

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 299**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/50** (2006.01)

**C12N 15/59** (2006.01)

**A23C 19/032** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2001 E 10185159 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2365069**

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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.05.2018**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (50.0%)**

**Boege Allé 10-12**

**2970 Hoersholm, DK y**

**EIDGENÖSSISCH TECHNISCHE HOCHSCHULE**

**ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAPPELER, STEFAN;**

**ZAKARIA, FARAH;**

**BUDTZ, PETER;**

**RAHBEK-NIELSEN, HENRIK y**

**VAN DEN BRINK, JOHANNES MAARTEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 669 299 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 basado en leche de vacas. En particular, se proporcionan nuevos medios recombinantes para proporcionar enzimas de coagulación de leche de origen natural de *Camelus sp.* de origen animal en donde la leche es leche de las vacas. Específicamente, la invención pertenece a un proceso para proporcionar de forma recombinante preproquimosina, proquimosina y quimosina de origen de *Camelus sp.* incluyendo las enzimas que provienen de camellos y añadiendo dicha preproquimosina, proquimosina y quimosina de origen de *Camelus sp.* a la leche de las vacas.

15 **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 de dos etapas: una primera etapa donde una enzima, quimosina o pepsina proteolítica ataca a la K-caseína, dando como resultado un estado metaestable de la estructura micela de la caseína y una segunda etapa, 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 amplia clase amplia 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 más. La estructura secundaria global consiste casi en su totalidad en láminas plegadas y es baja en  $\alpha$ -hélices. Cada dominio contiene un sitio activo centrado en un resto aspartil catalítico con una secuencia consenso [hidrofóbica]-Asp-Thr-Gly-[Ser/Thr] la cual ayuda a mantener la conformación correcta de bucles  $\Phi$  del sitio, y con múltiples restos hidrofóbicos cerca del resto aspártico. Los dos sitios catalíticos se disponen el uno en frente al 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 restos están extensivamente enlazados con hidrógeno, concomitantemente con los restos de treonina contiguos, a los restos correspondientes del otro dominio o los átomos limítrofes del propio dominio, para estabilizar la correcta posición. La actividad óptima de una proteasa aspártica se consigue cuando uno de los restos aspárticos se protona y el otro se carga negativamente. Los sitios activos de quimosina y otras proteasas aspárticas se introducen, con baja accesibilidad, 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 desde aproximadamente Leu73 hasta 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 en condiciones ácidas para la quimosina activa por eliminación autocatalítica del profragmento. Esta activación tiene lugar *in vivo* en el lumen gástrico en condiciones de pH apropiadas o *in vitro* en condiciones ácidas.

Las características funcionales y estructurales de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina bovinas, es decir *Bos taurus*, se han estudiado exhaustivamente (Foltman *et al.* 1977). La preparte de la molécula de preproquimosina bovina comprende 16 restos de aa y la proparte de la proquimosina correspondiente tiene una longitud de 42 restos de aa. Foltman *et al.*, 1997 ha demostrado que la quimosina bovina activa que comprende 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 resto de aspartato en la posición 290 en la quimosina A y un resto de glicina en esta posición de la quimosina B.

Mientras que la quimosina se produce de forma natural en especies de mamíferos, 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 menor medida) la quimosina caprina son actualmente las únicas de estas especies de quimosina animal que están disponibles comercialmente para la industria láctea. La quimosina bovina, en particular la quimosina de ternero, está comercialmente disponible tanto como extractos de enzima de estómago (cuajos) que comprenden la quimosina producida de manera natural y como quimosina producida de manera recombinante, la cual se expresa en células hospedadoras bacterianas, de levadura o fúngicas (véase por ejemplo el documento 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 camello se reduce significativamente cuando se usa cuajo de camello en vez de cuajo de

ternero bovino. Las porciones crudas de cuajos de camello y de ternero, las cuales se aislaron mediante cromatografía de intercambio aniónico, se han evaluado para conocer sus respectivas capacidades 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 que contiene tanto quimosina como pepsina) reside en la porción de pepsina, es decir la quimosina bovina es sustancialmente inactiva con respecto a coagular la leche de camello, mientras que la actividad de coagulación principal de los extractos del cuajo de camello en la leche de camello residió en una primera porción que, en comparación con la quimosina de ternero, eluyó a una concentración de NaCl algo inferior. La enzima activa de esta porción aún no se ha caracterizado, pero es presuntamente quimosina. También se ha demostrado que esta porción 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 camello más eficaz que se pudo obtener a nivel industrial fue con la quimosina de camello disponible comercialmente y también se concibe que la quimosina de camello es también altamente adecuada como enzima de la coagulación de leche de vaca.

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 restos de 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 la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo, usando hongos filamentosos tales como los de las especies de *Aspergillus* (véase por ejemplo Ward, 1990), cepas de levadura, por ejemplo de especies de *Kluyveromyces*, o especies bacterianas, por ejemplo *E. coli*, como organismos hospedadores. 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 continua necesidad industrial 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 de 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 la tecnología del 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 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 como para hacer viable una producción industrial de alta calidad y rentable de queso basado en leche de camello, 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 específica de  $\kappa$ -caseína (Phe- Met 105/106), es decir, la proporción C/P tal y como se define a continuación, es superior a la de la quimosina bovina. Una proporción C/P más alta implica generalmente que se reduzca la pérdida de proteína durante la fabricación de queso debido a la degradación de proteína no específica, es decir, que se mejore la productividad del queso, y que se reduzca el desarrollo del sabor amargo en el queso durante la maduración.

### Resumen de la invención

La invención se refiere a un método para fabricar queso, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural a la leche de las vacas y realizar además las etapas apropiadas de fabricación de queso, teniendo la proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural en dicha leche una proporción C/P tal como se determina el presente documento, que está en el intervalo de 2-20.

### Descripción detallada de la invención

*Camelus spp.* incluye las dos especies, *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*; Los camellos son rumiantes, pero no pertenecen al suborden *Ruminantia* como lo hacen por ejemplo las especies bovinas, ovinas y caprinas, sino que pertenecen al suborden *Tylopoda*.

La proquimosina se debe entender en el presente contexto como el precursor o la proenzima de la quimosina. La proquimosina parece poseer una secuencia líder básica (pro-parte) en la parte N-terminal de la quimosina y se cree que dicha secuencia líder se divide 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 líder hidrófoba. Esta secuencia líder, también llamada señal de secreción o preparte, se divide cuando se segrega la proteína. 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, 21772187 Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin.)

En una etapa inicial de este método, se proporciona 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 de forma sintética basándose en las secuencias conocidas para especies de quimosina bovinas. El experto en la materia apreciará que se pueden utilizar otros métodos para obtener una secuencia codificante según la invención tales como procedimientos de hibridación que usan 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. Como alternativa, es posible construir una secuencia codificante basada en el aislamiento de la preproquimosina, la proquimosina o la quimosina no bovina seguida de la determinación de la secuencia de aminoácidos de la enzima o de fragmentos de la misma lo cual a su vez permite la construcción de oligonucleótidos de cebador para la detección y la construcción de secuencias codificantes. Las técnicas básicas que se requieren en los procedimientos anteriores para obtener secuencias codificantes están generalmente dentro del conocimiento común del experto en la materia (Sambrook *et al.*, 1989).

Habiendo aislado o construido la secuencia de nucleótidos que codifica la preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural, 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, que permiten expresar la preproquimosina, proquimosina o quimosina en una célula hospedadora 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 hospedador 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 que codifican sustancias represoras o activadoras. Para permitir la secreción del polipéptido expresado, una secuencia señal se puede insertar aguas 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 que lleva la secuencia de nucleótidos que codifica la preproquimosina, proquimosina o quimosina puede ser cualquier vector que sea capaz de expresar la secuencia codificante en el organismo hospedador seleccionado, y la elección de tipo de vector dependerá de la célula hospedadora 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, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica en las células hospedadoras, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago, un minicromosoma o un cromosoma artificial. Como alternativa, el vector puede ser un vector que, introducido en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica con el cromosoma, incluyendo un elemento transponible.

En el vector, la secuencia de nucleótidos que codifica la preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural se combina operativamente con una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que confiera actividad transcripcional al organismo hospedador de elección y se pueda provenir de genes que codifican proteínas, las cuales sean o bien heterólogas u homólogas al organismo hospedador. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia codificante de la invención en un hospedador 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  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), los promotores del gen de amilasa de maltogenio de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), los promotores del gen  $\alpha$ -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 el documento WO 94/16086.

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 aspártico 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 que incluye un promotor T7 o un promotor bacteriófago lambda.

El vector que comprende el fragmento de ADN que codifica el polipéptido activo de la preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en el organismo hospedador tal como una mutación que confiere un fenotipo auxotrófico, o el marcador puede ser uno que confiera resistencia antibiótica o resistencia a iones de metales pesado.

En una realización específica, el vector de expresión proviene de pGAMpR tal como se describe en Ward *et al.*, 1990 por sustitución 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 que proviene de pGAMpR es pGAMpR-C depositado en un entorno huésped de *Aspergillus niger* var. *awamori* con los N.º de referencia CBS 108915 y CBS 108916, respectivamente.

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

Según la invención, el organismo hospedador puede ser una célula vegetal. No obstante, en realizaciones preferidas, el organismo hospedador es una célula microbiana, por ejemplo una célula bacteriana o fúngica, incluyendo una célula de levadura.

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

Un organismo hospedador 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 *Klyuve-romyces spp.* incluyendo *Klyuveromyces lactis*.

Los organismos hospedadores adecuados entre hongos filamentosos incluyen especies de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium* o *Trichoderma*, tal como por ejemplo *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*, incluyendo *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *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 reesii* o *Trichoderma viride*.

Los ejemplos de cepas de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformadas con un vector que expresa preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural incluyen las cepas depositadas con los N.º de registro 108915 y 108916.

Algunos organismos hospedadores 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 etapas posteriores la célula hospedadora transformada se cultiva en condiciones en las que se expresa la secuencia codificante, y se recolecta la preproquimosina, proquimosina o quimosina. El medio usado para cultivar

las células hospedadoras transformadas pueden ser cualquier medio convencional adecuado que haga crecer las células hospedadoras en cuestión y que obtenga la expresión del polipéptido. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas.

5 La preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural resultante típicamente se recupera o se recolecta a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células hospedadoras del medio mediante centrifugación o filtración, si es necesario, después de romper las células, seguido de la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtración por ejemplo añadiendo una sal tal como sulfato de amonio, seguido de una etapa de purificación. Como alternativa, el  
10 medio de cultivo sin 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.

Es generalmente sabido que los polipéptidos expresados por organismos hospedadores eucarióticos se pueden glicosilar al expresarse, dependiendo del grado de glicosilación del tipo de polipéptido y del organismo hospedador.  
15 Se ha descubierto previamente que se puede mejorar la actividad de coagulación de leche de las proteasas aspárticas de origen microbiano que se glicosilan tras la expresión sometiendo las proteasas a un tratamiento de deglicosilación hasta por lo menos eliminar parcialmente las porciones de azúcar fijadas a las proteasas. Tal tratamiento de deglicosilación puede por ejemplo comprender tratar la proteasa glicosilada con una enzima que tiene una actividad deglicosilante incluyendo como ejemplos PNGasa y endo-d-N-acetilglucosaminidasa (EC  
20 3.2.1.96) (Endo-H). Como alternativa, la deglicosilación se puede obtener sometiendo a la proteasa glicosilada a un tratamiento químico, tal como un tratamiento con periodato.

Por consiguiente, en una realización específica, el método anterior comprende, como otra etapa, que la preproquimosina, proquimosina o quimosina cosechada se someta a un tratamiento de deglicosilación.  
25

Se contempla igualmente que la deglicosilación de una preproquimosina, proquimosina o quimosina expresada se puede obtener de una manera más directa proporcionando una célula hospedadora que además de la preproquimosina, proquimosina o quimosina exprese una enzima deglicosilante tal como Endo-H mediante la cual, la preproquimosina, proquimosina o quimosina inicialmente glicosilada se deglicosila intracelularmente o tras la secreción. Por consiguiente, en otra realización la célula hospedadora es una célula que expresa además una enzima de deglicosilación capaz de deglicosilar la preproquimosina, proquimosina o quimosina coexpresada.  
30

La secuencia codificante de la construcción de ADN de la invención puede provenir de cualquiera de las especies animales anteriores de *Camelus spp.* de origen natural, incluyendo *Camelus dromedarius*. El vector de expresión de la construcción de ADN puede ser cualquiera de los vectores de expresión mencionados anteriormente incluyendo vectores que provienen de pGAMpR tales como el vector pGAMpR- C tal como se describe a continuación en los ejemplos. Adicionalmente, la construcción de ADN según la invención puede comprender además una secuencia que codifica una enzima de deglicosilación tal como endoH.  
35

La secuencia de la construcción de ADN según la invención que codifica una preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural puede ser una secuencia codificante de origen natural. No obstante, tal como apreciará el experto en la materia, la secuencia codificante también puede ser una que proviene de tal secuencia codificante de origen natural por una o más sustitución(es) de nucleótido silenciosas, el término "silenciosa" implica 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.  
40  
45

Un objetivo importante de la invención es proporcionar un método para fabricar queso, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de la composición anterior a leche de vacas y realizar otras etapas de fabricación de queso apropiadas. La preproquimosina, proquimosina o quimosina de la invención es conveniente para procesos de fabricación de queso donde la leche es de vaca. 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. Tal como se utiliza en este caso, el término "proporción C/P" se define mediante los métodos para determinar un valor C y un valor P, respectivamente tal como se describe a continuación en los ejemplos.  
50  
55

Tal como se muestra a continuación en los ejemplos, el uso de una proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural producida de manera recombinante en la fabricación del queso da como resultado 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 realización la invención proporciona un método de fabricación de queso donde el rendimiento del queso obtenido es superior al rendimiento obtenido en condiciones de fabricación idénticas usando la misma cantidad de proquimosina o quimosina bovina.  
60  
65

Se demuestra a continuación en los ejemplos, que la preproquimosina, proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural tiene una proporción C/P más alta, en relación a la quimosina bovina usada de forma convencional. Por consiguiente, la invención pertenece en otro aspecto a un método de fabricación de queso, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural a la leche bovina y realizar las otras etapas de fabricación de queso apropiadas, teniendo la proquimosina o quimosina de *Camelus spp.* de origen natural en dicha leche una proporción C/P en el intervalo de 2-20, preferentemente una proporción C/P de al menos 3, tal como al menos 5 o incluso al menos 10.

En una realización específica tal preproquimosina, proquimosina o quimosina proviene de *Camelus dromedarius*.

Es otro objetivo de la invención proporcionar una composición de coagulación de la leche que comprende una enzima bovina de coagulación de la leche seleccionada a partir de proquimosina, quimosina y pepsina y una enzima de coagulación de la leche de *Camelus spp.* de origen natural seleccionada a partir de proquimosina, quimosina y pepsina que incluye 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 intervalo 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 %, un 10 %, un 20 %, un 50 %, un 75, un 90 ó un 98 % de la actividad. En una realización preferida, la enzima no bovina en tal composición mezclada proviene de *Camelus dromedarius*.

También se proporciona un método para fabricar queso a partir de leche de las vacas, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulación de la leche de la composición anterior y realizar las otras etapas de fabricación del queso apropiadas.

La invención se describirá a continuación en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y en los dibujos donde:

La Fig. 1 es un mapa del plásmido pSK-SbXb-mut que contiene un casete de expresión de glucoamilasa A-quimosina B. Una mutación imperceptible da como resultado un único sitio *PmII*;

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

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

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

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

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

La 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 MES 33 nM, a pH 5,80 usando caseína bovina N,N-demetilada al 0,5 % como el sustrato e incubando a 32 °C durante 30-180 minutos a diferente pH;

La 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 MES 33 nM, a pH 5,80 usando un caseína bovina N,N-demetilada al 0,5 % como el sustrato e incubando a 32 °C durante 30-180 minutos en diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup>;

La 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 MES 33 nM, a pH 5,80 usando caseína bovina N,N-demetilada al 0,5 % como el sustrato e incubando a 32 °C durante 30-180 minutos a temperaturas diferentes; y

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

## Ejemplo 1

**Construcción de un vector para la expresión de quimosina de camello**

5 A menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinantes fueron las de Sambrook *et al.*, 1989.

1.1 Clonación de gen de quimosina de *Camelus dromedarius*

10 Se amplificó por PCR una secuencia de ADN que contiene una secuencia codificante de proquimosina de camello (proquimosina Cd) y las secuencias 5' y 3' contiguas del vector pGAMpR (Ward *et al.*, 1990). 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 kit de ARNm directo (Quiagen, D-40724 Hilden, Alemania). Basándose en este ARNm aislado, se generó un molde de ADNc para PCR mediante transcripción inversa. Para la amplificación mediante PCR se usó el siguiente par de cebadores:

*proquimosina Cd directo:*

*PmlI*

20 5'-cacgtggcggAGTGGGATCACCAGGATCCCTCTG-3' (SEQ ID NO:1)

*proquimosina Cd inverso:*

*XbaI*

25 5'-tctagaggaTCAGATGGCCTTGCCAGCCCCACG-3' (SEQ ID NO:2)

El producto de PCR se ligó a 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

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

35 Se introdujo una mutación imperceptible en pSK-SpXb mediante 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 de oligonucleótidos (las bases que introducen la mutación en el vector se muestran en letras mayúsculas):

40 5'-gcgacggtgactgacacGtggcgggcagaataac-3' (mutación de *PmlI* directa) (SEQ ID NO:3)

5'-gttatttctgcccgccCgtgtcagtcaccgtcgc-3' (mutación de *PmlI* inversa) (SEQ ID NO:4)

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

50 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

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

60 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 GCl-HF1-2dgr246 de *Aspergillus niger* var. *awamori* que tiene una mutación de *pyrG*, que hace que la cepa sea incapaz de crecer en ausencia de uridina, y la cual comprende diferentes copias del plásmido pGAMpR. La cepa derivada, dgr246pyrG usada como receptor se obtiene polimerizando la cepa progenitora mutante de *pyrG* para todas las copias de pGAMpR.

65 La cepa dgr246pyrG se ha depositado en 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 con el N.º de registro CBS 108914.

Se aplicó un protocolo optimizado tal como el desarrollado 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 que incluye la regeneración de protoplastos y la selección de transformantes.

5

### 2.1 Propagación de biomasa fúngica

Se añaden 50 ml de medio CSL [por litro: 100 g de extracto soluble de maíz; 1 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 2 g de sustancia antiespumante Mazu, 100 g de maltosa, 10 g de glucosa, 50 g de fructosa, 736,5 g de agua] a un matraz estéril de 250 ml, se añaden 0,5 ml de suplemento de penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL n.º 15140-114)] y el medio se inocula con  $10^8$  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. Se transfieren 10 ml de este precultivo a 100 ml de medio de *Aspergillus* completo en un matraz de 500 ml sin deflectores, se incuba durante toda la noche a 34-37 °C a 200-250 r.p.m. para obtener una biomasa micelial.

15

### 2.2 Generación de protoplastos

El micelio tal como se obtiene en la etapa anterior se filtra a través de miracloth estéril, se lava con agua estéril y posteriormente con 1700 mOsmol de  $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$  (39,7 g/l de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,27 M; 33,9 g/l de  $\text{NaCl}$  0,58 M), se escurre suavemente hasta secarse y se transfiere a un tubo Falcon para determinar el peso y se deja reposar en hielo.

20

Se añaden 20 ml de 1700 mOsmol de  $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$  por g de micelio para resuspender el micelio seguido de la adición de 50 mg de la Enzima Lítica Sigma L-1412 de *Trichoderma harzianum* por g de micelio disuelto en un pequeño volumen de 1700 mOsmol de  $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$ , y la incubación en un matraz Erlenmeyer a 100 r.p.m., a 37 °C durante aproximadamente 4 horas, período durante el cual el micelio se resuspende reiteradamente cada 30 minutos.

25

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 (218 g/l de sorbitol 1,2 M; 2,04 g/l de  $\text{NaCl}$  35 mM; 7,35 g/l de  $\text{Tris.HCl}$  10 mM y de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a 50 mM a pH 7,5). El número de protoplastos se cuenta usando una cámara de vidrio Bürger-Türk. La suspensión de protoplastos se centrifuga usando una centrifugadora Benchtop a 2.000 r.p.m. a 4 °C. El sedimento resultante se resuspende muy despacio en 20 ml de STC1700 congelada. Este procedimiento de lavado se repite dos veces y el sedimento final se resuspende en STC1700 congelada hasta obtener una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^8$  protoplastos por ml seguido de un ajuste a  $1 \times 10^8$  protoplastos por ml.

35

### 2.3 Transformación

Se mezclaron 200  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^7$  protoplastos), 2  $\mu\text{l}$  de ATA 0,5 M (ácido carboxílico de aurina 0,5 M (Sigma) en etanol al 20 %) y ADN (que comprende un marcador) hasta 15  $\mu\text{l}$ , típicamente 5-10  $\mu\text{g}$  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 minutos seguido de la adición de una primera gota de 250  $\mu\text{l}$  de PTC (PEG 4000 al 60%;  $\text{Tris.HCl}$  10 mM a pH 7,5,  $\text{CaCl}_2$  50 mM) inclinando el tubo un par de veces sin dejar que la mezcla toque el borde y una segunda gota de 250  $\mu\text{l}$ , se mezcla y se añaden 850  $\mu\text{l}$  seguido de un mezclador. Cada tubo se incuba a temperatura ambiente exactamente 20 minutos seguidos del relleno de los tubos con STC1700 congelada y del mezclador revertiendo los tubos. La mezcla se centrifuga durante 8-10 minutos usando una centrifuga benchtop a 2000 r.p.m. a 4 °C. El sedimento resultante se disuelve suavemente en aproximadamente 400-800  $\mu\text{l}$  de STC1700.

45

### 2.4 Regeneración y selección de transformantes

La mezcla de transformación se extendió sobre placas sólidas de medio de regeneración selectivas conteniendo por l de medio: 15 g de agar; 218 g de sorbitol; Sales de aspA 50x (por litro: 300 g de  $\text{NaNO}_3$ , 26 g de  $\text{KCl}$ , 76 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 18 ml de  $\text{KOH}$  10 M, a pH de aproximadamente 6,5; 20 ml de glucosa al 50 %; 10 ml de Pen-Strep de Gibco-BRL n.º 15140-114; 2 ml de  $\text{MgSO}_4$ ; 1 ml de elementos traza (2,2 g de  $\text{ZnSO}_4$  1,1 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,5 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,17 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,16 de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de EDTA, 100 ml de agua a pH 6,5). Las placas se incubaron a 37 °C durante 5-10 días y se seleccionaron los transformantes.

55

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

60

### Ejemplo 3

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

3.1 Selección de transformantes produciendo altas cantidades de quimosina

65

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. Se inocularon 20 ml de medio CSL (véase arriba) con  $1 \times 10^6$  esporas de cada transformante, se incubaron durante 24-48 horas 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 una centrifugadora de Eppendorf y los sobrenadantes claros se recogieron y almacenaron a -20 °C hasta la determinación de la actividad de la quimosina. Como controles, se incluyeron tanto la cepa receptora como una cepa de producción de *Aspergillus niger* var. *awamori* para la quimosina bovina, dgr246ch1or25 (Dunn-Coleman *et al.*, 1991) que contiene la pGAMpR (las esporas de esta cepa usadas como material inóculo se denominan en el presente documento 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 n.º 21 y n.º 28.

Se depositó una muestra de las cepas n.º 21 y n.º 28 se depositó según el Tratado de Budapest con el Centraalbureau voor Schim- melcultures (CBS), Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos, el 13 de junio de 2000 con los N.º de registro 108915 y 108916, respectivamente.

Se llevó a cabo un experimento de PCR de colonia 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 generó 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 anterior de selección a pequeña escala se evaluaron posteriormente para conocer sus capacidades de producción de quimosina en 19 fermentadores I Bioingeniería NLF22. Como un control, se evaluó de forma similar una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformada con pGAMpR, referida como PIM2075.

El medio básico usado en este experimento tuvo la siguiente composición por litro: 44,68 g de soja Danpro<sup>TM</sup>; 1,06 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,00 g de substancia antiespumante Mazu DF204K; 2,07 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,20 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 17,29 g de (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,80 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 38 %, agua hasta 1 litro. Se usó una solución acuosa de maltosa al 35 % como la fuente de carbono y para mantener el pH en el valor preestablecido, se usó una solución de NH<sub>3</sub> al 25 %. Los parámetros de fermentación fueron los siguientes: pH: 5,5 temperatura: 35 °C; agitación: 600 r.p.m.; suministro de aire: 12 l por minuto; exceso de presión: 0,5 bares.

Durante 164 horas 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 completo de fermentación, 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 n.º 21 y n.º 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 en idénticas condiciones de producción.

#### 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 de manera recombinante (quimosina Cd) tal como se obtiene en el Ejemplo 3 con la caseína bovina entera. A modo de comparación, se incluyó una quimosina bovina producida de forma recombinante, ChyMax<sup>TM</sup> (quimosina Bt). Se evaluó el valor P se evaluó en relación con el tiempo y se estudió el efecto sobre la actividad proteolítica de Ca<sup>2+</sup> y el pH, respectivamente.

## 4.1 Ensayo

Salvo que se indique lo contrario, las reacciones de actividad se hicieron en las siguientes condiciones: caseína bovina N,N-dimetilada al 0,5 % (Sigma C9801), quimosina 100 nM en MES 33 nM, a pH 5,80 a 32 °C durante 30 minutos a 180 minutos. Si midió la absorbancia de sobrenadantes de ATC al 3 % a 280 nm. Las condiciones para las reacciones de actividad se seleccionaron de tal manera para incluir las del 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  $\text{Ca}^{2+}$  (0-2 nM) y tiempo de reacción.

## 4.2 Resultados

Durante un período de tiempo de 180 minutos, el P-valor de la quimosina Bt aumentó progresivamente a un A280 de aproximadamente 0,5 mientras que, durante el período 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; de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango de 0-8 mM y de 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* de manera general fue significativamente inferior que la de la quimosina bovina en todas las condiciones de prueba usadas.

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

## Ejemplo 5

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

En este experimento, se estudió la actividad de coagulación de la leche (valor C) de la quimosina Cd recombinante de la invención a 32°C usando como sustrato leche desnatada bovina al 10 % (p/v) secada por pulverización a bajo calor (Hochdorf). La concentración de quimosina Cd usada fue de 3,1 nM. A modo de comparación, se determinó 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) en 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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. En condiciones de fabricación de queso típicas como se han 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, lo que indica reacciones de coagulación y de sinéresis similares.

Basándose en los resultados en este ejemplo y a los hallados en el Ejemplo 4, se puede estimar la proporción C/P para la quimosina de camello, en relación con la de la quimosina bovina. Estos datos se resumen a continuación en la tabla 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 enumeradas, 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 etapa soluble del coágulo de leche usando quimosina (Cd) recombinante de *Camelus dromedarius* o ChyMax™ (quimosina Bt)**

La leche desnatada bovina al 10 % (p/v) secada por pulverización se disolvió en MES 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM a pH 5,6. La leche se coaguló con 65 mIMCU ml<sup>-1</sup> de las respectivas preparaciones de quimosina recombinante, es decir, quimosina recombinante de *Camelus dromedarius* (Cd) o ChyMaX™ (quimosina Bt) durante 5, 60, 180 y 1.320 minutos, respectivamente. Los coágulos formados se centrifugaron a 20.000 x g a 4 °C durante 5 minutos. Se diluyeron cincuenta µl del sobrenadante que contiene productos de descomposición de digeridos enzimáticos y proteínas de lactosuero en 950 µl de guanidina-HCl, 8 M a pH 6,5 y se midió la absorbancia a 280 nm.

Los resultados se resumen en la Figura 10. Según se observa, la cantidad de péptidos y proteína fue la máxima en los sobrenadantes que provienen de la coagulación con la quimosina bovina, lo que indica que la quimosina de camello, en 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 camello 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. Se coagularon muestras de leche (10 por análisis) con 65 mIMCU ml<sup>-1</sup>. Se determinó el tiempo de coagulación del cuajo (r[*min*]) y la resistencia del coágulo de los coágulos (A<sub>60</sub> [mM]). La resistencia del coágulo se determinó usando un dispositivo Formagraf (Foss Electric, Hiller0d, 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 pulverización en CaCl<sub>2</sub> 1 mM 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 se usó 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 que da 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 <sub>60</sub> [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 camello	59,45	0,40
Quimosina Cd	Leche cruda de camello	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 se corresponden con las regiones sensibles a la quimosina de la K-caseína (CN) bovina y de camello, se dividieron proteolíticamente con quimosina bovina y de camello, respectivamente. Se determinaron la K<sub>M</sub> y la K<sub>cat</sub> se a pH 5,6. Adicionalmente, se midieron la temperatura y el pH óptimos de estas reacciones. En este estudio se usaron los dos péptidos sintéticos siguientes:

*Péptido sintético correspondiente a κ-CN* bovino

NH<sub>2</sub>-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-(p-N02)Phe∞Met-Ala-Ile-COOH bovino (SEQ ID NO:5)

*Péptido sintético correspondiente a  $\kappa$ -CN de camello*

NH<sub>2</sub>-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-(p-N02)Phe $\infty$ Ile-Ala-Ile-COOH de camello (SEQ ID NO:6)

5  $\infty$  enlace fisible

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

10 Los resultados se resumen en la Tabla 8.1

TABLA 8.1  
*Resumen de resultados*

	<b>Quimosina de Bt</b>	<b>Quimosina de Cd</b>
$K_M$ para $\kappa$ -CN de Bt	0,165 + 0,015/- 0,014 mM	0,077 + 0,019/- 0,015 mM
$k_{cat}$ para $\kappa$ -CN de Bt	44,3 + 1,3 /-1,2 s <sup>-2</sup>	11,7 + 1,5/-1,2 s <sup>-1</sup>
$K_M$ para $\kappa$ -CN de Cd	0,134 + 0,022/- 0,021 mM	0,056 + 0,035/- 0,021 mM
$k_{cat}$ para $\kappa$ -CN de Cd	4,3+0,2/-0,1 s <sup>-2</sup>	5,1 +1,7/-1,0s <sup>-1</sup>
Temp. óptima ( $\kappa$ -CN de Bt)	~42 °C	~42 °C
Temp. óptima ( $\kappa$ -CN de Cd)	~58 °C	~47 °C
pH óptimo ( $\kappa$ -CN de Bt)	~4,9	~5,1

15 Se encontraron diferencias notables cuando se examinaron las enzimas para observar la actividad proteolítica con respecto a dos péptidos sintéticos que representan parte de las regiones sensibles a la quimosina de la K-caseína bovina y de camello. La unión de sustratos de la quimosina de camello resultó ser aproximadamente el doble de alta (la 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  $\kappa$ -CN bovino fue aproximadamente cuatro veces inferior al índice de producción de quimosina bovina.

20 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  $\kappa$ -CN representa sólo una pequeña porción 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, que efectúa la autoinhibición de la enzima y la activación posterior por la molécula diana, llevará a una alta proporción C/P. Además, se hallaron una temperatura y un pH óptimos similares para la proteólisis del péptido  $\kappa$ -CN de Bt, y la temperatura óptima para el péptido  $\kappa$ -CN de Cd se observó notablemente más alta, principalmente la de la quimosina bovina.

30 Ejemplo 9

### ***Determinación del rendimiento del queso usando ChiMaX<sup>TM</sup> (FPC) y quimosina de camello (FPCC)***

#### *9.1 Introducción*

35 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 cuidadosa medición del nivel de sustancia seca en lactosuero se usa como un método de comparación del efecto de las enzimas sobre el rendimiento del queso. En este estudio se compararon el rendimiento del queso obtenido usando el producto comercial ChyMax<sup>TM</sup> (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*

45 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 constantes durante todo el estudio. La variación en la coagulación de la leche se compensó variando los tiempos de corte.

##### *9.2.2 Producción de queso en vasos de precipitación*

55 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 precipitados de 5 litros. Se añadió GluconoDeltaLactone (GDL) de "DAN BOUQUET" en una cantidad de 3.200 g.

1.600 g de CaCl<sub>2</sub>. El corte se produjo después de aproximadamente 30 minutos. El cuajo y el lactosuero se transfirieron a estopilla después de una curación y agitación durante 30 minutos, y se dejaron drenar durante toda la noche. Ambas enzimas de coagulación de la leche se usaron en cada uno de los 16 ensayos.

5 9.2.3 *Muestreo y análisis*

El lactosuero total bien mezclado se filtró a través de una gasa para eliminar el polvo de queso. Se determinó la sustancia seca 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.

10 9.2.4 *Análisis estadísticos*

Se usó un test t de Student pareado para n = 16 diferencias en la sustancia seca total del lactosuero, usando

15 
$$t = X_{\text{media}} / (S_2/n)^{1/2}$$

como una estimación,

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

20 9.3 *Resultados y discusión*

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 de FPC y 140 IMCU FPCC, respectivamente, se usó para todos los vasos de precipitación. El tiempo de corte fue de una media de 30 minutos.

25

TABLA 9.1  
*Parámetros de producción de queso*

	<b>Parámetro</b>	<b>media</b>	<b>n</b>	<b>s</b>
	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 <sub>2</sub> /g	1,60	16	
		<b>Tiempo, min.</b>		
	acidificación	30		constante
	tiempo de corte	2		
	tiempo de curación	3		constante
	agitación	25		constante
	recogida	1		constante
	recogida para prensado	60		constante
		<b>PH</b>		
	leche	6,66		
	cuajo	6,40		
	lactosuero	n.d		
		<b>Temperatura, °C</b>		
	cuajo	31,5		
		<b>Pesos, g</b>		
	leche	4000		constante
	lactosuero	3350		
	cuajada	610		

30 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 % de DM deduciendo la cantidad de FPCC sobre los tiempos de lactosuero en % de DM. La materia seca promedio resultó ser 221,4156 g en lactosuero de FPC lactosuero y 221,8666 g en lactosuero de FPCC.

TABLA 9.2  
Resultados de los ensayos de queso individuales

Nº.	Fecha	Tipo de cuajo	Recuperado	Materia seca en lactosuero (%)	Materia seca total en lactosuero	Materia seca en Delta	Materia seca total Delta
	28.11.00	FPC	98,69	6,639	221,32		
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
	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		
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
	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		
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
	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		
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
	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		
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
	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		
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		
					S <sub>2</sub>	0,0467	1,4837

5  $X_{media}$  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:

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

10 la cual demuestra 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, se compararon dieciséis ensayos pareados de queso de laboratorio, cada uno usando ChyMax™ (FPC) y quimosina de camello producida fermentada (FPCC) 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., Lpnblad, 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. DairyRes.* 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., Lpnblad, 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.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Stefan Kappeler  
Zakaria Farah  
Johannes Maarten van den Brink  
Henrik Rahbek-Nielsen  
Peter Budtz

<120> Método de producción de quimosina no bovina y uso de la misma

<130> P10039US01

<150> US 09/705.917

<151> 06-11-2000

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación por PCR

# ES 2 669 299 T3

<400> 1  
cacgtggcgg agtgggatca ccaggatccc tctg  
34

5 <210> 2  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador para la amplificación por PCR

<400> 2  
tctagaggat cagatggcct tggccagccc cacg  
34

15 <210> 3  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador de oligonucleótidos para la mutagénesis basada en oligonucleótidos

<400> 3  
gcgacggtga ctgacacgtg gcgggcagaa ataac  
35

25 <210> 4  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótidos para la mutagénesis basada en oligonucleótidos

<400> 4  
gttattttctg cccgccacgt gtcagtcacc gtcgc  
35

40 <210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> La quimosina hidroliza la unión peptídica entre nitrofenilalanina y Met.

45 <221> VARIANTE  
<222> 8  
<223> Xaa = nitrofenilalanina

<400> 5  
His Pro His Pro His Leu Ser Xaa Met Ala Ile  
50 1 5 10

55 <210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> La quimosina hidroliza la union peptídica entre nitrofenilalanina y He.

60

ES 2 669 299 T3

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = nitrofenilalanina

5

<400> 6

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

**REIVINDICACIONES**

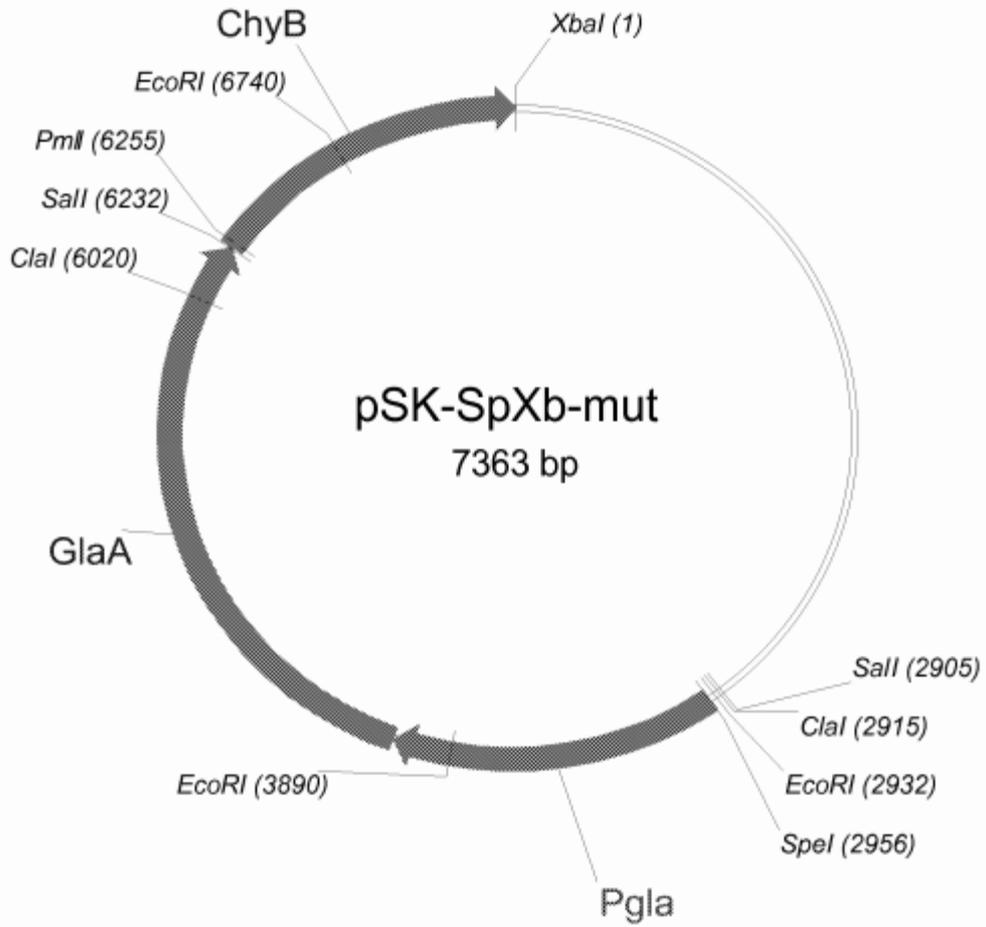
1. Método para fabricar queso, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una composición que comprende una quimosina no bovina, producida por el método que comprende las etapas de

- 5 (i) aislar o construir una secuencia de ácidos nucleicos codificando la preproquimosina, proquimosina o quimosina, donde la secuencia codificante es de origen natural y proviene de una especie mamífera seleccionada del grupo que consiste en especies de *Camelus*
- 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 hospedadora,
- (iii) transformar dicha célula hospedadora con el vector de expresión, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica (tal como una célula de *Aspergillus niger* var. *awamori*), una célula de levadura y una célula vegetal,
- 15 (iv) cultivar la célula hospedadora transformada bajo condiciones donde se exprese la secuencia codificante, y
- (v) recoger la quimosina,

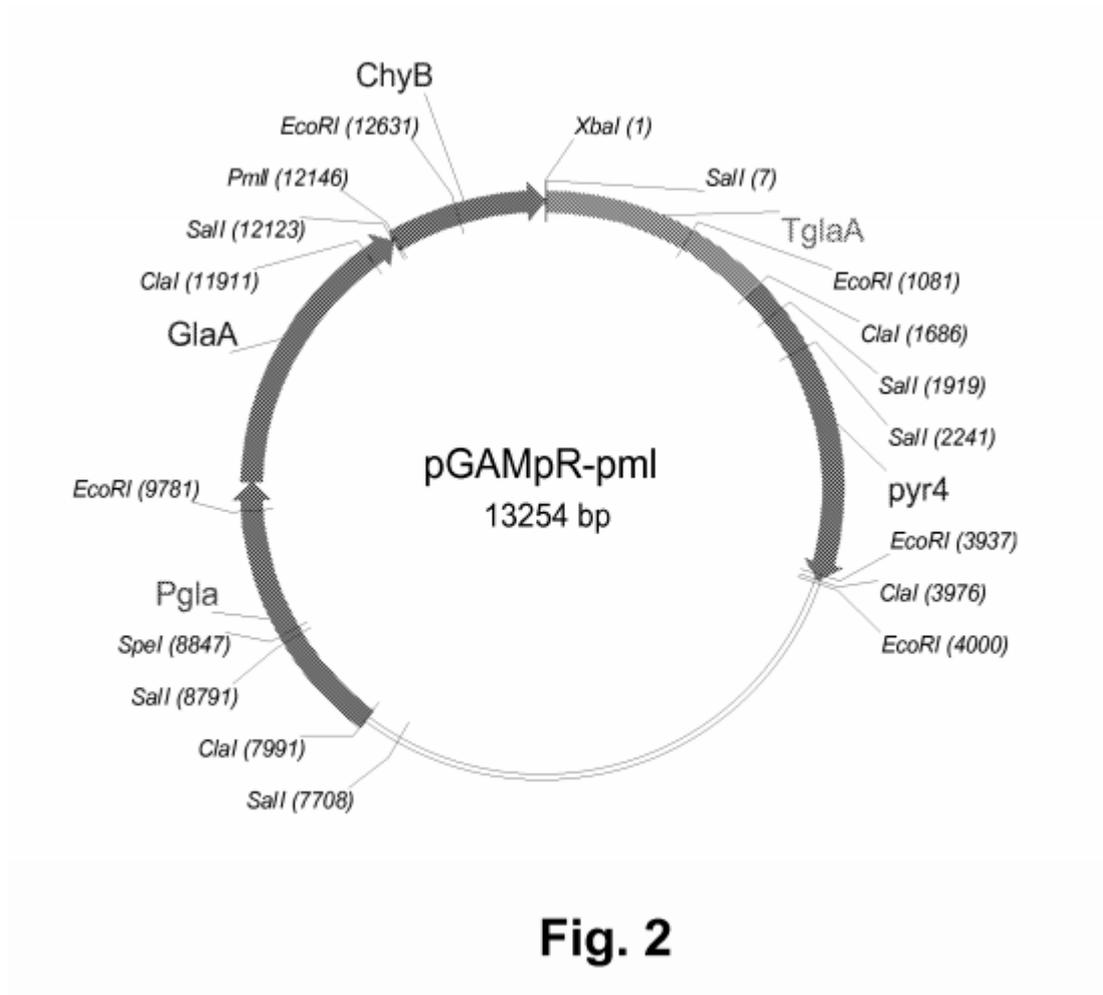
a leche y realizando otras etapas de fabricación de queso apropiadas donde la leche es leche de vaca.

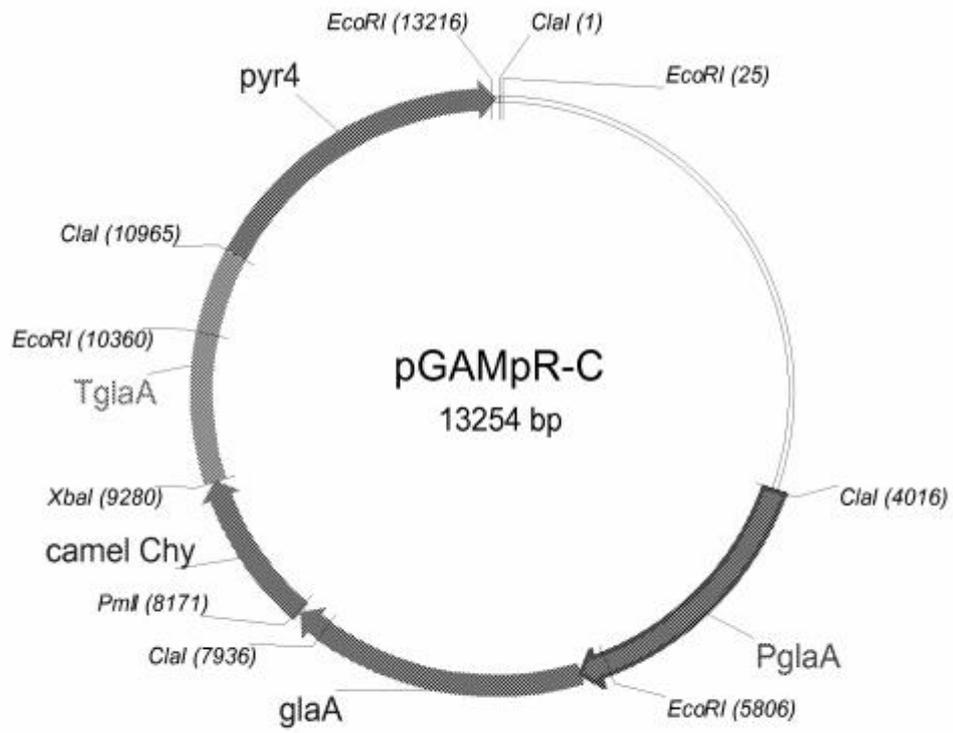
20 2. Un método de fabricación de queso, comprendiendo añadir una cantidad eficaz de coagulación de leche de una proquimosina o quimosina no bovina a la leche y realizar otras etapas de fabricación de queso apropiadas, teniendo la proquimosina o quimosina no bovina en dicha leche una proporción C/P en el rango de 2-20, donde la proquimosina o quimosina es de origen natural y proviene de *Camelus dromedarius*, y en donde la leche es leche de vaca.

25

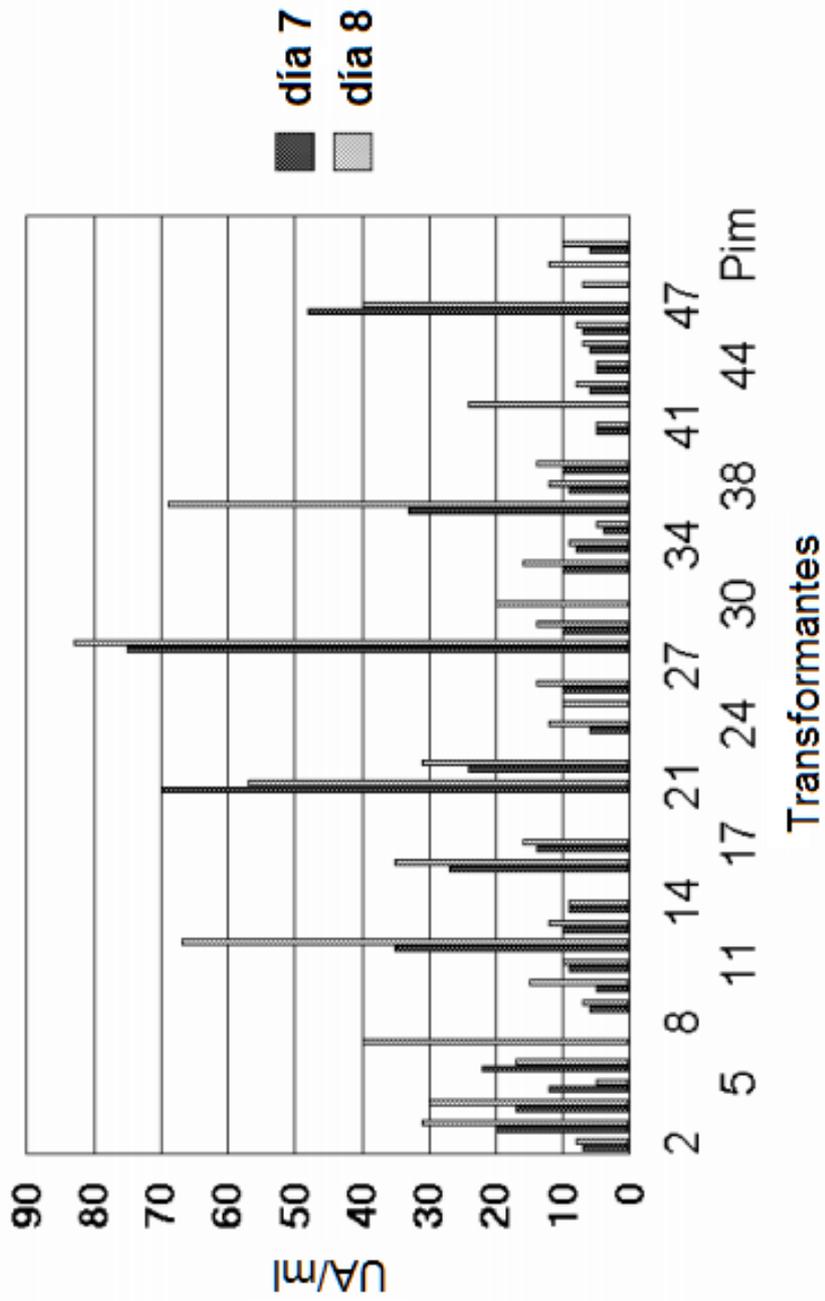


**Fig. 1**





**Fig. 3**



**Fig. 4**

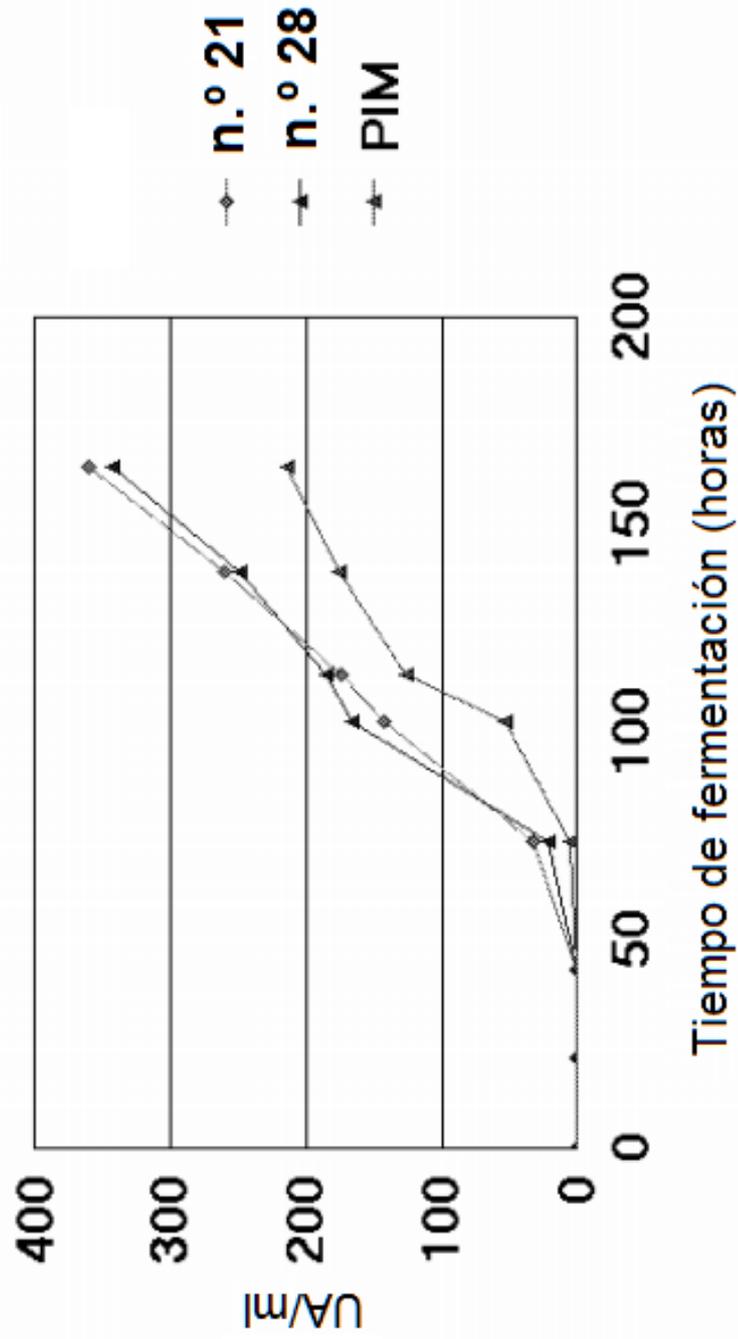
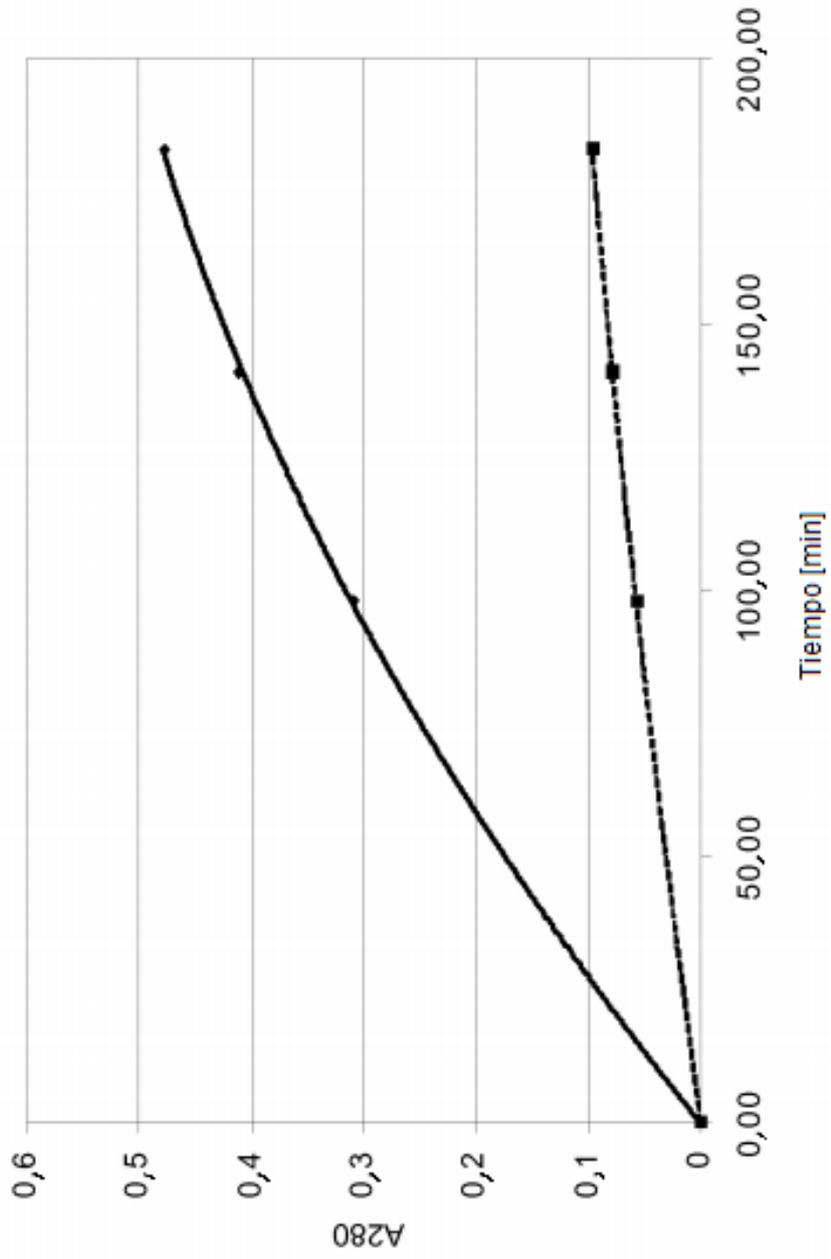


Fig. 5



**Fig. 6**

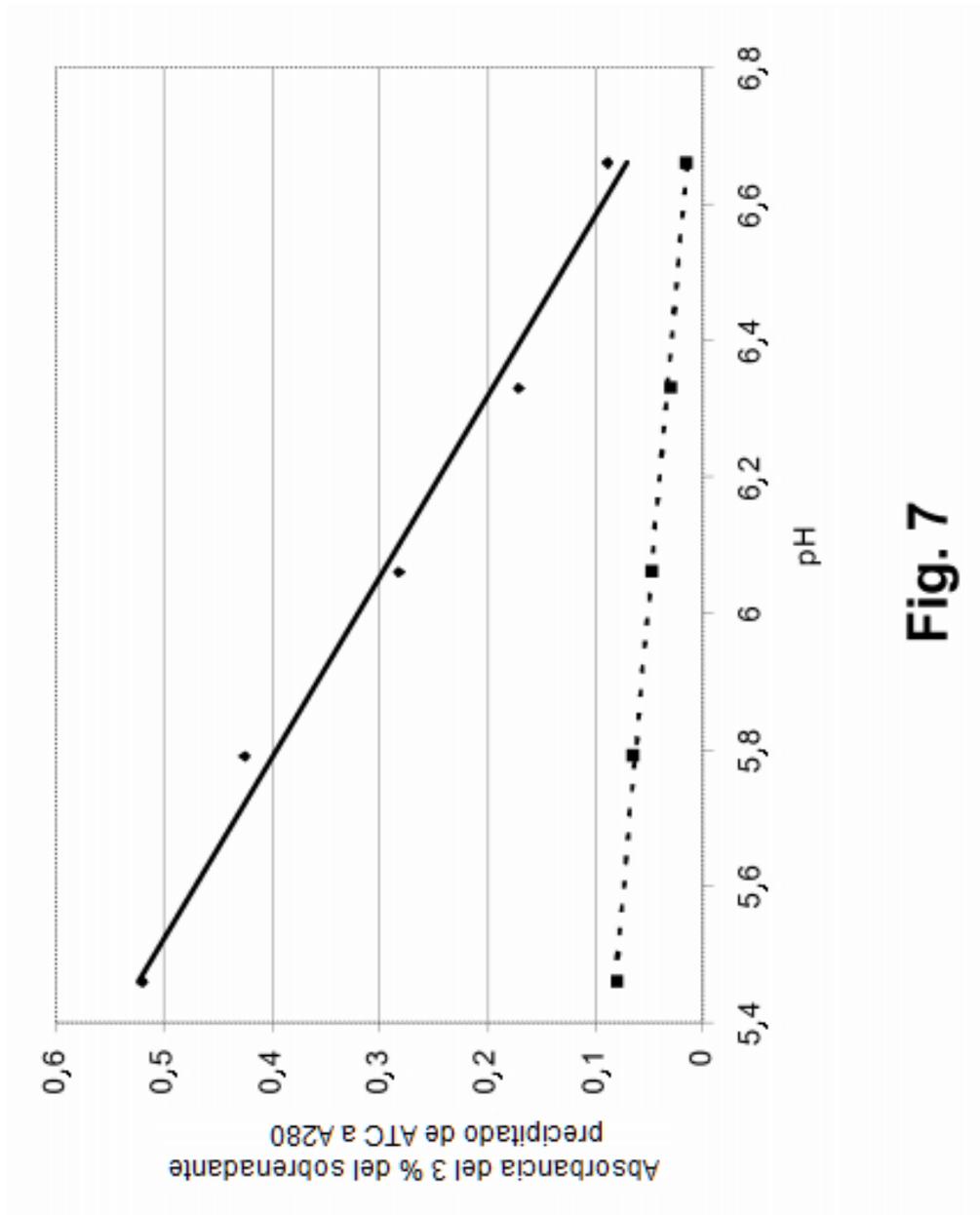


Fig. 7

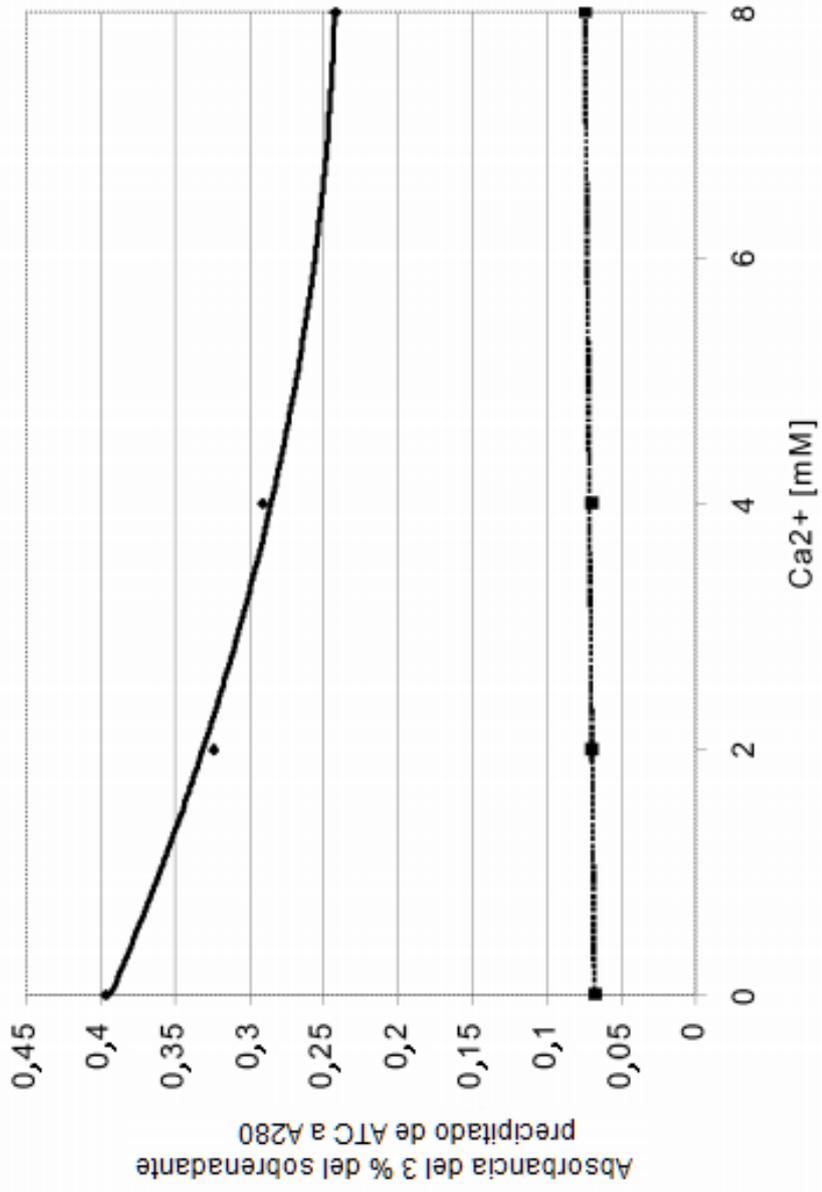


Fig. 8

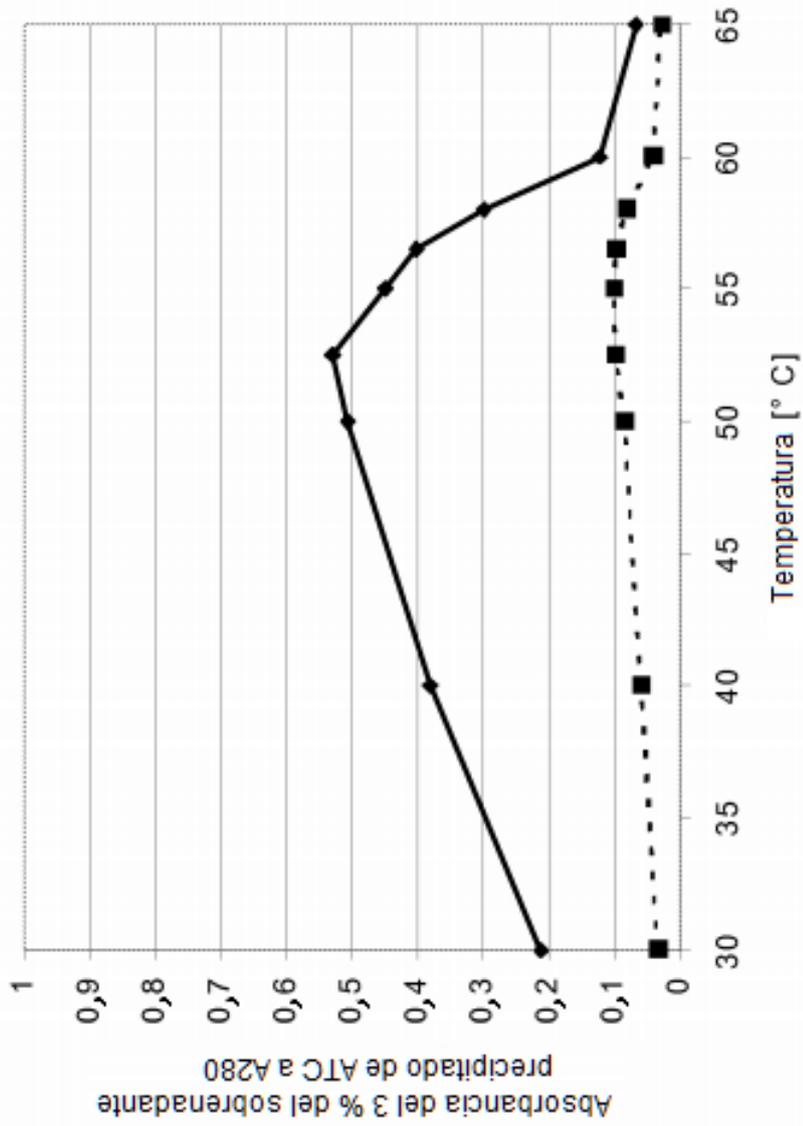
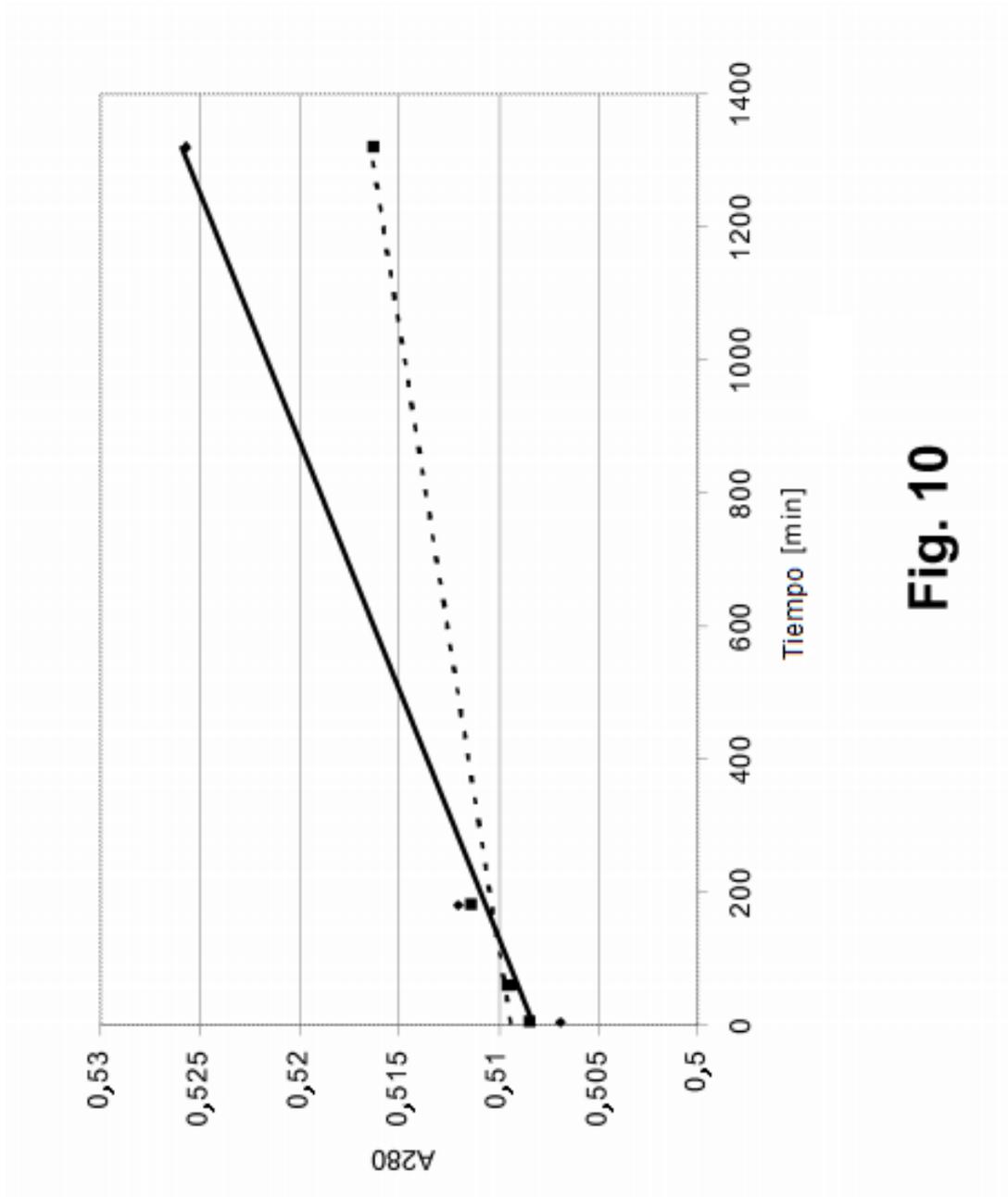


Fig. 9



**Fig. 10**