

## EXPRESIÓN DE QUIMOSINA DE CAMELLO RECOMBINANTE.

M. B. Pirola<sup>i</sup>, Y. Nosedá<sup>i</sup>, M. M. Adjad<sup>ii</sup>, R. Zandomeni<sup>iii</sup>, A. Amadio<sup>ii</sup>

<sup>i</sup>Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) Lácteos Rafaela.

<sup>ii</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Rafaela,

<sup>iii</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar.

[bpirola@inti.gov.ar](mailto:bpirola@inti.gov.ar)

### OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es obtener un sistema de producción de quimosina recombinante que permita ensayar y cuantificar su actividad, con miras futuras de realizar un mejoramiento en la actividad de la misma mediante técnicas de biología molecular. El objetivo específico del presente trabajo es expresar en forma soluble y activa quimosina de camello recombinante.

### DESCRIPCIÓN

La quimosina es una enzima proteolítica de peso molecular de 35 kDa aproximadamente que se utiliza en la elaboración de quesos ya que las micelas de caseína pueden coagular por acción de la misma. La quimosina se ha obtenido originariamente del abomaso de terneros jóvenes. En los últimos años, la biotecnología ha posibilitado su reemplazo por variantes recombinantes de la misma, es decir, se ha clonado el gen de la quimosina en microorganismos y éstos se han utilizado para su producción (Kappeler 2006, Jacob 2010). El gen utilizado es el de la quimosina de camello, la cual ha mostrado una mejor performance de formación de cuajo, con una proteólisis menor (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación entre diferentes quimosinas en cuanto a la actividad de coagulación y actividad proteolítica en función de la quimosina bovina.

	Actividad de coagulación de la leche (% de quimosina bovina)	Actividad proteolítica no específica (% de quimosina bovina)
Quimosina bovina	100	100
Quimosina de camello	170	25
Quimosina porcina	25	12

Fuente: Budtz 2011.

Para contar con la secuencia genética completa, el gen de quimosina de camello se sintetizó por completo y se clonó en el sistema de expresión pJexpress404 es cual es un sistema inducible por isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Para mejorar la expresión en *E. coli*, se realizó una optimización del uso de codones, es decir, se modificó la secuencia de ácido

desoxirribonucleico (ADN) para que codifique la misma proteína, pero usa codones que son más frecuentes en *E. coli*. A su vez, se le agregó un *tag* de histidinas para posibilitar su purificación por cromatografía de afinidad.

El sistema de expresión correspondiente a *E. coli* permite la expresión de la enzima recombinante en grandes cantidades, pero esta sobreexpresión conlleva a la formación de cuerpos de inclusión que contienen casi exclusivamente la enzima recombinante.

La proteína recombinante se expresó mediante la inducción de cultivos de la bacteria transformada en medio de cultivo Luria Bertani (LB) mediante el agregado de IPTG e incubando durante 4 y 24 horas a 37 °C (Zhang, 1991).

Luego de la inducción de la expresión se cosecharon las células por centrifugación a 5000 rpm, 4 °C durante 15 min. Al *pellet* celular se lo resuspendió en buffer 50 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl. Las células se lisaron en sonicador mediante 5 pulsos de 30 s de ultrasonido a potencia 5. Luego se centrifugó nuevamente separando de esta manera la fracción soluble de la insoluble (Wingfield, 1995).

Se analizó la expresión y pureza de la proteína mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (PAGE- SDS) al 12%.

Se evaluó el poder coagulante según norma ISO – FIL 157A-2007, corroborando así que la enzima tiene o no actividad coagulante (si se expresa y procesa en forma activa).

### RESULTADOS

En cultivos inducidos durante 24 h se observaron cantidades importantes de quimosina recombinante. Análisis posteriores mostraron que el alto nivel de expresión resultó en la formación de cuerpos de inclusión, los cuales contienen casi exclusivamente la proteína recombinante (Figura 1).

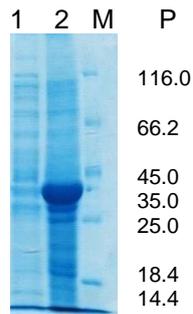


Figura 1: PAGE-SDS 12%. Calle 1: fracción soluble luego de lisis celular. Calle 2: Fracción insoluble luego de lisis celular. M: marcadores de peso molecular Thermo. P: Peso Molecular.

Sobre los cuerpos de inclusión se ensayaron diferentes metodologías de redisolución, como el agregado de urea y posterior diálisis (Figura 2). También se ensayaron metodologías de lavado y purificación de cuerpos de inclusión utilizando PMSF, Tritón X-100 y N-Lauril sarkosina (Narciandi 1991) (Figura 3).

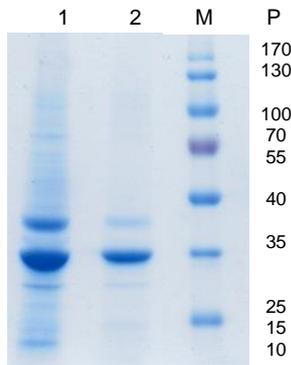


Figura 2: PAGE-SDS 12%. Calle 1: fracción insoluble luego de lisis celular. Calle 2: fracción soluble luego de tratamiento con urea y diálisis. M: marcadores de peso molecular marca . P: Peso Molecular.

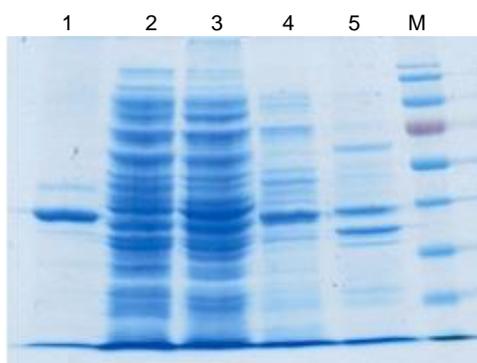


Figura 3: PAGE-SDS 12%. Calle 1: referencia quimosina de camello. Calle 2: fracción soluble luego de lisis celular. Calle 3: fracción soluble luego de lavado de cuerpos de inclusión. Calle 4: solubilización de cuerpos de inclusión. Calle 5: fracción insoluble luego de solubilización de cuerpos de inclusión. M: marcadores de peso molecular marca. P: Peso Molecular.

Las fracciones solubles obtenidas luego de estos tratamientos resultaron no ser activas.

En cuanto a las muestras inducidas durante 4 horas la expresión fue mucho menor que a 24 h (no mostrado). Sin embargo, sobre los extractos solubles luego de la lisis celular por ultrasonido se realizaron ensayos de actividad coagulante y se observó poder coagulante sobre una de las fracciones. Esto puede deberse a la presencia de enzima soluble que no forma cuerpos de inclusión luego de dicho tiempo inducción dado que no se presenta sobreexpresión.

## CONCLUSIONES

No ha sido posible expresar en forma soluble y activa quimosina de camello recombinante luego de 24 horas de inducción. Actualmente se están realizando ensayos para maximizar la obtención de proteína en forma soluble y activa modificando los tiempos de inducción, la temperatura y las concentraciones de IPTG.

## BIBLIOGRAFIA

- Budtz, P., Rahbek-Nielsen, H., Van Den Brink, J., Kappeler, S., Farah Z. (2011). Método de producción de quimosina no bovina y uso de la misma. Patente Internacional. <http://patentados.com/patente/metodo-produccion-quimosina-no-bovina-uso-misma/>
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2010). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14-33.
- Kappeler, S.R., Van den Brink, H.(J.)M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhán, Z., Hansen, E.B., Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel Chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 647–654.
- Mohanty, A.K., Mukhopadhyay, U.K., Grover, S., Batish, V.K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17, 205–217.
- Narciandi, R.E, Quiñones, Y., Morales, J., Torrens, I., Herrera, L. (1992). Obtención de quimosina bovina expresada en forma de cuerpos de inclusión insolubles en *Escherichia coli*. *Biología Aplicada*, 8, 48-54.
- Wingfield, P.T., Palmer, I. & Liang, S. (1995). Current Protocols in Protein Science. *Folding and purification of insoluble (Inclusion body) proteins from Escherichia coli*. (capítulos 6.5.1 – 6.5.27).
- Zhang, Y., Zhou, W., Liu, N., Yang, K. (1991). Expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol.*, 7(3),169-75.