

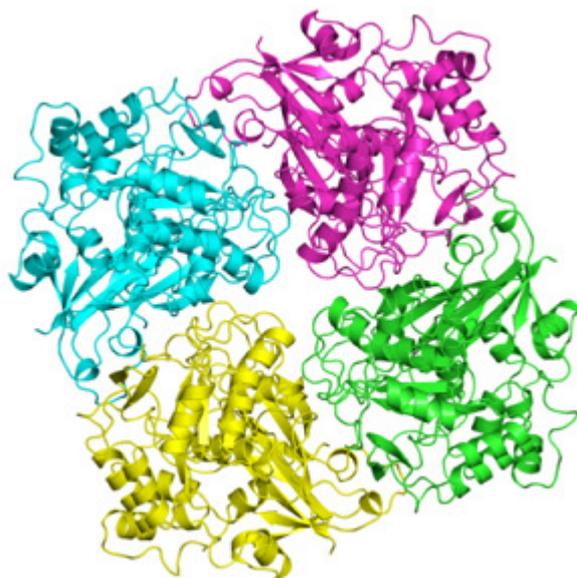
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA α -GALACTOSIDASA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y DE SU MUTANTE R412L

Caracterización bioquímica da enzima α -galactosidasa de Saccharomyces cerevisiae e do seu mutante R412L

Biochemical characterization of the enzyme α -galactosidase from Saccharomyces cerevisiae and its mutant R412L

Juan José Escuder Rodríguez

Tutor: Manuel Becerra Fernández



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

CURSO 2012/2013



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Imagen en portada: ensamblaje del homotetrámero de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* depositado en la base de datos PDB (3lrk) publicada por Fernandez-Leiro *et al.* (2010)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. α -galactosidasas.....	4
1.2. α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3. Aplicaciones de la α -galactosidasa de <i>S. cerevisiae</i> e ingeniería de proteínas.....	5
1.4. Mejora de la estabilidad térmica.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Material biológico.....	9
3.2. Medios y condiciones de cultivo.....	9
3.3. Técnicas de manipulación de DNA.....	11
3.4. Técnicas cromatográficas.....	13
3.5. Electroforesis en gel.....	14
3.6. Cuantificación de proteínas.....	15
3.7. Ensayos de actividad enzimática.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Construcción de los vectores para la purificación por cromatografía de la proteína mutante R412L.....	18
4.2. Purificación de la enzima α -galactosidasa y su mutante R412L.....	20
4.3. Caracterización bioquímica de la enzima α -galactosidasa y su mutante R412L	23
5. CONCLUSIONES.....	30
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. α -galactosidasas

Las α -galactosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -D-galactosídicos presentes en galactooligosacáridos y galactomananos poliméricos (polímeros de manano con ramificaciones de galactosa), así como en glucósidos (Fernández-Leiro, 2011). Bajo ciertas condiciones algunas de ellas también presentan actividad de transglicosilación (Eneyskaya *et al.* 1997; Zhao *et al.* 2008; Nakai *et al.* 2010).

Las α -galactosidasas están ampliamente distribuidas en bacterias (Zhao *et al.* 2008), hongos (Eneyskaya *et al.* 1997, Nakai *et al.* 2010), plantas (Gao *et al.* 1999) y animales (Garman y Garboczi 2004), y han sido clasificadas de acuerdo a similitudes de secuencia (Cantarel *et al.* 2009).

1.2. α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal)

Esta enzima es una proteína de 471 aminoácidos, codificada por el gen *MEL1*. La ORF no contiene intrones y consta de 1413 pb. La proteína presenta un péptido señal que la dirige al espacio extracelular y que corresponde a los 18 primeros aminoácidos (Liljestrom-Suominen 1985). Durante la ruta de secreción la proteína es altamente glicosilada, siendo en la proteína madura un 60% del peso molecular glucósidos (Sumner-Smith *et al.* 1985).

Tras la secreción, la enzima se acumula en el espacio periplásmico, pudiendo difundir al medio en cantidad variable según las condiciones del cultivo (Lazo *et al.* 1977). No presenta isoformas intracelulares y extracelulares (Post-Beittenmiller *et al.* 1984), y la población intracelular normalmente se asocia a membranas, por lo que se supone que se trata de precursores de la proteína extracelular madura (Lazo *et al.* 1977).

La α -galactosidasa de *S. cerevisiae* se clasifica en la familia GH27, proteínas que presentan un barril $(\alpha/\beta)_8$ (barril TIM) como motivo estructural principal y que catalizan la hidrólisis por un mecanismo de doble sustitución conservando la configuración anomérica del sustrato.

1.3. Aplicaciones de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* e ingeniería de proteínas

En la actualidad ya existen procesos industriales establecidos que usan α -galactosidasas de fuentes diversas, si bien el uso de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* puede tener ventajas. El hecho de que sea un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) le hace adecuado como fuente de la enzima para cualquier aplicación alimentaria o farmacéutica. Además, se trata de una levadura ampliamente estudiada y se ha empleado en muchos procesos de fermentación que están optimizados. Otro punto a favor es que la proteína es secretada con alta eficiencia por la levadura gracias a contar de forma natural con un péptido señal. Estas características junto a su razonable estabilidad pueden facilitar su empleo y la optimización de procesos de producción y aislamiento viables y fiables.

Dado que los carbohidratos son los principales componentes de muchos alimentos y que su hidrólisis es la etapa limitante de procesos relacionados con aplicaciones de la industria alimentaria (como la producción de cerveza, las industrias lácteas, el procesado del almidón, la degradación de melazas, la industria panadera, etc.), esta enzima tiene especial interés en esta industria. Los galacto-oligosacáridos melibiosa, rafinosa y estaquiosa son abundantes en las células vegetales, por lo que esta enzima es también utilizada en industrias que emplean material vegetal como materia prima (por ejemplo, en la industria de la remolacha azucarera, en la que pequeñas cantidades de galacto-oligosacáridos pueden impedir que la sacarosa se cristalice correctamente). Además, en la mayoría de mamíferos (incluyendo los humanos) no existe α -galactosidasa pancreática, por lo que los oligosacáridos no digeribles (normalmente rafinosa y estaquiosa) presentes en productos como la soja y otras legumbres pueden inducir flatulencia y otros trastornos intestinales tras la ingesta. La flora intestinal fermenta estos oligosacáridos produciendo gases cuya acumulación provoca estos síntomas. Por ello se han desarrollado suplementos dietéticos que contienen α -galactosidasa (Di Stefano *et al.* 2007) para solventar estos problemas. También se emplea esta enzima en alimentación animal para maximizar la conversión de galacto-oligosacáridos en animales monogástricos (Di Stefano *et al.* 2007). Otra aplicación en la industria alimentaria es la producción de un edulcorante artificial, la tagatosa (un monosacárido con mayor poder edulcorante y menos calorías que la sacarosa), a partir de los oligosacáridos de la soja.

Por otro lado, las melazas, el subproducto de las industrias azucareras, constituyen una posible amenaza ambiental dado su alto contenido en carbohidratos, y ya se han planteado estrategias que emplean la α -galactosidasa para aprovecharlas en la producción de biomasa y etanol con su degradación (Takakuwa *et al.* 2006; Argueso *et al.* 2009).

Por último cabe destacar algunas aplicaciones de esta enzima en el campo farmacéutico y biomédico. Una de las más importantes es el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Fabry, un trastorno hereditario ligado al cromosoma X causado por mutaciones en el gen que codifica la enzima α -galactosidasa A lisosomal. Las deficiencias en la hidrólisis de glicolípidos debidas a la enzima mutada causan la acumulación de globotriaosilceramida, que a su vez provoca fallo orgánico (Sakuraba *et al.* 2006; Yoshimitsu *et al.* 2010) y muerte prematura tanto en individuos homocigotos como heterocigotos. Se están desarrollando múltiples estrategias de terapia de reemplazamiento de la enzima con α -galactosidasas recombinantes para el tratamiento de esta enfermedad (Garman 2006).

Por otra parte, la ingeniería de proteínas permite el desarrollo de nuevas aplicaciones potenciales para la enzima. Muchas de sus posibles aplicaciones (procesado de la leche de soja, degradación de rafinosa en la industria de la remolacha, etc.) implican el empleo de altas temperaturas (65-70°C) en algunas etapas del proceso y requieren el uso de enzimas termoestables (Rezessy-Szabo, 2007). En este caso pueden emplearse las enzimas termófilas, derivadas de fuentes extremófilas, que han evolucionado en la naturaleza para desarrollar su actividad en esas condiciones extremas. Aún así, estas enzimas presentan tasas de reacción más bajas para garantizar un balance metabólico adecuado a esas temperaturas (Podar, M. y Reysenbach, A.L. 2006).

Por ello, en un estudio anterior en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC (Fernández-Leiro, 2011) se planteó una estrategia racional de ingeniería de proteínas, en la que se pretendía conseguir una mejora en la estabilidad térmica de la α -galactosidasa mesofílica de *S. cerevisiae*, lo que podría aportar la ventaja de presentar una tasa de reacción intacta y una estabilidad térmica elevada, resultando en un biocatalizador más efectivo.

1.4. Mejora de la estabilidad térmica

Los mecanismos estructurales que explican las mejoras en la estabilidad térmica de las enzimas son difíciles de predecir y dependen de muchos factores. Entre ellos encontramos los puentes disulfuro (Zavodszky *et al.* 2001), la formación de puentes de hidrógeno y salinos (Wrede y Schneider 1994), o efectos cooperativos entre residuos distales que forman este tipo de enlaces (Reetz *et al.* 2009), el incremento de la hidrofobicidad interna, minimización de la proporción superficie/volumen, o la estabilización de elementos de estructura secundaria o cuaternaria de la proteína (Gonzalez-Blasco *et al.* 2000)

Basándose en una estrategia de evolución dirigida, en concreto la Mutagénesis de Saturación Iterativa (ISM) usando como valor objetivo el B-factor (Reetz *et al.*, 2006), en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC se generó una librería de mutantes (Fernández-Leiro, 2011). Tras un *screening* basado en la actividad enzimática tras un tratamiento térmico a alta temperatura se seleccionaron las variantes que aumentaban la actividad residual respecto al genotipo silvestre. De este modo, una mutación en el residuo 412 generaba una librería de mutantes en la que la mayoría de variantes mostraban mayor o similar actividad y estabilidad térmica. Todo ello condujo a encontrar 3 enzimas mutadas con mayor estabilidad, que una vez secuenciadas coincidían en la misma mutación, un cambio en la Arginina en posición 412 por Leucina (R412L).

2. OBJETIVOS

Como una continuación a los trabajos realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC con respecto al mutante obtenido de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* R412L, en este trabajo se han abordado los siguientes objetivos:

- 1.- Construcción de dos plásmidos que presentasen el gen *MEL1*, que codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*, portando la mutación R412L fusionado a diferentes secuencias (la secuencia codificadora para una cola de 6 histidinas por una parte y la secuencia codificadora para el péptido FLAG por otra) y que permitiesen la purificación de la enzima en un único paso.
- 2.- Purificación mediante cromatografía de la proteína expresada por las levaduras transformadas por las construcciones previas obtenidas. Así como comprobación del grado de pureza obtenido mediante electroforesis en gel.
- 3.- Determinación del pH y temperatura óptimas así como de la estabilidad a diferentes temperaturas y pHs de la enzima α -galactosidasa de *S. cerevisiae* y de su mutante R412L purificados mediante cromatografía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepas

Se empleó la cepa de la bacteria *Escherichia coli* XLI- Blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^qZDM15 Tn10* (Tet^r)]} (Stratagene) como células competentes en las que amplificar los vectores.

La cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 [*pep4:: HIS3, prb- Δ 1.6R HIS3, lys2-208, trp1- Δ 101, ura 3-52, gal2, can1*] (Eastman Kodak Company) fue utilizada para expresar las proteínas.

3.1.2. Vectores

Como molde para la mutagénesis dirigida del gen *MEL1* se empleó el plásmido YEpMEL1 [*amp^r, ori, 2 μ , MEL1, TRP1*] modificado previamente en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC (Fernández-Leiro, 2011) mediante recombinación homóloga de tal forma que en cada caso contenía la construcción *MEL1FLAG* (que introduce al final de la ORF, antes del codón de paro, la secuencia que codifica para el péptido FLAG, plásmido YEpMEL1FLAG) o *MEL1HIS* (que introduce al final de la ORF, antes del codón de paro, la secuencia codificadora para la cola de 6 histidinas, plásmido YEpMEL1HIS).

3.2. Medios y condiciones de cultivo

La transformación en bacterias incluyó la resuspensión de las mismas en medio LB (Luria-Bernati) y la siembra de las mismas en medio LBA (Luria-Bertani suplementado con Ampicilina) cuyas composiciones se indican en las siguientes tablas:

Luria-Bertani (LB)	
Bactotripton	1%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%
D-glucosa	0,1%

Luria-Bertani suplementado con Ampicilina (LBA)	
Bactotripton	1%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%
D-glucosa	0,1%
Ampicilina*	40 mg/L

*Se parte de una solución madre preparada con agua destilada estéril y conservada en alícuotas a una temperatura de -20°C.

Se realizó un pre-inóculo de las levaduras en medio CM -TRP (Medio Completo sin Triptófano), de 1 colonia en 20mL en un matraz en agitación a 30°C durante 72h. La composición del medio CM -TRP, junto con la de sus componentes, se indica a continuación:

Medio Completo sin triptófano (CM -TRP)	para 1 L
D-glucosa	20 g
Mezcla de aminoácidos (200x)	5 mL
YNB*	67 mL
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina, Tirosina	(cada uno) 40 mg

*Se añade después de la esterilización del resto de los componentes, a una temperatura menor de 60°C y en condiciones estériles

Mezcla de aminoácidos 200X		YNB	
	para 1 L		para 1 L
Arginina, Metionina, Treonina	(cada uno) 2 g	Mezcla de vitaminas 300X	50 mL
Isoleucina, Fenilalanina	(cada uno) 2 g	Sales traza 150X	100 mL
Lisina	8 g	Sulfato amónico*	75 g
		KH ₂ PO ₄	15 g
		MgSO ₄	7,5 g
		NaCl	1,5 g
		CaCl ₂	1,5 g

*Se añade después de disolver el resto de componentes para evitar su precipitación

Mezcla de vitaminas 300X		Sales traza 150X	
	para 1 L		para 1 L
Biotina	0,6 mg	Acido bórico	75 mg
Pantotenato cálcico	120 mg	Sulfato cúprico	6 mg
Ácido fólico	0,6 mg	Ioduro potásico	15 mg
Inositol	600 mg	Cloruro férrico	30 mg
Niacina	120 mg	Sulfato manganoso	60 mg
p-Aminobenzoico	60 mg	Molibdato sódico	30 mg
Piridoxina	120 mg	Sulfato de zinc	60 mg
Riboflavina	60 mg		
Tiamina	120 mg		

Tras el pre-inóculo se realizó un pre-cultivo, en medio YPSHM (extracto de levadura 1%, peptona 8%, glucosa 1%, glicerol 3%) en un matraz en agitación a 30°C durante otras 72h.

3.3. Técnicas de manipulación de DNA

3.3.1. Transformación de bacterias

Las bacterias competentes *Escherichia coli* XLI- Blue (Stratagene) se descongelaron en hielo durante 20 minutos desde una temperatura de -80°C. Tras ello, se añadieron 5µL del plásmido con el que se querían transformar y se dejó la mezcla en hielo durante 1 minuto.

A continuación se realizó un choque térmico introduciendo la mezcla en un baño a 42°C durante 45 segundos, y volviéndola a introducir en hielo.

Posteriormente se añadió 1mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 30 minutos para recuperar las células.

Por último, se realizó una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, tras lo que se resuspendieron las células y se sembraron en placas con medio LBA.

3.3.2. Transformación de levaduras

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 fueron descongeladas a temperatura ambiente desde una temperatura de -80°C y transformadas con 5 μ L de plásmido y 500 μ L de solución 3 (Frozen EZ Yeast Transformation II Kit, Zymo Research) incubadas durante 45 minutos a 30°C.

A continuación se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se tomaron 100 μ L del fondo del tubo y se usaron para sembrar placas con medio CM-TRIP.

3.3.3. Extracción de DNA plasmídico

Para las extracciones de DNA plasmídico se empleó el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), siguiendo el protocolo de purificación indicado por el fabricante.

3.3.4. Cuantificación de DNA

Las cuantificaciones de DNA se realizaron con un espectrofotómetro NanoPhotometer (IMPLEN), que permite la lectura de micro-volúmenes desde 0,3 μ L, utilizando un programa interno con protocolos ya establecidos para realizar las mediciones.

Se utilizaron entre 1-3 μ L de muestra para las mediciones y el protocolo para medición de ADN de doble cadena incluido en el programa, que mide la concentración y hace una valoración de la pureza de la muestra.

La relación A260/A280 es un índice del grado de impurezas que contiene la muestra. La relación ideal se ajusta a un valor aproximado de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.5. Secuenciación de DNA

Para la secuenciación del DNA se contó con los servicios de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular de los SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña y los de la empresa Sistemas Genómicos (Parque Tecnológico de Valencia).

3.4. Técnicas cromatográficas

3.4.1. Cromatografía de afinidad Níquel-Sefarosa

Se midió la OD_{600} de los cultivos de levadura que expresaban la proteína (con el genotipo silvestre y con la mutación R412L) unida a una cola de histidinas, crecidos durante 72h. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos, conservando el sobrenadante. El sobrenadante a continuación fue filtrado con un filtro de 0,22 μ m.

Los tampones fueron filtrados con un filtro de 0,22 μ m y una bomba de vacío, y desgasificados durante 20 minutos con un equipo desgasificador. Se emplearon los siguientes tampones: tampón de unión (“binding buffer”) 6-HisTAG- α GAL (tampón fosfato 100mM pH7, NaCl 500mM, Imidazol 25mM), tampón de elución (“elution buffer”) 6-HisTAG- α GAL (tampón fosfato 100mM pH7, NaCl 500mM, Imidazol 500mM) y tampón de “stripping” (tampón fosfato 20mM, EDTA 50mM, NaCl 500mM, pH7.4).

Para la cromatografía se empleó una columna *HisTrap HP Column* (GE Healthcare). En primer lugar se descargaron las columnas con 10 volúmenes de tampón de “stripping”, 10 volúmenes de tampón de unión y 10 volúmenes de agua desgasificada. A continuación se recargó con 2,5 mL de sulfato de níquel ($NiSO_4$ 0,1M) y se hizo pasar nuevamente agua desgasificada. La muestra (sobrenadante del medio de cultivo filtrado) se cargó en la columna haciéndola pasar 2 veces por la misma (se recogió el efluente y se volvió a pasar por la columna).

La cromatografía se llevó a cabo con un sistema Äkta Prime Plus (GE Healthcare). Una vez conectada la columna al sistema se lavó con tampón de equilibrado y se eluyeron las fracciones con el tampón de elución.

3.4.2. Cromatografía de inmunoafinidad

Se midió la OD₆₀₀ de los cultivos de levadura que expresaban la proteína (con el genotipo silvestre y con la mutación R412L) unida a un péptido FLAG, crecidos durante 72h. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos, conservando el sobrenadante. El sobrenadante a continuación fue filtrado con un filtro de 0,22 μ m.

En primer lugar se resuspendió la resina de afinidad ANTI-FLAG M2 (Sigma) en buffer TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH7.4), se centrífugo durante 5 minutos a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer TBS (repetiendo la operación hasta realizar 3 lavados). La resina a continuación se resuspendió en el cultivo filtrado y se dejó incubando en agitación durante 2 horas en frío (4°C). La columna se rellenó con la mezcla de cultivo y resina, realizando a continuación 3 lavados con tampón TBS. Por último, la columna se eluyó con el tampón de elución (péptido FLAG diluido en tampón TBS en proporción 1:20). La columna posteriormente fue reciclada con tampón glicina (0,1M glicina, pH 3,5).

3.5. Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

Se desarrollo una electroforesis en gel de bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para comprobar el grado de pureza obtenido tras las purificaciones de las proteínas mediante cromatografía. Se preparó el gel separador al 15% de bisacrilamida y el gel concentrador al 5%. A continuación se recogen en tablas las composiciones de los geles:

Gel separador	para 10mL
Bis-acrilamida (45%)	3,33mL
Tris 1,5M pH 8,8	2,5mL
H ₂ O destilada	4mL
SDS 10%	100 μ L
APS 10%*	50 μ L
TEMED*	20 μ L

*Comienza a polimerizar el gel

Gel concentrador	para 5,475mL
Bis-acrilamida (45%)	0,85mL
Tris 0,5M pH 6,8	1,3mL
H ₂ O destilada	2,8mL
SDS 10%	50 μ L
APS 10%*	20 μ L
TEMED*	5 μ L

*Comienza a polimerizar el gel

Las muestras fueron diluidas al 50% con tampón de carga (SDS 4%, glicerol 20%, Tris-HCl 12%, Azul de bromofenol 0,2%, β -mercaptoetanol 10%) y fueron desnaturalizadas a 95°C durante 12 minutos. Para el desarrollo de la electroforesis se empleó un tampón de electroforesis (glicina 14,4g/L, Tris-HCl 3g/L, SDS 1g/L, pH 8.3) y se aplicó un voltaje de 150 V. El marcador de pesos moleculares empleado fue PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) cuyas bandas en gel de SDS-PAGE se indican en la figura 1.

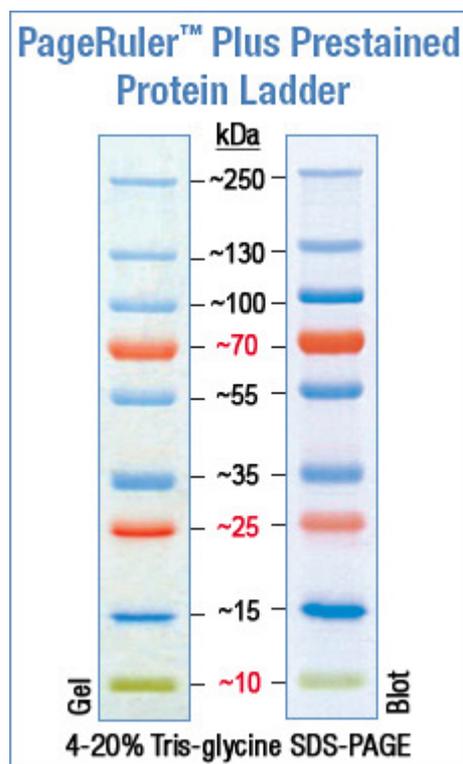


Figura 1. Marcador de peso molecular Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder

Como solución de tinción para los geles se empleó una solución de Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue 0,25 mg/mL, ácido acético 10%) calentada junto al gel en microondas y dejados en agitación durante más de 10 minutos, y para eliminar el exceso de tinción se empleó una solución de ácido acético al 10% calentada junto al gel en microondas y dejados en agitación durante más de 10 minutos. Las imágenes de los geles fueron tomadas con un equipo Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad).

3.6. Cuantificación de proteínas

La concentración proteica se midió mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Este método colorimétrico nos permite detectar cantidades de proteínas de hasta 1 μ g.

Para cuantificar la cantidad de proteína purificada en cada fracción eluida de la cromatografía, se construyó una recta patrón con BSA (0 mg/mL, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50) y tanto esta como las muestras fueron diluidas en reactivo Bradford (10 μ L en 200 μ L de reactivo) e incubadas en agitación durante 15 minutos, tras lo que se midió la absorbancia a 585 nm.

El reactivo Bradford se preparó diluyendo 2 mL de reactivo concentrado en 8 mL de agua destilada, tras lo cuál se filtró con un filtro de 45 μ m.

Los puntos de la recta patrón se midieron por duplicado, mientras que los de las muestras se hicieron por triplicado.

3.7. Ensayos de actividad enzimática

3.7.1. Ensayos de temperatura óptima

Se midió la actividad de la enzima purificada a diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C). La muestra purificada fue diluida en un tampón (TrisHCl 0.05M, NaCl 150M, pH7.4) en proporción 1:400 en el caso de la muestra procedente del genotipo silvestre y 1:50 en el caso de la procedente del genotipo mutante.

Como sustrato de la reacción se empleó PNP α (α -nitrofenil-galactopiranosido) 10 mM en tampón ácido cítrico 61mM, Na₂HPO₄ 77mM, pH3.0. Para detener la reacción se empleó carbonato sódico 0.1M en agua destilada. El sustrato se añadió en proporción 1:2, y tras 2 minutos y 4 minutos de reacción se extrajo un volumen de muestra y se añadió a la solución de parada de reacción en proporción 1:10.

Las medidas de p-nitrofenol liberado se realizaron por absorbancia UV a 400 nm, expresando la actividad de la α -galactosidasa en unidades enzimáticas (UE) definidas como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de producto por minuto en las condiciones experimentales (μ mol min⁻¹ mL⁻¹). Las medidas se realizaron por triplicado.

3.7.2. Ensayos de estabilidad a diferentes temperaturas

Se midió la actividad de la enzima purificada tras incubar esta a diferentes temperaturas (a 70°C durante un período de 40 minutos con intervalos de 10 minutos, a 60°C durante un período de 2 horas con intervalos de 10 minutos en la primera hora y de 30 minutos en la

segunda, y a 50°C y 40°C durante un período de 24 horas con intervalos de 2 horas hasta las 8 horas y una medida final a las 24 horas).

La muestra purificada fue diluida al igual que en el apartado anterior, empleándose los mismos tampones, solución con sustrato y solución de parada y las mismas proporciones de cada uno, así como los mismos tiempos de parada de reacción. Las medidas se realizaron por triplicado.

3.7.3. Ensayos de pH óptimo

Se midió la actividad de la enzima purificada en diferentes condiciones de pH (pH2.07, pH3.0, pH4.0, pH5.0, pH6.0, pH7.0 y pH8.0). En cada caso la muestra purificada fue diluida en un tampón fosfato-citrato con el pH ajustado a cada caso, en la misma proporción que los apartados anteriores.

El sustrato empleado fue PNPG- α 10mM y en este caso fue disuelto en el tampón fosfato-citrato con el pH ajustado a cada caso. Para detener la reacción se empleó la misma solución de parada que en los apartados anteriores.

La reacción se desarrollo de la misma forma que en los apartados anteriores y empleando los mismos tiempos de parada de reacción, a una temperatura de 40°C. Las medidas se realizaron por triplicado.

3.7.4. Ensayos de estabilidad a diferentes pHs

Se midió la actividad de la enzima purificada tras incubarla a diferentes pHs (a pH2.07 y pH3.0 durante 2 horas con intervalos de 15 minutos la primera media hora e intervalos de 30 minutos el resto de tiempo, y a pH4.0, pH5.0 y pH6.0 durante 52 horas con intervalos alternados de 6 y 18 horas). En cada caso la muestra purificada fue diluida en tampón fosfato-citrato con el pH ajustado correspondiente, y en la misma proporción que en los apartados anteriores. Como sustrato se utilizó PNPG- α 10mM disuelto en tampón ácido cítrico 61mM, Na₂HPO₄ 77mM, pH3.0. Para detener la reacción se utilizó la misma solución de parada que en los apartados anteriores.

La reacción se desarrollo de la misma forma que en los apartados anteriores y empleando los mismos tiempos de parada de reacción, a una temperatura de 40°C. Las medidas se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Construcción de los vectores para la purificación por cromatografía de la proteína mutante R412L

Se introdujo una mutación puntual (R412L) en el gen *MEL1* introducido en el plásmido YEpMEL1 modificado en anteriores trabajos en el laboratorio (Fernández-Leiro, 2011), para incluir un epítipo FLAG (YEpMEL1FLAG) o una cola de histidinas (YEpMEL1HIS) empleando el kit comercial de Mutagénesis Dirigida QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit permite realizar mutaciones puntuales en genes incluidos en un vector de dsDNA. Para ello se utiliza la PfuUltra™ High Fidelity DNA polimerasa (capaz de replicar ambas cadenas con alta fidelidad) y un termociclador. En el protocolo se emplean dos *primers* sintéticos que contienen la mutación deseada en el centro de los mismos, cada uno complementario a cadenas opuestas del vector, que son extendidos por la polimerasa permitiendo amplificar la molécula del vector completa. Esto da lugar a plásmidos mutados que contienen *nicks* espaciados que se reparan tras una posterior transformación en bacterias.

Para el diseño de los *primers* para la mutagénesis se empleó la herramienta bioinformática de *Agilent Technologies* disponible en <http://www.home.agilent.com/>. Se emplearon los mismos *primers* para mutar el gen *MEL1* unido a la cola de histidinas del vector YEpMEL1HIS que para el caso del gen *MEL1* unido al epítipo FLAG del vector YEpMEL1FLAG.

Oligos mutante R412L
F GTCTGCTATCCTTGGACTGAATAAGACAGCCACCG
R CGGTGGCTGTCTTATTCAAGTCCAAGGATAGCAGAC

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de reacción QuickChange	
Buffer de reacción 10x	5 μ L
dsDNA template	10ng*
Primer F	125ng*
Primer R	125ng*
dNTP mix	1 μ L
Quick Solution	3 μ L
ddH2O	hasta volumen final 50 μ L
Añadir al final:	
<i>PfuUltra</i> DNA polimerasa (2.5 U/ μ L)	1 μ L

*Los volúmenes se calculan en cada caso en función de la concentración, cuantificadas en NanoPhotometer.

La mutagénesis se llevo a cabo en un termociclador con el siguiente programa de ciclos:

Programa del termociclador		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	1 minuto
18	95°C	50 segundos
	60°C	50 segundos
	68°C	1 minuto por longitud en kb de plásmido (8378pb, 8 minutos 25 segundos)
1	68°C	7 minutos

El producto fue tratado con 1 μ L la enzima DpnI (10 U/ μ L) [Quickchange, Stratagene] una endonucleasa específica de DNA metilado o hemimetilado (de tal forma que digiere el molde de DNA original, quedando solamente DNA que contiene la mutación), incubando la mezcla durante 1 hora a 37°C y repitiendo el proceso otra vez (se añadió otra vez 1 μ L de DpnI, y se incubó durante 1 hora a 37°C). Por último se procedió a la transformación en bacterias competentes *Escherichia coli* XLI- Blue siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos.

Tras realizar la mutagénesis dirigida y secuenciar tanto la forma silvestre como la mutante, se pudo confirmar que en la segunda el codón CGG que codifica para una Arginina en posición 412 se cambió por CTG que codifica para Leucina (resultando la mutación R412L), mientras que la secuencia de la primera se mantenía sin modificaciones. Estos resultados se confirmaron tanto en el vector YEpMEL1HIS como para el YEpMEL1FLAG.

4.2. Purificación de la enzima α -galactosidasa y su mutante R412L

4.2.1. Purificación de la proteína α -galactosidasa y su mutante mediante cromatografía de afinidad Niquel-Sefarosa

Para la purificación de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* fusionada a una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal se empleó la construcción YEpMEL1HIS transformada en la cepa de levadura BJ3505. De la misma manera para la purificación de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* mutante R412L fusionada a una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal se empleó la construcción YEpMEL1mutHIS transformada en la cepa de levadura BJ3505. La purificación se basa en la afinidad existente entre la secuencia de histidinas y un metal iónico inmovilizado (Ni^{2+}). Se partió de una concentración inicial de proteínas en el sobrenadante filtrado del cultivo de 0.2983 mg/mL en el cultivo que expresaba la forma silvestre y de 0.3537 en el de la forma mutante. Tras cargar la columna se encontró una concentración de 0.2907 mg/mL en la fracción no retenida de la forma silvestre y de 0.2876 mg/mL en el de la mutante. Tras realizar el lavado de la columna no se encontró proteína en el caso de la forma silvestre, mientras que en la mutante existía una concentración de 0.0355 mg/mL. Finalmente, en la fracción eluida analizada en cada caso se encontraron concentraciones de 0.3650 mg/mL en el caso de la forma silvestre y de 0.2050 mg/mL en el caso de la mutante. En las figuras 2 y 3 pueden observarse los geles de electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de afinidad Niquel-Sefarosa de la proteína silvestre y de la proteína mutante R412L respectivamente.

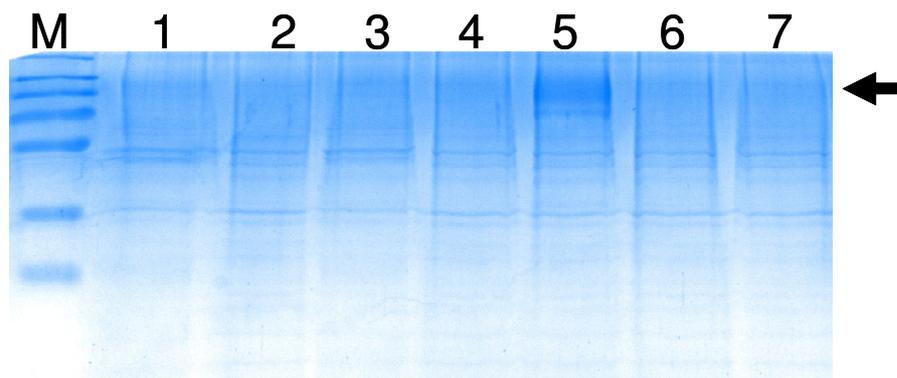


Figura 2. Electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de afinidad Niquel-Sefarosa de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae*. M) Marcador de peso molecular; 1) Sobrenadante filtrado del cultivo; 2) Lavado; 3) Fracción no retenida; 4) Fracción eluida nº3; 5) Fracción eluida nº4; 6) Fracción eluida nº5 ; 7) Fracción eluida nº6. La flecha indica el peso molecular esperado para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*

Se empleó la fracción eluida nº4 para realizar los ensayos de actividad enzimática con la proteína α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae*.

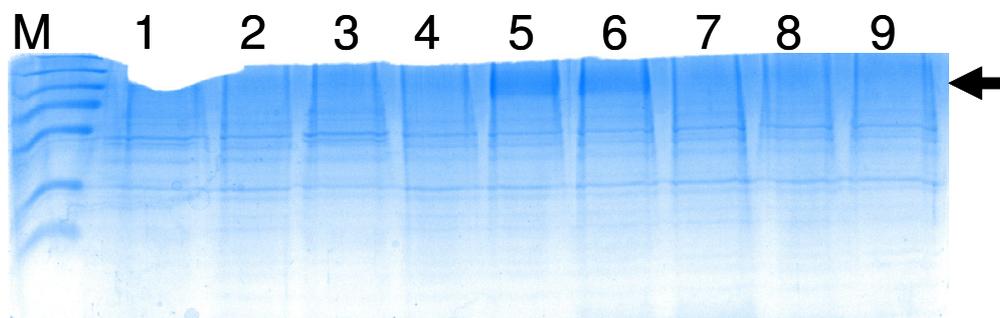


Figura 3. Electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de afinidad Niquel-Sefarosa de la α -galactosidasa mutante R412L de *S. cerevisiae*. M) Marcador de peso molecular; 1) Sobrenadante filtrado del cultivo; 2) Lavado; 3) Fracción no retenida; 4) Fracción eluida nº5; 5) Fracción eluida nº6; 6) Fracción eluida nº7 ; 7) Fracción eluida nº8; 8) Fracción eluida nº 9; 9) Fracción eluida nº 10. La flecha indica el peso molecular esperado para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*

La fracción eluida nº6 (carril 5 de la figura 3) fue la elegida para realizar los ensayos de actividad enzimática para la proteína α -galactosidasa de *S. cerevisiae* mutante R412L.

4.2.2. Purificación de la proteína α -galactosidasa y su mutante mediante cromatografía de inmunoafinidad

Para la purificación de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* fusionada al péptido FLAG en el extremo carboxilo terminal se empleó la construcción YEpMEL1FLAG transformada en la cepa de levadura BJ3505. De la misma manera para la purificación de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* mutante R412L fusionada al péptido FLAG en el extremo carboxilo terminal se empleó la construcción YEpMEL1mutFLAG transformada en la cepa de levadura BJ3505. La purificación se basa en la utilización de una resina de agarosa unida covalentemente a anticuerpos monoclonales contra el péptido FLAG. La elución de la proteína unida a la resina se realiza mediante elución competitiva contra el péptido FLAG.

Se realizaron cuantificaciones de las concentraciones de proteína en cada fracción eluida de la columna, encontrándose en la forma silvestre concentraciones de 0.3734 mg/mL, 0.2893 mg/mL, 0.2668 mg/mL y 0.2412 mg/mL (en orden sucesivo) y en la mutante de 0.0426 mg/mL, 0.0631 mg/mL, 0.0657 mg/mL y 0.0545mg/mL (en orden sucesivo). En las figuras 4 y 5 pueden observarse los geles de electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad de la proteína silvestre y de la proteína mutante R412L respectivamente.

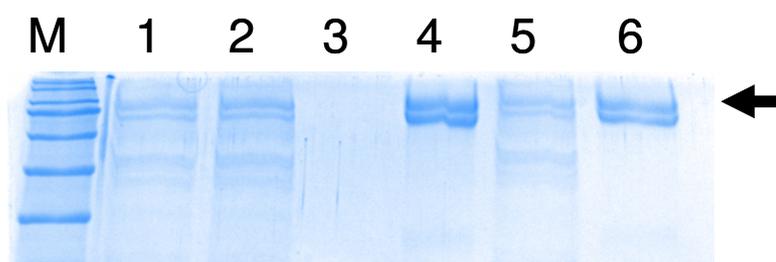


Figura 4. Electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae*. M) Marcador de peso molecular; 1) Sobrenadante filtrado del cultivo; 2)Fracción no retenida nº 1 ; 3) Lavado; 4) Fracción eluida nº1; 5) Fracción no retenida nº 2; 6) Fracción eluida nº2. La flecha indica el peso molecular esperado para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*

Se empleó la fracción eluida nº2 para realizar los ensayos de actividad enzimática con la proteína α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae*.

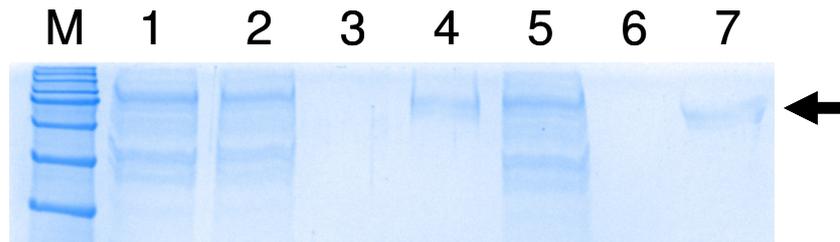


Figura 5. Electroforesis en SDS-PAGE de la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad de la α -galactosidasa mutante R412L de *S. cerevisiae*. M) Marcador de peso molecular; 1) Sobrenadante filtrado del cultivo; 2) Fracción no retenida n° 1; 3) Lavado; 4) Fracción eluida n°1; 5) Fracción no retenida n° 2; 6) carril vacío ; 7) Fracción eluida n°2. La flecha indica el peso molecular esperado para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*

Se empleó la fracción eluida n°2 para realizar los ensayos de actividad enzimática de la proteína α -galactosidasa de *S. cerevisiae* mutante R412L.

Como puede observarse, en el caso de la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad se consigue un grado de pureza superior al conseguido mediante cromatografía de afinidad. En los geles de SDS-PAGE (Figuras 4 y 5) se pueden observar menos bandas de otras proteínas retenidas de forma no específica durante la cromatografía de inmunoafinidad que con la cromatografía de afinidad (Figuras 3 y 4) tanto para la proteína silvestre como la mutante.

4.3. Caracterización bioquímica de la enzima α -galactosidasa y su mutante R412L

4.3.1. Temperatura óptima

Se comprobó la actividad enzimática a diferentes temperaturas de la enzima silvestre y de su mutante R412L obtenidas mediante purificación por cromatografía de afinidad (Figura 6) e inmunoafinidad (Figura 7) para determinar la temperatura óptima.

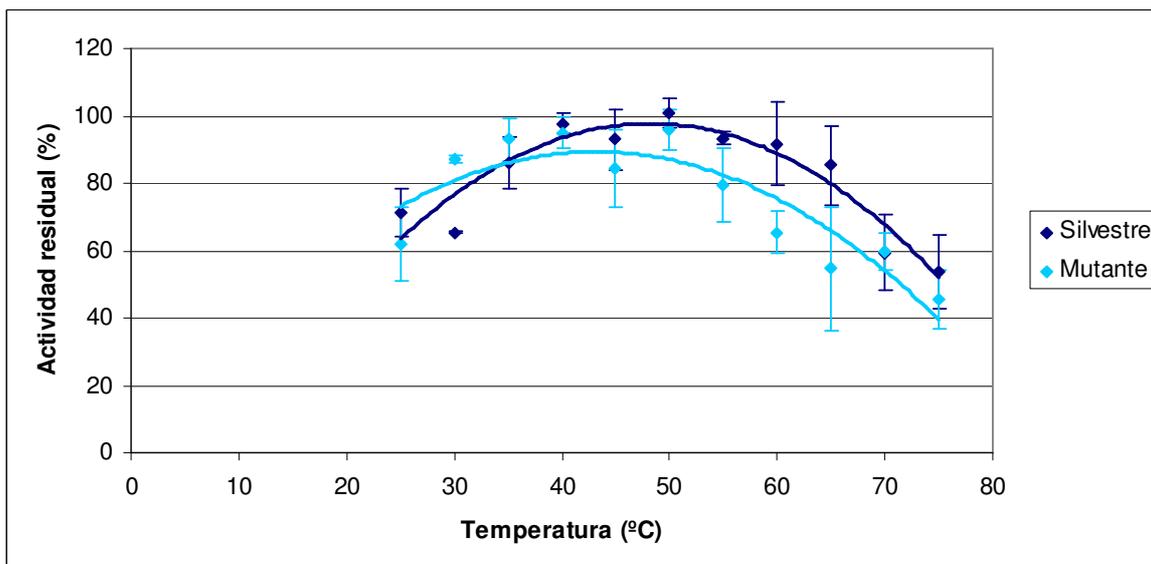


Figura 6. Determinación de la temperatura óptima de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* (azul oscuro) y la α -galactosidasa mutante R412L (azul claro) purificadas mediante cromatografía de afinidad.

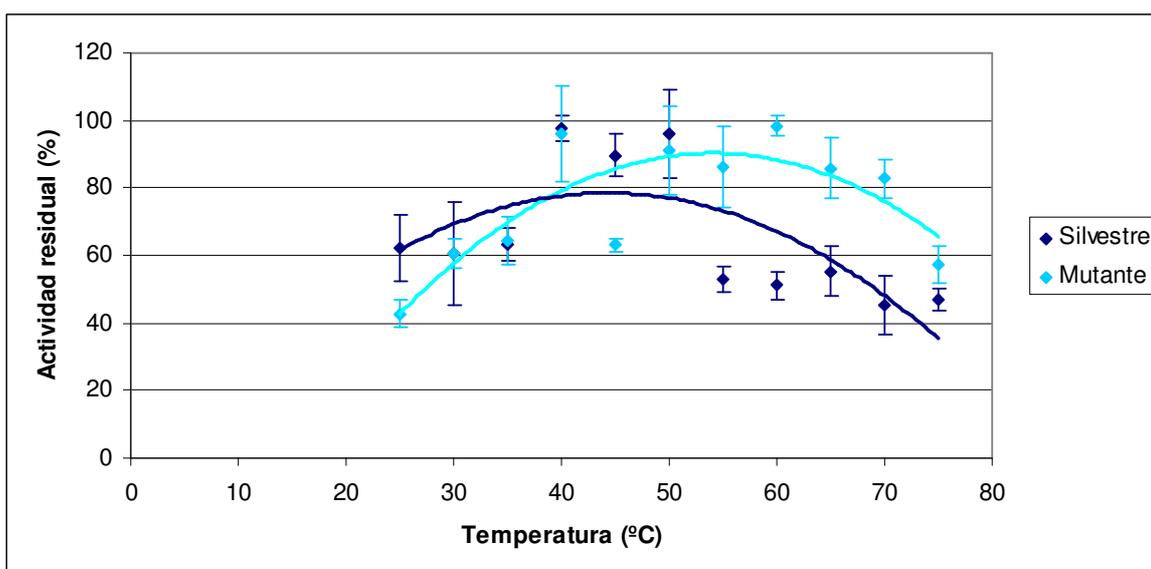


Figura 7. Determinación de la temperatura óptima de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* (azul oscuro) y la α -galactosidasa mutante R412L (azul claro) purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad.

En el caso de la enzima purificada mediante cromatografía de afinidad se encontró un máximo de actividad a una temperatura de 50°C, tanto en la forma silvestre como en la mutante (Figura 6). Sin embargo, la enzima purificada por inmunoafinidad presenta un máximo de actividad a 40°C para la enzima silvestre, mientras que para la mutante presenta un máximo a 60°C (Figura 7).

Tanto la cola de Histidinas como el péptido FLAG que se añaden al extremo carboxilo Terminal de la proteína para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad o inmunoafinidad respectivamente, parecen tener un efecto sobre la temperatura óptima. Mientras que en el primer caso, tanto el mutante como la proteína silvestre presentan la misma temperatura óptima (50°C). En el segundo caso, con el péptido FLAG, la proteína silvestre presenta una temperatura óptima claramente inferior (40°C) a la proteína mutante (60°C). Resultados previos, realizados por otros autores determinaron una temperatura óptima para la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* de 40° C (Fernández-Leiro, 2011) que confirman los resultados obtenidos mediante la proteína purificada por inmunoafinidad. La cola de Histidinas es posible que esté produciendo algunos cambios conformacionales en la proteína provocando modificaciones en la temperatura óptima. Este hecho unido a que se consigue un mayor grado de pureza mediante cromatografía de inmunoafinidad nos ha llevado a realizar los siguientes experimentos con la proteína purificada mediante esta técnica.

4.3.2. Estabilidad a diferentes temperaturas

Se comprobó la estabilidad a diferentes temperaturas tanto de la enzima mutante como de la silvestre, determinando la actividad residual tras incubarla a diferentes temperaturas durante determinados períodos de tiempo (Figura 8 y 9).

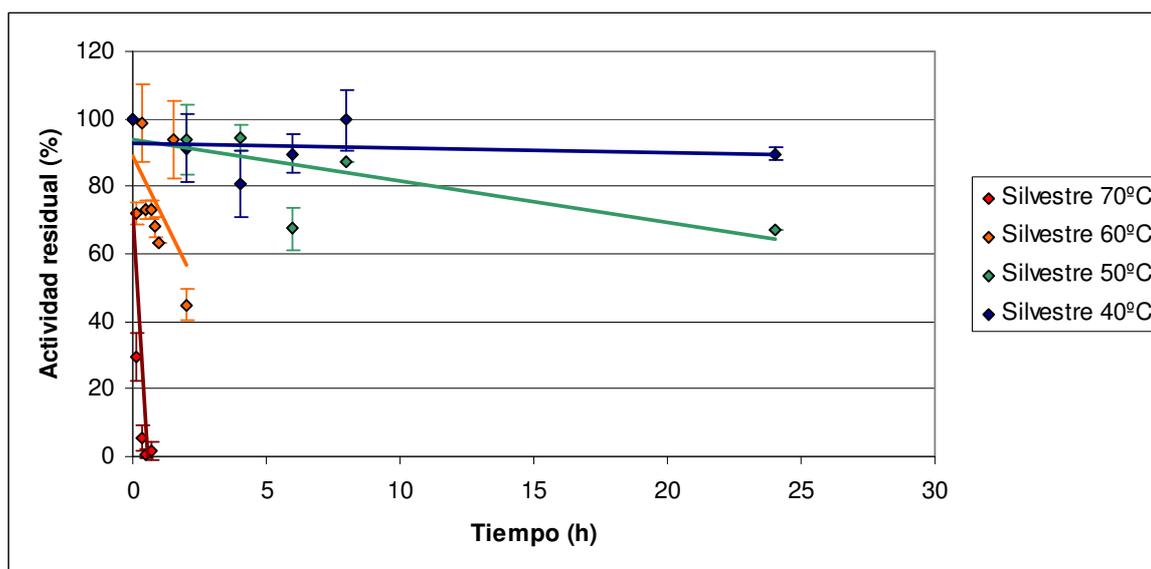


Figura 8. Determinación de la estabilidad a diferentes temperaturas de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad.

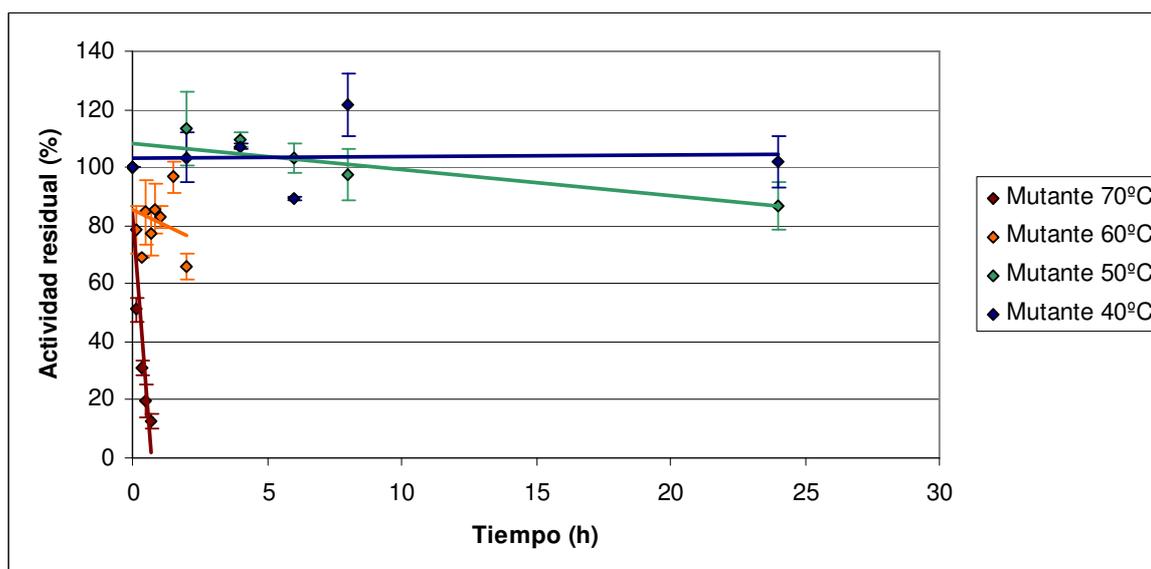


Figura 9. Determinación de la estabilidad a diferentes temperaturas de la α -galactosidasa mutante R412L de *S. cerevisiae* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad.

En este caso, se observan claras diferencias en la estabilidad de la proteína entre la forma silvestre y la mutante. Así, a 70°C la actividad de la forma silvestre decae hasta el 0% en un período de 30 minutos, mientras que en la forma mutante esto ocurre a los 40 minutos. A 60°C la enzima silvestre conserva un 60% de actividad en un período de 2 horas, mientras que en el mismo período la actividad de la enzima mutante es de un 80% respecto a la original. A 50°C y tras un período de 24 horas la actividad en la enzima silvestre es de un 70%, por un 90% en el mismo período en la mutante. Finalmente, en un período de 24 horas en incubación a 40°C, la actividad de la enzima silvestre es de un 90%, mientras que en la mutante no hay un descenso de actividad apreciable.

En el caso de la vida media, la proteína silvestre presenta una vida media de 0.17 y 2.42 horas a 70°C y 60°C respectivamente, mientras que para la proteína mutante la vida media es de 0.28 y 7.93 horas para esas mismas temperaturas (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación de las vidas medias (horas) a diferentes temperaturas de la α -galactosidasa asilvestre de *S. cerevisiae* y su mutante R412L purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Temperatura (°C)	Proteína Silvestre	Proteína mutante
50	35.74	65.48
60	2.422	7.93
70	0.17	0.28

Como ya se ha mencionado previamente, muchas de las aplicaciones de esta enzima, especialmente en la industria alimentaria, requieren que la enzima sea termoestable (Rezessy-Szabo, 2007), por lo que el mutante R412L de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* puede ser de gran interés en tales procesos al aumentar su termoestabilidad.

4.3.3. Determinación del pH óptimo

El pH óptimo de la enzima silvestre y del mutante R412L fue determinado realizando los ensayos enzimáticos en un rango de pH entre 2.07 y 8.0 (Figura 10).

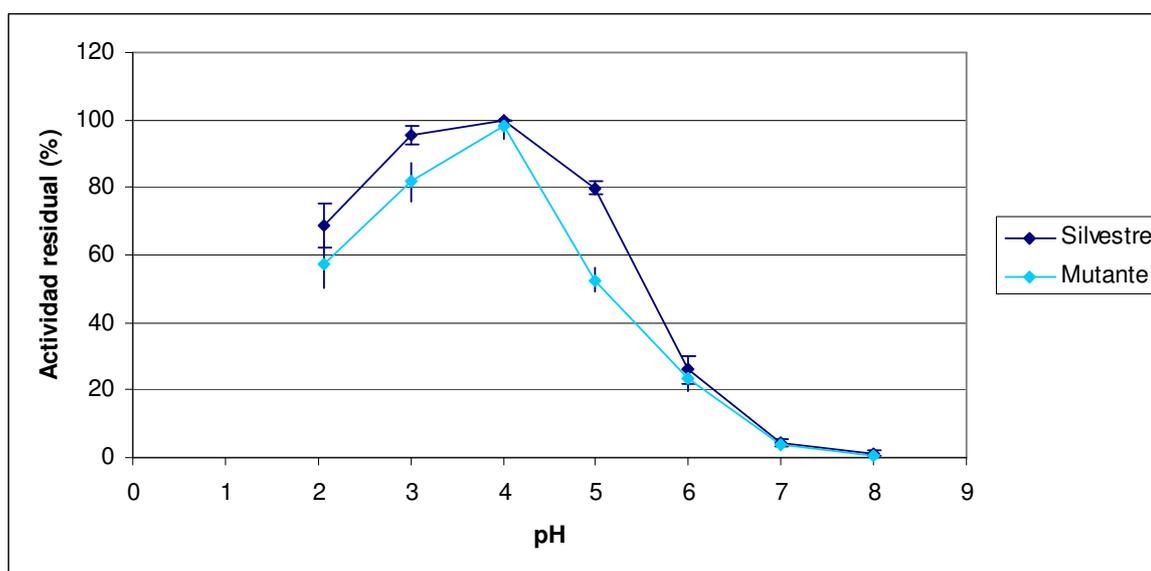


Figura 10. Determinación del pH óptimo de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* (azul oscuro) y la α -galactosidasa mutante R412L (azul claro) purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Como se puede observar (Figura 10), el pH óptimo de la enzima es de 4, tanto en la forma silvestre como en la mutante. Este dato en el caso de la enzima silvestre confirma resultados anteriores (Dey y Pridham 1972; Murphy y Power 2002; Fernández-Leiro, 2011). La mutación, no parece alterar el pH óptimo de la enzima.

4.3.4. Determinación de la estabilidad a diferentes pHs

Para determinar la estabilidad de la enzima a diferentes pHs, se realizaron medidas de la actividad enzimática tras distintos períodos de incubación en determinadas condiciones de pH (Figura 11 y 12). Cuando la enzima se incubó a pH 2.07, se observó un 85% de actividad en la enzima mutante tras un período de 2 horas, mientras que era de un 75% en

la enzima silvestre en ese mismo período. Se obtuvieron resultados similares en el caso de la incubación a pH 3.0. Cuando la enzima se incubó a pH 4.0 la enzima silvestre mostraba un 75% de actividad tras 52 horas, siendo de un 90% en ese mismo tiempo en la enzima mutante. La incubación a pH 5.0 tuvo como resultado un ligero descenso en la actividad de la enzima mutante hasta un 95% de actividad en 52 horas, siendo el descenso ligeramente mayor en la silvestre hasta un 90% de actividad. Por último, tras 52 horas de incubación a pH 6.0 no se encontraron diferencias en la actividad respecto a la inicial, tanto en el caso de la enzima silvestre como en la mutante.

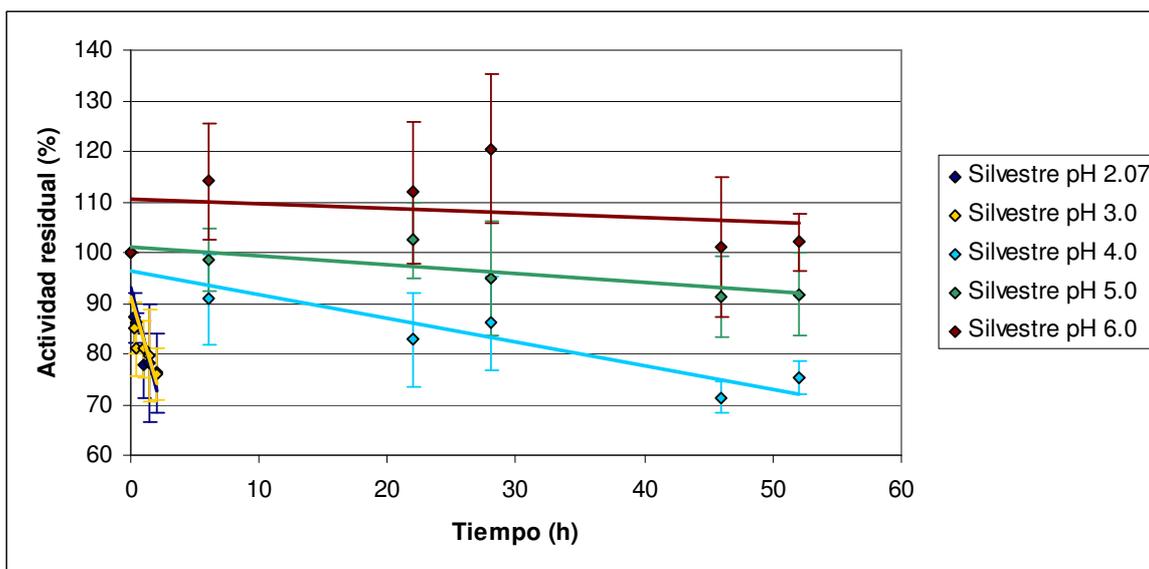


Figura 11. Determinación de la estabilidad a diferentes pHs de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad.

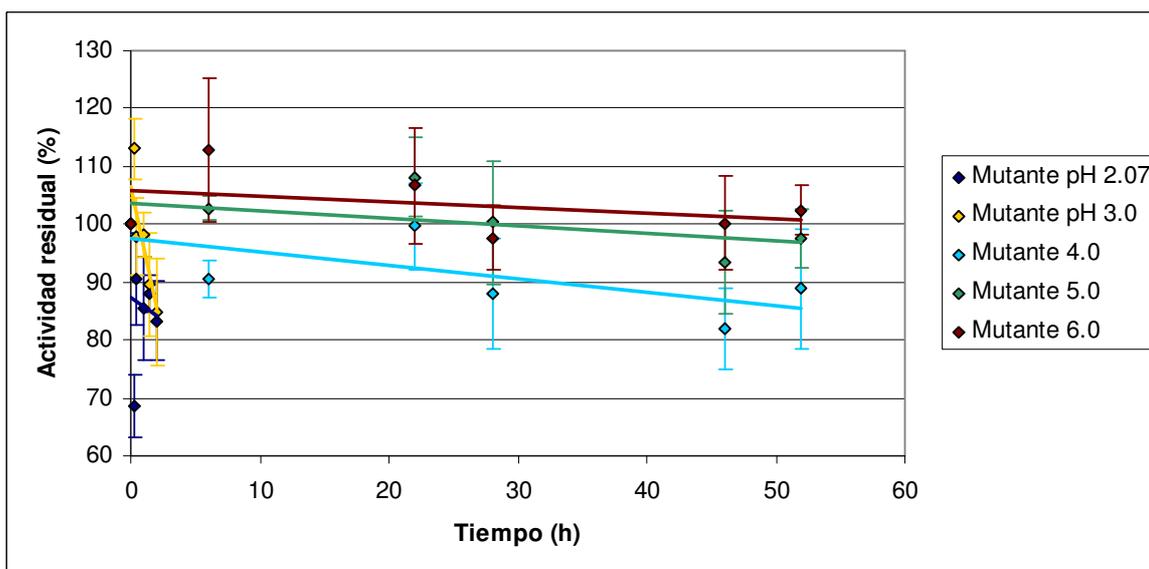


Figura 12. Determinación de la estabilidad a diferentes pHs de la α -galactosidasa mutante R412L de *S. cerevisiae* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad.

La vida media de la proteína mutante incubada a diferentes pHs (2.07, 3, 4, 5) es mayor que la obtenida para la proteína silvestre (Tabla 2). Por lo que la mutación R412L de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* no sólo tiene efecto en la termoestabilidad si no que también incrementa la estabilidad a diferentes pHs.

Tabla 2. Determinación de las vidas medias (horas) a diferentes pHs de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* y su mutante R412L purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad.

pH	Proteína Silvestre	Proteína mutante
5	287.87	408.90
4	99.09	205.38
3	4.77	5.38
2.07	4.26	22.58

5. CONCLUSIONES

1.- Se han construido dos plásmidos que presentan el gen que codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* portando la mutación R412L fusionado a diferentes secuencias (la secuencia codificadora para una cola de 6 histidinas por una parte y la secuencia codificadora para el péptido FLAG por otra).

2.- Se ha conseguido purificar tanto la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* como su mutante R412L mediante cromatografía de afinidad y cromatografía de inmunoafinidad. Siendo esta última la que ha mostrado un mayor grado de pureza en geles de SDS-PAGE.

3.- La enzima purificada mediante cromatografía de afinidad presenta una temperatura óptima de 50°C, tanto para su forma silvestre como su mutante R412L. Sin embargo, la enzima purificada por cromatografía de inmunoafinidad presenta una temperatura óptima de 40°C para la enzima silvestre, mientras que para la mutante es de 60°C.

4.- La cola de Histidinas que se añade al extremo carboxilo Terminal de la proteína para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad puede estar produciendo algunos cambios conformacionales en la enzima provocando modificaciones en su temperatura óptima.

5.-El mutante R412L de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* presenta una vida media más elevada y es más termoestable que la proteína silvestre a todas las temperaturas ensayadas (40°C, 50°C, 60°C y 70°C).

6. Mientras que el pH óptimo de la α -galactosidasa silvestre de *S. cerevisiae* y su mutante R412L es de 4, la vida media de la proteína mutante incubada a diferentes pHs (2.07, 3, 4, 5) es mayor que la obtenida para la proteína silvestre.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Argueso J, Carazzolle M & Mieczkowski P (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome research* 19(12), 2258–70.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.

Cantarel B, Coutinho P, Rancurel C, Bernard T, Lombard V & Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research* 37(Database issue): D233-8.

Dey P & Pridham J. (1972). Biochemistry of α -galactosidases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 36: 91-130..

Di Stefano M, Miceli E, Gotti S, Missanelli A, Mazzocchi S & Corazza G (2007). The effect of oral alpha-galactosidase on intestinal gas production and gas-related symptoms. *Digestive Diseases Sciences* 52(1): 78-83.

Eneyskaya E, Golubev A, Kachurin A, Savel'ev & Neustroev K (1997). Transglycosylation activity of alpha-D-galactosidase from *Trichoderma reesei*. An investigation of the active site. *Carbohydrate research* 305(1): 83-91.

Fernández-Leiro R (2011) Structural Characterization and Directed Evolution of an α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Fernandez-Leiro R, Pereira-Rodriguez A, Cerdan M, Becerra M & Sanz-Aparicio J (2010) Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-galactosidase and its complexes with natural substrates reveals new insights into substrate specificity of GH27 glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*. 285(36): 28020-33.

Gao Z & Schaffer A (1999) A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiology* 119, 979–987.

Garman S (2006). Structural studies on α -GAL and α -NAGAL: The atomic basis of Fabry and Schindler diseases. *Biocatalysis and Biotransformation* 24 (1-2): 129-36.

Garman S & Garboczi D (2004). The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *Journal of Molecular Biology* 337(2): 319-35.

Gonzalez-Blasco G, Sanz-Aparicio J, Hermoso J & Polaina J (2000). Directed evolution of beta -glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 275(18): 13708-12.

Kim S, Kim J, Lee Y, Kim J & Park S (2009). Process for manufacturing tagatose using soy oligosaccharide. WO Patent: WO2009096693.

Lazo P, Ochoa A & Gascon S (1977). Alpha-Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localization, and purification of the external enzyme. *European Journal of Biochemistry* 77(2): 375-82.

Liljestrom-Suominen P (1985). The nucleotide sequence of the yeast MEL1 gene. *Nucleic acids research* 12(20).

Makowski K, Bialkowska A, Szczesna-Antczak M, Kalinowska H, Kur J, Cieśliński H & Turkiewicz M (2007). Immobilized preparation of coldadapted and halotolerant Antarctic beta-galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. *FEMS Microbiology Ecology* 59(2):535-42

Murphy R & Power R (2002). Expression of an alpha-galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (2): 97-102

Nakai H, Baumann M, Petersen B, Westphal Y, Hachem M, Dilokpimol A, Duus J, Schols H & Svensson B (2010). *Aspergillus nidulans* alpha-galactosidase of glycoside

hydrolase family 36 catalyses the formation of alpha-galacto-oligosaccharides by transglycosylation. The FEBS journal 277(17): 3538-51.

Podar M & Reysenbach A (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. Current Opinion in Biotechnology, 17(3):250–5.

Post-Beittenmiller M, Hamilton R & Hopper J (1984). Regulation of basal and induced levels of the MEL1 transcript in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Cell Biology 4(7): 1238-45.

Reetz M, Carballeira, J. D. & Vogel A (2006). Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. Angewandte Chemie International Edition 45(46): 7745-51.

Reetz M, Soni P, Acevedo J & Sanchis J (2009). Creation of an amino acid network of structurally coupled residues in the directed evolution of a thermostable enzyme. Angewandte Chemie International Edition 48(44): 8268-72.

Rezessy-Szabo J, Nguyen Q, Hoschke A, Braet C, Hajos G & Claeysens M (2007). A novel thermostable alpha-galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: purification and characterization. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology 1770(1): 55-62.

Sakuraba H, Chiba Y, Kotani M, Kawashima I, Ohsawa M, Tajima Y, Takaoka Y, Jigami Y, Takahashi H, Hirai Y, Shimada T, Hashimoto Y, Ishii K, Kobayashi T, Watabe K, Fukushige T & Kanzaki T (2006). Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human alpha-galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. Journal of Human Genetics 51(4): 341-52.

Sambrook J., Fritsch EJ. & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.

Sumner-Smith M, Bozzato R, Skipper N, Davies R & Hopper J (1985). Analysis of the inducible MEL1 gene of *Saccharomyces carlsbergensis* and its secreted product, alpha-galactosidase (melibiase)." Gene 36(3): 333-40.

Takakuwa N, Tamura M, Ohnishi M & Oda Y (2006). Sequence analysis of the α -galactosidase MEL gene governing the efficient production of ethanol from raffinose-rich molasses in the yeast *Lachancea thermotolerans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(4): 587-91.

Wrede P & Schneider G (1994). *Concepts in protein engineering and design*, Walter de Gruyter.

Yoshimitsu M, Higuchi K, Fan X & Takao S (2010). Sequencing and characterization of the porcine α -galactosidase A gene: towards the generation of a porcine model for Fabry disease. *Molecular Biology Reports* 38(5):3145-52.

Zavodszky M, Chen C, Huang J, Zolkiewski M, Wen L & Krishnamoorthi R (2001). Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Science* 10(1): 149-60.

Zhao H, Lu L, Xiao M, Wang Q, Lu Y, Liu C, Wang P, Kumagai H & Yamamoto K (2008). Cloning and characterization of a novel alphagalactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal α -1,4 linkage. *FEMS Microbiology letters* 285(2): 278-83.