



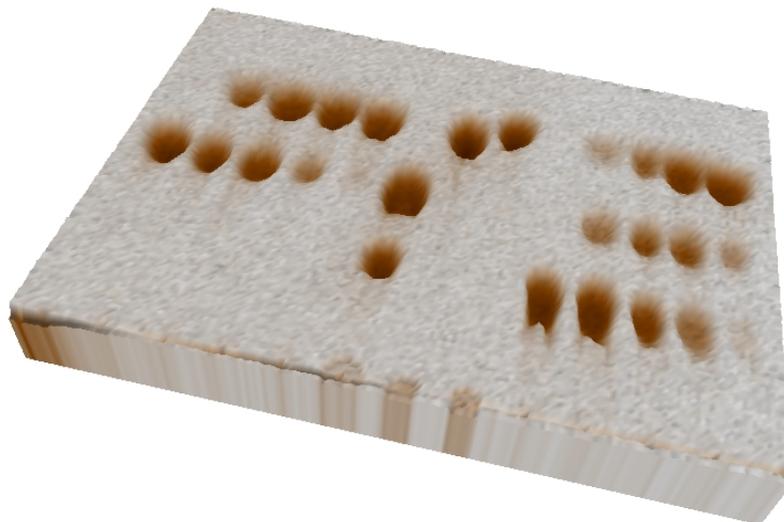
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

**Caracterización e aplicación biotecnolóxica da enzima
 α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Caracterización y aplicación biotecnológica de la enzima
 α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Characterization and biotechnological application of α -
galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*.**



María E. Álvarez Cao

TRABAJO FIN DE MASTER

D/Dna. Manuel Becerra Fernández autorizo la presentación del Trabajo de Fin de Máster: **Caracterización y aplicación biotecnológica de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*** presentado por la alumna Dña. **M^a Efigenia Álvarez Cao**, estudiante del Máster en Biología Molecular, Celular y Genética, para su defensa ante el tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 de Xullo de 2014

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

Este trabajo no sería posible sin el apoyo incondicional de todos los que forman parte del grupo de Bioquímica, gracias por despertar en mí el interés por la investigación.

En especial, dedicado a mi querido y amado *Grande* por enseñarme a disfrutar y apreciar las pequeñas cosas de cada día, tu recuerdo permanecerá siempre presente en mi corazón. Y a los dos soles de mi vida, Anxo y Breixo, una esperanza nueva para un mundo mejor.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A:	Absorbancia
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADH2:	Alcohol deshidrogenasa 2
APS:	Persulfato amónico
α -Gal:	α -Galactosidasa
CM-TRP:	Medio Completo sin triptófano
DTT:	Ditiotreitol
EC:	Código de clasificación de enzimas
EDTA:	Ácido etilendiamino tetra-acético
Gal:	Galactosa
Gal ¹ Man ₃ :	6 ¹ -mono- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manotriosa
Gal ^{3,4} Man ₅ :	6 ³ , 6 ⁴ -di- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manopentosa
GH:	Glucósido Hidrolasa
Glc:	Glucosa
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance Liquid Chromatography</i>)
IUPAC:	Unión internacional de química pura y aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
IUBMB:	Unión internacional de bioquímica y biología molecular (<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)

Kb:	Kilobase
KDa:	KiloDalton
LBA	Medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i> con ampicilina
M:	Molar
Man:	Manosa
OD:	Densidad óptica (<i>Optical Density</i>)
ORF:	Pauta de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PEG:	Polietilenglicol
PNPG:	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-galactopiranosido
RFOs:	Oligosacáridos de la familia de la rafinosa (<i>Raffinose family oligosaccharides</i>)
rpm:	Revoluciones por minuto
ScAGAL:	α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCP:	Proteína de origen unicelular (<i>Single Cellular Protein</i>). Complemento alimenticio proteico obtenido de cultivos de microorganismos
SDS:	Dodecil sulfato sódico
TE:	Tris-EDTA
TEMEZ:	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TLC:	Cromatografía de capa fina (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
U:	Unidad enzimática
YNB:	Base nitrogenada para levaduras (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)

Introducción	Pág.
1. α -GALACTOSIDASAS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS	1
2. α -GALACTOSIDASA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1. Producción y propiedades físico-químicas	3
2.2. Estudio de la especificidad de sustrato	4
3. UNA HERRAMIENTA ÚTIL: CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	6
Objetivos	9
Materiales y Métodos	
1. MATERIAL BIOLÓGICO	11
2. VECTOR DE EXPRESIÓN	11
3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	12
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	14
4.1. Introducción de ADN en bacterias y levaduras	14
4.1.1. Preparación de bacterias competentes	14
4.1.2. Transformación de bacterias	14
4.1.3. Extracción de ADN plasmídico bacteriano	15
4.1.4. Transformación de levaduras	15
4.2. Manipulación enzimática de proteínas: desglucosilación con endoglicosidasa H	16
5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	16
5.1. Electroforesis de AND en geles de agarosa	16
5.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
5.3. Electroforesis de proteínas bajo condiciones no desnaturizantes.	17
6. TÉCNICAS PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	18
6.1. Concentración del medio extracelular	18
6.2. Cromatografía de afinidad Níquel-Sepharosa	18
6.3. Concentración de la proteína purificada	19

7. TÉCNICAS ANALÍTICAS	19
7.1. Medida de la concentración proteica: Método de Bradford	19
7.2. Determinación de la actividad α -galactosidasa	19
7.3. Caracterización de la especificidad de sustrato	20
7.3.1. Hidrólisis enzimática de glucósidos con α -Gals	21
7.3.2. Hidrólisis enzimática de glucósidos con β -manosidasa y ScAGal	21
7.3.3. Determinación de la actividad α -galactosidasa para los sustratos melibiosa, rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo	21
7.3.3.1. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico	22
7.3.3.2. Método Glucosa-Oxidasa	22
7.3.4. Cromatografía de capa fina (TLC)	23
7.3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	24
Resultados y Discusión	
1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE SCAGAL	26
1.1. Seguimiento de la secreción de ScAGal al medio extracelular	26
1.2. Purificación y formas moleculares de la ScAGal	27
2. CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO POR LA SCAGAL	28
2.1. Actividad α -galactosidasa	28
2.2. Análisis de los productos de hidrólisis	28
3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA HIDRÓLISIS DE SUSTRATOS POR LA SCAGAL Y LAS A-GALS DE <i>A. NIGER</i> Y <i>C. TETRAGONOLOBA</i>	31
Conclusiones	34
Bibliografía	37

INTRODUCCIÓN

1. α -galactosidasas y sus aplicaciones biotecnológicas

Las α -galactosidasas o melibiasas pertenecen al amplio grupo de las glucósido hidrolasas o carbohidrasas que presentan la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico de los diferentes azúcares, los carbohidratos. Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes de la materia viva y representan una gran parte de la fuente de carbono de la biosfera y por lo tanto, también pueden llegar a ser una fuente importante de energía renovable. Las α -galactosidasas se clasifican según los Comités de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUBM bajo el código numérico EC 3.2.1.22, donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glicosídico, y el cuarto indica el tipo de sustrato. Una clasificación complementaria a la anterior, es la de Henrissat y colaboradores, disponible en internet en el servidor CAZy (*Carbohydrate Active enZymes*) que las diferencia en las familias GH4, GH27, GH36, GH57, GH97 y GH100 (Henrissat, 1991; Henrissat *et al.*, 1993).

La α -galactosidasa (α -Gal) cataliza la hidrólisis de residuos de galactosa unidos por enlaces $\alpha(1,6)$ glicosídicos de oligosacáridos sencillos como la melibiosa, rafinosa y estaquiosa, y de galactomananos poliméricos que son polímeros de manosas con ramificaciones de galactosas. Estos oligosacáridos se encuentran en las vacuolas de la mayoría de los vegetales, como son principalmente, la caña de azúcar y la remolacha azucarera, o la soja y derivados de leguminosas, productos muy utilizados tanto en alimentación humana como animal.

La actividad catalítica de la α -Gal posee gran interés biotecnológico porque puede ser aplicada en numerosos sectores industriales.

Industria Azucarera. La actividad α -Gal es principalmente usada en la elaboración del azúcar de mesa y el caramelo para mejorar la cristalización de la sacarosa al permitir la hidrólisis de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) presentes en la materia prima, que puede ser la caña de azúcar o la remolacha azucarera. Otra aplicación en esta área es la síntesis enzimática de ciertos azúcares a través de la reacción reversa de la enzima (reacción de transglicosilación) como la obtención de tagatosa a partir de oligosacáridos de la soja, un monosacárido natural, con mayor poder edulcorante y menos calórico que la sacarosa, que se utiliza como edulcorante funcional (Kim *et al.*, 2009).

Suplemento alimenticio. La mayoría de los mamíferos carecen de α -Gal pancreática, de manera que los carbohidratos complejos presentes en muchos alimentos no pueden ser digeridos en el sistema digestivo y son fermentados por la microflora intestinal

produciendo gases que generan flatulencia y otros desórdenes de mayor orden. Aunque no está demostrado científicamente el efecto del enzima tras su ingesta, sí su potencial beneficioso, se están comercializando comprimidos que contienen α -Gal del hongo *Aspergillus niger*, como es el caso del suplemento alimenticio BEANO-UTM Medical Group (Levine B. *et al.*, 2004). La empresa BIO-CAT (Virginia, EEUU) comercializa α -Gal de *A. niger* como suplemento líquido para alimentación animal que permite aumentar el aprovechamiento energético de los piensos.

Aditivo alimentario. Los galactomananos son añadidos a muchos productos porque permiten modificar su textura y consistencia sin afectar a las características propias del mismo. La eliminación de residuos de galactosa de estos polisacáridos o “gomas” mejora sus propiedades de gelificación, lo que amplía su uso no sólo como aditivos alimentarios, sino también en cosmética y farmacia (Oliva M. *et al.*, 2010; Simila *et al.*, 2010).

Sector bioenergía. Los productos de desecho agrícolas, como las melazas de la industria azucarera y derivados de la industria de las legumbres, suponen un problema medioambiental debido a su elevada degradación y contaminación. Uno de los campos de aplicación con mayor futuro y rentabilidad es su degradación acoplada a la producción de bioetanol, donde Brasil destaca como país pionero y de mayor producción, (Argueso JL. *et al.*, 2009). El bioetanol presenta un abanico de posibilidades de uso, como biocombustible, en desinfectantes sanitarios, en productos cosméticos y en la producción de bebidas alcohólicas. El uso de α -Gal puede mejorar la utilización de estos productos biodegradables empleados como materia prima para la producción de etanol y/o biomasa (SCP) a través de la fermentación alcohólica llevada a cabo por *S. cerevisiae* (Takakuwa *et al.*, 2006).

Sector farmacéutico. Una de las aplicaciones farmacológicas de α -Gal más importante es el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Fabry, trastorno de almacenamiento lisosomal hereditario ligado al cromosoma X, causada por mutaciones en el gen que codifica para la enzima α -Gal A, que conlleva a la acumulación de glicoesfingolípidos (globósidos, galabiosilceramida y isoglobósidos). La terapia de reemplazo de la enzima está aceptada pero su eficacia es discutida y se están estudiando nuevas estrategias como el uso de chaperonas para estabilizar la α -Gal A y la reducción de glicoesfingolípidos (Yu Y. *et al.*, 2014; Porubsky S. *et al.*, 2014). También, es de gran interés para la industria farmacológica la posibilidad de conversión entre grupos sanguíneos ABO, donde es determinante las diferencias estructurales de los polisacáridos presentes en la superficie de los eritrocitos. Algunas α -Gals de plantas pueden eliminar los

residuos de galactosa terminal unidos por enlaces $\alpha(1,3)$ de donantes de sangre tipo B para generar sangre de tipo serológico O (Zhu *et al.*, 1994; Singh N. *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta todas las virtudes atribuidas a la actividad de la α -Gal, y dado que muchas de las aplicaciones están relacionadas con el procesamiento de alimentos, es de esperar que el organismo productor de enzima debe ser seguro o GRAS (*Generally Recognized As Safe*), como lo es *Saccharomyces cerevisiae*. Así pues, uno de los objetivos principales de este trabajo es determinar la habilidad de la α -Gal de *S. cerevisiae* producida por una cepa de *S. cerevisiae* recombinante para hidrolizar RFOs muy útil en la industria alimentaria y en la elaboración de piensos.

2. α -Galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

La α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (EC 3.2.1.22) pertenece a la familia GH27 y es transcrita por el gen *MEL1* que contiene 1413 pb que codifican para una proteína de 471 aminoácidos. La proteína atraviesa una ruta de secreción donde es altamente glicosilada y dirigida a la membrana extracelular gracias a la presencia de un péptido señal de 18 aminoácidos en su extremo amino terminal. Una vez secretada, se acumula en el espacio periplasmático y finalmente difunde al medio extracelular en diferentes cantidades dependiendo de las condiciones de cultivo, de tal manera, que la forma intracelular corresponde a un estado de la proteína asociada a las membranas. Al ser una enzima extracelular facilita su producción y purificación sin necesidad de dañar las células, las cuales pueden ser utilizadas para otros fines como la producción de biomasa (SCP).

2.1. Producción y propiedades físico-químicas

En trabajos previos en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña una α -galactosidasa recombinante de *S. cerevisiae* (ScAGAL) expresada en una cepa de *S. cerevisiae* mostró una actividad total entre 10-20 U/ml y una actividad extracelular de 3.4-7.8 U/ml durante las 36-54 horas de cultivo llegando a alcanzar valores en torno a 32 U/ml y 18.7 U/ml, respectivamente, en fases más tardías de crecimiento (Fernández-Leiro R., 2011). Teniendo en cuenta que la cantidad de enzima que libera la célula al exterior está muy influenciado por el ambiente extracelular que la rodea, en este trabajo se llevó a cabo un seguimiento del cultivo de la cepa recombinante que expresa la ScAGal como paso previo a la purificación de la proteína para alcanzar la mayor producción

de enzima, en términos de unidades de actividad enzimática, necesaria para su estudio de especificidad por sustrato.

El pH óptimo de la enzima es 4 pero es estable en un rango de 2–7.5, la temperatura óptima es 40°C y presenta cierta termoestabilidad con una vida media de 14 horas a 50°C, de 30 minutos a 60°C y de tan solo 5 minutos a 70°C (Fernández-Leiro R., 2011). Tanto el pH como la temperatura son variables importantes a tener en cuenta durante los procesos biotecnológicos, altas temperaturas (65-70°C) son necesarias en tratamientos como la pasteurización de la leche de soja, el refinado del azúcar o la producción de piensos, por eso supone una ventaja añadida que la enzima sea termoestable. Existen procedimientos documentados que pueden mejorar esta condición como es la inmovilización de enzimas y que se plantean para la mejora de la características de la ScAGAL pero que no se tratan en este trabajo (Makowski *et al.* 2006; Lee J. *et al.*, 2013; Singh N. *et al.*, 2014; Abo-Elmagd H. I., 2014). Estudios de inhibición muestran que la ScAGAL es sensible a concentraciones de 1 mM de sales de los metales Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} y presenta inhibición competitiva por azúcares como la galactosa, glucosa y melibiosa (Fernández-Leiro R., 2011).

La ScAGAL posee mayor afinidad por el sustrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG), seguido de los sustratos naturales melibiosa y rafinosa, y exhibe una eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) mas alta por la melibiosa que por la rafinosa (Fernández-Leiro R. *et al.*, 2010). Actualmente, los estudios de caracterización de α -Gals reportan datos cinéticos no sólo para el PNPG y otros sustratos sintéticos, sino también para rafinosa, estaquiosa y galactomananos, (Fialho Lda S. *et al.*, 2008; Singh N.1. *et al.*, 2012; Katrolia P. *et al.*, 2012; Du F. *et al.*, 2013; Du F. *et al.*, 2014). Aunque en este trabajo no se incorporan datos de la cinética enzimática de los sustratos ensayados, es necesario añadir el interés por completar dichos parámetros.

2.2. Estudio de la especificidad de sustrato

La ScAGAL rompe los enlaces galactosil terminales del sustrato sintético PNPG y los oligosacáridos naturales como la melibiosa, rafinosa y estaquiosa (Tabla 1). Sin embargo, para una mejor caracterización de la enzima, es necesario utilizar otros sustratos con uniones galactosa en otras posiciones, como son los galactomano-oligosacáridos. La preparación y obtención de galactomano-oligosacáridos a partir de galactomananos complejos de origen natural es complicada y a menudo se necesita recurrir a la actividad de otras enzimas, las β -mananasas (Kasukabe I. *et al.*, 1986). Los galactomano-oligosacáridos están formados por

una cadena principal de β -1,4-D-manosas unidos a residuos α -D-galactosil a través de la posición O-6 (OH- del carbono 6 de la hexosa). Hay varios trabajos que reportan estudios de especificidad de sustrato de α -Gals utilizando galactomanosacáridos como Gal³Man₃ (6³-mono- α -D-galacto-piranosil- β -1,4-manotriosa) y Gal¹Man₄ (6³-mono- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manotetraosa) por aportar un residuo de galactosa unido al extremo no reductor y una galactosa unida en posición interna de la cadena principal del oligosacárido, respectivamente (Kaneco R. *et al.*, 1990; Kaneco R. *et al.*, 1991; Shibuya H. *et al.*, 1995; Yoshida S. *et al.* 1997; Wook-Dong K. *et al.* 2003). De tal manera, que las α -Gals son clasificadas en tres grupos en función de su especificidad de sustrato, un primer grupo que liberan la galactosa que ataca a la manosa no reductora pero no liberan los residuos de galactosa internos; un segundo grupo que liberan residuos unidos a posiciones internas pero no residuos terminales; y un tercer grupo que libera tanto residuos internos como terminales. Las α -Gals de levaduras eliminan el residuo de galactosa terminal pero es incapaz de hidrolizar galactosas que atacan a residuos de manosa internos de oligosacáridos y galactomananos, (Yoshida S. *et al.* 1997). Sin embargo, no está documentado que puedan hidrolizar la galactosa terminal unida a la manosa reductora de galactomanosacáridos, por ello, el objetivo principal de este trabajo es la caracterización de los productos de hidrólisis liberados por la ScAGAL de galactomanosacáridos para confirmar el grupo al que pertenece. Por otro lado, como se puede apreciar en las referencias aportadas, hay muchos estudios sobre α -Gals de diferentes orígenes, por lo que surgió un interés por localizar aquellas disponibles en el mercado para realizar un análisis comparativo con la ScAGAL. Las más accesibles fueron, la α -Gal de *Aspergillus niger*, que libera residuos de galactosas internos pero no terminales, y la α -Gal de *Cyamopsis tetragonoloba* (planta de guar), que actúa sobre el galactomanano de guar (Kaneco R. *et al.*, 1991; Overbeeke N. *et al.*, 1990).

La dificultad de obtener galactomanosacáridos con uniones a galactosa en las posiciones de interés, conlleva a recurrir a la actividad de enzimas como la β -manosidasa, para hidrolizar previamente otros galactomanosacáridos (Kasukabe I. *et al.*, 1990). La β -manosidasa de *Helix pomatia* es una glicosidasa que hidroliza los enlaces β (1-4) de residuos D-manosil de galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos. En concreto participa en la eliminación de la manosa del extremo no reductor de β -1,4-mano-oligosacáridos hasta alcanzar un punto de ramificación, por lo tanto, no puede hidrolizar el enlace con un residuo D-galactosil (McCleary *et al.* 1981, McCleary 1982). Los galactomanosacáridos utilizados en este trabajo, Gal¹Man₃ (6¹-mono- α -D-galacto-piranosil- β -1,4-manotriosa) y Gal¹Man₅

(6³,6⁴-di- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manotetraosa), necesitaron ser tratados previamente con la β -manosidasa de *Helix pomatia* para poder obtener un sustrato con una galactosa en la posición no reductora de la cadena principal (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura de los sustratos susceptibles de hidrólisis de α -Gals y β -manosidasa

SUSTRATO	ESTRUCTURA	ENLACES HIDROLIZADOS
α -PNPG	α -D-Gal-1- <i>p</i> -nitrofenol	Gal – PNP ↑
Melibiosa	α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc	Gal – Glc ↑
Rafinosa	α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru	Gal – Glc – Fru ↑ ↑
Estaquirosa	α -D-Gal-(1,6)- α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru	Gal – Gal – Glc – Fru ↑ ↑
Gal ¹ Man ₃	Gal α 1 ↓ 6 Man β 1-4Man β 1-4Man	Gal → M – M – M ↑ ↑
Gal ^{3,4} Man ₅	Gal α 1 Gal α 1 ↓ ↓ 6 6 Man β 1-4Man β 1-4Man β 1-4Man β 1-4Man	Gal Gal → → M – M – M – M – M ↑

→ Enlaces hidrolizados por α -Gal M: Manosa reductora del galactomanosacárido
 → Enlaces hidrolizados por β -manosidasa M: Manosa no reductora del galactomanosacárido

3. Una herramienta útil: cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) es una de las primeras técnicas cromatográficas utilizadas que está recuperando su interés por ser una técnica simple, rápida y barata que ofrece la posibilidad de observar todos los componentes de una reacción de hidrólisis o síntesis de productos siempre que éstos puedan ser separados (Ishiguro M. *et al.*, 2001; Li S. *et al.*, 2007; Singh N. *et al.*, 2012; Katrolia P. *et al.* 2012). Además de permitir el seguimiento de las reacciones por la aparición de productos y desaparición del sustrato, es posible el tratamiento de varias muestras al mismo tiempo.

La TLC consiste en tres pasos, colocación del punto de la muestra mediante un capilar en un extremo de la placa de gel de sílice (fase estacionaria, muy polar), desarrollo a través de un sistema solvente volátil donde el desplazamiento de los componentes de la muestra es inversamente proporcional a su polaridad, y finalmente, el revelado para detectar las manchas o *spots* que corresponden a los componentes de la muestra. Una vez revelado, podemos determinar el valor de R_f (coeficiente de reparto) como la distancia recorrida por la sustancia dividida por la distancia recorrida por el disolvente, que representa la posición de un compuesto. En algunos casos, es recomendable un pre-equilibrado de la placa en el sistema

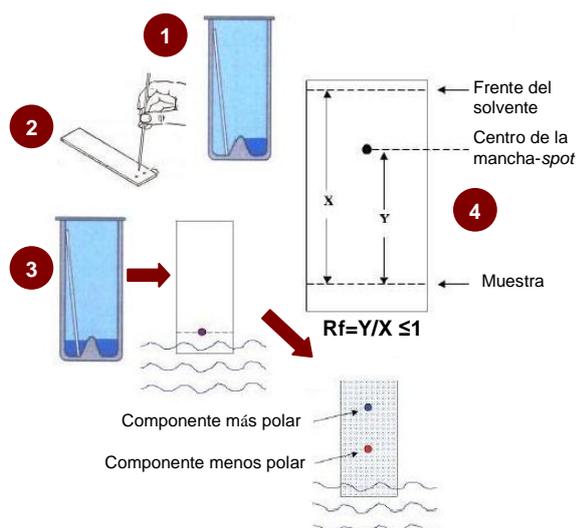


Figura 1: Representación esquemática del análisis por TLC. 1. Pre-equilibrado de la placa, 2. Aplicación de las muestras, 3. Desarrollo del sistema, 4. Revelado y cálculo de los Rf. Imagen modificada (Manucci F., 2009).

solvente antes de la colocación de las muestras para reproducir los resultados que alargaría el proceso cromatográfico (Figura 1). La dificultad que atañe a este tipo de técnica, es que algunos componentes pueden presentar polaridades similares apareciendo bajo el mismo punto. Si se utiliza un disolvente de desarrollo demasiado polar, todos los componentes en la mezcla se moverán junto con el disolvente (Rf demasiado grande) y si su polaridad es demasiado baja no se mueven lo suficiente (Rf demasiado pequeño), en cualquiera de los dos casos, los componentes de la muestra no se separarán bien. Las mezclas de carbohidratos pueden ser separadas a través

de diferentes sistemas de solventes como 1-propanol-nitrometano-agua, cloroformo-metanol-agua o 1-propanol-ácido acético-agua, utilizados como fase móvil, y posteriormente ser detectados por revelado con diferentes combinaciones de ácido sulfúrico concentrado y alcoholes (Kaneco R. *et al*, 1990; Kaneco R. *et al*, 1991; Shibuya H. *et al.*, 1995; Yoshida S. *et al* 1997; Wook-Dong K. *et al.* 2003; Singh N.L. *et al.*, 2012; Katrolia P. *et al.*, 2012). Este trabajo pretende optimizar el sistema solvente y revelador utilizado en el análisis por TLC que aporte resultados satisfactorios en términos de resolución y movilidad de los productos detectados, y ausencia de artefactos provocados por el revelado de las placas. Todos los autores mencionados utilizan la TLC como método cualitativo para la caracterización de los sustratos ensayados pero también podría ser posible su semicuantificación o cuantificación mediante la preparación de soluciones de patrones de concentración conocida y utilizando programas informáticos. Esto podría tener gran interés en estudios de transglucosilación donde se facilitaría el análisis del número de muestras experimentales para finalmente determinar las condiciones óptimas de producción de α -galacto-oligosacáridos (α -GOS). En este trabajo, se ha utilizado esta técnica sólo como método cualitativo de la especificidad de sustrato de la ScAGAL y comparativo utilizando otras α -Gals disponibles en el mercado, los casos de cuantificación se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

OBJETIVOS

En el presente Proyecto Fin de Máster se proponen los siguientes objetivos:

- I. Producción y purificación de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de obtener la mayor cantidad de proteína purificada para llevar a cabo el estudio de caracterización de sustratos.
- II. Caracterización mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando los galactosacáridos naturales melibiosa, rafinosa y estaquiosa, y el galacto-oligosacárido complejo, galactomanano de algarrobo.
- III. Estudio comparativo de especificidad de sustrato con otras α -galactosidasas disponibles en el mercado, la α -galactosidasa de *Aspergillus Níger* y la α -galactosidasa de *Cyamopsis tetragonoloba*, mediante análisis de los productos de hidrólisis por TLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

El plásmido recombinante, formado por el vector de expresión YEpFlag-1 (*Eastman Kodak Company*) en el que se le integró el gen *MEL1* que codifica la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGAL) (Fernández-Leiro R. *et al.*, 2010), fue necesario transformarlo y amplificarlo en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* XL-Blue con genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]* (*Stratagene Cloning Systems*). El hospedador utilizado como sistema de expresión de proteínas fue la cepa de la levadura *S. cerevisiae* BJ3505, genotipo: *pep4:: HIS3, prb- Δ 1.6R HIS3, lys2-208, trp1- Δ 101, ura 3-52, gal2, can1* (*Eastman Kodak Company*).

Las bacterias transformadas con el plásmido se conservaron a 4°C en placas Petri con medio de cultivo LB (*Luria-Bertani*) suplementado con ampicilina (ver apartado 3) para la selección de las colonias transformantes. Las levaduras se conservaron también a 4°C, la cepa silvestre en placas con medio de cultivo YPD (ver apartado 3) y las recombinantes, en medio de cultivo CM-TRP (Medio Completo sin triptófano, ver apartado 3) porque la cepa es auxótrofa para el aminoácido triptófano y el vector utilizado presenta el marcador de selección *TRP*. En el caso de las levaduras, tanto silvestres como recombinantes, se llevaron a cabo resiembras periódicas cada 30 días y también se almacenaron a -80°C en viales de cultivo líquido con 50% de glicerol.

2. Vector de expresión

El vector de expresión de levaduras YEpFlag-1, [*ampr ori 2 μ FLAG TRP1*], (*Eastman Kodak Company*), digerido con las enzimas de restricción *Nru I* y *Bgl II*, fue utilizado para clonar por recombinación homóloga, la ORF completa del gen *MEL1* fusionada a una secuencia de 6 histidinas (6His) en su extremo carboxilo terminal (Fernández-Leiro R. *et al.*, 2010). La cola de 6His es utilizada para facilitar la posterior purificación de la ScAGAL. De esta manera, se eliminaron la señal de secreción (α -Factor) y el péptido Flag del vector propiamente dicho, generándose la construcción YEpMEL1His (Figura 2).

YEpMEL1His presenta el promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ADH2*), reprimido por glucosa, el terminador transcripcional *CYCI*, la región 2 *micron* (2 μ) y el marcador de selección *TRP1* para la replicación y selección en *S. cerevisiae* y un origen de replicación bacteriano (*ori*) y el gen de resistencia a la ampicilina (*ampr*) para su replicación y selección en bacterias. El gen *MEL 1* íntegro contiene una secuencia señal de secreción endógena en

posición 5' que codifica para el péptido señal que permite la secreción de la proteína al medio extracelular.

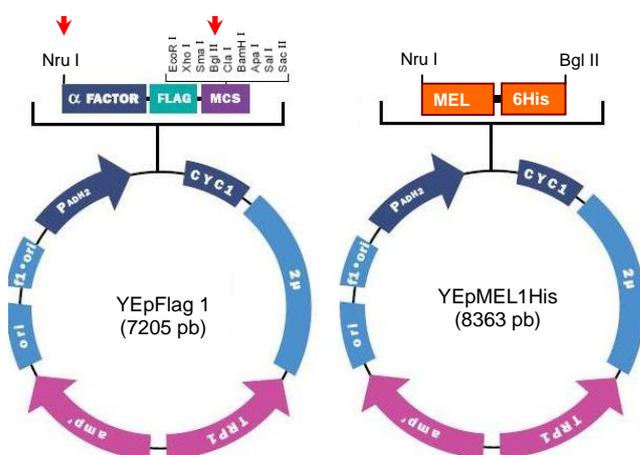


Figura 2. YEpFlag-1 y YEpMEL1His. La construcción YEpMEL1His, generada a partir del vector YEpFlag-1, fue empleada para expresar la ScAGAL, (Fernández-Leiro R., 2010).

3. Medios y condiciones de cultivo

La composición de los medios de cultivo se describe en la Tabla 2. En todos los casos, los medios se prepararon con agua destilada, fueron suplementados con 1.5% de agar bacteriológico cuando se requerían medios sólidos en placas Petri y se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 2 Ba de presión. Los crecimientos de todas las cepas se realizaron en cultivos discontinuos en medio líquido en matraces *Erlenmeyer* con agitación de 250 r.p.m. y se incubaron a una temperatura de 37°C y 30°C para bacterias y levaduras, respectivamente.

El medio de cultivo para bacterias fue suplementado con 100 µg/ml de ampicilina después de ser autoclavado para evitar su degradación y se mantuvieron entre 55-60 °C en el caso de la preparación de cultivos sólidos para evitar su gelificación. Este tipo de medio permite la selección de los clones transformados con el vector YEpMEL1His, el cual posee el gen de resistencia al antibiótico (*Ampr*). El gen *Ampr* codifica para una enzima localizada en el espacio periplásmico que cataliza la hidrólisis del anillo β-lactámico del antibiótico que inhibe la formación de la pared bacteriana. La solución madre de ampicilina se prepara con agua destilada estéril y se conserva en alícuotas a una temperatura de -20°C.

El medio YPHSM modificado está indicado para mejorar la estabilidad de las proteínas expresadas en levaduras (*Eastman Kodak Company*). Además, el alto contenido en nutrientes facilita la producción de grandes cantidades de proteína y ante un promotor reprimido por glucosa, como es el promotor de la *ADH2* que posee la construcción YEpMEL1His, la

composición del medio permite que la expresión de la proteína comience a altas densidades de cultivo.

Las condiciones de cultivo óptimas para la máxima expresión de ScAGal en la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505 se establecieron realizando cultivos por triplicado de 20 ml en YPHSM durante 144 horas. Durante el seguimiento de los cultivos, se recogieron muestras cada 24 horas para determinar la curva de crecimiento celular y la actividad enzimática. Los estudios de caracterización de la ScAGal se llevaron a cabo a partir de proteína purificada expresada en cultivos de 400 ml en las condiciones establecidas. En todos los casos, primero se preparó un cultivo iniciador en CM-TRP a partir de las colonias recombinantes aisladas de placa o de viales de cultivo líquido conservados a -80°C y en medio selectivo durante 24 horas. Los cultivos de YPHSM se prepararon en matraces *Erlenmeyer* de 1 L de capacidad para permitir una buena aireación (1:5, v/v) y favorecer el metabolismo respiratorio frente al fermentativo de la levadura.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo

Medios de cultivo para bacterias			Soluciones para medios de cultivo		
<i>Luria-Bertani</i> (LB)	Bactotripton	1%	<i>200X</i>	Arginina,	2 g
	Extracto de levaduras	0,5%	<i>Mezcla aminoácidos</i>	Metionina,	2 g
	NaCl	0,5%		Treonina	2 g
<i>SOC</i>	Bactotripton	2 %		Isoleucina,	2 g
	Extracto de levaduras	0.5%		Fenilalanina	2 g
	NaCl	10 mM		Lisina	8 g
	KCl	2.5 mM		Hasta 1L	
Medios de cultivo para levaduras			<i>300X</i>	Biotina	0.6 mg
<i>YPD</i>	Bactopeptona	0.5%	<i>Mezcla vitaminas</i>	Pantotenato cálcico	120 mg
	Extracto de levaduras	1%		Ácido fólico	0.6 mg
	D-Glucosa	0,5%		Inositol	600 mg
<i>YPHSM</i>	Bactopeptona	8%		Niacina	120 mg
	Extrato de levadura	1%		p-Amino benzoico	60 mg
	Glicerol*	3%		Piridoxina	120 mg
	D-Glucosa*	1.5%		Riboflavina	60 mg
<i>CM-TRP</i>	D-Glucosa	20 g		Tiamina	120 mg
	Histidina	40 mg		Hasta 1L	
	Leucina	40 mg	<i>150X Sales traza</i>	H ₃ BO ₃	75 mg
	Uracilo	40 mg		CuSO ₄	6 mg
	Adenina	40 mg		KI	15 mg
	Tirosina	40 mg		FeCl ₃	30 mg
	YNB*	67 ml		MnSO ₄	60 mg
	Mezcla aminoácid. (200x) hasta 1L	67 ml		MnSO ₄	60 mg
				Na ₂ MoO ₄	30 mg
<i>YNB</i>	Mezcla vitaminas (300X)	50 ml		ZnSO ₄	60 mg
	Sales traza (150X)	100 ml		Hasta 1L	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ **	75 g			
	KH ₂ PO ₄	15 g			
	MgSO ₄	7,5 g			
	NaCl	1,5 g			
	CaCl ₂	1,5 g			

*La solución se autoclava por separado y después de la esterilización se añade al resto de componentes, a una temperatura menor de 60°C y en condiciones estériles.

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

4. Técnicas de biología molecular

4.1. Introducción de ADN en bacterias y levaduras

4.1.1. Preparación de bacterias competentes

Las células bacterianas necesitan adquirir un estado de competencia transitorio para poder captar material genético exógeno del medio que las rodea. Para ello, se inoculó 1 mL de un cultivo fresco de la cepa bacteriana en 100 mL de medio SOC y se dejó crecer hasta alcanzar una OD_{600 nm} de 0.6. A continuación, se recolectaron las células centrifugando a 5000 r.p.m. durante 5 minutos, a 4° C, y se añadieron 40 mL de solución TBF-1 fría (Tabla 3). Después de una incubación de 5 min en hielo, se centrifugaron de nuevo en frío a 5000 r.p.m. durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron cuidadosamente en 4 mL de TBF-2, (Tabla 3). La suspensión celular se repartió en tubos *ependorff* y se congeló a -80°C para su almacenamiento (Kushner, 1978). En este trabajo se utilizó la cepa XL1-Blue para amplificar y obtener el ADN del vector YEpFlag-1 y la construcción YEpMEL1His.

Tabla 3. Soluciones para la preparación de bacterias competentes

<i>TBF</i> <i>1</i>	Cl ₂ Rb	0,964 g	<i>TBF</i> <i>2</i>	Cl ₂ Rb	0,02 g
	Cl ₂ Mn	0,788 g		Cl ₂ Ca	0,2 g
	CH ₃ COOK, pH 5,8	0,232 g		Glicerol	2,28 mL
	Cl ₂ Ca	0,116 g		Hasta 15 mL con H ₂ O	
	Glicerol	12 ml		bidestilada y esterilizar	
	Hasta 80ml con H ₂ O bidestilada y esterilizar				

4.1.2. Transformación de bacterias

La transformación de las células de *E. coli* XL1-Blue se llevó a cabo en condiciones de esterilidad a partir de 20 µL de células competentes recién descongeladas. Las células se incubaron en hielo con 30-50 ng del ADN a transformar. Al cabo de 30 minutos, se sometieron a un choque térmico a 42° C durante 90 segundos y a una incubación en hielo de 2 minutos. En este caso, como el ADN que se desea introducir es un plásmido circularizado, puede evitarse el paso de recuperación por lo que se añade 0,1 ml de medio LB y se plaquea directamente en placas de LBA como medio selectivo (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.3. Extracción de ADN plásmídico bacteriano

El método de la lisis alcalina modificado, sin adicción de fenol-cloroformo, (Sambrook *et al.* 1989) fue empleado para aislar el ADN plasmídico necesario para transformar bacterias o levaduras. Se preparó un cultivo celular con 5 ml de LBA líquido, a 37° C y en agitación toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células 3 minutos a 8.000 r.p.m y se resuspendieron en 100 µl de solución 1 (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-ClH 25 mM, pH 8,0) previamente enfriada en hielo. Se añadieron 200 µl de solución 2 (NaOH 0,2 N y SDS al 1%) preparada en el momento, se mezcla por inversión suave del tubo 5-6 veces y se mantiene en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 150 µl de solución 3 (60 ml de acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada), se repite la inversión suave y otros 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos y se transfirió la fase superior acuosa a un tubo limpio. Se añadieron dos volúmenes de etanol al 95% y tras incubar 5 minutos a -20°C, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. Para eliminar restos de sales, se lavó la muestra con 1 ml de etanol al 70% y se decantó como en el paso anterior. Las muestras se secaron al aire durante 2 horas y finalmente, se resuspendieron en 20-30 µl en agua bidestilada estéril. El ADN así obtenido se usó para transformar directamente bacterias o levaduras sin necesidad de realizar un tratamiento con ARNasa.

4.1.4. Transformación de levaduras

La introducción del ADN recombinante, YEpMEL1His, en la levadura *S. cerevisiae* fue realizada mediante el método *One Step* en condiciones de esterilidad (Chen D.C. *et al.*, 1992). Una colonia aislada en placa de medio YPD de la cepa BJ3505 fue utilizada para inocular un cultivo líquido de 10 mL de YPD e incubada a 30°C durante toda la noche para alcanzar la fase estacionaria. Al día siguiente, se centrifugaron 250 µl de cultivo, a 5.000 r.p.m. durante 3 minutos, y las células sedimentadas se lavaron con 100 µl del tampón *One Step* (acetato de litio 0.2 M, PEG 3350 40%, DTT 100 mM). Se añadieron entre 100-500 ng del ADN transformante y 5 µl de ADN de esperma de salmón sonicado a una concentración de 10 mg/ml (*DNA carrier, Sigma-Aldrich*). La mezcla se agitó vigorosamente y después de una incubación a 45 °C durante 30 minutos para permitir la entrada de ADN. Finalmente, se plaqueó en medio selectivo CM-TRP y se incubó a 30 °C durante 3 días.

4.2. Manipulación enzimática de proteínas: desglicosilación con endoglicosidasa H

La ScAGal es una proteína que es altamente glicosilada durante su paso a través de la ruta secretora celular alcanzando alrededor de un 60% de su peso molecular en glicósidos. Con la finalidad de comprobar los tamaños de los diferentes estados moleculares se procedió a realizar un tratamiento de la proteína pura con la enzima endoglicosidasa H (*Endo H*, *New England Biolabs*). Esta enzima es capaz de catalizar la hidrólisis de los residuos de azúcares presentes en las modificaciones por glicosilación en residuos de asparagina. Se añadió 1 µl de *Endo H* por cada 20 µg de proteína y se incubó 37°C durante 6-10 horas en el tampón de reacción (citrato sódico 50 mM pH 5.5). Para el análisis del peso molecular de la ScAGal mediante SDS-PAGE se llevó a cabo la desnaturalización de la *Endo H* mediante tratamiento térmico (10 minutos a 95°C) en presencia del tampón de desnaturalización suministrado con la casa comercial.

5. Técnicas electroforéticas

5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El análisis de la integridad del ADN plasmídico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa que permite la separación de los diferentes tamaños moleculares (Sambrook *et al.* 1989). Como el tamaño de la construcción y del plásmido vacío ronda entre los 7-8 Kb, se prepararon geles con agarosa (Sigma) al 0,7% (p/V) en tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM). Se empleó como referencia de tamaños el marcador de peso molecular 1Kb de ADN (Fermentas). Tanto las muestras como el marcador se mezclaron con el tampón de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen-cianol, 30% de glicerol y en 1xTE) junto al compuesto fluorescente, se cargaron en el gel y la electroforesis se llevó a cabo a 65 V durante 45 minutos. El compuesto fluorescente, *GelGreen* (*Biotium*) se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y permite detectarlos cuando se ilumina la muestra con luz ultravioleta. El marcador presenta un patrón de bandas de concentración conocida que permitió determinar la concentración semicuantitativa de las muestras. La visualización y análisis de los geles se llevó a cabo empleando un transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad).

5.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los análisis de las muestras proteicas se realizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) empleando un sistema *Mini Protean II BioRad*, (Laemmli, 1970). El gel separador se preparó al 8% o al 10% de acrilamida, dependiendo de los casos, y el gel concentrador al 5% de acrilamida (Tabla 4). Las muestras se diluyeron al 50% con tampón de carga (Tris-HCl 0,12 M pH 6,8, SDS al 6%, glicerol 10%, 2-β-mercaptoetanol al 15% y azul de bromofenol 0,0025%) y se desnaturizaron mediante una incubación a 95°C durante 5 minutos. Como referencia de tamaños moleculares se empleó el marcador *PageRuler (Fermentas)*. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 200 V en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3) y se detuvo al llegar el azul de bromofenol al extremo inferior del gel. Los geles se tiñeron en la solución precalentada azul de *coomassie* 0.1 % (*Coomassie brilliant blue*) y ácido acético 10% durante 10 minutos en agitación suave (Reiner, 2006). Después de la tinción se realizó un lavado en una solución de ácido acético 10% para retirar el exceso de colorante y las imágenes de los geles se recogieron en el equipo Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad).

Tabla 4. Composición del gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Gel separador	8%	10%	Gel concentrador	5%
Acrilamida:bisacrilamida	2.69 ml	3.33 ml	Acrilamida:bisacrilamida	0.85 ml
Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	Tris-HCl 0.5 pH 6.8	1.3 ml
H2O	4.75 ml	4 ml	H2O	2.8 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml	SDS 10%	0.05 ml
APS 10%	0.05 ml	0.05 ml	APS 10%	0.02 ml
TEMED	0.02 ml	0.02 ml	TEMED	0.005 ml

5.3. Electroforesis de proteínas bajo condiciones no desnaturizantes.

Con el fin de comprobar el tamaño molecular y la pureza de la muestra en estado nativo se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes. Las condiciones para el desarrollo de la electroforesis fueron las mismas que en la Sección 5.2. sin añadir al gel el detergente SDS. Las muestras no contenían el agente reductor 2-β-mercaptoetanol y tampoco se hirvieron para evitar la desnaturización de la proteína oligomérica.

6. Técnicas purificación de proteínas

6.1. Concentración del medio extracelular

La ScAGAL es una proteína oligomérica altamente glicosilada de aproximadamente 300 kDa en su estado nativo y cada monómero representa un peso molecular de entre 65 y 95 kDa dependiendo del número de carbohidratos que permanecen unidos a ella. En su extremo amino terminal, posee un péptido señal endógeno que la dirige hacia el exterior de la célula, razón por la que se ha conservado para generar la construcción YEpMEL1His (Fernández-Leiro R. *et al.*, 2010), y poder obtener la proteína fácilmente, mediante centrifugación preparativa, separando las células del resto del medio de cultivo. Sin embargo, el cultivo en medio YPHSM genera muchos desechos y para eliminar parte de los restos del medio extracelular, se realizó un paso previo mediante filtración tangencial con el sistema *Tangential Flow Filtration System (TFF, Milipore)*. El tamaño de poro del sistema de membranas utilizado fue de 10 kDa, por lo que la proteína fue retenida durante el filtrado y concentrada hasta el volumen deseado de como máximo 100 ml. Un cultivo de medio extracelular de 400 ml se concentró hasta 100 ml haciendo circular el mismo volumen de tampón PBS (*Phosphate Buffer Solution: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 100 mM, pH 7*) que de cultivo. Volúmenes de 100 ml son más apropiados para trabajar en los siguientes pasos de purificación, además de contener una mayor concentración de proteína.

6.2. Cromatografía de afinidad Níquel-Sepharosa

La proteína recombinante ScAGal codificada a partir de la construcción YEpMEL1His presenta una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad por unión a una columna de níquel. Se partió de un cultivo de 400 ml de YPHSM de la cepa de levadura BJ3505 transformada con YEpMEL1His y se dejó crecer durante 96 horas para alcanzar los valores máximos de actividad α -galactosidasa. Las purificaciones se realizaron a partir del medio de cultivo concentrado empleando las columnas de níquel-sefarosa comerciales *His GraviTrap™* suministradas por *General Electric Healthcare* y el sistema *ÄKTA prime plus (GE Healthcare)*. La purificación se realizó a 4°C y se guardaron alícuotas de todos los pasos para comprobar la evolución de la purificación mediante medidas de actividad enzimática, de concentración proteica y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Después de pasar la muestra por la columna, se realizaron 2 lavados con 10 ml de tampón de lavado PBS 100 mM

pH 7, NaCl 500 mM, Imidazol 25 mM (*Sigma-Aldrich*). La elución de la proteína unida específicamente a la columna se realizó con el tampón de elución PBS 100 mM pH 7, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM y finalmente fueron recogidas 4 alícuotas de 1 ml.

6.3. Concentración de la proteína purificada

Las alícuotas recogidas de la cromatografía de afinidad analizadas en un gel SDS-PAGE que presentaron un grado de pureza de la proteína óptima, se mezclaron y se procedió a su diálisis y concentración mediante centrifugación en dispositivos de ultrafiltración *AMICON ULTRA* de *Milipore*. Éstos presentan una membrana de ultrafiltración en posición vertical de 100 kDa de tamaño de corte y un volumen total de 15 mL. Durante la centrifugación, este sistema crea un gradiente vertical de concentración a lo largo del tubo, por lo tanto, para evitar la precipitación de la proteína, la muestra se centrifugó a 2500 r.p.m. en refrigeración y se homogeneizó cada 5 minutos durante el tiempo necesario hasta alcanzar el volumen deseado (200-500 μ l).

7. Técnicas analíticas

7.1. Medida de la concentración proteica: Método de Bradford

La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford que es un ensayo colorimétrico que permite detectar cantidades de proteínas de hasta 1 μ g, (Bradford, 1976). Se añadieron 10 μ l de la muestra adecuadamente diluida a 200 μ l del reactivo diluido (1:5, v/v) *Protein-assay* (*Bio-Rad*) a una placa de microtitulación de 96 pocillos para lector de placas. Se utilizó el espectrofotómetro con lector de placas *BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR* programado para llevar a cabo una agitación durante 30 segundos, incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y medida de la absorbancia a 595 nm. El patrón utilizado para elaborar la recta de calibrado fue albúmina de suero bovino (BSA) con cantidades de proteína comprendidas entre 5 y 500 μ g/ml. El blanco de las muestras, donde se reemplazó la enzima por agua destilada, y el patrón se trataron de la misma manera.

7.2. Determinación de la actividad α -galactosidasa

La medida de actividad α -galactosidasa se llevó a cabo utilizando el sustrato cromogénico p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG) siguiendo el método descrito por Ryan y colaboradores (Ryan *et al.* 1998). El compuesto incoloro PNPG da lugar a un producto tras su hidrólisis que, con el cambio de pH producido al parar la reacción enzimática, adquiere un

color amarillo cuantificable por un espectrofotómetro y proporcional a la cantidad de sustrato liberado. Para llevar a cabo las medidas de actividad, después de incubar muestra y sustrato 5 minutos a 40°C para que alcancen la temperatura óptima de reacción, 110 µl de la muestra diluida fueron añadidos a 110 µl de PNPG 7 mM en tampón de reacción (ácido cítrico 61 mM, Na₂HPO₄ 77 mM, pH 4). Alícuotas de 100 µl fueron recogidas a los tiempos de 2 y 4 minutos y se añadieron directamente a 100 µl de Na₂CO₃ para parar la reacción. Las muestras se pasaron a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se midieron en el espectrofotómetro *BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR* a la longitud de onda de absorbanza de 400 nm. Para determinar las medidas de actividad intracelular, fue necesario un tratamiento previo de las muestras de cultivo para permeabilizar las células y permitir la entrada del sustrato. Alícuotas de 1 ml del cultivo celular, se centrifugaron (5 minutos, 5000 r.p.m), se resuspendieron vigorosamente en 200 µl de tampón de reacción (Hepes 20 mM pH 7,5, SDS 0,002% y DTT 10 mM) con 30 µl de cloroformo y se mantuvieron a 4°C hasta iniciar el ensayo.

La actividad enzimática (Act.Enz.) de la α-galactosidasa se expresó en unidades enzimáticas (U), definiéndose la unidad como la cantidad de enzima que libera un µmol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$). La cuantificación se realizó, aplicando la ecuación $\text{Act.Enz.} = (\Delta\text{Abs}_{400}/\Delta T^\circ \times \epsilon \times V_m) \times V_t \times \text{F.D.}$, derivada de la ley de *Lambert y Beer*, donde $\Delta\text{Abs}_{400}/\Delta T^\circ$ es el incremento de absorbanza por unidad de tiempo (min^{-1}), V_m es el volumen de muestra (ml), ϵ es el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol a 400 nm ($18200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), V_t es el volumen total de la reacción (ml) y F.D. el factor de dilución aplicado a la muestra para realizar la medida.

7.3. Caracterización de la especificidad de sustrato

El estudio de la caracterización de la ScAGal para determinar la especificidad por el sustrato se realizó a través del análisis de los productos de hidrólisis de diferentes glucósidos mediante medida de actividad α-galactosidasa, cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los sustratos utilizados fueron el α-PNPG, los galactosacáridos naturales melibiosa, rafinosa y estaquiosa, y el galactomanano de algarrobo (*Sigma-Aldrich*) y los galactomanosacáridos sintéticos Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅ (*Megazyme*). Además, se utilizaron las α-Gals de *A. niger* y *C. tetragolonoba* para llevar a cabo un estudio comparativo del seguimiento de los productos de hidrólisis que fueron proporcionados por *Megazyme*.

7.3.1. Hidrólisis enzimática de glucósidos con α -Gals

La reacción de hidrólisis con la enzima α -Gal se realizó mezclando 200 μ l de una disolución acuosa de sustrato al 1% con 200 μ l de α -Gal (2 U/ml, en el tampón adecuado de reacción) y se incubaron a 40 °C. El tampón de reacción utilizado para la ScAGal y la α -Gal de *A. niger* fue ácido cítrico 61 mM, Na₂HPO₄ 77 mM, pH 4; y el utilizado para la α -Gal *C. tetragolnoba* fue el tampón acetato 10 mM pH 4,5. Para llevar a cabo el seguimiento, se sacaron muestras de 50 μ l a los tiempos 0, 5, 15 y 30 minutos en el caso de α -PNPG y melibiosa; y a los tiempos 0, 0.5, 2 y 4 horas para la rafinosa, estaquiosa, Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅. Después de cada tiempo de incubación, las muestras se hirvieron durante 5 minutos para parar la reacción y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis de actividad enzimática, TLC o HPLC.

7.3.2. Hidrólisis enzimática de glucósidos con β -manosidasa y ScAGal

Para determinar la rotura de enlaces galactosa unidos al extremo no reductor de oligosacáridos, se llevó a cabo el tratamiento previo de los galactomanosacáridos con la β -manosidasa de *Helix pomatia*. Esta enzima rompe sólo residuos de manosa del extremo reductor de Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅ generándose finalmente los productos GalMan y Man, y Gal^{3,4}Man₄ y Man, respectivamente (Tabla 1, Apartado 2.2., Introducción). Se añadieron 100 μ l de β -manosidasa (2.4 U/ml en tampón acetato 5 mM, pH 4.5) a una disolución acuosa de los galactomanosacáridos al 1% y se incubó a 40°C durante 24 horas. A continuación, se añadieron 100 μ l de ScAGal (0.6 U/ml, en tampón de reacción) a 100 μ l del hidrolizado anterior y se incubó a 40 °C durante 24 horas. En todos los casos, se recogió una muestra a tiempo cero de reacción y se procedió de la misma manera que en apartado 7.3.1. para inactivar la enzima y conservar las muestras hasta su análisis de actividad enzimática o TLC. También se procedió a tratar, de igual manera, el sustrato galactomanano de algarrobo para demostrar la eficiencia de hidrólisis sobre galactomano-polisacáridos complejos de la ScAGal en combinación con β -manosidasa.

7.3.3. Determinación de la actividad α -galactosidasa para los sustratos melibiosa, rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo

La actividad α -galactosidasa de los sustratos naturales, melibiosa, rafinosa, estaquiosa y el galactomanano de algarrobo se determinó midiendo, tras previa hidrólisis enzimática con la

ScAGAL, la liberación de azúcares reductores (glucosa y galactosa). Como uno de los productos de la hidrólisis de la rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo es la galactosa se utilizó el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), sin embargo, como la melibiosa se escinde a glucosa y galactosa, se recurrió al kit enzimático glucosa-oxidasa para la medida de azúcares reductores. En las muestras de galactomanano de algarrobo digeridas previamente con la enzima β -manosidasa de *Helix pomatia*, la cantidad de galactosa se cuantificó mediante la diferencia entre los azúcares reductores liberados antes y después del tratamiento de las muestras con la ScAGAL.

7.3.3.1. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico

La determinación de azúcares reductores después de la hidrólisis de rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo, se realizó mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Este procedimiento consiste en una reacción redox entre los grupos reductores de los azúcares y el reactivo oxidante DNS mantenido en exceso. Por lo tanto, mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra cuantificable por espectrofotometría visible. Se mezclaron 50 μ l de las muestras digeridas, con 50 μ l de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 1%, tartrato sódico-potásico 40%, NaOH 1,5%), y tras hervir y enfriar las muestras en sesiones de 5 minutos, se diluyeron con 500 μ l de agua destilada. Finalmente, se añadieron 200 μ l de cada muestra a una placa de microtitulación de 96 pocillos para medir la absorbancia a 540 nm en el lector de placas *BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR*. El patrón utilizado para elaborar la recta de calibrado fue una solución acuosa con concentraciones de galactosa comprendidas entre 0,25 y 2 mg/ml. El blanco de las muestras, donde se reemplazó la enzima por agua destilada, y el patrón se trataron de la misma manera. La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μ mol de azúcar reductor equivalente a galactosa por minuto bajo las condiciones de ensayo.

7.3.3.2. Método Glucosa-Oxidasa

La actividad α -galactosidasa utilizando melibiosa como sustrato fue determinada tras su hidrólisis con ScAGAL midiendo la liberación de glucosa mediante un kit enzimático glucosa-oxidasa (*Sigma Aldrich*). El ensayo consiste en la reacción específica de la enzima glucosa oxidasa con la glucosa acoplada a la liberación de H_2O_2 , el cual es cuantificable por espectrofotometría visible a una longitud de onda de absorbancia máxima 450 nm. La

cantidad de H_2O_2 es proporcional a la cantidad de glucosa presente en las muestras. La reacción se llevó a cabo mezclando 100 μ l de las muestras digeridas diluidas (1:20) con 1 ml del reactivo *Combined Enzyme-Color Reagent Solution (Sigma-Aldrich)* y se incubaron a 37°C durante 25 minutos, evitando la exposición de luz directa sobre las muestras. Después, se tomaron 200 μ l de cada muestra y se añadieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos para medir la absorbancia a 450 nm en el lector de placas *BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR*. El patrón utilizado para elaborar la recta de calibrado fue una solución acuosa con concentraciones de glucosa comprendidas entre 0,5 y 5 mg/ml. El blanco de las muestras, donde se reemplazó la enzima por agua destilada, y el patrón se trataron de la misma manera. La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto bajo las condiciones de ensayo.

7.3.4. Cromatografía de capa fina (TLC)

La hidrólisis de los sustratos α -PNPG, melibiosa, rafinosa, estaquiosa, Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅, y el galactomanano de algarrobo fue estudiada mediante la determinación cualitativa de sus productos por TLC. Todas las alícuotas de las muestras que fueron sometidas a hidrólisis enzimática fueron analizadas por TLC sobre placas de gel de sílice (*Merck Silica Gel 60F 254, Germany*). Después de dejar un margen de 1.5 cm en uno de los extremos de la placa, se colocaron con un capilar de 2 a 8 μ l de muestra con una separación de 7 mm entre ellas procurando concentrarla en un punto. Se prepararon soluciones acuosas al 1% de cada uno de los sustratos y de los productos esperados, como control de posición en la placa. Una vez colocadas todas las muestras, las placas se dejaron secar bien a temperatura ambiente. Después, las placas se metieron dentro de la cámara de TLC previamente saturada con la mezcla del sistema solvente 1-propanol-nitrometano-agua (5:2:3, v/v) sin que éste toque la línea de muestras, y se dejó llevar a cabo el desarrollo del sistema por desplazamiento del solvente por capilaridad durante 1 hora. Por último, las placas se retiraron de la cámara y tras la evaporación de todo el solvente, los azúcares fueron detectados por calentamiento tras pulverizar sobre las placas con una mezcla de metanol:ácido sulfúrico (95:5, v/v) utilizado como revelador. Las imágenes y análisis de las placas fueron recogidas empleando un transiluminador *Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad)*.

7.3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La hidrólisis de los sustratos melibiosa, rafinosa y estaquiosa fue estudiada mediante la determinación cuantitativa de sus productos por HPLC utilizando la columna *Sugar Pack Waters* (6.5 mm x 300 mm). Los patrones utilizados para elaborar las rectas de calibrado fueron mezclas acuosas de melibiosa, glucosa y galactosa; y estaquiosa, rafinosa, sacarosa y galactosa con cantidades comprendidas entre 1 y 0.0625 mg/ml, para la determinación cuantitativa de los productos de hidrólisis de la melibiosa y, de la rafinosa y estaquiosa, respectivamente. Todas las muestras y patrones fueron filtrados a través de membranas de tamaño de poro de 0.22 micras (*Millipore*) y se inyectaron 15 µl en la columna. Los azúcares se eluyeron utilizando como fase móvil, agua destilada filtrada y desgasificada a un flujo de 0.5 ml.min⁻¹ y se detectaron con un *Refractive Index Detector (RID)* (*Cienytech*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la producción de ScAGal

1.1. Seguimiento de la secreción de ScAGal al medio extracelular

La construcción YEpMEL1His, con el gen completo de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGal) (Fernández-Leiro R. et al., 2010), fue amplificada en la cepa *E. coli XL1Blue* para obtener suficiente material genético e introducida en la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505 utilizada como sistema de expresión de proteínas. El gen *MEL1* codifica para una proteína de 471 aminoácidos que es secretada al medio extracelular en diferentes cantidades dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo tanto, puede quedar retenida en el interior de la célula como un estado de proteína asociado a las membranas. El seguimiento en el tiempo de cultivos en medio selectivo CM-TRP muestra la aparición de actividad α -galactosidasa después de las 20 horas de incubación alcanzándose entre los intervalos 74 y 154 horas, una media máxima de secreción y de actividad total de 0.53 U/ml y 1 U/ml, respectivamente (Fernández-Leiro R., 2010). Por ello, se eligió el intervalo temporal entre las 72 y 144 horas para llevar a cabo el seguimiento de las medidas de actividad α -galactosidasa extracelular e intracelular en el medio de cultivo rico YPHSM, mostrando una mejora considerable en la producción de proteína (Figura 4). En este medio, la cepa recombinante secreta una media de 12 U/ml a las 96 horas de crecimiento y continúa incrementando ligeramente hasta las 144 horas. La media de la actividad total a las 96 horas es de 31 U/ml, lo que significa que la actividad extracelular es del 40% de la actividad total disminuyendo ligeramente conforme se alcanza el periodo máximo de cultivo. Es por tanto, que se eligió un tiempo de crecimiento de 96 horas para llevar a cabo la expresión máxima de proteína y proceder a su purificación, necesaria para realizar los estudios de caracterización de sustrato de la ScAGal.

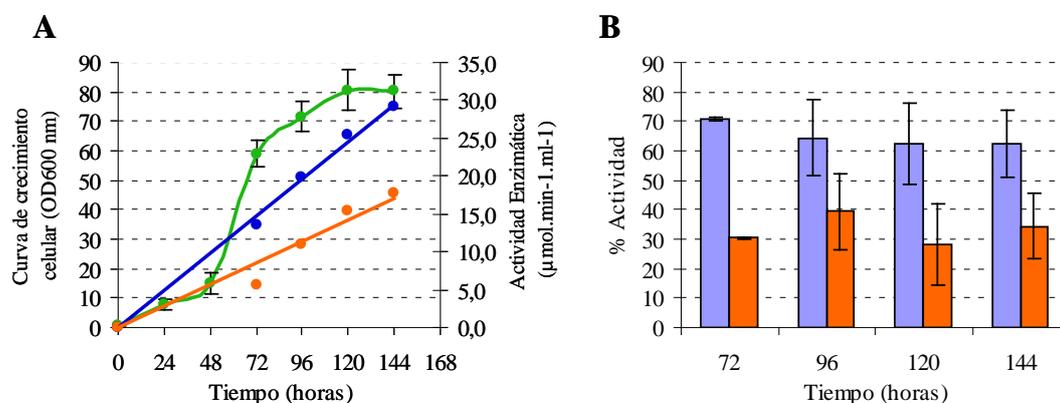


Figura 4. Seguimiento de la producción de ScAGal en el medio YPHSM: A) Curva de crecimiento celular expresada en medida de la absorbancia a OD600 nm (\rightarrow); Actividad enzimática intracelular expresada en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ (\rightarrow); Actividad enzimática extracelular expresada en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ (\rightarrow). B) % de actividad de la fracción intracelular (\rightarrow) y extracelular (\rightarrow) con respecto a la actividad total. Todos los resultados corresponden a la media de tres cultivos independientes.

1.2. Purificación y formas moleculares de la ScAGal

Los pasos de purificación de la ScAGal a partir del sobrenadante libre de células de un cultivo de 400 ml de YPHSM se indican en la Tabla 5. La purificación de la proteína extracelular por cromatografía de afinidad en columnas de níquel-sefarosa resultó en una recuperación de la proteína del 75 % con un factor de purificación de 5 veces y un rendimiento total expresado en unidades totales de la enzima del 51%. Las fracciones de todos los pasos de purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE que permitió comprobar la pureza final de la proteína (Figura 5.A, calle 4).

Tabla 5. Tabla de purificación de la ScAGal

	ml	mg	U/ml	mg/ml	AE (U/mg)	FP	Rendimiento (%)
Medio extracelular	400	88	15.16	0.22	68.91	1.00	100
Medio concentrado	130	66.30	48.33	0.51	94.76	1.38	103
Cromatografía de afinidad	26	9.10	120.11	0.35	343.17	4.98	51

AE: Actividad Específica; FP.: Factor de purificación.

En los análisis de la proteína purificada en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se observa una gran banda difusa entre los tamaños 180 y 70 kDa que corresponde a los diferentes estados de glicosilación de los monómeros de la ScAGal. Sin embargo, la proteína desglicosilada presenta un peso molecular de 55 kDa como se puede observar en la figura 5B, calle 1 y calle 2, respectivamente. Por otro lado, podemos observar el comportamiento de la forma tetramérica de la ScAGal en un gel nativo antes y después de desglicosilar demostrando su naturaliza oligomérica.

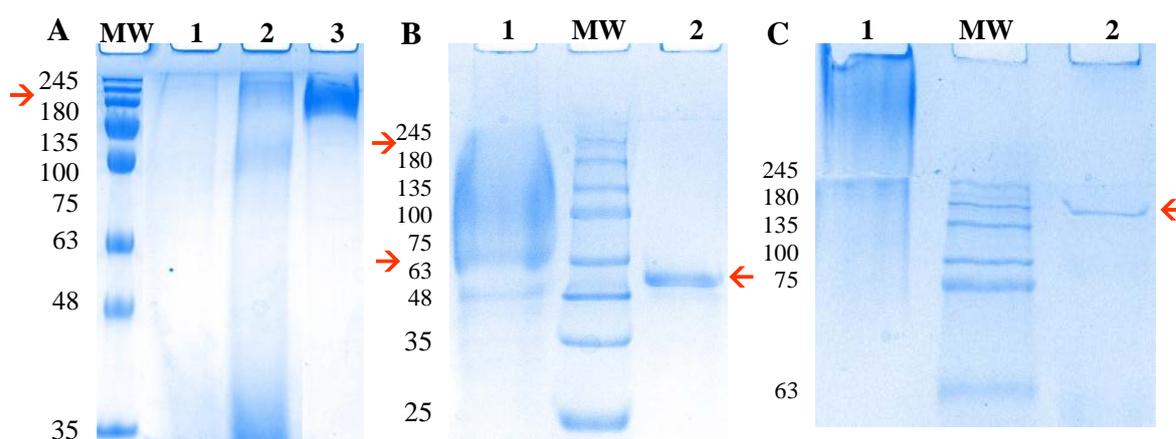


Figura 5. A) Análisis del proceso de purificación de la ScAGal en gel SDS-PAGE: medio de cultivo extracelular (calle 1), medio extracelular concentrado (calle 2), proteína purificada por cromatografía de afinidad (calle 3); B) Forma monomérica de la ScAGal en gel SDS-PAGE, proteína glicosilada (calle 1) y proteína desglicosilada (calle 2); C) Forma tetramérica de la ScAGal en gel PAGE en condiciones nativas, proteína glicosilada (calle 1) y proteína desglicosilada (calle 2). MW, marcador de peso molecular. → Posición estimada de la proteína glicosilada. ← Posición estimada de la proteína desglicosilada.

2. Caracterización de la especificidad de sustrato por la ScAGal

2.1. Actividad α -galactosidasa

La ScAGal purificada se utilizó para llevar a cabo el análisis de la actividad α -galactosidasa con los sustratos α -PNPG, melibiosa, rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo (Tabla 6). La ScAGal presenta la especificidad más elevada con el α -PNPG y no actúa sobre el galactomanano de algarrobo. Teniendo como referencia el α -PNPG (100%), la enzima exhibe una actividad elevada en presencia de melibiosa (65%) por ser su sustrato natural, y una actividad más baja para rafinosa y estaquiosa (6%). La ScAGal no actúa directamente sobre los galactopolisacáridos complejos como la goma de algarrobo, pero sí

Tabla 6. Especificidad de sustrato de la ScAGal (media \pm SD, n = 3)

Sustratos	Concentración (mg/ml)	Actividad Relativa (%) [*]
α PNPG	3	100 ^{**}
Melibiosa	5	65 \pm 4.75
Rafinosa	5	6 \pm 0.65
Estaquiosa	5	6 \pm 0.39
Goma algarrobo	5	–
Goma algarrobo tratada con β -manosidasa	2.5	8 \pm 0.80

* % de actividad enzimática con respecto al sustrato α PNPG.

** Valor tomado como máxima referencia obtenido de la media de tres medidas independientes con una desviación estandar (SD) \pm 0.063.

cuando ésta se somete a un tratamiento previo con la enzima β -manosidasa. Esto último, es un indicativo de la ventaja que puede suponer el uso de la ScAGal en combinación con la β -manosidasa para mejorar las propiedades gelificantes de galactomananos utilizados en la industria biotecnológica.

2.2. Análisis de los productos de hidrólisis

Los resultados obtenidos muestran la acción de la ScAGal sobre varios sustratos artificiales como α -PNPG y los galactosacáridos naturales melibiosa, rafinosa y estaquiosa. Estos datos confirman resultados previos obtenidos por otros autores (Fernández-Leiro R. *et al* 2010). La figura 7 representa los resultados obtenidos de la acción de la ScAGal sobre los sustratos analizados por HPLC. En la figura 7A, se observa que a los 5 minutos de reacción, cuando la melibiosa comienza a ser hidrolizada, tiene lugar también la síntesis de un galactotrisacárido como producto de la reacción de transglicosilación. Esto sucede porque todavía hay suficiente sustrato para favorecer esta reacción, conforme transcurre el tiempo de reacción la melibiosa y el galactotrisacárido desaparecen. En el caso de la rafinosa y estaquiosa, en tiempo cero de la reacción de hidrólisis, se observa un pico que cae a los

tiempos de retención de la rafinosa y sacarosa, respectivamente, por otro lado, a los 15 minutos de la reacción de hidrólisis, en el cromatograma de la rafinosa se observa un pico desconocido en el tiempo de retención de aproximadamente de 10 minutos (Figura 7A y 7B). Todos estos picos están por determinar en posteriores ensayos. Los análisis de HPLC (Figura 7D) muestran que alrededor del 90% de la rafinosa y estaquiosa es hidrolizada por la ScAGal a las 4 horas de reacción resultando ser una buena candidata para la hidrólisis de oligosacáridos derivados de la rafinosa (RFOs) presentes en productos derivados de la industria alimentaria (melazas, soja y derivados de legumbres).

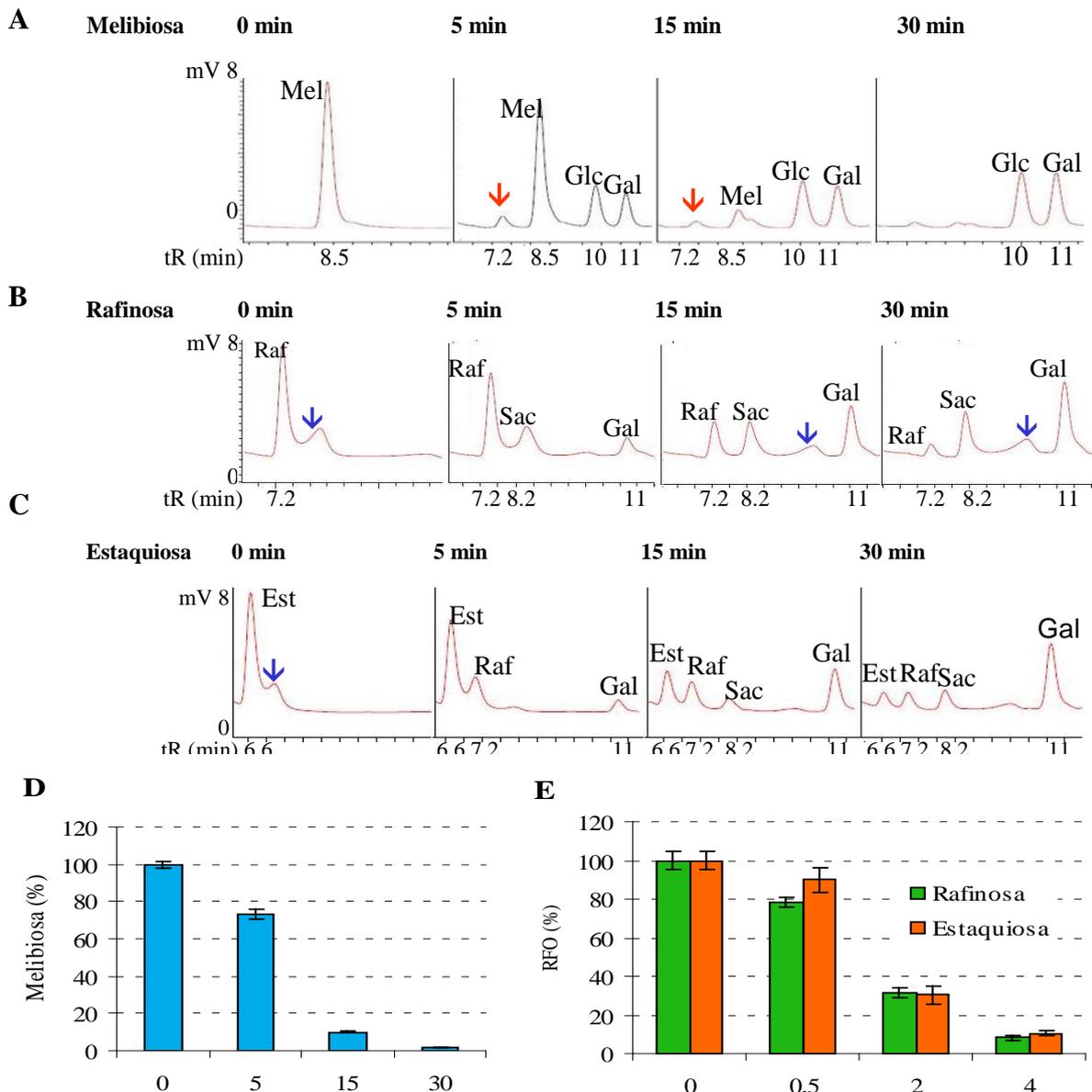


Figura 7. Acción de la ScAGal sobre los sustratos naturales, Melibiosa, Rafinosa y Estaquiosa estimada por HPLC. Análisis de los productos de la hidrólisis de Melibiosa (A), Rafinosa (B) y Estaquiosa (C) durante el tiempo de reacción; y porcentaje del contenido de Melibiosa (D) y RFOs (E) durante el tiempo de reacción de hidrólisis. Los datos representan la medida de tres experimentos independientes. → Trigalactosacárido sintetizado por la reacción de transglicosilación de la ScAGal. → Desconocido.

La ScAGal puede hidrolizar el galactomanosacárido sintético Gal³M₃ pero no puede actuar sobre Gal³M₄ (Yoshida S. *et al* 1997). Así, la ScAGal puede romper el enlace de un residuo de galactosa unido a la manosa no reductora del galactomanosacárido pero no cuando la galactosa está unida a una manosa interna. Sin embargo, no hay evidencias documentadas de su acción sobre una galactosa unida a la manosa reductora del azúcar como sería el caso del sustrato Gal¹Man₃. En este trabajo, se demuestra que la ScAGal sólo puede actuar sobre Gal¹Man₃ tras hidrólisis previa con la β-manosidasa de *Helix pomatia*, por lo que se confirma que pertenece al segundo grupo de α-Gals. La figura 8 muestra el resultado de la acción de la ScAGal sobre los sustratos previamente tratados con la enzima β-manosidasa analizados mediante TLC. Gal¹Man₃ tratado con β-manosidasa resultó en la liberación de la manosa no reductora terminal generando el producto GalMan₂ y finalmente GalMan después de las 24 horas de reacción, el cual puede ser accesible por la ScAGal liberando galactosa y manosa. La acción de la ScAGal sobre la goma de algarrobo previamente digerida con β-manosidasa también es confirmada por TLC. En el caso del sustrato Gal^{3,4}Man₅ el análisis por TLC es más confuso, posiblemente por ser un sustrato de mayor tamaño y por lo tanto, menor accesible al centro activo de la enzima. En todos los casos, los datos están a la espera de ser confirmados por HPLC.

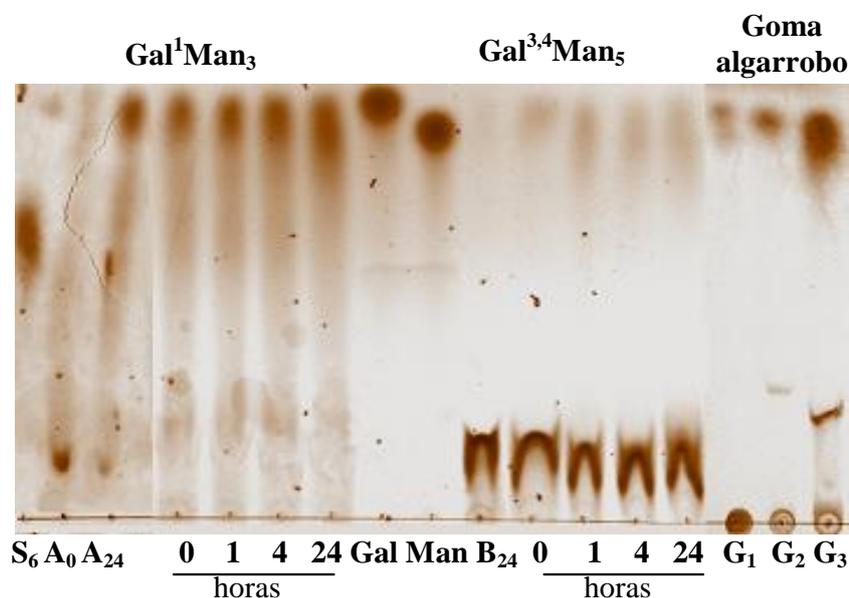


Figura 8. Acción de la ScAGal sobre los galactosacáridos (Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅) y el galactomanano de algarrobo tratados previamente con β-manosidasa de *Helix pomatia*. 0.3 U/ml de ScAGal (en tampón ácido cítrico 61 mM, Na₂HPO₄ 77 mM, pH 4) se incubaron con 2.5 mg/ml del sustrato hidrolizado con β-manosidasa a 40°C. 8 μl de las muestras recogidas a los tiempos 0, 1, 4 y 24 horas fueron utilizados en la TLC para caracterizar los productos de la hidrólisis. G₁, galactomanano control; G₂, galactomanano al 1% hidrolizado con 1.2 U/ml de β-manosidasa durante 24 horas; G₃, muestra G₂ hidrolizada con ScAGal durante 24 horas; A₀ y A₂₄ corresponden a muestras de 1% Gal¹Man₃ digerido con 1.2 U/ml de β-manosidasa a los tiempos 0 y 24 horas, respectivamente; B₂₄ corresponde a una muestra de 1% Gal^{3,4}Man₅ digerido con 1.2 U/ml de β-manosidasa durante 24 horas; S₆, Gal¹Man₃ control; Gal, galactosa control; Man, manosa control.

3. Estudio comparativo de la hidrólisis de sustratos por la ScAGal y las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba*

En el transcurso de la hidrólisis de los sustratos analizada por TLC, se observa que el α -PNPG es hidrolizado rápidamente por las tres α -Gals, sin embargo, sólo la ScAGal hidroliza completamente la melibiosa a glucosa y galactosa después de 15 minutos de reacción (Figura 6A). La α -Gal de *A. niger* no actúa sobre la melibiosa incluso después de 12 horas de reacción (Kaneco R. *et al.*, 1991) pero en este trabajo se observó que era totalmente hidrolizado después de 4 horas (dato no mostrado). En cuanto a la rafinosa y estaquiosa, la ScAGal presenta mayor especificidad por los sustratos que la α -Gal de *A. niger*, frente a la α -Gal de *C. tetragonoloba* que no actúa sobre la estaquiosa y muy poco sobre la rafinosa (Figura 6B). Por el contrario, la ScAGal y la α -Gal de *A. niger* no pueden hidrolizan los sustratos Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅, mientras que la α -Gal de *C. tetragonoloba* lo hace cuando tan sólo ha transcurrido 1 hora de reacción (Figura 6C). La tabla 7 resume los sustratos específicos de la ScAGal y las α -Gals de de *A. niger* y *C. tetragonoloba*.

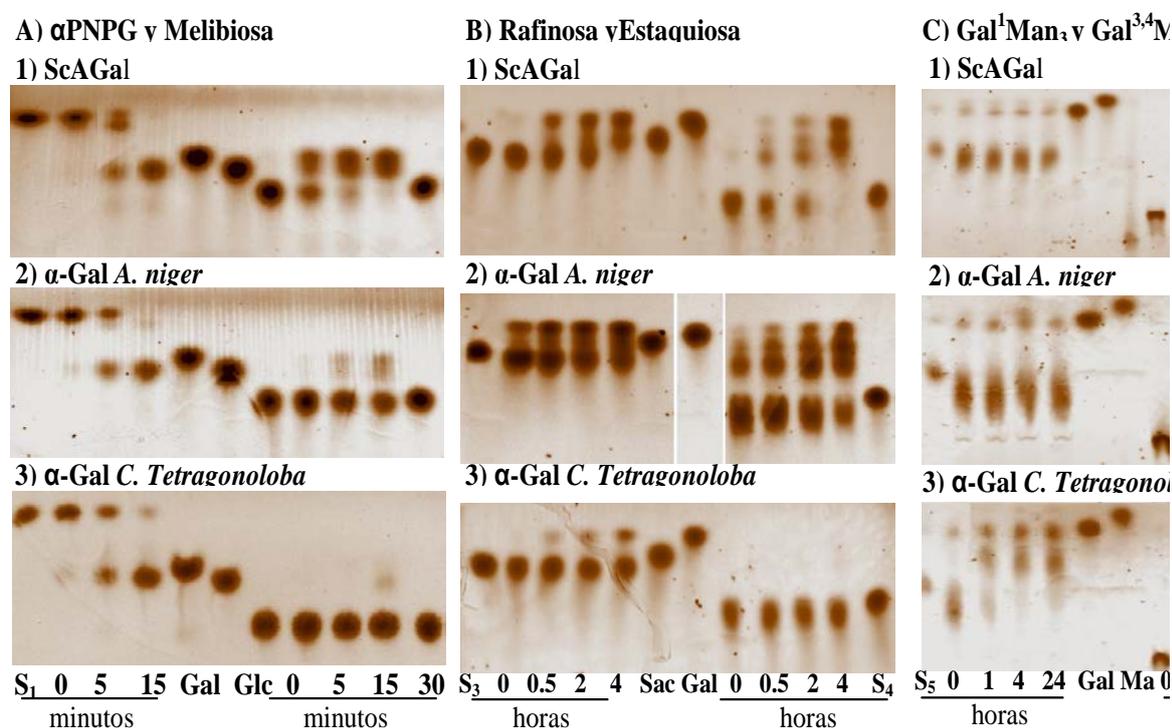


Figura 9. Análisis comparativo de los productos de hidrólisis de la ScAGal con las α Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba* por TLC. 1U/ml de α Gal (en el tampón de reacción adecuado) se incubó con 5mg/ml de los sustratos a 40°C y se utilizaron 2 μ l de muestra en el TLC para caracterizar los productos de hidrólisis, a los 0, 5 y 15 minutos para α PNPG y melibiosa (A), a los 0, 0.5, 2 y 4 horas para rafinosa y estaquiosa (B), y a las 0, 1, 4 y 24 horas para Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅ (C). S₁, α PNPG control; S₂, Melibiosa control; S₃, Rafinosa control; S₄, Estaquiosa control, S₅, Gal¹Man₃; S₆, Gal^{3,4}Man₅; Gal, galactosa control; Glc, Glucosa control; Man, Manosa control.

Tabla 7. Sustratos específicos de la ScAGal y las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba* (planta de Guar).

SUSTRATO	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. tetragonoloba</i>
α -PNPG	Gal – PNPG	Gal – PNPG	Gal – PNPG
Melibiosa	Gal – Glc	Gal – Glc	Gal – Glc
Rafinosa	Gal – Gal – Fru	Gal – Gal – Fru	Gal – Gal – Fru
Estaquirosa	Gal – Gal – Gal – Fru	Gal – Gal – Gal – Fru	Gal – Gal – Gal – Fru
Gal ¹ Man ₃			
GalMan (a partir de Gal ¹ Man ₃)*		**	**
Gal ^{3,4} Man ₅			
Gal ^{3,4} Man ₅ (a partir de Gal ^{3,4} Man ₅)*			

↑ Enlaces hidrolizados rápidamente por la α -Gal
 ↑ Enlaces hidrolizados moderadamente por la α -Gal
 ↑ Enlaces hidrolizados por β -manosidasa
 M Residuo de manosa reductora terminal
 M Residuo de manosa no reductora terminal

* Sustratos obtenidos del tratamiento con β -manosidasa
 ** Ensayos no realizables en este estudio.

CONCLUSIONES

La caracterización de enzimas es una herramienta fundamental en la búsqueda y estudio de la mejora de dianas enzimáticas con aplicaciones de interés biotecnológico, para determinar no sólo características bioquímicas como T^a y pH óptimo de reacción, termoestabilidad, parámetros cinéticos, inhibición por sustrato, sino también la especificidad de sustrato y los productos obtenidos tras su reacción de hidrólisis o de síntesis. La α -galactosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal) presenta muchas cualidades, identificadas en trabajos anteriores, como son el bajo coste de producción por ser una proteína extracelular, rango amplio de T^a y pH de trabajo, y elevada afinidad por el galactosacárido natural melibiosa seguido de la rafinosa. Sin embargo, la importancia por determinar las posiciones de hidrólisis de los residuos de galactosa para estudiar otros sustratos de interés, como galactopolisacáridos complejos, nos conduce a llevar a cabo una caracterización completa de la especificidad de sustrato de la ScAGal. Las principales conclusiones que se aportan de este trabajo se resumen a continuación.

- I. El seguimiento de la producción de ScAGal, previo a la etapa de purificación de la proteína, utilizando el medio de cultivo YPHSM en lugar de un medio selectivo permitió detectar un aumento del rendimiento medio de la proteína secretada de 1 U/ml a 12 U/ml, y establecer el tiempo de cultivo óptimo de 96 horas para obtener la mayor cantidad de proteína extracelular.
- II. La purificación de la ScAGal por cromatografía de afinidad en columnas de níquel-seferosa resultó en una recuperación de la proteína del 75 % con un factor de purificación de 5 veces y un rendimiento total expresado en unidades totales de la enzima del 51%. Aunque el factor de purificación es inferior que cuando se utilizan otro tipo de cromatografías, éste es suficiente para realizar los ensayos de caracterización, y además disponemos de la ventaja de obtener mayor cantidad de proteína.
- III. La especificidad de sustrato de la ScAGal expresada en porcentaje de actividad enzimática relativa fue en el orden de PNPG (100 % \pm 0.063DE), melibiosa (65 % \pm 4.75DE), rafinosa (6 % \pm 0.65DE) y estaquirosa (6 % \pm 0.39DE).
- IV. La ScAGal no actúa directamente sobre el galactomanano de algarrobo, sin embargo, el tratamiento previo de éste con la enzima β -manosidasa de *Helix pomatia* permite su acción, con un porcentaje de actividad relativa del orden de 8 % \pm 0.80DE.

- V. Los análisis de los productos de hidrólisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) muestran que alrededor del 90% de la rafinosa y estaquirosa es hidrolizada por la ScAGal a las 4 horas de reacción resultando ser una buena candidata para la hidrólisis de oligosacáridos derivados de la rafinosa (RFOs).
- VI. Mediante cromatografía de capa fina (TLC) se confirma que la ScAGal pertenece al segundo grupo de α -galactosidasas, ya que actúa sobre residuos de galactosa terminal de glucósidos sencillos como melibiosa, rafinosa y estaquirosa, y sólo puede romper el enlace de un residuo de galactosa unido a la manosa no reductora terminal (no actúa sobre galactosa unida a una manosa interna) de la cadena de oligosacáridos complejos como los galactomananos.
- VII. El estudio comparativo de especificidad de sustrato de la ScAGal con las α -galactosidasas de *Aspergillus niger* y *Cyamopsis tetragonoloba* mediante análisis de los productos de hidrólisis por TLC, muestra que la ScAGal actúa más rápido sobre los sustratos melibiosa, rafinosa y estaquirosa que la α -Gal de *A. niger*, frente a la α -Gal de *C. tetragonoloba* que no actúa o lo hace muy débilmente. Mientras que sólo la α -Gal de *C. tetragonoloba* puede hidrolizar galactomanosacáridos con uniones galactosa en posición interna de la cadena.

BIBLIOGRAFÍA

Abo-Elmagd H.I. (2014). Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Chaetomium madarasense* AUMC 9376. Romanian Biotechnological Letters Vol. 19, No1.

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). rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-54.

Chen D.C., Yang B.C., Kuo T.T. (1992). One step transformation of yeast in stationary phase. Curr. Genet 21: 83-84.

Du F, Liu Q, Wang H, Ng T. (2014). Purification an α -galactosidase from *Coriolus versicolor* with acid-resistant and good degradation ability on raffinose family oligosaccharides. World J Microbiol Biotechnol. 30(4):1261-7.

Du F, Zhu M, Wang H, Ng T. (2013). Purification and characterization of an α -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides. Plant Physiol Biochem. 69:49-53.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. The Biochemical journal 280 (Pt 2): 309-16.

Henrissat, B. and A. Bairoch (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." The Biochemical journal 293 (Pt 3): 781-8.

Fernández-Leiro R. (2011). Structural Characterization and Directed Evolution of an α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña.

Fernández-Leiro R, Pereira-Rodríguez A, Cerdán ME, Becerra M, Sanz-Aparicio J. (2010). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of alpha-galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 66(Pt 1):44-7.

Fernández Leiro R., Pereira Rodríguez A., Cerdán M.E, Becerra Fernández M., Sanz Aparicio J. (2010). "Structural Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* α -Galactosidase and Its Complexes with Natural Substrates Reveals New Insights into Substrate Specificity of GH27 Glycosidases". *Journal of Biological Chemistry* 285(36): 28020-28033.

Fialho Lda S, Guimarães VM, Callegari CM, Reis AP, Barbosa DS, Borges EE, Moreira MA, de Rezende ST. (2008). Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry* 69(14):2579-85.

Ishiguro M, Kaneko S, Kuno A, Koyama Y, Yoshida S, Park GG, Sakakibara Y, Kusakabe I, Kobayashi H. (2001). Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. strain T2 α -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 67(4):1601-6.

Kaneko R., Kusakabe I., Sakai Y. (1990): Substrate specificity of α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 7-8

Katrolia P, Jia H, Yan Q, Song S, Jiang Z, Xu H. (2010). Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. *Bioresour Technol.* 110:578-86. doi:

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

Kusakabe I., Kaneko R., Takada N., Zamora A. F., Fernandez W. L. (1990). Simple Method for Elucidating Structures of Galactomannooligosaccharides y Sequential Actions of β Mannosidase and α -Galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* 54 (4), 1081-1083, 1990

Kusakabe I., Zamora A. F., Satoru Kusama S., William L. Fernández W. L., Murakami K. (1986). Studies on the Mannanase of *Streptomyces*. VI . Structure of Copra Galactomannan and specificity of *Streptomyces* β -Mannanase to the substrate. *Japan. J. Trop. Agr.* 30 (4): 264 – 271.

Kushner, S. R. (1978) An Improved method for transformation of *Escherichia coli* with col El-derived plasmids. In *Genetic Engineering* (Boyer, H.W. and Nicosia, S., eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, 17–23.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

Lee J., Park I., Cho J. (2013). Immobilization of the Antarctic *Bacillus* sp. LX-1 α -Galactosidase on Eudragit L-100 for the Production of a Functional Feed Additive. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*; 26(4): 552-557.

Levine, B. and S. Weisman. (2004). Enzyme replacement as an effective treatment for the common symptoms of complex carbohydrate intolerance. *Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University* 7(2): 75-81.

Li S, Kim WD, Kaneko S, Prema PA, Nakajima M, Kobayashi H. (2007). Expression of rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) alpha-galactosidase genes in *Escherichia coli* and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(2):520-6.

Manucci F.(2009). Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides From Whey Permeate. (Thesis). Dublin Institute of Technology

McCleary BV. (1983). beta-D-Mannosidase from *Helix pomatia*. *Carbohydr Res.*111(2):297-310.

McCleary B. V., Taravel F.R., Cheetham N. W. H. (1982). Preparative-scale isolation and characterization of 6¹- α -D-galactosyl-(1,4)- β -D-mannobiose and 6²- α -D-galactosyl-(1,4)- β -D-mannobiose. *Carbohydr. Res.*104, 285.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426–428.

Oliva, M.; C. Alfaro e I. Palape (2010). Evaluación del potencial tecnológico de galactomananos del endospermo de semillas de *Prosopis* sp. para el uso en la industria de alimentos. *Agriscientia*, vol. xXVI (2): 107-113.

Overbeeke N, Termorshuizen GH, Giuseppin ML, Underwood DR, Verrips CT. (1990). Secretion of the alpha-galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 56(5):1429-34.

Porubsky S, Jennemann R, Lehmann L, Gröne HJ. (2014). Depletion of globosides and isoglobosides fully reverts the morphologic phenotype of Fabry disease. *Cell Tissue Res.*

Reiner, W. (2006). Sensitive, Quantitative, and Fast Modifications for Coomassie Blue Staining of polyacrylamide gels. *Practical Proteomics.*

Ryan, M., R. Jones and R. Morse (1998). SWI-SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. *Molecular Cell Biology* **18**(4): 1774-82.

Simila, J., Gernig, A., Murray P., Fernandes, S. and M. G. Tuohy (2010). Cloning and expression of a thermostable alpha-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(12):1653–63.

Sambrook, J., T. Maniatis and E. Fritsch (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* CSHL Press.

Singh N.1., Kayastha A.M. (2012). Purification and characterization of α -galactosidase from white chickpea (*Cicer arietinum*). *J Agric Food Chem.*, 60(12):3253-9.

Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. (2014). *Cicer* α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chem.* 142:430-8.

Shibuya H, Kobayashi H, Park GG, Komatsu Y, Sato T, Kaneko R, Nagasaki H, Yoshida S, Kasamo K, Kusakabe I. (1995). Purification and some properties of alpha-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59(12):2333-5.

Singh N, Kayastha AM. (2012). Purification and characterization of α -galactosidase from white chickpea (*Cicer arietinum*). *J Agric Food Chem.* 28; 60(12):3253-9.

Takakuwa, N., M. Tamura, M. Ohnishi and Y. Oda (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.

Yu Y, Mena-Barragán T, Higaki K, Johnson JL, Drury JE, Lieberman RL, Nakasone N, Ninomiya H, Tsukimura T, Sakuraba H, Suzuki Y, Nanba E, Mellet CO, García Fernández JM, Ohno K. (2014). Molecular Basis of 1-Deoxygalactonojirimycin Arylthiourea Binding to Human α -Galactosidase A: Pharmacological Chaperoning Efficacy on Fabry Disease Mutants. *ACS Chemical Biology*.

Zhu, A., Goldstein, J. (1994). Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. *Gene* 140, 227–231.