



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 775**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 15/59 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01982192 .5**

96 Fecha de presentación : **06.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1334182**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54

Título: **Método de producción de quimosina no bovina y uso de la misma.**

30

Prioridad: **06.11.2000 US 705917**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.03.2011

73

Titular/es: **CHR. HANSEN A/S**
Boege Alle 10-12, P.O. Box 407
2970 Hørsholm, DK
Eidgenossische Technische Hochschule (ETH)

72

Inventor/es: **Kappeler, Stefan;**
Farah, Zakaria;
Budtz, Peter;
Rahbek-Nielsen, Henrik y
Van den Brink, Johannes, Maarten

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 354 775 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de quimosina no bovina y uso de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la fabricación de queso. En particular, se proporcionan nuevos medios recombinantes para proporcionar enzimas de coagulación de leche de origen animal no bovino, es decir no *Bos taurus*. Específicamente, la invención pertenece a un proceso para proporcionar de forma recombinante preproquimosina, proquimosina y quimosina de origen no bovino incluyendo las enzimas que se derivan de camellos.

Antecedentes técnicos y Técnica anterior

La coagulación enzimática de enzimas de coagulación de leche-por-leche, tales como la quimosina y la pepsina, es uno de los procesos más importantes en la fabricación de quesos. La coagulación de leche enzimática es un proceso bifásico: una primera fase donde una enzima, quimosina o pepsina proteolítica ataca a la κ -caseína, dando como resultado un estado metaestable de la estructura micela de la caseína y una segunda fase, donde la leche coagula posteriormente y forma un coágulo.

Quimosina (EC 3.4.23.4) y pepsina (EC 3.4.23.1), las enzimas de coagulación de la leche del estómago mamífero, son proteasas aspárticas pertenecientes a una clase amplia de peptidasas (Kappeler, 1998). Las proteasas aspárticas se encuentran en eucariotas, retrovirus y algunos virus vegetales. Las proteasas aspárticas eucarióticas son monómeros de aproximadamente 35 kDa, los cuales se incorporan en un par de dominios dispuestos en tándem con un alto grado de similitud, es decir un 20% o mayor. La estructura secundaria global consiste casi en su totalidad de hojas plegadas y es baja en α -hélices. Cada dominio contiene un sitio activo centrado en un residuo aspartil catalítico con una secuencia consenso [hidrofóbica]-Asp-Thr-Gly-[Ser/Thr] la cual ayuda a mantener la conformación correcta de ϕ -bucles del sitio, y con múltiples residuos hidrofóbicos cerca del residuo aspártico. Los dos sitios catalíticos están dispuestos el uno en frente del otro en la estructura terciaria de proteínas correctamente plegadas. En la quimosina bovina, la distancia entre las cadenas laterales aspárticas es de aproximadamente 3,5 Å. Los residuos están extensivamente enlazados con hidrógeno, concomitantemente con los residuos de treonina contiguos, a los residuos correspondientes del otro dominio o los átomos limítrofes del propio dominio, para estabilizar la posición correcta. La actividad óptima de una proteasa aspártica se consigue cuando uno de los residuos aspárticos se protona y el otro se carga negativamente. Los sitios activos de quimosina y otras proteasas aspárticas se introducen, con accesibilidad baja, en medio de una fisura, de aproximadamente 40 Å de longitud, la cual separa los dos dominios, y la cual está cubierto por una lengüeta que, en quimosina bovina y de camello, se extiende de aproximadamente Leu73 a Ile85 en el dominio N-terminal.

Cuando se producen en las células de las mucosas gástricas, la quimosina y la pepsina ocurren como preproquimosina y prepepsinógeno enzimáticamente inactivos, respectivamente. Cuando se excreta quimosina, un fragmento peptídico N-terminal, el prefragmento (péptido señal) se divide para dar proquimosina incluyendo un profragmento. La proquimosina es una forma sustancialmente inactiva de la enzima que, no obstante, se vuelve activa bajo condiciones ácidas para la quimosina activa por eliminación autocatalítica del profragmento. Esta activación ocurre *in vivo* en el lumen gástrico bajo condiciones de pH apropiadas o *in vitro* bajo condiciones ácidas.

Las características funcionales y estructurales de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina bovinas, es decir *Bos taurus*, se han estudiado de forma extensa (Foltmann *et al.* 1977). La preparte de la molécula de preproquimosina bovina comprende 16 residuos aa y la parte de la proquimosina correspondiente tiene una longitud de 42 residuos aa. Foltmann *et al.*, 1997 ha mostrado que la quimosina bovina activa comprendiendo 323 aa es una mezcla de dos formas, A y B, las cuales son ambas activas, y los datos de secuenciación indican que la única diferencia entre estas dos formas es un residuo de aspartato en la posición 290 en la quimosina A y un residuo de glicina en esta posición de la quimosina B.

Mientras que la quimosina se produce de forma natural en especies mamíferas incluyendo especies de rumiantes tales como bovinos, caprinos, búfalos y ovinos; cerdos (Houen *et al.*, 1996); la especie *Camelidae*; primates incluyendo seres humanos y simios; y ratas, la quimosina bovina y (en una extensión menor) la quimosina caprina son actualmente las únicas de estas especies de quimosina animal que están disponibles comercialmente para la industria lechera. La quimosina bovina, en particular la quimosina de ternero, está comercialmente disponible tanto como extractos de enzima de estómago (cuajos) comprendiendo la quimosina producida de manera natural y como quimosina producida recombinantemente la cual está expresada en células huéspedes bacterianas, de levadura o fúngicas (véase por ejemplo WO 95/29999, Ward *et al.* 1990).

Recientemente, se han realizado estudios sobre las características funcionales de la quimosina de cuajo extraído del estómago de *Camelus dromedarius* (Wangoh *et al.*, 1993 Elagamy, 2000) y se ha descubierto que el tiempo de coagulación de la leche de camella se reduce significativamente cuando se usa cuajo de camello en vez de cuajo de ternero bovino. Fracciones de cuajos de camello y de ternero crudas, las cuales se aislaron por cromatografía de intercambio aniónico, se han evaluado para conocer sus capacidades respectivas para coagular leche de camello y leche de vaca y se descubrió que la actividad de coagulación principal del cuajo de ternero (es decir, un extracto conteniendo tanto quimosina como pepsina) reside en la fracción de pepsina, es decir la quimosina bovina es sustancialmente inactiva con respecto a coagular la leche de camella, mientras que la actividad de coagulación principal de los extractos

del cuajo de camello en la leche de camella residió en una primera fracción que, en comparación con la quimosina de ternero, eluyó a una concentración de NaCl algo inferior. La enzima activa de esta fracción aún no se ha caracterizado, pero es presuntamente quimosina. También se ha demostrado que esta fracción de cuajo de camello tiene una actividad de coagulación en la leche de vaca similar a la de la quimosina bovina (Wangoh *et al.*, 1993). Es evidente, por lo tanto, que la coagulación de la leche de camella más eficaz que se pudo conseguir a un nivel industrial fue con la quimosina de camello disponible comercialmente y es también concebible que la quimosina de camello es también altamente adecuada como enzima de la coagulación de leche de vaca.

WO 95/29999 divulga un proceso para recuperar quimosina y pepsina bovinas a partir de un extracto crudo de tejidos animales, véase la página 6, líneas 12-18. Todos los experimentos se llevan a cabo sobre tejido bovino.

Ward *et al.*, 1990 divulga un método para la producción mejorada de quimosina bovina por expresión de la enzima como una proteína de fusión. El objetivo parece para ser mejorar el rendimiento de la enzima.

Wangoh *et al.*, 1993 divulga que se puede extraer cuajo de camello de camel abomasum, y que el cuajo de camello es más eficaz para coagular leche de camello que el cuajo de ternero.

Elagamy 2000 divulga que el cuajo de camello originado de tejido de abomasum es un coagulante relativamente eficaz para la caseína de leche de camella. El objetivo del estudio fue producir información que pueda probarse como útil en la coagulación de leche de camella y la producción de queso.

Se ha determinado la estructura primaria de quimosina aislada a partir de mucosa gástrica de camellos (Kappeler, 1998). La forma madura y activa de la quimosina de camello es de 323 residuos aa de longitud y tiene un peso molecular de 35,6 kDa y un punto isoeléctrico a pH 4.71. Ésta muestra un 85,1% de identidad de secuencia de aa con la quimosina bovina.

Actualmente, la quimosina bovina se fabrica industrialmente usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo usando hongos filamentosos tales como de la especie *Aspergillus* (véase por ejemplo Ward, 1990), cepas de levadura, por ejemplo de la especie *Kluyveromyces*, o especies bacterianas, por ejemplo *E. coli*, como organismos huéspedes. Tales cepas de producción microbiana recombinantes se construyen y mejoran continuamente usando tecnología de ADN así como medidas de mejora de cepa tradicionales dirigidas a optimizar la expresión y secreción de la proteína heteróloga, pero es evidente que la productividad en términos de rendimiento global del producto genético es un factor importante para la eficacia del coste de la producción industrial de la enzima. Por consiguiente, existe una necesidad industrial continua de mejorar el rendimiento de la quimosina en sistemas de expresión recombinantes.

Mientras que los esfuerzos por mejorar los rendimientos de la actividad de la quimosina han concernido hasta la fecha exclusivamente a la quimosina de origen bovino, la industria no ha explorado todavía la posibilidad de proporcionar quimosina eficaz basada en las preparaciones en especies de quimosina no bovina, es decir no de *Bos taurus*. No obstante, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible proporcionar quimosina no bovina altamente útil a nivel industrial usando tecnología de ADN recombinante a un nivel de rendimiento de producción el cual, en relación al que se puede obtener en sistemas de producción de quimosina bovina optimizados corrientes, está significativamente mejorado.

Además del potencial de la eficacia de los costes de producción de quimosina significativamente mejorada, la provisión de tal especie de quimosina no bovina a un nivel comercial pone a disposición productos de quimosina que no sólo son capaces de coagular leche de vaca al menos tan eficazmente como la quimosina de origen bovino, sino que, además, son capaces de coagular más eficazmente leche de otras especies animales incluyendo leche de la especie de origen. Específicamente, la invención ha hecho posible proporcionar, por primera vez, quimosina de camello en cantidades suficientes para hacer viable una producción industrial de alta calidad y rentable de queso basado en leche de camella, la cual, debido a la escasez de material del estómago de ternero de camello, no había sido hasta ahora posible.

Además, se ha descubierto que la quimosina de camello tiene una alta actividad de coagulación en la leche de vaca, lo cual hace la enzima útil para fabricar queso a base de leche de vaca. Fue un descubrimiento sorprendente de los presentes inventores que la quimosina de camello tiene una actividad hidrolizante de κ -caseína específica (Phe-Met 105/106), es decir, proporción C/P tal y como se define a continuación, la cual es superior a la de la quimosina bovina. Una proporción C/P más alta implica generalmente que la pérdida de proteína durante la fabricación de queso debido a la degradación de proteína no específica se reduzca, es decir que el rendimiento del queso se mejore, y que el desarrollo del sabor amargo en el queso durante la maduración se reduzca.

Resumen de la invención

La invención se refiere en un aspecto a un método para producir una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina, el método incluyendo las etapas de (i) aislar o construir una secuencia de ácidos nucleicos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina, donde la secuencia codificante se deriva de unas especies mamíferas seleccionadas del grupo que consiste en una especie camelidae, (ii) construir un vector de expresión comprendiendo dicha secuencia codificante y, operativamente vinculado, señales de expresión apropiadas permitiendo a la preproquimosina, proquimosina o quimosina expresarse en una célula huésped, (iii) transformar dicha célula huésped con

el vector de expresión, (iv) cultivar la célula huésped transformada bajo condiciones donde se expresa la secuencia codificante y (v) recoger la preproquimosina, proquimosina o quimosina. Como se utiliza en este caso, la expresión “preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovinas” se refiere a tales enzimas o precursores de éstas que se derivan de unas especies mamíferas diferentes de *Bos taurus*.

En otros aspectos, la invención pertenece a un constructo de ADN capaz de expresar preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovinas, dicho constructo comprendiendo un vector de expresión comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos comprendiendo un gen codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina, donde la secuencia codificante se deriva de unas especies mamíferas seleccionadas del grupo que consiste en una especie Camelidae, y, operativamente vinculadas, señales de expresión apropiadas permitiendo expresar la preproquimosina, proquimosina o quimosina en una célula huésped, y a una célula huésped transformada con tal constructo de ADN.

En otros aspectos se proporciona una composición comprendiendo una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina producida por el método anterior incluyendo una enzima tal que está en una forma sustancialmente deglicosilada y un método para fabricar queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de tal composición a leche y realizar el resto de fases de fabricación de queso apropiadas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina o quimosina no bovina a la leche y realizar apropiado además pasos de fabricación de queso, la proquimosina no bovina o quimosina teniendo en dicha leche una proporción C/P como se determina aquí, la cual está en el rango de 2-20, donde la proquimosina o quimosina no bovina se produce por recombinación usando una secuencia codificante derivada de unas especies mamíferas seleccionadas del grupo que consiste en una especie Camelidae.

En otros aspectos la invención proporciona una composición de coagulación de leche comprendiendo una enzima de coagulación de leche bovina seleccionada a partir de proquimosina, quimosina y pepsina y una enzima de coagulación de leche no bovina seleccionada de proquimosina, quimosina, pepsina y una proteasa microbiana aspártica, donde la enzima de coagulación de leche no bovina se produce recombinantemente usando una secuencia codificante derivada de unas especies mamíferas seleccionadas a partir del grupo que consiste en una especie Camelidae, y un método para fabricar queso a partir de leche, comprendiendo añadir a la leche una cantidad eficaz de coagulación de leche de tal composición, y realizar el resto de fases de fabricación de queso apropiadas.

Descripción detallada de la invención

Según la invención, en un aspecto de la invención se proporciona un método para producir recombinantemente preproquimosina, proquimosina o quimosina de origen no bovino.

Para los objetivos de esta solicitud, la expresión “de origen no bovino” se refiere a cualquier especie mamífera no *Bos taurus* donde la preproquimosina se produce naturalmente en el tracto gastrointestinal seleccionado de especies Camelidae comprendiendo el género *Camelus* con las dos especies *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus* el género *Lama* incluyendo *Lama glama*, *Lama guanicoe* y *Lama paco*; y el género *Vicugna*. Los camellos son ruminantes, pero no pertenecen al suborden *Ruminantia* como lo hacen por ejemplo las especies bovina, ovina y caprina, sino que pertenecen al suborden *Tylopoda*.

No obstante, una quimosina no bovina como se usa en este contexto también puede incluir una molécula de quimosina codificada por un clúster o una redistribución de segmentos de ADN de diferente origen dando como resultado reestructuraciones complejas del ADN. La redistribución de segmentos de ADN o transposición de genes se debe interpretar en la presente invención en general como un método para la construcción de genes quiméricos dando como resultado genes codificando proteínas quiméricas. Tales proteínas consistirán en dominios derivados de dos o más proteínas parentales. Los genes quiméricos pueden construirse o bien en base a un diseño racional basado en el conocimiento de la función de la proteína o en base a métodos de laboratorio combinatorios generando genes quiméricos aleatorios. Tales bibliotecas combinatorias aleatorias se pueden seleccionar para la identificación de enzimas óptimas mediante una variedad de procedimientos de selección.

La proquimosina se debe entender en el presente contexto como el precursor o la proenzima de la quimosina. La proquimosina parece poseer una secuencia guía básica (pro-parte) en el lado N-terminal de la quimosina y dicha secuencia guía se cree dividirse durante la activación de la proquimosina. Además en este contexto la preproquimosina consiste en proquimosina a la cual se añade en el extremo N-terminal de la proquimosina una secuencia guía hidrofóbica. Esta secuencia guía, también llamada señal de secreción o preparte, se divide cuando la proteína se segrega. La quimosina se sintetiza en la célula inicialmente como preproquimosina. (Harris, T.J., Lowe, P.A., Lyons M.T., A., Thomas, P.G., Millican, T.A., Ptael, T.P., Bose, C.C., Carey, N.H., Doel, Nucleic acid Research 1982, abril 10, 2177-2187 Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin.)

En una fase inicial de este método, está provista una secuencia de ácidos nucleicos, es decir un polinucleótido, de origen no bovino que codifica la preproquimosina, proquimosina o quimosina. El experto en la materia apreciará que se pueden usar diferentes enfoques para obtener tal secuencia incluyendo uno basado en el aislamiento de ARNm de células de mucosa de la especie animal fuente seleccionada y usando este ARN como patrón en un procedimiento de amplificación de nucleótidos tal como una reacción PCR usando cebadores adecuados sentido y anti-sentido los

cuales por ejemplo se puede construir sintéticamente basados en las secuencias conocidas para especies de quimosina bovinas. La persona experta en la técnica apreciará que se pueden utilizar otros métodos para obtener una secuencia codificante según la invención tales como procedimientos de hibridación usando como sondas fragmentos de secuencias de codificación conocidas para la quimosina que permitan detectar la presencia de ADN homólogo o ARN en preparaciones de células de la especie fuente seleccionada no bovina. Alternativamente, es posible construir una secuencia codificante basada en el aislamiento de la preproquimosina, la proquimosina o la quimosina no bovina seguida de determinar la secuencia de aminoácidos de la enzima o fragmentos de la misma lo cual a su vez permite la construcción de oligonucleótidos de cebador para la detección y la construcción de secuencias de codificación. Las técnicas básicas que se requieren en los procedimientos anteriores para obtener secuencias de codificación están generalmente dentro del conocimiento común del experto en la materia (Sambrook *et al.*, 1989).

Habiendo aislado o construido la secuencia de nucleótidos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina se construye un vector de expresión que comprende la secuencia codificante y, operativamente vinculado al mismo, señales de expresión apropiadas, es decir secuencias para controlar o regular la expresión, permitiendo expresar la preproquimosina, proquimosina o quimosina en una célula huésped seleccionada. Un vector de expresión incluye normalmente los componentes de un vector de clonación típico, es decir un elemento que permite la replicación autónoma del vector en el organismo huésped seleccionado y uno o más marcadores fenotípicos para los objetivos de selección. Un vector de expresión adecuado puede comprender además una o más señales de expresión tales como secuencias promotoras, operadores, sitios de unión de ribosoma, sitios de iniciación de traducción y/o secuencias codificando sustancias represoras o activadoras. Para permitir la secreción del polipéptido expresado, una secuencia señal se puede insertar corriente arriba de la secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina o quimosina. En el presente contexto, el término “señal de expresión” incluye cualquiera de las secuencias de control, sustancias represoras o activadoras y secuencias señal anteriores. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia codificante se vincula operativamente a las secuencias control de manera apropiada con respecto a la expresión.

De acuerdo con la invención, un vector de expresión llevando la secuencia de nucleótidos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina puede ser cualquier vector que sea capaz de expresar la secuencia codificante en el organismo huésped seleccionado, y la elección de tipo de vector dependerá de la célula huésped en la cual se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica en las células huéspedes, por ejemplo un plásmido, un bacteriófago, un minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma, incluyendo un elemento transponible.

En el vector, la secuencia de nucleótidos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina se combina operativamente con una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, la cual confiera actividad transcripcional al organismo huésped de elección y se pueda derivar de genes codificando proteínas, las cuales sean o bien heterólogas u homólogas al organismo huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia codificante de la invención en un huésped bacteriano incluyen el promotor del operón lac de *E. coli*, el promotor tac, los promotores del gen de agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), los promotores del gen de amilasa de maltogenio de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), los promotores del gen C-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* y los promotores de origen bacteriano de ácido láctico tales como los promotores regulables descritos en WO 94/16086, los cuales se incorporan aquí por referencia.

Para la transcripción en una especie fúngica, son ejemplos de promotores útiles los derivados de los genes que codifican la alcohol-oxidasa de *Pichia pastoris*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa de aspartio de *Rhizomucor miehei*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *A. niger*, *gpdA* de *A. niger*, *pepA* de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus oryzae* o acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, *gpdA* de *A. nidulans* y un promotor *chbl* de *Trichoderma reesei*. Como ejemplos de promotores adecuados para la expresión en una especie de levadura se pueden mencionar los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae*. Al expresarse en una especie bacteriana tal como *E. coli*, un promotor adecuado se puede seleccionar de un promotor bacteriófago incluyendo un promotor T7 o un promotor bacteriófago lambda.

El vector comprendiendo el fragmento de ADN codificando el polipéptido activo de la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen el producto del cual complementa un defecto en el organismo huésped tal como una mutación que confiere un fenotipo auxotrófico, o el marcador puede ser un que confiera resistencia antibiótica o resistencia a iones de metal pesado.

En una forma de realización específica, el vector de expresión se deriva de pGAMpR como se describe en Ward *et al.*, 1990 por substitución de la secuencia codificante de este vector por proquimosina bovina con una secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina o quimosina no-bovina. Un ejemplo de tal vector de expresión derivado de pGAMpR es pGAMpR-C depositado en un entorno huésped de *Aspergillus niger* var. *awamori* bajo los Nos. de registro CBS 108915 y CBS 108916, respectivamente.

La persona de habilidad en la técnica apreciará fácilmente que cualquier secuencia codificando una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina construable como se ha descrito anteriormente se puede modificar por substitución, borrado, inserción o adición de uno o más nucleósidos para obtener una codificación de secuencia para una preproquimosina, proquimosina o quimosina no-bovina comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la enzima no bovina producida de forma natural o teniendo, en relación a la enzima no bovina producida de forma natural, una secuencia de aminoácidos modificada. Tal secuencia codificante modificada incluye una secuencia quimérica comprendiendo partes de dos o más secuencias codificantes aisladas o derivadas de especies animales no bovinas y secuencias codificantes quiméricas comprendiendo parte de una secuencia codificante de una o más especies no *Bos taurus* y parte de una secuencia codificante de *Bos taurus*.

En una fase posterior del método una célula huésped adecuada se transforma con el vector de expresión. La célula huésped se puede transformar con un vector de replicación autónoma o un vector que permite que la secuencia codificante se integre en el cromosoma de la célula huésped. Tal integración se considera generalmente ventajosa puesto que la secuencia codificante tiene más posibilidades de mantenerse estable en la célula. Integración de la secuencia codificante en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales tales como por ejemplo por recombinación homóloga o heteróloga o por medio de un elemento transponible.

Según la invención, el organismo huésped puede ser una célula de un organismo mayor tal como una célula animal, incluyendo un mamífero, una célula aviar o de insecto, o una célula vegetal. No obstante, en formas de realización preferidas, el organismo huésped es una célula microbiana, por ejemplo una célula bacteriana o fúngica incluyendo una célula de levadura.

Ejemplos de organismos huéspedes bacterianos adecuados son las especies bacterianas Gram positivas tales como *Bacillaceae* incluyendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus thuringiensis*, especies de *Streptomyces* tales como *Streptomyces murinus*, especies bacterianas de ácido láctico incluyendo *Lactococcus spp.* tales como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp.* incluyendo *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc spp.* y *Streptococcus spp.* Alternativamente, cepas de una especie bacteriana gram negativa tal como una especie de *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli* o de *Pseudomonadaceae*, se pueden seleccionar como el organismo huésped.

Un organismo huésped de levadura adecuado se puede seleccionar ventajosamente de una especie de *Saccharomyces* incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* o una especie de *Schizosaccharomyces*. Otros organismos huéspedes de levadura útiles incluyen *Pichia spp.* tales como especies metilotróficas de ésta, incluyendo *Pichia pastoris*, y *Kluyveromyces spp.* incluyendo *Kluyveromyces lactis*.

Organismos huéspedes adecuados entre hongos filamentosos incluyen especies de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyocladium* o *Trichoderma*, tal como e.g. *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*, incluyendo *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola langinosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizomucor miehei*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trochoderma viride*.

Ejemplos de cepas de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformadas con un vector expresando preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina incluyen las cepas depositadas bajo los Nos. de registro 108915 y 108916.

Algunos organismos huéspedes útiles anteriores, tales como especies fúngicas o especies bacterianas Gram positivas, se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular en una manera conocida *per se*.

En pasos posteriores la célula huésped transformada se cultiva bajo condiciones donde se expresa la secuencia codificante, y se cosecha la preproquimosina, proquimosina o quimosina. El medio usado para cultivar las células huésped transformadas pueden ser cualquier medio convencional adecuado haciendo crecer las células huéspedes en cuestión y obteniendo la expresión del polipéptido. Medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas.

La preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina resultante típicamente se recupera o cosecha a partir del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo separar las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, si es necesario, después de romper las células, seguido de precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por ejemplo añadiendo una sal tal como sulfato de amonio, seguido de una fase de purificación. Alternativamente, el medio de cultivo libre de células puede también, opcionalmente después de concentrarse o diluirse o de la adición de aditivos convencionales, usarse directamente como un producto coagulante para la fabricación de queso.

Se apreciará que la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina en forma aislada se puede someter a modificaciones de secuencia por borrado, substitución, modificación o adición de uno o más aminoácidos siempre y cuando la molécula modificada resultante retenga al menos parte de la actividad de coagulación de leche de la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina en forma aislada. Tales modificaciones pueden ser realizadas fácilmente por la persona hábil en la técnica usando métodos para modificaciones de proteína que son comúnmente conocidos en la técnica.

Conforme a la invención, la secuencia de nucleótidos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina no *Bos taurus* se aísla o deriva de una especie mamífera seleccionada del grupo que consiste en una especie *Camelidae*. Un animal fuente particularmente interesante es el *Camelus dromedarius*.

Se ha descubierto que la expresión y la secreción de un producto genético heterólogo se puede mejorar expresando el producto genético en forma de una proteína de fusión. En este contexto, el término "proteína de fusión" denota una proteína quimérica comprendiendo preproquimosina, proquimosina o quimosina o al menos una parte activa de coagulación de leche de la misma y, como el socio de fusión, al menos un aminoácido de un polipéptido diferente. Por consiguiente, en una forma de realización de la invención, el método anterior es uno donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína de fusión comprendiendo preproquimosina, proquimosina o quimosina. Más específicamente, el socio de fusión puede ser una glucoamilasa o un fragmento de la misma. En una forma de realización la preproquimosina, proquimosina o quimosina, o una proteína de fusión de la misma, se segrega sobre la membrana de la célula huésped.

Un objetivo más importante de la presente invención es proporcionar un método para producir una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina de forma recombinante con un alto rendimiento. Durante la experimentación que lleva a la invención se obtuvo el resultado altamente inesperado de que una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina, expresada en la misma célula huésped y bajo condiciones esencialmente idénticas, se expresa con unos rendimientos de actividad significativamente superiores a lo que lo son los rendimientos de actividad obtenidos de la quimosina bovina.

De acuerdo con esto, el método anterior de la invención es preferiblemente un método, donde el rendimiento de la actividad de coagulación de leche de la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina es de al menos un 10%, 25%, 50%, 100% ó 200% superior al rendimiento de la actividad de coagulación de leche de la preproquimosina, proquimosina o quimosina bovina obtenido al usar, bajo condiciones de producción idénticas, el mismo vector de expresión, pero con una secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina o quimosina bovina en lugar de la secuencia codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina.

Es generalmente sabido que los polipéptidos expresados por organismos huésped eucarióticos pueden ser glicosilados al expresarse, dependiendo el grado de glicosilación del tipo de polipéptido y organismo huésped. Se ha descubierto previamente que la actividad de coagulación de leche de las proteasas aspárticas de origen microbiano que se glicosilan tras la expresión se pueden mejorar sometiendo las proteasas a un tratamiento de deglicosilación hasta por lo menos eliminar parcialmente las fracciones de azúcar fijadas a las proteasas. Tal tratamiento de deglicosilación puede por ejemplo comprender tratar la proteasa glicosilada con una enzima teniendo un actividad deglicosilante incluyendo como ejemplos PNGasa y endo- β -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.96) (Endo-H). Alternativamente, la deglicosilación se puede obtener sometiendo a la proteasa glicosilada a un tratamiento químico, tal como un tratamiento con periodato.

Por consiguiente, en una forma de realización específica, el método anterior comprende, como otra fase, que la preproquimosina, proquimosina o quimosina cosechada se someta a un tratamiento de deglicosilación.

Se contempla igualmente que la deglicosilación de una preproquimosina, proquimosina o quimosina expresada se puede obtener de una manera más directa proporcionando una célula huésped que además de la preproquimosina, proquimosina o quimosina exprese una enzima deglicosilante tal como Endo-H por la cual la preproquimosina, proquimosina o quimosina inicialmente glicosilada se deglicosila intracelularmente o tras la secreción. Por consiguiente, en otra forma de realización la célula huésped es una célula expresando además una enzima de deglicosilación capaz de deglicosilar la preproquimosina, proquimosina o quimosina coexpresada.

En otro aspecto, la invención proporciona un constructo de ADN capaz de expresar preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina. Este constructo comprende un vector de expresión comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos comprendiendo un gen codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina y, operativamente vinculado al mismo, señales de expresión apropiadas tal como se ha definido anteriormente, permitiendo que la preproquimosina, proquimosina o quimosina se exprese en una célula huésped. Por consiguiente, tal constructo incluye un constructo que comprende una secuencia codificando un péptido señal para la preproquimosina, proquimosina o quimosina y/o una señal de expresión que es un promotor originalmente no asociado a la secuencia codificante.

La secuencia codificante del constructo de ADN de la invención se puede derivar de cualquiera de las especies animales anteriores no bovinas, es decir no *Bos taurus*, incluyendo *Camelus dromedarius*. En formas de realización útiles, el constructo de ADN comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión como también se define anteriormente, comprendiendo la preproquimosina, proquimosina o quimosina o un fragmento de la misma teniendo actividad de coagulación de leche. En otra forma de realización, la proteína de fusión comprende

glucoamilasa o un fragmento de la misma. El vector de expresión del constructo de ADN puede ser cualquiera de los vectores de expresión mencionados arriba incluyendo vectores derivados de pGAMpR tales como el vector pGAMpR-C como se describe en los ejemplos de debajo. Adicionalmente, el constructo de ADN según la invención puede comprender además una secuencia codificando una enzima de deglicosilación tal como endoH.

La secuencia del constructo de ADN según la invención que codifica una preproquimosina, proquimosina o quimosina no-bovina puede ser una secuencia codificante de origen natural. No obstante, como será apreciado por la persona hábil en la técnica, la secuencia codificante también puede ser una derivada de tal secuencia codificante de origen natural por una o más sustitución(es) de nucleótido silenciosas, el término “silenciosa” implicando que el codón en el cual tiene lugar la(s) sustitución(es) codifica el mismo aminoácido que el codón correspondiente en la secuencia codificante de origen natural.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped transformada con un constructo de ADN como se ha descrito anteriormente. La célula huésped se selecciona a partir de cualquiera de los organismos anteriores, es decir células bacterianas, células micóticas incluyendo *Aspergillus niger* var. *awamori* tales como las cepas depositadas como CBS 108915 y CBS 108916., células de levadura, células mamíferas, células de insecto y células vegetales.

En otro aspecto ulterior una composición de coagulación de leche está provista comprendiendo una proquimosina no bovina o quimosina tal y como se define aquí y producida por el método anterior incluyendo tal proquimosina o quimosina estando ésta en una forma sustancialmente deglicosilada. Tal composición puede, además de la enzima de coagulación de leche activa, comprender aditivos usados convencionalmente en cuajos de origen animal tales como por ejemplo NaCl. En formas de realización preferidas, la composición comprende preproquimosina, proquimosina o quimosina derivada del grupo que consiste en una especie *Camelidae*.

La preproquimosina, proquimosina o quimosina no-bovina recombinante como se proporciona aquí es útil como un producto coagulante de leche. Por consiguiente, un objetivo importante de la invención es proporcionar un método para fabricar queso, componiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de la composición anterior a leche y realizar otras fases de fabricación de queso apropiadas. La preproquimosina, proquimosina o quimosina de la invención es conveniente para procesos de fabricación de queso donde la leche se selecciona a partir de leche de vaca, leche de camella, leche de búfala, leche de cabra y leche de oveja.

Una proteasa aspártica tal como quimosina adecuada para la fabricación de queso debería tener una alta actividad de coagulación de leche específica (c) y una actividad proteolítica general, es decir, no específica, baja (P), con respecto a las proteínas de la leche. Por consiguiente, la proporción C/P debería ser preferiblemente lo más alta posible, como un valor P relativamente alto, durante el proceso de fabricación de queso y durante la maduración del queso llevará a la formación de péptidos de bajo peso molecular y de aminoácidos libres, lo cual a su vez le puede conferir al queso final un sabor amargo indeseable y también suponer una pérdida de rendimiento del queso. Como se utiliza en este caso, el término “proporción C/P” se define por los métodos para determinar un valor C y un valor P, respectivamente como se describe en los ejemplos de debajo.

Como se muestra en los ejemplos de debajo, el uso de una proquimosina o quimosina no-bovina producida recombinantemente en la fabricación del queso resulta en un rendimiento más alto del queso que el rendimiento obtenido con la misma cantidad de actividad de coagulación de leche de la proquimosina o quimosina bovina. Por consiguiente, en una forma de realización la invención proporciona un método de fabricación de queso donde el rendimiento del queso obtenido es superior al rendimiento obtenido bajo condiciones de fabricación idénticas usando la misma cantidad de proquimosina o quimosina bovina.

Se demuestra en los ejemplos de debajo, que la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina tiene una proporción C/P más alta, en relación a la quimosina bovina usado de forma convencional. Por consiguiente, la invención pertenece en otro aspecto a un método de fabricación de queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina no bovina o quimosina a la leche incluyendo leche bovina y realizando las otras fases de fabricación de queso apropiadas, teniendo la proquimosina o quimosina no bovina en dicha leche una proporción C/P en el rango de 2-20, preferiblemente una proporción C/P de al menos 3, tal como al menos 5 o incluso al menos 10.

En una forma de realización específica tal preproquimosina, proquimosina o quimosina se deriva de *Camelus dromedarius*.

Es otro objetivo de la invención proporcionar una composición de coagulación de la leche comprendiendo una enzima bovina de coagulación de la leche seleccionada a partir de proquimosina, quimosina y pepsina y una enzima de coagulación de la leche no bovina seleccionada a partir de proquimosina, quimosina y pepsina incluyendo tal composición donde la proporción de actividad de coagulación de la leche entre la enzima de coagulación de la leche bovina y no bovina está en el rango de 1:99 a 99:1, incluyendo una composición donde al menos un 2% de la actividad de coagulación de la leche es de la enzima no bovina tal como al menos un 5%, 10%, 20%, 50%, 75, 90 ó 98% de la actividad. En una forma de realización preferida, la enzima no bovina en tal composición mezclada se deriva de *Camelus dromedarius*.

También se proporciona un método para fabricar queso a partir de leche incluyendo leche de vaca, leche de camella, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja y una mezcla de cualquiera de estos tipos de leche, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de la leche de la composición anterior y realizar las otras fases de fabricación del queso apropiadas.

La invención se describirá ahora en más detalle en los ejemplos no limitativos siguientes y en los dibujos donde:

Fig. 1 es un mapa del plásmido pSK-SbXb-mut conteniendo un cassette de expresión de glucoamilasa A-quimosina B.

Una mutación imperceptible resulta en un único sitio *PmlI*;

Fig. 2 es un mapa del plásmido pGAMpR-pml el cual es idéntico al plásmido pGAMpR salvo por una mutación imperceptible dando como resultado un único sitio *PmlI*;

Fig. 3 es un mapa del plásmido pGAMpR-C, un constructo de expresión de quimosina de camello;

Fig. 4 muestra la actividad de coagulación de la leche en unidades arbitrarias en sobrenadantes del plásmido pGAMpR-C transformados de *Aspergillus niger* var. *awamori* cultivadas en frascos de agitación en medio CSL durante 24-48 hrs a 37°C y a 200 r.p.m.;

Fig. 5 muestra la producción de actividad de la quimosina de camello en la fermentación a escala piloto de las cepas #21 y #28 de pGAMpR-C transformado de *Aspergillus niger* var. *awamori* en comparación con la producción de la actividad de la quimosina bovina usando una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformada con pGAMpR;

Fig. 6 ilustra el progreso de digestión de la caseína entera en relación al tiempo usando quimosina de camello (■-----■) y quimosina bovina (◆-----◆) producidas de forma recombinante, respectivamente;

Fig. 7 ilustra la actividad proteolítica general no específica como la absorbancia del 3% del sobrenadante precipitado de ATC de 100 nM de quimosina de camello (■-----■) y quimosina bovina (◆-----◆) producidas de forma recombinante, respectivamente en 33 nM de MES, a pH 5.80 usando un 0,5% de caseína bovina N,N-demetilada como el sustrato e incubando a 32°C durante 30-180 min. a diferente pH;

Fig. 8 ilustra la actividad proteolítica general no específica como la absorbancia del 3% del sobrenadante precipitado de ATC de 100 nM de quimosina de camello (■-----■) y quimosina bovina (◆-----◆) producidas de forma recombinante, respectivamente en 33 nM MES, a pH 5.80 usando un 0,5% de caseína bovina N,N-demetilada como el sustrato e incubando a 32°C durante 30-180 min. en diferentes concentraciones de Ca²⁺;

Fig. 9 ilustra la actividad proteolítica general, no específica como absorbancia de un 3% del sobrenadante precipitado de ATC de 100 nM de quimosina de camello (■-----■) y quimosina bovina (◆-----◆) producidas de forma recombinante, respectivamente en 33 nM de MES, a pH 5.80 usando un 0,5% de caseína bovina N,N-demetilada como el sustrato e incubando a 32°C durante 30-180 min. a temperaturas diferentes; y

Fig. 10 muestra una concentración de péptido y proteína en 50 µl de la fase soluble de un coágulo de leche desnatada bovina reconstruida coagulada durante 5,60 y 1.320 min., respectivamente con 65 mIMCU ml⁻¹ de quimosina de camello (■-----■) y quimosina bovina (◆-----◆) producidas de forma recombinante, respectivamente, medida como absorbancia a 280 nm, y diluida en 950 µl de 8M de guanidina-HCl.

Ejemplo 1

Construcción de un vector para la expresión de quimosina de camello

A menos que se indicado de otra manera, técnicas de ADN recombinantes fueron según Sambrook *et al.*, 1989.

1.1 Clonación de gen de quimosina de *Camelus dromedarius*

Una secuencia de ADN conteniendo una secuencia codificante de proquimosina de camello (proquimosina Cd) y las secuencias 5' y 3' contiguas del vector pGAMpR (Ward *et al.*, 1990) se amplificó por PCR. El vector pGAMpR comprende, como un marcador de selección, el gen *pir4* de *Neurospora crassa*, el cual es capaz de complementar una mutación de *pirG* en una cepa receptora. Se aisló ARNm a partir de tejido de mucosa de un camello de 3 años de edad usando un equipo de ARNm directo (Quiagen, D-40724 Hilden, Alemania). En base a este ARNm aislado, se generó un molde de ADNc para PCR por transcripción inversa. Para la amplificación por PCR se usó el siguiente par de cebadores:

proquimosina Cd hacia adelante:

PmlI

5'-cacgtggcggAGTGGGATCACCAGGATCCCTCTG-3' (SEC ID NO:1)

proquimosina Cd inversa:**XbaI**

5'-tctagaggaTCAGATGGCCTTGGCCAGCCCCACG-3' (SEC ID NO:2)

El producto de PCR se ligó ligado en un vector PCR-script (Stratagene, La Jolla, CA) según las recomendaciones del fabricante.

1.2 Construcción del vector de expresión de proquimosina cd, pGAMpR-C

Para la construcción de pGAMpR-C, un fragmento de SpeI-XbaI conteniendo una fusión entre la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y las secuencias codificantes de proquimosina *Bos taurus* se aisló a partir de pGAMpR. Este fragmento se clonó en un vector PBluescript-SK II+, dando como resultado el vector pSK-SpXb.

Una mutación imperceptible se introdujo en pSK-SpXb por mutagénesis basada en los oligonucleótidos en la región 3' de la glucoamilasa para crear un único sitio para *PmlI*, dando como resultado el plásmido pSK-SpXb-mut (Figura 1). Se usó el siguiente par de cebadores oligonucleótidos (las bases introduciendo la mutación en el vector se muestran en letras mayúsculas):

5'-gcgacggtgactgacacGtggcgggcagaaataac-3' (mutación de *PmlI* hacia adelante) (SEC ID NO:3)

5'-gttatttctgcccgccCGtgtcagtcaccgtcgc-3' (mutación de *PmlI* inversa) (SEC ID NO:4)

El fragmento SpeI-XbaI a partir de pSK-SpXb-mut se usó para reemplazar el fragmento correspondiente en pGAMpR, dando como resultado pGAMpR-pml (Figura 2). pGAMpR-pml se digirió con *PmlI* y *XbaI* y el clon de ADNc de camello, digerido con las mismas enzimas de restricción, se insertó, dando como resultado pGAMpR-C (Figura 3). La secuencia de la fusión glucoamilasa-proquimosina de camello en pGAMpR-C se confirmó en ambos hilos.

Por consiguiente, el vector de expresión del plásmido pGAMpR-C de *Aspergillus* es idéntico para pGAMpR, el plásmido de expresión usado para la expresión de la quimosina bovina, excepto porque la secuencia codificante de la proquimosina es la aislada de *Camelus dromedarius*. Al expresarse y segregarse, la proquimosina de camello se convierte en quimosina por escisión autocatalítica de la pro-secuencia.

Ejemplo 2

Transformación de *Aspergillus niger* var. *awamori* con pGAMpR-C

Para estos experimentos de transformación, se usó un derivado de la cepa dgr246pirG de *Aspergillus niger* var. *awamori* (Ward *et al.*, 1993) como receptor. Esta cepa es un derivado de la cepa GCI-HF1-2dgr246 de *Aspergillus niger* var. *awamori* teniendo una mutación de pyrG, haciendo la cepa incapaz de crecer en ausencia de uridina, y la cual comprende diferentes copias del plásmido pGAMpR. La cepa derivada, dgr246pyrG usada como receptor se deriva polimerizando la cepa progenitora mutante de *pyrG* para todas las copias de pGAMpR.

La cepa dgr246pyrG se ha depositado bajo el Tratado de Budapest con el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, P.O. caja 273, 3740 Ag Baarn, Países Bajos, el 13 de junio de 2000 bajo el no. de registro CBS 108914.

Un protocolo optimizado como se desarrolla por Chr. Hansen A/S se aplicó para la transformación de la cepa de *Aspergillus* "polimerizada". Este protocolo comprende los pasos de proporcionar un medio de cultivo líquido, la propagación de biomasa fúngica, la generación de protoplastos y la transformación incluyendo la regeneración de protoplastos y la selección de transformantes.

2.1 Propagación de biomasa fúngica

50 ml de medio CSL [por litro: extracto soluble de maíz, 100 g; NaH₂PO₄·H₂O, 1 g; MgSO₄, 0.5 g; substancia antiespumante Mazu, 2g, maltosa, 100 g, glucosa, 10 g, fructosa, 50 g, agua 736.5 g] se añaden a un matraz estéril de 250 ml, 0.5 ml de suplemento de penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL #15140-114)] y el medio se inocula con 10⁶ esporas por ml. El medio inoculado se cultiva durante toda la noche a 34-37°C a 200-250 r.p.m. para obtener una suspensión densa de micelio. 10 ml de este precultivo se transfieren a 100 ml de medio de *Aspergillus* completo en

ES 2 354 775 T3

un matraz de 500 ml sin deflectores, incubación durante toda la noche a 34-37°C a 200-250 r.p.m. para obtener una biomasa micelial.

2.2 Generación de protoplastos

El micelio según se obtiene en la fase anterior se filtra a través de miracloth estéril, se lava con agua estéril y posteriormente con 1700 mOsmol NaCl/CaCl₂ (0,27 M de CaCl₂.2 H₂O, 39.7 g/l; 0,58 M de NaCl, 33.9 g/l), se escurre suavemente hasta secarse y se transfiere a un tubo Falcon para determinar el peso y se deja reposar en hielo.

20 ml de 1700 mOsmol NaCl/CaCl₂ por g de micelio se añaden para resuspender el micelio seguido de añadir 50 mg de la Enzima Lítica Sigma L-1412 *Trichoderma harzianum* por g de micelio disuelto en un pequeño volumen de 1700 mOsmol NaCl/CaCl₂, incubación en un matraz Erlenmeyer a 100 r.p.m., a 37°C durante aproximadamente 4 hrs, periodo durante el cual el micelio se resuspende reiteradamente cada 30 minutos.

Cuando se obtiene una buena protoplastosis, es decir surgen muchos protoplastos libres y raramente queda algún micelio intacto, la mezcla se filtra en hielo, usando hoja de malla o miracloth y se añade un volumen igual de STC1700 congelado (1,2 M de sorbitol, 218 g/l; 35 mM de NaCl, 2,04 g/l; 10 mM de Tris.HCl a pH 7.5 y 50 mM de CaCl₂.2 H₂O, 7,35 g/l). El número de protoplastos se cuenta usando un cámara Bürger-Türk de vidrio. La suspensión de protoplastos se centrifuga usando una centrifugadora Benchtop a 2.000 r.p.m. a 4°C. El granulado resultante se resuspende muy despacio en 20 ml de STC1700 congelada. Este procedimiento de lavado se repite dos veces y el granulado final se resuspende en STC1700 congelada hasta obtener una concentración final de aproximadamente 1 x 10⁸ protoplastos por ml seguidos de un ajuste a 1 x 10⁸ protoplastos por ml.

2.3 Transformación

200 µl (2 x 10⁷ protoplastos), 2 µl de 0,5 M de ATA (0,5 M de ácido carboxílico de aurina (Sigma) en un 20% de etanol) y ADN (comprendiendo un marcador) hasta la fecha 15 µl, típicamente 5-10 µg de ADN, se mezcla en una probeta de 12 ml. Como control se usa una mezcla correspondiente, pero sin ADN. Las mezclas de transformación se incuban en hielo durante 25 min. seguidas de añadir una primera gota de 250 µl de PTC (60% PEG 4000; 10 mM de Tris.HCl a pH 7.5, 50 mM de CaCl₂) inclinando el tubo un par de veces sin dejar que la mezcla toque el borde y una segunda gota de 250 µl, mezclar y añadir 850 µl seguido de un mezclado. Cada tubo se incuba a temperatura ambiente exactamente 20 min. seguidos de rellenar los tubos con STC1700 congelada y mezclar revertiendo los tubos. La mezcla se centrifuga durante 8-10 min. usando un benchtop centrifuge a 2000 r.p.m. a 4°C. El granulado resultante se disuelve suavemente en aproximadamente 400-800 µl de STC1700.

2.4 Regeneración y selección de transformantes

La mezcla de transformación se extiende sobre placas sólidas de medio de regeneración selectivas conteniendo por I medio: agar, 15 g; sorbitol, 218 g; Sales de aspA 50x (por litro: 300 g de NaNO₃, 26 g de KCl, 76 g de KH₂PO₄, 18 ml de 10 M de KOH, a pH de aproximadamente 6.5); glucosa 50%, 20 ml; Gibco-BRL #15140-114 Pen-Strep, 10 ml; MgSO₄, 2 ml; elementos traza (2,2 g de ZnSO₄ 1,1 g de H₃BO₃, 0,5 g de MnCl₂ .7H₂O, 0,5 g de FeSO₄ .7H₂O, 0,17 g de CoCl₂ .6H₂O, 0,16 de CuSO₄ .5H₂O, 0,15 de NaMoO₄.2H₂O, 5 g de EDTA, agua a 100 ml, a pH 6.5), 1 ml. Las placas se incuban a 37°C durante 5-10 días y los transformantes se seleccionan.

Aproximadamente se obtuvieron 80 transformantes y se obtuvieron esporas de estos transformantes.

Ejemplo 3

Producción de quimosina de camello usando *Aspergillus niger* var. *awamori* recombinante

3.1 Selección de transformantes produciendo altas cantidades de quimosina

Para seleccionar los transformantes que produjeron la mayor parte de la quimosina, se llevó a cabo un experimento con un matraz de agitación a pequeña escala (20 ml) con 45 transformantes. 20 ml de medio CSL (véase arriba) se inocularon con 1 x 10⁶ esporas de cada transformante, incubación durante 24-48 hrs a 37°C y a 200 r.p.m. Se usaron 2 ml de estos precultivos para la inoculación de 20 ml de medio seguida de una incubación durante 10 días a 37°C, a 200 r.p.m. Tras la incubación los cultivos se centrifugaron a 14.000 r.p.m. usando un centrifugador Eppendorf y los sobrenadantes claros se recogieron y almacenaron a -20°C hasta la determinación de la actividad de la quimosina. Como controles, tanto la cepa receptora como una cepa de producción de *Aspergillus niger* var. *awamori* para la quimosina bovina, dgr246ch1or25 (Dunn-Coleman *et al.*, 1991) conteniendo la pGAMpR (las esporas de esta cepa usadas como material inóculo se denominan aquí como PIM2075).

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 4. Parece que 5 de las cepas evaluadas se produjeron en exceso de 40 unidades arbitrarias por ml de sobrenadante. Entre los transformantes evaluados, los mejores productores fueron las cepas #21 y #28.

ES 2 354 775 T3

Una muestra de las cepas #21 y #28 se depositó según el Tratado de Budapest con el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos, el 13 de junio de 2000 bajo los Nos. de registro 108915 y 108916, respectivamente.

Un experimento de colonia PCR se efectuó para verificar que la quimosina producida por los transformantes era de hecho quimosina de camello. El micelio de los transformantes se analizó usando dos conjuntos de cebadores, uno específico para la quimosina bovina y uno específico para la quimosina de camello. Se confirmó que todos los transformantes sólo contenían el gen de *Camelus dromedarius* puesto que no se observó ninguna banda en ninguno de los transformantes usando el conjunto de cebadores bovinos, sino que se generaron bandas en todos los transformantes cuando se usó el conjunto de cebadores de quimosina de camello. Tanto la cepa receptora polimerizada como la cepa productora de quimosina bovina se evaluaron de forma similar. No se pudieron observar bandas con ninguno de los conjuntos de cebadores cuando se evaluó la cepa polimerizada mientras que la cepa productora de control produjo productos de PCR sólo con el conjunto de cebadores de quimosina bovina.

3.2 Producción a escala piloto de quimosina de camello

Los dos mejores productos del procedimiento de selección a pequeña escala anterior se evaluaron posteriormente para conocer sus capacidades de producción de quimosina en 19 fermentadores I Bioingeniería NLF22. Como un control, una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformada con pGAMpR, referida como PIM2075 se evaluó de forma similar.

El medio básico usado en este experimento tuvo la siguiente composición por litro: soja Danpro™, 44.68 g; KH₂PO₄, 1.06 g; substancia antiespumante Mazu DF204K, 1.00 g; MgSO₄·7H₂O, 2.07 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 1.20 g; (NH₃)₂PO₄, 17.29 g; H₂SO₄ 38%, 0.80 ml, agua para 1 litro. Una solución acuosa de maltosa al 35% se usó como la fuente de carbono y para mantener el pH en el valor preestablecido, se usó un 25% de solución de NH₃. Los parámetros de fermentación fueron los siguientes: pH: 5.5 temperatura: 35°C; agitación: 600 r.p.m.; suministro de aire: 12 l por min.; exceso de presión: 0.5 bares.

Durante 164 hrs de fermentación, la concentración actividad de quimosina de camello y bovina, se determinó respectivamente a intervalos en los caldos de fermentación. Los resultados se resumen en la Figura 5. Según se observa, el rendimiento de la actividad de quimosina de camello de ambas cepas transformantes fue, durante el periodo de fermentación entero, significativamente superior que el de la quimosina bovina. Al final de las fermentaciones, el rendimiento de la actividad de coagulación de la leche de la quimosina de las cepas recombinantes #21 y #28 fue de 361 y 343 unidades arbitrarias, respectivamente, mientras que el rendimiento de la actividad de la quimosina bovina producido por PIM2075 fue de 215 unidades arbitrarias, es decir las cepas recombinantes expresando quimosina de *Camelus dromedarius* produjeron aproximadamente un 70% más de actividad de quimosina que la cepa productora de quimosina bovina bajo condiciones de producción idénticas.

Ejemplo 4

Actividad proteolítica no específica de la quimosina de *Camelus dromedarius* recombinante

En este experimento, se estudió la actividad proteolítica (valor P) general (no específica) de la quimosina de *Camelus dromedarius* producida recombinantemente (quimosina Cd) según se obtiene en el Ejemplo 3 con la caseína entera bovina. A modo de comparación, se incluyó una quimosina bovina producida de forma recombinante, ChyMax™ (quimosina Bt). El valor P se evaluó en relación al tiempo y se estudió el efecto sobre la actividad proteolítica de Ca²⁺ y el pH, respectivamente.

4.1 Ensayo

A menos que se indique de otra manera, las reacciones de actividad se hicieron bajo las siguientes condiciones: 0.5% caseína bovina N,N-dimetilada (Sigma C9801), 100 nm de quimosina en 33 mM de MES, a pH 5.80 a 32°C durante 30 min. a 180 min. La absorbancia de un 3% de sobrenadantes de ATC se midió a 280 nm. Las condiciones para las reacciones de actividad se seleccionaron de tal manera para incluir las de proceso de fabricación de queso convencional con respecto al sustrato a analizar, concentraciones de sustrato y enzima, temperatura (30-35°C), pH (aproximadamente 6.6), concentración de Ca²⁺ (0-2 mM) y tiempo de reacción.

4.2 Resultados

Durante un período de tiempo de 180 min., el valor P de la quimosina Bt aumentó progresivamente a un A280 de aproximadamente 0.5 mientras que, durante el periodo de reacción la quimosina Cd mostró una actividad proteolítica no específica mucho inferior, finalizando a un A280 de aproximadamente 0.1 (Figura 6).

Los efectos del pH en el rango de 5.4-6.8; concentración de Ca²⁺ en el rango de 0-8 mM y la temperatura en el rango de 30-65°C, sobre la actividad proteolítica no específica de la quimosina Cd y la quimosina Bt, respectivamente se resumen en las Figuras 7-9. Según parece, la actividad proteolítica no específica de la quimosina de *Camelus dromedarius* fue de forma significativa generalmente inferior que la de la quimosina bovina bajo todas las condiciones de prueba usadas.

Se observó una actividad proteolítica no específica más alta cuando el pH del ensayo se bajó (Figura 7). La relación de los valores P entre la quimosina de camello y la bovina se mantuvo sustancialmente constante en el margen de pH estudiado.

Ejemplo 5

La actividad de coagulación de la leche de la quimosina de Camelus dromedarius recombinante

En este experimento, la actividad de coagulación de la leche (valor C) de la quimosina Cd recombinante de la invención se estudió a 32°C usando como sustrato un 10% (p/v) de leche desnatada bovina secada por atomización a bajo calor (Hochdorf). La concentración de quimosina Cd usada fue de 3,1 nM. A modo de comparación, el valor C de la quimosina Bt recombinante (ChiMax™) a una concentración de 5,4 nM (misma actividad de coagulación de la leche en IMCUs que la quimosina Cd) se determinó bajo las mismas condiciones. Se determinaron la actividad de coagulación de la leche y la resistencia del coágulo final. Además, se determinaron el efecto de los cambios en el pH y la concentración de Ca²⁺ sobre la actividad de coagulación de la leche de ambas enzimas. Los resultados de estos experimentos se pueden resumir de la siguiente manera:

La actividad de coagulación de la leche de la quimosina de camello queda menos afectada por los cambios en el pH y la concentración de Ca²⁺. La actividad de coagulación media (C) por mol de quimosina de camello fue de aproximadamente un 170% de la actividad por mol de la quimosina bovina. Bajo condiciones de fabricación de queso típicas como se ha descrito anteriormente, el valor C de la quimosina de camello es de aproximadamente un 180% del valor correspondiente para la quimosina bovina. La resistencia del coágulo de la leche final fue esencialmente la misma para ambas enzimas, indicando reacciones de coagulación y de sinéresis similares.

En base a los resultados en este ejemplo y a los encontrados en el Ejemplo 4, se puede estimar la proporción C/P para la quimosina de camello, en relación a aquella para la quimosina bovina. Estos datos se resumen en la tabla de debajo 5.1 la cual también muestra datos correspondientes para la quimosina porcina, la pepsina bovina B y dos proteasas aspárticas microbianas:

TABLA 5.1

Actividad de coagulación de la leche, actividad proteolítica no específica y valor C/P para la quimosina porcina, la pepsina bovina B y dos proteasas aspárticas microbianas

	Actividad de coagulación de la leche (% de quimosina bovina)	Actividad proteolítica no específica (% de quimosina bovina)	Valor C/P
Quimosina bovina	100	100	1.00
Quimosina de camello	170	25	7.00
Quimosina porcina	25	12	2.10
Proteasa <i>M. pusillus</i>	33	147	0.22
Proteasa <i>M. miehei</i>	19	149	0.13
Pepsina bovina A	124	2731	0.05

Estos datos muestran que entre las proteasas aspárticas catalogadas, la quimosina de camello recombinante tiene la mayor actividad de coagulación de la leche y la segunda menor actividad proteolítica no específica en la caseína bovina, dando como resultado con mucha diferencia el máximo valor C/P entre estas proteasas. En particular, es significativo que con respecto a estos parámetros, la quimosina de camello supera significativamente a la quimosina bovina recombinante comercial.

Ejemplo 6

Determinación de la cantidad de digestiones enzimáticas y proteína de lactosuero en la fase soluble del coágulo de leche usando quimosina (Cd) recombinante de Camelus dromedarius o ChyMax™ (quimosina Bt)

Un 10% (p/v) de leche desnatada bovina secada por atomización se disolvió en 50 mM de MES, 1 mM de CaCl₂, a pH 5.6. La leche se coaguló con 65 de mIMCU ml⁻¹ de las preparaciones de quimosina recombinante respectivas,

es decir quimosina (Cd) recombinante de *Camelus dromedarius* o ChyMaX™ (quimosina Bt) durante 5, 60, 180 y 1.320 min., respectivamente. Los coágulos formados se centrifugaron a 20.000 x por g a 4°C durante 5 min. Cincuenta µl del sobrenadante conteniendo productos de descomposición de digeridos enzimáticos y proteínas de lactosuero se diluyeron en 950 µl de 8M de guanidina-HCl, a pH 6.5 y la absorbancia se midió a 280 nm.

Los resultados se resumen en la Figura 10. Según se observa, la cantidad de péptidos y proteína fue la máximo en los sobrenadantes derivados de la coagulación con la quimosina bovina, indicando que la quimosina de camello, bajo condiciones de coagulación de la leche, tiene menos actividad proteolítica no específica que la quimosina bovina.

Ejemplo 7

*Coagulación de leche de vaca y leche de camella crudas usando quimosina (Cd) recombinante o ChyMaX™ (quimosina Bt) producidas de forma recombinante de *Camelus dromedarius**

La leche cruda se almacenó durante dos días a 4°C. Muestras de leche (10 por análisis) se coagularon con 65 mM-CU ml⁻¹. Se determinaron el tiempo de coagulación del cuajo (r[*min*]) y la resistencia del coágulo de los coágulos (A₆₀ [mM]). La resistencia del coágulo se determinó usando un dispositivo Formagraf (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca). Los resultados se resumen en la Tabla 7.1.

Las diluciones de la quimosina de camello y la bovina ajustadas a la misma actividad de coagulación en leche desnatada bovina secada por atomización en 1 mM de CaCl₂ mostraron una actividad en leche bovina cruda la cual fue de una forma similar mayor (menor tiempo de coagulación del cuajo) para ambas enzimas, en relación a la actividad en la leche bovina secada por atomización. La resistencia del coágulo final de la leche bovina fue ligeramente mayor cuando al usarse la quimosina de camello. La quimosina bovina difícilmente tuvo alguna actividad de cuajado sobre la leche de camello cruda, mientras que la quimosina de camello mostró una alta actividad dando como resultado un cuajo de resistencia del coágulo media.

TABLA 7.1

Tiempo de coagulación del cuajo y resistencia del coágulo usando quimosina bovina o de camello

Enzima	Leche	r[<i>min</i>]	A ₆₀ [mm]
Quimosina Bt	Leche cruda bovina	12,34	48,94
Quimosina Cd	Leche cruda bovina	12,20	50,56
Quimosina Cd	Leche desnatada bovina	22,07	37,96
Quimosina Bt	Leche cruda de camella	59,45	0,40
Quimosina Cd	Leche cruda de camella	12,66	18,24

Ejemplo 8

*Examen de la actividad proteolítica de quimosina (Cd) y ChyMaX™ (quimosina Bt) de *Camelus dromedarius* recombinante*

Dos peptidasas sintéticas, las cuales corresponden a las regiones sensibles a la quimosina de la κ-caseína (CN) bovina y de camello, se dividieron proteolíticamente con quimosina bovina y de camello, respectivamente. K_M y K_{cat} se determinaron a pH 5.6. Adicionalmente, se midieron la temperatura y el pH óptimos de estas reacciones. Los dos péptidos sintéticos siguientes se usaron en este estudio:

Péptido sintético correspondiente a κ-CN

NH₂-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-(p-NO₂)Phe-∞Met-Ala-Ile-COOH bovino
(SEC ID NO:5)

Péptido sintético correspondiente a [α]-CN

NH₂-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-(p-NO₂)Phe-∞Ile-Ala-Ile-COOH de camello
(SEC ID NO:6)

∞ enlace fisible

ES 2 354 775 T3

La medición de las muestras se repitió de 3 a 6 veces, los valores de Michaelis-Menten y de producción se determinaron a partir de porciones de Lineweaver-Burke con una regresión lineal ponderada de datos.

Los resultados se resumen en la Tabla 8.1

TABLA 8.1

Resumen de resultados

	Quimosina Bt	Quimosina Cd
K_M para Bt κ -CN	0,165 + 0,015/- 0,014 mM	0,077 + 0,019 / - 0,015 mM
k_{cat} para Bt κ -CN	44.3 + 1.3 / -1.2 s ⁻²	11.7 + 1.5/-1.2 s ⁻¹
K_M para Cd κ -CN	0,134 + 0,022/- 0,021 mM	0,056 + 0,035 / - 0,021 mM
k_{cat} para Cd κ -CN	4,3+0,2/-0,1s ⁻²	5,1 +1,7/-1,0s ⁻¹
Temp. optimum (Bt κ -CN)	~42 °C	~42 °C
Temp. optimum (Cd κ -CN)	~58 °C	~47 °C
pH optimum (Bt κ -CN)	~4.9	~5.1

Se encontraron diferencias notables cuando las se examinaron las enzimas para observar la actividad proteolítica con respecto a dos péptidos sintéticos representando parte de las regiones sensibles a la quimosina de la κ -caseína bovina y de camello. La unión de sustratos de la quimosina de camello resultó ser aproximadamente el doble de alta (mitad del valor K_M) que la unión de sustratos de la quimosina bovina y el índice de producción de quimosina de camello con respecto al péptido κ -CN bovino fue aproximadamente cuatro veces inferior al índice de producción de quimosina bovina.

Estas conclusiones pueden explicar la mayor proporción C/P encontrada para la quimosina de camello en el Ejemplo 5. Puesto que el enlace fisible de κ -CN representa sólo una pequeña fracción de los sitios fisibles en las proteínas de la leche, un enlace específico más alto de la molécula objetivo, y una baja actividad proteolítica no específica, efectuando la auto inhibición de la enzima y la activación posterior por la molécula objetivo, llevará a una alta proporción C/P. Además, se encontraron una temperatura y un pH óptimos similares para la proteólisis del péptido Bt κ -CN, y la temperatura óptima para el péptido Cd κ -CN se observó notablemente más alta, principalmente la de la quimosina bovina.

Ejemplo 9

Determinación del rendimiento del queso usando ChiMax™(FPC) y quimosina de camello (FPCC)

9.1 Introducción

El efecto de las enzimas de coagulación de la leche sobre el rendimiento del queso es una característica de gran importancia a nivel comercial. La medición cuidadosa del nivel de sustancia seca en lactosuero se usa como un método de comparación del efecto de las enzimas en el rendimiento del queso. En este estudio se compararon el rendimiento del queso obtenido usando el producto comercial ChyMax™ (FPC) y la quimosina de camello producida fermentada (FPCC), ambos originarios de Chr. Hansen A/S.

9.2 Materiales y métodos

9.2.1 Enzimas de coagulación de la leche

5 Las enzimas de coagulación de la leche usadas fueron FPC (lote n°. 2114475, 198 IMCU/ml) y la quimosina de camello producida fermentada, FPCC, (lote n°. SR 30.05.00, 234 IMCU/ml). Las cantidades usadas fueron tales que se obtuvo un tiempo de corte de 30 minutos. Las dosis se mantuvieron constante durante todo el estudio. La variación en la coagulabilidad de la leche se compensó variando los tiempos de corte.

9.2.2 Producción de queso en vasos de precipitación

10 Se usó leche entera pasteurizada no homogeneizada proveniente de Arla Foods, Slagelse, Dinamarca. El procedimiento de fabricación de queso se resume en la Tabla 9.1. Se añadieron 4.000 g de leche a un vaso de precipitación de 5 litros. GluconoDeltaLactone (GDL) de “DAN BOUQUET” se añadió en una cantidad de 3.200 g. 1.600 g de CaCl_2 .
15 El corte se produjo después de aproximadamente 30 min. El cuajo y el lactosuero se transfirieron a estopilla después de una curación y agitación durante 30 min, y se dejaron drenar durante toda la noche. Ambas enzimas de coagulación de la leche se usaron en cada uno de los 16 ensayos.

9.2.3 Muestreo y análisis

20 El lactosuero total bien mezclado se filtró a través de una gasa para eliminar el polvo de queso. La sustancia seca se determinó secando aproximadamente 25 g de lactosuero en lapis pumices p.a. durante 4 horas a una temperatura de 110°C. Los análisis se hicieron por duplicado.

9.2.4 Análisis estadísticos

25 Se usó un test t de estudiantes pareados en $n = 16$ diferencias en la sustancia seca total del lactosuero, usando

$$30 \quad t = x_{\text{mean}}/s_2/n)^{1/2}$$

como una estimación,

$$35 \quad t_{16}(90\%) = 1,34, t_{16}(95\%) = 1,75, t_{16}(99,5\%) = 2,92$$

9.3 Resultados y discusión

40 La Tabla 9.1 resume algunos parámetros para el procedimiento de producción de queso. La recuperación de la leche como queso y del lactosuero fue superior al 99%. La actividad de coagulación de 140 IMCU FPC y 140 IMCU FPCC, respectivamente, se usó para todos los vasos de precipitación. El tiempo de corte fue de una media de 30 min.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 354 775 T3

TABLA 9.1

Parámetros de producción de queso

	Parámetro	media	n	s
	Leche, cantidad en g	4000	16	constante
	GDL en g	3,200	16	constante
Enzima de coagulación de leche IMCU/4	FPC		8	constante
	FPCC		8	constante
	CaCl ₂ /g	1,60	16	
		Tiempo, min.		
	acidificación	30		constante
	tiempo de corte	2		
	tiempo de curación	3		constante
	agitación	25		constante
	recogida	1		constante
	recogida para prensado	60		constante
		pH		
	leche	6,66		
	cuajo	6,40		
	lactosuero	n.d		
		Temperatura, °C		
	cuajo	31,5		
		Pesos, g		
	leche	4000		constante
	lactosuero	3350		
	cuajada	610		

La Tabla 9.2 resume los resultados de las pruebas individuales con el queso, en particular la sustancia seca (DM) en el lactosuero, con la sustancia seca delta calculada como la diferencia entre cantidad de FPC de los tiempos de lactosuero en DM% deduciendo la cantidad de FPCC sobre los tiempos de lactosuero en DM%. Promedio secan un

ES 2 354 775 T3

TABLA 9.2

Resultados de los ensayos de queso individuales

5	Nº.	Fecha	Tipo de cuajo	Recuperado	Materia seca en lactosuero (%)	Materia seca total en lactosuero	Materia seca Delta	Materia seca total Delta
		28.11.00	FPC	98,69	6,639	221,32		
10	1	28.11.00	FPCC	98,74	6,606	220,71	0,03304	0,60581
		29.11.00	FPC	98,89	6,685	222,14		
	2	29.11.00	FPCC	99,00	6,681	222,66	0,00433	-0,51101
15		30.11.00	FPC	98,38	6,641	220,62		
	3	30.11.00	FPCC	98,62	6,602	220,85	0,03898	-0,22351
		04.12.00	FPC	99,27	6,610	223,60		
20	4	04.12.00	FPCC	98,87	6,628	223,22	-0,01807	0,38949
		05.12.00	FPC	98,80	6,613	222,36		
	5	05.12.00	FPCC	98,71	6,635	222,41	-0,02205	-0,04471
25		06.12.00	FPC	99,02	6,446	217,65		
	6	06.12.00	FPCC	98,95	6,570	221,32	-0,12420	-3,67446
		07.12.00	FPC	98,81	6,365	213,15		
30	7	07.12.00	FPCC	98,61	6,442	214,95	-0,07644	-1,79965
		12.12.00	FPC	98,81	6,520	218,35		
	8	12.12.00	FPCC	98,61	6,508	217,15	0,01279	1,19616
35		13.12.00	FPC	98,88	6,611	223,18		
	9	13.12.00	FPCC	98,82	6,614	222,48	-0,00290	0,70228
		15.12.00	FPC	98,78	6,665	222,37		
40	10	15.12.00	FPCC	98,87	6,688	223,31	-0,02258	-0,94070
		20.12.00	FPC	98,23	6,685	221,63		
	11	20.12.00	FPCC	98,26	6,636	219,32	0,04856	2,31351
45		21.12.00	FPC	98,13	6,46	215,13		
	12	21.12.00	FPCC	98,40	6,50	217,58	-0,04364	-2,45507
		16.01.01	FPC	98,70	6,752	223,83		
50	13	16.01.01	FPCC	98,73	6,814	226,32	-0,06126	-2,49389
		17.01.01	FPC	98,73	6,801	226,43		
	14	17.01.01	FPCC	98,73	6,747	225,99	0,05351	0,43229
55		18.01.01	FPC	98,49	6,695	221,48		
	15	18.01.01	FPCC	98,63	6,725	222,01	-0,02969	-0,52480
		09.02.01	FPC	98,88	6,867	229,39		
60	16	09.02.01	FPCC	99,08	6,854	299,58	0,01354	-0,18775
			FPC	AVG	6.628	221,4156	-0,0123	-0,4510
			FPCC	AVG	6.641	221,8666		
65						S ₂	0,0467	1,4837

ES 2 354 775 T3

x_{mean} en sustancia seca delta resultó ser de 0,4510, s_2 , ser de 1,4837 y $N = 16$, y así una estimación para t se puede calcular como:

$$t_0 = 0,4510 / (1,4837 / 16)^{1/2} = 1,4811$$

la cual muestra que la hipótesis de que no hay diferencias entre las pérdidas de sustancia seca de FPC y FPCC se puede rechazar con más de un 90% de probabilidad.

De manera especulativa, la diferencia en la sustancia seca de 0,4510 g podría llevar a un peso del queso de 1 g o un aumento del rendimiento del queso de un 0,16% o un 1,6%.

En resumen, el dieciséis ensayos de queso de laboratorio pareados, cada uno usando ChyMax™ (FPC) y quimosina de camello producida fermentada (FPCC) se compararon y se descubrió con más de un 90% de probabilidad que la quimosina de camello producida fermentada da una menor pérdida de sustancia seca para el lactosuero, reflejando una esperanza de un mayor rendimiento del queso.

Referencias

Dunn-Coleman, N.S., Bloebaum, P., Berka, R.M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G.L., LaCost, R., Wilson, L.J., Kodoma, K.H., Baliu, E.F., Houen, G., Madsen, M.T., Harlow, K.W., Lønblad, P. y Foltmann, B. (1996) The Primary Structure and Enzymic Properties of Porcine Prochymosin and Chymosin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:667-675.

Elagamy, E.I. (2000) Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: A comparison with buffalo rennet, *J. Dairy Res.* 67:73-81.

Foltmann, B., Pedersen, V.B., Jacobsen, H., Kauffman, D. y Wybrandt, G. (1977) The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:2321-2324.

Houen, G., Madsen, M.T., Harlow, K. W., Lønblad, P. y Foltmann, B. (1996) The primary structure and enzymatic properties of porcine prochymosin and chymosin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28:667-675.

Kappeler, S. (1998) Compositional and Structural Analysis of Camel Milk Proteins with Emphasis on Protective Proteins, Dissertation ETH No. 12947, *Swiss Federal Institute of Technology*.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2a edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Wangoh, J., Farah, Z. and Puhon, Z. (1993). Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract, *Milchwissenschaft* 48:322-325.

Ward, M., Wilson, L.J., Kodoma, K.H., Rey, M.W. y Berka, R.M. (1990) Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression of glycoamylase-chymosin fusion, *Bio/Technology* 8:435-440.

Ward, M., Wilson, L.J. y Kodoma, K.H. (1993) Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for integrated plasmid, to overproduce heterologous proteins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743. WO 94/16086, Chr. Hansen A/S y Bioteknologisk Institut, 21 de julio de 1994.

INDICACIONES ACERCA DE LOS MICROORGANISMOS DEPOSITADOS (NORMA PCT 12BIS)

Hoja adicional

Además del microorganismo indicado en la página 9 de la descripción, los siguientes microorganismos se han depositado según el Tratado de Budapest con el

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos

en las fechas y bajo los números de registro como se declara debajo:

Nº de registro	Fecha de depósito	Página de la descripción nº.	Línea de la descripción nº.
CBS 108916	13 de junio de 2000	9	19
CBS 108914	13 de junio de 2000	19	35

Para todos los microorganismos depositados anteriormente identificados, se aplican las siguientes indicaciones adicionales:

En cuanto a las Oficinas de Patentes respectivas de los países designados respectivos, los solicitantes piden que una muestra de los microorganismos depositados declarados arriba sólo esté disponible para un experto designado por el solicitante hasta la fecha en la cual se conceda la patente o la fecha en la cual la solicitud se rechace o revoque o se crea que se vaya a revocar.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9529999 A, Ward, 1990 [0006] [0008]
- WO 1990 A [0006]
- WO 9416086 A [0029] [0115]
- US 09705917 B, 2000 [0118]

Bibliografía fuera de la patente citada en la descripción

- Harris, T.J. Lowe, P.A. Lyons, A. Thomas, P.G. Millican, T.A. Ptael, T.P. Bose, C.C. Carey, N.H. Doel, M.T. *Nucleic acid Research*, 1982, 2177-2187 [0025]
- Dunn-Coleman, N.S. Bloebaum, P. Berka, R.M. Bodie, E. Robinson, N. Armstrong, G. Ward, M. Przetak, M. Carter, G.L. LaCost, R. The Primary Structure and Enzymic Properties of Porcine Prochymosin and Chymosin *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1996, vol. 28, 667-675 [0115]
- Elagamy, E.I. Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: A comparison with buffalo rennet *J. Dairy Res.*, 2000, vol. 67, 73-81 [0115]
- Foltmann, B. Pedersen, V.B. Jacobsen, H. Kauffman, D. Wybrandt, G. The complete amino acid sequence of prochymosin *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, 2321-2324 [0115]
- Houen, G. Madsen, M.T. Harlow, K. W. Lønblad, P. Foltmann, B. The primary structure and enzymatic properties of porcine prochymosin and chymosin *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1996, vol. 28, 667-675 [0115]
- Compositional and Structural Analysis of Camel Milk Proteins with Emphasis on Protective Proteins Kappeler, S. Dissertation ETH No. 12947 Swiss Federal Institute of Technology [0115]
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. Molecular cloning. *A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989. [0115]
- Wangoh, J. Farah, Z. Puhan, Z. Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract *Milch-wissenschaft*, 1993, vol. 48, 322-325 [0115]
- Ward, M. Wilson, L.J. Kodoma, K.H. Rey, M.W. Berka, R.M. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression of glycoamylase-chymosin fusion *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 435-440 [0115]
- Ward, M. Wilson, L.J. Kodoma, K.H. Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for integrated plasmid, to overproduce heterologous proteins *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, vol. 39, 738-743 [0115]

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina, incluyendo el método las
5 fases de
 - (i) aislar o construir una secuencia de ácidos nucleicos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimo-
sina, donde la secuencia codificante se deriva de una especie mamífera seleccionada del grupo que consiste
en una especie *Camelidae*.
 - 10 (ii) construir un vector de expresión comprendiendo dicha secuencia codificante y, operativamente vinculadas
al mismo, señales de expresión apropiadas permitiendo que la preproquimosina, proquimosina o quimosina
se exprese en una célula huésped,
 - 15 (iii) transformar dicha célula huésped con el vector de expresión,
 - (iv) cultivar la célula huésped transformada bajo condiciones donde se exprese la secuencia codificante, y
 - (v) recoger la preproquimosina, proquimosina o quimosina.
- 20 2. Método según la reivindicación 1 donde la secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina y
quimosina se aísla o deriva a partir de *Camelus dromedarius*.
3. Método según la reivindicación 1 donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína de fusión com-
25 prendiendo preproquimosina, proquimosina o quimosina.
4. Método según la reivindicación 3 donde la proteína de fusión comprende glucoamilasa o un fragmento de la
misma.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la preproquimosina, proquimosina o quimosina, o
una proteína de fusión de la misma, se segrega sobre la membrana de la célula huésped.
6. Método según la reivindicación 1 donde el vector de expresión se deriva de pGAMpR como se describe en
Ward *et al.*, 1990 substituyendo la secuencia codificante del vector para la proquimosina bovina con una secuencia
35 codificante para la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina.
7. Método según la reivindicación 6 donde el vector de expresión es pGAMpR-C como se contiene en las cepas de
Aspergillus niger var. *awamori* depositadas bajo los números de registro CBS 108915 y CBS 108916.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde la célula huésped transformada se selecciona del
grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula mamífera, una
célula de insecto y una célula vegetal.
9. Método según la reivindicación 8 donde la célula huésped es *Aspergillus niger* var. *awamori*.
- 45 10. Método según la reivindicación 9 donde la célula huésped de *Aspergillus niger* var. *awamori* se selecciona del
grupo que consiste en CBS 108915 y CBS 108916.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde el rendimiento de la actividad de coagulación de la
50 leche de la preproquimosina, proquimosina o quimosina es al menos un 25% mayor al rendimiento de la actividad de
coagulación de la leche de la preproquimosina, proquimosina o quimosina bovina obtenida al usar, bajo condiciones
de producción idénticas, el mismo vector de expresión, pero con una secuencia codificante para la preproquimosi-
na, proquimosina o quimosina bovina en vez de la secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina o
quimosina no bovina.
- 55 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 comprendiendo, como otra fase, que la preproquimosina,
proquimosina o quimosina cosechada se somete a un tratamiento de deglicosilación.
13. Método según la reivindicación 1 donde la célula huésped es una célula expresando una enzima de deglicosi-
60 lación.
14. Método según la reivindicación 13 donde la enzima de deglicosilación es endoH.
15. Constructo de ADN capaz de expresar preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina, comprendiendo
65 dicho constructo un vector de expresión comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos comprendiendo un gen
codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina, donde la secuencia codificante se deriva de una especie
mamífera seleccionada del grupo que consiste en una especie *Camelidae*, y, operativamente vinculadas, señales de
expresión apropiadas permitiendo expresar la preproquimosina, proquimosina o quimosina en una célula huésped.

ES 2 354 775 T3

16. Constructo de ADN según la reivindicación 15 donde el constructo comprende una secuencia codificando un péptido señal para la preproquimosina, proquimosina o quimosina.
17. Constructo de ADN según la reivindicación 15 donde la señal de expresión comprende un promotor originalmente no asociado a la secuencia codificante.
18. Constructo de ADN según la reivindicación 15 donde la secuencia codificante se deriva de *Camelus dromedarius*.
19. Constructo de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-18 donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína de fusión comprendiendo la preproquimosina, proquimosina o quimosina.
20. Constructo de ADN según la reivindicación 19 donde la proteína de fusión comprende glucoamilasa o un fragmento de la misma.
21. Constructo de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-20 donde el vector de expresión se deriva de pGAMpR como se describe en Wart *et al.*, 1990 substituyendo la secuencia codificante del vector para la proquimosina bovina con una secuencia codificante para la preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina.
22. Constructo de ADN según la reivindicación 21 donde el vector de expresión es pGAMpR-C como se contiene en las cepas de *Aspergillus Niger* var. *awamori* depositadas bajo los números de registro CBS 108915 y CBS 108816.
23. Constructo de ADN según la reivindicación 15 comprendiendo una secuencia codificando una enzima de deglicosilación.
24. Constructo de ADN según la reivindicación 23 donde la enzima de deglicosilación es endoH.
25. Constructo de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-24 donde la secuencia codificante es una secuencia codificante de origen natural.
26. Constructo de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-24 donde la secuencia codificante se deriva de una secuencia codificante de origen natural por una o más sustitución(es) de nucleótidos silenciosas.
27. Célula huésped transformada con el constructo de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-26.
28. Célula huésped según la reivindicación 27 la cual se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula mamífera, una célula de insecto y una célula vegetal.
29. Célula huésped según la reivindicación 28 la cual es de *Aspergillus niger* var. *awamori*.
30. Célula huésped según la reivindicación 29 donde la célula huésped de *Aspergillus niger* var. *awamori* se selecciona del grupo que consiste en las cepas depositadas como CBS 108915 y CBS 108916.
31. Composición comprendiendo una preproquimosina, proquimosina o quimosina no bovina producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
32. Composición según la reivindicación 31 donde la preproquimosina, proquimosina o quimosina está en una forma sustancialmente deglicosilada.
33. Composición según la reivindicación 31 ó 32 comprendiendo preproquimosina, proquimosina o quimosina derivada del grupo que consiste en una especie *Camelidae*.
34. Método de fabricación de queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de la composición según la reivindicación de cualquiera de las reivindicaciones 31-33 a leche y realizando otras fases de fabricación de queso apropiadas.
35. Método según la reivindicación 34 donde la leche se selecciona del grupo que consiste en leche de vaca, leche de camella, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja y una mezcla de cualquiera de estos tipos de leche.
36. Método según la reivindicación 34 donde el rendimiento del queso obtenido es superior al rendimiento obtenido bajo condiciones de fabricación idénticas usando la misma cantidad de preproquimosina, proquimosina o quimosina bovina.
37. Método de fabricación de queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina o quimosina no bovina a la leche y realizar otras fases de fabricación de queso apropiadas, teniendo la proquimosina o quimosina no bovina en dicha leche una proporción C/P en el rango de 2-20, donde la proquimosina o quimosina no bovina se produce recombinantemente usando una secuencia codificante derivada de una especie mamífera seleccionada del grupo que consiste en una especie *Camelidae*.

ES 2 354 775 T3

38. Método según la reivindicación 37 donde la leche es leche de vaca.

39. Método según la reivindicación 37 ó 38 donde la proquimosina o quimosina no bovina se deriva de *Camelus dromedarius*.

5

40. Composición para la coagulación de leche comprendiendo una enzima bovina de coagulación de leche seleccionada de proquimosina, quimosina y pepsina y una enzima de coagulación de leche no bovina seleccionada de proquimosina y quimosina, donde la enzima de coagulación de leche no bovina se produce recombinantemente usando una secuencia codificante derivada de una especie mamífera seleccionada del grupo que consiste en una especie

10

Camelidae.

41. Composición según la reivindicación 40 donde la proporción de actividad de coagulación de leche entre las enzimas de coagulación de leche bovina y no bovina está en el rango de 1:99 a 99:1.

15

42. Composición según la reivindicación 40 ó 41 donde la enzima de coagulación de leche no bovina se deriva de *Camelus dromedarius*.

43. Método de fabricación de queso a partir de leche, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 40-42 a la leche y realizar otras fases de fabricación de queso apropiadas.

20

44. Método según la reivindicación 43 donde la leche es leche de vaca.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

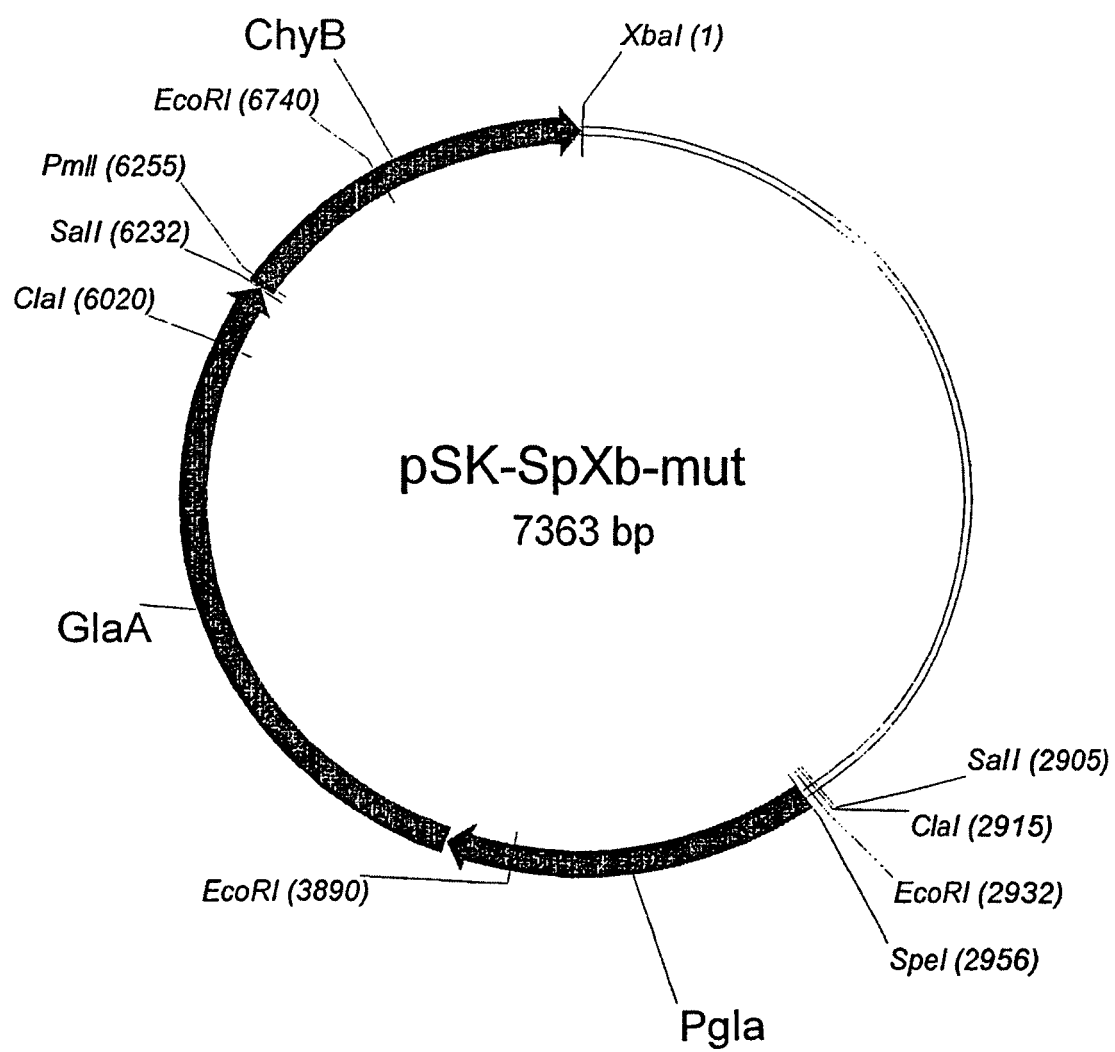


Fig. 1

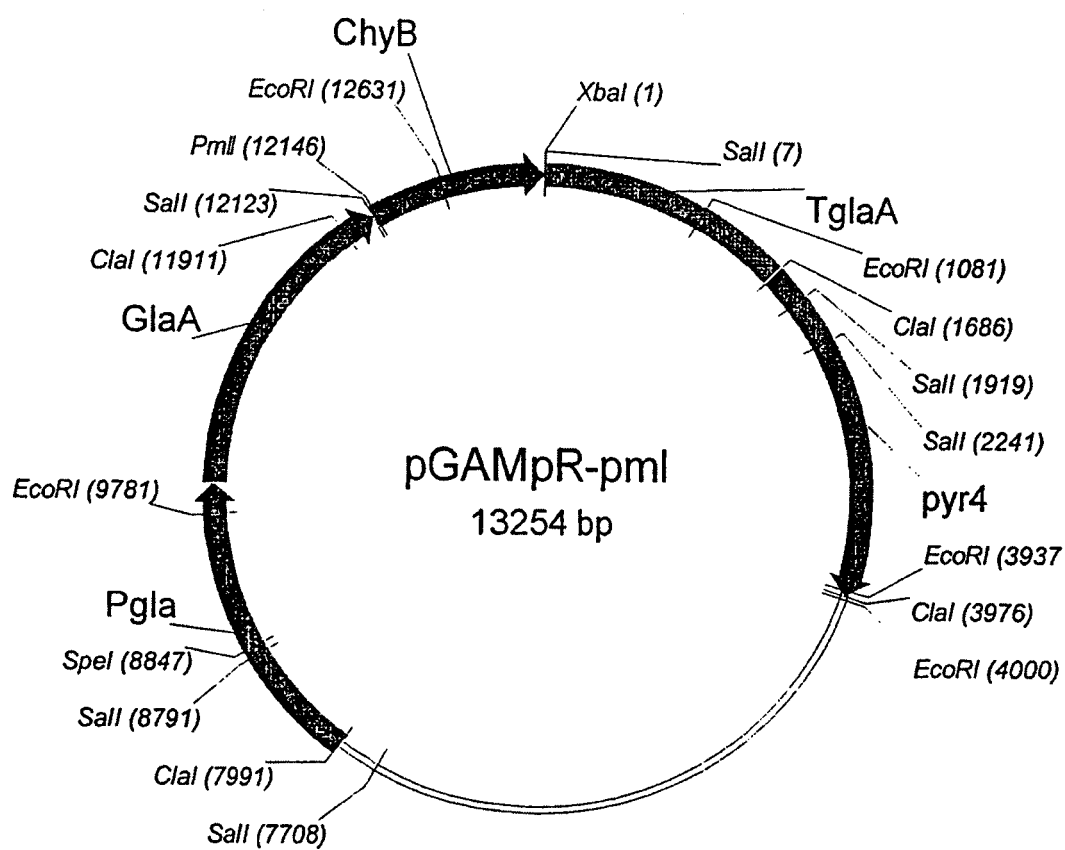


Fig. 2

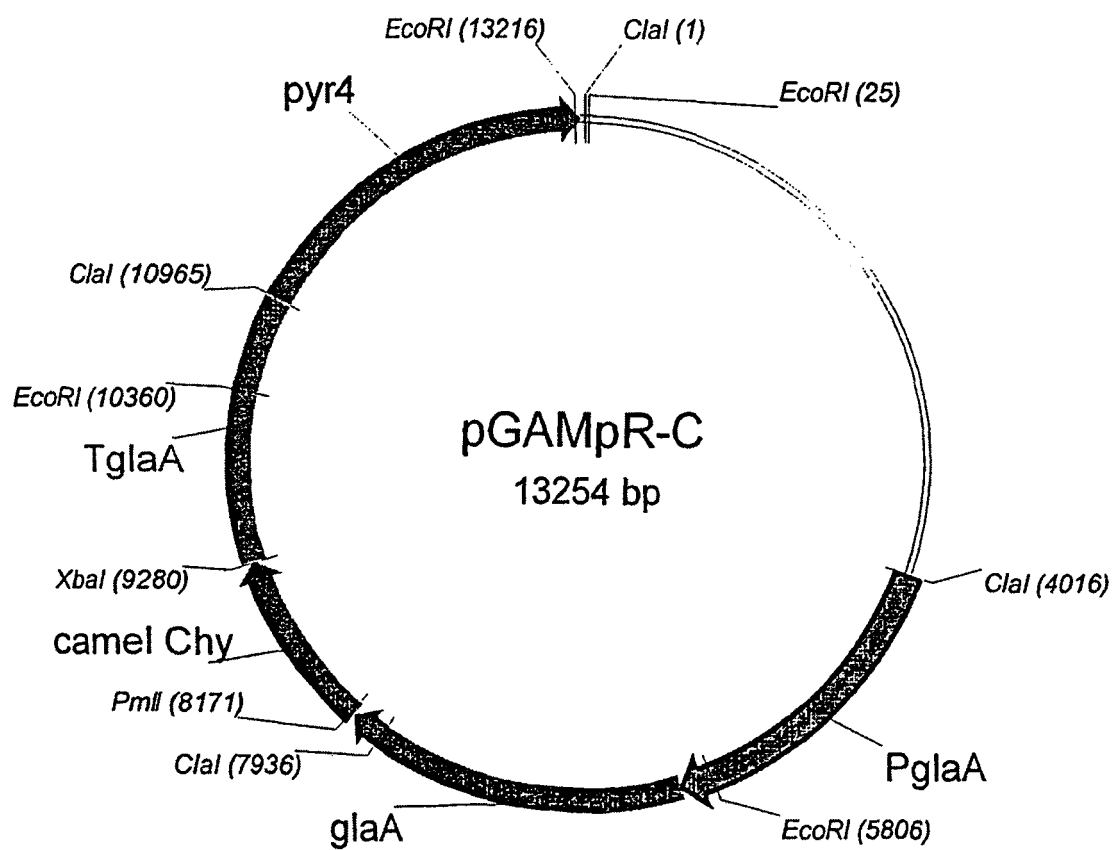


Fig. 3

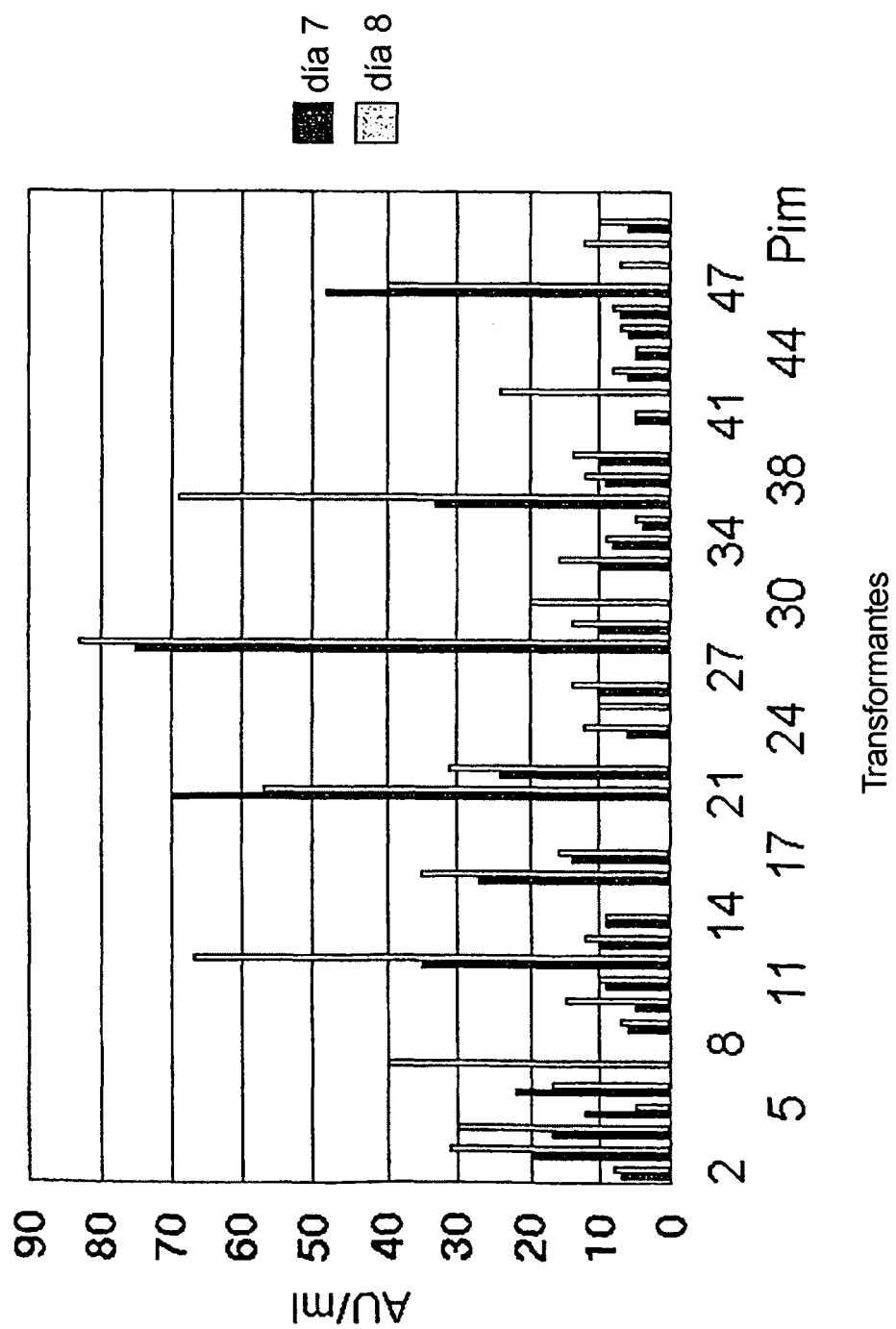


Fig. 4

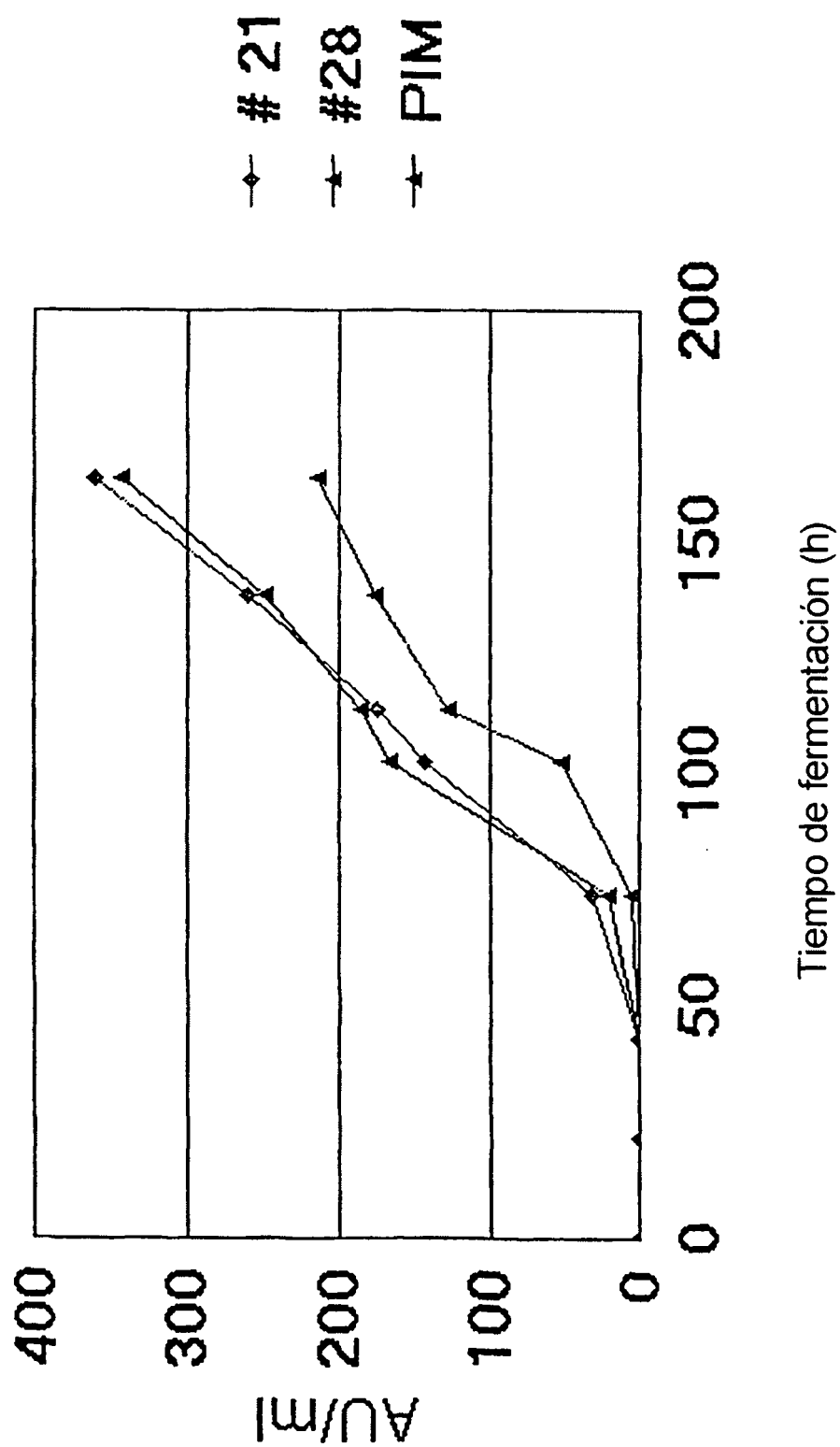


Fig. 5

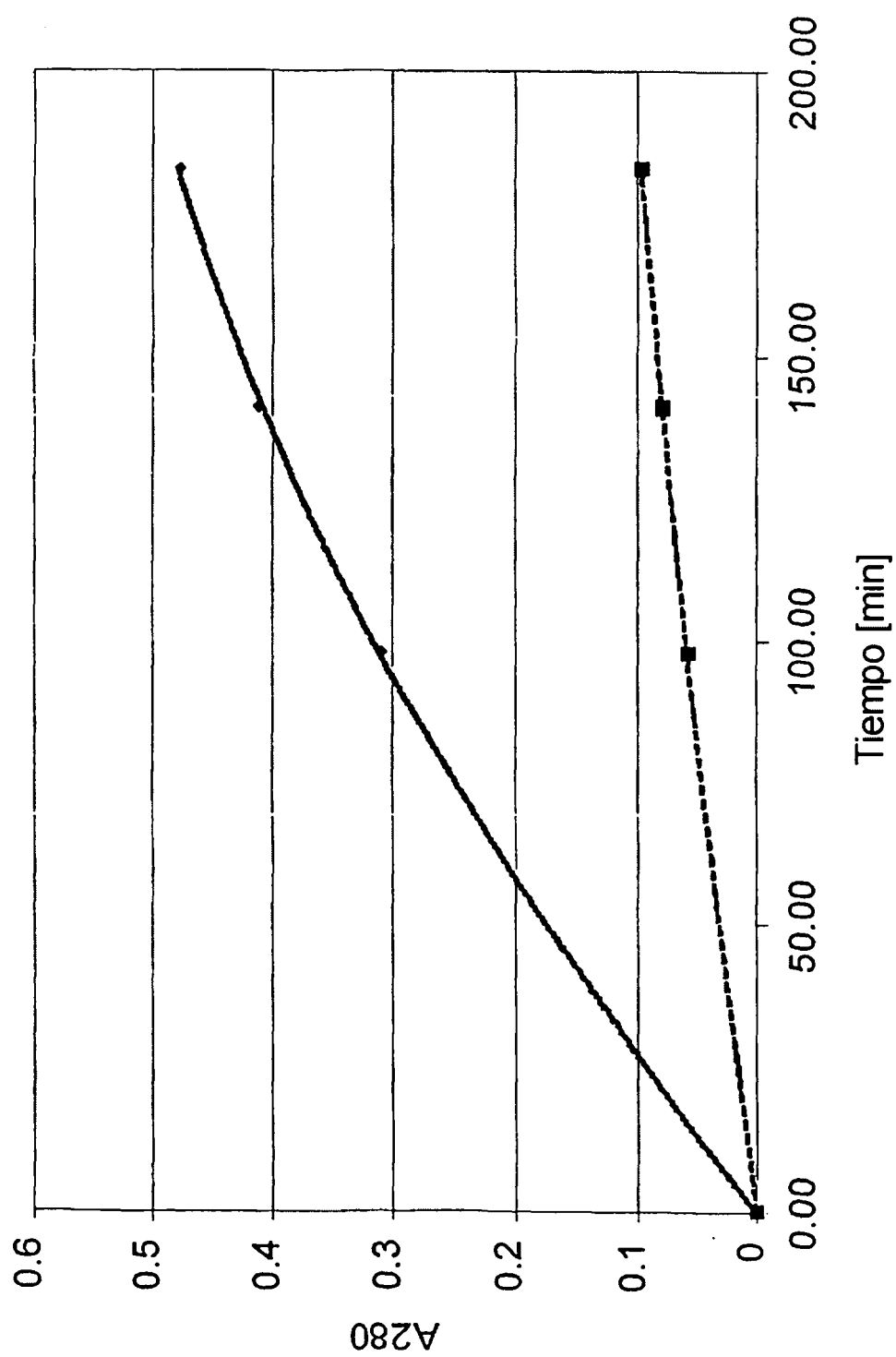


Fig. 6

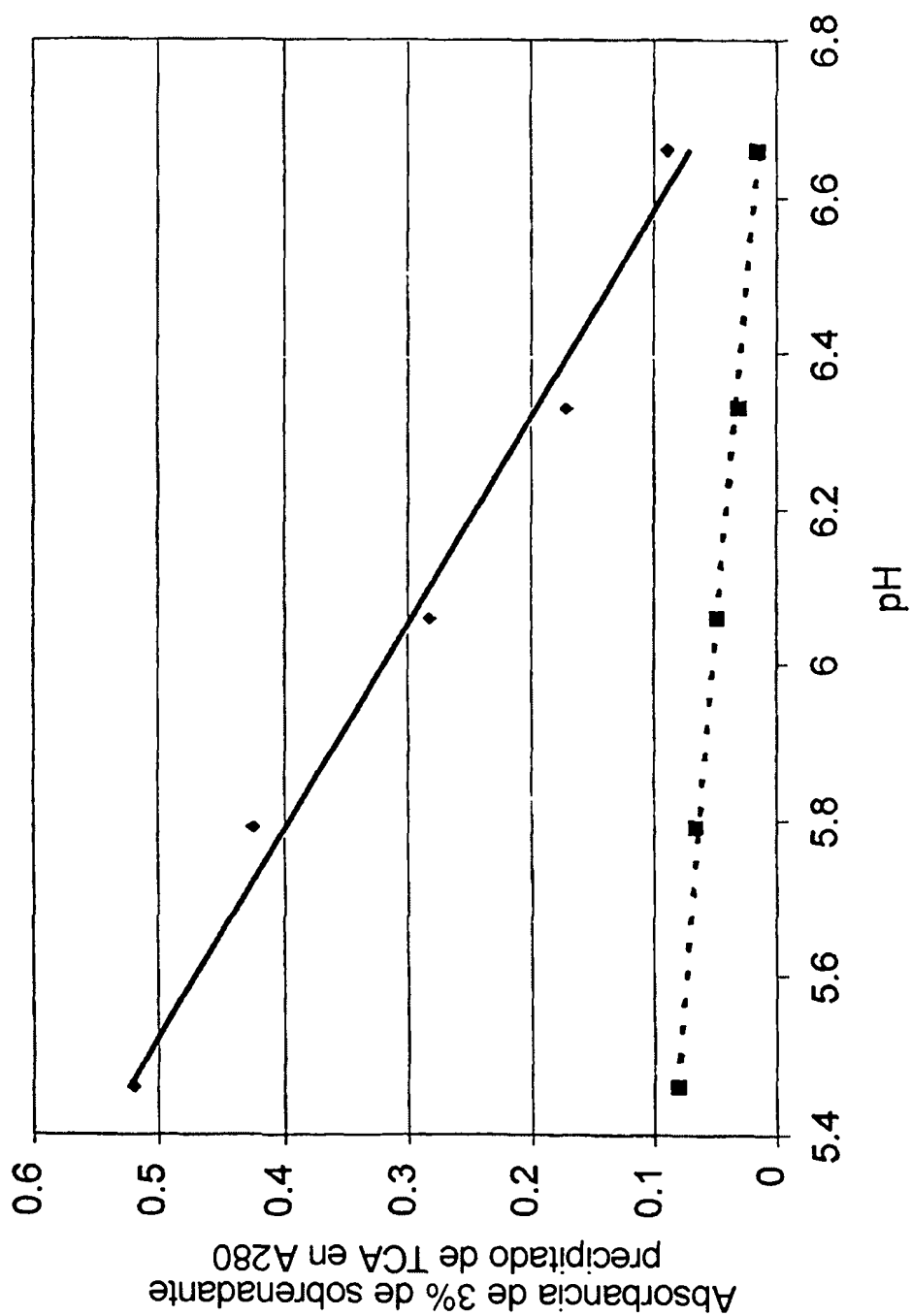


Fig. 7

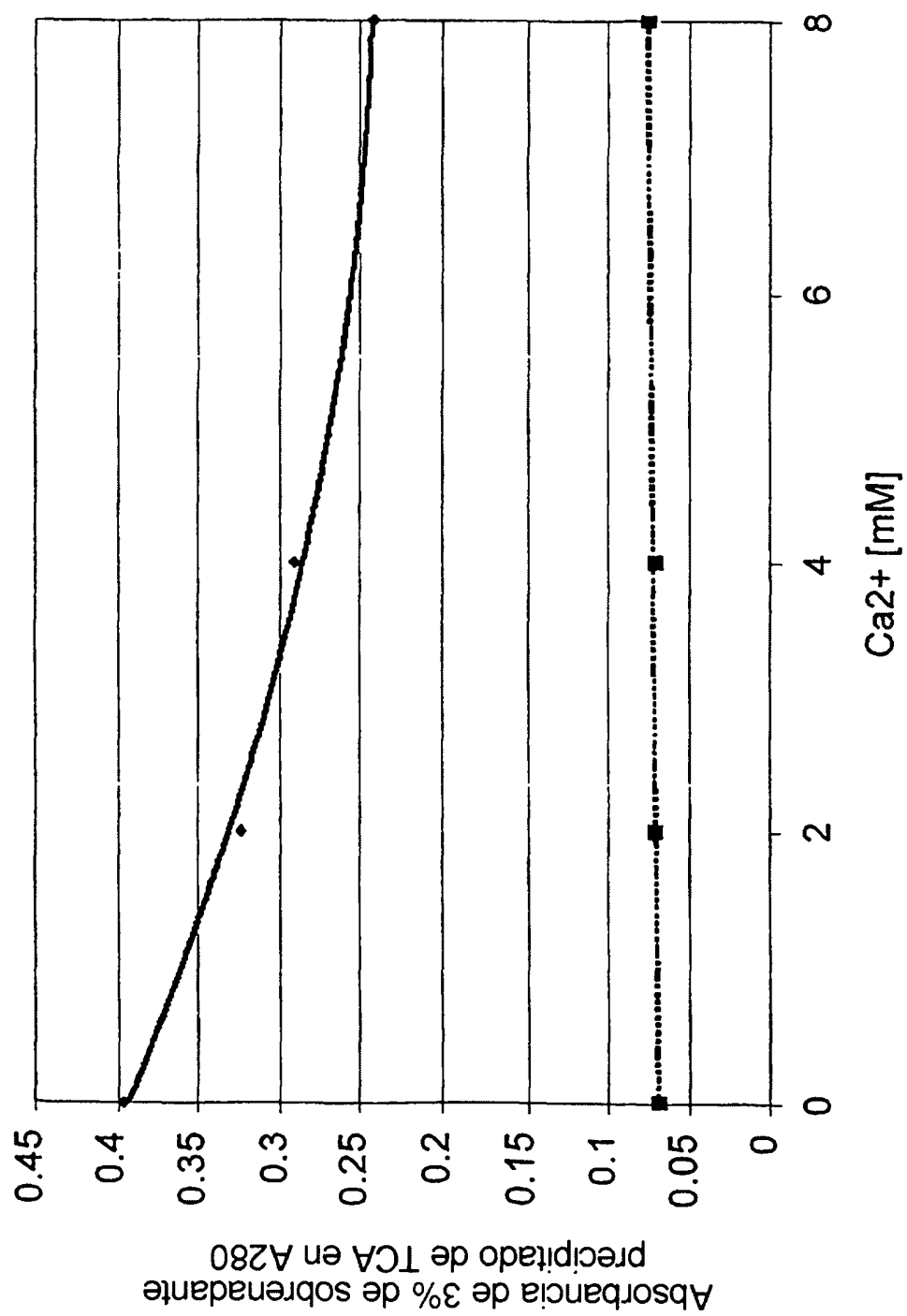


Fig. 8

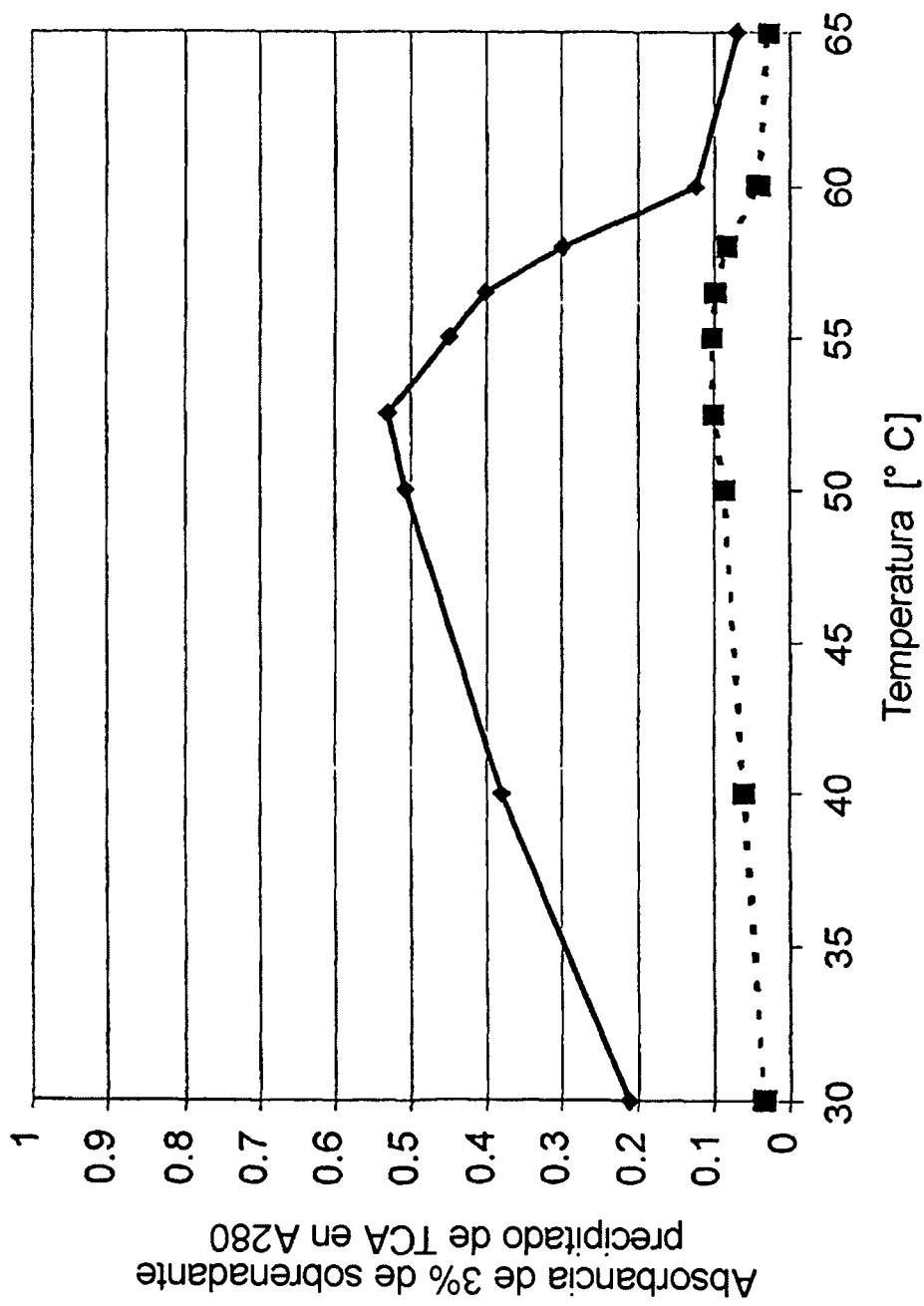


Fig. 9

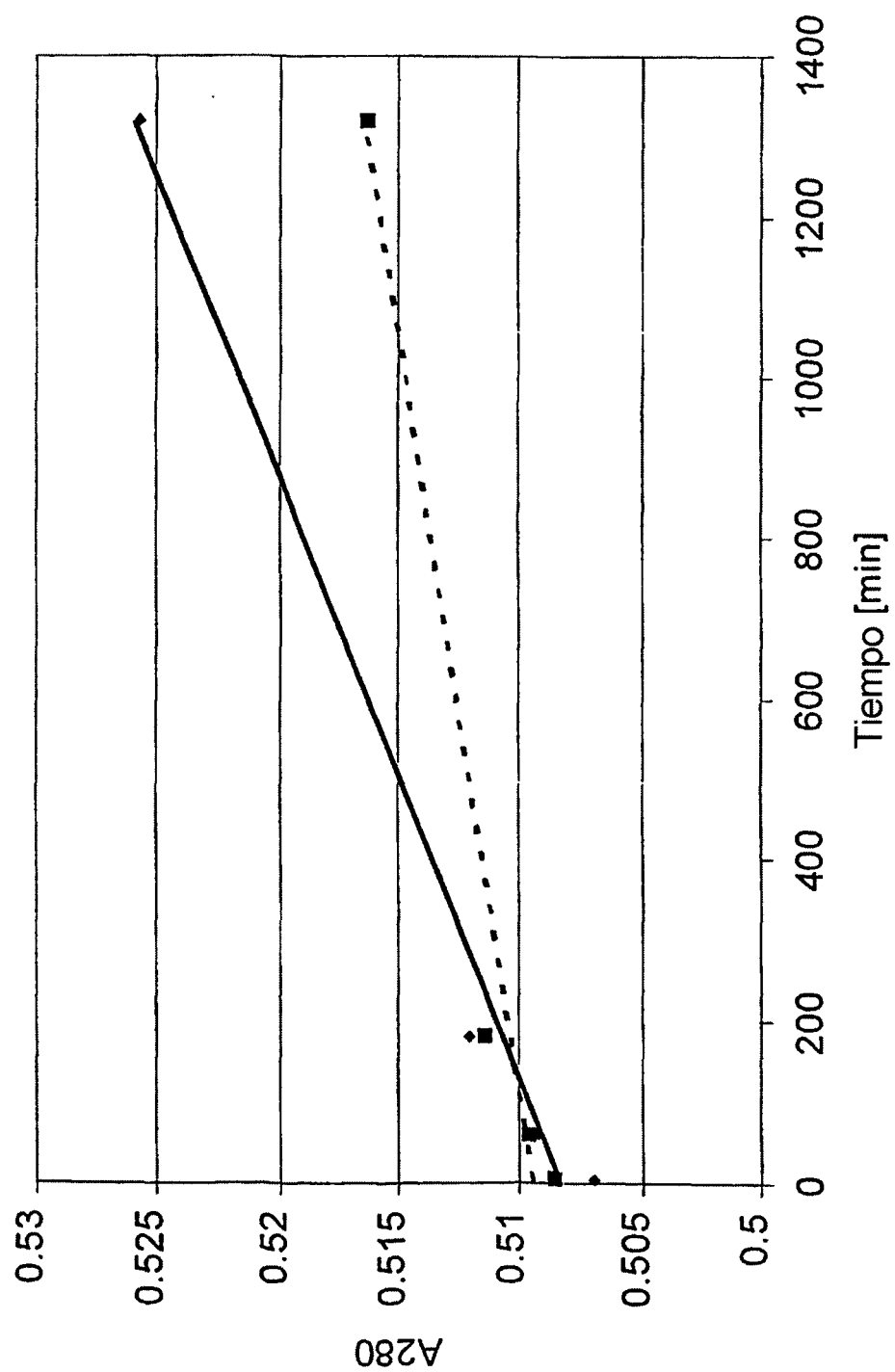


Fig. 10

ES 2 354 775 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Stefan Kappeler
Zakaria Farah
5 Johannes Maarten van den Brink
Henrik Rahbek-Nielsen
Peter Budtz
- 10 <120> Método para producir quimosina no bovina y uso del mismo
- <130> P10039US01
- 15 <150> US 09/705,917
<151> 2000-11-06
- <160> 6
- 20 <170> FastSEQ para la versión de Windows 4.0
- <210> 1
<211> 34
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial
- 30 <220>
<223> cebador para amplificación por PCR
- <400> 1
- 35 **cacgtggcgg agtgggatca ccaggatccc tctg**
34
- 40 <210> 2
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> Cebador para amplificación por PCR
- 50 <400> 2
- tctagaggat cagatggcct tggccagccc cacg**
34
- 55
- <210> 3
<211> 35
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 65 <220>
<223> Cebador oligonucleótido para mutagénesis basada en oligonucleótidos

ES 2 354 775 T3

 $\langle 400 \rangle$ 3

5 gcgacggtga ctgacacgtg gcgggcagaa ataac
35

<210> 4

<211> 35

10 $\langle 212 \rangle$ ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Oligonucleótido para mutagénesis basada en oligonucleótidos

<400> 4

20 gttatttctg cccgccacgt gtcagtcacc gtcgc
35

25 $\langle 210 \rangle$ 5

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

 $\langle 220 \rangle$

<223> La quimosina hidroliza el enlace peptídico entre nitrofenilalanina y Met.

35 <221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = nitrofenilalanina

40 $\langle 400 \rangle$ 5

His Pro His Pro His Leu Ser Xaa Met Ala Ile
1 5 10

45

 $\langle 210 \rangle$ 6

<211> 11

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

55 <223> La quimosina hidroliza el enlace peptídico entre nitrofenilalanina e Ile.

<221> VARIANTE

<222> 8

60 <223> Xaa = nitrofenilalanina

<400> 6

65 Arg Pro Arg Pro Arg Pro Ser Xaa Ile Ala Ile
 1 5 10