

10529
7 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS
METODOLOGÍAS BIOTECNOLÓGICAS UTILIZADAS
PARA EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS
RECOMBINANTES PRODUCTORES DE PROQUIMOSINA
DE BOVINO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GABRIEL / COBIELLES CASTREJÓN

ASESORA: M. en C. PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRÉSPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Descripción y comparación de las metodologías
biotecnológicas utilizadas para el desarrollo
de microorganismos recombinantes productores
de proquimosina de bovino".
que presenta el pasante: Cobielles Castrejón Gabriel
con número de cuenta: 09656694-1 para obtener el título de:
Ingeniero en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 4 de Febrero de 2003

PRESIDENTE

Dr. Francisco Montiel Sosa
MC. Susana Patricia Miranda Castro

VOCAL

SECRETARIO

MC. Clara Inés Álvarez Manrique

PRIMER SUPLENTE

IA. Guadalupe López Franco

SEGUNDO SUPLENTE

IA. Miriam Álvarez Velasco

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A G R A D E C I M I E N T O S

... a mis padres, Elsa Laura y Manuel, por su enorme paciencia, por su incondicional apoyo y por haber confiado en mí durante todo el camino. Sin su amor y su estímulo nunca hubiese llegado hasta aquí.

LOS QUIERO MUCHO.

... a mi hermana, Adriana, quien ha caminado siempre junto a mí y con quien he compartido muchas alegrías, siendo siempre mi testigo y compañera en cada paso de mi vida.

... a todos mis amigos y amigas, por colmar mis días de buenos momentos y por brindarme siempre, sin importar la situación, su sincero cariño y apoyo. En mis mejores recuerdos siempre están ustedes.

... a mis profesores, quienes además de transmitirme sus valiosos conocimientos y el entusiasmo por aprender, me demostraron el valor de trabajar con calidad y la importancia de mantener una actitud siempre crítica y a la vez abierta.

... a los grandes científicos, hombres y mujeres tan comunes como cualquiera de nosotros, pero que con su curiosidad, con su esfuerzo y con un poco de suerte, han hecho historia, se han convertido en un ejemplo a seguir y nos han abierto el camino hacia el fascinante mundo de la Ciencia.

... a mi Universidad, por acogerme en su distinguido espacio y proporcionarme los medios para impulsarme en mi desarrollo académico y cultural. La FESC me ha dado razones de sobra para sentirme orgulloso de pertenecer a ella y considerarla mi segundo hogar.

Gracias a todos ustedes por contribuir a hacer de esta meta una realidad.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE GENERAL

I.	Índice general	I
II.	Índice de figuras	II
III.	Índice de tablas	III
i.	Objetivo	1
ii.	Introducción	2
1. Capítulo 1: Antecedentes		
1.1	El Cuajo	4
1.1.1	Definiciones de cuajo	4
1.1.2	Antecedentes históricos	5
1.2	Química de la coagulación enzimática de la leche	7
1.2.1	La leche	7
1.2.2	El queso	7
1.2.3	Las proteínas de la leche	8
1.2.4	Las micelas de caseína	9
1.2.5	Fase primaria de la coagulación enzimática	11
1.2.6	Fase secundaria de la coagulación enzimática	13
1.2.7	Reacciones secundarias producidas por la quimosina	13
1.3	La Quimosina	
1.3.1	Química de la quimosina de bovino	15
1.3.2	Estructura de la quimosina	16
1.3.3	Estabilidad de la quimosina	18
1.3.4	Solubilidad de la quimosina	18
1.3.5	Inhibidores de la quimosina	18
1.3.6	Prueba de actividad coagulante de la leche	19
1.3.7	Otros usos de la quimosina	20
1.4	Fuentes de obtención de enzimas coagulantes de la leche	
1.4.1	Enzimas coagulantes de origen animal	21

1.4.2 Enzimas coagulantes de origen microbiano	22
1.4.3 Enzimas coagulantes de origen vegetal	23
1.4.4 Quimosina recombinante	24
1.5 Tecnología del DNA recombinante	
1.5.1 Recombinación	26
1.5.2 Endonucleasas de restricción	26
1.5.3 Vectores	28
1.5.4 Expresión	30
1.5.4.1 Transcripción	31
1.5.4.2 Traducción	31
1.5.4.3 Modificaciones posteriores a la traducción	34
1.5.5 El cDNA	35
1.5.6 Inserción en el vector	36
1.5.7 Transformación de la célula hospedadora	36
1.5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2. Capítulo 2: Desarrollo de organismos productores de quimosina recombinante	
2.1 El gen de la proquimosina de bovino	41
2.2 Expresión de quimosina en procariotas	43
2.2.1 Primeros intentos de expresión de quimosina recombinante	43
2.2.2 Expresión de quimosina en <i>Escherichia coli</i>	45
2.3 Expresión de quimosina en eucariotas	48
2.3.1 Expresión de quimosina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
2.3.2 Expresión de quimosina en <i>Kluyveromyces lactis</i>	57
2.3.3 Expresión de quimosina en <i>Aspergillus spp.</i>	65
3. Capítulo 3: Importancia económica de la quimosina recombinante	
3.1 Ventajas del cuajo recombinante	78
3.2 El mercado del cuajo en México y en el mundo	79
3.3 Compañías fabricantes y productos	80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4 Normatividad	80
3.5 Aspectos sociales	81
4. Últimos avances en el estudio de la quimosina	82
5. Conclusión	84
6. Glosario	86
7. Anexos	94
8. Bibliografía	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de una micela de caseína.	9
Figura 2 Ruptura de la κ -caseína.	10
Figura 3 Sitio de acción de la quimosina.	11
Figura 4 Análisis de la hidrólisis de κ -caseína	12
Figura 5 Segmentos que componen la preproquimosina.	16
Figura 6 Estructura de la quimosina	17
Figura 7 Estructura de la pepstatina	19
Figura 8 Localización del abomaso	21
Figura 9 Proceso general para la obtención de quimosina por recombinación de microorganismos	25
Figura 10 Ejemplo de plásmidos comúnmente utilizados	29
Figura 11 Esquema de la transcripción	32
Figura 12 Traducción de un ARN mensajero	33
Figura 13 Conversión del mRNA en cDNA	36
Figura 14 Ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa	38
Figura 15 Esquema general del proceso de recombinación	39
Figura 16 Eliminación de los intrones (splicing) para la síntesis de mRNA.	42
Figura 17 Construcción de un gen ATG-proquimosina.	51
Figura 18 Construcción de un vector de expresión de levadura	53
Figura 19 Aislamiento de la región del extremo 5' del gen de lactasa	59
Figura 20 Los vectores de integración para <i>K. lactis</i> .	59
Figura 21 Mapa esquemático de los vectores de expresión pGRG1 hasta pGRG4.	67
Figura 22 Hibridación Northern comparando glucoamilasa y quimosina en una cepa de <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	70
Figura 23 Esquema que muestra los productos de transcripción y traducción dirigidos por la unidad de expresión en pGAMpR	74
Figura 24 Distribución del mercado de cuajo en México en el año 2000	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química de la leche	7
Tabla 2 Composición proteica de la leche	8
Tabla 3 Algunas endonucleasas de restricción, sus orígenes y especificidades	27
Tabla 4 Diferentes resultados en la expresión de proquimosina en procariotes	45
Tabla 5 Producción de quimosina en transformantes de <i>K. lactis</i> .	62
Tabla 6 Producción de quimosina en <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i> .	63
Tabla 7 Rendimiento extracelular de quimosina y glucoamilasa en cultivos de transformantes seleccionados de <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> .	69
Tabla 8 Comparación de niveles de quimosina intracelular vs. extracelular producidos por transformantes de <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> pGRG1.	72
Tabla 9 Comparación de niveles intracelulares vs. extracelulares de quimosina y glicoquimosina producidos por <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> GC12.	73
Tabla 10 Productos y fabricantes de enzimas coagulantes de la leche de origen microbiano.	80
Tabla 11. Cuadro comparativo de microorganismos recombinantes productores de proquimosina de bovino.	85

i. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es el de proporcionar un material informativo que ofrezca al estudiante universitario de ciencias químicas y biológicas a nivel licenciatura un panorama general sobre el origen, naturaleza química, función, utilidad y nuevos procesos de obtención de la enzima quimosina (Ec 3.4.23.4). De manera más específica, dar a conocer a detalle la metodología que se ha seguido para lograr la eficiente expresión del gen heterólogo de la quimosina de bovino en microorganismos de uso industrial y ofrecer un análisis comparativo del desempeño entre éstos. Todo con la intención de brindar un apoyo más para el desarrollo de la tecnología de los lácteos y de la producción de enzimas recombinantes de uso alimentario en nuestro país.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ii. INTRODUCCIÓN

Pocos alimentos reúnen tantas propiedades positivas como el queso. Por tradición, por su sabor característico, por su inmensa variedad, por sus numerosas aplicaciones culinarias, por su alta calidad nutricional, el queso se ha ganado un lugar privilegiado en las mesas de millones de familias alrededor del mundo. Su consumo en México alcanza hoy las 150 mil toneladas al año y, a nivel mundial, la producción rebasa los 15 millones de toneladas anuales¹⁴.

Un componente indispensable dentro del procesamiento de la leche para la fabricación del queso es el *cuajo*. Este preparado es el encargado de propiciar la coagulación de la leche para permitir la formación de la masa proteica sólida que después de ser desuerada, salada y comprimida se convierte en queso. El componente enzimático que le da al cuajo su poder coagulante se llama *quimosina*.

Durante muchos años, la única fuente de quimosina que se utilizó fue la de origen animal, extraída del cuarto estómago de bovinos lactantes. Sin embargo, a finales del siglo XX los industriales del queso predijeron una grave crisis en torno al mercado del cuajo. Esto debido, por un lado, a la creciente demanda de queso y, por el otro, al aumento en la demanda de carne de bovino adulto, razones que disminuirían drásticamente la disponibilidad del valioso extracto. De este modo, la industria se vio obligada a buscar nuevas formas de obtención de cuajo, haciéndose uso de otras fuentes de origen animal y otras de origen microbiano.

Hoy son muchos los avances logrados en producción alimentaria con ayuda de las nuevas tecnologías. Tal es el caso de la *biotecnología*. Con los nuevos conocimientos adquiridos en materia de bioquímica, biología molecular e ingeniería genética, ha sido posible desarrollar novedosos métodos de producción que elevan el rendimiento, mejoran la calidad y disminuyen los costos de los métodos ya existentes. Dentro de estas nuevas técnicas hay una que ha resultado muy ventajosa para la industria quesera, se trata de la modificación genética de ciertos microorganismos para la obtención de una quimosina idéntica a aquella de origen bovino que permitirá una mejor disponibilidad de cuajo y que podrá satisfacer a menor costo la enorme demanda actual (más de 10 millones de litros anuales de cuajo en todo el mundo). La descripción integral de esta novedosa técnica biotecnológica es el objetivo del presente trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 1

ANTECEDENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 1: ANTECEDENTES

1.1 EL CUAJO

1.1.1 DEFINICIONES DE CUAJO

Cuajo y *quimosina* son dos términos que en muchas ocasiones son usados indistintamente, sin embargo, para su estudio es necesario entender la diferencia entre ambos. Las siguientes definiciones ayudarán a comprender mejor esta diferencia y a aclarar cuál será el sentido que se les dé a dichos términos en el presente trabajo

[1] *Cuajo*. Extracto proveniente del estómago de los mamíferos lactantes. Contiene una enzima que coagula la leche, llamada *quimosina* o *renina*, que es el principio activo de las preparaciones utilizadas en la fabricación de queso.¹⁰

[2] *Cuajo*. Toda aquella preparación enzimática coagulante de la leche que contenga a la enzima digestiva *quimosina* o alguna otra enzima proteolítica de origen animal, vegetal o fúngico.⁴

El cuajo tradicional de uso industrial se comercializa en presentación líquida (aunque también existen presentaciones en polvo y pastilla), su color característico varía entre el ámbar claro y oscuro. Entre sus ingredientes, aparte de la enzima específica, se encuentran los conservadores propionato y benzoato de sodio, sal, alcohol y propilén glicol.²⁹

Fuerza y dosificación: Generalmente el cuajo es de fuerza 1:10,000, con lo cual se indica que con un litro de cuajo coagulan hasta 10,000 litros de leche. Sin embargo esta fórmula es sólo aproximada, ya que el valor depende tanto de las características propias de la leche, como de las condiciones del proceso.²⁹

1.1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Es amplia la creencia de que el queso se originó en las tierras fértiles entre el Tigris y el Eufrates, en lo que es el actual Iraq, hace 8000 años. Es muy probable que el queso se originara de manera accidental en alguna etapa de la pre-historia cuando el hombre se percató del valor nutritivo de la leche producida por sus animales domésticos. Desafortunadamente la leche es también una fuente rica de nutrientes para las bacterias, algunas especies utilizan el azúcar de la leche, la lactosa, como fuente de energía y la transforman en ácido láctico. Tal crecimiento puede ocurrir durante periodos de almacenamiento de la leche. Cuando se ha producido suficiente ácido, la proteína de la leche se coagula para formar un gel. Los primeros productos lácteos fermentados pudieron haberse creado de esta manera. Éste se cree es el origen de un grupo de quesos, los quesos ácidos. Miembros modernos de este grupo son el queso *cottage* y el queso-crema.³⁴

Mientras que el ácido láctico se cree que fue el coagulante original de la leche, otro mecanismo alternativo fue descubierto en épocas tempranas. Muchas enzimas proteolíticas pueden modificar el sistema proteico de la leche, ocasionando que se coagule bajo ciertas condiciones. Debí observarse que los estómagos de animales jóvenes sacrificados frecuentemente contenían leche cuajada, como pudo haberse observado también en el vómito de infantes humanos. El almacenamiento de alimentos en bolsas hechas con estómago era una práctica común, bajo tales

circunstancias la leche extraería enzimas coagulantes del tejido estomacal llevando a la coagulación durante el almacenamiento.^{3,4}

La manufactura del queso obviamente acompañó a la expansión de la civilización a través del Medio Oriente, Egipto, Grecia y Roma. Existen varias referencias hacia el queso en escritos antiguos como en el Viejo Testamento y en la literatura griega clásica. La manufactura del queso se estableció sólidamente en los tiempos del imperio romano y se estandarizó como componente destinado a la dieta de los soldados romanos. El queso debió haberse vuelto popular entre los civiles romanos puesto que el emperador Diocletiano (284-305 d.C.) fijó un precio máximo para el queso. Las grandes migraciones de gente a través de Europa tras la caída del imperio romano debió promover la difusión de la manufactura del queso. Posiblemente el agente que más contribuyó al desarrollo de la tecnología del queso y a la evolución de las variedades de queso fueron los monasterios y los estados feudales. Los monasterios hicieron una contribución considerable al avance de la agricultura en Europa y al desarrollo y mejoramiento de los productos alimentarios, especialmente los vinos y los quesos.^{3,4}

En la Europa del siglo XIX algunos granjeros vendían extractos de cuajo de vaca en pequeñas cantidades para responder a las necesidades de la elaboración de queso casero. En 1874, un químico danés fundó un laboratorio en Copenhague y puso en marcha la elaboración industrial de cuajo de ternera, extraído de los estómagos de las terneras sacrificadas para carne, proceso que ha perdurado hasta nuestros días.⁵

1.2 QUÍMICA DE LA COAGULACIÓN ENZIMÁTICA DE LA LECHE

1.2.1 LA LECHE

La leche es el líquido opaco blanquecino segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos para la alimentación de sus crías. La leche más empleada para el consumo humano es la de origen bovino. La leche está formada por glóbulos de grasa suspendidos en una solución que contiene lactosa, proteínas y sales de calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio y azufre. La leche entera está compuesta en un 80 a un 90 % de agua (ver tabla 1).

Tabla 1. Composición química de la leche.

Componente	Contenido (%)
Agua	87
Grasa	4
Proteína	3.6
Lactosa	4.6
Cenizas	0.8

Fuente: Dalgleish, 1987

1.2.2 EL QUESO

El queso es el producto alimenticio sólido o semisólido derivado de la separación de los componentes sólidos de la leche (cuajada) de los líquidos (suero). La fabricación de queso generalmente involucra la acidificación de la leche (normalmente a pH 6.5 usando cultivos iniciadores que convierten la lactosa en ácido láctico), seguida por una coagulación, el corte de la cuajada y el drenado del suero. La cuajada es entonces salada, moldeada y puesta a madurar para obtener el queso terminado.⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La gran mayoría de los quesos son producidos por coagulación enzimática aunque algunos otros son coagulados con ácido o una combinación de ácido con calor.⁴ En el presente trabajo sólo se describirá el proceso químico involucrado en la formación y desarrollo de la cuajada del queso por vía enzimática.

1.2.3 LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

Las proteínas de la leche se dividen comúnmente en dos grandes grupos dependiendo de su comportamiento por acidificación a pH 4.6 (ver tabla 2). La fracción soluble, llamada "proteína del suero", está constituida por varias proteínas diferentes; las más importantes son la α -lactalbúmina y β -lactoglobulina. La fracción insoluble, llamada "caseína entera", está constituida por diferentes caseínas nativas: α -s-1 caseína, α -s-2 caseína, β -caseína y κ -caseína; estas proteínas están asociadas con un número variado de grupos fosfato y, en el caso de la κ -caseína, con una fracción de carbohidrato.¹⁹

Tabla 2. Composición proteica de la leche

Proteína	Contenido (%)
<i>Caseínas</i>	
α s1-caseína	32
α s2-caseína	8
β -caseína	32
κ -caseína	8
	80
<i>Proteínas del suero</i>	20
Total	100

Fuente: The University of Reading, 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las α -s-1, α -s-2 y β -caseínas son más ricas en grupos fosfato y se distinguen de las κ -caseínas por su tendencia a la precipitación en presencia de iones de calcio. La κ -caseína está constituida por dos fracciones diferentes con respecto a su solubilidad, la primera de estas (1-105 aa.) se caracteriza por la presencia de residuos hidrofóbicos, la segunda (106-169 aa.), a la cual se unen además grupos de carbohidratos, manifiesta una marcada naturaleza hidrofílica.¹⁹ Esto convierte a la κ -caseína en el componente clave para estabilizar al total de las caseínas y mantenerlas en suspensión.

1.2.4 LAS MICELAS DE CASEÍNA

La mayor parte de la caseína (95%) existe en asociación con el fosfato de calcio formando estructuras coloidales llamadas micelas de caseína, las cuales miden 20 a 300 nm de diámetro. Las micelas están formadas de partículas más pequeñas de caseína agregadas llamadas submicelas, y la mayor parte de la κ -caseína se encuentra en la superficie exterior exponiendo parte de su cadena proteica⁴ (ver figura 1).

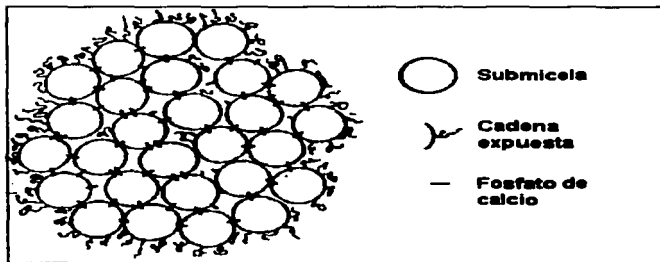


Figura 1. Estructura de una micela de caseína. (Fuente: Dalglish, 1987)

La porción que ocupa las dos terceras partes correspondientes al extremo N de la molécula de caseína es hidrofóbica y es llamada *para- κ -caseína*. La tercera parte restante del extremo carboxilado es hidrofílica, aniónica, y es llamada fracción soluble de *glicomacropéptido*.⁴ Esta fracción interacciona con el solvente para estabilizar la micela. (ver figura 2)

El extremo N-terminal (*p- κ -caseína*), está asociado con las caseínas hidrófobas alfa y beta y el fosfato de calcio coloidales, y por lo tanto se proyecta en cierta medida hacia el interior de la micela. El resto (macropéptido de caseína) sobresale de la superficie para cubrir a la micela en forma de vellosidad.⁴

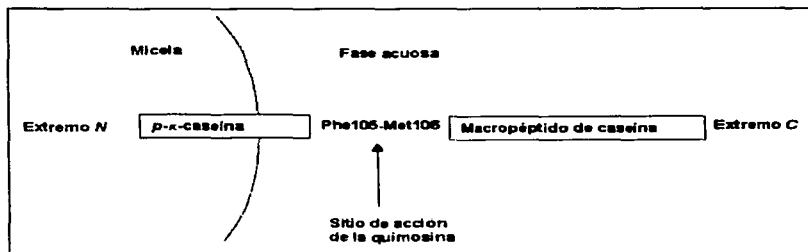


Figura 2. Ruptura de la κ -caseína (Fuente: Dalglish, 1987)

Antes de que el cuajo sea agregado a la leche, las micelas no muestran tendencia a agregarse, por dos razones: (1) Los extremos expuestos de κ -caseína son aniónicos, dando a las micelas una carga negativa general y un potencial ζ entre -10 y -20 mV. La repulsión electrostática produce de esa manera una barrera al acercamiento entre micelas. (2) Las capas exteriores no pueden interactuar y, por lo tanto, la agregación y coagulación son impedidas por efectos estéricos. Por consiguiente, la región hidrofílica de κ -caseína protege a las micelas de la agregación y la formación de coágulos.⁴

La coagulación enzimática es un proceso que se da en dos fases. En la primera fase las micelas de caseína son desestabilizadas como resultado de la proteólisis, mientras que la segunda fase consiste en la agregación de las micelas desestabilizadas para formar un gel.⁴

1.2.5 FASE PRIMARIA DE LA COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

La acción principal de la quimosina es hidrolizar la κ -caseína en el enlace peptídico localizado entre los aminoácidos Phe105 y Met106 (ver figura 3) [consultar *código de una y tres letras para aminoácidos* en el anexo II]. Este enlace es también mucho más susceptible a la hidrólisis ácida que cualquier otro enlace peptídico en la molécula debido a la estructura primaria y la conformación de los aminoácidos más próximos. La κ -caseína es, por consiguiente, dividida en la *para*- κ -caseína hidrofóbica, la cual se queda unida a la superficie de la micela de caseína, y el macropéptido hidrofílico de caseína, el cual se desprende de la superficie de la micela, lo cual es acompañado por una reducción de potencial ζ hasta -5 a -7 mV. De esta manera las repulsiones estéricas y electrostáticas entre las micelas son notablemente reducidas y las micelas se desestabilizan.⁴

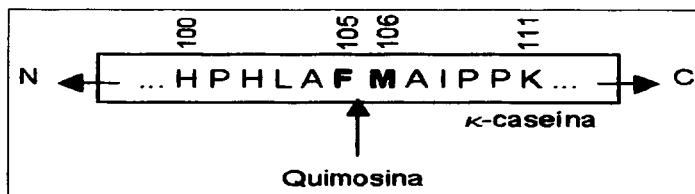


Figura 3. Sitio de acción de la quimosina (Fuente: The University of Reading, 1996)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La velocidad de la hidrólisis de la κ -caseína es afectada por la concentración de quimosina, la concentración de Ca^{++} , fuerza iónica, temperatura y pH^4 . El pH óptimo está en el rango de 5.1 - 5.4 en términos de actividad catalítica específica del enlace Phe-Met, y de 4.0 en términos de actividad proteolítica en general.⁴⁶ Sin embargo, existe suficiente actividad en la quimosina al pH natural de la leche (6.6 - 6.8) para que ocurra la coagulación. Muchos quesos son coagulados después de una previa acidificación hasta pH 6.4 - 6.6.⁴ En la figura 4 aparece el resultado de una prueba de electroforesis de la hidrólisis de κ -caseína con quimosina. Se manejaron diferentes condiciones de pH y tiempos. Se pueden apreciar la κ -caseína, sus dos productos principales (el macropéptido de caseína y la *para*- κ -caseína) y también los productos secundarios de la hidrólisis⁴⁶.

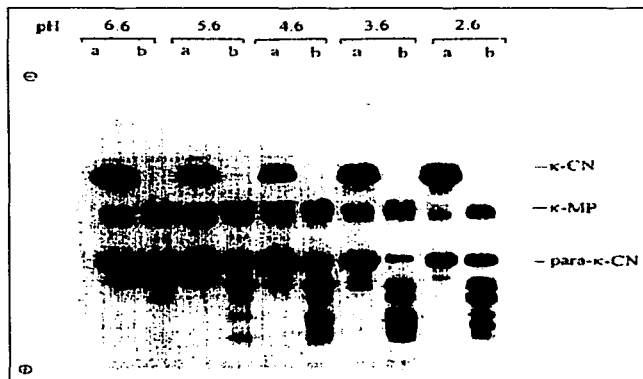


Figura 4. Análisis de la hidrólisis de κ -caseína. (a) incubación por dos minutos, (b) incubación por 3 horas. Los productos son κ -caseína (κ -CN), macropéptido de caseína (κ -MP), *para*- κ -caseína (*para*- κ -CN) y otros péptidos. (Fuente: Reid, 1997)

1.2.6 FASE SECUNDARIA

Cuando la mayor parte de la κ -caseína ha sido hidrolizada las micelas se desestabilizan hasta un nivel crítico. Las micelas entonces comienzan a agregarse y la velocidad de agregación se incrementa hasta que todos los macropéptidos de caseína estabilizantes han sido removidos. Al inicio las micelas forman estructuras de tipo cadena las cuales se enlazan para formar una red de gel que atrapa a los glóbulos de grasa (en caso de estar presentes). Para cuando la coagulación puede ser apreciada a simple vista, la formación de la red ya se encuentra bastante desarrollada.⁴

El proceso de agregación involucra fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas, así como atracciones electrostáticas entre los aminoácidos de moléculas de caseína de micelas adyacentes. La presencia de Ca^{++} es crítica en este mecanismo para la neutralización de cargas superficiales y para la formación de enlaces entre micelas. Además el fosfato de calcio coloidal es esencial para la coagulación. El tiempo de coagulación con cuajo se puede por lo tanto reducir con la adición de Ca^{++} y factores que afecten la distribución de calcio en la leche (por ej. ajustes de pH).⁴

1.2.7 REACCIONES SECUNDARIAS PRODUCIDAS POR LA QUIMOSINA

El enlace Phe105-Met106 de la κ -caseína es el sitio de proteólisis principal de la quimosina. Sin embargo, ésta no es la única reacción de la que es responsable. Se han realizado nuevos estudios donde se investiga el efecto de la quimosina sobre otros tipos de caseína presentes en la leche (α_1 -caseína y β -caseína) e inclusive sobre los mismos productos de su reacción principal (la para- κ -caseína y el macropéptido de caseína). Reid *et al.* (1997) reportan que la hidrólisis secundaria de la κ -caseína varía con el pH y que esta hidrólisis se vuelve apreciable al pH $\square$ 5.6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aquellos productos de hidrólisis de la para-k-caseína pueden tener algunas implicaciones en la maduración del queso, aunque hasta la fecha, sólo los derivados de la α_{s1} - y β -caseínas han sido identificados en extractos de queso solubles en agua. Es posible que los péptidos derivados de la para- κ -caseína jueguen algún papel en la digestión y bioactividad de los productos lácteos⁴⁶. McSweeney, P. L. *et al.* reporta péptidos derivados de la hidrólisis de α_{s1} -caseína de bovino con quimosina⁵². Awad *et al.* (1998) identifican a las α_{s1} -I y β -I, II, y III como fragmentos de degradación de las α_{s1} - y β -caseínas. Todos estos compuestos se encontraron de manera similar en caseína entera de vaca, búfalo y cabra al hacerse reaccionar con quimosina recombinante. La excepción fue la β -I de cabra, que presentó mayor resistencia a la hidrólisis.⁴⁹

1.3 QUÍMICA DE LA QUIMOSINA

La *quimosina* (EC. 3.4.23.4; *chymosin*, en inglés) es el componente enzimático activo del cuajo encargado de llevar a cabo la hidrólisis específica de la κ -caseína en la leche y que desencadena el proceso de coagulación. Otros nombres con los que se conoce a la quimosina son: *renina*, *proteasa aspártica*, o *enzima coagulante de la leche*. Sin embargo, No deben ser considerados como sinónimos estrictos, ya que pueden diferir según el enfoque bajo el cual se les trate.

La quimosina pertenece a un grupo de enzimas denominadas proteasas aspárticas, dentro de este grupo se incluyen todas las enzimas de origen animal y microbiano que realizan una función proteolítica y que presentan dos grupos de aspartato en su sitio activo. Ejemplos de éstas son la pepsina porcina, endothiapepsina, mucorpepsina, renina de ratón, renina humana, proteasa A de levadura y proteasa de VIH.⁹

1.3.1 QUÍMICA DE LA QUIMOSINA DE BOVINO

La quimosina es sintetizada *in vivo* como *preproquimosina*. Está caracterizada como una proteína de 365 aminoácidos (consultar secuencia de la quimosina en el anexo III). La *pre*-secuencia inicial hidrofóbica de 16 aminoácidos es una secuencia señal que es importante en la secreción de quimosina a través de la membrana celular. La *pre*-secuencia está seguida por una *pro*-secuencia de 42 aminoácidos (ver figura 5). Es bien sabido que la quimosina es secretada como un zimógeno inactivo llamado *proquimosina*, que tiene un peso molecular de 40,777 Dalton (Da) cuyo estado activo es controlado por el *pro*-péptido N-terminal. A pH ácido, el precursor sufre una transformación por activación autocatalítica a quimosina (peso molecular de 35,600 Da, 323 aminoácidos, observada a pH 5.0) o *pseudoquimosina* (337

aminoácidos, observada a pH de 2.0). Ambos, quimosina y pseudoquimosina (ver figura 5), muestran actividad de coagulación en la leche. Existen dos formas alélicas de quimosina de ternera denominadas como quimosinas A y B, respectivamente. Estas formas difieren en un sólo aminoácido, un aspartato en vez de glicina en la posición 244. La forma A tiene una actividad ligeramente más específica sobre la κ -caseína pero es marginalmente menos estable que la forma B. La quimosina exhibe un rango de pHs óptimos. Los pHs óptimos para las quimosinas A y B de estómago de ternera se han reportado como pH 4.2 y 3.7 respectivamente, usando sustratos sintéticos.⁶

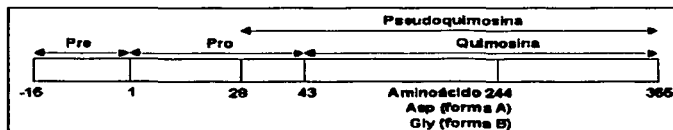


Figura 5. Segmentos que componen la preproquimosina. (Fuente: Mohanty, 1999).

1.3.2 ESTRUCTURA DE LA QUIMOSINA

La estructura cristalina de la quimosina recombinante de bovino ha sido determinada usando datos de rayos-X extendidos a resolución de 2.3 Å. La enzima tiene una forma irregular con dimensiones máximas aproximadas de 40 x 50 x 65 Å. La estructura secundaria consiste principalmente de cadenas beta paralelas y anti-paralelas con algunas alfa-hélices cortas (ver figura 6). La enzima puede ser subdividida en dominios N- y C-terminales, los cuales están separados por una hendidura profunda que contiene a los residuos aspárticos activos Asp34 y Asp216 (de ahí su nombre de proteasa asoártica). Los aminoácidos y las moléculas de agua en el sitio activo forman una extensa red de enlaces de hidrógeno que mantiene la simetría de doble plegamiento de la estructura entera.⁵⁸

Una comparación de quimosina con otras proteasas ácidas revela la alta similaridad estructural con otros miembros de esta familia de proteínas así como sutiles diferencias que hacen única a la quimosina. En particular, Tyr-77 en la región del doblez de la quimosina no forma enlace de hidrógeno con Trp-42, pero se extiende hacia afuera formando interacciones hidrofóbicas con Phe-119 y Leu-32. Esto tiene implicaciones importantes en cuanto al mecanismo de unión al sustrato y especificidad.⁵⁸

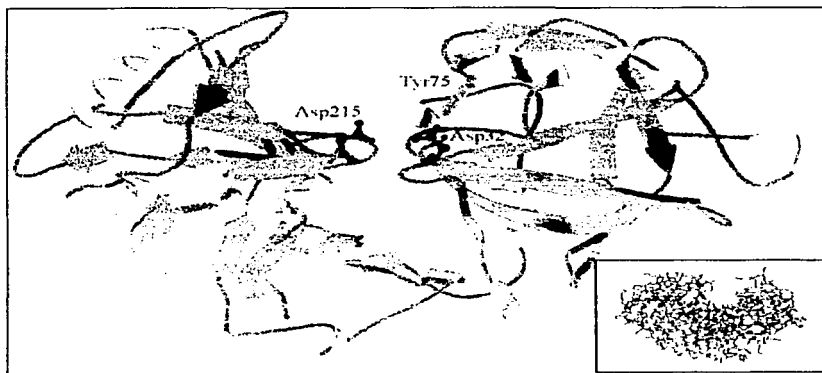


Figura 6. Estructura de la quimosina. Las imágenes permiten apreciar la forma bilobular de la molécula, la hendidura del sitio activo y los aminoácidos de mayor importancia en el mismo.

(Fuente: Lantbruks-universitet, Suecia. 2001)

Existe una evidente disparidad en cuanto a la numeración de los aminoácidos en la secuencia de la quimosina entre fuentes bibliográficas diferentes. Esto debido probablemente a diferencias en resultados reportadas por investigadores de la enzima en cuanto a secuenciación o a la asignación del aminoácido #1 al hacer la

enumeración. Se recomienda prestar atención a esta situación si el lector desea profundizar en torno a la estructura de la quimosina.

1.3.3 ESTABILIDAD

La quimosina es más estable a valores de pH entre 5.3 y 6.3. Sin embargo, su función biológica la puede realizar inclusive a pH 2. Bajo condiciones ácidas (pH 3-4) la enzima pierde su actividad con mayor rapidez, causado probablemente por una autodegradación, mientras que a valores de pH alcalinos (por arriba de 9.8) la pérdida se debe a un cambio conformacional irreversible. La pérdida en la actividad en la quimosina A es mayor que en la quimosina B, lo que hace a esta última la más estable de las dos. La quimosina es más estable a 2°C que a temperatura ambiente.⁹ La inactivación térmica de la enzima comienza a los 50°C y a los 61°C ya es total.²⁰

1.3.4 SOLUBILIDAD

La solubilidad de la quimosina es afectada por el pH, la temperatura y la fuerza iónica de la solución. La quimosina no cristalizada es soluble en una solución que contenga NaCl 1M y a pH 5.5. La quimosina es insoluble en soluciones > NaCl 2M. La quimosina cristalizada muestra una mayor solubilidad a 25°C que a 2°C. A valores de pH cercanos al punto isoeléctrico (4.5) y fuerza iónica de 0.005 la quimosina es muy insoluble; la solubilidad aumenta incrementando la fuerza iónica.⁹

1.3.5 INHIBIDORES

Todas las proteasas aspárticas son inhibidas por la pepstatina (ver figura 7), a través de la unión del grupo hidroxilo de la estatina con los dos aspartatos catalíticos. La pepstatina es un péptido con un peso molecular de 685.9 Da, su estructura se

compone de Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta, donde Sta = estatina = ácido (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico³⁶. Las constantes de inhibición (K_i) de la pepstatina para la quimosina determinados a pH 6.0 y 3.2 son $2.2 \times 10^{-7} \text{M}$ y $3.2 \times 10^{-8} \text{M}$ respectivamente. Dado que la pepstatina es relativamente poco efectiva hacia la quimosina de bovino, se han desarrollado inhibidores análogos. Uno de éstos incluye al péptido R(CO)NH-Leu-Ser-Sta-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys (R=grupo acilo) el cual tiene un valor de K_i 20 veces mejor que la pepstatina a pH 6.0 y aproximadamente 10 veces mejor a pH 3.1.⁹

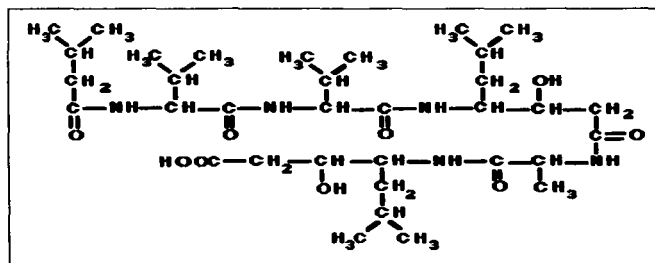


Figura 7. Estructura de la pepstatina (Fuente: Université François Rabelais, 2002)

1.3.6 PRUEBA DE ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE

La determinación de actividad coagulante de la leche para una preparación enzimática dada se realiza por medio de pruebas donde una muestra de la enzima coagulante se pone en contacto con una suspensión de leche deshidratada descremada añadida con CaCl_2 y se incuba bajo condiciones controladas. El tiempo transcurrido hasta la formación del primer coágulo determina las UCL/ml del preparado enzimático, donde UCL significa unidades coagulantes de la leche. UCL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

se define como la cantidad de quimosina capaz de coagular 10 ml de leche en un minuto a 30°C. Las técnicas más utilizadas son las descritas por Emtage *et al.* (1983) y Foltmann (1970).

1.3.7 OTROS USOS DE LA QUIMOSINA

Algunos investigadores han encontrado usos muy novedosos para la actividad específica de la enzima quimosina. Un ejemplo de esto lo describen Walsh, M. K., *et al.* quienes han investigado el uso de la secuencia de la k-caseína sensible a la quimosina como una secuencia unión para proteínas de fusión. El objetivo es expresar los genes fusionados de straptavidina y de cloranfenicol acetiltransferasa en *E. coli*. Al unir a estas dos proteínas usando la secuencia de k-caseína de aminoácidos 97 a 113, se puede hacer la posterior separación de las enzimas haciendo un corte por hidrólisis con quimosina⁵⁶.

1.4 FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS COAGULANTES DE LA LECHE

1.4.1 ENZIMAS COAGULANTES DE ORIGEN ANIMAL

Los extractos enzimáticos de origen bovino (cuajo bovino) han sido utilizados tradicionalmente para la coagulación de la leche en la manufactura del queso. Son extraídos del abomaso o cuarto estómago de terneros o bovinos adultos (ver figura 8). El cuajo extraído de los estómagos de terneros lactantes tiene un alto contenido de *quimosina*, mientras que el cuajo obtenido de estómagos de bovinos adultos es de alto contenido de *pepsina*.

Extracto proveniente de abomaso de ternero lactante²⁰:

(masa de quimosina activa / masa de pepsina activa) ≥ 1.38

Extracto proveniente de abomaso de bovino adulto²⁰:

(masa de quimosina activa / masa de pepsina activa) $\square 0.154$

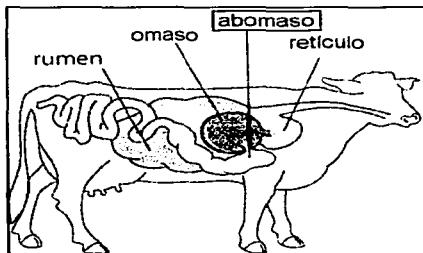


Figura 8. Localización del abomaso.

(Fuente: The American Heritage Dictionary of English Language, 2000)

El abomaso es separado del resto de los reservorios gástricos y del duodeno, pasa por un secado, una posterior maceración y después se realiza una extracción de la enzima en medio acuoso. La quimosina de bovino es comúnmente considerada como la enzima ideal para la fabricación de queso, esto se debe a su alta especificidad y la elevada relación que presenta en su actividad coagulante frente a su actividad proteolítica. Además que presenta una mínima actividad residual después de realizada la etapa de coagulación.⁷ La relación entre la actividad coagulante y actividad proteolítica de la quimosina de bovino es 1.5 veces mayor que cualquiera de origen microbiano.⁶ Otra enzima coagulante de origen animal de uso comercial es la pepsina de cerdo, normalmente se vende mezclada con quimosina de bovino²⁹. A pesar de que la pepsina se asemeja a la quimosina de bovino en algunas propiedades, su uso como sustituto al 100% de quimosina animal en la manufactura de queso es limitada debido a su tendencia a formar péptidos amargos. Además, el sabor del queso producido con pepsina es generalmente pobre.⁴⁹

A pesar que animales como el búfalo, cabra, borrego y conejo son considerados como buenas fuentes de cuajo, no han sido estudiados extensamente para su explotación comercial.⁶ Sin embargo existen algunos trabajos experimentales que demuestran algunas diferencias entre cuajo bovino y cuajo de borrego, siendo el primero de menor actividad proteolítica que el segundo durante la etapa de maduración del queso, aunque las diferencias en cuanto a características sensoriales es poco notoria.^{42,45}

1.4.2 ENZIMAS COAGULANTES DE ORIGEN MICROBIANO

Los coagulantes microbianos fueron desarrollados a inicios de los años 70 como sustituto de los cuajos de origen animal¹². Actualmente la industria quesera utiliza estos cuajos de origen fúngico especialmente de *Mucor miehei* y *Mucor pusillus*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(mucorpepsina), *Endothia parasitica* (endothiaepsina) y *Aspergillus oryzae*⁶. Todos estos microorganismos producen proteasas de manera natural, es decir, en el estado nativo de estas cepas.

El cuajo microbiano ha reemplazado buena parte del cuajo de origen bovino, más de la mitad de la producción mundial de queso está basada en el cuajo microbiano. Sin embargo, la demanda de quimosina animal, está aún en aumento dados los problemas asociados con el cuajo microbiano.⁶ Las proteasas microbianas son de estructura similar a la de la enzima bovina y todas tienen la especificidad necesaria para la κ -caseína. Sin embargo, no se les considera adecuadas para quesos de maduración larga pues tienen un rango diferente de actividades no específicas y no producen los sabores correctos en maduración prolongada.⁸ Se le considera *actividad no específica* a toda aquella acción proteolítica de las enzimas coagulantes diferente a aquella de la acción de hidrólisis específica del enlace Phe105-Met106 en la κ -caseína realizada por la quimosina de bovino.

1.4.3 ENZIMAS COAGULANTES DE ORIGEN VEGETAL

Está muy poco difundido el uso de enzimas coagulantes de origen vegetal. Algunos ejemplos se encuentran en países mediterráneos, en Chile y en Argentina donde se utiliza un cuajo llamado cardoon obtenido a partir del género *Cynara* para fabricar algunos tipos de queso casero. En el sur de Angola, los extractos de raíces y hojas de varias plantas pertenecientes a las Papilionoideas como *Eriosema psoraleoides* y *Adenolichos anchieta* son usados para productos lácteos caseros suaves³⁸. No se ha extendido su uso probablemente debido a su bajo poder coagulante comparado con sus homólogos de origen animal y microbiano.

1.4.4 QUIMOSINA RECOMBINANTE

Algunos microorganismos han sido modificados genéticamente para producir quimosina idéntica a la enzima obtenida de bovinos. Ésta puede ser utilizada para producir queso de mejor calidad que con los cuajos fúngicos u otros cuajos de animales diferentes al bovino. En 1988, la quimosina fue la primera enzima procedente de una fuente genéticamente modificada en ser aceptada para su uso en alimentos (consultar anexo IV). Estas enzimas se comportan exactamente de la misma manera que la quimosina de bovino, pero su actividad es más predecible y presentan menos impurezas. Se ha logrado la expresión del gen de la quimosina bovina en organismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* spp. y *Kluyveromyces lactis*, obteniendo de cada uno características diferentes en cuanto a modo y velocidad de producción de la enzima.²

El proceso para la obtención de quimosina a partir de microorganismos genéticamente modificados puede dividirse en cinco pasos generales (ver figura 9): (1) el aislamiento del mRNA que codifica para la quimosina presente en el estómago de ternero, (2) la conversión del mRNA a cDNA, (3) su introducción por transformación con vectores de recombinación al interior de un hospedador apropiado, (4) el crecimiento del microorganismo en condiciones adecuadas para la expresión del nuevo gen y (5) la recuperación y activación de la proquimosina producida.

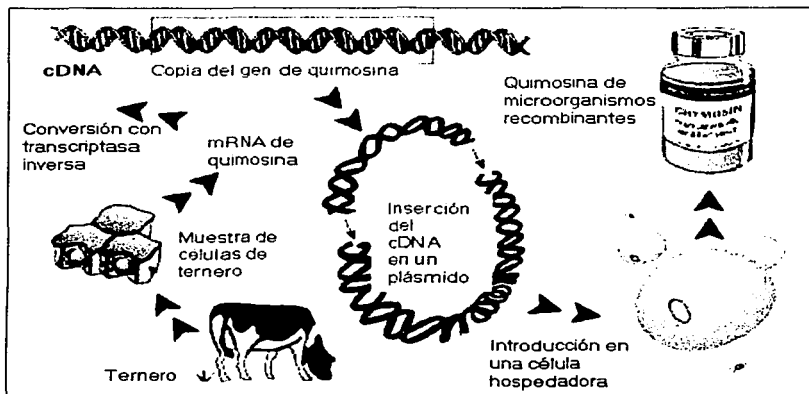


Figura 9. Proceso general para la obtención de quimosina por recombinación de microorganismos.
(Fuente: The University of Reading, 2001)

1.5 TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE

1.5.1 RECOMBINACIÓN

El desarrollo de tecnologías tales como la del DNA recombinante (rDNA), la fusión de células (anticuerpos monoclonales), la ingeniería de proteínas, y el cultivo de células vegetales datan de finales de los años setenta. Sin embargo, fue el descubrimiento de la tecnología del rDNA, popularmente conocida como ingeniería genética, la causa del auge actual de la biotecnología. La tecnología del rDNA ha supuesto un salto en la investigación básica gracias a tres innovaciones que han ocurrido simultáneamente. La primera fue el descubrimiento y acceso comercial a las endonucleasas de restricción, que reconocen y cortan secuencias de nucleótidos específicas dentro de la molécula de DNA. La segunda fue la creación y purificación con alto rendimiento de vectores de clonación artificiales (por ej., plásmidos de DNA en los que se han introducido artificialmente marcadores y sitios de restricción), y la tercera innovación fue la habilidad para transformar células e identificar los transformantes que contienen clones recombinantes. Utilizando únicamente estos tres procedimientos, se puede conseguir DNA recombinante *in vitro*.²¹

La palabra *clonar*, en el presente trabajo, es usada para expresar la acción de incorporar DNA foráneo al DNA de un vector determinado y multiplicarlo.

1.5.2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Para poder insertar DNA foráneo dentro de un plásmido, se hace uso de enzimas especiales llamadas *endonucleasas de restricción*. Estas enzimas reducen moléculas largas de DNA hasta fragmentos cortos, pero no hidrolizan el DNA de manera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

completa sino que reconocen secuencias de 4 a 11 nucleótidos de longitud y cortan en el centro (ver tabla 3).

Tabla 3. Algunas endonucleasas de restricción, sus orígenes y especificidades		
Enzima*	Fuente	Especificidad
EcoR I	<i>Escherichia coli</i>	-G A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A C-
Hae III	<i>Haemophilus aegyptus</i>	-G-G C-C- -C-C G-G-
BamH I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-G G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G G-
Bgl II	<i>Bacillus globigii</i>	-A G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G A-
Hind III	<i>Haemophilus influenza</i>	-A A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A A-
Hpa I	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	-G-T-T A-A-C- -C-A-A T-T-G-
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	-C-T-G-C-A G- -G A-C-G-T-C-
Sau3A I	<i>Staphylococcus aureus</i>	- G-A-T-C- -C-T-A-G -
*La nomenclatura en el organismo en el que se descubrió la enzima. La primera letra mayúscula es la primera letra del género, las dos siguientes las de la especie. El número romano denota el orden de descubrimiento.		
Fuente: Byong, 1996		

El origen de las endonucleasas se encuentra en microorganismos capaces de producir enzimas que modifican y digieren o rompen el DNA. Estos sistemas, llamados de *modificación-restricción*, son análogos a un sistema inmune, los cuales probablemente evolucionaron como un mecanismo de protección de los microorganismos contra infecciones virales. En efecto, las bacterias, por ejemplo, son infectadas por *bacteriófagos*, que inyectan su propio DNA en la célula bacteriana. En algunas bacterias el DNA propio está modificado en ciertas secuencias. Una enzima de modificación se desliza sobre la hebra de DNA, y cada vez que se topa con su secuencia blanco, por ejemplo GAATTC, introduce un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pequeño grupo químico en la adenina (A) central (metilación). Otra enzima, la enzima de restricción, también se desliza en la hebra de ADN, y si encuentra la secuencia GAATTC, corta el ADN en esa posición. La enzima, sin embargo, no corta el ADN modificado, por lo que efectivamente es capaz de degradar el ADN extraño que puede entrar a la célula, sin alterar el ADN propio⁴⁰.

Los cortes producidos por algunas endonucleasas de restricción pueden dar extremos romos, afectando a las dos hebras del DNA en el mismo punto, o dar extremos cohesivos al cortar las dos hebras en puntos distintos a unos cuantos nucleótidos de distancia. Los dos extremos cohesivos son complementarios y tienden a aparear de nuevo por medio de puentes de hidrógeno.²¹ Los fragmentos de DNA foráneo son insertados en vectores plasmídicos que han sido cortados con la misma enzima o una que produzca el mismo extremo complementario.

1.5.3 VECTORES

En el contexto de la tecnología del DNA recombinante, un vector es la molécula de DNA utilizada para introducir DNA foráneo a las célulasceptoras. Los vectores de DNA recombinante incluyen plásmidos, bacteriófagos y otras formas de DNA. Los *plásmidos* son moléculas de DNA de doble cadena autoreplicativos y extracromosómicos que se encuentran a menudo en las bacterias y en algunos eucariotas inferiores (ver figura 10). La mayoría son circulares, pero también existen algunos lineales. Un requisito esencial para lograr una aplicación práctica con éxito en la manipulación genética es la disponibilidad de un vector adecuado, que asegure la replicación y conservación tanto del DNA vector como del DNA foráneo integrado.²¹

Un vector de clonación útil debe tener (1) un origen de replicación *ori* en el plásmido (esto es, una secuencia de nucleótidos que dirige y controla la replicación

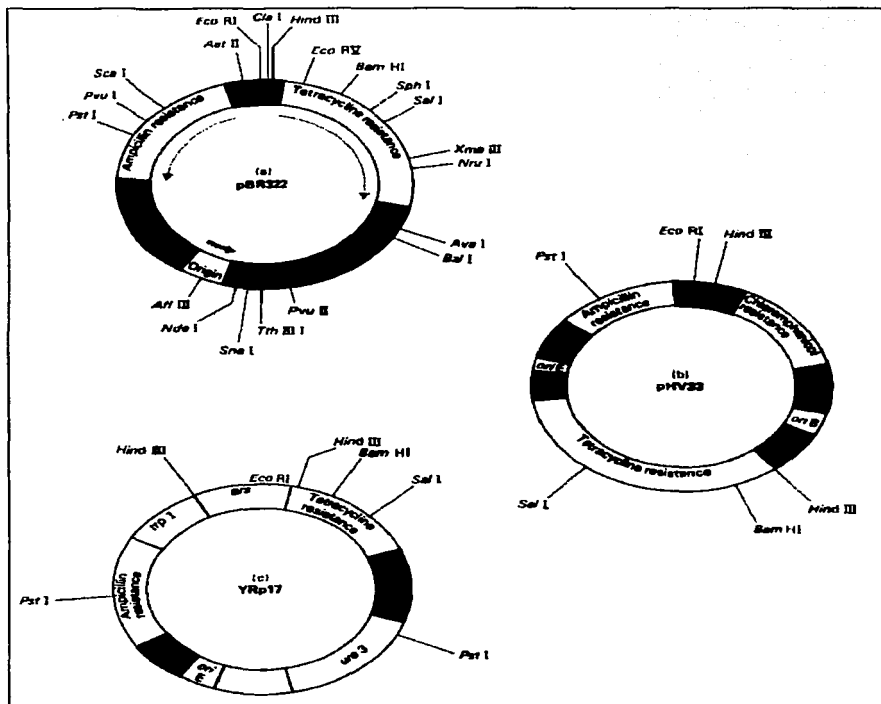


Figura 10. Ejemplo de plásmidos comúnmente utilizados, aparecen con sus sitios de restricción, marcadores de resistencia y orígenes de replicación.
(Fuente: Primrose, 1991)

de modo que cada célula contenga un número razonablemente constante de copias de plásmido), (2) marcadores fenotípicos como genes de resistencia a antibióticos que faciliten la identificación de las células que han sido transformadas, por ejemplo, la adquisición de la resistencia a ampicilina, (3) genes marcadores con sitios de restricción únicos para uno o más endonucleasas de restricción diferentes, y (4) un tamaño molecular lo más bajo posible ya que un tamaño bajo normalmente va acompañado de un alto número de copias, y porque esta propiedad favorece que el material sufra menos daño por las fuerzas físicas de cizalla durante la preparación.²¹

Los vectores pueden ser plásmidos, pero pueden ser también partículas víricas (DNA con el potencial de codificar virus). Los vectores tradicionales tales como la serie pBR y los vectores 2 μ m para levadura, son plásmidos, mientras que la serie lambda está basada en bacteriófagos. Otros virus como el T7, son utilizados también, y fracciones de ellos han sido usadas en la construcción de otros vectores más exóticos como los *cósmidos*. Los cósmidos son utilizados en clonaciones genéticas a gran escala, son plásmidos que pueden ser empaquetados dentro de partículas víricas lambda, pero solamente cuando se manejan fragmentos de DNA foráneo con más de 40 kilo bases.²³

Algunos tipos de vectores integran su DNA al cromosoma de sus hospedadores. Ejemplos son los YIps (yeast-integrating plasmid), un plásmido que se puede insertar a sí mismo en el cromosoma de levaduras y vectores retrovíricos para células de mamífero. Otros vectores de clonación para levadura, como los YEps (yeast episomal plasmids) basados en el plásmido 2 μ m se mantienen separados del cromosoma como lo hace un plásmido bacteriano.²³

1.5.4 EXPRESIÓN

La expresión se realiza en los siguientes pasos:

1. transcripción de DNA a mRNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. traducción de mRNA a secuencias polipeptídicas
3. en algunos casos, modificación de la proteína posteriores a la traducción

En muchos eucariotas existe un paso adicional previo a la traducción, la remoción de secuencias no codificantes del mRNA (splicing).²²

1.5.4.1 TRANSCRIPCIÓN

La transcripción de DNA a mRNA está mediada por la enzima RNA polimerasa. El proceso comienza con la unión de la RNA polimerasa a los sitios de reconocimiento en el DNA llamados *promotores*. Después de la unión, la RNA polimerasa viaja a lo largo de la molécula de DNA hasta encontrar una señal de terminación (ver figura 11). Los genes aislados en ciertas maneras en como la clonación de cDNA o la síntesis artificial, no tienen su propio promotor y deben ser insertados en un vector cerca de un sitio promotor. Aún cuando un gen clonado posea su propio promotor, este promotor puede no funcionar en la nueva célula hospedadora. En tales circunstancias el promotor original debe ser reemplazado por otro más efectivo.²²

1.5.4.2 TRADUCCIÓN

La traducción de mRNA a proteína es un proceso complejo que involucra la interacción del mensajero con ribosomas. Para que la traducción ocurra el mRNA debe incluir un sitio de unión para ribosoma (rbs) delante del gen a ser traducido. Después de la unión, el ribosoma se desplaza a lo largo del mRNA e inicia la síntesis de proteína en el primer codón AUG que encuentra. Éste continúa hasta que se encuentra con un codón de terminación (UAA, UAG o UGA). Si el gen clonado no contiene un sitio de unión a ribosoma es

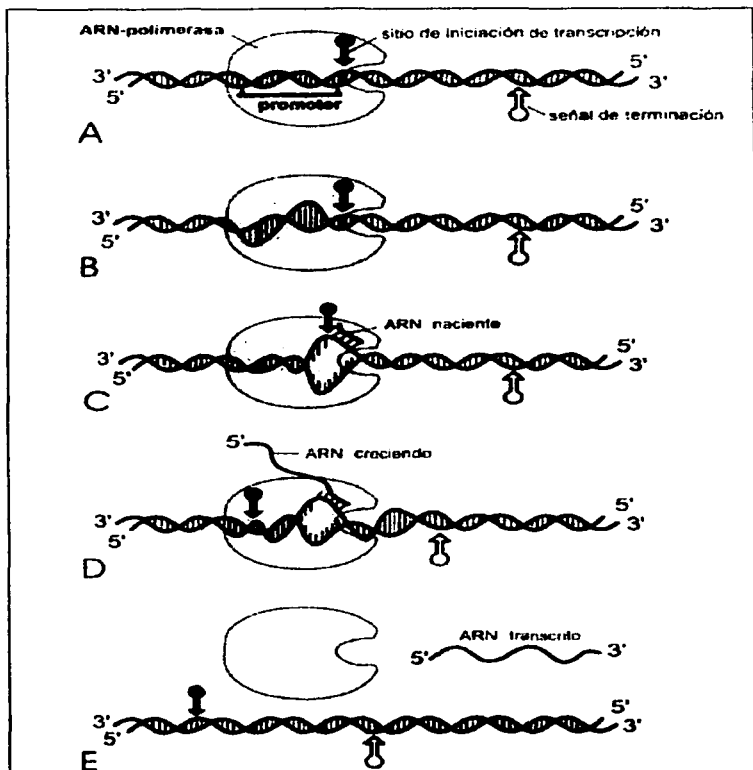


Figura 11. Esquema de la transcripción: A) Llegada de la ARN- polimerasa a su promotor; B) desdoblamiento de la doble hélice para que se inicie la síntesis de ARN; C) iniciación de la síntesis de ARN; D) alargamiento del ARN a medida que se desplaza la polimerasa; E) el ARN transcrito se desprende ya completo, al igual que la polimerasa. (Fuente: ILCE, 2002)

necesario utilizar un vector en el cual el gen pueda insertarse tanto después de un promotor como de un rbs.²² El proceso de traducción del mRNA consiste de tres fases: iniciación, elongación y terminación (ver figura 11). Este proceso es en esencia idéntico en todos los casos, a pesar de las diferencias de tamaño entre las subunidades ribosómicas de procariotas y eucariotas.²¹

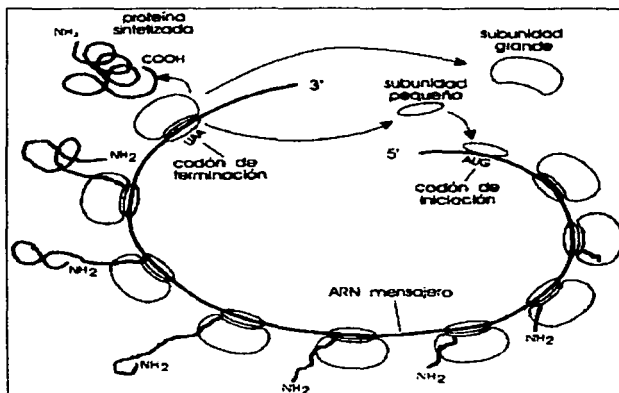


Figura 12. Traducción de un RNA mensajero y síntesis de la proteína que codifica (Fuente: ILCE, 2002)

La *iniciación* requiere una interacción específica entre el rRNA de la subunidad ribosómica pequeña y el *sitio de unión al ribosomas (rbs)* o la *secuencia consenso* (AGGAGGU) denominada *secuencia Shine-Delgarno del mensajero*. Esta secuencia Shine-Delgarno (SD) que está localizada a unas 10 bases del codón de iniciación (AUG) es complementaria al extremo hidroxilo 3' del rRNA de la subunidad pequeña y es necesaria para la formación del complejo de iniciación junto con el N-formil metionil-tRNA^{met} y los factores

de iniciación. Los rbs's de los diferentes genes varían casi mil veces en eficiencia relativa, y por ello es importante que la señal de iniciación de la traducción pueda modificarse para conseguir una secuencia SD eficiente para el organismo hospedador y una distancia óptima entre el SD y el codón de iniciación.²¹

La *elongación* es la fase de la traducción en la que el mRNA es decodificado en la dirección 5' a 3' y en la que se sintetiza la cadena polipeptídica comenzando por el amino terminal. Este proceso es en esencia similar tanto en células procariotas como eucariotas.²¹

La *terminación* ocurre hasta que se alcanza un codón sin sentido (UAG, UAA, o UGA), lo que provoca la liberación de la proteína resultante por la subunidad grande del ribosoma.

Existe una diferencia importante en la expresión de genes entre procariotas y eucariotas. En los procariotas no existe un núcleo celular, por lo que la transcripción y la traducción se dan simultáneamente; en los eucariotas ambos procesos se dan por separado ya que el transcrito (mRNA) debe abandonar el núcleo para poder continuar con la traducción en los ribosomas.

1.5.4.3 MODIFICACIONES POSTERIORES A LA TRADUCCIÓN.

Cierto número de proteínas sufren modificaciones posteriores a su traducción. Las proteínas destinadas a ser transportadas fuera de la célula son sintetizadas con 15–30 aminoácidos extra en su extremo amino (extremo-N). Estos aminoácidos extra son llamados *secuencia señal* y una característica común de estas secuencias es que tienen un esqueleto central de aminoácidos

hidrofóbicos flanqueados por residuos hidrofílicos o polares. Durante el paso a través de la membrana la secuencia señal es cortada de la molécula proteica.²²

Un pequeño número de proteínas son sintetizadas como *pro*-proteínas. Esto significa que hay una secuencia adicional de aminoácidos en el extremo N que cumple alguna función estructural pero la cual es eliminada antes de que la proteína se active y se vuelva totalmente funcional.²²

Otra modificación posterior a la traducción que ocurre de manera natural en la construcción de muchas proteínas es la adición de oligosacáridos a algunos aminoácidos. Este proceso de *glicosilación* ocurre, por ejemplo, en la síntesis de interferón antiviral. Las bacterias no pueden glicosilar los productos de genes mamíferos. Las levaduras pueden glicosilar proteínas pero el mecanismo difiere de aquel mediado por células animales. Cuando la correcta glicosilación es necesaria la opción más recomendable es expresar el gen correspondiente en una célula de mamífero.²²

1.5.5 EL cDNA

Como los genes de los eucariotas superiores contienen intrones (regiones no codificadoras) y no podrían ser procesados directamente en una bacteria, el DNA para clonación generalmente se obtiene con una reacción de la *transcriptasa inversa*, que convierte el mRNA en *DNA complementario* (cDNA).²¹ El mRNA se aísla del organismo original. En el caso de la quimosina el mRNA sería obtenido de las células gástricas de bovino lactante, dado que éstas son ricas en mRNA específico de quimosina de la cual los intrones ya han sido eliminados (ver figura 13). Una vez

obtenido el cDNA por transcripción inversa, el cual lleva la información genética ininterrumpida, se puede proceder a su inserción en un vector²².

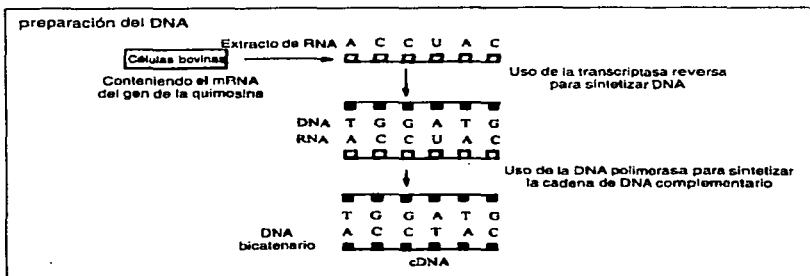


Figura 13. Conversión del mRNA en cDNA (Fuente: Byong, 1996)

1.5.6 INSERCIÓN EN EL VECTOR

Normalmente el vector se corta con la misma enzima de restricción que la utilizada para generar los fragmentos de DNA cromosómicos. Los vectores linealizados se incuban junto con el fragmento a unir en presencia de DNA ligasa, que une de manera covalente los extremos cohesivos de las moléculas de DNA. De la mezcla de ligación, algunos plásmidos contendrán un fragmento de DNA híbrido recombinante (o quimérico).²¹

1.5.7 TRANSFORMACIÓN DE LA CÉLULA HOSPEDADORA

Los recombinantes resultantes se introducen en la célula hospedadora por el proceso de transformación (ver figura 15). En este proceso la mezcla ligada de plásmido se introduce en una suspensión de bacterias previamente tratadas con una solución fría de CaCl_2 . Tras este tratamiento, las células se mezclan con el DNA plasmídico a

introducir, se da un breve choque térmico y se les permite recuperarse. Se pueden obtener hasta 107 transformantes por microgramo de DNA, que es suficiente para el propósito de clonación. Recientemente la electroporación se ha convertido en un método muy eficiente de introducción física de DNA en bacterias. La electroporación emplea cortos pulsos eléctricos de un determinado voltaje, que alteran la permeabilidad de las membranas de modo que las moléculas de DNA pueden entrar en la célula.²¹

1.5.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR fue reportada por primera vez en 1985; de esa fecha hasta ahora esta metodología ha experimentado numerosas modificaciones, siendo la más importante de ellas la ocurrida en 1986 donde se introdujo por primera vez el uso de una polimerasa termoestable, la *Taq polimerasa*, lo cual implicó un cambio radical en la técnica y su definitiva aceptación por la comunidad científica internacional⁶⁰.

Durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se multiplica un fragmento de ácido nucleico hasta 10^9 veces, la reacción imita un fenómeno de replicación del DNA que ocurre en forma natural en la célula. La reacción *in vitro* necesita la presencia de una cadena de DNA *diana* o *template* donde está incluido el fragmento que se puede amplificar, un par de *cebadores* o *primers* (cadenas simples de DNA, entre 15-30 nucleótidos) que limitan la talla del segmento que se va amplificar, nucleótidos que son precursores de las nuevas cadenas de DNA (adenina, timina, guanina y citosina) y la enzima polimerasa, *taq polimerasa*, la cual usando como inicio los cebadores va a formar las cadenas nuevas⁶⁰.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

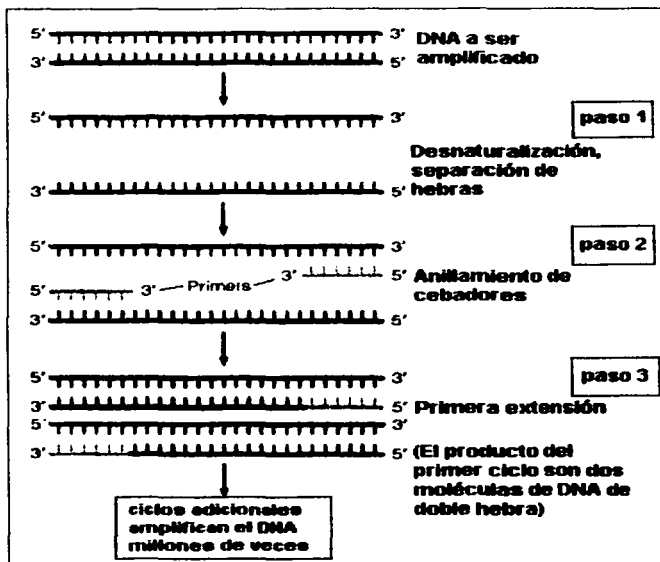


Figura 14. Ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa. (Fuente: UCLA, 2002)

La reacción tiene lugar en tres pasos (ver figura 14). Durante el primero o desnaturalización el fragmento original de DNA se calienta hasta una temperatura de 92° a 96 °C; esto provoca la separación de las dos cadenas. En el segundo paso, llamado hibridación, la temperatura de la mezcla se rebaja hasta 40-60 °C para que los cebadores se enlacen con el DNA escindido. En el tercer paso de extensión o polimerización, la temperatura de la mezcla se eleva hasta 72 °C para la extensión,

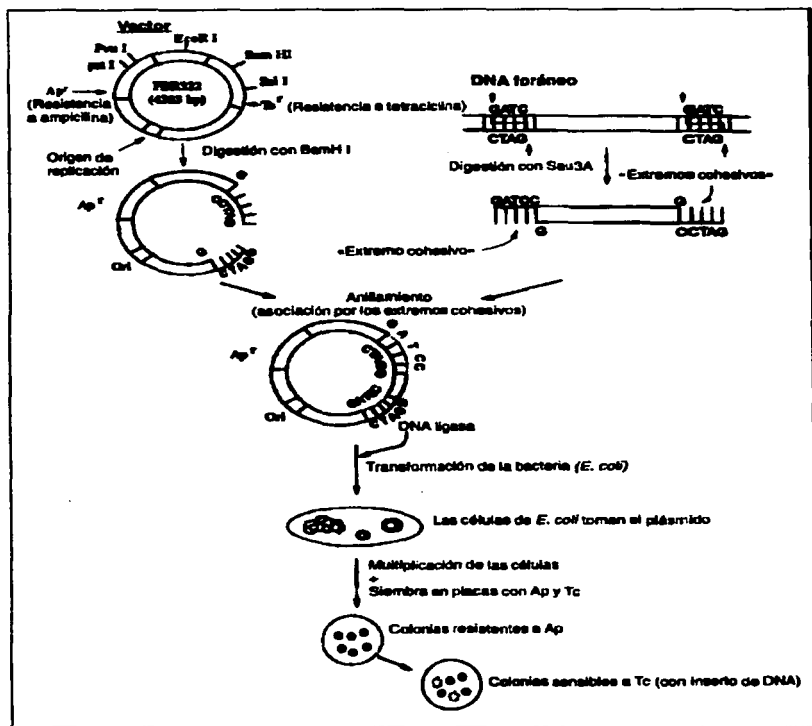


Figura 15. Esquema general del proceso de recombinación. Clonación de un fragmento cromosómico foráneo utilizando un plásmido (pBR322) como vector y las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sau*3AI, transformación de *E. coli* y expresión del gen foráneo que le confiere resistencia a antibióticos. (Fuente: Byong, 1996)

la enzima la *Taq DNA polimerasa* la cual es termoestable, copia rápidamente la molécula de DNA⁶⁰.

Estas tres etapas constituyen un ciclo completo de PCR, que se realiza en menos de dos o tres minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir sin límite, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores suelen renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir mil millones de copias de ADN⁶⁰.

Esta característica identifica a la PCR como una herramienta poderosa y valiosa en todos los campos de la Biotecnología. En el caso particular de la recombinación genética para la producción de quimosina, la técnica de PCR es útil para amplificar el cDNA del gen de la proquimosina una vez que se ha obtenido por transcripción inversa del mRNA y así poder clonarlo en vectores de recombinación. Puede también ser utilizada para comprobar la presencia del gen en células que han sido transformadas con el gen de la quimosina.

Capítulo 2^A

**DESARROLLO DE MICROORGANISMOS RECOMBINANTES
PRODUCTORES DE QUIMOSINA**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 2: DESARROLLO DE ORGANISMOS RECOMBINANTES PRODUCTORES DE QUIMOSINA

Una de las principales ventajas de la ingeniería genética es su capacidad potencial de producir cualquier proteína de cualquier fuente por expresión en un huésped heterólogo. En el futuro se espera que la industria de los alimentos se beneficie de la disponibilidad de una amplia gama de enzimas recombinantes como las proteasas y las enzimas generadoras de sabor. Esto ya ha sido logrado en el caso de la quimosina recombinante.¹³

2.1 EL GEN DE LA PROQUIMOSINA DE BOVINO

El gen de la proquimosina de ternero abarca aproximadamente 10.5Kb y consiste de 9 exones y 8 intrones.⁶ En los eucariotas superiores, la mayoría de los genes cromosómicos contienen secuencias de intrones lo que interrumpe las secuencias de codificación para la traducción a proteínas. Cuando estas secuencias son transcritas en células eucarióticas, los intrones son omitidos en el transcrito de mRNA (ver figura 16) y la subsecuente traducción genera proteínas con secuencias de aminoácidos correctas. Como las células procariotas no cuentan con este mecanismo de omisión de intrones, los genes obtenidos a partir de cromosomas eucarióticos no pueden ser expresados correctamente en bacterias. Por consiguiente, el procedimiento general para la clonación del gen que codifica para la quimosina de ternero es sintetizar ADN complementario (cDNA) a través de la transcripción inversa de mRNA en el cual han sido omitidos los intrones. La secuencia completa del cDNA de la proquimosina de bovino aparece en el anexo III.

Las células altamente especializadas dentro de los tejidos de la capa mucosal del abomaso, frecuentemente contienen grandes cantidades de mRNA que codifica para

la preproquimosina. Esto provee la base para el aislamiento del mRNA específico para facilitar la clonación. El RNA total de la capa mucosal del abomaso es aislada y el mRNA es fraccionado por cromatografía de afinidad en celulosa oligo(dT). El mRNA es transcrito inversamente a cDNA, amplificado por técnica de PCR y subsecuentemente insertado en un vector adecuado y expresado en una bacteria o levadura huésped apropiada. Fue en 1980 que Nishimori *et. al.* sintetizaron por primera vez el cDNA de la proquimosina a partir de mRNA por métodos convencionales e insertaron el cDNA dentro del sitio SAL I del plásmido pBR322, el resultado fue confirmado por hibridación de colonias y la traducción del mRNA *in vitro*.⁶

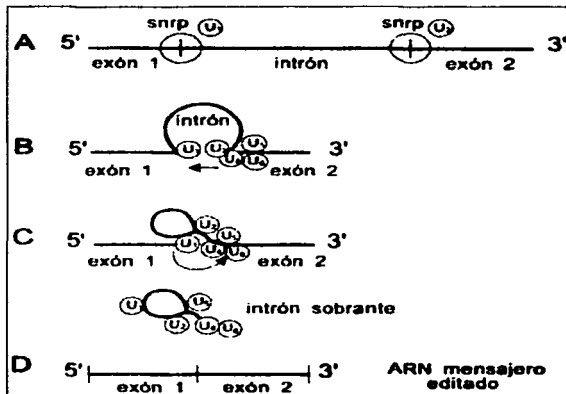


Figura 16. Eliminación de los intrones (splicing) para la síntesis de mRNA.
(Fuente: ILCE, 2002)

El gen que codifica para la quimosina ha sido insertado con éxito en numerosos vectores plasmídicos y expresado en organismos hospedadores como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus* spp. Varias formas de quimosina han sido expresadas, incluyendo la preproquimosina, met-proquimosina y met-quimosina como proteínas heterólogas.⁶

En el presente trabajo se ofrecerá una descripción con ejemplos detallados de la expresión de quimosina tanto en procariotas como eucariotas..

2.2 EXPRESIÓN EN PROCARIOTAS

2.2.1 PRIMEROS INTENTOS DE EXPRESIÓN DE QUIMOSINA RECOMBINANTE

Después de extensa experimentación en la clonación molecular y caracterización del cDNA de la proquimosina, Nishimori y colaboradores construyeron un plásmido pCR301 para la expresión de cDNA de quimosina de bovino en *Escherichia coli*, conteniendo el promotor LacUV5 frente al gen fusionado en el cual los codones de los cuatro aminoácidos N-terminales del cDNA de la proquimosina fueron reemplazados con los 10 aminoácidos N-terminales de la β -galactosidasa. Se detectó inmunológicamente la síntesis de la proteína fusionada, con el peso molecular esperado, y la proteína expresada fue localizada en la membrana celular del hospedador bacteriano.⁶

En estudios subsecuentes el cDNA para la quimosina se clonó y expresó bajo el control del promotor "triptofano" (*trp*). El procedimiento seguido fue la síntesis de Met-proquimosina donde un gen sintético construido *in vitro* tomado de un fragmento de un clon de cDNA fue insertado en los plásmidos bacterianos pCT66,

pCT67 y pCT70 inmediatamente a continuación del fuerte promotor *trp* de *E. Coli*, un sitio de unión ribosomal (rbs) funcional y el codón de iniciación ATG. La inducción de la transcripción del promotor *trp* resultó en una síntesis de proquimosina a un nivel del 5% de la proteína total.⁶

En un intento por incrementar la producción de proquimosina, Nishimori utilizó el promotor *trp* para controlar la expresión en un plásmido híbrido p501. Este plásmido contenía la codificación para la proquimosina a partir del 5° a.a. Arg fusionado con el fragmento N-terminal del gen *trp* E, precedido por las regiones del promotor *trp* y atenuador. Después de la expresión en un huésped adecuado, el sistema llevó a un incremento diez veces mayor en la síntesis de proquimosina comparada a la síntesis obtenida con el promotor *lacUV5*.⁶

En subsecuentes trabajos se hizo uso de otros promotores (*trp*-beta, gen *gly A*, triptofano, transferasa hidroximetil serina, etc)⁶ en distintos plásmidos, obteniéndose *cuerpos de inclusión* en todos los casos, es decir, agregados proteicos insolubles de proquimosina inactiva de 0.5 a 1 μ m de diámetro promedio acumulados en el interior de la célula. Éstos llegaron a representar hasta un 40% de la masa celular total. La síntesis de proquimosina como cuerpos de inclusión intracelulares causa fragilidad en la membrana celular, la pérdida de actividad respiratoria celular y su habilidad para multiplicarse.⁹

Los cuerpos de inclusión deben pasar por un proceso de (1) liberación, (2) solubilización, (3) renaturalización y (4) activación, para convertirse en quimosina con capacidad coagulante. La liberación se logra por ruptura celular por métodos físicos, químicos o enzimáticos. La solubilización se logra incubando los cuerpos de inclusión en solución buffer pH 8 con urea 8 M. Después se induce la

renaturalización a pH 10.7 para generar proteína con el doblamiento correcto y finalmente es activada a pH ácido.⁹

Dado que las proteínas insolubles requieren de un subsecuente proceso de redoblamiento previo a la recuperación de actividad enzimática, se hicieron intentos para producir proquimosina de manera extracelular.⁹ Klesen *et al.* usaron a la bacteria *Proteus mirabilis* como huésped de expresión para la secreción completa de proquimosina de bovino biológicamente activable hacia el medio a través de la fusión del cDNA de la proquimosina con el gen de la etotoxina-A pirogénica de *Streptococcus* (Spe-A), con el promotor Spe-A, rbs, y secuencia señal peptídica. La proquimosina secretada fue convertida por proceso autocatalítico en quimosina con actividad coagulante de la leche.⁶ La producción extracelular de proquimosina se logró también en *Bacillus subtilis* fusionando el gen a la secuencia señal de la subtilisina de *B. subtilis* y la producción alcanzó los 0.1 µg/ml. En *P. mirabilis* fue de hasta 40 µg/ml de fluido de cultivo libre de células.⁹

Tabla 4 Diferentes resultados en la expresión de proquimosina en procariotas.

Organismo	Vector	Promotor	Expresión	Rendimiento
<i>E. coli</i>	pCR301	LacUV	Intracelular	detectado
<i>E. coli</i>	PCT66	Trp	Intracelular	40 mg/l de cultivo
<i>B. subtilis</i>	---	subtilisina	Extracelular	0.1 mg/l de cultivo
<i>Proteus mirabilis</i>	---	Spec-A	Extracelular	40 mg/l de cultivo

Fuente: Chitpintytol, 1997.

2.3 EXPRESIÓN EN *Escherichia coli*.

Fueron muchos los avances logrados en la expresión de proquimosina en *E. coli* en los años siguientes. Las metodologías evolucionaron hasta permitir la producción de

cantidades suficientemente altas para la introducción de la enzima recombinante al mercado. Los procedimientos modernos permiten una eficiencia de 3.0 mg de quimosina por 1 g de biomasa en peso húmedo⁴³. En un inicio se tuvo dificultad por el problema de que *E. coli* no es considerado un organismo GRAS, sin embargo, más adelante la FDA permitió la comercialización de la quimosina proveniente de *E. coli* K-12, cepa que demostró ser no patogénica y no toxigénica⁴¹.

Actualmente se siguen realizando trabajos de investigación en torno al aprovechamiento de la proquimosina de producción intracelular. Se ha investigado la renaturalización de los cuerpos de inclusión de quimosina recombinante, lo cual está fuertemente relacionado con la asociación de residuos de cisteína dentro de la molécula y su correcto apareamiento para la formación de enlaces disulfuro⁴⁴. Se ha estudiado el efecto de alteraciones en la secuencia de la quimosina por mutagénesis dirigida usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las distintas mutaciones incluyeron (1) la delección de los 34 residuos del extremo C de la enzima, (2) la adición de His y Gly en el extremo C, y (3) el intercambio de Thr 77 por Asp (T77D). En todos los casos la actividad específica de la quimosina se vio disminuida, poniendo de manifiesto que las zonas de la enzima alteradas por las mutaciones están involucradas en la actividad catalítica de la misma.⁴³ También se ha estudiado el efecto de la unión de la quimosina con otras proteínas para mejorar la solubilización y renaturalización de los cuerpos de inclusión. La α -cristalina parece tener un efecto positivo en la actividad enzimática de la quimosina cuando hay altas concentraciones de cuerpos de inclusión¹⁰. Otras enzimas como la *proteína disulfuro isomerasa* (PDI) facilitan la renaturalización de la quimosina a través de la correcta formación de los enlaces disulfuro en la molécula⁵⁹.

DISCUSIÓN

Los resultados en los experimentos realizados en torno a la expresión de quimosina en *E. coli*, *B. subtilis* y *P. mirabilis* demostraron que la producción de dicha proteína heteróloga en procariotes es factible. Haciendo uso de diferentes modificaciones en los vectores de clonación se pueden conseguir notables mejoras en el rendimiento de la producción del zimógeno, como ocurre con el uso de promotores de alto rendimiento, la sustitución de los primeros codones en la secuencia de cDNA de proquimosina con los de la enzima correspondiente al promotor utilizado, o la fusión del gen de la proquimosina con el gen completo de alguna determinada proteína de rendimiento conocido en la célula hospedadora. Cabe notar que, a pesar de estas mejoras, el rendimiento final no siempre es lo suficientemente alto como para considerar a de estos organismos como productores potenciales de quimosina a nivel industrial. Sólo en el caso de *Escherichia coli* se han logrado recientemente rendimientos de hasta 3 g/Kg de biomasa. Aunque *E. coli* no es considerado como un organismo GRAS (Generally Recognized As Safe), la FDA lo ha reconocido como tal a la quimosina proveniente de la cepa K-12 por considerarla no toxigénica o patogénica. Es así que hoy día existen compañías como Pfizer que fabrican quimosina recombinante a partir de *E. coli* para su uso comercial a pesar del costo que implica el aislamiento y activación de la enzima en su estado intracelular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 EXPRESIÓN DE PROQUIMOSINA DE BOVINO EN EUKARIOTAS

Después de la extensa investigación en la clonación y expresión del gen de la quimosina en bacterias^{6,9}, la atención fue desviada hacia la búsqueda de un mejor sistema de expresión, por ejemplo, levaduras donde la proteína recombinante pudiera ser expresada a un nivel elevado y que al mismo tiempo pudiera ser secretada al medio. Esto sería ventajoso ya que la quimosina recombinante en *E. coli* es producida como cuerpos de inclusión los cuales necesitan procesamiento extenso para recuperar la proteína activa.⁶

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que combinan la facilidad para la manipulación genética con la habilidad de desarrollar procesos de eucariotas sobre los polipéptidos expresados, y por lo tanto constituyen sistemas atractivos para varios aspectos de la biotecnología moderna.²⁴

2.3.1 EXPRESIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido usada durante miles de años por la humanidad en la cervecera y en la panificación y es considerada como GRAS (reconocido generalmente como seguro). Se ha acumulado una formidable riqueza de información en genética, biología molecular y fisiología haciendo a esta especie tradicional el sistema eucariote mejor caracterizado hoy. Más de mil genes están caracterizados y la secuenciación de su genoma entero ha sido completada. Debido a las obvias ventajas descritas antes y las variadas posibilidades para influenciar su metabolismo, dirigido al incremento en la obtención de productos, muchos procesos de producción de proteínas heterólogas están basados en el empleo de *S. cerevisiae*²⁴

Los vectores utilizados para la transformación de células hospedadoras adecuadas son en general híbridos entre secuencias derivadas de (1) bacterias y (2) levaduras: (1) La porción procariota alberga un origen de replicación (*ori*) y una secuencia que confiere resistencia contra antibióticos específicos (como elementos de propagación y selección en un huésped bacteriano). (2) La porción de levadura contiene de manera similar los elementos de selección para la transformación en levaduras, por ejemplo genes de la beta-isopropilmalato deshidrogenasa (*LEU2*) y de la oritidina 5-descarboxilasa (*URA3*), para complementar una auxotropía en las respectivas cepas.²⁴

Los vectores deben de combinar: (1) un gen de alto número de copias para expresar a un alto nivel dosis-dependiente con (2) una estabilidad mitótica bajo condiciones no selectivas. Normalmente, los vectores usuales no cumplen ambos requerimientos.²⁴

Se ha logrado modificar por transformación cepas de levadura que sintetizan proquimosina de bovino activable con vectores que incluyen la secuencia que codifica para la metionil-proquimosina unida a secuencias promotoras de transcripción y terminadoras de levadura eficientes. Para alcanzar este objetivo se alteró el cDNA para la preproquimosina previamente clonado cortándolo con endonucleasas de restricción y la adición de un oligonucleótido para generar una secuencia de DNA que codificara para la Met-proquimosina. Este gen de la Met-proquimosina fue ligado a un fragmento cromosomal de levadura que contiene al promotor *GALI*, y la construcción fue insertada en un vector polifuncional *Escherichia coli*—*Saccharomyces cerevisiae* con o sin el gen terminador *SUC2* de levadura.²⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación se describe a detalle este proceso como ejemplo de una de las metodologías seguidas para la expresión de la proquimosina en el caso específico de *S. cerevisiae*. El trabajo fue realizado por el Departamento de Genética Molecular, Collaborative Research Inc. en Lexington, MA en 1983.

2.3.1.1 Construcción de la secuencia codificante de ATG-proquimosina. Con el fin de construir la secuencia codificante para la proquimosina de bovino expresable en células heterólogas, se removió la secuencia que codifica para la secuencia señal de 16 aminoácidos de la preproquimosina y se reemplazó con un codón de iniciación ATG. El DNA del fago recombinante f1 R207 fue cortado con *HindIII* + *BglII* para generar un fragmento conteniendo la secuencia que codifica para la regiones *pro*, *pre* y región inicial de la quimosina (435pb)²⁵ (ver figura 17). El acceso al inicio de la región codificante para la proquimosina se logró con el rompimiento incompleto de este fragmento con *HhaI* para generar un fragmento *HhaI*-a-*BglII* de 180 pb. El residuo cohesivo *HhaI* 3', incluyendo al residuo inicial G del primer codón de alanina de la proquimosina, fue removido por incubación con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Un oligonucleótido sintético auto-complementario de secuencia 5' dCCATCTAGATGG 3' se ligó a los extremos del fragmento; este oligonucleótido provee el residuo faltante G para el primer codón de proquimosina auténtica, un codón de iniciación ATG, y un sitio de restricción *XbaI*. El fragmento fue digerido con *XbaI* y clonado en el vector fago f1 CGF12 el cual contiene sitios únicos de restricción *XbaI* y *EcoRI* para generar al fago CGF21 (ver figura 17). El resto del gen de proquimosina fue obtenido del vector recombinante fago f1 R118/37. El gen entero fue regenerado usando el sitio único *PstI* en el DNA de proquimosina y fue clonado en pBR322 para generar al plásmido pCGE68²⁵ (ver figura 17).

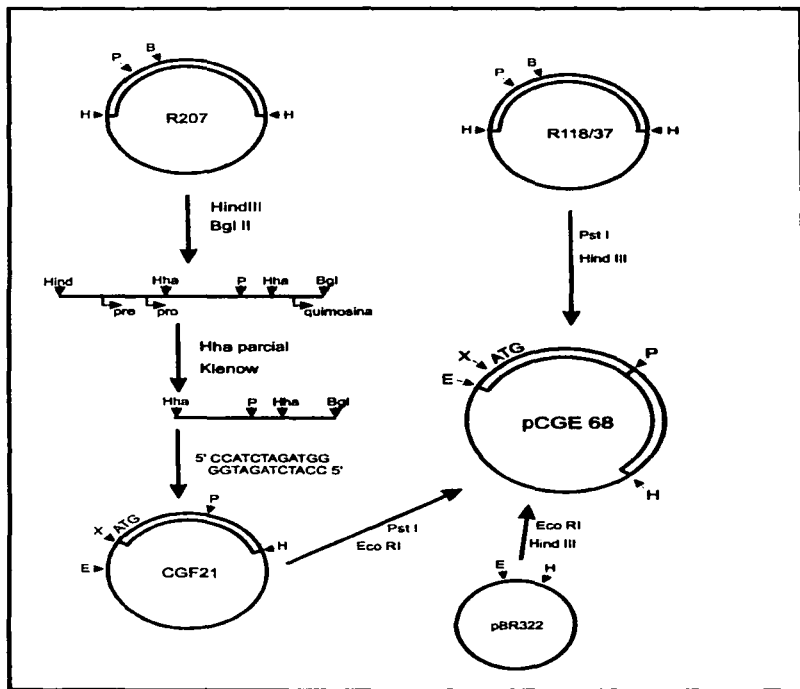


Figura 17. Construcción de un gen ATG-proquimosina. Las líneas sencillas denotan secuencias pBR322 y las líneas dobles representan secuencias de quimosina. Los sitios de reconocimiento de endonucleasas son: *HindIII* (H), *PstI* (P), *BglII* (B), *XbaI* (X), *EcoRI* (E). (Fuente: Goff, 1983)

2.3.1.2 Construcción de un plásmido diseñado para la expresión de proquimosina en levadura. Prácticamente todos los genes de levadura que han sido secuenciados contienen un residuo A en la posición -3 (A de la posición ATG define la posición +1) y un residuo T en la posición +6. La secuencia codificante para ATG-proquimosina en el pCGE68 ya contiene el residuo T en +6 pero también tiene un T en la posición -3. De acuerdo con esto, el plásmido se cortó con *Xba*I, los extremos adhesivos 5' de recortaron con nucleasa S1 para ganar acceso al codón ATG, y se ligó una secuencia unión *Sal*I (5' dGGTCGACC 3') para proveer un residuo A en la posición -3 (ver figura 18). El plásmido recircularizado, conteniendo la secuencia unión *Sal*I, se designó como pCGE91.²⁵ El promotor para la construcción se derivó de un fragmento del cromosoma II de levadura el cual contiene los promotores para los genes de *GAL1* y *GAL10* clonados en un plásmido YCp50-Sc4816AAUG. El plásmido se cortó con *Bam*HI, el cual corta un sitio prefabricado a cuatro nucleótidos en dirección 5' de la posición del codón ATG del gen de levadura *GAL1* (galactoquinasa) (ver figura 18). Los extremos adhesivos de *Bam*HI fueron truncados por tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I en presencia de los cuatro trifosfato desoxinucleósidos; finalmente el fragmento de 850 pb que contenía el promotor *GAL1* así como el promotor *GAL10* mas aproximadamente 850 bases de secuencia de *GAL10* transcrita fue liberado por digestión con *Eco*RI.²⁵

El vector para la construcción se derivó del plásmido Yip5 por adición de un origen de replicación de levadura. El fragmento de 2.2 kb *Eco*RI de la forma B 2 μ aislado del plásmido Yep21 fue posteriormente cortado con *Hpa*I y *Hind*III, tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I en presencia de los cuatro trifosfato desoxinucleósidos, e insertado en el sitio *Pvu*II del Yip5 (ver figura 18). El vector resultante pCGS40 es un vector

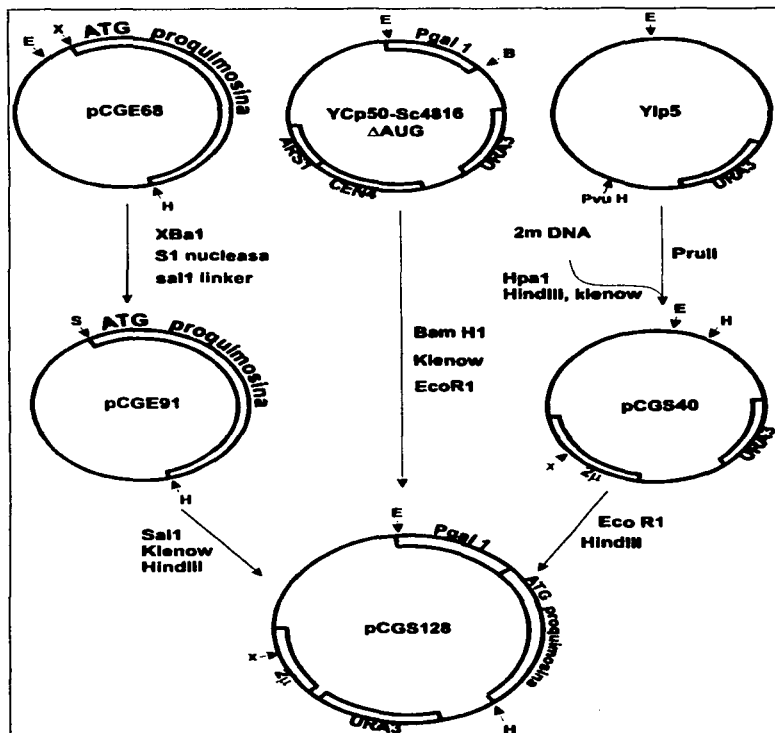


Figura 18. Construcción de un vector de expresión de levadura para metionil-proquimosina. Diagrama de la estrategia de ensamble. Las líneas sencillas denotan secuencias de pBR322 y las líneas dobles representan DNA de levadura y el gen de la proquimosina de bovino. (Fuente: Goff, 1983)

polifuncional porque contiene orígenes de replicación que funcionan tanto para *E. coli* (la región ori pBR322 del Yip59) como para *S. cerevisiae* (el fragmento 2 μ de levadura), mas marcadores seleccionables en *E. coli* (el gen *amp^r* pBR322 de Yip5) y *S. cerevisiae* (el gen *URA3* de levadura procedente de Yip5). El DNA 2 μ en el pCGS40 carece de los sitios *EcoRI*, *HindIII*, *PvuI* y *PstI* presentes en el fragmento mayor 2 μ en otros vectores polifuncionales tales como el Yep21; por lo tanto, es más conveniente para manipulaciones de subclonación.²⁵

El promotor, el gen de la proquimosina y los DNA's de vectores fueron ensamblados en una unión trimolecular. Esta reacción contenía el fragmento promotor *GAL1* desde *EcoRI* hasta *BamHI* (romos) descritos anteriormente, un fragmento desde *SalI* (con extremos truncados con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y los cuatro trifosfato desoxinucleósidos) hasta *HindIII* procedente del pCGE91 conteniendo la secuencia que codifica para la ATG-proquimosina, y el fragmento más largo del pCGS40 producido por digestión con *EcoRI* y *HindIII*. El plásmido resultante pCGS128 (ver figura 18) puede dirigir la síntesis de proquimosina de bovino en *S. cerevisiae*.²⁵

El plásmido pCGS128 no contiene señales de terminación de transcripción de levadura aparte de aquellas que pudieran estar presentes de manera fortuita más adelante después de la secuencia de proquimosina en el DNA *URA3* y 2 μ . Por lo tanto, se agregó un terminador eficiente al pCGS128 en un sitio cercano a la región que codifica para la proquimosina. Dicho terminador procede del plásmido pBR58 que contiene el gen de levadura *SUC2* (el cual codifica para invertasa) y éste a su vez procede de una biblioteca de DNA cromosomal de levadura. Al plásmido pCGS128 con el terminador *SUC2* se le denominó pCGS168.²⁵

2.3.1.3 Transcripción del gen ATG-proquimosina en levadura. Los transcritos de mRNA específicos de la proquimosina en levadura procedentes de los plásmidos pCGS128 y pCGS168 fueron examinados por hibridación de transferencia en gel. Los resultados mostraron la ausencia completa de mRNA específico de proquimosina cuando las células son crecidas en glucosa, consistente con la conocida regulación del gen *GALI*. Por otro lado, cuando se crece en galactosa, la levadura produce RNA específico de proquimosina. Los transcritos de pCGS128 y pCGS168 son de tamaños distintos, lo que indica la eficiente terminación de la transcripción en el segmento de DNA *SUC2* del plásmido pCGS168. Tras realizar pruebas de identificación de mRNA, los resultados indican que el RNA específico de proquimosina representa de 2 a 5% del RNA poliadenilado total presente en la cepa tratada.²⁵

2.3.1.4 Síntesis de proquimosina en *S. cerevisiae* y activación a quimosina: el aislamiento de las proteínas para su posterior análisis inmunológico por transferencia en gel se llevó a cabo por extracción física agitando los cúmulos celulares con partículas de vidrio de 0.3 g y centrifugación para separar los restos celulares. Los extractos preparador por este método contienen una proteína que migra en geles de poliacrilamida hasta una posición idéntica a la de auténtica proquimosina de bovino y se asocia con anticuerpos creados contra quimosina. La comparación con una cantidad conocida de proquimosina auténtica de bovino indica que 0.02% de la proteína soluble de la cepa portadora del plásmido pCGS168 es proquimosina. Extractos de la misma cepa huésped portadora de un plásmido similar sin el gen de proquimosina no contienen ninguna proteína con relación inmunológica del tamaño de la proquimosina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los resultados de los trabajos realizados en torno a la expresión de la proquimosina en *S. cerevisiae* revelan la gran variedad de factores durante la expresión que influyen en los niveles de rendimiento de la proteína heteróloga. El proceso completo, desde la selección del recombinante hasta la activación de la enzima, contiene puntos que determinan la cantidad final de quimosina activa obtenible. Del mismo modo también la habilidad de autoreplicación de los plásmidos demostró ser un factor importante, un número elevado de plásmidos recombinantes dentro de la célula de levadura promueve una mayor actividad de traducción y generación de mRNA específico de la proquimosina. Casos donde existe una abundancia de mRNA específico de proquimosina (aproximadamente 7% del RNA poliadenilado presente) en contraste con una baja cantidad de proquimosina detectada (0.5% de la proteína extraíble) demuestran que la eficiencia de la expresión depende tanto de la selección correcta de la secuencia promotora como también del método de extracción de la proteína. Hasta un 80% de la proquimosina presente en las cepas tratadas de *S. cerevisiae* no es soluble en el citoplasma tras la ruptura celular. Esta problemática en torno a la insolubilidad de la enzima se hizo presente en todas las pruebas. En otros trabajos realizados se intentó inducir la secreción de proquimosina y otras proteínas heterólogas como la β -lactoglobulina³¹ pero, aunque se lograron encontrar en el sobrenadante del medio de cultivo, las cantidades (2 mg/l) no fueron las suficientes para poder considerar a *S. cerevisiae* como potencial organismo productor de quimosina de bovino a nivel industrial.

2.3.2 EXPRESIÓN EN *Kluyveromyces lactis*

Cepas de levadura del género *Kluyveromyces* han sido utilizadas comercialmente para la producción de la enzima lactasa (β -galactosidasa) por varios años. El crecimiento de estas cepas en fermentaciones a gran escala ha sido estudiado extensamente y se han desarrollado métodos eficientes de extracción y recuperación de lactasa. Estos han resultado en útiles productos para la conversión de lactosa a glucosa y galactosa (en productos lácteos). La riqueza de conocimiento obtenida durante la utilización comercial de *Kluyveromyces* hace a éste un organismo atractivo para la producción de proteínas heterólogas.²⁶

La introducción de DNA heterólogo en *K. lactis* por transformación fue descrita por Das y Hollenberg quienes demostraron la aceptación de plásmidos auto-replicativos. Se ha aislado también de *K. drosophilarum* un plásmido circular análogo al plásmido 2 μ m de *S. cerevisiae* y ha demostrado replicarse eficientemente en *K. lactis*. Este plásmido, llamado pKD1, ha sido utilizado para la construcción de vectores de expresión heterólogos en *Kluyveromyces*.²⁶

Dado que los sistemas de expresión basados en plásmidos pueden ser inestables (por pérdida o rearrreglos del plásmido bajo condiciones no-selectivas), se buscó desarrollar un sistema de expresión de proteína heterólogo basado en secuencias integradas. Se han utilizado elementos reguladores de transcripción del gen de la lactasa de *K. lactis* y un sistema de vector integrante para la producción de proquimosina de bovino. La producción de quimosina intracelular en *E. coli* o en *S. cerevisiae* resulta en un producto insoluble que puede ser aislado solamente con el uso de un desnaturalizante de proteínas. Por medio de la fusión de una secuencia codificante para una señal de secreción con la de la proquimosina se ha logrado la

producción de quimosina extracelular de quimosina en *S. cerevisiae*, sin embargo, la eficiencia en la secreción de quimosina fue muy baja.²⁶

A continuación se describe el proceso que se siguió para la expresión de proquimosina en *K. lactis*, y su secreción dirigida por distintas secuencias señal. El trabajo de investigación fue desarrollado por Johan A. van den Berg y colaboradores en los laboratorios de Royal Gist-Brocades, Holanda en 1990.

2.3.2.1 Aislamiento de la región del extremo 5' del gen de lactasa: El gen de la lactasa de *K. lactis*, *LAC4*, fue aislado por primera vez por complementación del mutante Lac de *E. coli*. Análisis de uno de los clones, pK16, demostró que contiene una copia del gen lactasa con aproximadamente 650 pb en dirección 5' del codón de iniciación de la región del gen lactasa. Para asegurar que se incluyeran todos los elementos reguladores esenciales de la región al extremo 5' del gen de lactasa, se clonó un fragmento de DNA conteniendo una parte más larga de las secuencias en el extremo 5'. Basado en sitios de restricción previamente identificados y por análisis Southern, se clonó un fragmento XhoI conteniendo al gen *LAC4*, en el plásmido pPA153-215. La figura 19 proporciona una vista de los sitios de restricción relevantes y elementos estructurales del fragmento clonado.²⁶

2.3.2.2 Construcción de vectores de integración: Aparte del promotor del gen de lactasa, se usó también la región no codificante 3' en los casetes de expresión. Todas las variantes de los vectores de expresión fueron construidas en pUC18 o pUC19, y también contenían un marcador de selección de levadura que confiere resistencia ante el antibiótico G418²⁶. Un ejemplo típico de uno de los vectores de integración aparece en la figura 20.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

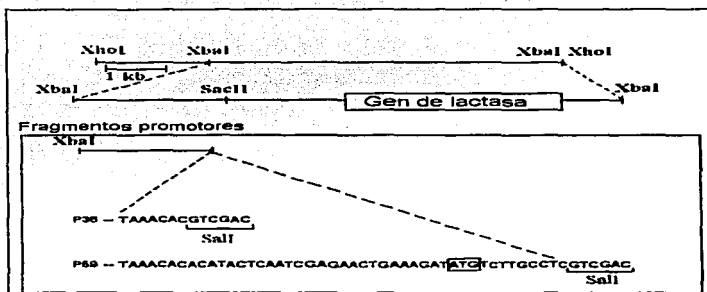


Figura 19. Aislamiento de la región del extremo 5' del gen de lactasa: Clonación y subclonación de los fragmentos promotores. El gen de la lactasa de *K. Lactis* de la cepa SL56 fue clonado en un fragmento XhoI de 12 kb. Se seleccionaron dos promotores P36 y P59 para su estudio. El p36 carece de 26 nucleótidos frente al codón de iniciación, el p59 contiene al codón ATG y 8 nucleótidos del gen estructural. Estos promotores se usaron para los vectores de expresión (fig.17). (Fuente: Van den Berg, 1990)

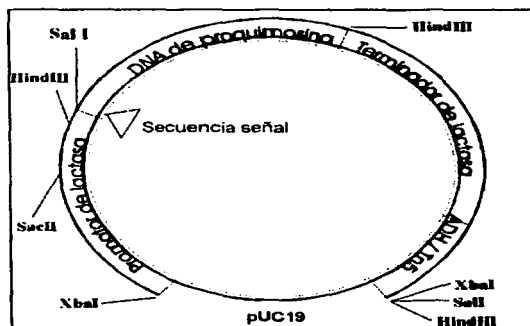


Figura 20. Los vectores de expresión contienen al promotor del gen de la lactasa (fig. 16), el DNA que codifica para proquimosina y la secuencia opcional, el terminador de transcripción de lactasa, el vector de *E. coli* pUC19 y el gene Tn5 que confiere resistencia al antibiótico G418 bajo la dirección del promotor ADH I de *S. cerevisiae*. Se indican los sitios de restricción importantes.

(Fuente: Van den Berg, 1990)

2.3.2.3 Producción intracelular de proquimosina: Primero se investigó la producción intracelular de la Met-proquimosina. Se construyeron los plásmidos pGB901 y pGB902, donde la secuencia que codifica para Met-proquimosina se encuentra bajo el control del promotor de lactasa. La única diferencia entre los dos plásmidos es el fragmento promotor usado. Cuando se usa el fragmento P₃₆ (pGB901), el codón de metionina situado frente a la proquimosina sirve como codón de iniciación de la proteína (figura 19).

En el caso del fragmento promotor P₅₉ (pGB902) el DNA que codifica para Met-proquimosina está fusionado al DNA que codifica para los primeros cuatro aminoácidos de la lactasa y cuatro aminoácidos codificados por secuencias unión. La cantidad de proquimosina producida fue cuantificada con una prueba de coagulación de la leche. Para sorpresa de los investigadores, la actividad enzimática no sólo se encontró en el interior de las células, sino que se encontró más de 80% en el sobrenadante del cultivo de levadura. Basado en datos enzimáticos e inmunológicos se concluyó que la quimosina producida tanto de manera intra como extra-celular fue completamente soluble y totalmente activa. Esto contrasta con los resultados obtenidos con *S. Cerevisiae*, donde la proquimosina producida se encuentra asociada a los restos celulares y es insoluble.²⁶

2.3.2.4 Secreción de proquimosina: Se han usado varias secuencias líder para dirigir la secreción de proquimosina en *K. lactis*. Primero, se intentó la secuencia señal homóloga de la quimosina. La secuencia codificante de la preproquimosina se colocó bajo el control del fragmento promotor de lactasa P₅₉ en un plásmido (pGB904) derivado de pGB902. A pesar de que en el producto proteico resultante algunos de los aminoácidos del gen de la lactasa fueron encontrados

fusionados a la preproquimosina, la proteína resultante fue eficientemente secretada al medio de cultivo (tabla 5).

En segundo lugar, se usaron secuencias líder de proteínas de levadura, por ej., la *pre-pro*-región de los genes α -factor de *S. Cerevisiae* y de *K. lactis*. Esta secuencia fue fusionada con la preproquimosina en un casete de expresión comparable al de aquellos descritos anteriormente, resultando en el plásmido pKS105. Más del 95% de la proquimosina producida fue encontrada en el medio de cultivo (tabla 5). Resultados similares fueron obtenidos cuando la *pre-pro*-región de *K. lactis* fue utilizada.

En tercer lugar, se emplearon exitosamente secuencias líder heterólogas a la quimosina y a la célula huésped, por ej., la secuencia señal de la amiloglucosidasa (AG) de *Aspergillus awamori* y secuencias señal sintéticas. En el caso de la secuencia líder-AG se sintetizó un fragmento de DNA codificando la secuencia líder y el sitio completo de proceso. Este fragmento de DNA fue unido a DNA codificante de proquimosina en un casete de expresión derivado de pGB902, resultando en pGB905. Después de la expresión y secreción de la proteína algunos aminoácidos extras permanecen unidos con la proquimosina, pero son removidos junto con la *pro*-región ante el tratamiento ácido de la proteína. La secuencia líder sintética fue diseñada usando aminoácidos comúnmente presentes en la posición -6 hasta +2 del sitio de corte de la secuencia señal y la secuencia de aminoácidos de la secuencia líder AG (con excepción del segundo aminoácido). El fragmento de DNA que codifica para este líder (figura 20) fue unido al DNA de la proquimosina en un casete de expresión derivado de pGB901, resultando en pGB906. Ambos, la secuencia líder-AG y la secuencia líder diseñada fueron capaces de dirigir eficientemente la secreción de quimosina al medio de cultivo (tabla 5).²⁶

Tabla 5 Producción de quimosina en transformantes de *K. lactis*. Cepa SL56 transformadas con los vectores indicados en la tabla. Los valores están expresados en unidades de coagulación de la leche.

Vector de integración	Señal de secreción	Producción de proquimosina	
		Intra	extra
pGB901	Ninguna	0.3	1.1
pGB902	Ninguna	0.5	2.2
pGB904	Quimosina	5.0	94.6
pGB905	AG	0.4	27.4
pGB906	Diseñada	---	13.1
PKS105	α -factor _{sc}	3.0	104.2

Fuente: Gist-Brocades, 1990.

2.3.2.5 Comparación de la secreción de proquimosina entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*: Con la finalidad de comparar directamente la secreción de proquimosina por *K. lactis* y *S. cerevisiae*, se construyó un plásmido pKS100. Este plásmido contiene la región que codifica para la proquimosina fusionado al líder del α -factor de *S. cerevisiae*. La transcripción fue controlada por un promotor-GAPDH de *S. cerevisiae*, esto es funcional en ambas levaduras. El plásmido pKS100 fue dirigida hacia los genomas de *K. lactis* y *S. cerevisiae* y varios transformantes fueron analizados. Los resultados en la tabla 6 muestran que los transformantes de *K. lactis* secretaron eficientemente la proquimosina hacia el medio de cultivo, mientras que los transformantes de *S. cerevisiae* secretaron sólo una pequeña fracción de la proquimosina producida. Se ha demostrado que para *S. cerevisiae* la proquimosina producida internamente se encuentra asociada a membranas celulares y a la pared celular, es altamente insoluble y puede ser aislada sólo después de su solubilización con desnaturalizantes de proteínas. Ha quedado en evidencia que uno o más de los tres enlaces disulfuro presentes en la molécula nativa no

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

se forman o se forman incorrectamente. Sin embargo, parece ser que en *K. lactis*, todos estos enlaces disulfuro se forman correctamente, sugiriendo una diferencia en el ambiente intracelular entre las dos especies.²⁶

Tabla 6. Producción de quimosina en *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Ambas cepas fueron transformadas con pKS100. Los resultados se reportan en unidades de coagulación de la leche.

Levadura	Cepa	Producción de proquimosina	
		Intra	extra
<i>S. cerevisiae</i>	AB110	<0.25	<1.0
<i>S. cerevisiae</i>	AB110::pKS100	15.5	2.3
<i>K. lactis</i>	KRN201-6	<0.25	<1.0
<i>K. lactis</i>	KRN201-6::pKS100	12.0	333.0

Fuente: Gist-Brocades, 1990

2.3.2.6 PRODUCCIÓN A MAYOR ESCALA

Una cepa (SL56) de *K. lactis* transformada con pKS105 fue seleccionada para producción de quimosina a gran escala. Esta cepa fue usada como hospedador debido a su bien caracterizadas propiedades de fermentación. La cepa seleccionada CHY1, fue analizada para determinar su estabilidad con respecto a la producción de quimosina. No se detectó ninguna disminución en la capacidad de producción después de 45 generaciones. Hibridaciones Southern confirmaron que durante 50 generaciones no ocurrieron rearreglos en los casetes de expresión integrados y que su número de copias era estable.²⁶

Con esta cepa se realizaron varias fermentaciones en planta piloto en fermentadores de 3,000, 12,000 y 41,000 litros seguidas de un procesamiento del líquido de fermentación. Se realizó un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida del sobrenadante crudo y se comparó con una preparación de cuajo de bovino

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

comercial. También se hizo una caracterización bioquímica del producto por secuenciación de aminoácidos N-terminal y determinación de estabilidad térmica. Finalmente, se compararon las características enzimáticas de la preparación con cuajo comercial, usando perfiles de degradación de caseína y pruebas de coagulación de leche. No se observaron diferencias entre la enzima producida por *K. lactis* y la enzima natural de cuajo de ternero.²⁶

DISCUSIÓN

Los resultados de los trabajos realizados en torno a la expresión del gen de la proquimosina de bovino en la levadura *Kluyveromyces lactis* fueron muy satisfactorios. La diferencia en el rendimiento de la producción de la enzima entre *K. lactis* y los microorganismos trabajados anteriormente fue muy notoria, pero lo fueron aún más los niveles de secreción extracelular alcanzados. Secuencias señal tanto del propio organismo como aquella de la quimosina misma dieron resultados positivos en cuanto a secreción, inclusive aquellas cepas transformadas con el gen de la proquimosina sin una secuencia señal rindieron altos niveles de enzima en el medio de cultivo. Estas características propias de *K. lactis*, hicieron de esta levadura un excelente candidato para la producción de quimosina de bovino a nivel industrial. Ya que la combinación de alto rendimiento con secreción eficiente y con tratamientos sencillos posteriores a la fermentación permiten la fabricación de un producto abundante y a bajo costo. Esta especie presenta aún más propiedades ventajosas en comparación a otras levaduras. Estas incluyen su estatus de grado alimenticio y la amplia disponibilidad de vectores de expresión. Además, en contraste con las levaduras metilótrofas, que son frecuentemente usadas para la expresión de genes foráneos, *K. lactis* no requiere de equipo de fermentación a prueba de explosiones⁵³. Hoy día toda la producción de quimosina comercial con *K. lactis* está en manos de la compañía holandesa Gist-Brocades.

2.3.3 EXPRESIÓN EN *Aspergillus* spp.

Dentro de la diversidad de sistemas celulares que han sido desarrollados para la expresión de productos de genes heterólogos, ciertas especies de hongos filamentosos poseen atributos que los hacen excepcionalmente atractivos para este propósito. Éstos incluyen (a) la habilidad para producir altos niveles (>25 g/L) de proteína secretada en cultivo sumergido, (b) una larga historia de uso seguro en la producción de enzimas, antibióticos y bioquímicos que son usados para consumo humano, y (c) procesos fermentativos establecidos que son poco costosos en comparación con procesos de cultivo de células animales realizados a la misma escala.²⁸

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas e incluyen a las formas filamentosas de la subdivisión *eumycotina*. Estos hongos están caracterizados por un micelio compuesto de quitina, celulosa y otros polisacáridos compuestos. Los hongos filamentosos son morfológica, fisiológica y genéticamente diferentes a las levaduras. El crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos es por elongación de hifas y catabolismo de carbono estrictamente aerobio. En contraste, el crecimiento vegetativo en levaduras como *S. cerevisiae* es por gemación de un tallo unicelular, y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo. *S. cerevisiae* tiene 17 cromosomas en contraste con 8 de *A. nidulans*. Recientes ilustraciones de diferencias entre *S. cerevisiae* y hongos filamentosos incluyen la carente habilidad de *S. cerevisiae* de procesar intrones de *Aspergillus* y su carente habilidad para reconocer muchos reguladores de transcripción de hongos filamentosos. Varias especies de hongos filamentosos pueden ser usados como huéspedes de expresión incluidos los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Tricoderma*, *Neurospora*, *Podospora*, *Endothia* y *Mucor*.²⁷

La sección siguiente describe el camino seguido en investigación biotecnológica para lograr la expresión y secreción en cantidades satisfactorias de la proquimosina en *Aspergillus niger* var. *awamori*. El trabajo fue realizado por Randy M. Berka y colaboradores, en los laboratorios de Genecor International Inc., South San Francisco, California (1991).

2.3.3.1 Expresión de quimosina en *Aspergillus nidulans*: Primero se probó la expresión y secreción en una cepa de laboratorio de *Aspergillus nidulans*. A pesar de que no es considerado generalmente como un organismo de producción industrial, *A. nidulans* es un hongo bien caracterizado genéticamente que está taxonómicamente emparentado con especies como *A. niger* y *A. oryzae* los cuales son usados para la producción industrial de enzimas.²⁸

Se construyó una serie de vectores de expresión que emplearon los elementos de control de transcripción, traducción y secreción del gen *glaA* (glucoamilasa) de *A. niger* (figura 21). Tres de los vectores tenían cDNA de proquimosina unido a secuencias de *glaA* detrás de (a) el sitio de corte del péptido señal de la glucoamilasa (pGRG1), (b) el sitio de corte del propéptido de glucoamilasa (pGRG2), o (c) después de 11 codones de la glucoamilasa madura (pGRG4). Una cuarta construcción involucró la unión entre las secuencias de cDNA de preproquimosina directamente con el promotor de *glaA* (pGRG3). Los cuatro vectores contenían un segmento del DNA genómico de *Neurospora crassa* albergando el gen *pyr4* (orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa) el cual fue usado como el marcador selectivo para la transformación de un recipiente auxotrófico *A. nidulans pyrG*. Aparte, estos vectores contenían un segmento de DNA genómico de *A. nidulans* conocido como *ans1* que promueve la transformación integrativa eficiente en esta especie.²⁸

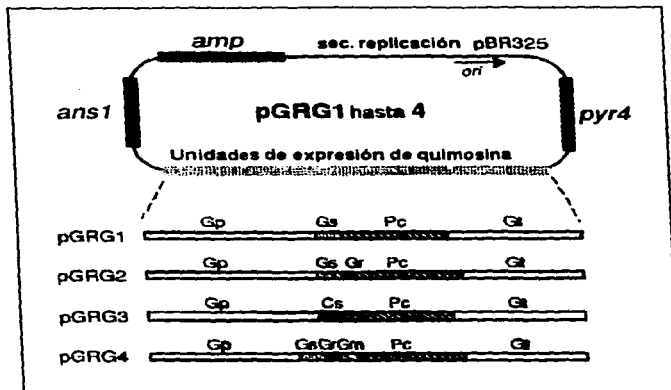


Figura 21. Mapa esquemático de los vectores de expresión pGRG1 hasta pGRG4. Se usó un gen de aplicación (pBR325) y de resistencia (amp) para la construcción y propagación de los vectores en *E. coli*. El gen *pyr4* codifica para la orotidina-5'-descarboxilasa la cual confiere un requerimiento auxotrófico para uridina en mutantes *pyrG* de *A. nidulans*. La secuencia *ans1* incrementa la frecuencia de transformación. Las unidades de expresión de quimosina contienen los siguientes componentes: Gp, promotor de *glaA* de *A. niger*; Gs, codones del péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*; Gr, codones del propéptido de la glucoamilasa; Pc, cDNA de la proquimosina B. Gt, terminados de *lglaA* de *A. Nigri*²¹. (Fuente: Genecor International Inc. 1991)

Los transformantes de *A. nidulans* generados con cada uno de los cuatro vectores de expresión secretaron quimosina activa hacia el medio de cultivo cuando se crecieron en presencia de almidón como única fuente de carbono. Cuando se usó xilosa como única fuente de carbono el nivel de quimosina extracelular fue despreciable, sugiriendo con esto que el promotor heterólogo *glaA* era inducible por almidón en *A. nidulans*, del mismo modo que en el huésped *A. niger* nativo. Experimentos de hibridación Northern indicaron que la expresión de quimosina en *A. nidulans* fue regulada a nivel de transcripción. En contraste a previas

observaciones en la levadura *S. cerevisiae*, la quimosina fue secretada por *A. nidulans* aún cuando la secuencia de cDNA que codifica para el péptido señal nativo fue incorporado al vector de expresión. De esta observación se puede intuir que los hongos filamentosos puedan ser más permisivos que la levadura con respecto a la función de péptidos señal heterólogos. Mientras que la integración de los vectores de expresión en el DNA cromosomal del huésped parecía involucrar predominantemente recombinación no-homóloga y que se observó un variable número de copias entre los transformantes, pareció no haber una correlación estricta entre la producción de quimosina y el número de copias de genes integradas. La producción de quimosina extracelular en *A. nidulans* fue modesta (aproximadamente de 20 a 150 µg por gramo de micelio seco; y a 5 mg/l en cultivo de tubo agitado). No obstante, los resultados conllevaron a los investigadores a intentar experimentos similares en una cepa de *A. niger* var. *awamori* la cual ha sido seleccionada por su habilidad para secretar grandes cantidades de glucoamilasa.²⁸

2.3.3.2 Producción de quimosina en *A. niger* var. *awamori*: Los vectores de expresión de quimosina pGRG1 y pGRG3 fueron usados para la transformación de un mutante *pyrG* auxótrofo de *A. niger* var. *awamori* conocido como la cepa GC5. El plásmido pGRG1 codificaba para el péptido señal de la glucoamilasa para dirigir la secreción de quimosina mientras que el pGRG3 empleó codones del péptido señal nativo de proquimosina (ver figura 21). Los filtrados de cultivo de un gran número de transformantes fueron seleccionados por medio de pruebas de coagulación de leche para medir los niveles de quimosina extracelular. Aquellos transformantes que produjeron los más altos niveles fueron seleccionados para subsiguientes estudios. La tabla 7 muestra los niveles de quimosina y glucoamilasa secretados por los transformantes seleccionados. Uno de los transformantes derivados del vector de expresión pGRG3, designado como

cepa 107, produjo los niveles de quimosina extracelular más elevados (aproximadamente 14 $\mu\text{g/ml}$ en 50 ml de cultivo en tubo agitado). Varias otras conclusiones se pudieron sacar de estos datos. Primero, la cantidad de quimosina producida fue considerablemente inferior a la de glucoamilasa, sugiriendo que algún aspecto de la expresión de quimosina (por ej., transcripción, estabilidad de mRNA, procesamiento de mRNA, traducción o secreción) fue ineficiente.²⁸

Tabla 7. Rendimiento extracelular de quimosina y glucoamilasa en cultivos de transformantes seleccionados de <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> .			
Cepa	Vector de expresión	Quimosina ($\mu\text{g/ml}$)	Glucoamilasa ($\mu\text{g/ml}$)
GC5	Ninguno	N.D.	2311
62	pGRG1	4.7	420
82	pGRG1	5.6	3922
83	pGRG3	4.9	3105
13	pGRG3	4.8	1482
18	pGRG3	5.5	3863
20	pGRG3	4.1	2821
107	pGRG3	14.6	3280

(Fuente: Berka, 1991)

Se realizaron experimentos de Northern blot para comparar niveles en estado estacionario de mRNA de quimosina y glucoamilasa. Se construyó un fragmento de sonda de quimosina-glucoamilasa combinados el cual contenía cantidades aproximadamente iguales de DNA específico de quimosina y glucoamilasa. De esta manera se pudo hacer una comparación directa de los niveles de mRNA en estado estacionario de ambas especies a partir de una única hibridación Northern con una sola sonda. En los mismos experimentos, se examinó la eficiencia de la poliadenilación tras una cromatografía en celulosa oligo-dT (ver figura 22). A partir de este experimento resultó aparente que el nivel de mRNA específico de proquimosina fue ligeramente superior al mRNA de glucoamilasa sugiriendo que la transcripción del cDNA del promotor *glaA* fue razonablemente eficiente. Además, el análisis de RNA seleccionado por oligo-dT indicó que casi todo el

mRNA de proquimosina se encontraba poliadenilado. Por lo tanto, los pasos que limitan la producción de quimosina en *Aspergillus* son postranscripcionales, quizás la presencia de alguna enzima degradante, traducción o secreción defectuosa, o una combinación de éstos.²⁸

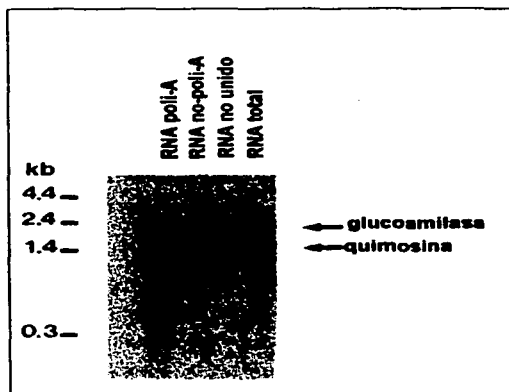


Figura 22. Hibridación Northern comparando niveles en estado estacionario de glucoamilasa y quimosina en una cepa de *A. niger* var. *awamori* que contiene varias copias integradas de pGRG3. (Fuente: Genecor International Inc, 1991).

Repetidas sesiones de mutagénesis de la cepa 107 con luz ultravioleta o nitrosoguanidina (NTG), con seleccionamientos subsecuentes para la detección de incrementos en la producción de quimosina resultaron en el aislamiento de cepas de producción mejoradas. Cinco sesiones de mutagénesis y selección produjeron una cepa que demostró una mejora en la producción de quimosina cuatro veces mayor.²⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.3.3 Degradación de la quimosina por aspergillopepsina A: Las condiciones de cultivo que se usaron para inducir la expresión de quimosina de bovino en *A. niger* var. *awamori* también permitieron la secreción de una proteasa aspártica endógena propia conocida como aspergillopepsina A. Esta enzima fue responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica presente en filtrados de cultivo de *A. niger* var. *awamori*. Los investigadores notaron en los resultados del programa de mutagénesis y selección que los niveles de quimosina detectada por pruebas de actividad enzimática fueron invariablemente más bajos que los niveles que se midieron usando pruebas con anticuerpos. Esta observación sugirió la presencia de quimosina inactiva en los filtrados de cultivo. Más aún, experimentos en los cuales una cantidad conocida de quimosina añadida al filtrado de cultivo mostraron una disminución gradual de actividad coagulante con el tiempo, implicando que una proteasa endógena estaba degradando la quimosina. Esta degradación fue prevenida por la proteasa aspártica inhibidora pepstatina y, de este modo, la aspergillopepsina fue implicada como la causante. Adicionalmente, los investigadores notaron en el programa de mutagénesis y selección que varios mutantes con mejorada productividad de quimosina mostraron dramáticas disminuciones en la producción de aspergillopepsina. Por lo tanto, eligieron clonar el gen que codifica la aspergillopepsina A y borrarlo del genoma de su mejor cepa productora. A la cepa resultante de la remoción del gen de la aspergillopepsina A se le denominó *ApepA*. La producción de quimosina en las cepas se incrementó aproximadamente al doble sobre las cepas que expresaban la aspergillopepsina. Se notó que después de siete días en cultivo de tubos de agitación, el nivel de quimosina extracelular producida por las cepas estaba todavía en incremento, mientras que la producción en cepas no borradas estaba disminuyendo.²⁸

2.3.3.4 Eficiencia en la secreción de quimosina: Se realizaron experimentos para estimar la eficiencia de secreción de quimosina en *A. niger* var. *awamori* midiendo el porcentaje de quimosina que permanecía asociada a la célula. La concentración de quimosina intracelular se midió extrayendo la proteína del micelio fresco el cual fue liofilizado y molido hasta polvo en mortero y pistilo. El polvo fue resuspendido en buffer con pepstatina y metil fenil sulfonil fluoruro (PMSF) como inhibidores de proteasa para minimizar la degradación de quimosina en la muestra. Los extractos fueron después tratados con NaOH y después centrifugados para remover los restos celulares. La concentración de quimosina fue después medida por pruebas inmunológicas. La tabla 8 muestra el porcentaje de quimosina intracelular contra extracelular producida en los transformantes pGRG1 y pGRG3. En la mayoría de los transformantes más de la mitad de la quimosina que fue sintetizada permaneció asociada a la célula, haciendo evidente que la secreción del gen heterólogo de la quimosina no era eficiente.²⁸

Tabla 8. Comparación de niveles de quimosina intracelular vs. extracelular producidos por transformantes de <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> pGRG1 detectados inmunológicamente. La cepa GC12 no está transformada			
Concentración de quimosina (µg/ml)			
Cepa	Intracelular	Extracelular	%intracelular
GC12	N.D.	N.D.	----
12grgl-1	5.4	1.2	81.8
12grgl-1 a	20.8	0.5	97.7
12grgl-3 a	0.6	1.1	35.3
12grgl-4 a	2.5	1.4	64.1
12grgl-5 a	4.6	0.8	85.2

(Fuente: Berka, 1991)

2.3.3.5 Mejoramiento de la secreción/estabilidad de la quimosina por glicosilación: Los investigadores notaron que la mayor parte de las proteínas

extracelulares abundantes producidas por *A. niger* var. *awamori* son glicoproteínas. En contraste, sólo un bajo porcentaje de la quimosina producida es glicosilada. De este modo, los investigadores intentaron mejorar la eficiencia de la secreción de quimosina creando un sitio para glicosilación N-vinculada de la enzima. Usando técnicas de mutagénesis dirigida, se generaron dos mutaciones ($\text{Ser}_{74} \rightarrow \text{Asn}_{74}$ y $\text{His}_{76} \rightarrow \text{Ser}_{76}$) en la secuencia codificante de quimosina, creando de este modo un sitio de N-glicosilación consenso en la región "flap" de la molécula de quimosina. Este lugar es homólogo a uno de los dos sitios de glicosilación N-vinculados encontrados en la proteasa aspártica del hongo cigomiceto *Mucor miehei*.²⁸

Tabla 9. Comparación de niveles intracelulares vs. extracelulares de quimosina y glicoquimosina producidos por <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> GC12.				
Transformante	Tipo de quimosina	Concentración de quimosina ($\mu\text{g/ml}$)		
		Intracelular	Extracelular	% secretado
12pPyrGRG3-3	nativa	0.50	3.30	92
12pPyrGRG3-4		1.39	0.81	36
12pPyrGRG3-5		2.72	4.26	61
12GLYCHY8	glicoquimo-sina	N.D.	14.17	>99
12GLYCHY9		1.66	9.02	84
12GLYCHY17		1.28	20.48	94
12GLYCHY20		1.99	15.32	88

(Fuente: Berka, 1991)

El vector de expresión para este experimento se derivó de pGRG3 y se insertó, con el fragmento de quimosina mutante, dentro del plásmido pUC_{pyr}, dando como resultado al plásmido pUC_{pyr}-GLYCHY. Los niveles de producción de quimosina de los transformantes derivados de este vector se incrementaron hasta diez veces comparados con transformantes con el mismo vector pero sin mutación y, en casi todos los casos, más del 90% de la quimosina fue

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

extracelular (ver tabla 9). Estas observaciones sugieren que la quimosina fue, ya sea más eficientemente secretada por *A. niger* var. *awamori*, o fue más resistente a la degradación que la quimosina en su forma nativa. Sin embargo, haciendo una comparación de la quimosina detectada por inmunanálisis con los niveles obtenidos de pruebas de actividad enzimática, resultó ser que la actividad específica de la glicoquimosina había disminuido hasta una cuarta o quinta parte comparada con la quimosina nativa, probablemente por el oligosacárido unido a la molécula.²⁸

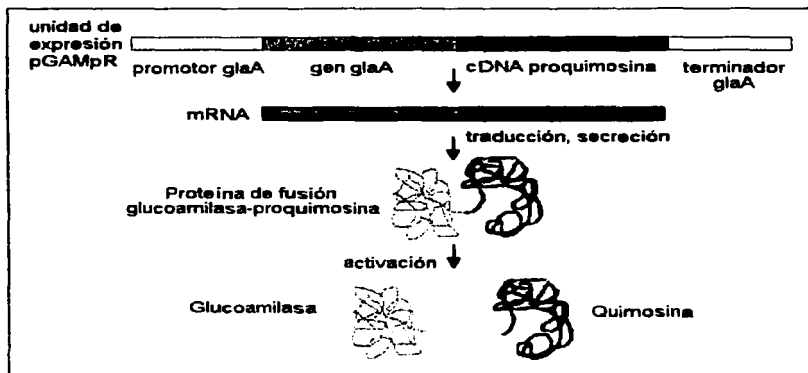


Figura 23. Esquema que muestra los productos de transcripción y traducción dirigidos por la unidad de expresión en pGAMpR. Los intrones del gen *glaA* son escindidos después de la transcripción. El producto de glucoamilasa resultante de la ruptura proteolítica de la proteína de fusión contiene una porción del péptido de la quimosina. (Fuente: Genecor International Inc, 1991)

2.3.3.6 Producción mejorada por fusión de genes *glc4A*-proquimosina: En un intento por obtener niveles más altos de quimosina sin alterar la estructura primaria o la actividad de la enzima, los investigadores construyeron un vector de expresión llamado pGAMpR, el cual dirigiría la expresión de una proteína de fusión con las secuencias enteras de glucoamilasa y proquimosina unidas. El razonamiento detrás de esta estrategia presupone que si existen secuencias contenidas dentro de las estructuras del mRNA y/o de la proteína de la glucoamilasa que promueva la traducción y/o secreción eficientes, éstas deberían estar también presentes en una fusión glucoamilasa-proquimosina para generar altos niveles de producto secretado. Posteriormente la quimosina puede ser liberada de esta proteína de fusión por hidrólisis autocatalítica de su propéptido. El esquema se ilustra en la (ver figura 23) El análisis de los transformantes *A. niger* var. *awamori* derivados del pGAMpR revelaron que la quimosina activa se produjo extracelularmente y el rendimiento aumentó dramáticamente. Un transformante, designado como la cepa GC4-1, produjo 286 mg/l de enzima activa.²⁸

2.3.3.7 Cepas mejoradas por mutagénesis y selección: La cepa productora de quimosina GC4-1 la cual contenía pGAMpR fue usada como punto de partida para un programa de mejora de rendimiento que involucraba seis ciclos sucesivos de mutagénesis con NTG con selección de los mejores productores en cada ciclo. El rendimiento aumentó a más del doble como resultado de este esfuerzo. Se hicieron mejoras adicionales en la productividad de estas cepas por selección de mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa.²⁸

Trabajos anteriores demostraron una producción mayor de glucoamilasa en cepas con esta característica y, dado que la producción de proquimosina en los transformantes pGAMpR depende de la habilidad de las células para producir

altos niveles glucoamilasa, parecía razonable esperar mejoras también en el rendimiento de quimosina. Dos mutantes fueron identificados que mostraron un incremento al doble en rendimiento (hasta un gramo por litro). Esto representa una mejora total de hasta 80 veces el rendimiento inicial comparado con el del mejor transformante pGRG3 de la cepa 107 (ver tabla 7).²⁸

En estudios posteriores (1993) realizados en el mismo instituto se hizo uso de las cepas de *Aspergillus niger* utilizadas originalmente para expresar el gen fusionado de la quimosina. A pesar de que el vector de expresión utilizado anteriormente estaba integrado en el cromosoma de estas cepas, fue posible obtener cepas de las cuales las secuencias del vector de transformación habían sido borradas. Estas últimas se transformaron nuevamente para producir la proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, esta enzima se pudo secretar en forma no-fusionada, hecho que no se pudo lograr con la proquimosina de bovino.⁵⁰

En el mismo año, Tsuchita *et al.* repitieron el intento de expresión del gen de la proquimosina bajo el control del gen de la glucoamilasa pero en cepas de *Aspergillus oryzae*. Se logró la expresión y activación de la enzima, sin embargo los niveles de rendimiento fueron bajos (0.16 mg/L)⁵¹. Después el mismo grupo intentó la expresión por medio de la fusión del gen de la glucoamilasa de *A. Oryzae* con el cDNA de la proquimosina, produciéndose hasta 150 mg por Kg de cultivo sólido (fibra de trigo).⁵⁴

2.3.3.8 DISCUSIÓN

Los trabajos realizados en torno al desarrollo de una cepa adecuada para la producción de proquimosina en *A. niger* var. *awamori* se enfrentaron a varios problemas. A diferencia de cómo se esperaba, el rendimiento de quimosina tras la transformación de las cepas con el cDNA correspondiente fue extremadamente bajo, aún cuando se utilizó un promotor altamente eficiente como es el de *glcA*. Pruebas

hechas con hibridación Northern demostraron la presencia de cantidades abundantes de mRNA, suficientes como para lograr una adecuada producción de proteína, lo que indicaba que el problema se encontraba en la etapa de secreción. No fue hasta que se intentó, por un lado la glicosilación de la proteína y, por el otro, la fusión de las proteínas completas de quimosina con glucoamilasa, que se alcanzaron los niveles de secreción de enzima deseados, en especial con el segundo método. Los esfuerzos se vieron bien recompensados, ya que al final se logró obtener una cepa capaz de producir quimosina de bovino extracelular con rendimientos que rebasaron los 1300 mg/l en medio de cultivo. Esto convirtió al hongo filamentoso *Aspergillus niger* var. *awamori* en un huésped heterólogo para expresión de quimosina tan eficiente como demostró serlo la levadura *Kluyveromyces lactis*. Ambos microorganismos a pesar de su enorme diferencia taxonómica son capaces de producir, con rendimientos equivalentes, proquimosina de bovino de manera extracelular y con actividad y especificidad idénticas a la del tipo nativo.

A partir de los años 1994-1995, la información sobre producción de quimosina en *K. lactis* y *A. niger* se vuelve más difícil de obtener. Un artículo publicado por Archer, D. B.,⁵⁵ habla sobre el potencial y la importancia científica y tecnológica de la expresión de proteínas heterólogas en *A. niger* y comenta que será un área de estudio con mucha actividad futura. Contrariamente, los artículos disponibles sobre el tema se vuelven más escasos a partir de ese momento, probablemente debido a una más celosa protección de la información por parte de las empresas dueñas de las patentes que respaldan estas nuevas tecnologías.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

^A
Capítulo 3

IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA QUIMOSINA RECOMBINANTE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 3: IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA QUIMOSINA RECOMBINANTE

En el mercado los preparados coagulantes de la leche suelen ser clasificados por sus fabricantes de la siguiente manera: (1) el *cuajo natural*, nombre que se le da al de origen animal, (2) los *cuajos microbianos* que abarcan todos aquellos producidos por hongos no recombinantes y (3) la *quimosina producida por fermentación o por organismos modificados*, que se refiere a los cuajos preparados con quimosina recombinante.

3.1 VENTAJAS DEL CUAJO RECOMBINANTE

La quimosina recombinante, aparte de ser química y biológicamente idéntica a su contraparte de origen bovino, ofrece otras ventajas sobre el cuajo animal tradicional. El ser un producto obtenido a partir de fermentaciones microbianas le permite ser fabricado con mayor rapidez y bajo condiciones de proceso más controlables. Esto se traduce en una mayor adaptabilidad de los volúmenes de producción frente a las constantes fluctuaciones del mercado y, desde luego, en menores costos. Además de esto, el queso fabricado con quimosina de origen microbiano goza de buena aceptación entre ciertos sectores específicos de consumidores, como aquellos que siguen regímenes vegetarianos y que se oponen al sacrificio de animales para su consumo. Además, los quesos fabricados con cuajo microbiano pueden ser certificados como Kosher y Halal, lo que les abre también mercado entre los grupos religiosos que consumen esta clase de alimentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2 EL MERCADO DEL CUAJO EN EL MUNDO Y EN MÉXICO

Hoy en día los coagulantes microbianos (incluidos los cuajos recombinantes) abarcan entre 80 y 90% de la producción quesera en países industrializados como los Estados Unidos, Reino Unido, Irlanda y Australia¹³. Compañías fabricantes de cuajo recombinante como CHR-Hansen abastecen a gigantes de la industria alimentaria como Kraft, General Foods y Nestlé³². De esta manera, la fabricación de queso con cuajo recombinante se ha extendido más allá de los países industrializados y se ha introducido poco a poco en los mercados de países en desarrollo, donde la actividad de compañías transnacionales es fuerte.

Se espera que en poco tiempo, el uso de cuajo recombinante para la fabricación de quesos en México se vuelva mucho más generalizado, en consecuencia de las ventajas económicas que ofrece este producto y la influencia que ejercen las empresas transnacionales sobre las locales, los cuales acostumbran seguir los estilos de los mercados extranjeros para mantener su competitividad.

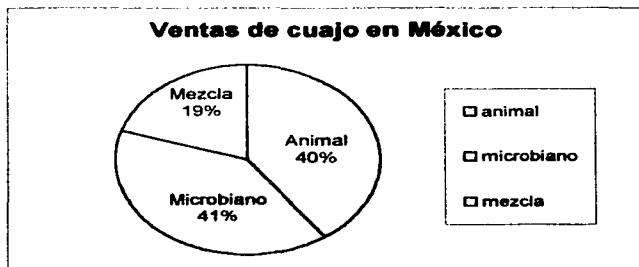


Figura 24. Distribución del mercado de cuajo en México en el año 2000 de acuerdo a su fuente de obtención. El cuajo de origen animal incluye quimosinas y pepsinas de origen bovino y porcino. El cuajo de origen microbiano incluye las proteasas de origen fúngico y la quimosina de origen recombinante (Fuente: Cuamex, 2000).

3.3 COMPAÑÍAS FABRICANTES Y PRODUCTOS

	Fuente	Nombre comercial	fabricante
Coagulantes microbianos	<i>Endothi parasitica</i>	Surecurd®/Suparen®	DSM*
		Thermolase®	SKW
	<i>Mucor pusillus</i>	Renzyme®	Rhodia
		Emporase®	SKW
	<i>Mucor miehei</i>	Microlant®	CHR-Hansen
		Marzyme Supreme®	Rhodia
Quimosina recombinante		Fromase®	DSM*
	<i>Escherichia coli</i> K12	Chy-max®	Pfizer
	<i>Aspergillus niger</i>	Chymogen®	CHR-Hansen
	<i>Escherichia coli</i> K12	Chymostar®	Rhodia
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxiren®	DSM*

Tabla 10 Productos y fabricantes de enzimas coagulantes de la leche de origen microbiano³². *DSM alberga a los laboratorios Gist-Brocades. (Fuente: Powell, R. S. 2000)

3.4 NORMATIVIDAD

El cuajo con quimosina recombinante fue aprobado por la FDA y reconocido como ingrediente alimenticio GRAS en 1990 (ver anexos I y IV). La quimosina recombinante fue la primera enzima procedente de una fuente genéticamente modificada en ser aceptada para su uso en alimentos.

En México, la Secretaría de Salud, en la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 en su sección 7.6.7 (ver anexo V) permite el uso de las enzimas de origen microbiano para cuajar la leche derivadas de *Bacillus cereus*, *Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, y *Mucor pusillus*; permite también el uso de la pepsina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

derivada de estómagos de bovinos y porcinos y la quimosina derivada de la *Escherichia coli* K12 y *Kluyveromyces marcianus var lactis*.

3.5 ASPECTOS SOCIALES

La biotecnología moderna ha despertado optimismo y a la vez controversia. El debate alrededor del impacto de las herramientas de investigación y los productos de la biotecnología incluye temas como la salud, economía agrícola, biodiversidad global, calidad ambiental e, inclusive, hambre y malnutrición. Desafortunadamente, el debate público en torno a los beneficios y riesgos de la tecnología genética sufre de un enorme conjunto de información mal guiada y manipulación.³³

Mucha gente se pregunta si las técnicas de ingeniería genética son en algún modo peligrosas o impredecibles. Numerosas organizaciones científicas internacionales han hecho énfasis en que estas nuevas técnicas son tanto precisas como confiables. Las características genéticas y fenotípicas de cada nuevo producto modificado genéticamente son evaluadas a cada etapa de su desarrollo bajo las guías y normas del NIH (National Institutes of Health), USDA (United States Department of Agriculture) y FDA (Food and Drugs Administration).

Muchos consumidores alegan que desean que los alimentos genéticamente modificados (AGM) lleven una etiqueta especial. Sin embargo, las etiquetas tienen la intención de proporcionar información significativa en cuanto al los contenidos, ya sea por razones nutricionales o de salud. Las normas actuales exigen que los AGM lleven una etiqueta si el alimento es diferente a su similar convencional, por ejemplo, si existe algún alérgico o sustancia tóxica en el alimento. Pero si el alimento es idéntico a su versión regular, la etiqueta resulta engañosa.³³ En el caso específico de los quesos fabricados con quimosina recombinante ocurre algo muy particular. Los fabricantes defienden que no es necesario etiquetar el producto como

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGM, alegando que la quimosina en sí es sólo una sustancia, no un organismo genéticamente modificado y, por lo tanto, no contiene rDNA, además de que constituye un componente que se utiliza durante la manufactura mas no como ingrediente en la fórmula final del producto.

Debido a que la biotecnología alimentaria es joven y que algunos criticos continúan a la expectativa, los nuevos productos alimenticios irán apareciendo de forma gradual en el mercado durante los próximos años. Sin embargo, con la creciente acumulación de evidencia en seguridad y eficiencia, y la ausencia total de daño a la salud pública o el medio ambiente, más y más consumidores se sentirán más cómodos con la presencia de la biotecnología alimentaria.³³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. ÚLTIMOS AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA QUIMOSINA

Los trabajos de investigación más recientes (2001) revelan estudios realizados, en su mayoría, en torno a la estructura de la quimosina y a su mecanismo de renaturalización y activación. Los trabajos describen los efectos de remplazos, deleciones y añadidos de aminoácidos dentro de la estructura primaria de la enzima. Se ha estudiado el efecto de mutagenesis dirigida sobre sitios de interés estructural de la proquimosina, como por ejemplo en el sitio 36p de la *pro* secuencia⁶³ o en los puentes disulfuro Cys206-Cys210⁶². En general los resultados revelan disminución en la actividad enzimática tras realizadas dichas modificaciones.

Por otro lado se continúa investigando la acción de la quimosina durante la maduración de los quesos, sus efectos secundarios sobre las proteínas de la leche a través de posteriores reacciones de proteólisis y su efecto sobre las propiedades organolépticas del producto^{42,45}.

Un trabajo reciente muy interesante y novedoso describe la producción y aislamiento de quimosina a partir de leche de borrega transgénica. La enzima ha sido separada por cromatografía de intercambio iónico y bioespecífica, resultando ser homogénea y activa. Esta enzima ha demostrado ser idéntica a la de origen bovino en pruebas de masa, de estabilidad a diferentes valores de pH y actividad catalítica sobre sustratos proteicos como hemoglobina y caseinato de sodio⁶⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. CONCLUSION

El análisis de la información expuesta en el presente trabajo hace evidente la variedad de opciones con las que cuentan hoy los biotecnólogos en alimentos para ayudarse en su búsqueda de sistemas de expresión adecuados para la producción de enzimas recombinantes de utilidad económica. En el caso particular de la quimosina de bovino, enzima indispensable en la manufactura de quesos, los avances han sido muy notables. A través de la inserción del gen que codifica para la proquimosina de bovino en microorganismos adecuados se ha logrado producir la enzima en condiciones más controladas que mejoran varias características de su análogo tradicional. Estas características son: (1) mayores volúmenes de producción, (2) mayor pureza en el producto, (3) satisfacción de grupos especiales de consumidores (vegetarianos y ciertas comunidades religiosas) y, por último y más importante, (4) la disminución de costos de producción.

Actualmente son tres las fuentes de quimosina recombinante que se utilizan para la preparación de cuajo a nivel industrial: la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Kluyveromyces lactis* y el hongo filamentoso *Aspergillus niger* var. *awamori*.

La tabla 11 presenta un cuadro comparativo entre estos tres microorganismos en cuanto a su eficiencia como productores de proquimosina de bovino. La mayor diferencia entre estas tres fuentes yace no en sus características funcionales o calidad final, sino en su procesamiento. En el caso de *K. lactis* y *A. niger*, la proquimosina secretada sólo pasa por un proceso de separación y posterior activación autocatalítica para convertirse en quimosina activa; por otro lado, en el caso de *E. coli* K12, la proquimosina es producida en forma intracelular, lo que exige un proceso más largo y complejo para su obtención final, que inicia con la extracción de los cuerpos de inclusión y su posterior separación, purificación, solubilización,

renaturalización y activación. Proceso que le pone en desventaja frente a las dos primeros organismos.

Organismo	<i>Kluyveromyces lactis</i> (levadura)	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> (hongo)	<i>Escherichia coli</i> K12 (bacteria)
Producción de tipo	extracelular	extracelular	intracelular
Procesamiento posterior	activación	activación	ruptura celular, separación purificación solubilización, renaturalización, activación
Rendimiento	100 – 300 mg/l (1994)	1,300 mg/l (1994)	3 g/Kg (1997)
Precio en el mercado (pesos/l)	\$80.00 a \$140.00 (fuerza 1:10000)		
Fabricante / producto	Giste Brocades DSM /Maxiren®	Christian Hansen - Genencor /Chymogen®	Pfizer /Chy-Max®

Tabla 11. Cuadro comparativo de microorganismos recombinantes productores de proquimosina de bovino.

Es probable que a pesar de estas diferencias, se haya decidido a trabajar con distintas fuentes a causa del sistema de patentes. Cada una de las cepas recombinantes creadas está registrada y protegida por una patente, esto imposibilita a que el "invento" se copie y se hagan competencia entre compañías usando a un mismo organismo. Este fenómeno de las patentes, a mi punto de vista tiene tanto un lado positivo como uno negativo. La ventaja está en que al patentar, los investigadores reciben un beneficio económico derivado de su trabajo, el cual les permite sostener y continuar su actividad; la desventaja reside en que, al ser los únicos poseedores del derecho a fabricar determinados productos, impiden la libre competencia en el mercado propiciando el monopolio. Esta condición probablemente contribuye al hecho de que hasta la fecha no se fabrica ningún cuajo con quimosina recombinante en México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. GLOSARIO

Ácido nucleico: nombre genérico que se aplica indistintamente al ADN o ARN de las dos moléculas informacionales de los seres vivos.

Ácido ribonucleico (RNA): Ácido nucleico, complementario al DNA, compuesto por nucleótidos de ribosa. Es fundamental en la síntesis celular de proteínas

ADN recombinante: término que se usa en la tecnología aplicada para obtener moléculas de ADN híbridas, por ejemplo, provenientes de diversos seres vivos.

Aerobio: Microorganismo que crece en presencia de oxígeno.

Aminoácido: unidad monomérica fundamental de las proteínas. Existen 20 tipos diferentes.

Amplificar: Incrementar el número de copias de una secuencia de DNA. Puede hacerse in vivo por inserción de la secuencia en un vector de clonación que se replica dentro de una célula huésped, o in vitro por la reacción en cadena de la polimerasa.

Anaerobio: Un organismo que crece en ausencia de oxígeno.

Anticodón una secuencia específica de tres nucleótidos en un RNA de transferencia (tRNA), complementario a un codón (también tres nucleótidos) para un aminoácido en un RNA mensajero.

Anticuerpo: Una proteína compleja (Inmunoglobulina) que se produce en respuesta a un antígeno la cual reacciona y se une específicamente para formar un complejo antígeno-anticuerpo.

Anticuerpos monoclonales: Anticuerpos idénticos que reconocen un antígeno sencillo, específico y que son producidos por clones de células especializadas (hibridoma). Son moléculas de inmunoglobulina de especificidad de epítopo simple.

Antígeno: sustancia extraña a un organismo, capaz de desencadenar la producción de una respuesta inmune. Blanco de los anticuerpos.

Apareamiento: Proceso por el cual los pares de bases complementarios en las hebras de DNA se combinan.

ARN mensajero (mRNA): molécula de ARN, copia de un gene, que lleva la información desde el genoma hasta donde se realiza la traducción.

Auxótrofo: Un mutante defectuoso en la síntesis de una biomolécula dada. La biomolécula debe ser administrada al organismo si se desea su crecimiento normal.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Bacteriófago (fago): Virus que infecta bacterias. Las formas modificadas son usadas como vectores para la clonación de DNA.

Biología molecular: rama de la biología nacida a raíz de la identificación de la naturaleza química (molecular) del material genético. Hoy día, nos referimos a biología molecular cuando hablamos de estudios o técnicas centradas en los genes y sus productos inmediatos, las proteínas.

Casete de expresión: (nombre que se le da al vector de clonación construido a partir de otros vectores y segmentos de DNA necesarios para la expresión de algún gen heterólogo en un hospedador específico)

Catabolismo: Ruta productora de energía. La fase del metabolismo involucrada en la liberación de energía por degradación de moléculas nutrientes.

Catalítico: referente a la catálisis. Proceso en el que un componente (catalizador) acelera la transformación de unos compuestos químicos en otros. El catalizador no se altera al final de la reacción, por lo que puede actuar repetidamente.

Célula haploide: Una célula que contiene solamente un juego o la mitad del número habitual (diploide) de cromosomas.

Cepa silvestre: la variedad natural de un determinado organismo. Su contraparte es una cepa mutante que contiene lesiones particulares en su genoma.

Citoplasma: Todos los contenidos del protoplasma de la célula no incluidos en el núcleo.

Clon: Una replica genética exacta de un gen específico o de un organismo completo.

Clonación celular: proceso de multiplicación de células genéticamente idénticas, a partir de una sola célula.

Clonación de genes: técnica que consiste en multiplicar un fragmento de ADN recombinante en una célula-huésped (generalmente una bacteria o una levadura) y aislar luego las copias de ADN así obtenidas.

Clonación molecular: inserción de un segmento de ADN ajeno, de una determinada longitud, dentro de un vector que se replica en un huésped específico.

Código genético: reglas de correspondencia entre la secuencia de bases del ADN y la secuencia de aminoácidos de una proteína. Para relacionar un código de cuatro letras (bases), con uno de 20 letras (aminoácidos), se requiere usar tres bases por aminoácido. La secuencia de bases del ADN, leída de tres en tres, constituye una secuencia de codones que corresponde a un aminoácido cada uno.

Codón: Un triplete de nucleótidos (tres unidades de ácido nucleico seguidas) que codifica para un aminoácido o una señal de terminación.

Conformación: arreglo espacial que adopta una molécula, en virtud de los diferentes ángulos de rotación que pueden adquirir sus enlaces químicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cromosomas: Unidades discretas del genoma que contienen numerosos genes que consisten de proteínas (histonas) y una molécula muy larga de DNA. Se encuentra en el núcleo de toda célula de planta o animal. . Puede medir desde medio millón (en las bacterias más simples) hasta varios cientos de millones de pares de bases (en los organismos superiores). En los organismos eucariontes los cromosomas se condensan y hacen visibles en ciertos momentos del ciclo de reproducción celular.

Cuajada: Fracción sólida de la leche que se forma tras la coagulación de las caseínas.

Dálton (Da): Unidad de masa casi igual a aquella del átomo de hidrógeno (exactamente igual a 1.0000 en la escala de masa atómica).

Desnaturalización: La pérdida de la conformación nativa de una macromolécula como resultado, por ejemplo, de calor, de cambios extremos de pH, tratamiento químico, etc. Es acompañada de la pérdida de actividad biológica.

DNA complementario (cDNA): Un DNA de cadena simple que es complementario a una cadena de mRNA. El DNA es sintetizado *in vitro* por una enzima conocida como transcriptasa inversa. Luego, una segunda cadena de DNA es sintetizada por la enzima conocida como DNA polimerasa.

DNA polimerasa: Una enzima que sintetiza una cadena doble de DNA. Lo logra catalizando la adición de residuos de desoxiribonucleótidos al extremo 3' de la cadena de DNA comenzando a partir de una mezcla de las bases trifosforiladas apropiadas, las cuales son dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Esta reacción química es reversible y, por lo tanto, la DNA polimerasa también funciona como exonucleasa.

Electroforesis en gel de agarosa: Una matriz compuesta por agar altamente purificado que se usa para separar moléculas grandes (alrededor de 20.000 nucleótidos) de DNA y RNA.

Electroforesis en gel de poliacrilamida: Electroforesis a través de una matriz compuesta de un polímero sintético, usada para separar proteínas o moléculas pequeñas de DNA o RNA.

Electroforesis: La técnica de separación de moléculas cargadas en una matriz a la cual se aplica un campo eléctrico.

Endonucleasa (enzima de restricción): Un tipo de endonucleasa que corta el DNA después de reconocer una secuencia específica (e.g. *bam*H1, *Eco*RI, *Hind*III)

Enzima: Un catalizador orgánico de base proteica que no es en sí consumido en la reacción. Es producido de forma natural por células vivientes para catalizar reacciones bioquímicas. Cada enzima es altamente específica con respecto al tipo de reacción química que cataliza y con respecto a las sustancias (llamadas sustratos) sobre los cuales actúa. Esta actividad catalítica específica y su control por otros constituyentes bioquímicos son de primordial importancia en las funciones fisiológicas de todos los organismos. A pesar de que todas las enzimas son proteínas usualmente contienen componentes no proteicos llamados coenzimas que son esenciales para la actividad catalítica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Eucariote: organismo con núcleo organizado y cromosomas. Forma parte de un gran grupo que difiere de los procariontes (las bacterias y organismos similares) que carecen de núcleo. Existen diferencias fundamentales entre la organización genética de uno y otro grupo.

Exón: El segmento de un gen eucariótico que es transcrito a mRNA; codifica para un dominio específico de una proteína.

Expresar: Traducir la información específica de una célula almacenada en el DNA (gen) a una proteína (sintetizada por el sistema de ribosomas de la célula).

Extremo romo de DNA: Un segmento de DNA que tiene a ambas hebras terminando en el mismo sitio de par de bases, esto es DNA con todas sus bases apareadas. No hay extremos adhesivos.

Fenotipo: se refiere a la manifestación observable de un determinado genotipo. A un genotipo corresponde un fenotipo. Por ejemplo, a la presencia de un gene productor de mucha melanina (genotipo), corresponde una coloración oscura de la piel (fenotipo).

Fermentación: Un proceso aeróbico o anaeróbico donde la fuente de carbono es también el aceptor de electrones. La fermentación se utiliza en varios procesos industriales para la manufactura de productos tales como alcoholes, ácidos etc.

Food and Drug Administration (FDA): La agencia federal encargada de aprobar todos los ingredientes alimenticios y farmacéuticos que se comercializan dentro de los Estados Unidos.

Gen: Un locus en un cromosoma que codifica una proteína específica o varias proteínas relacionadas. Se considera la unidad fundamental y funcional de la herencia, la porción de DNA que está organizada en una secuencia ordenada de pares de bases nucleótidos y que produce un producto específico o tiene una función asignada.

Genoma: término que denota a todo el material genético de un organismo vivo. En un ser humano, por ejemplo, se refiere a todas las secuencias de todos los cromosomas de una célula.

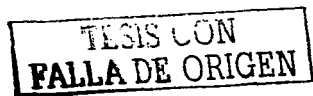
Genotipo: componente genético de un determinado individuo o variedad. Se refiere, en última instancia a la secuencia de su genoma. Su contraparte es el fenotipo.

GRAS (Generally Accepted As Safe): Aquellos microorganismos reconocidos como seguros para su uso en la industria farmacéutica o de los alimentos en cuanto riesgos posibles a la salud se refiere.

Halal: Palabra árabe que significa permitido o dentro de la ley. Aquellos alimentos etiquetados como Halal están aprobados para su consumo por la comunidad Musulmana.

Heterólogo: derivado de un organismo de especie distinta.

Hibridación: aplicado a los ácidos nucleicos, significa su capacidad de encontrar o asociarse a la hebra opuesta o complementaria.



Hibridización Northern (Northern blot): Procedimiento en el cuál un fragmento de RNA es transferido de un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa, en el cuál el RNA transferido es luego hibridizado a una sonda marcada con radiactividad u otro sistema.

Hibridización Southern (Southern blot): Una prueba que es realizada en muestras de DNA (por ej., para asegurar si el DNA insertado está presente en algunas células en particular). Se utiliza la electroforesis en gel para separar los fragmentos de DNA de acuerdo con su tamaño y entonces son transferidos a un filtro de nitrocelulosa (blot). Se añaden sondas de DNA o RNA etiquetadas radiactivamente, y aquellas que sean complementarias se unirán por hibridación con los fragmentos respectivos de DNA en el filtro. La localización de estas sondas radioetiquetadas puede ser interpretada para determinar la naturaleza del DNA en la muestra analizada.

Hidrólisis: Rotura de un enlace por adición de los elementos del agua, dando dos o más productos

in vitro: Crecimiento y desarrollo en el ambiente estéril de cultivo tejidos.

in vivo: se refiere a condiciones experimentales que incorporan células u organismos vivos.

Ingeniería Genética: La manipulación de la composición genética mediante la introducción o eliminación de genes específicos a través de técnicas modernas de biología molecular y DNA recombinante.

Interferon: Una familia de proteínas pequeñas que estimulan resistencia a virus en las células.

Intrón: Una secuencia no codificante de DNA en un gen, la cuál inicialmente se transcribe a RNA mensajero y posteriormente es escindida.

Kosher: Aquellos alimentos certificados por las autoridades judías para ser consumidos por los miembros de esa comunidad.

Ligación de extremos romos: Un método para unir fragmentos de DNA romos usando la enzima T4 ligasa la cuál puede unir DNA de doble cadena totalmente apareado.

Ligasa: Una enzima que une extremos de moléculas de DNA. Estas enzimas son herramientas esenciales en la ingeniería genética. c

Medio de cultivo: Cualquier sistema de nutrientes para el cultivo artificial de bacterias u otras células. Comúnmente consiste de una mezcla compleja de materiales orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, el medio de cultivo clásico usado para bacterias consiste de nutrientes requeridos por esas bacterias mas agar para solidificar o semi-solidificar la masa que contiene los nutrientes.

Microinyección: Medio para introducir una solución de DNA, proteína u otro material soluble a una célula utilizando una pipeta microcapilar.

Mutagénesis: proceso por el cual se inducen cambios en el material genético de un organismo. El proceso puede ser espontáneo o inducido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Nucleótido: unidad fundamental de los ácidos nucleicos. Constituida por una base, un azúcar y un fosfato.

Organismo transgénico: organismo vivo que contiene algún o algunos genes introducidos de manera exógena a su patrimonio genético. Se utiliza especialmente en los casos de plantas y animales.

Par de bases (pb): Dos nucleótidos que se encuentran en cadenas de ácido nucleico diferentes y cuyas bases se aparean (interactúan) por enlaces de hidrógeno. En el DNA las bases de nucleótidos son adenina (que se aparea con timina) y guanina (que se aparea con citosina).

Plásmido: Un elemento genético extracromosómico presente en muchas cepas bacterianas. Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de DNA utilizados como vectores para la transferencia de genes de un organismo a otro.

Primer (iniciador): Un fragmento corto de DNA o RNA ligado a un DNA de cadena simple a partir del cual la polimerasa extiende una nueva cadena de DNA para producir una molécula doble.

Promotor: Secuencias de DNA que controlan la expresión de genes.

Proteína: sustancia bioquímica constituida por una hebra o cadena lineal de unidades llamadas aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura y su función. Las proteínas son los productos primarios codificados por los genes, encargadas de organizar la actividad bioquímica celular.

Punto isoelectrico (pI): es el pH para el que una molécula es eléctricamente neutra, es decir, donde la suma de las cargas positivas iguala a la suma de las cargas negativas. La forma en que se encuentra la molécula en el punto isoelectrico se denomina zwitterion o forma isoelectrica.

Quimosina: También conocida como renina. Es una enzima usada para fabricar quesos a partir de leche. La quimosina se encuentra de forma natural en el estómago de terneros y es una de las enzimas de uso comercial mas antiguas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Un procedimiento de laboratorio que amplifica DNA enzimáticamente. Técnica poderosa para producir millones de copias de una región específica de DNA, que permite el analizarla tan rápido como se puede purificar una sustancia química. PCR ha sido el instrumento esencial en el desarrollo de técnicas de diagnóstico, medicina forense y la detección de genes asociados con errores innatos del metabolismo.

Recombinación: La unión de genes, juegos de genes o partes de genes, en nuevas combinaciones, ya sea biológicamente o por manipulación en laboratorio (ingeniería genética).

Replicación: proceso por el cual las moléculas de ADN se duplican, generando dos copias iguales a partir de una sola. El proceso requiere la separación de las dos hebras de la molécula original.

Resistencia a Antibióticos: Una propiedad de la célula que le permite evadir el efecto de un antibiótico que ha en un principio matado o inhibido a esa célula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ribosoma: organelo encargado de manufacturar proteínas, de acuerdo con las instrucciones del ADN (presentes en el ARN mensajero). Es un agregado de proteínas y ARN, llamado ribosomal.

Secuencia líder: la secuencia en el extremo 5' del mRNA que precede al codón de iniciación.

Secuencia poliadenilada: es una secuencia de DNA que al ser traducida es reconocida por el huésped de expresión para agregar residuos de poliadenosina al mRNA transcrito. Está unida al extremo 3' del DNA que codifica el polipéptido heterólogo que será expresado.

Secuenciación de DNA: Determinación del orden de bases en una molécula de DNA.

Sitio activo: zona de una enzima con la que se asocia el sustrato y donde se induce su transformación química para dar un producto. Los sitios activos frecuentemente son hendiduras en la superficie de las enzimas.

Sonda de DNA: También llamada sonda genética. Segmentos de DNA cortos y específicos complementarios a un gen deseado producidos artificialmente, usados para asociarse y detectar la presencia de genes específicos (o segmentos de DNA mas cortos) dentro de un cromosoma. Si una sonda de DNA de longitud y composición conocidas se mezcla con piezas de DNA cromosomal, la sonda se unirá a su contraparte exacta en las piezas de DNA cromosomal formando un híbrido de doble cadena estable. La presencia de esta sonda etiquetada es detectada visualmente o con la ayuda de un instrumento de detección.

Sustrato: sustancia o molécula con la que interacciona una enzima, transformándose en productos.

Tecnología de DNA recombinante: El proceso de cortar y recombinar fragmentos de DNA de diferentes fuentes como medio para el aislamiento de genes o para alterar su estructura y función.

Traducción: proceso por medio del cual se lee la secuencia de codones del ARN y se elabora una cadena de proteína, con la secuencia correspondiente, de acuerdo con el código genético.

Transcripción: proceso por el que un gene se expresa mediante la síntesis de un ARN que contiene la misma secuencia del gene.

Transformación: procedimiento que permite introducir, directamente a células vivas, moléculas de ADN. Existen varios procedimientos que pueden lograr este objetivo, por ej., tratamiento con calcio.

Transgénico (organismo): Un organismo (animal, vegetal o microorganismo) en el cual un gen foráneo (transgen), o una secuencia de DNA foránea ha sido incorporada a su genoma durante su desarrollo inicial. En los organismos transgénicos, en el laboratorio usando técnicas de DNA recombinantes, el DNA hereditario se incrementa por la adición de DNA de una fuente diferente al

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

germoplasma parental. El transgen se encuentra tanto en células somáticas como germinales, se expresa en uno o más tejidos y es heredado en forma Mendeliana.

Vector: Los vectores son agentes de transmisión. En biotecnología moderna, un vector es una molécula de DNA de replicación autónoma, en la cual fragmentos foráneos de DNA pueden insertarse y luego propagarse en una célula huésped. En el contexto de la tecnología del DNA recombinante, un vector es la molécula de DNA utilizada para introducir DNA foráneo a las células receptoras. Vectores de DNA recombinante incluyen plásmidos, bacteriófagos y otras formas de DNA.

Zimógeno: Precursor inactivo de un enzima (p.ej., pepsinógeno, precursor de pepsina)

Fuentes del glosario:

<http://biotechterms.org/>

<http://www.biexanara.tuportal.com>

<http://lectura.ilce.edu.mx:3000/>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

[Code of Federal Regulations]
[Title 21, Volume 3]
[Revised as of April 1, 2002]
From the U.S. Government Printing Office via GPO Access
[CITE: 21CFR184.1685]

[Page 536]

ANEXO I

TITLE 21--FOOD AND DRUGS

CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (CONTINUED)

PART 184--DIRECT FOOD SUBSTANCES AFFIRMED AS GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE--Table of

Subpart B--Listing of Specific Substances Affirmed as GRAS

Sec. 184.1685 Rennet (animal-derived) and chymosin preparation (fermentation-deriv

(a) (1) Rennet and bovine rennet are commercial extracts containing the active enzyme rennin (CAS Reg. No. 9001-98-3), also known as chymosin (International Union of Biochemistry Enzyme Commission (E.C.) 3.4.23.4). Rennet is the aqueous extract prepared from cleaned, frozen, salted, or dried fourth stomachs (abomasas) of calves, kids, or lambs. Bovine rennet is the product from adults of the animals listed above. Both products are called rennet and are clear amber to dark brown liquid preparations or white to tan powders.

(2) Chymosin preparation is a clear solution containing the active enzyme chymosin (E.C. 3.4.23.4). It is derived, via fermentation, from a nonpathogenic and nontoxicogenic strain of *Escherichia coli* K-12 containing the prochymosin gene. The prochymosin is isolated as an insoluble aggregate that is acid-treated to destroy residual cellular material and, after solubilization, is acid-treated to form chymosin. It must be processed with materials that are generally recognized as safe, or are food additives that have been approved by the Food and Drug Administration for this use.

(3) Chymosin preparation is a clear solution containing the active enzyme chymosin (E.C. 3.4.23.4). It is derived, via fermentation, from a nonpathogenic and nontoxicogenic strain of *Kluyveromyces marxianus* variety *lactis*, containing the prochymosin gene. The prochymosin is secreted by cells into fermentation broth and converted to chymosin by acid treatment. All materials used in the processing and formulating of chymosin must be either generally recognized as safe (GRAS), or be food additives that have been approved by the Food and Drug Administration for this use.

(4) Chymosin preparation is a clear solution containing the active enzyme chymosin (E.C. 3.4.23.4). It is derived, via fermentation, from a nonpathogenic and nontoxicogenic strain of *Aspergillus niger* van Tieghem variety *awamori* (Nakazawa) Al-Musallam (synonym *A. awamori* Nakazawa) containing the prochymosin gene. Chymosin is recovered from the fermentation broth after acid treatment. All materials used in the processing and formulating of chymosin preparation must be either generally recognized as safe (GRAS), or be food additives that have been approved by the Food and Drug Administration for this use.

(b) Rennet and chymosin preparation meet the general and additional requirements for enzyme preparations of the "Food Chemicals Codex," 3d Ed. (1981), pp. 107-110, which is incorporated by reference in accordance with 5 U.S.C. 552(a). Copies are available from the National Academy Press, 2101 Constitution Avenue NW., Washington, DC 20418, or are available for inspection at the Office of the Federal Register, 800 North Capitol Street, NW., suite 700, Washington, DC.

(c) In accordance with Sec. 184.1(b)(1), the ingredient is used in

<http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/get-cfr.cgi>

30/10/02

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

food with no limitation other than current good manufacturing practice. The affirmation of this ingredient as generally recognized as safe as a direct human food ingredient is based upon the following current good manufacturing practice conditions of use:

- (1) The ingredient is used as an enzyme as defined in Sec. 170.3(o)(9) of this chapter; a processing aid as defined in Sec. 170.3(o)(24) of this chapter; and a stabilizer and thickener as defined in Sec. 170.3(o)(28) of this chapter.
- (2) The ingredient is used in the following foods at levels not to exceed current good manufacturing practice: In cheeses as defined in Sec. 170.3(n)(5) of this chapter; frozen dairy desserts and mixes as defined in Sec. 170.3(n)(20) of this chapter; gelatins, puddings, and fillings as defined in Sec. 170.3(n)(22) of this chapter; and milk products as defined in Sec. 170.3(n)(31) of this chapter.
- (d) Prior sanctions for this ingredient different from the uses established in this section do not exist or have been waived.

[55 FR 10935, Mar. 23, 1990, as amended at 57 FR 6479, Feb. 25, 1992; 58 FR 27202, May 7, 1993]

[[Page 537]]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO II

Código de una y tres letras para aminoácidos

A	Alanina	Ala
C	Cisteina	Cys
D	Ac. aspártico	Asp
E	Ac glutámico	Glu
F	Fenilalanina	Phe
G	Glicina	Gly
H	Histidina	His
I	Isoleucina	Ile
K	Lisina	Lys
L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met
P	Prolina	Pro
Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg
S	Serina	Ser
T	Treonina	Thr
V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp
Y	Tirosina	Tyr

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CCC AGA TCC AAG ATG AGG TGT CTG GTG GTG CTA CTT GCT GTC TTC GCT CTC TCC GAA GGC GCT
 M R C L V V L L A V F A L S Q G A P1
 P21
 GAG ATC ACC AGG ATC CCT CTG TAC AAA GGC AAG TCT CTG AGG AAG GCG CTG AAG GAG CAT GGG
 G I T R I F L Y K G K S L R K A L K E H O
 P10 P20
 CTT CTG GAG CAG TTC CTG CAG AAA CAG CAG TAT GCG ATC AGC AGC AAG TAC TCC GGC TTC * GGG
 L L E N F L E K E E Y G I S S K Y S G F G I
 P30 P40
 GAG GTG GCG AGC GTG CCG CTG ACC AAC TAC CTG GAT AGT CAG TAC TTT GGG AAG ATC TAC CTG
 E V A D S V P L T N Y L D S Q Y F G K I Y L
 10 20
 GGG ACC CCG CCC CAG GAG TTC ACC GTG CTG TTT GAC ACT GCG TCC TCT GAC TTC TGG GTA CCG
 G T F F H E F T V L F D T G S D F W V P
 30 40
 TCT ATC TAC TCC AAG ACC AAT GCG TCC AAA AAC CAG CCG TTC GAG CCG AGA AAG TCG TCC
 S I Y C K S N A C K N H Q R F D P R K S S
 50 60
 ACC TTC CAG AAC CTG GCG AAG CCG CTG TCT ATC CAC TAC GCG ACA GCG AGC ATG CAG GGC ATC
 T F Q N L G K F L S I H Y G T 80
 70
 CTA GGC TAT GAC ACC GTG ACT GTG TCG AAG ATT GTG GAC ATC CAG CAG ACA GTA GGC CTG AGC
 L G Y D V T V S N I V D I Q 100
 90
 ACC CAG CAG CCG GCG GCA CTC TTC ACC TAT GCG GAA TTC GAG GCG ATC CTG GCG ATG GCG TAC
 T Q E P G D V F T Y A E F D G I L G M A Y
 110 120
 CCG CTC CTC GCG TCA GAG TAC TCG ATA CCG GTG TTT GAC D AAC ATG ATG AAC AGC CAG CTG GTG
 F S L A S E Y S I F V 140
 130
 GCG CAA GAC CTG TTC TCG GTT TAC ATG GAC AGG AAT GCG CAG GAG AGC ATG CTC ACG CTG GCG
 A Q D L F S V Y Y H D R N G Q E S H M I C T L G
 150 160
 GCG ATC CAG CCG TCC TAC ACA GCG TCC CTG CAC TCG GTG CCG CTC ACA GTG CAG CAG TAC
 A I N P S Y Y T G S L H W V P V T V Q Q Y
 170 180 190
 TGG CAG TTC ACT GTG GAC AGT GTC ACC ATC AGC GGT GTG GTT GTG GCG TGT GAG GGT GGC TGT
 M Q Q D V G S T I S G V V V A C E G C 210
 200
 CAG GCG ATC TTG GAC ACG GCG ACC TCC AAG CTG CTC GCG CCC AGC AGC GAC ATC CTC AAC ATC
 Q A I L D T G T 220
 210
 CAG CAG GCG ATT CAG GCG ACA CAG AAC CAG TAC GGT GAG TTT GAG ATC GCG TGC CAG AAC CTG
 Q Q A I G A T Q N Q Y G E F D I D C D N L
 240 250
 AGC TAC ATG CCC ACT GTG GTC TTT GAG ATC AAT GGC AAA ATG TAC CCA GTG ACC CCC TCC GCG
 S Y M P T V F E I N G K M Y P L T F S A
 260 270
 TAT ACC AGC CAA GAC CAG GCG TTC TCC ACC AGT GCG TTC CAG AGT GAA AAT CAT TCC CAG AAA
 Y T S Q D Q G G F C T S G F Q S E N H S Q K
 280 290
 TGG ATC CTG GCG GAT GTT TTC ATC CCA GAG TAT TAC AGC GTC TTT GAC AGG GCG AAC AAC CTG
 M I L G D V F I R E Y F 310
 300
 GTG GGG CTG GCG AAA GCG ATC TGA TCACATGCTGACCA.....
 V G L A K A I 320 323

ANEXO III: SECUENCIA DE BASES Y AMINOÁCIDOS DEL CDNA DE LA
 QUIMOSINA B DE BOVINO*

Fig. 1. Nucleotide sequence of calf chymosin B cDNA (adapted from Moir *et al.*, 1982).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

A N E X O IV: Productos fabricados por ingeniería genética permitidos para su uso en alimentos en el Reino Unido (fragmento).

Genetically engineered products approved for food use in the United Kingdom

© 1997 Agency BATS www.bats.ch/abstr/tables.htm

Product Name Company	Altered trait	# Promoter	Genes introduced (Source of transgene)	Approval / Date
Chymosin*** (ex <i>K. lactis</i>) Maxirend® Giste Brocades	Cheese production	nda	bovine prochymosin (isomer B) (bovine)	MAFF: 1/91
Chymosin*** (ex <i>E. coli</i> K12) Chy-Max® Pfizer	Cheese production	nda	bovine prochymosin (isomer A) (bovine)	MAFF: 3/92
Chymosin*** (ex <i>A. niger</i>) Chymogen® Christian Hansen / Genencor	Cheese production	nda	bovine prochymosin (isomer B) (bovine)	MAFF: 5/91
Yeast (bakers') Giste Brocades	Carbohydrate metabolism	1) P-EF(A) 2) P-adh I	Maltase Maltose permease (Yeast) (Yeast)	MAFF: 2/90
Yeast (brewers') BFR International	Improved starch degradation	1) nda 2) nda	STA2 CUP1 (Yeast) (Yeast)	MAFF: 3/94

(***) prochymosin is purified and activated to chymosin by autocatalysis at pH 2; alpha, recombinantly expressed chymosin has been approved in at least 17 countries (see , legend of Table 6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

72-23-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3 fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401 BIS, 401 BIS 1, 401 BIS 2 de la Ley General de Salud, 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, VI, VIII, XI, XIII, 41, 43, 47 fracción IV, 50 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 20 fracción III inciso b), 347, 348 fracción I y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 80 fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 28 de abril de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 15 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS

(AHORA: SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL)

Dirección General de Desarrollo Pecuário

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL

Dirección General de Políticas Comerciales

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

Dirección General de Investigación Tecnológica

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ANEXO V.- NOM-121-SSA1-1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.6.5.1.3 Espesantes

Agar agar

8 g/kg (solos o mezclados con otros espesantes)

Alginato de amonio

Alginato de potasio

Alginato de propilenglicol

Carboximetil celulosa de sodio

Carragenina

Goma arábica

Goma de algarrobo

Goma de karaya

Goma guar

Grenetina

Pectina

7.6.5.2 Se permite el empleo de la lecitina como emulsificante para la elaboración de los quesos llamados Cottage, sola o mezclada con otros estabilizantes, en una cantidad máxima de 5 g/kg.

7.6.5.3 Se permite el empleo de las siguientes sustancias espesantes en la elaboración de los quesos denominados Cottage (en la mezcla de la crema solos o mezclados con otros espesantes): Ácido alginico; alginato de calcio, potasio, propilenglicol o amonio; goma de algarrobo, carragenina, grenetina; goma guar; goma de karaya; carboximetil celulosa, en una cantidad máxima de 5 g/kg y además de caseinato de sodio, o potasio o calcio, solos o mezclados en una cantidad máxima de 30 g/kg.

7.6.5.4 Para los quesos procesados se permite la adición de caseinato de sodio, potasio o calcio solos o mezclados en una cantidad máxima de 30 g/kg.

7.6.6 Saborizantes

En la elaboración de los quesos denominados Petit Suisse se permite el empleo de los saborizantes que contemple el Reglamento, de acuerdo a las BPF, además de los establecidos en el Acuerdo que da a conocer la lista de sustancias sintético artificiales que solos o mezclados podrán utilizarse para la elaboración de saborizantes o aromatizantes sintético artificiales que se emplean en la industria de Alimentos y bebidas.

7.7.1.1 Control

En la elaboración de los quesos objeto de esta norma se permite el empleo de los siguientes aditivos autorizados a las BPF:

Enzimas de origen microbiano para curar la leche derivadas de:

Bacillus cereus

Erwinia persici

Mucor janthi

Mucor pusillus

Proteína derivada de subproductos de torres y porcinos

Quinazolina derivada de la Escherichia coli K12 y Polysorbato mercaderes vel. 100%

8. Muestreo

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

9. Métodos de prueba

Para la verificación de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba que se señalan en el Apartado de referencias.

10. Etiquetado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Dijck, V. W. M. (1999) Chymosin and Pepsinase made by genetic engineering (No.10). *J of Biotechnology*. 67, 77-80.
2. The University of Reading. (2001). NCBE Chymosin for cheese making. www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/GMFOOD/chymosin.com
3. FAO (2002). Chymosin B from *Kluyveromyces lactis* containing the prochymosin gene. www.fao.org/docrep/X3860E10.htm
4. Dalgleish D.G. (1987) The enzymatic coagulation of milk: In: Fox PF (ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp 63-96. London: Elsevier Applied Science. // Fox P.F. and Mulvihill D.M. (1990) Casein: In: Harris P (ed.) *Food Gels*, pp 121-173. London: Elsevier Applied Science.
5. European Food Information Council (2002). Chymosin and cheese making. <http://www.eufic.org/sp/tech/tech02e.htm>
6. Mohanty, A.K., Mukhopadhyay U.K., Grover S., Batish V.K. (1999) Bovine Chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*. 17, 205-217.
7. El Danes, S. A. de C. V. (2001) Fábrica de cuajo. (Literatura comercial).
8. The University of Reading. Department of Food Science and Technology (1996) Industrial Enzymology: Recombinant chymosin. <http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic11/index.htm>
9. Chitpintyol, S., and Crabbe M.J.C. (1997) Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*. 61, 395-418.
10. Chitpintyol, S., Goode, D., Crabbe, M. J. C. (1998) Studies on the Binding of α -Crystallin to Recombinant Prochymosins and Chymosin. *Molecular Vision* 4: 1.
11. Utah State Biotechnology and Genomics Research Center (2002) Making Cheese Using Modern Biotechnology. http://www.usu.edu/biotech/education_outreach_cheese_lab.html
12. CHR Hansen (2002) Coagulants <http://www.chr-hansen.com/>
13. Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Coffey, A. (2000) Novel cultures for cheese improvement. *Trends in food science & technology*. 11, 96-104.

14. FAO (2000) Queso (Todos tipos) Producción.
<http://apps.fao.org/page/collections?language=ES>
15. Davidson College, NC. (2002) Department of Biology: Genetically Modified Organisms
<http://www.bio.davidson.edu/people/kabernd/seminar/GMO/wwwmeth.html>
18. Access Excellence. The National Health Museum (2002) Recombinant DNA.
http://www.accessexcellence.com/AB/IE/Speaking_Language_rDNA.html
19. Formaggioni, P., Summer, M., Malacarne, M. y Mariani, P. (2000) Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma, Italy.
20. Luquet, F. M. (1993) *Leche y Productos lácteos. Transformación y Tecnologías*. Acribia. Zaragoza, España.
21. Byong H., Lee. (1996) *Fundamentos de biotecnología de los alimentos*. Acribia. Zaragoza, España.
22. Primrose, S.B. (1991) *Molecular Biotechnology*. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
23. Bains, W. (1998) *Biotechnology from A to Z*. 2nd edition. Oxford University Press. New York.
24. Gellisen, G. and Hollenberg C. P. (1996). Applications of yeast in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*. *Gene*. 190, 87-97.
25. Goff, C., Moir, D. T., Kohno, T., Gravius, T. C., Smith, R. A., Yamasaki, E., and Tauton-Rigby, A. (1984). Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 27, 35-46.
26. Van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J. J., Renniers, T. C. H. M., Rietveld, K., and Schaap, A. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of proquimosin. *Bio/Technology*. 8, 135-139.
27. Berka, R. M. (1994) Heterologous polypeptides expressed in *aspergillus*. Pat.Num.05364770
http://www.nal.usda.gov/bic/Biotech_Patents/1994patents/05364770.html

28. Berka, R.M. (1991) *Applications of Enzyme Biotechnology: Aspergillus niger* var. Awamori as a host for the expression of heterologous genes., Edited by J.W. Kelly and T.O. Baldwin, Plenum Press, New York.
29. Industrias Cuamex, S.A. de C.V. (2000) Boletín de ventas. Cuajo industrial Cuamex
30. The American Heritage® Dictionary of the English Language, Fourth Edition. Copyright © 2000 by Houghton Mifflin Company. Published by the Houghton Mifflin Company. All rights reserved.
<http://www.bartleby.com/61/imagepages/A4abomas.html>
31. Rocha, T. L., Paterson, G., Crimmins, K., Boyd, A., Sawyer, L., and Fothergill-Gilmore, L. A. (1996) Expression and secretion of recombinant ovine beta-lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Biochem.* 313. 927-932.
32. Rebecca S. Powell (2000) Kitchen table cheese making.
<http://cheesebits.com/chapt02.htm>
33. American Council on Science and Health (2000) *Biotechnology and Food*.
<http://www.acsh.org/publications/booklets/biotechnology2000.html>
34. Fox, P. (1987) *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Vol.1. Elsevier applied science. Ireland.
35. Université François Rabelais. Laboratoire d'Enzymologie et Chimie des Protéines (2002) <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/inhibitor.html>
36. Merck Index, 11th ed., p. 1133, #7104 (1989) Sigma product information sheet. Pepstatin <https://www.sigma-aldrich.com/sigma/proddata/p4265.htm>
37. Milk Net, Brazil (2000) Chymax. <http://www.milknet.com.br/hala/chymax.html>
38. Lopes, A. et. al. (1997) New vegetal sources for milk clotting enzymes. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5. 63-68.
40. Instituto Latinoamericano de Comunicación Educativa. (2002) La ciencia para todos: del ADN a las proteínas
http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/143/htm/sec_6.htm
41. FDA (2003) Office of Regulatory Affairs.
http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/iom/APPENDICES/appA3.html

42. Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., Torre, P. (2002) Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, a sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *International Dairy Journal* 12. 27–34
43. Chitpinitiyol, S., Goode, D., Crabbe, M. J. C. (1998) Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk clotting activity. *Food Chemistry*. 62. 133-139.
44. Wei, C., Tang, B., Zhang, Y., Yang, K. (1999) Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem J*. 340. 345-351.
45. Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., Torre, P. (2000) Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881. 59–67
46. Reid, J. R., Coolbear, T., Ayers, J. S., Coolbear, K. P. (1997) The Action of Chymosin on κ -Casein and its Macropeptide: Effect of pH and Analysis of Products of Secondary Hydrolysis. *Int. Dairy Journal*. 7. 559-569.
47. Emtage, J. S., Angal, S., Doel, M. T., Harris, T. J. R., Jenkins, B., Lilley, G., Lowe, P. A. (1983) Synthesis of calf proquimosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 80. 3671-3675.
48. Foltmann, B. (1970) Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Methods in enzymology*, vol. 19. Academic Press, New York, 1970. 421-436.
49. Awad, S., Lüthi-Peng, Q., Puhán, Z. (1998) Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow and goat whole and β -casein fractions. *J. Agric. Food Chem.* 46. 4997-5007.
50. Ward, M., Wilson, L. J., Kodama, K. H. (1993) Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for integrated plasmid, to overproduce heterologous proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 39(6): 738–43.
51. Tsuchita, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G. (1993) Secretion of calf chymosin from filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40(2-3): 327-32.
52. McSweeney, P. L., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A., Hojrup, P. (1993) Proteolytic specificity of chymosin on bovine alpha s1-casein. *J. Dairy Res.* 60(3): 401-12
53. Swinkels, B. W., van Ooyen, A. J., Bonekamp, F. J. (1993) The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression (review). *Antonie van Leeuwenhoek*. 64(2): 187-201.

54. Tsuchita, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G. (1994) High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58(5): 895-9
55. Archer, D. B. (1994). Enzyme production by recombinant *Aspergillus* (review) *Bioprocess Technol.* 19. 373-93
56. Walsh, M. K., Swaisgood, H. E. (1996) Investigating the use of chymosin-sensitive sequence of kappa-casein as a cleavable linker site in fusion proteins. *J Biotechnol.* 45(3): 235-41.
57. Lantbruksuniversitet, Sweden. (2001) Structural Biology Labs: Chymosin
<http://alpha2.bmc.uu.se/Courses/Bke1/2001/Projects/Chymosin/index.html>
58. Gilliland, G. L., Winborne, E. L., Nachman, J., Wlodawer, A. (1990) The Three-Dimensional Structure of Recombinant Bovine Chymosin at 2.3 Å Resolution. *Proteins* 1990, 8, 82-101.
59. Wei, C., Zhang, Y., Yang, K. (2000) Chaperone mediated refolding of recombinant chymosin. *J Protein Chem.* 19(6): 449-56
60. Laboratorio Genomik, Venezuela. (2002) Principios de la Reacción en cadena de la Polimerasa <http://www.labgenomik.com/Tecnicas.htm>
61. Bruin On Line. UCLA (2002) Cloning of endangered animals: Polymerase Chain Reaction. <http://www.bol.ucla.edu/~megami/pcr.html>
62. Cheng, H. J., Pan, X. F., Zhang, G. B., Liu, N. J., Zhang, Y. Y., Yang, K. Y. (2001) Site-directed mutagenesis at disulfide bond Cys206-Cys210 of prochymosin (chymosin). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 17(1): 7-10
63. Francky, A., Franky, B. M., Strukelj, B., Gruden, K., Ritonja, A., Krizaj, I., Fregar, I., Pain, R. H., Pungercar, J. (2001) A basic residue at position 36p of the propeptide is not essential for the correct folding and subsequent catalytic activation of prochymosin. *Eur J Biochem.* 268(8): 2362-8.
64. Mezina, M. N., Lavrenova, G. I., Prokofiev, M. I., Starovoitova, V. V., Ermoralev, V. I., Chernyh, V. Y., Balandina, G. N., Demidovich, S. S. (2001) Isolation of milk-clotting enzyme from transgenic sheep milk and its comparison with calf chymosin. *Biochemistry.* 66(4): 378-83.