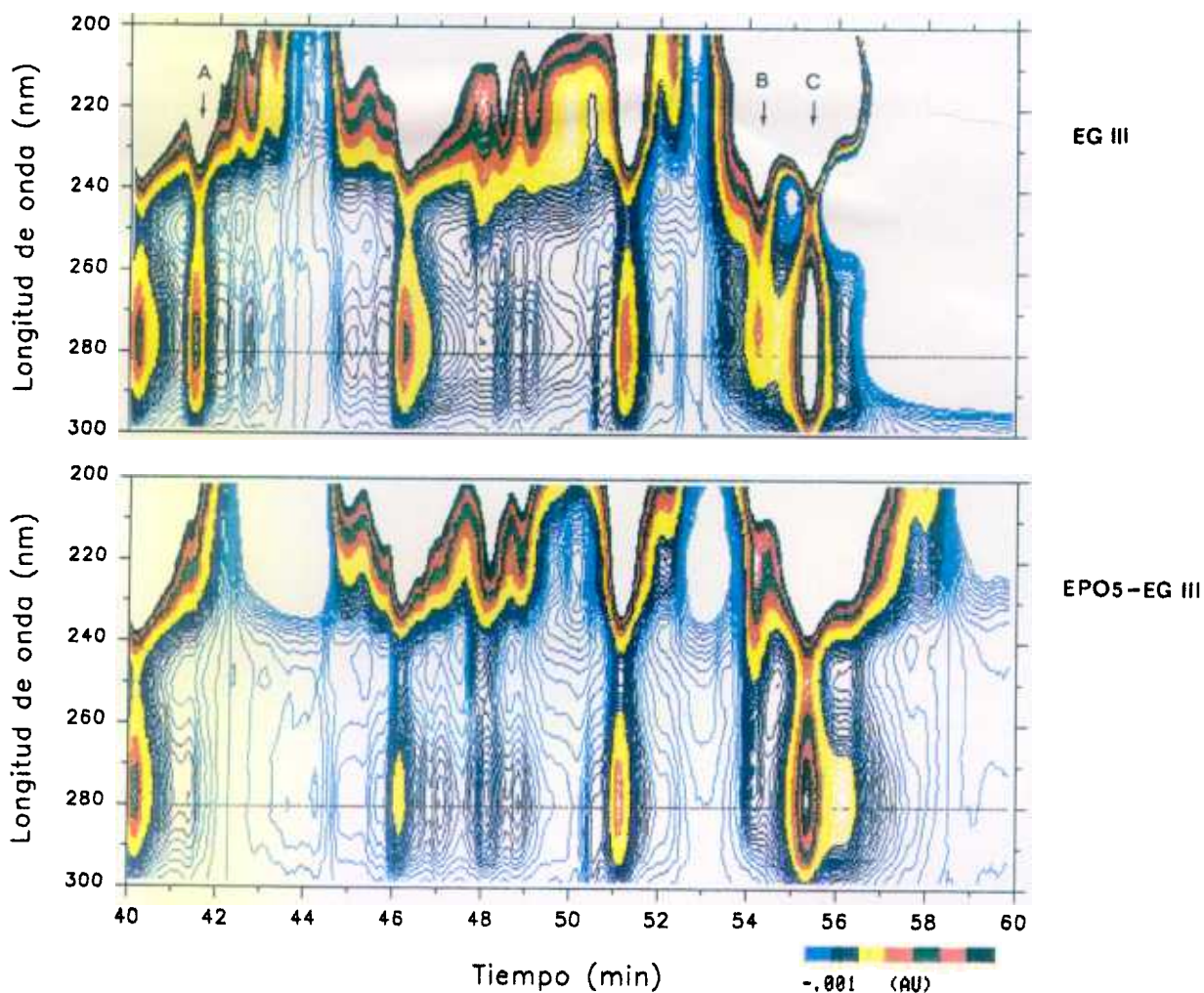


Figura 44. Mapas topográficos correspondientes a la región del perfil en que se observan diferencias entre los hidrolizados de EG III no modificada, y EPO5-EG III. Los detalles de este tipo de representación se explican en la Figura 37 (pág. 65).

La secuencia del péptido "A" señala a tres carboxilos como posibles dianas de EPO5: Glu301, Asp308 o Glu329. Los datos que conocemos de "B" excluyen al primero de estos residuos, y los estudios de homología (Fig. 48, pág. 83) al segundo. Glu329 está conservado en todas las celulasas de la familia A, y por lo tanto, debe ser el nucleófilo al que se une EPO5. Es digno de mención el origen anómalo de "B" que supone la rotura de un enlace Ile-Asp, inesperado en una digestión con la proteasa V8.

Por otra parte, EG III y EPO5-EG III también se han digerido con tripsina. Si bien no se ha concluido el análisis de los péptidos cuyo tiempo de retención varía en el perfil cromatográfico del hidrolizado de EPO5-EG III respecto al del control, los primeros resultados obtenidos corroboran que es Glu329 el residuo modificado.

$$v_1/v_2 = (k_{cat1})_{app}/(k_{cat2})_{app} = k_{cat1} \cdot K_{m2}/(k_{cat2} \cdot K_{m1}) \quad (15)$$

La linearización de las ecuaciones (10) o (11) permite calcular k_{catj}/K_{mj} :

$$[S]/v_j = K_{mj}/(k_{catj} \cdot [E]_0) + [S]/((k_{catj})_{app} \cdot [E]_0) \quad (16)$$

DISCUSSION

1. PURIFICACION Y PROPIEDADES MOLECULARES DE EG III

Numerosos procedimientos de **purificación** para las celulasas de *Trichoderma reesei* han sido desarrollados en distintos laboratorios, haciendo uso de combinaciones más o menos complejas de técnicas de separación convencionales (cromatografía en todas sus vertientes, electroforesis, isoelectroenfoque) (Bhikhabhai y col., 1984; van Tilbeurgh y col., 1984; Enari y Niku-Paavola, 1987; Biely y Markovic, 1988; Schülein, 1988, por citar algunos ejemplos sobresalientes). Frente a la mayor o menor complejidad de estos procedimientos, el paso cromatográfico en DEAE-Sepharose a pH 7 diseñado en nuestro laboratorio para el fraccionamiento inicial del material de partida, supone una forma rápida y sencilla de separar eficazmente las principales celulasas y hemicelulasas del hongo (Fig. 12, pág. 40).

Sin embargo, sólo se había descrito hasta el presente un método específico para la purificación de EG III (Saloheimo y col., 1988). A falta de datos cuantitativos referentes a dicho método, no podemos establecer una comparación con el procedimiento aquí expuesto. En cualquier caso, la preparación final de EG III empleada en este estudio es altamente homogénea como demuestran los análisis de pureza realizados (Figs. 13 y 14, pág. 41).

En un trabajo previo se había demostrado que la composición del sistema celulasa de *T. reesei* es independiente de la fuente de carbono empleada en el cultivo del hongo (Domínguez, 1991); no obstante, las condiciones de cultivo y la edad del caldo determinan la aparición de isocomponentes por modificaciones post-traduccionales tales como agregación, glicosilación, desamidación o proteólisis; así, en este trabajo no se ha detectado la presencia del núcleo catalítico de EG III, aislado en otras condiciones (lactosa como fuente de carbono) por Ståhlberg y col. (1988). En cambio, sí se ha detectado y purificado una isoenzima de EG III, denominada A 1:2 (Ståhlberg y col., 1988); ambas proteínas poseen igual masa y forma (según se determina por electroforesis y cromatografía de penetrabilidad, respectivamente), composición de aminoácidos (determinada después de hidrólisis ácida, que no permite conocer la proporción de Asn y Asp, o Gln y Glu, sino únicamente la suma de ácido y amida para cada par) y propiedades catalíticas, diferenciándose por su pI, más ácido en el caso de A 1:2. Parece muy probable que A 1:2 sea una forma desamidada de EG III, y dado que la desamidación es un mecanismo de degradación de proteínas relativamente poco estudiado (Creighton, 1985), sería interesante determinar las causas de aparición de A 1:2 en el caldo de cultivo de *T. reesei*.

El comportamiento de EG III en las dos cromatografías de intercambio iónico en DEAE-Sepharose incluídas en el proceso de purificación resulta sorprendente a primera vista: a pH 7 (fosfato sódico 5 mM) la enzima es parcialmente retenida, mientras que a pH 6.5 (imidazol-HCl 8 mM) la retención es total. Esta aparente contradicción se explica por la diferente naturaleza iónica de los tampones empleados que hace que en el primer caso la cantidad de cargas negativas (que compiten con la proteína por las cargas positivas del lecho cromatográfico) sea mayor que en el segundo, y, por otra parte, por la débil carga neta que exhibe la proteína a valores de pH neutros (por encima de su pI) como indica su curva de titulación (Fig. 16, pág. 43). A consecuencia de esta propiedad, la determinación correcta del pI de EG III implica largos tiempos de electroenfoque para permitir a la proteína migrar hasta el pH en que su carga se hace nula. En consecuencia, el valor de pI ha sido reevaluado como 5.1 frente al valor de 5.6 publicado por Saloheimo y col. (1988), en un artículo donde se mostraba un gel de isoelectroenfoque en el que EG III aparecía como una banda difusa y ancha

debido, probablemente, a un tiempo insuficiente de electroenfoque, que condujo a una imprecisa determinación del pI. La posibilidad de que la discrepancia en el valor de pI fuera achacable a diferencias reales entre ambas proteínas quedó descartada al observar que muestras de EG III procedentes del laboratorio del Dr. Pettersson (Universidad de Upsala, Suecia), coautor de la citada publicación, y las preparadas en nuestro laboratorio, exhibían el mismo comportamiento en isoelectroenfoque.

Cuando se emprendió el estudio de EG III existía cierta controversia en cuanto al número de endoglucanasas secretadas por *T. reesei*, y debido a la similitud en masa molecular y pI de las enzimas descritas en distintos laboratorios resultaba complicada la **identificación** de la endoglucanasa purificada con alguna de las caracterizadas hasta entonces. Los estudios realizados en esta dirección se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Pettersson en Upsala, y demostraron inequívocamente la identidad de la endoglucanasa purificada en nuestro laboratorio con el producto del gen *egl3* (Saloheimo y col., 1988) (pág. 39; Tabla VIII, pág. 43).

Las 12 Cys presentes en EG III se encuentran formando 6 puentes disulfuro. La misma situación se da en otras celulasas de *T. reesei*: EG I (Penttilä y col., 1986) y CBH I (Bhikhabhai y Pettersson, 1984), y en EG I de *Schizophyllum commune* (Clarke y Yaguchi, 1985). En CBH II existen dos Cys libres y dos puentes disulfuro fundamentales en el mantenimiento de la estructura tridimensional del centro activo, que se dispone a modo de túnel para acoger al sustrato (Rouvinen y col., 1990).

2. ESPECIFICIDAD Y MODO DE ACCION DE EG III

EG III hidroliza eficazmente celulosas sustituidas solubles, celooligosacáridos y derivados de éstos. El estudio de los patrones de rotura de sustratos de bajo peso molecular proporciona información sobre la estructura del centro activo de la enzima. El empleo de derivados cromofóricos de celotriosa, MeUmb(Glc)₃ y CNP(Glc)₃, resulta muy adecuado para diferenciar EG III de otras celulasas de *T. reesei*, así como para medir la actividad enzimática en aquellos estudios que requieran precisión y reproducibilidad. En el caso concreto de la modificación química de la enzima, estos sustratos se han revelado como auténticas sondas del centro activo (estudios de la modificación por NBS). Por el contrario, la carboximetilcelulosa (CMC), que se ha utilizado tradicionalmente como sustrato de endoglucanasas, presenta serios inconvenientes ya que se trata de una mezcla heterogénea de polímeros de distinta longitud, con varias poblaciones de enlaces glucosídicos en cuanto a su grado de accesibilidad a las enzimas (Sharrock, 1988); su naturaleza iónica hace que el pH, la fuerza iónica o la temperatura influyan enormemente en la viscosidad de sus soluciones, que supone en sí misma un problema práctico de manejo (Sharrock, 1988); por último, los métodos colorimétricos empleados en la determinación de azúcares reductores liberados por la acción enzimática no son estequiométricos, ya que la reacción del grupo aldehído reductor es distinta dependiendo del residuo al cual esté unido (Aminoff y col., 1970). Así, cuando se ha ensayado CMC como sustrato de EG III se ha observado que la curva de actividad frente a pH no coincide con la de otros sustratos (Fig. 17D, pág. 45), y que la variación de la actividad con la concentración de enzima dista mucho de ser lineal (Fig. 22, pág. 50). No obstante, CMC resulta útil en aquellas valoraciones de la actividad enzimática que no requieren gran precisión, como por ejemplo en la detección de endoglucanasa en eluidos cromatográficos.

2.1. Modelo de organización en subsitios del centro activo

En las enzimas que degradan polisacáridos, como en otras que actúan sobre polímeros, el centro activo está compuesto por varios subsitios cada uno de los cuales es capaz de alojar un residuo glicosídico. El ejemplo arquetípico es el de la lisozima de clara de huevo de ganso, en la que existen 6 subsitios de unión (Blake y col., 1967; Johnson y col., 1988). Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional de dos celulasas, una endoglucanasa, EG D de *Clostridium thermocellum* (Juy y col., 1992), y una celobiohidrolasa, CBH II de *T. reesei* (Rouvinen y col., 1990). El centro activo está constituido por 6 subsitios en la primera y por 4 en la segunda. La diferencia en el modo de acción de ambas enzimas se explica por la arquitectura de la hendidura donde se aloja el sustrato que presenta los dos extremos abiertos en la endoglucanasa, mientras que en la celobiohidrolasa uno de ellos está cerrado, impidiendo el paso de celulosa.

En EG III los patrones de rotura de sustratos de bajo peso molecular (celooligosacáridos no sustituidos y metilados, Fig. 21, pág. 49, y derivados cromofóricos, Fig. 18, pág. 46) permiten aventurar un modelo para el centro activo, que estaría formado por cinco subsitios (ABCDE), localizándose los aminoácidos catalíticos entre los subsitios C y D (Fig. 45).

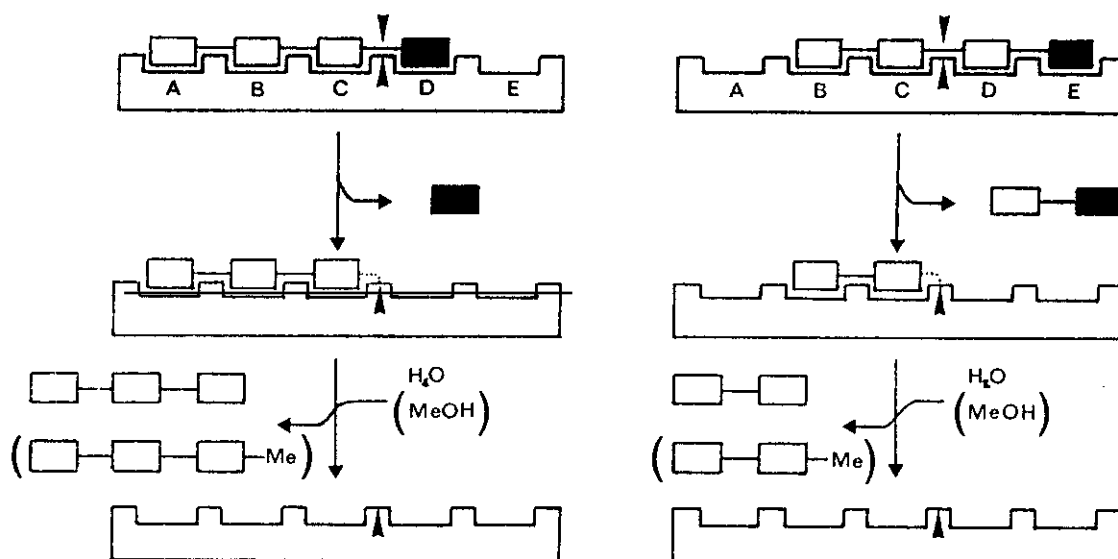


Figura 45. Representación esquemática del modelo propuesto de organización del centro activo de EG III. Las dos vías alternativas de hidrólisis de MeUmb(Glc)₃ se muestran como ejemplo. La posibilidad de transferencia de restos glucosilo a metanol también se señala. Las hendiduras en el bloque, cada una con una letra de la A a la E, indican los subsitios de unión; las flechas (▲) indican grupos catalíticos de la enzima. Otros símbolos: (□), resto glucosilo; (■), grupo MeUmb; "Me", grupo metilo.

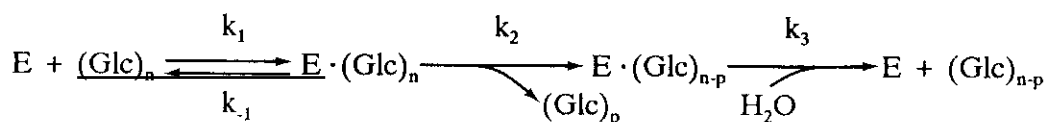
El extremo reductor del sustrato podría interactuar con el subsitio D o con el E; si tomamos la hidrólisis de MeUmb(Glc)₃ como ejemplo, en el primer caso se obtendrían MeUmb y celotriosa como productos, mientras que en el segundo los productos resultantes serían MeUmbGlc y celobiosa. De igual forma se podrían explicar el resto de los patrones de rotura

observados. Se postula la existencia de cinco subsitios, y no más, porque la inhibición por celobiosa es competitiva y no cambia el patrón de rotura de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ o $\text{MeUmb}(\text{Glc})_3$, indicando que no se pueden unir a la vez cualquiera de estos sustratos y el disacárido.

En su calidad de endoglucanasa, el centro activo de EG III no ofrece, probablemente, ningún impedimento al paso de celulosa por cualquiera de sus extremos.

2.2. Mecanismo cinético

De acuerdo con los datos obtenidos en los estudios de partición con metanol, la reacción de hidrólisis de oligosacáridos (y por extensión, de cualquier sustrato) catalizada por EG III sigue un mecanismo secuencial ordenado UNI-BI, de acuerdo con la terminología de Cleland (1977):



En el complejo disociable enzima-sustrato, $\text{E} \cdot (\text{Glc})_n$, la rotura de un enlace glicosídico del sustrato da lugar a un primer producto, $(\text{Glc})_p$, denominado *aglicón* (Sinnott, 1990), que comprende el extremo reductor del sustrato, y a un complejo glicosil-enzima, $\text{E} \cdot (\text{Glc})_{n-p}$, probablemente de naturaleza covalente (Sinnott, 1990); el ataque nucleofílico de una molécula de agua (o alternativamente de metanol) restaura la molécula de enzima y rinde un segundo producto, $(\text{Glc})_{n-p}$ (o $\text{Me}-(\text{Glc})_{n-p}$ cuando se adiciona metanol).

La capacidad de EG III para transferir restos glicosilo a metanol y otros alcoholes implica necesariamente que la enzima retiene la configuración del carbono anomérico del sustrato en el segundo producto de la reacción, mediante una doble inversión de la misma (Sinnott, 1990). Estudios de RMN han confirmado recientemente esta propiedad de EG III (Gebbler y col., 1992). Sin embargo, y en contraste con EG I de *T. reesei* (Claeyssens y col., 1990a), no se ha detectado actividad transglicosidasa en EG III.

El paso limitante de la reacción, deducido también de los experimentos de partición con metanol, es la glicosilación de la enzima en todos los casos estudiados, excepto en la liberación de CNP a partir de $\text{CNP}(\text{Glc})_3$ en la que pasa a serlo la desglicosilación. La razón de esta diferencia debe encontrarse en el bajo valor de pK_a del CNP (5.5), que lo configura como el mejor grupo saliente de entre los considerados (MeUmb , $\text{pK}_a = 7.2$; grupos hidroxilo de azúcares, $\text{pK}_a > 14$) (Fersht, 1985). Un comportamiento similar se observa en otras enzimas como, por ejemplo, β -galactosidasa (Sinnott y Viratelle, 1973).

2.3. Actividad sobre mananos

La actividad mananasa de EG III indica que la especificidad de la enzima no es tan estricta como se suponía; EG I se considera una endoglucanasa no específica por su capacidad para hidrolizar xilanos y derivados de lactosa, y EG III se tenía por específica, por no ser activa sobre estos sustratos no celulósicos (Biely, 1990). No obstante, teniendo en cuenta la similitud entre glucosa y manosa (sólo se diferencian en la orientación de un grupo hidroxilo), no es de extrañar que EG III sea activa sobre mananos siendo su principal función la de hidrolizar celulosa. El papel fisiológico de esta actividad hemicelulasa no está claro, habida cuenta de la existencia de una mananasa específica en el caldo de cultivo de *T. reesei*.

3. RESIDUOS DE TRIPTOFANO ESENCIALES

Los estudios de modificación de EG III con NBS han permitido identificar dos residuos de triptófano esenciales para la unión, localizados uno en el dominio de unión a celulosa (Trp5), y otro en el centro activo de la enzima (Trp255). La existencia de residuos aromáticos, especialmente Trp y Tyr, que participan en la unión de azúcares, es frecuente en proteínas capaces de interactuar con carbohidratos (Quioco, 1986). El empleo de NBS como agente oxidante específico de Trp ha demostrado la importancia de dichos residuos en numerosas glicanasas y proteínas que unen carbohidratos, tales como xilanasas (Keskar y col., 1989), celulasas (Clarke, 1987; Ozaki e Ito, 1991), galactosidasas (Mathew y Balasubramaniam, 1986), amilasas (Clarke y Svensson, 1984; Iwama y col., 1986) o lectinas (Privat y col., 1976; Absar y col., 1986).

Los DUC de las distintas celulasas de *T. reesei* presentan un alto grado de semejanza, y los cuatro residuos aromáticos que poseen están conservados en todos ellos (Fig. 47). Los resultados aquí presentados indican que el Trp5 es rápida y selectivamente oxidado por NBS, reduciendo al ~50 % la capacidad de adsorción a Avicel de la enzima. Este residuo corresponde a la Tyr466 en CBH I, que se dispone en la cara hidrofílica del dominio, junto a otras dos Tyr, posiblemente con la función de iniciar el contacto con la fibra de celulosa (Fig. 46) (Kraulis y col., 1989). La importancia de estos residuos aromáticos en CBH I ha sido probada mediante estudios de modificación química con TNM (Tomme, 1991) y mutagénesis dirigida (comunicación personal de la Dra. Teeri, VTT, Espoo, Finlandia).

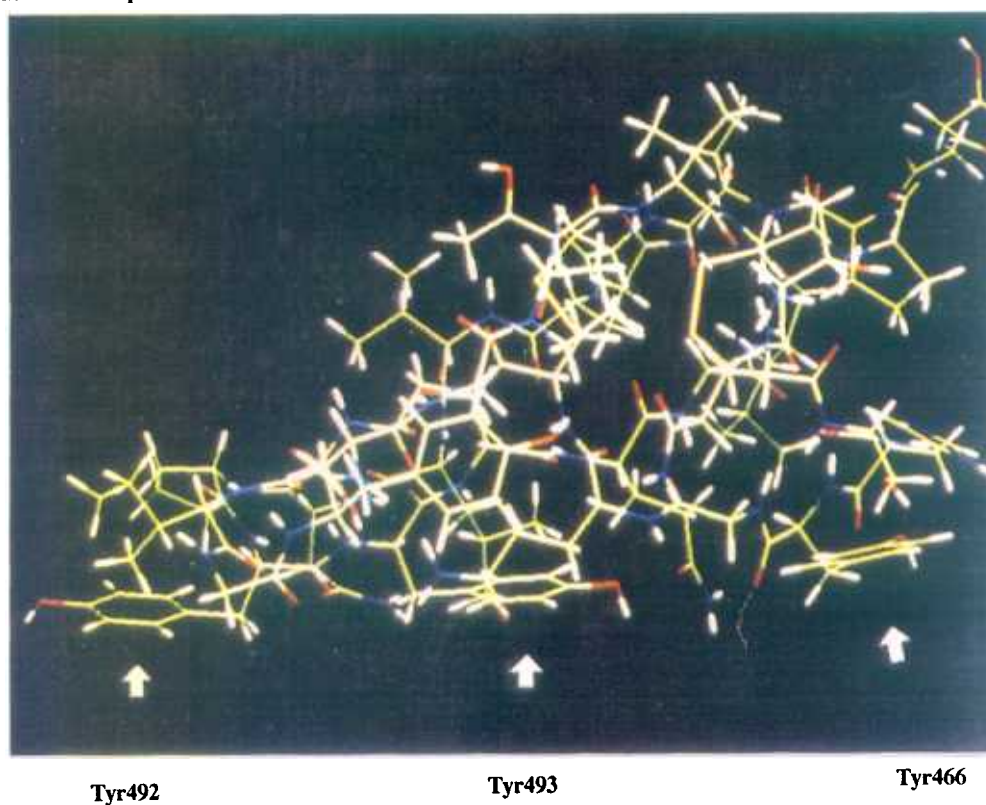


Figura 46. Modelo de varillas del dominio de unión de CBH I de *Trichoderma reesei* deducido por RMN bidimensional (Kraulis y col., 1989, modificado). Se señalan los residuos de Tyr de la superficie hidrofílica.

CBH I <i>Pc</i>	423	TvpqWGQC GGIGYtGsTtCAS py TChvLNP YYSQ Cy
CBH I <i>Tr</i>	405	TQSHYGQC GGIGYSGPTvCAS GT TCqYLNP YYSQ CL **
CBH II <i>Tr</i>	3	* csSVWGQC GGq n WSGPTcCAS GS TCvYSND YYSQ CL
EG I <i>Tr</i>	462	TQTHWGQC GGIGYSG ckt CTSG TT CqYSND YYSQ CL **
EG III <i>Tr</i>	1	* qQTVWGQC GGIGW SGPT nCA pGS ACstLNP YYa QC i

Figura 47. Comparación de secuencias correspondientes al dominio de unión de las celulasas de *Trichoderma reesei* (*Tr*) y de CBH I de *Phanerochaete chrysosporium* (*Pc*). En letras mayúsculas y negrita se indican los residuos conservados, en mayúsculas los parcialmente conservados, y en minúsculas los no conservados; * indica extremo N-terminal y ** extremo C-terminal (Gilkes y col., 1991).

La oxidación del Trp255, localizado en el núcleo catalítico, afecta sensiblemente a la actividad de EG III y los estudios realizados indican que se trata de un residuo esencial para la unión del sustrato al centro activo de la enzima. De acuerdo con el modelo de organización en subsitios postulado (Fig. 45, pág. 79), el Trp255 debe estar situado en el subsitio D, ya que es la única posibilidad que permite explicar todos los efectos observados en la hidrólisis de distintos sustratos cuando se modifica dicho residuo. El patrón de rotura de MeUmb(Glc)₃ o CNP(Glc)₃ cambia drásticamente, y en distinto sentido para cada sustrato (Tabla XIII, pág. 59), indicando que el Trp255 debe interactuar con el grupo cromofórico correspondiente; la distinta naturaleza química y volumen de estos grupos hace que la MeUmb sea preferido al CNP en la enzima nativa, y viceversa en EG III W_{20x}. Hasta aquí podríamos localizar el Trp255 en D o E (ver Fig. 45, pág. 79), pero el hecho de que la oxidación de este residuo no cambie el patrón de hidrólisis de celooligosacáridos no sustituidos (se reducen en la misma proporción las velocidades de todas las vías de ataque enzimático) lleva a la conclusión antes expuesta, porque sólo en el subsitio D el Trp255 puede interactuar con un resto glicosídico del sustrato sea cual sea el modo de unión (productivo) considerado; si estuviera en el subsitio E, la modificación por NBS no afectaría a los modos de unión en los que el extremo reductor interactuara con D, y en consecuencia se alteraría el patrón de rotura.

Según la nomenclatura propuesta por Karpeiskii (1976) para la designación de aminoácidos esenciales, Trp255 es un aminoácido de contacto, es decir, que participa directamente en la estabilización del sustrato en el centro activo de la enzima. Estudios de alineamiento de secuencias muestran que este residuo de Trp está bien conservado en distintas celulasas de la familia A (Fig. 48).

EG III <i>Tr</i>	117	m q hfvnedGNTI FRL PVg w qylvnnrlggnldstsi-----skydql-----VQGLSLGAYCIV-DI l nyarwng	
EG C <i>Ct</i>	33	di e tia e aaGFDH VRL PFdypitesddn v geykedgl-----syidrc-----LEWCKKYLN-GLVLD M napgyrf	
EG B <i>Ct</i>	85	di e lvadkGINV V RMP I atd l lyawsqgiyp p st d tsynnpalaglnsyel f nf m LENFKRVG I KVIL-DV M spetdnq	
EG H <i>Ct</i>	362	y f dd f kaaGYKN VRI PIV r wd n ht m rtyp t id k afld-----rveqv-----VDWSLSRGFVTII-NS H dd-wik	
CBH <i>Sc</i>	118	df a niasqGFNL VRI PIg y wafqtld d dp y vsglqesy-----ldqa-----IGWARRNSLKVVV-DL H gaagsqn	
BMAN A <i>Cs</i>	79	-----GMNS VRI V L sngyrwtkipa-----sevani-----ISLSRSLGFKAIILEV M dttygye	
EG III <i>Tr</i>	182	giigqggp t naq-----FTSL M SQLASKYAS---QSRVWF GIMNE P h dv n intwaa-----	
EG C <i>Ct</i>	101	q f kt s tkf e dp n q q kr---FVDI M RFLAKRYI n e---REHIAFELLNE V vep d strwn-----	
EG B <i>Ct</i>	163	gh n ypl w y n ttiteei---FKK A WVAERYKND---DTIIGFDL KNE P h ntgt t gmki---kaqsai w ddsn h pn	
EG H <i>Ct</i>	427	e d yn g nier-----FEK I MEQIAERFK Nk ---SE N LLFEI MNE P f gnit d eq-----id	
CBH <i>Sc</i>	183	g f dn s gl r dsy k fl e ds n l a vt t nv l nyil k ky s a e eyLDTVIGIE LNE P l gp v ld m dkm-----kn	
BMAN A <i>Cs</i>	129	d g aacs l aq-----a v ey w ke i ks v ldgn---EDFVI I NI NE P y gn n nyqn-----wv	
EG III <i>Tr</i>	230	-tvqevvtairnaga--tsQFISLPG-n o qsagafisdgs-----aaalsqvt-npdg s tt--nLI	
EG C <i>Ct</i>	151	kl m leyikairei---dst M WLYIGG-n r ns p del-----knla-didd d ---yIV	
EG B <i>Ct</i>	229	n w kr v aeetalail e vh p nVLI F VEG v em t pk d gi w ddet f dt s pwtg n ndy y gn w gg n l r gv k dyp i nl g ky q s q LV	
EG H <i>Ct</i>	472	d m ns r il k i r kt--n p tr V I I GGG-g y ns y ntl-----v n ik- i p d dp---yLI	
CBH <i>Sc</i>	246	d y lapayeyl r nn- i ks d qVII I HDA f q y ny w ddf-----m t en- d gy w g---VT	
BMAN A <i>Cs</i>	174	nd t k n aikal r da--g f KHTIM VDA -p r ng d -----ws n t m r d na-qs i mead p l r nLV	
EG III <i>Tr</i>	285	FDV M KYLds d ns g tha e ct t rn i dg a fs p lat w lrq-----nnrq-----	
EG C <i>Ct</i>	195	YN F MYN p ff f th q kahw-----sesamay n r---tvkyp g q y egie e f v k n p k ys f mm e ln n kl n ke	
EG B <i>Ct</i>	307	YSP H Y G pi v ye q d w fk d fi t and e q a k r il y eq c w r dn w ay i me e g i sp-----	
EG H <i>Ct</i>	516	GT F HY D py e f t h k wrgt--w g t q ed m dt v rv y fd v ks w ---s d rn n tp-----	
CBH <i>Sc</i>	292	ID H HY Q v f as d ql e rs i de h ik v ace w gt g vl n esh w tv-----	
BMAN A <i>Cs</i>	225	FSI M HY G v y nt a sk v ee-----y i qs---f v dk g lp-----	
EG III <i>Tr</i>	325	-----AILTE I GGG N vq s ci q dm c q q i q yl n q n s d vylg--y v g w g a gs f d s ty v l t et p t s sgn	
EG C <i>Ct</i>	256	ll r kd l k p aie f re k kk c LYC GE FG V IA i ad l es r ik w h e dy i s l leey--d i gg a v w ny k m-----d f e i yn e dr	
EG B <i>Ct</i>	358	-----LLLG E WGG M Teg g h p l d nl k yl r cm r d f ilen k yl h t f w c in i ds a dt g gl f tr d e	
EG H <i>Ct</i>	561	-----VY F GE F AV M Ay a dr t s r vk w y d fi s da a ler--g f acs v w d ng v fg s ld n -d m a i yn r dt	
CBH <i>Sc</i>	332	-----CGE F Aa a l t d c tk w l n sv g fg a ry d g s v w ng d qt s sy i g s cann d i a y w s d er k ent	
BMAN A <i>Cs</i>	252	-----LVIG E FG H QE t dg d p d ee a iv r y a k q y k igl-----f-----s w s w c g n s sy v gyl-----	
EG III <i>Tr</i>	383	s---wt d ts l v s sc i ark	397
EG C <i>Ct</i>	329	k p vs q el v ni----larr	342
EG B <i>Ct</i>	418	g t pf g gr d l k w n d n kyd	435
EG H <i>Ct</i>	618	r t fd t e i lna----lfnp	631
CBH <i>Sc</i>	390	r r y v ea q ld a fem r gg w i	407
BMAN A <i>Cs</i>	298	----d m v n n w d p nn p tp w	311

Figura 48. Alineamiento de secuencias del dominio catalítico de las celulasas de la familia A. En mayúscula se señalan los segmentos en los que se han localizado por HCA (Gaboriaud y col.,1987) grupos de aminoácidos hidrofóbicos topológicamente conservados en las celulasas de la familia A (Henrissat y col., 1989); en negrita se muestran los aminoácidos conservados que pueden participar en la unión del sustrato y/o en la catálisis. Claves: EG III *Tr*, EG III de *Trichoderma reesei* (Saloheimo y col., 1988); EG C *Ct*, EG C de *Clostridium thermocellum* (Schwarz y col., 1988); EG B *Ct*, EG B de *C. thermocellum* (Grépinet y col., 1986); EG H *Ct*, EG H de *C. thermocellum* (Yagüe y col., 1990); CBH *Sc*, CBH de *Saccharomyces cerevisiae* (Vázquez de Aldana y col., 1991); BMAN A *Cs*, B-mananasa A de *Caldocellum saccharolyticum* (Luthi y col., 1991).



Figura 49. Secuencia de EG III de *Trichoderma reesei* (Saloheimo y col., 1988). Los aminoácidos conservados en las celulasas de la familia A se señalan en rojo; se enmarcan los residuos esenciales identificados en el presente trabajo. La flecha (▲) indica el punto de rotura en la bisagra, que da lugar al núcleo catalítico aislado del caldo de cultivo por Ståhlberg y col. (1988).

4. IDENTIFICACION DE DOS GRUPOS CARBOXILO ESENCIALES: MECANISMO QUIMICO DE EG III

4.1. Estudios de pH: Glu218

Los estudios del efecto del pH y la temperatura sobre la hidrólisis de MeUmb(Glc)₃ catalizada por EG III revelan la existencia de un grupo carboxilo esencial ($pK_a = 5.5$) en el centro activo de la enzima. Como el residuo Glu35 de lisozima, este grupo está protonado en la forma activa de la enzima, y su función debe ser facilitar la salida del primer producto de la reacción (aglicón) por catálisis ácida general (Sinnott, 1990). Este residuo de EG III podría corresponder a Glu218, incluido en la secuencia Asn-Glu-Pro conservada en todas las celulasas de la familia A (Béguin, 1990) (Fig. 48). Experimentos de mutagénesis dirigida han corroborado la importancia de este glutámico, como donador potencial de protones, en tres endoglucanasas pertenecientes a la familia A: EG de *Bacillus polymixa*, EG de *B. subtilis* (Baird y col., 1990), y EG de *Erwinia chrysanthemi* (Py y col., 1991).

4.2. Marcaje de afinidad: Glu329

La rápida inactivación de EG III a valores de pH por debajo de 4 (Fig. 17A, pág. 45) ha limitado al intervalo de pH de 4.0-6.3 el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la reacción enzimática, por lo que no ha podido ser detectada por este método la presumible existencia de un carboxilato esencial en el centro activo de EG III (pág. 66). Este grupo, sin embargo, ha sido identificado como Glu329 por marcaje de afinidad con el epoxipentil-celobiósido (EPO5). La inactivación por epoxialquil-celobiósidos ocurre por modificación específica de un aminoácido del centro activo como sugieren los siguientes hechos:

- la inactivación depende de la longitud del brazo aglicónico del inhibidor (Fig. 39, pág. 68); EPO5 es el más potente inhibidor de los ensayados, probablemente porque su brazo aglicónico es el que mejor reproduce el tamaño de un resto glicosídico en el subsitio C, permitiendo así una correcta orientación de la función epóxido (que mimetiza a un enlace glicosídico) respecto a los aminoácidos catalíticos (Fig. 50). Resultados parecidos han sido descritos para celulasas de *Oxysporus* spp., *Aspergillus niger* y *A. wentii* (Legler y Bause, 1973), y para EG I de *Schizophyllum commune* (Clarke, 1988; Høj y col., 1989). Sin embargo, otra endoglucanasa de la familia A, EG de *Bacillus subtilis*, es inactivada más rápidamente por EPO4 que por EPO5 (Høj y col., 1989).
- el inositol-epóxido carece de poder inhibitorio; el inositol no es ligando de la enzima.
- la celobiosa, ligando de EG III, protege de la inactivación por EPO5 (Fig. 40, pág. 69).
- la variación con el pH de la velocidad de inactivación es similar a la de la actividad de la enzima sobre celotriosa u otros sustratos (Fig. 42, pág. 71).
- la estequiometría de la reacción de inactivación, que depende de la unión covalente de una molécula de inhibidor por molécula de enzima (Fig. 41C, pág. 70).

Como se observa en el mecanismo de inactivación propuesto (Fig. 50), la reacción con el epóxido implica protonación desde un lado del anillo, y ataque nucleofílico por un carboxilato desde el otro lado; en consecuencia, sólo las glicosidasas que operan con retención de la configuración anomérica pueden sufrir inactivación por epóxidos (Legler, 1990). La inhibición de EG III por epoxialquil-celobiósidos confirma una vez más que esta celulasa actúa por un mecanismo de doble desplazamiento.

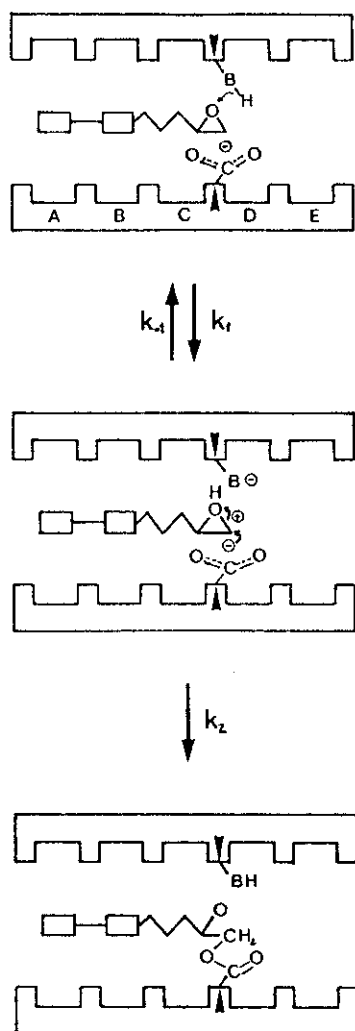


Figura 50. Mecanismo de inactivación de EG III por EPO5 (Høj y col., 1989, modificado). Símbolos como en la Figura 45, pág. 79.

El carboxilato al cual se une covalentemente el EPO5 ha sido identificado mediante análisis de péptidos como Glu329. Este residuo está flanqueado por dos residuos de Thr, en la secuencia Thr-Glu-Thr, bien conservada en las celulasas de la familia A (Fig. 48). Su función catalítica sería estabilizar el catión carboxonio presumiblemente formado tras la salida del aglicón, bien por interacción electrostática, bien mediante la formación de un intermediario covalente (Sinnott, 1990); se trata de un grupo equivalente al Asp52 de lisozima, o al Glu461 de β -galactosidasa, que son también susceptibles de esterificación por un epóxido unido a un análogo de sustrato (Eshdat y col., 1973; Herrchen y Legler, 1984).

4.3. Mecanismo químico de EG III

En resumen, los datos experimentales expuestos permiten aventurar que EG III actúa mediante un mecanismo similar al de la lisozima (caso paradigmático de β -glucosidasa que retiene la configuración anomérica). El Glu218 aceleraría por catálisis ácida general la rotura del enlace glicosídico situado entre los subsitios C y D, facilitando la salida del aglicón; el ión carboxonio resultante sería estabilizado por el Glu329 bien por interacción electrostática, bien mediante la formación de un intermediario covalente; una molécula de agua protonaría

entonces el Glu218, rindiendo un ión hidroxilo que atacaría el resto glicosilo para liberar el segundo producto de la reacción, quedando la molécula de enzima preparada para iniciar un nuevo ciclo catalítico.

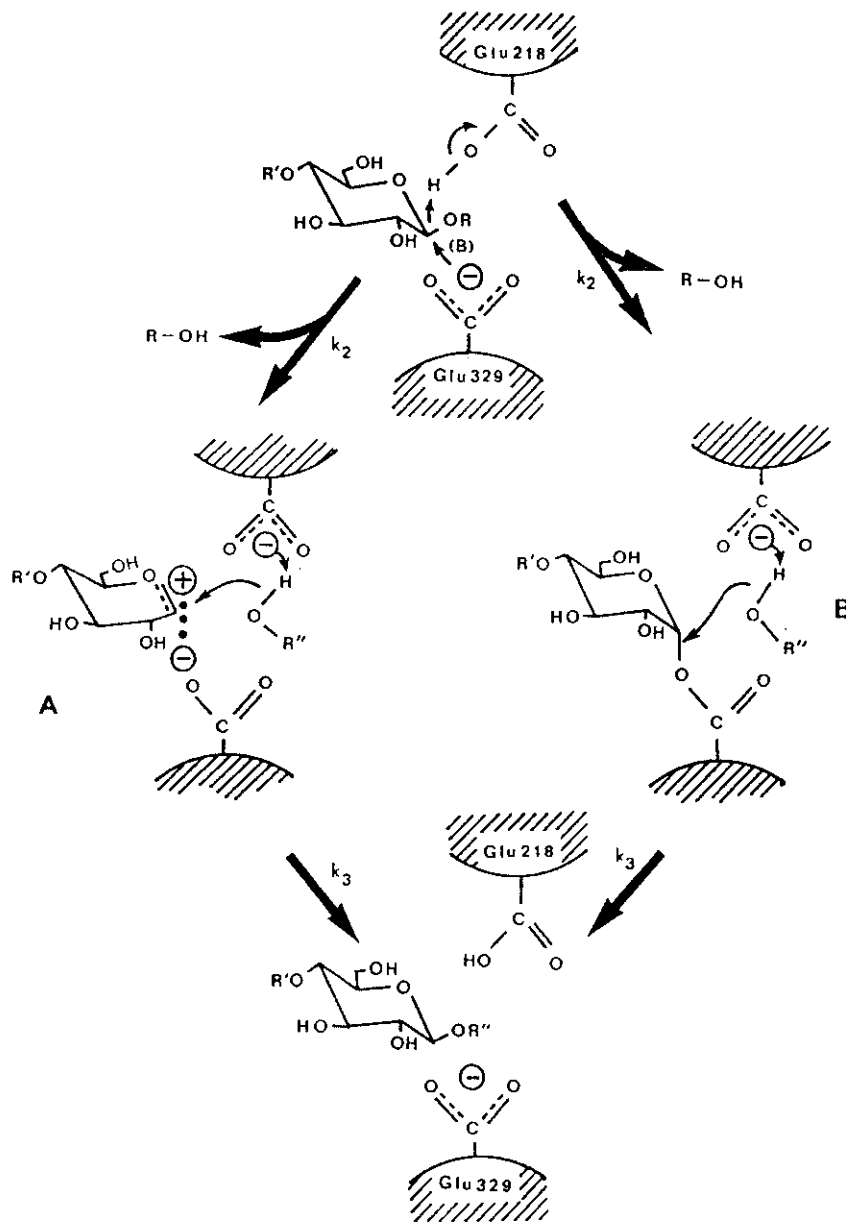


Figura 51. Modelo propuesto para el mecanismo químico de EG III. Se muestran los dos tipos posibles de intermediarios glicosil-enzima: (A), par iónico carboxonio-carboxilato, como en la lisozima (Phillips, 1966), y (B), ester glicosil-enzima, como en la β -galactosidasa (Sinnott, 1987). El intermediario real puede ser un híbrido entre ambas formas. En las dos vías, los estados de transición (no ilustrados) tanto de la glicosilación (1^{er} paso) como de la desglicosilación (2^o paso) son semejantes al ión oxocarbonio representado en A (Sinnott, 1987).

La naturaleza del intermediario glicosil-enzima no ha sido determinada. En el caso de la lisozima se consideraba tradicionalmente que el Asp52 estabilizaba el catión carboxonio por interacción electrostática (Phillips, 1966; Fersht, 1985). En una revisión reciente sobre el

mecanismo catalítico de glicosidasas, Sinnott pone en duda esta idea, argumentando que la falta de sustratos de lisozima en los que la etapa limitante de la reacción sea la desglicosilación ha impedido recabar información mecanística sobre este particular. En otras β -glicosidasas que actúan de forma similar (β -galactosidasas de *Escherichia coli*) sí se ha demostrado que el ión carboxonio esterifica el carboxilato esencial de la enzima (Glu461) dando lugar a un intermediario covalente (Sinnott, 1990).

Hace ya casi treinta años se sugirió que todas las glicosidasas pudieran compartir el mismo mecanismo catalítico que la lisozima (Banks y Vernon, 1963). En el caso de las celulasas esta idea se ha mantenido hasta hace pocos años (Knowles y col., 1987), pero hoy día sabemos que no existe un modo de acción común a todas las celulasas: aquellas que actúan invirtiendo la configuración anomérica lo hacen por un mecanismo de desplazamiento simple, netamente distinto al de doble desplazamiento de la lisozima. No obstante, entre las glicosidasas de un mismo tipo sí se encuentran características similares en la estrategia catalítica. Así, en este trabajo se ha demostrado que EG III, una endoglucanasa de la familia A de celulasas (que actúan vía doble desplazamiento del sustrato), parece seguir un mecanismo similar al de la lisozima. Experimentos de mutagénesis dirigida, intercambio isotópico y determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X deberán confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método para la purificación de endoglucanasa III a partir de caldos de cultivo de *Trichoderma reesei* QM9414. La enzima se ha identificado inequívocamente como el producto del gen *egl3* (Saloheimo y col., 1988).

2. EG III presenta una débil carga negativa a valores de pH próximos a la neutralidad; su pI ha sido reevaluado como 5.1.

3. EG III es activa sobre celulosa y derivados, y también sobre mananos. Los sustratos cromofóricos MeUmb(Glc)₃ y CNP(Glc)₃ son muy adecuados para el estudio cinético de la enzima, no así CMC, tradicionalmente empleada como sustrato de endoglucanasas.

4. La hidrólisis de β-glicósidos catalizada por EG III transcurre con retención de la configuración del carbono anomérico del sustrato, mediante un mecanismo secuencial ordenado Uni-Bi, con el concurso de un intermediario glicosil-enzima. El primer producto de la reacción es el fragmento del sustrato que contiene el extremo reductor, es decir, el resto de glucosa cuyo carbono anomérico está libre (o el resto equivalente en el caso de derivados).

5. Se ha propuesto un modelo de organización del centro activo de EG III, en el que la enzima sería capaz de alojar hasta 5 residuos de glucosa, en 5 subsitios ABCDE, estando situados los grupos catalíticos entre C y D.

6. El Trp5, localizado en el dominio de unión a celulosa de EG III juega un papel esencial en la adsorción de la enzima al polisacárido. El Trp255 participa directamente en la estabilización del sustrato en el centro activo de la enzima.

7. EG III posee un grupo carboxilo esencial ($pK_a = 5.5, \Delta H_{ion} = -15.9 \text{ J/mol}$) que debe estar protonado para que la enzima sea activa. Este residuo se ha identificado como Glu218 por estudios de homología con otras celulasas relacionadas estructuralmente con EG III.

8. El marcador de afinidad 4',5'-epoxipentil-β-celobiosido se une covalentemente al Glu329 inactivando EG III. Este grupo carboxilo es esencial para la actividad catalítica en su forma ionizada, y estabiliza el intermediario glicosil-enzima.

9. EG III actúa mediante un mecanismo de doble desplazamiento, similar al de la lisozima. El Glu218 aceleraría por catálisis ácida general la rotura del enlace glicosídico situado entre los subsitios C y D, facilitando la salida del aglicón; el ión carboxonio resultante sería estabilizado por el Glu329 bien por interacción electrostática, bien mediante la formación de un intermediario covalente; una molécula de agua protonaría entonces el Glu218, rindiendo un ión hidroxilo que atacaría el resto glicosilo para liberar el segundo producto de la reacción, quedando la molécula de enzima preparada para iniciar un nuevo ciclo catalítico.

BIBLIOGRAFIA

- Absar N., Yamasaki, N. y Funatsu, G. (1986) "Identification of the tryptophan residue located at the saccharide binding site of Castor Bean hemagglutinin" *Agr. Biol. Chem.* 50: 3071-3076
- Allen, A. (1983) "Mucus: a protective secretion of complexity" *Trends Biochem.* 8: 169-173
- Acebal, C., Castillón, M. P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D. y Lacaba, F. (1985) "Cellulase production by *Trichoderma reesei* on wheat straw" *Biochem. Soc.* 13: 453-455
- Acebal, C., Castillón, M. P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D. y Jiménez, F. (1986) "Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM9414 on physically treated wheat straw" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 218-223
- Aninoff, D., Binkley, W. W., Schaffer, R. y Mowry, R. W. (1970) en "The carbohydrates" (Pigman, W., Horton, D. y Herps, A., eds) Vol. 2B, pp. 739-807, Academic Press, Nueva York, USA
- Baird, S. D., Hefford, M. A., Johnson, D. A., Sung, W. L., Yaguchi, M y Seligy, V. L. (1990) "The Glu residue in the conserved Asn-Glu-Pro sequence of two highly divergent endo- β -1,4-glucanases is essential for enzymatic activity" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 1035-1039
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B. y Sánchez, R. (1987). "Fisiología Vegetal" 4ª ed. Ed. Pirámide, Madrid
- Barras, F., Bortoli-German, I., Bauzan, M., Rouvier, J., Gey, C., Heyraud, A. y Henrissat, B. (1992) "Stereochemistry of the hydrolysis reaction catalyzed by endoglucanase Z from *Erwinia chrysantemi*" *FEBS Lett.* 300: 145-148
- Béguin, P. (1990) "Molecular biology of cellulose degradation" *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248
- Bergfors, T., Rouvinen, J., Lehtovaara, P., Caldentey, X., Tomme, P., Claeysens, M., Pettersson, G., Teeri, T. T., Knowles, J. y Jones, T. A. (1989) "Crystallization of the core protein of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*" *J. Mol. Biol.* 209: 167-169
- Bhikhabhai, R. y Pettersson, G. (1984) "The disulphide bridges in a cellobiohydrolase and an endoglucanase from *Trichoderma reesei*" *Biochem. J.* 222: 729-736
- Bhikhabhai, R., Johansson, G. y Pettersson, G. (1984) "Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414" *J. Appl. Biochem.* 6: 336-345
- Biely, P. y Markovic, O. (1988) "Resolution of glycanases of *Trichoderma reesei* with respect to cellulose and xylandegradation" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 99-106
- Biely, P. (1990) "Artificial substrates for cellulolytic glycanases and their use for the differentiation of *Trichoderma* enzymes" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 30-46, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Biely, P., Vrsanska, M. y Claeysens, M. (1991) "The endo-1,4- β -glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on β -1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose" *Eur. J. Biochem.* 200: 157-163
- Binder, A. y Ghose, T. K. (1978) "Adsorption of cellulose by *Trichoderma viride*" *Biotechnol. Bioeng.* 20: 187-199
- Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. y Sarma, V. R. (1967) "Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme" *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* B167: 378-388
- Blanch, H. W. y Wilke, C. R. (1983) "Sugars and chemicals from cellulose" *Rev. Chem. Eng.* 1: 71-119
- Claeysens, M. (1988) "The use of chromophoric substrates and specific assays in the study of structure-activity relationships of cellulolytic enzymes" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 393-397, Academic Press, Londres
- Claeysens, M. y Tomme, P. (1990) "Structure-function relationships of cellulolytic proteins from *Trichoderma reesei*" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 1-11, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Claeysens, M., van Tilbeurgh, H., Kamerling, J. P., Berg, J., Vrsanka, M. y Biely, P. (1990a) "Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM 9414. Substrate specificity and transfer activity of endoglucanase I" *Biochem. J.* 270: 251-256
- Claeysens, M., Tomme, P., Brewer, C. F. y Hehre, E. J. (1990b) "Stereochemical course of hydrolysis and hydration reactions catalysed by cellobiohydrolases I and II from *Trichoderma reesei*" *FEBS Lett.* 263, 89-92.
- Clarke, A. J. y Svensson, B. (1984) "Identification of an essential tryptophanyl residue in the primary structure of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*" *Carlsberg. Res. Commun.* 49: 559-566

- Clarke, A. J. y Yaguchi, M. (1985) "The role of carboxyl groups in the function of endo- β -1,4-glucanase from *Schizophyllum commune*" *Eur. J. Biochem.* 149: 233-238
- Clarke, A. J. (1987) "Essential tryptophan residues in the function of cellulase from *Schizophyllum commune*" *Biochim. Biophys. Acta* 912: 424-431
- Clarke, A. J. (1988) "Active-site-directed inactivation of *Schizophyllum commune* cellulase by 4',5'-epoxy pentyl-4-D-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside" *Biochem. Cell. Biol.* 66: 871-879
- Cleland, W. W. (1977) "Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies" *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 45: 273-387
- Cornish-Bowden, A. (1976) "Principles of enzyme kinetics" Ed. Butterworths, Londres, UK
- Coughlan, M. P. (1985) "The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application" *Biotech. Genet. Eng. Reviews* 3: 39-109
- Coughlan, M. P. y Ljungdahl, L. G. (1988) "Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 11-30, Academic Press, Londres
- Cowling, E. B. y Kirk, T. K. (1976) "Properties of cellulose materials" *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 95-123
- Creighton, T. E. (1984) "Proteins", W. H. Freeman and Co., Nueva York, USA
- Chanzy, H., Henrissat, B., Vuong, R. y Schülein, M. (1983) "The action of 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase on *Vallonia cellulosa* microcrystals" *FEBS Lett.* 153: 113-118
- Chapman, G. E., Hartman, P. G. y Bradbury, E. M. (1976) "Studies on the role and mode of operation of the very lysine-rich histone H1 in eukariote chromatin. The isolation of the globular and non-globular regions of the H1 histone molecule" *Eur. J. Biochem.* 61: 69-75
- Chen, C. M., Griztali, M. y Stafford, D. W. (1987) "Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei*" *Bio/Technol.* 5: 274-278
- Dale, B. E. (1987) "Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology" *Trends Biotechnol.* 5: 287-291
- de la Mata, I. (1992) " β -glucosidasa de *Trichoderma reesei* QM 9414". Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid
- Detroy, R. W. y Julian, G. (1982) "Biomass conversion: fermentation chemicals and fuels" *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10: 203-228
- Din, N., Gilkes, N. R., Tekant, B., Miller Jr., R. C., Warren, R. A. J. & Kilburn, D. G. (1991) "Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase" *Bio/Tech.* 9: 1096-1099
- Dinur, T., Osiecki, K. M., Legler, G., Gatt, S., Desnick, R. J. y Grabowski, G. A. (1986) "Human acid β -glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 1660-1664
- Domínguez, J. M. (1991) "Aislamiento, purificación y caracterización de endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* QM 9414" Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid
- Domínguez, J. M., Pettersson, G., Acebal, C., Jiménez, J., Macarrón, R., de la Mata, I. & Castellón, M. P. (1992) "Spontaneous aggregation of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* QM 9414" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, en prensa
- Drapeau, G. R. (1977) "Cleavage at glutamic acid with Staphylococcal protease" *Methods Enzymol.* 47: 189-191
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E. y El-Dorri, H. (1989) "Mechanism by which cellulose triggers CBH I gene expression in *Trichoderma reesei*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6138-6141
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., El-Dorri, H. y Eveleigh, D. E. (1990) "*Trichoderma reesei* cellulase- from mutants to induction" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 200-211, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Ellis, K. J. y Morrison, J. F. (1982) "Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes" *Meth. Enzymol.* 87: 405-426
- Enari, T.-M. y Niku-Paavola, M.-L. (1987) "Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanism of hydrolysis valid?" *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 5: 67-87
- Eshdat, Y., McKelvy, J. y Sharon, N. (1973) "Identification of aspartic acid 52 as the point of attachment of an affinity label in hen egg white lysozyme" *J. Biol. Chem.* 248: 5892-5898

- Eyzaguirre (1987) "Chemical modification of enzymes. Active site studies" Ellis Horwood Ltd., Chichester, Reino Unido.
- Fan, L. T., Gharpuray, M. M. y Lee, Y.-H. (1987) "Cellulose hydrolysis". Biotechnology Monographs vol. 3. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg
- Fersht, A. (1985) "Enzyme structure and mechanism", 2ª ed., W. H. Freeman and Co., Nueva York, USA
- Fritscher, C., Messner, R. y Kubicek, C. P. (1990) "Cellobiose metabolism and cellobiohidrolase I by *Trichoderma reesei*" *Exp. Mycol.* 14: 405-415
- Gaboriaud, C., Biossery, V., Benchetrit, T. y Mornon, J. P. (1987) "Hydrophobic cluster analysis: an efficient way to compare and analyse amino acid sequences" *FEBS Lett.* 224: 149-155
- Gebbler, J., Gilkes, N., Claeysens, M., Wilson, B., Béguin, P., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Miller, R. C., Warren, A. J. y Whitters, S. G. (1992) "Stereospecific hydrolysis catalysed by related β -1,4 glucanases and β -1,4 xylanases" *J. Biol. Chem.*, en prensa
- Gilbert, I. G. y Tsao, G. T. (1983) "Interaction between solid substrate and cellulase enzymes in cellulose hydrolysis" *Annu. Rep. Ferm. Process.* 6: 323-358
- Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, R. C. Jr y Warren, R. A. J. (1991) "Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzyme families" *Microbiol. Rev.* 55: 303-315
- Gilligan, W. y Reese, E. T. (1954) "Evidence for multiple components in microbial cellulases" *Can. J. Microbiol.* 1: 90-107
- Green, N. M. y Witkop, B. (1964) "Oxidation studies of indoles and the tertiary structure of proteins" *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 26: 659-669
- Grépinet, O. y Béguin, P. (1986) "Sequence of the cellulase gene of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanase B" *Nucl. Acids Res.* 14: 1791-1799
- Griztali, M. y Brown, R.D. (1979) "The cellulose system of *Trichoderma*. Relationships between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells" *Adv. Chem. Ser.* 181: 237-260
- Habeeb, A. F. S. A. (1972) "Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent" *Methods Enzymol.* 25: 457-463
- Haynes, W. C., Wickerham, L. J. y Hesseltine, C. W. (1955) "Maintenance of cultures of industrially important microorganisms" *Appl. Microbiol.* 3: 361-368
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. y Schülein, M. (1985) "Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose" *Bio/Tech.* 3: 722-726
- Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L. y Mornon, J.-P. (1989) "Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis" *Gene* 81: 83-95
- Henrissat, B. y Mornon, J.-P. (1990) "Comparison of *Trichoderma* cellulases with other β -glycanases" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 11-29, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Herrchen, M. y Legler, G. (1984) "Identification of an essential carboxylate group at the active site of *lacZ* β -galactosidase from *Escherichia coli*" *Eur. J. Biochem.* 138: 527-531
- Hoare, D. G. y Koshland Jr., D. E. (1967) "Method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins" *J. Biol. Chem.* 242: 2447-2453
- Høj, P. B., Rodríguez, E. B., Stick, R. V. y Stone, B. A. (1989) "Differences in active site structure in a family of β -glucan endohydrolases deduced from the kinetics of inactivation by epoxyalkyl β -oligoglucosides" *J. Biol. Chem.* 264: 4939-4947
- Iwama, M., Inokuchi, N., Okazaki, Y., Takahashi, T., Yoshimoto, A. e Irie, M. (1986) "Oxidation of glucoamylase from a *Rhizopus* sp. with N-bromosuccinimide" *Chem. Pharm. Bull.* 34: 1355-1361
- Iyayi, C. B., Bruchmann, E.-E. y Kubicek, C. P. (1989) "Induction of cellulase formation in *Trichoderma reesei* by cellobiono-1,5-lacton" *Arch. Microbiol.* 151: 326-330
- Johnson, L. N., Cheetham, J., McLaughlin, P. J., Acharya, K. R., Basford, D. y Phillips, D. C. (1988) "Protein-oligosaccharide interactions: lysozyme, phosphorylase, amylases" *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 139: 81-134
- Juy, M., Amit, A. G., Alzari, P. M., Poljak, R. J., Claeysens, M., Béguin, P. y Aubert, J.-P. (1992) "Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase" *Nature*, en prensa
- Karpeiskii, M. Y. (1976) "Active site of enzymes: stereochemistry and dynamics" *Mol. Biol.* 10: 1197-1210

- Keskar, S. S., Srinivasan, M. C. y Deshpande, V. V. (1989) "Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cystein residues at the active site" *Biochem. J.* 261: 49-55
- Kitz, R. y Wilson, I. B. (1962) "Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase" *J. Biol. Chem.* 237: 3245-3249
- Klyosov, A. A. (1988) "Cellulases of the third generation" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 87-99, Academic Press, Londres
- Knowles, J., Lehtovaara, P. y Teeri, T. T. (1987) "Cellulase families and their genes" *Trends Biotechnol.* 5: 255-261
- Knowles, J., Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Penttilä, M. y Saloheimo, M. (1988) "The use of gene technology to investigate fungal cellulolytic enzymes" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 153-169, Academic Press, Londres
- Knowles, J. K. C., Lehtovaara, P., Murray, M. y Sinnott, M. L. (1988) "Stereochemical course of action of the cellobioside hydrolases I and II of *Trichoderma reesei*" *J. Chem. Soc. Chemm. Commun.* 1988: 1401-1402
- Kraulis, P. J., Clore, G. M., Nilges, M., Jones, T. A., Pettersson, G., Knowles, J y Gronenborn, A. M. (1989) "Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using NMR and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing" *Biochemistry* 28: 7241-7257
- Kubicek, C. P. (1987) "Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound β -glucosidase in the induction of the cellulase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*" *J. Gen. Microbiol.* 133: 1481-1487
- Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds. (1990a) *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Kubicek, C. P., Messner, R., Fritscher, C., Strauss, S. y Kubicek-Pranz, E. M. (1990b) "Regulatory aspects of formation and secretion of cellulases by *Trichoderma reesei*" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 81-102, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Kyriacou, A., Neufeld, R. J. y McKenzie, C. R. (1989) "Reversibility and competition in the adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase components" *Biotechnol. Bioeng.* 33: 631-637
- Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* 227: 680-685
- Lamed, R. y Bayer, E. A. (1988) "The cellulosome concept: exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 101-116, Academic Press, Londres
- Legler, G. y Bause, E. (1973) "Epoxyalkyl oligo-(1-4)- β -D-glucosides as active-site-directed inhibitors of cellulases" *Carbohydr. Res.* 28: 45-52
- Legler, G. (1990) "Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors" *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 48: 319-384
- Levy, H. A., Leber, P. D. y Ryan, E. M. (1963) "Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds" *J. Biol. Chem.* 238, 3654-3659
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. T. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193: 256-265
- Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) "Chemical reagents for protein modification" CRC Press, Inc., Boca Raton, USA
- Lüthi, E., Jasmat, N. B., Grayling, R. A., Love, D. R. y Bergquist, P. L. (1991) "Cloning, sequence, analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a β -mannanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*" *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 694-700
- Lützen, N. W., Nielsen, M. H., Oxenboell, K. M., Schülein, M. y Stenbebjerg-Olesen, B. (1983) "Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B300*: 283-291
- Macfarlane, R. D. (1990) "Principles of Californium-252 plasma desorption mass spectrometry applied to protein analysis" *Methods Enzymol.* 193: 263-280
- Mandels, M. y Reese, E. T. (1960) "Induction of cellulase in fungi by cellobiose" *J. Bacteriol.* 79: 816-826
- Mandels, M., Parrish, F. W. y Reese, E. T. (1962) "Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*" *J. Bacteriol.* 83: 400-408

- Mandels, M. y Reese, E. T. (1964) "Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fibres" *Dev. Ind. Microbiol.* 5: 5-20
- Mäntylä, A., Harkki, A., Penttilä, M., Muttillainen, S., Buhler, R., Vaara, T., Knowles, J. y Nevalainen, H. (1989) "Construction of *Trichoderma reesei* strains with new cellulase profiles" *EMBO-Alko Workshop "Molecular biology of filamentous fungi"*, Espoo, Finlandia, Julio de 1989, p. 40.
- Mathew, C. D. y Balasubramaniam, K. (1986) "Chemical modification of α -galactosidase from coconut" *Phytochem.* 25: 2439-2443
- Menéndez-Arias, L., Gómez-Gutiérrez, J., García-Ferrández, M., García-Tejedor, A. y Morán, F. (1988) "A BASIC microcomputer program to calculate the secondary structure of proteins, from their circular dichroism spectrum" *CABIOS* 4: 479-482
- Messner, R., Gruber, F. y Kubicek, C. P. (1988) "Differential regulation of synthesis of multiple forms of specific endoglucanases by *Trichoderma reesei* QM9414" *J. Bacteriol.* 170: 3689-3693
- Messner, R., Kubicek-Pranz, E. M., Gsur, A. y Kubicek, C. P. (1991) "Cellobiohydrolase II is the main conidial-bound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains" *Arch. Microbiol.* 155: 601-606
- Messner, R. y Kubicek, C. P. (1991) "Carbon source control of Cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*" *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 630-635
- Miles, E. W. (1977) "Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate", *Meth. Enzymol.*, 47: 431-442
- Miller, G. L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars" *Anal. Chem.* 31: 426-428
- Mitsuishi, Y., Nitisinprasert, S., Saloheimo, M., Biese, I., Reinikanien, T., Claeysens, M., Keränen, S., Knowles, J. K. C. y Teeri, T. T. (1990) "Site-directed mutagenesis of the putative catalytic residues of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I" *FEBS Lett.* 275: 135-138
- Montenecourt, B. S. y Eveleigh, D. E. (1979) "Production and characterization of high yielding cellulase mutants from *Trichoderma reesei*" *TAPPI Ann. Meeting Proc.* 1979: 101-108
- Nieves, R. A., Ellis, R. P., Todd, R. J., Johnson, T. J. A., Grohmann, K. y Himmel, M. E. (1991) "Visualization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I on aspen cellulose by using monoclonal antibody-colloidal gold conjugates" *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3163-3170
- Niku-Paavola, M.-L., Lappalainen, A., Enari, T.-M. y Nummi, M. (1986) "*Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. Purification by immunoadsorption and hydrolytic properties" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8: 449-458
- Nisizawa, T., Suzuki, H. y Nisizawa, K. (1972) "Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*" *J. Biochem.* 71: 999-1007
- Ohnishi, M., Kawagishi, T., Abe, T. e Hiromi, K. (1980) "Stopped-flow studies on the chemical modification with N-bromosuccinimide of model compounds of tryptophan residues" *J. Biochem.* 87: 273-279
- Ong, E., Greenwood, J. M., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller Jr, R. C. y Warren, R. A. J. (1989) "The cellulose-binding domains of cellulases: tools for biotechnology" *Trends Biotechnol.* 7: 239-243
- Ozaki, K. e Ito, S. (1991) "Purification and properties of an acid endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330" *J. Gen. Microbiol.* 137:41-48
- Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. y Knowles, J. (1986) "Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene" *Gene* 45: 253-263
- Pereira, A. N., Mobedshashi, M. y Ladisch, M. R. (1988) "Preparation of cellodextrins" *Meth. Enzymol.* 160: 26-37
- Pétra, P. H. (1971) "Modification of carboxyl groups in Bovine Carboxypeptidase A. (I). Inactivation of the enzyme by N-ethyl-5'-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K" *Biochemistry* 10: 3163-3170
- Phillips, D. C. (1966) "The three dimensional structure of an enzyme molecule" *Sci. Am.* 215: 78-90
- Pokorny, M., Zupancic, S., Steiner, Th. y Kreiner, W. (1990) "Production and down-stream processing of cellulases on a pilot scale" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 168-184, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Pourquié, J., Warzywoda, M., Chevron, F., Théry, M., Lonchamp, D. y Vandecasteele, J. P. (1988) "Scale up of cellulose production and utilization" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 71-86, Academic Press, Londres
- Privat, J.-P., Lotan, R., Bouchard, P., Sharon, N. y Monsigny, M. (1976) "Chemical modification of the tryptophan residues of wheat-germ agglutinin" *Eur. J. Biochem.* 68: 563-572

- Py, B., Bortoli-German, I., Haiech, J., Chippaux, M. y Barras, F. (1991) "Cellulase EGZ of *Erwinia chrysanthemi*: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis" *Protein Eng.* 4: 325-333
- Quioco, F. A. (1986) "Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions" *Annu. Rev. Biochem.* 55: 287-315.
- Reese, E. T., Siu, R. G. H. y Levinson, H. S. (1950) "Degradation of soluble cellulose derivatives" *J. Bacteriol.* 59: 485-497
- Reese, E. T. y Mandels, M. (1984) "Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase" *Ann. Reports, Ferm. Processes* 7: 1-20
- Robson, L. M. y Chanbliss, G. M. (1989) "Cellulases of bacterial origin" *Enzyme Microb. Technol.* 11: 626-644
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T. T., Knowles, J. K. C. y Jones, T. A. (1990) "Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*" *Science* 248: 380-386
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T. T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeysens, M., Tomme, P. y Knowles, J. K. C. (1988) "EG III, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both, gene and enzyme" *Gene* 63: 11-21
- Schülein, M. (1988) "Cellulases of *Trichoderma reesei*" *Meth. Enzymol.* 160: 234-242
- Schwarz, W. H., Schimming, S., Rücknagel, K. P., Burgschwaiger, S., Kreil, G. y Staudenbauer, W. L. (1988) "Nucleotide sequence of the *celC* gene encoding endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*" *Gene* 63: 23-30
- Sharrock, K. R. (1988) "Cellulase assay methods: a review" *J. Biochem. Biophys. Meth.* 17: 81-106
- Shina, V. y Brewer, J. M. (1985) "A spectrophotometric method of quantitation of carboxyl group modification of protein using Woodward's Reagent K" *Anal. Biochem.* 151: 327-333
- Shoemaker, S. P., Watt, K., Tsitovsky, G. y Cox, R. (1983) "Characterization and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27" *Bio/Technol.* 1: 687-690
- Simmons, E. G. (1977) "Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species" *Second International Mycological Congress, Abstracts, vol. 2* University of South California, Tampa, p. 618
- Sinnott, M. L. y Viratelle, O. M. (1973) "The effect of methanol and dioxan on the rates of the β -galactosidase-catalysed hydrolyses of some β -D-galactopyranosides: rate-limiting degalactosylation" *Biochem. J.* 133: 81-87
- Sinnott, M. L. (1987) "Glycosyl group transfer" en *Enzyme Mechanisms* (Page, M. I. y Williams, A., eds.) pp. 259-295. The Royal Society, Londres
- Sinnott, M. L. (1990) "Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer" *Chem. Rev.* 90: 1171-1202
- Spande, T. F., Green, N. M. y Witkop, B. (1966) "The reactivity toward N-bromosuccinimide of tryptophan in enzymes, zymogens and inhibited enzymes" *Biochemistry* 5: 1926-1933
- Spande, T. F. y Witkop, B. (1967) "Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide" *Meth. Enzymol.* 11: 498-506
- Sprey, B. y Lambert, C. (1983) "Titration curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase- β -glucosidase-containing complex" *FEMS Microbiol. Lett.* 18: 217-222
- Ståhlberg, J., Johansson, G. y Pettersson, G. (1988) "A binding-site-deficient, catalytically active, coreprotein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei*" *Eur. J. Biochem.* 173: 179-183
- Sternberg, D. y Mandels, M. (1979) "Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose" *J. Bacteriol.* 139: 761-769
- Tanford, C. (1961) "Physical chemistry of macromolecules", pp. 317-366, John Wiley & Sons, Nueva York, USA
- Teeri, T. T., Salovuori, I. y Knowles, J. (1983) "The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*" *Bio/Technology* 1: 691-699
- Teeri, T. T., Jones, A., Kraulis, P., Rouvinen, J., Penttilä, M., Harkki, A., Nevalainen, H., Vanhanen, S., Saloheimo, M. y Knowles, J. K. C. (1990) "Engineering *Trichoderma* and its cellulases" en *Trichoderma Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application* (Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M., eds.) pp. 156-167, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido
- Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Vandekerchove, J., Knowles, J., Teeri, T. y Claeysens, M. (1988) "Studies of the cellulolytic system from *Trichoderma reesei*. Analysis of the domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis" *Eur. J. Biochem.* 170: 575-581
- Tomme, P. y Claeysens, M. (1989) "Identification of a functionally important carboxyl group in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*" *FEBS Letters* 243: 239-243

- Tomme, P. (1991) "Cellulasen uit *Trichoderma reesei* en *Clostridium thermocellum*: domeinstructuur, chemische modificaties en mutagenese" Tesis Doctoral, Rijksuniversiteit Gent, België.
- Ülker, A. y Sprey, B. (1990) "Characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4- β -glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*" *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 215-220
- Vaheri, M. (1982) "Oxidation as a part of degradation of crystalline cellulose by *Trichoderma reesei*" *J. Appl. Biochem.* 4: 356-363
- van Tilbeurgh, H., Claeysens, M. y de Bruyne, C. K. (1982) "The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes" *FEBS Lett.* 149: 152-156
- van Tilbeurgh, H., Bhikhabhai, R., Pettersson, L. G. y Claeysens, M. (1984) "Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity chromatography method" *FEBS Lett.* 169: 215-216
- van Tilbeurgh, H. y Claeysens, M. (1985) "Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates" *FEBS Lett.* 187: 283-288
- van Tilbeurgh, H., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. y Claeysens, M. (1988) "Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases" *Meth. Enzymol.* 160: 45-58
- Vázquez de Aldana, C. R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebreda, A. R., Méndez, E y del Rey, F. (1991) *Gene* 97: 173-182
- Vega, J. M., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1983) "La bioconversión de la biomasa" Ed. Pirámide, Madrid
- Vernon, C. A. y Banks, B. (1963) "The enzymic hydrolysis of glycosides" *Biochem. J.* 86: 7p
- Walsh, K. A. y Neurath, H. (1964) "Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52: 884-889
- Wolfrom, M. L. y Haq, S. (1964) "A polymer-homologous series of methyl β -D-glycosides from cellulose" *TAPPI* 47: 183-185
- Wood, T. M. (1985) "Properties of cellulolytic systems" *Biochem. Soc. Trans.* 13: 407-410
- Wood, T. M., McCrae, S. I., Wilson, C. A., Bhat, K. M. y Gow, L. A. (1988) "Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose" en *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (Aubert, J.-P., Béguin, P. y Millet, J., eds.) pp. 31-52, Academic Press, Londres
- Wood, T. M. y Bhat, K. M. (1988) "Methods for measuring cellulase activities" *Meth. Enzymol.* 160: 87-111
- Yagüe, E., Béguin, P. y Aubert, J.-P. (1990) "Nucleotide sequence and deletion analysis of the cellulase encoding gene celH of *Clostridium thermocellum*" *Gene* 89: 61-67