



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Construcción de vectores para la expresión de un gen sintético de proquimosina de búfalo (*Bubalus bubalis*) por *Aspergillus niger*

Opción de titulación  
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

JUAN PABLO MORÁN TORRES

Dirigido por:

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

Presidente

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

Secretario

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO

Vocal

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

Suplente

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

Suplente

M.S.P. SERGIO PACHECO  
HERNÁNDEZ

Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA  
LOARCA PIÑA

Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

En quesería diversas proteasas pueden ser utilizadas durante la etapa de coagulación, aunque las quimosinas son las preferidas porque su elevada especificidad impide el desarrollo de sabores amargos indeseables. Debido a la escasez de quimosina bovina, desde hace 30 años ésta ha sido obtenida mediante tecnología de DNA recombinante. Sin embargo, en el reino animal existen quimosinas con propiedades interesantes que todavía no han sido explotadas, como la quimosina de búfalo, cuya proporción entre capacidad coagulante y actividad proteolítica general (C/P) es tres veces mayor que en la quimosina bovina. Para obtenerla por fermentación a través de *Aspergillus niger*, se construyó un dispositivo de expresión basado en un cDNA sintético de la proquimosina de búfalo fusionado al extremo-C truncado del ORF de la glucoamilasa A, y regulado a nivel transcripcional por el promotor inducible de *glaA*. En una versión alternativa se utilizó el promotor de la glucoamilasa B de *A. oryzae* con la intención de probar la expresión específicamente en estado sólido. Se obtuvieron 9 transformantes donde se comprobó la integración del vector con *PglaA* y 12 transformantes del vector con *PglaB*. Para limitar la degradación de la quimosina se diseñó un vector para la interrupción del gen de la proteasa nativa mayoritaria (*pepA*) pero no fue posible aislar la construcción correcta.

**(Palabras clave:** quimosina recombinante, péptido de fusión, promotor heterólogo)

## SUMMARY

In the cheesemaking process a variety of proteases could be used during the coagulation step, but chymosins are the preferred type because their high specificity prevents the development of unwanted bitterness during ripening. Due to limitations of bovine chymosin, it has been obtained by recombinant DNA technology since 30 years from now. However, some alternative gene sources of chymosin are still unexploited, such as buffalo chymosin, in which the ratio (C/P) between coagulating activity and general proteolytic activity is a three-fold superior than bovine chymosin; also, its use might be suitable for buffalo milk cheeses. Towards a genetic manipulation of *Aspergillus niger* for its expression, a synthetic buffalo prochymosin cDNA was fused to a truncated c-terminal glucoamylase A ORF, transcriptionally regulated by the *glaA* promoter for inducible expression. An alternative expression device was built with the glucoamylase B promoter from *A. oryzae*, in order to assess specific expression in solid-state fermentation. Nine transformants with a verified integration of *PglaA* vector were obtained, and 12 for the *PglaB* vector. A replacement vector for the major native protease (*pepA*) was designed in order to limit chymosin degradation, however, the correct construction could not be isolated.

**(Key words:** recombinant chymosin, fusion peptide, heterologous promoter)



## **AGRADECIMIENTOS**

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante el periodo 2015-2017, a Diana Karen Herrera de ADYTEC por proporcionarnos una muestra de quimosina recombinante, y al CONCyTEQ por el apoyo para la difusión de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA QUIMOSINA .....	2
2.2 FENÓMENOS PROTEOLÍTICOS EN QUESERÍA .....	5
2.3 EL SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN <i>Aspergillus niger</i> .....	9
2.3.1 CUELLOS DE BOTELLA.....	10
2.3.1.1 Dosis génica, transcripción y estabilidad del mRNA .....	10
2.3.1.2 Limitaciones del inicio de la traducción en adelante.....	12
2.3.1.3 Proteólisis extracelular .....	14
2.3.2 VECTORES DE EXPRESIÓN .....	15
2.3.3 GEN DE LA GLUCOAMILASA A.....	16
2.3.4 EL PROMOTOR DE LA GLUCOAMILASA B DE <i>Aspergillus oryzae</i> .....	19
2.4 TÉCNICAS MODERNAS DE CONSTRUCCIÓN DE VECTORES.....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
5.1 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	27
5.2 CONSERVAS.....	27
5.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> .....	28
5.4 GEN SINTÉTICO DE PROQUIMOSINA Y ARMONIZACIÓN DE CODONES ...	29
5.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES <i>IN SILICO</i> .....	30
5.6 EXTRACCIÓN DE DNA: pDNA DE <i>E. COLI</i> Y gDNA DE HONGOS .....	30
5.7 AISLAMIENTO DE GENES Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES.....	31
5.8 ANÁLISIS DE CLONAS: PCR DE COLONIA, DIGESTIÓN, Y SECUENCIACIÓN	33

5.9 TRANSFORMACIÓN DE <i>Aspergillus niger</i> .....	34
5.10 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.....	36
5.11 ENSAYOS DE EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	36
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
6.1 MODIFICACIÓN DEL cDNA DE PROQUIMOSINA DE BÚFALO .....	37
6.2 CONSTRUCCIÓN Y ANOTACIÓN DE VECTORES.....	39
6.2.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EN MEDIO LÍQUIDO (pGAM) .....	41
6.2.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EN MEDIO SÓLIDO (pPB:GAM).....	47
6.2.3 VECTOR DE SELECCIÓN (pPYRG) .....	54
6.2.4 VECTOR DE INTERRUPCIÓN (pΔPEPA:HPH) .....	57
6.3 CONFIRMACIÓN DE CONSTRUCCIONES MEDIANTE SECUENCIACIÓN ....	64
6.4 TRANSFORMACIÓN DE <i>Aspergillus niger</i> .....	69
6.5 ENSAYOS DE EXPRESIÓN .....	74
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>78</b>
8.1 MAPAS DE VECTORES .....	78
8.2 OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS .....	78
8.3 CONDICIONES DE PCR.....	80
8.4 ELECTROFOREOGRAMAS .....	81
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 . a) Estructura tridimensional de la quimosina bovina.....	4
Figura 2-2 . Zimógeno e isoformas de la quimosina .....	5
Figura 2-3 . (a) Micelas de caseína; (b) desestabilización proteolítica; (c) agregación.....	6
Figura 2-4 . Representación de la glucoamilasa Al.....	13
Figura 2-5 . Organización del gen <i>glaA</i> de <i>A. niger</i> : .....	18
Figura 2-6 . Promotor de <i>glaB</i> de <i>A. oryzae</i> .....	21
Figura 2-7 . Flujo del proceso para iVEC.....	23
Figura 5-1 . Estrategia para la construcción del vector de selección (a) y el vector de interrupción (b).....	32
Figura 5-2 . Estrategia para la construcción de los vectores de expresión.....	33
Figura 6-1 . Alineamiento del cDNA nativo y armonizado de la proquimosina de búfalo.....	39
Figura 6-2 . Clonas pCHYBb del #1-6.....	40
Figura 6-3 . <i>chyBb</i> liberado de pCHYBb mediante PCR.....	41
Figura 6-4 . Mapa del vector de expresión inducible por almidón crudo en medio líquido.....	42
Figura 6-5 . Amplificación del gen <i>glaA</i> usando DNA genómico.....	43
Figura 6-6 . PCR de colonia de pGAM.....	44
Figura 6-7 . pGAM linearizado de dos maneras mediante PCR.....	45
Figura 6-8 . Mapa del vector de expresión de proquimosina de búfalo inducible por almidón crudo en medio líquido.....	46
Figura 6-9 . PCR de colonia de pGAM:CHY.....	47
Figura 6-10 . Mapa del vector de expresión inducible por almidón gelatinizado en medio sólido.....	48
Figura 6-11 . PCR de colonia de pPB:GAM.....	49
Figura 6-12 . Patrón de digestión de cuatro clonas.....	50
Figura 6-13 . Clonas de pPB:GAM analizadas con tres distintas endonucleasas.....	51
Figura 6-14 . Mapa del vector de expresión de proquimosina de búfalo inducible por almidón gelatinizado en medio sólido.....	52
Figura 6-15 . PCR de colonia de pPB:GAM:CHYBb.....	53
Figura 6-16 . Patrón de digestión de tres clonas pPB:GAM:CHYBb.....	54
Figura 6-17 . Mapa del vector de selección basado en el gen <i>pyrG</i> de <i>A. niger</i> .....	55
Figura 6-18 . Aislamiento del gen <i>pyrG</i> .....	56
Figura 6-19 . PCR de colonia de pPYRG.....	56

Figura 6-20 . Patrones de digestión de 4 clonas pPYRG.....	57
Figura 6-21 . Mapa del vector de reemplazo del gen <i>pepA</i> basado en el marcador de selección para higromicina B.....	58
Figura 6-22 . (a) Amplificación de la unidad de expresión de higromicina B transferasa <i>hph</i> .....	59
Figura 6-23 . PCR de colonia para el vector p $\Delta$ PEPA:HPH.....	60
Figura 6-24 . Análisis de dos clonas p $\Delta$ PEPA:HPH.....	61
Figura 6-25 . Dos pares de primers fueron usados para amplificar una secuencia corta. ....	62
Figura 6-26 . PCR de colonia amplificando el inserto completo FHder.....	63
Figura 6-28 . Sustitución identificada en la clona pPB:GAM:CHYBb#6 que no pudo ser corregida manualmente.....	67
Figura 6-29 . Sustitución no corregible en la clona pPB:GAM:CHYBb#23 ubicada en la misma posición que en la clona homónima #6.....	67
Figura 6-30 . (a) Transformantes gamchy #1 al 6.....	72
Figura 6-31 . (a) Transformantes pbgamchy #1 a 9.....	73
Figura 6-32 . Ensayo de coagulación láctea. CHY-MAX M.....	74
Figura 8-1 . Mapa del vector pCHYBB donde fue clonado el cDNA sintético de la proquimosina de búfalo. ....	78
Figura 8-2 . Clona pGAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18_FWD.....	82
Figura 8-3 . Clona pGAM:CHYBb#11, secuencia SpPIG18_FWD.....	84
Figura 8-4 . Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18_FWD.....	86
Figura 8-5 . Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia SpPIG18_FWD.....	88
Figura 8-6 . Clona pGAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18_REV. ....	90
Figura 8-7 . Clona pGAM:CHYBb#11, secuencia SpPIG18_REV. ....	91
Figura 8-8 . Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia spPIG18_REV. ....	93
Figura 8-9 . Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia spPIG18_REV. ....	94
Figura 8-10 . Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia Pglab_F.....	96
Figura 8-11 . Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia Pglab_F. ....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1 . Valores de actividad de coagulación, proteólisis general, y su relación C/P para distintas proteasas.....	8
Tabla 5-1 . Sustituciones usadas para la armonización de codones .....	29
Tabla 8-1 . Condiciones de reacción para PCR.....	80

## 1. INTRODUCCIÓN

En el proceso de elaboración de queso, la coagulación láctea es un paso esencial y definitorio. Esta transformación es un elemento inseparable de los orígenes serendípicos del queso: cuando la leche, debido a su almacenamiento en odres o solamente por acidificación microbiana, se convirtió en cuajada. Desde entonces, por motivos culinarios o de conservación, maestros queseros y científicos de los productos lácteos han buscado en sus alrededores agentes para la coagulación de la leche (Harboe *et al.*, 2010).

Según su mecanismo, la coagulación de la leche se clasifica en tipo enzimático, tipo ácido, o en coagulación por temperatura y acidez. Actualmente, la coagulación enzimática es el mecanismo preferido debido a una mayor recuperación de la fracción nutritiva de la leche y a un potencial reológico más amplio de la cuajada (Fox *et al.*, 2017).

Las preparaciones acuosas de proteasas son conocidas como cuajos. Las fuentes de estas enzimas son diversas, aunque la mayoría son de uso regional y por lo tanto asociadas a ciertas variedades de queso (Vallejo, 2008). Algunas de estas proteasas son obtenidas de plantas, como de flores (*Cynara cardunculus*), y hojas (*Ficus carica*); otras son de origen fúngico como las proteasas de *Cryphonectria parasitica*, *Mucor pusillus* y *Rhizomucor miehei*, que ya son producidas industrialmente y han sido bien aceptadas por maestros queseros (Harboe *et al.*, 2010).

Las proteasas más reconocidas para la coagulación láctea son de origen animal, particularmente de mamíferos aún no destetados, de donde se obtiene cuajo compuesto principalmente por quimosina. Debido a su elevada especificidad, las quimosinas producen geles eficientemente, sin hidrolizar excesivamente las caseínas (Kumar *et al.*, 2010). Esta manifiesta superioridad catalítica ha sido aprovechada principalmente en quesos añejados, donde la etapa

de maduración presenta un vasto espacio de transformaciones bioquímicas (Sousa *et al.*, 2001).

Sin embargo, el suministro de cuajo animal ha disminuido debido a que la industria del ganado pierde dinero al sacrificar animales prematuramente. Para compensar la disponibilidad limitada del cuajo animal, obtener preparaciones más puras y evitar riesgos de agentes infecciosos presentes en el tejido animal, la tecnología de DNA recombinante es una excelente alternativa. Por medio de DNA recombinante han sido desarrollados microorganismos capaces de sintetizar quimosina indistinguible de su contraparte animal, que para el 2010 ya cubrían el 50% de las proteasas demandadas por la industria quesera, por lo que en diez años logró suplir al cuajo animal (Harboe *et al.*, 2010).

Aunque menos enérgica que a principios de los 90's, la carrera tecnológica por la obtención de quimosina recombinante sigue: antes se investigaba para establecer el más eficiente sistema de expresión; actualmente se buscan otras fuentes de quimosina, con propiedades catalíticas nuevas y superiores a las de la quimosina bovina. Un caso ejemplar es el de quimosina de camello (Kappeler *et al.*, 2006), similarmente, en este trabajo se propone la expresión de la quimosina de búfalo por *Aspergillus niger* para dos distintas condiciones de regulación.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA QUIMOSINA**

La quimosina es una enzima neonatal encontrada en el estómago de diversas especies de mamíferos que dependan de un abastecimiento postnatal de inmunoglobulinas, como las cabras, ovejas, corderos, cerdos, llamas, camellos, búfalos y humanos. Se especula que la función biológica de la quimosina es transformar un alimento líquido en sólido, en beneficio de la cría desdentada y todavía sin destetar; la resultante cuajada incrementa el tiempo de retención de la fracción nutritiva mayoritaria de la leche y de este modo mejorar su absorción. Por

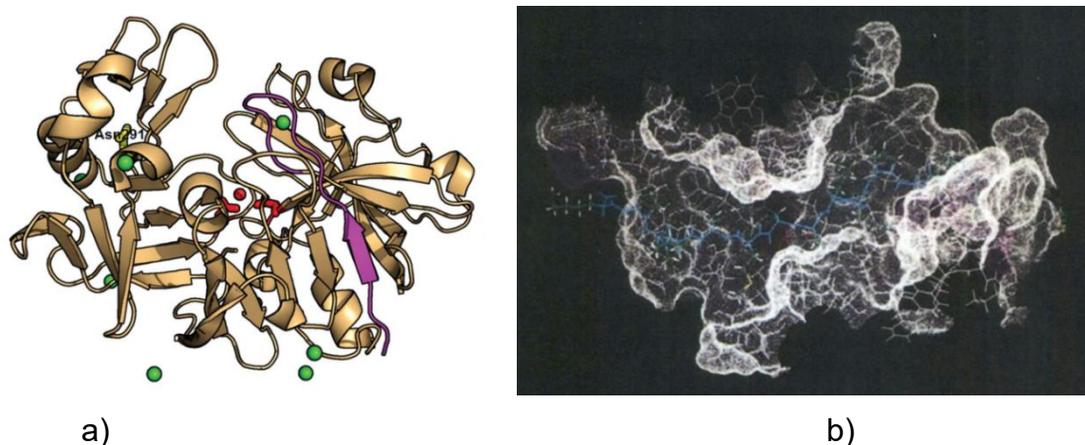
otro lado, la baja capacidad proteolítica de la quimosina ayuda a proteger a los péptidos de actividad biológica (Kumar *et al.*, 2010).

En etapas más avanzadas del desarrollo de los mamíferos, la secreción de quimosina es reemplazada por otra enzima digestiva, la pepsina, que en las preparaciones de cuajo bovino está presente hasta en un 12% (Sousa *et al.*, 2001; Harboe *et al.*, 2010).

La quimosina de origen bovino es la más extensamente caracterizada: se trata de una proteasa aspártica secretada por las células epiteliales del abomaso en tres isoformas denominadas A, B, y C. Las primeras dos son versiones alélicas que difieren en el aminoácido de la posición 244 (A=aspartato, B=glicina) (Moir *et al.*, 1982). La quimosina C, identificada también como pseudoquimosina, es un producto proteolítico de la quimosina A cuando se activa a pH menor a 2.0 (Ward *et al.*, 1990).

La quimosina es una proteína bilobulada, y cada lóbulo es un barril compuesto por laminas- $\beta$  que contienen un ácido aspártico (posiciones 32 y 215), los cuales apuntan hacia el eje de simetría formando el centro de la actividad biológica (Figura 2-1).

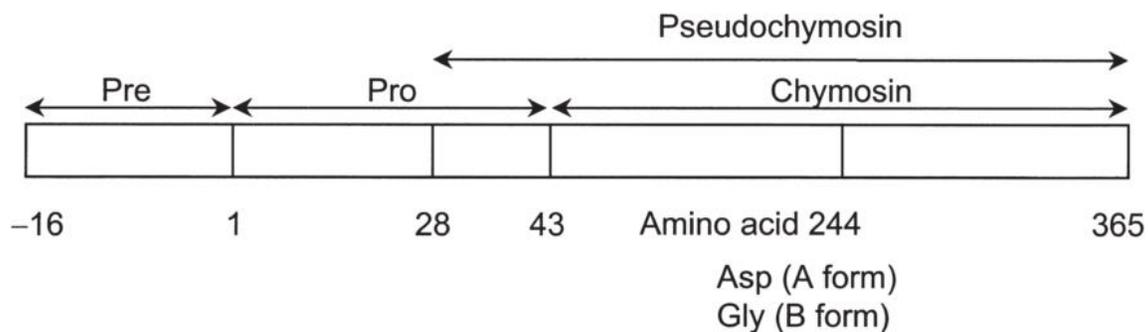
La actividad catalítica está mediada por el ataque nucleofílico de un átomo de hidrógeno proporcionado por una molécula de agua activada, sostenida por los dos residuos de ácido aspártico (Foltman, 1979) y bien asegurados por residuos vecinos, interacción que ha sido denominada 'el asidero del bombero'. Los residuos en este largo surco son los que definen la especificidad de una quimosina al sustrato y pueden reconocer una extensión de aminoácidos del His 98 a Lys 110 en la  $\kappa$ -caseína.



**Figura 2-1. a) Estructura tridimensional de la quimosina bovina deducida por Jensen *et al.* (2013). Glicosilación, en amarillo. Extremo-N, en magenta. Sitios activos y molécula de agua activada, en rojo. Iones de cloro usados en la cristalización, en verde. b) Acomodación del sustrato peptídico en el surco catalítico de la quimosina bovina (Fox *et al.*, 2017).**

En su forma madura, la quimosina bovina consta de 323 aminoácidos, pesa 35.6 kDa, y tiene dos sitios teóricos para N-glicosilación (252 y 291) (Jensen *et al.*, 2013). Un análisis del transcrito ha mostrado que la quimosina es secretada por células epiteliales en forma de zimógeno de 365 aminoácidos, con un propéptido N-terminal de 42 aminoácidos y un peso total de 40.77 kDa (Kumar *et al.*, 2010). El zimógeno es procesado de forma autocatalítica extracelularmente al alcanzar un pH menor a 5.0 (Foltman *et al.*, 1977). Como se verá más adelante, este peculiar mecanismo de autoprosesamiento ha servido para simplificar la expresión heteróloga bajo el concepto de proteína quimérica.

El transcrito completo contiene una región que codifica para un prepéptido de 16 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, para dirigir y facilitar la translocación a través de membranas celulares (Moir *et al.*, 1982; Beppu, 1983). En la Figura 2-2 se muestra un esquema del quimosina y sus formas precursoras.



**Figura 2-2. Zimógeno e isoformas de la quimosina; la versión B tiene en las posición 244 una glicina en vez de un aspartato. (Mohanty *et al.*, 1999).**

En la proquimosina de búfalo de río (*Bubalus bubalis*) el cDNA es idéntico en un 98.7% de las bases al de la proquimosina bovina, y la secuencia de aminoácidos es también muy parecida a la de la quimosina bovina, con un 97.8% de identidad (8 aminoácidos distintos), y un peso molecular de 35.6 kDa (Mohanty *et al.*, 2003).

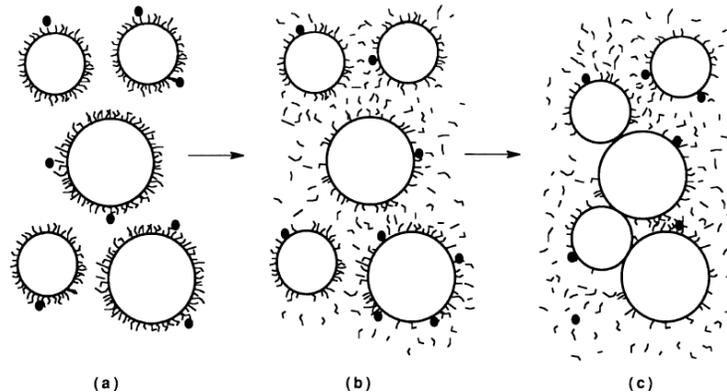
## 2.2 FENÓMENOS PROTEOLÍTICOS EN QUESERÍA

En quesería, las transformaciones más radicales son procesos proteolíticos. Primeramente, la cuajada es el producto obtenido cuando las proteínas sensibles al calcio son separadas del suero lácteo. Este proceso se logra mediante la coagulación, que se desarrolla en dos etapas: una desestabilización de las micelas de la leche y su agregación.

Las micelas de caseína se mantienen dispersas en el suero lácteo debido al impedimento estérico y a la superficie con polielectrolitos a base de  $\kappa$ -caseína, una pequeña proteína de 169 aminoácidos que apunta su extremo-C, altamente hidrofílico, O-glicosilado, y negativamente cargado, hacia el exterior; por el otro lado, su extremo-N, cargado positivamente, apunta hacia el interior y es estabilizado por medio de interacciones no covalentes. El resto de las caseínas en el núcleo de la micela se mantienen unidas por medio de *nanoclusters* de fosfato

de calcio, fosfopéptidos unidos a fosfato de calcio (Dalgleish & Corredig, 2012; Jensen *et al.*, 2013; Corredig & Salvatore, 2016).

El rol de la quimosina en la desestabilización enzimática implica la hidrólisis del extremo-C de la  $\kappa$ -caseína en la posición Phe 105 y Met 106, generando el caseinomacropéptido y la para- $\kappa$ -caseína. La primera molécula es soluble y se difunde en el suero lácteo, mientras que la segunda es un complejo hidrofóbico que al exponer suficientemente su superficie, colisiones seguidas de interacción hidrofóbica provocan la agregación (Dalgleish & Corredig, 2012). Tras esto último se obtiene un gel y después la separación del suero (Figura 2-3).



**Figura 2-3. (a) Micelas de caseína; (b) desestabilización proteolítica; (c) agregación (Dalgleish, 1993).**

Aunque se dice que la quimosina hidroliza específicamente el enlace 105-106 de la  $\kappa$ -caseína, también puede presentar actividad sobre otras caseínas (Corredig & Salvatore, 2016), como la  $\beta$ -caseína, siendo hidrolizada en el enlace Leu192-Tyr193 (Bijl *et al.*, 2014; Bansal *et al.*, 2009) durante la maduración; y la  $\alpha_{s1}$ -caseína en el enlace Phe23-Phe24 (Mulvihill & Fox, 1979; McSweeney *et al.*, 1993). En comparación con estos, la  $\alpha_{s2}$ -caseína y la para- $\kappa$ -caseína son resistentes a la degradación por quimosina residual (Bijl 2014).

Dichos efectos son relevantes porque en algunos quesos la quimosina residual puede ser hasta del 30% de la añadida, esto es especialmente relevante en quesos de pasta cocida a bajas temperaturas como el Cheddar y algunas

variedades de queso tipo Holandés. Por el contrario, en quesos en donde la cocción de la cuajada es intensa, como en el Mozzarella, Parmesano-Reggiano y quesos tipo Suizo, los agentes coagulantes son desnaturalizados totalmente y la proteólisis primaria es atribuida principalmente a la plasmina (Sousa *et al.*, 2001).

Sin embargo, hidrólisis residual excesiva es la causa de perfiles de sabor defectuosos, como el amargor (Harboe *et al.*, 2010). La percepción del amargor es atribuida a péptidos hidrofóbicos de 2 a 23 aminoácidos, como el fragmento  $\beta$ -CN(f193-209) producto de la hidrólisis primaria por la quimosina en soluciones modelo; en quesos Gouda y Cheddar este péptido ha sido asociado a defectos de amargor (Singh *et al.*, 2005). En cuanto a los defectos de textura por la acción primaria de la quimosina, se ha señalado la proteólisis primaria sobre la  $\alpha_{s1}$ -caseína, a través del enlace Phe23-Phe24, produce pérdida de firmeza (Lucey *et al.*, 2003).

Por lo anterior, la calidad de una proteasa para su uso en quesería se pondera mediante la proporción entre su capacidad para coagular (C) y su actividad proteolítica general (P). La quimosina bovina es la proteasa de referencia, con un valor de  $C/P=1.0$ . Este índice sirve para describir qué tan eficientemente se pueden obtener cuajadas sin degradar extensamente las caseínas: usando el  $C/P$  como criterio, una proteasa podría destacar incluso si su actividad proteolítica es mayor que la de la quimosina bovina, siempre y cuando la actividad de coagulación láctea sea lo suficientemente elevada para volver al  $C/P$  mayor a 1.0; en este caso la actividad proteolítica se mitigaría porque teóricamente la elevada capacidad de coagulación permitiría añadir menor cantidad de enzima. Los índices  $C/P$  de distintas proteasas en condiciones estándar se muestran en la Tabla 2-1.

**Tabla 2-1. Valores de actividad de coagulación, proteólisis general, y su relación C/P para distintas proteasas. (Kappeler *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2003). N.R.: no reportado**

Proteasa	Actividad de coagulación láctea	Actividad proteolítica general	C/P
Pepsina bovina A	124	2731	0.05
Proteasa de <i>Mucor miehei</i>	19	149	0.1
Proteasa de <i>Mucor pusillus</i>	33	147	0.2
Quimosina bovina recombinante	100	100	1.0
<b>Quimosina de búfalo</b>	<b>N.R.</b>	<b>N.R.</b>	<b>3.0</b>
Quimosina de cerdo	25	12	2.1
Quimosina de camello recombinante	170	25	6.8

Mohanty *et al.* (2003) reportaron que el índice C/P para la quimosina de búfalo es de 3.0 y afirmaron que la industria láctea que procesa leche de búfala demanda quimosina de búfalo. Ahmed *et al.* (2013) encontraron que el rendimiento de la cuajada producida por quimosina de búfalo era superior (32.21%) al de cuajo bovino comercial de Christian Hansen (29.87%); además, aquel fue más eficiente en coagular la leche de búfala que la leche de vaca, por lo que la quimosina de búfalo podría tener un nicho de mercado en los quesos elaborados con leche de búfala, como el tradicional *mozzarella di buffala campana* con denominación de origen protegida, que actualmente se coagula con cuajo animal (Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana, 2008).

Mohanty *et al.* (2003) hallaron que la actividad proteolítica de la quimosina de búfalo disminuía a temperaturas mayores (55 °C) que la quimosina bovina, coincidiendo parcialmente con lo que Vallejo *et al.* (2012) reportaron: la quimosina de búfalo tiene actividad residual de 30 °C a 40 °C con máxima a 37 °C, mientras que la bovina presentó un rango de 35 °C a 40 °C con mayor actividad a 40 °C. Por otro lado, Elagamy (2000) encontró que la quimosina de búfalo es menos termotolerante que la quimosina de camello, lo que podría ayudar a eliminar fácilmente su actividad residual, según las condiciones con las que sea tratada la cuajada.

### 2.3 EL SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *Aspergillus niger*

Un sistema de expresión para proteínas heterólogas engloba un organismo de expresión, una o más moléculas donadoras de DNA (vectores) que contengan secuencias para controlar el inicio de la transcripción de una secuencia codificante, señales para terminar la transcripción y procesar el transcrito inmaduro, secuencias para dirigir la localización en la célula, un marcador de selección, y usualmente un método de transfección.

El sistema de expresión de *Aspergillus niger* fue derivado de las técnicas de manipulación molecular para el estudio de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Ballance *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1989). El interés por *A.niger* resulta de la convergencia entre estos avances y el estado de explotación biotecnológica en el que se encuentra dicho ascomiceto desde hace 100 años que es utilizado para la obtención industrial de ácido cítrico, por lo que sus productos son considerados GRAS (Meyer *et al.*, 2015).

En la sección Nigri de los Aspergilli han sido expresados genes de eucariotas superiores como proquimosina bovina (Ward *et al.*, 1990), lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) (Archer *et al.*, 1990), profosfolipasa pancreática porcina A<sub>2</sub> (Roberts *et al.*, 1992), interleucina-6 (Broekhuijsen *et al.*, 1993), lactoferrina humana (Ward *et al.*, 1995), taumatina (Moralejo *et al.*, 1999), y hasta anticuerpos

humanizados (Ward *et al.*, 2004) y conglomerados de genes regulados de manera policistrónica (Schuetze & Meyer, 2017).

En la cepa *A. awamori* G12 es posible recuperar 5 g/l de glucoamilasa A (Ward, 1991) pero esta sobreexpresión es de un gen nativo y salvo por la cepa GC1HF1-3;dgr2 de Dunn-Coleman *et al.* (1990), no se han logrado niveles de secreción mayores a 1.2 g/l para genes heterólogos, mediante enfoques moleculares y mejoramiento de cepas por mutagénesis clásica (Bodie *et al.*, 1994); por lo general sólo se obtienen decenas de miligramos por litro (Gouka *et al.*, 1997a). En los pocos estudios realizados en condiciones isogénicas han sido identificados algunos posibles cuellos de botella en la ruta de gen a proteína.

### 2.3.1 CUELLOS DE BOTELLA

#### 2.3.1.1 Dosis génica, transcripción y estabilidad del mRNA

A diferencia de *S. cerevisiae*, en el género de los *Aspergilli* repetidamente se ha descrito una falta de correlación entre el número de copias de las integraciones y los niveles finales de expresión (Cullen *et al.*, 1987; Ward *et al.*, 1990; Tsuchiya *et al.*, 1993), sin embargo, en el caso de una colección de transformantes con el gen HEWL, las mayores eficiencias de secreción coincidían con múltiples integraciones en un solo locus (Jeenes *et al.*, 1994).

Por otro lado, los niveles de mRNA sí suelen ser dependientes del número de copia y el sitio de integración, pero como lo observaron Ward *et al.* (1990), el mRNA de un gen heterólogo (*chy*) puede encontrarse en niveles superiores que los de un gen nativo (*glaA*), y el nivel final de expresión ser drásticamente inferior; en contraste, un mRNA quimérico (*glaA-chy*) puede encontrarse en niveles inferiores que el gen nativo (*glaA*) y expresarse por encima del mRNA recombinante simple. Esta diferencia pudiera ser efecto de una mayor eficiencia tanto del inicio de la traducción como de eventos post-traduccionales.

Para las unidades de expresión heteróloga se utilizan promotores altamente eficientes y éstas se integran en múltiples copias, por lo tanto los niveles de mRNA

heterólogos no son un factor limitante (Gouka *et al.*, 1997a). Al comparar la expresión de genes heterólogos no-fúngicos y genes heterólogos fúngicos en *Aspergillus awamori*, en transformantes de una sola copia integrada en el locus de *pyrG*, Gouka *et al.* (1996a) encontraron que los niveles de proteína eran de 100 a 1000 veces menores para los genes no fúngicos que en los fúngicos. Las diferencias en la transcripción y estabilidad de los transcritos no eran la única causa ya que los niveles estacionarios de mRNA eran menores en los genes no fúngicos, por solo 4 a 8 veces.

Se descubrió, además, que los transcritos de un gen *aglA* de *Cyamopsis tetragonoloba* en su secuencia nativa eran indetectables (Northern blot) o se encontraban incompletos, sin embargo eran encontrados completos para una versión de origen sintético con una preferencia de codones más cercana a la de *A. awamori*. Ensayos de transcripción en el núcleo indicaron que el inicio de transcripción de estos mRNA era eficiente, por lo tanto, el inicio de la transcripción es únicamente dependiente de las secuencias promotoras o del sitio de integración; sin embargo, la subsecuente elongación, maduración, exportación, y exposición del mRNA al citoplasma, podría estar comprometida por secuencias extranjeras (Gouka *et al.*, 1996a).

El procesamiento del mRNA podrá ser mejorado utilizando preferencias de codones homólogas para evitar señales crípticas de terminación que poliadenilen prematuramente. Esto fue mostrado por Gouka *et al.* (1997b) al caracterizar el mRNA incompleto de *aglA* y encontrarlo truncado río abajo de un punto en la secuencia que aunque no contenía el consenso de terminación AAUAAA, sí era una región rica en AU que la secuencia sintética no tenía.

A pesar de que la fusión de péptidos nativos a péptidos heterólogos no logra igualar los niveles de mRNA a los del péptido nativo, generalmente sí incrementa los niveles con respecto a una expresión directa del péptido heterólogo (Gouka *et al.*, 1997b).

### 2.3.1.2 Limitaciones del inicio de la traducción en adelante

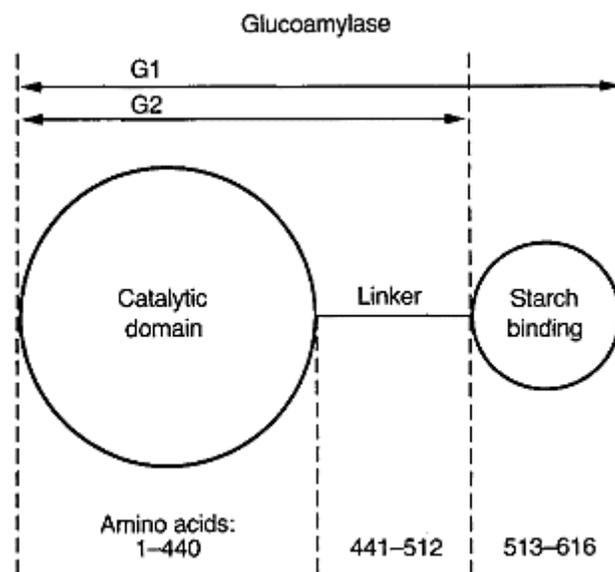
Dado que los niveles de mRNA no correlacionan con la proteína obtenida, el inicio de la traducción, elongación, translocación, plegamiento, decoración, y secreción de los polipéptidos heterólogos son los procesos mayormente limitantes.

En cuanto a la translocación y localización, las secuencias del péptido señal sirven para dirigir los productos heterólogos hacia determinados organelos o hacia la ruta secretoria, proceso cotraduccional que comienza en el retículo endoplásmico (ER). El péptido señal es reconocido por la proteína SRP, unido, y llevado al punto de anclaje en la membrana del ER, donde se disocian y el péptido nascente entra al lumen para ser escoltado por la chaperona BiP (Gouka *et al.*, 1997a). A partir de aquí comienza el proceso de maduración: las enzimas encargadas del plegamiento son llamadas foldasas y catalizan isomerizaciones y formación de puentes disulfuro, mientras que las proteínas chaperonas median el plegamiento por vías no catalíticas y previenen interacciones aberrantes entre proteínas (Conesa *et al.*, 2001).

En el ER, los polipéptidos se convierten en glicoproteínas por medio de ciclos de glicosilación, deglicosilación y reglicosilación. Aquellas proteínas que no son correctamente plegadas se incorporan a la ruta de la respuesta a la proteína no doblada (UPR) (Meyer *et al.*, 2015). En cambio, las proteínas correctamente plegadas son reconocidas por el sistema de chaperonas calnexina/reticulina, y son transportadas en vesículas al aparato de Golgi para modificar los glicanos y añadir otros. Finalmente son llevados nuevamente en vesículas hasta a la membrana celular para coalescer y secretarse (Bartnicki-García, 1991).

El conocimiento exacto de estos procesos aún es difuso, pero su limitación para la obtención de proteínas recombinantes ha sido empíricamente mitigada al ligar la proteína heteróloga al extremo-C de un polipéptido nativo conservando el marco de lectura abierto. A esta estrategia se le llama de péptido de fusión, péptido quiméricos o de proteína acarreadora.

En *A. niger* y *A. awamori*, la proteína nativa más usada y estudiada para casos de secreción es la glucoamilasa A (Nunberg *et al.*, 1984; Fowler *et al.*, 1990; Verdoes *et al.*, 1994; Ganzlin & Rinas, 2007). Como se muestra en la Figura 2-4, la glucoamilasa A consiste en tres dominios, el catalítico, el puente O-glicosilado, y el dominio de unión al sustrato. Se especula que agregar una proteína nativa en el extremo-N de la proteína recombinante antepone una cara familiar para al mecanismo celular y así translocar más fácilmente al ER, plegar con más naturalidad y prevenir la degradación. Algunos estudios han utilizado la proteína completa (Contreras *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1990) y obtenido aumentos del 10X a 200X. Otros, presuntamente para inducir un plegamiento más independiente, han utilizado secuencias truncas próximas al final del dominio O-glicosilado, y obtenido aumentos de expresión del 20X (Jeenes *et al.*, 1993) al 200X (Gouka *et al.*, 1997b), usando péptidos de 498 y 514 aminoácidos respectivamente.



**Figura 2-4. Representación de la glucoamilasa A (Archer & Wood, 1995). No se muestra el péptido señal.**

La separación del péptido de fusión puede ocurrir de manera controlada por una endoproteasa tipo KEX2p (Conesa *et al.*, 2001) que reconoce los péptidos lisina y arginina como en la secuencia del péptido pre- (NVISKR) de la

glucoamilasa A (Meyer *et al.*, 2010); también puede separarse autocatalíticamente como en el caso de la proquimosina a pH de 4.0.

### 2.3.1.3 Proteólisis extracelular

La degradación de los productos recombinantes debido a proteasas es bien reconocida como problemática para los rendimientos (van den Hombergh *et al.*, 1997a; Ward *et al.*, 2012), especialmente en la fase autolítica del crecimiento (Koutinas *et al.*, 2003). Sin embargo, no todas las proteínas heterologas son susceptibles a la degradación, como HEWL, donde fermentaciones en lote de hasta 25 días muestran cinéticas de producción creciente (Jeenes *et al.*, 1993).

Braaksma & Punt (2008) comentado sobre los enfoques para reducir la actividad proteolítica extracelular: el más sencillo, aunque menos eficiente en fermentaciones industriales, es el establecimiento de condiciones de fermentación, específicamente pH, control de metabolitos de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. Proteasas como aspergillopepsina A y B se expresan específicamente en medio ácido (pH 4 a 5) y pueden ser reprimidas en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno como NH<sub>4</sub> o urea sin ser desreprimida su expresión por la presencia de proteína degradable en el medio (Jarai & Buxton, 1994; van den Hombergh *et al.*, 1997b; Siala *et al.*, 2012). La morfología también impacta en la actividad proteolítica extracelular, limitándose en crecimiento como pellets y aumentando en crecimiento filamentoso libre (Xu *et al.*, 2000).

Otra opción es el desarrollo de cepas mutantes, mediante la interrupción o el silenciamiento de genes responsables de proteasas prominentes, como se ha hecho repetidamente con el gen *pepA* que codifica la aspergillopepsina A, responsable hasta del 85% de la actividad proteolítica (Mattern *et al.*, 1992); Berka *et al.* (1990) lo hicieron por vez primera mediante reemplazo genético con recombinación homóloga. Igualmente, puede ser logrado para las proteasas alcalinas, serina-proteasas, proteasas glutámicas, metalo-proteasas, o bien interrumpiendo genes regulatorios como el *priT*, un gen capaz de abatir la expresión de proteasas hasta un 80% (Punt *et al.*, 2008).

### 2.3.2 VECTORES DE EXPRESIÓN

Como los vectores de clonación, los vectores de expresión incluyen secuencias para el mantenimiento y selección en un huésped intermediario como *E. coli* con el fin de facilitar la manipulación en el proceso de construcción y propagación (Ausubel 2000). Meyer *et al.* (2010) reconocen tres tipos de vectores de expresión para hongos filamentosos:

Vector tipo I: las secuencias de genes heterólogos, generalmente en forma de cDNA, son flanqueadas río arriba y río abajo por secuencias de regulación transcripcionales suficientemente caracterizadas. Los promotores pueden ser inducibles o constitutivos; en *A. niger* los más representativos son el promotor del gen de *glaA* y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpdA* de *A. nidulans*), respectivamente. Entre los primeros también se ha usado el de la inulinasa (*inuE*) de *A. niger* (Yuan *et al.*, 2006), la aspergillopesina B (*pepB*) y la 1,4- $\beta$ -endoxilanasas (*exlA*) de *A. awamori* (Gouka *et al.*, 1996b; Cardoza *et al.*, 2003), el del gen alcohol deshidrogenasa (*alcA*) de *A. nidulans*, y el de la takaamilasa de (*amyB*) de *A. oryzae*; entre los segundos están el del gen *trpC* de *A. nidulans* involucrado en la síntesis de triptófano, y el TEF1- $\alpha$ , factor de elongación traduccional de *A. oryzae* (Zhang & An, 2010). Las secuencias terminadoras contienen señales para la terminación y poliadenilación, y como no son determinantes para el inicio de la transcripción, se han usado indistintamente las del gen *trpC* y *glaA* (Meyer *et al.*, 2010).

Vector tipo II: además de las secuencias del vector tipo I, entre el final del promotor y el primer codón del gen heterólogo se agrega un péptido señal. Los péptidos señal son secuencias cortas que dirigen a una proteína madura a su destino dentro o fuera de la célula, ya sea en un organelo, o una vacuola para la externalización; al translocar la membrana celular, el péptido señal es retirado por medio de un complejo de peptidasas (Palomares *et al.*, 2004). Para la secreción, este péptido señal es indispensable y en vectores de expresión normalmente se emplean péptidos señal homólogos, aquellos de las proteínas más secretadas y

estudiadas (Archer & Wood, 1995), como *glaA*. Sin embargo, en *A. niger* han sido funcionales los péptidos señal originales de la preproquimosina y de HEWL (Cullen *et al.*, 1987; Jeenes *et al.*, 1993).

Vector tipo III: se trata de los mismos componentes que el vector tipo II pero con un péptido de fusión. Estos vectores son construidos con el ORF de una proteína nativa bien secretada y caracterizada como describieron Gouka *et al.*, (1997b) para la glucoamilasa A (Figura 2-4).

### 2.3.3 GEN DE LA GLUCOAMILASA A

Para construir un vector de expresión tipo III regulado transcripcionalmente por el gen *glaA* de *A. niger* y fusionado a la proteína que codifica, conviene conocer la organización del gen de la glucoamilasa A. La glucoamilasa A es una 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolasa (EC 3.2.1.3), exoenzima con actividad sobre el extremo no reductor de la amilosa y amilopectina, de los que se obtienen unidades de D-glucosa.

En el genoma de *Aspergillus niger* solo hay una copia del gen *glaA* (Boel *et al.*, 1984), y el sitio de iniciación de la transcripción comienza aproximadamente 50 pb rio arriba del codón de inicio y el sitio de poliadenilación comienza 124 pb rio abajo del codón de terminación.

El cDNA de 1,923 nt codifica para 640 aminoácidos que corresponden a la proteína inmadura, que durante la secreción pierde un péptido señal de 18 aminoácidos y un péptido pre- de 6 que contienen la secuencia NVISKR para el reconocimiento de la endoproteasa KEX2. La glucoamilasa A madura es de 616 aminoácidos tiene los tres dominios que ya se mencionaron, catalítico (1-440), puente (441-512), y de unión al sustrato (513-616) para reconocer almidón granular (Figura 2-4). En la Figura 2-5 se muestra el ORF que consiste de 5 exones (gris) y 4 intrones (blanco); el quinto intrón de 169 pb que surge del *splicing* alternativo ocurre en una región del exón 5 y la lectura recomienza con el marco desplazado.

Nunberg *et al.*, (1984) desglosaron la estructura del gen de la glucoamilasa A de *A. awamori* y reportaron que la inducción sucedía a nivel transcripcional ya que encontraron mRNA en abundancia durante fermentaciones líquidas con almidón soluble como fuente de carbono, mientras se minimizaba con xilosa y glicerol. Los elementos funcionales dentro del promotor fueron descritos por Fowler *et al.* (1990), y propusieron abreviarlo de 1,966 pb a 562 pb, suficientes para que la inducción sirviera como en la cepa silvestre, y sólo 214 pb para iniciar la transcripción, indicativo de dos regiones, la más lejana para la unión de activadores, y la más cercana al ATG para la unión de factores de transcripción generales, como la caja TATAAT y la caja CAAT que se muestran en púrpura en la Figura 2-5.

Más adelante, Verdoes *et al.* (1994) sugirieron que la secuencia promotora debía abarcar al menos 814 pb para elevados niveles de expresión y demostraron que en la región de -517 pb había elementos *cis* de los que dependía la inducción, ya que al integrar múltiples copias de esta región su contraparte *trans* se consumía, manifestándose en una reducción de la expresión relativa al número de copias. Además, en estas regiones encontraron una elevada homología entre las secuencias promotoras de algunos genes amilolíticos de *A. oryzae*, *glaA* y *amyB*; en la Figura 2-5 se muestran en azul y con las siglas UAS (de upstream activating sequence), del A al F. Además, estas regiones se empalman con dos de los tres sitios putativos (CCCCGGG y CCGGGG) para la unión de CreA, factor de regulación en la represión por catabolitos de carbono.

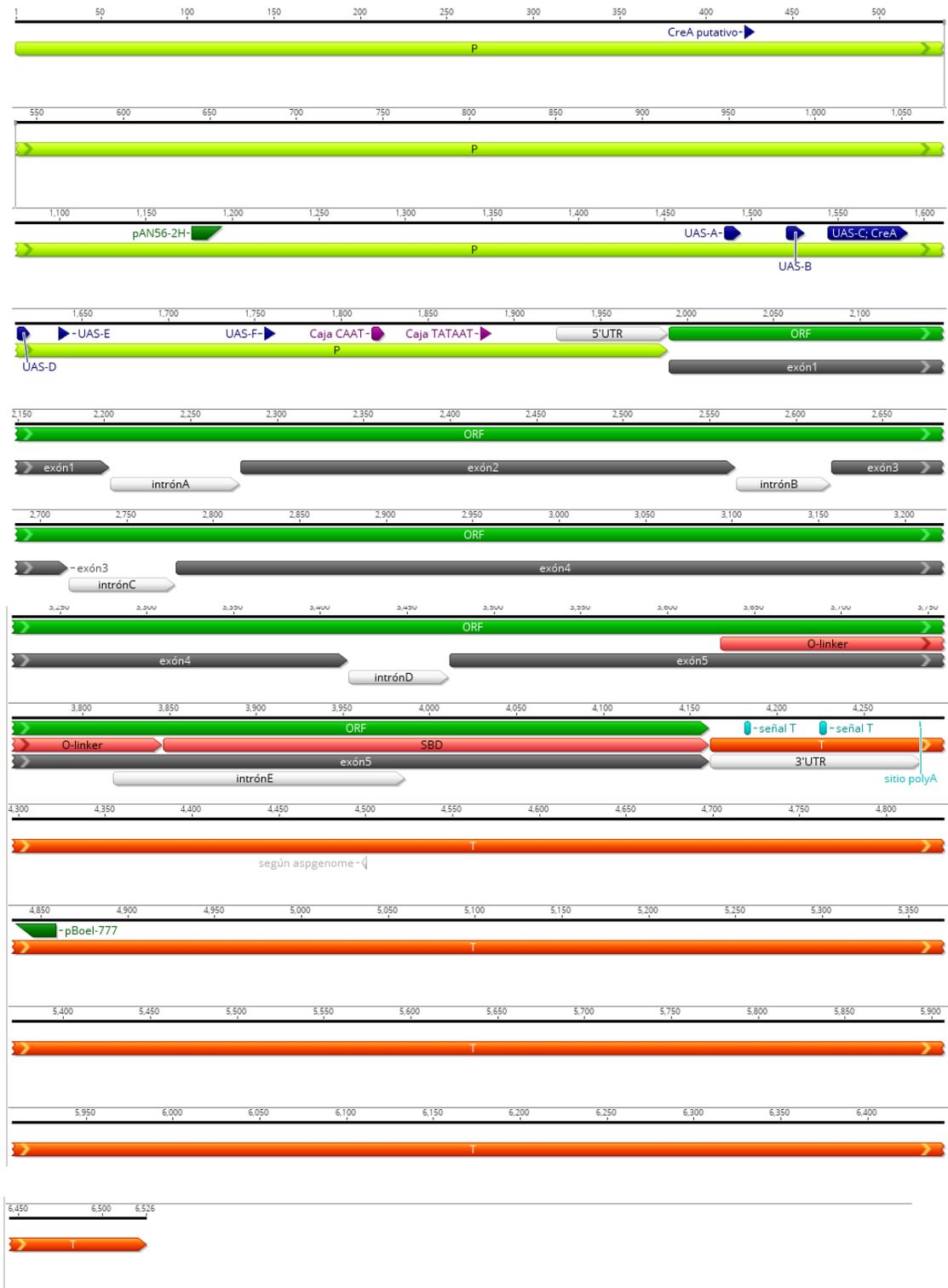


Figura 2-5. Organización del gen *glaA* de *A. niger*: promotor en verde, exones en gris, intrones en blanco, terminador en anaranjado, regiones funcionales del promotor en

púrpura (iniciación) y en azul (inducción); señal T se refiere a secuencias putativas para la señal de terminación; los *primers* muestran la extensión del gen 5' y 3' utilizada por algunos autores en sus vectores de expresión

#### 2.3.4 EL PROMOTOR DE LA GLUCOAMILASA B DE *Aspergillus oryzae*

En *A. oryzae* se expresan dos glucoamilasas distintas, una específicamente en medio sólido (*glaB*) y otra específicamente en medio sumergido (*glaA*) (Oda *et al.*, 2006). En medio sumergido *glaA* se expresa 12 veces más de lo que se expresa *glaB*, mientras que en medio sólido *glaB* se expresa 200 veces más que *glaA*. Dicho de otro modo, la máxima expresión de *glaA* (medio sumergido, almidón crudo) alcanza 879 U, y la máxima de *glaB* (medio sólido, almidón gelatinizado), alcanza 3843 U, 4.4 veces más (Ishida *et al.*, 1998). Esta expresión diferencial podría ser aprovechada para la obtención de proteínas recombinantes, y pocas veces ha sido considerada (Ishida *et al.*, 2006).

La importancia de *glaB* radica en que se han encontrado pocos genes expresados específicamente en medio sólido, por lo que su análisis ha contribuido ampliamente a comprender la regulación en este medio. La glucoamilasa B es una de las principales responsables de la sacarificación en el *koji* (Hata *et al.*, 1997).

Estructuralmente, la glucoamilasa B difiere de la A en que la primera carece de dominio de unión al sustrato, hecho que explica porqué es incapaz de hidrolizar el almidón crudo (Hata *et al.*, 1998). Dado que la glucoamilasa B no es más termoestable que la A, se piensa que los oligosacáridos sirven para aumentar la solubilidad en medio sólido y, cuando aumente la osmolaridad del ambiente como resultado de la liberación de glucosa, permanecer activa (Hata *et al.*, 1997).

Fisiológicamente, más allá de la inducción por la fuente de carbono (C) Ishida *et al.* (1998), estudiaron el efecto de tres factores más en la fermentación sólida (*koji*): la temperatura, la actividad de agua ( $A_w$ ), y las barreras físicas. La influencia de los primeros dos se manifestó en la cinética de expresión de un gen reportero, donde la máxima expresión coincidía con un despunte en la temperatura y una caída de  $A_w$ .

La influencia de estos factores físicos se investigó por separado y se encontró que en condiciones estándar fijas (cultivo en caja de petri con la misma fuente de carbono) se alcanzaba una máxima expresión a 42 °C, y a  $A_w=0.935$ . La barrera física fue investigada con membranas de distintos poros y se encontró que era mayor la expresión con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ . Finalmente se combinaron los cuatro factores en los niveles máximos de inducción y se obtuvo una expresión similar a la fermentación en *koji*

En el promotor de *glaB* no se encuentran los mismos elementos *cis* que en el gen de *glaA*, tanto de *A. oryzae* como de *A. niger*, y esto implica un sistema de regulación distinto. Ishida *et al.* (2000) identificaron tres regiones funcionales en la región promotora, A, B y C, como se muestra en la Figura 2-6. Encontraron que la región A (GAGAACTAAGAGAATGGCGGCACGGGC, subrayados los motivos putativos de elementos de choque térmico) era responsable del 99.5% de la inducción por los tres factores (C, T,  $A_w$ ), mientras que la región C (CCCGGAAATTAATACCGG), similar a algunas de genes amilolíticos de otros *Aspergillus*, es responsable del 88% de la expresión; la región B sólo afecta la represión por catabolitos de carbono. Particularmente de la región A, los elementos funcionales que determinaron la inducción son la caja C y el elemento de choque térmico 1.

En un estudio más moderno con ensayos de movilidad electroforética de extractos intracelulares y sondas de DNA, Hisada *et al.* (2013) determinaron tres regiones *cis* en donde se unen proteínas activadoras para la inducción en medio sólido: H, S, y R. El último es encargado de la inducción por almidón, posiblemente una secuencia de unión de amyR. La región H es encargada de la inducción por estrés de choque térmico, y no coincide con la región A antes reportada, pero puede ser debido a que éstas también afectan el proceso de unión del factor. Finalmente, sugieren que la región S funciona como elemento *cis* para la regulación ante baja  $A_w$ .



**Figura 2-6. Promotor de *glaB* de *A. oryzae*. Las regiones funcionales H, S, y R se muestran en azul.**

A pesar de que no existe un ortólogo putativo de *glaB* en *A. niger*, nosotros pensamos que los transfactores para la expresión en medio sólido por almidón podrían estar presentes y servir para aumentar la expresión en un sistema de fermentación en estado sólido.

#### 2.4 TÉCNICAS MODERNAS DE CONSTRUCCIÓN DE VECTORES

Las técnicas para la construcción de moléculas híbridas de DNA se han simplificado drásticamente desde las basadas en endonucleasas específicas y ligasas. Actualmente existen dos tendencias principales para clonación y construcción, aquellas que son dependientes de secuencias específicas y las que no (Nakayama & Shimamoto, 2014). Las primeras incluyen las técnicas tradicionales y otras más sofisticadas como Golden Gate. Golden Gate se fundamenta en un corte enzimático mediado por endonucleasas tipo IIS que producen extremos pegajosos en un sitio distal al sitio de reconocimiento. Su principal ventaja es que se obtienen unidades de expresión sin cicatrices, ya que los extremos colgantes no están relacionados con los sitios de corte porque éste es unidireccional (Engler & Marillonnet, 2014).

Todas las técnicas independientes de secuencias específicas tienen en común, sin embargo, que las secuencias que van a ser unidas requieren homología en sus extremos, por lo tanto, el diseño de construcciones no es tan versátil como el que resulta de endonucleasas. Las técnicas más confiables de este género son las que llevan un tratamiento enzimático de polimerización lineal,

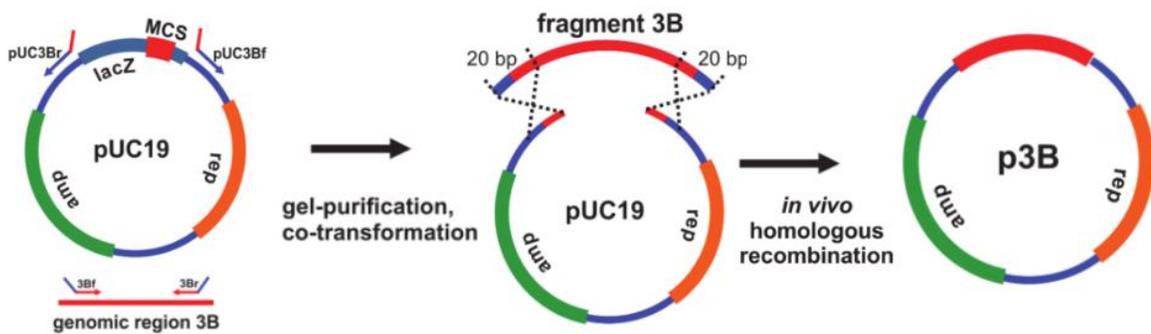
como SLIC (sequence and ligase independent cloning) (Li & Elledge, 2012), Gibson (Gibson *et al.*, 2009), o el producto comercial In-Fusion, y suelen ser más costosas debido a los reactivos que consumen.

Las técnicas que dependen de la polimerización exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requieren menos reactivos pero pueden ser más susceptibles a mutaciones; no obstante, esta desventaja ha sido mitigada con la aparición de polimerasas de alta fidelidad. El concepto en común es la creación de *megaprimers* a partir de los genes que deseen clonarse o fusionarse, y posteriormente circularizar las moléculas con rondas de polimerización. Ejemplos de técnicas donde la reacción central es la PCR o polimerización lineal por polimerasa son OEP (Bryksin *et al.*, 2010), CPEC (Quan & Tian, 2009), QuickStep Cloning (Jajesniak & Wong, 2015), entre otras.

De acuerdo a distintos grupos de investigación (Kostylev *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015b; Beyer *et al.*, 2015; Jacobus & Gross, 2015; García-Nafría *et al.*, 2016), la técnica más simple y efectiva de clonación y construcción es la clonación *in vivo* por *E. coli* (iVEC) o sus variantes. Consiste en aprovechar la tendencia a recombinar secuencias homólogas en las cepas de *E. coli* utilizadas por la mayoría de los laboratorios de biología molecular. Lo escandaloso es que estas cepas son *recA*<sup>-</sup>, deficientes en su sistema de recombinación homóloga, precisamente para evitar rearrreglos indeseables en el pDNA. Sin embargo, es posible inducir un mecanismo alternativo de recombinación homóloga y aprovecharlo para que los rearrreglos produzcan las moléculas deseadas (Motohashi, 2017). Esta técnica es una adaptación de la construcción *in vivo* de múltiples partes por *S. cerevisiae* (Ma *et al.*, 1987), fue reportada hace más de 20 años pero ignorada (Jones *et al.*, 1991; Bubeck *et al.*, 1993), y a diferencia de la técnica *recombineering* no se necesitan cepas con los sistemas recombinantes especializados  $\lambda$  Red o RecET (Kostylev *et al.*, 2015).

Para lograr iVEC basta con ‘alimentar’ células competentes de *E. coli* (*recA*<sup>-</sup>), como DH5 $\alpha$ , con moléculas de DNA linearizadas, con homología de

aproximadamente 30 pb en los extremos que deseen fusionarse, y cotransformarlas. *E. coli* se encarga de recombinar, circularizar y cerrar covalentemente (Figura 2-7) (Jacobus & Gross, 2015). El proceso de linearización de vectores y aislamiento de insertos ha sido incluso realizado en una sola reacción de PCR (García-Nafría *et al.*, 2016). En la mayoría de las clonas se habrá favorecido la circularización de moléculas híbridas con extremos homólogos antes que la autocircularización de los vectores linearizados, sin embargo, el porcentaje de clonas negativas por esta razón puede reducirse destruyendo con la enzima *DpnI* el molde del vector si ha sido linearizado por PCR, y, todavía mejor, utilizando vectores con sistemas de selección positiva que por la presencia de genes suicidas (*ccdB* o *eco47IR*) se vuelven tóxicos al autocircularizarse.



**Figura 2-7.** Flujo del proceso para iVEC: linearizar vector de recepción, aislar gen, limpiar, cotransformar y recombinar (Jacobus & Gross, 2015).

SLiCE, por otro lado, parte de las mismas moléculas con extremos homólogos y depende de las mismas reacciones de recombinación pero *ex vivo*, al utilizar un extracto celular de *E. coli* producido *in domu*. Esta técnica es superior en la eficiencia (número de clonas) y precisión de la clonación (determinado por secuenciación) que iVEC, sin embargo, la obtención del extracto crudo requiere de más preparación y un detergente especializado no encontrado en todos los laboratorios de biología molecular (Motohashi, 2017).

Con iVEC es posible no sólo subclonar una gen a la vez, algunos autores (Jacobus & Gross, 2015) han obtenido eficiencias moderadas (60%) subclonado

dos moléculas simultáneamente, otros (Beyer *et al.*, 2015) han reportado que subclonar hasta tres genes con un eficiencia de 83% no es complicado, y cinco partes tampoco pero no mencionan la eficiencia; García-Nafría *et al.* (2016) fusionaron 5 partes (incluyendo vector) con 14% de eficiencia.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La quimosina de búfalo es tres veces superior a la quimosina bovina como agente coadyuvante en la coagulación láctea en quesería, y no ha sido expresada en *Aspergillus niger*, el organismo ideal para la obtención de esta enzima. Por esto se construyeron dispositivos de expresión para un gen sintético de proquimosina de búfalo utilizando dos distintas secuencias reguladoras de la transcripción, ya que promotores como el del gen *glaB* de *A. oryzae* podrían contribuir a la sobreexpresión de genes heterólogos en condiciones alternativas de fermentación. Para evitar secuencias superfluas y obtener fusiones absolutas de los genes involucrados, se utilizaron técnicas de construcción modernas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Construir vectores para un sistema de expresión de proquimosina de búfalo por *Aspergillus niger*, a saber: vector inducible en medio líquido (*PglaA*), vector inducible en medio sólido (*PglaB*), vector de selección (*pyrG*) y vector de interrupción ( $\Delta pepA$ ).

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener un gen sintético modificado de la proquimosina de búfalo
- Aislar los genes *glaA*, *PglaB*, *pyrG*, y flancos homólogos de *pepA*
- Clonar genes y ensamblar componentes de los vectores
- Transformar *Aspergillus niger* y aislar cepas prometedoras

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La propagación de DNA en plásmidos fue realizada por métodos convencionales (Asubel, 2003) en *Escherichia coli* TOP10 en LB. Medio Super nutritivo (SOB) fue a veces usado: 2.0 % de peptona, 0.5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM de KCl (J.T. Baker) y para SOC, 20 mM de glucosa (Golden Bell) fue añadida en frío.

Las cepas de mohos usadas fueron *A. niger* AB4.1 (*cspA1*, *pyrG*), *A. niger* N402 (*cspA1*) y *A. oryzae* WT. Para la propagación de esporas se utilizaron 25 ml de PDA (BD-DIFCO) en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Las esporas se cosecharon con 25 ml de una solución de Tween-80 al 0.05%, y contadas en cámara de Neubauer. El medio mínimo para *Aspergillus* (AMM) fue el de Cove (1966) con modificaciones: 10 g/l glucosa, 6 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.52 g/l KCl, 0.52 g/l MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 12 ml/l buffer de fosfatos 1 M, pH 6.8, minerales traza (500X: 2.2 g de ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1.1 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 g de MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 0.5 g de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.16 g de CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.16 g de CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 0.11 g de (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 5 g de EDTA, en 100 ml); y vitaminas (500X: 0.1 g/l de biotina, piridoxina-HCl, tiamina-HCl, riboflavina, ácido-p-aminobenzóico, y niacina). Para la versión sólida 1.8% de agar bacteriológico. AMM y PDA fueron suplementados con 10 mM de uridina y 10 mM uracilo cuando fuera requerido.

Para los ensayos de expresión preliminares se usó el medio de Gheshlaghi *et al.* (2005): 34 g/l almidón soluble (BD-DIFCO), 34 g/l de peptona (BD-DIFCO), 11.9 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J. T. Baker), 0.5 g/l de extracto de levadura (Sigma), 0.5 g/l de CaCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O (J. T. Baker) y 100 ml/l buffer de citrato de sodio 0.9 M pH 6.5.

### 5.2 CONSERVAS

Los plásmidos en *E. coli* fueron conservados a -20 °C y -80 °C, a partir de cultivos saturados por una noche y diluidos en un mismo tanto de una solución de

DMSO (Sigma D8418) al 7% (Ausubel, 2003). Todas las cepas de hongos fueron conservadas en tubos de agar oblicuo para su uso a corto plazo (3 semanas máximo). Para conservar esporas a largo plazo se utilizaron criotubos con 0.6 g de silica gel malla 28 estéril y anhidra, a los que se les añadió 150-200 ul de una suspensión concentrada de conidioesporas hecha con leche descremada al 7%.

### 5.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

Células quimocompetentes de *E. coli* TOP10 fueron preparadas según el método de Hanahan (1983) modificado por Tom Knight (OpenWetWare, 2013), usando la solución CCMB80 (80 mM de CaCl<sub>2</sub> (J.T. Baker), 20 mM de MnCl<sub>2</sub> (J.T. Baker), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (J.T. Baker), 10 mM de acetato de potasio (J.T. Baker) pH 7.0, 10% de glicerol (Meyer), y esterilizada por filtración. Un mililitro de cultivo saturado de *E. coli* TOP10 fue inoculado en 100 ml de SOB e incubado a 20 °C, 150 rpm, hasta una densidad óptica de  $A_{590nm}=0.4$ . Se helaron por 5 minutos y las células se cosecharon a 1600xg, 4 °C, 7 minutos, y desaceleración lenta. Tras desechar sobrenadante, la biomasa fue resuspendida con 2.5 ml de CCMB80 helada, y centrifugada a 1100xg, 5 °C, 5 minutos. Se resuspendió en 2.5 ml de CCMB80 y se dejó reposar en baño de hielo 30 minutos. Se repitió lo anterior y se resuspendió en 4 ml de CCMB80; alícuotas de 100 ul fueron congeladas y almacenadas -70 °C. Se transformó con 100 ng de pDNA ajustados en un volumen de 10 ul; las células competentes fueron descongeladas en hielo, y tras añadir la mezcla de transformación se dejaron reposar en hielo durante 25 minutos, seguidos de un choque térmico a 42 °C por 45 segundos. Para plásmidos cerrados, se omitió la etapa de regeneración con 250 ul de SOC a 37 °C, 1 hora, 150 rpm. La eficiencia de transformación fue estimada con el plásmido pUCP20GFP<sup>+</sup> (Loske *et al.*, 2011).

## 5.4 GEN SINTÉTICO DE PROQUIMOSINA Y ARMONIZACIÓN DE CODONES

El gen de proquimosina de búfalo (*Bubalus bubalis*) *chyBb* fue tomado de la secuencia del cDNA depositada en GenBank con el código de acceso AF177290. La adaptación de los codones a la preferencia de uso *Aspergillus niger* fue realizada según la teoría propuesta por Angov *et al.* (2008). Se omitió el uso de algoritmos y se modificó la secuencia a partir de la frecuencia de uso de codones para ambas especies, *Aspergillus niger* y *Bubalus bubalis*, tomadas del Codon Usage Database, publicada por el Kasuza DNA Research Institute a partir de datos tabulados del NCBI-GenBank (Kasuza, 2007a y b).

Con base en la frecuencia de uso de estas tablas, para ambas especies se asignó un valor de uso a cada codón por cada aminoácido que codifica según el código genético estándar, y se obtuvo la Tabla 5-1, donde un valor menor implica una mayor frecuencia de uso.

**Tabla 5-1. Sustituciones usadas para la armonización de codones. Se muestran sólo los aminoácidos que difieren entre las especies. Fondo negro, *Bubalus bubalis* y fondo blanco, *A. niger*.**

Frecuencia de uso (mayor a menor)		Leucina		Serina		Arginina		Valina		Prolina		Treonina		Aspartato	
		1	CTG	CTG	AGC	TCC	AGG	CGC	GTG	GTC	CCC	CCC	ACC	ACC	GAC
2	CTC	CTC	TCC	AGC	AGA	CGG	GTC	GTC	CCT	CCT	ACA	ACT	GAT	GAC	
3	CTT	TTG	TCT	TCT	CGC	CGT	GTT	GTT	CCA	CCG	ACT	ACG			
4	TTG	CTT	AGT	TCG	CGG	CGA	GTA	GTA	CCG	CCA	ACG	ACA			
5	CTA	CTA	TCA	TCA	CGA	AGA									
6	TTA	TTA	TCG	AGT	CGT	AGG									

La frecuencia de uso de *Bubalus bubalis* corresponde a la columna con fondo negro y la de *Aspergillus niger* a la columna con fondo blanco. A partir de esta

tabla se reemplazó cada codón en la secuencia nativa de proquimosina de búfalo por el correspondiente codón de *A. niger* con una frecuencia de uso equiparable según el valor asignado (1 a 6). El gen fue sintetizado *de novo* y clonado en el vector pCHYBb por el laboratorio T4 Oligo. Para facilitar la subclonación, el inserto fue flanqueado por sitios de restricción *Xba*I como se muestra en la Figura 8-1.

## 5.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES *IN SILICO*

Los vectores fueron diseñados y dibujados en el software Geneious 9.1.6. Las secuencias de los genes fueron tomadas de las bases de datos MycoCosm del Joint Genome Institute ([https://genome.jgi.doe.gov/Aspni\\_NRRL3\\_1/Aspni\\_NRRL3\\_1.home.html](https://genome.jgi.doe.gov/Aspni_NRRL3_1/Aspni_NRRL3_1.home.html)) para *A. niger* N402 y de AspGD (Cerqueira *et al.*, 2014) para *A. oryzae*. Los *primers* fueron diseñados de acuerdo a la temperatura de desnaturalización calculada tanto por el software Geneious 9.1.6 como por la calculadora de New England Biolabs según la polimerasa usada. El análisis de estructuras secundarias y dímeros fue hecho en el OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, 2017). En el caso de oligonucleótidos quiméricos, el cálculo sólo tomó en cuenta la región alineable que terminara en el extremo 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados y desalados por el laboratorio T4 Oligo.

## 5.6 EXTRACCIÓN DE DNA: pDNA DE *E. COLI* Y gDNA DE HONGOS

DNA plasmídico fue purificado utilizando los kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y QIAGEN-tip 500 (Qiagen). Para maxipreps utilizando columnas *spin* se utilizó el protocolo de Pronobis *et al.*, 2016. Para la purificación de DNA genómico de hongos se utilizó el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research), a partir de 150 mg de micelio fresco.

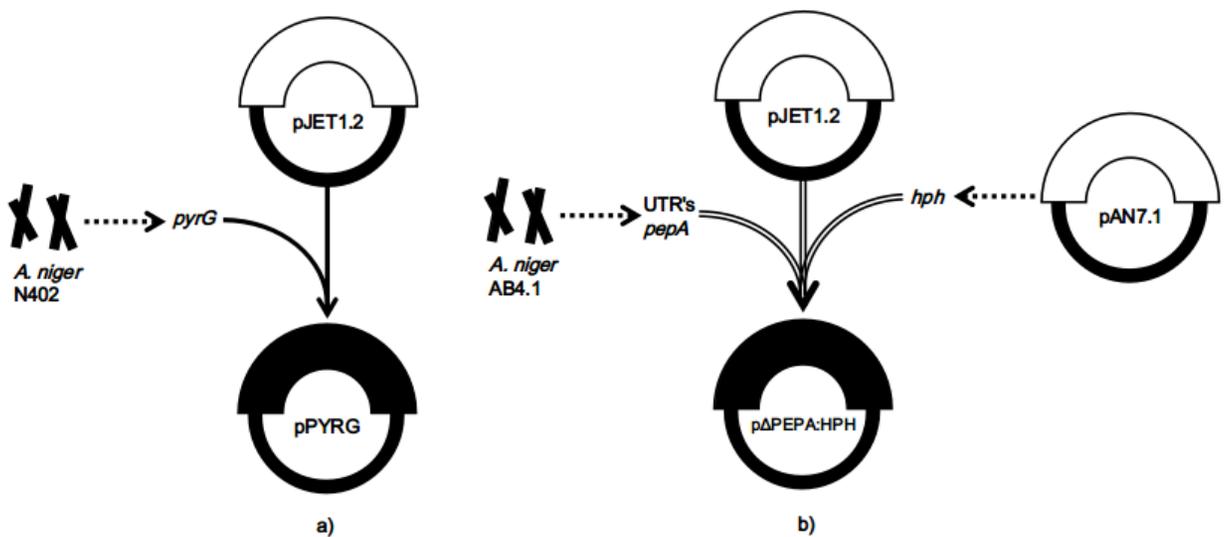
## 5.7 AISLAMIENTO DE GENES Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES

Los genes aislados fueron amplificados *in vitro* con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la polimerasa de alta fidelidad Q5® (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante: 1X de Buffer de reacción Q5, 200 µM de dNTP's, 0.5 µM de cada primer, y 0.02 U/µl de reacción de polimerasa. La temperatura de alineamiento (Ta) usada fue la sugerida por la calculadora en el sitio web del fabricante. La efectividad de los primers fue probada en reacciones preliminares de 5 a 10 µl, tras lo cual se escaló a reacciones de 55 µl, de este modo garantizando reproducibilidad ya que las reacciones fueron ejecutadas al menos por duplicado. Cuando el producto era específico, las reacciones fueron limpiadas cromatográficamente (PureLink®PCR Purification Kit) y el DNA fue eluido en un volumen de 50 µl, para obtener concentraciones de 30 a 80 ng/µl. En su defecto, los productos de PCR se aislaron del gel.

El ensamblaje fue mediado por recombinación *in vivo* en *E. coli* (iVEC) según Jacobus & Gross (2015) con modificaciones sugeridas por Beyer *et al.* (2015): los vectores fueron linearizados mediante PCR según las regiones que se desearan reemplazar, la mezcla tratada con 20 U de enzima *DpnI* (New England Biolabs) por 1 hora a 37 °C, y se mezclaron en proporción molar 1:2 de vector:inserto (300 ng de vector por cada 100 µl de células competentes). Los insertos fueron preparados para el ensamblaje mediante una homología de sus extremos con respecto al vector linealizado, de 25 hasta 50 pb. La mezcla de DNA se ajustó a un volumen de 10 µl y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se transformó en *E. coli* como se indicó anteriormente, incluyendo etapa de regeneración. Para la ensamblaje de cuatro partes la proporción vector insertos fue 1:2:2:2, vector:insertos, y la mezcla de DNA fue de 32 µl.

En la Figura 5-1 y Figura 5-2 se muestra la estrategia seguida para la construcción de los seis vectores, y en la Tabla 8-1 del anexo se indican las condiciones de reacción para cada componente del ensamblaje.

Los genes *glaA* y *pyrG* fueron aislados de gel y purificados cromatográficamente (PureLink®PCR Purification Kit). Posteriormente fueron clonados en el vector pJET1.2 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante (20 µl de reacción, 50 ng de vector y una proporción molar vector:inserto de 1:3), usando la ligasa T4 (400 U) y el buffer (1X) de New England Biolabs; la reacción se incubó 1 hora a 25 °C, seguida de 16 horas a 4 °C, y finalizando con otra hora a 25 °C. Cien microlitros de células competentes fueron transformadas con 8 µl de la reacción de ligación.



**Figura 5-1. Estrategia para la construcción del vector de selección (a) y el vector de interrupción (b). Doble x, DNA cromosomal; líneas sólidas, clonación convencional; líneas punteadas, amplificación por PCR; líneas dobles, iVEC.**

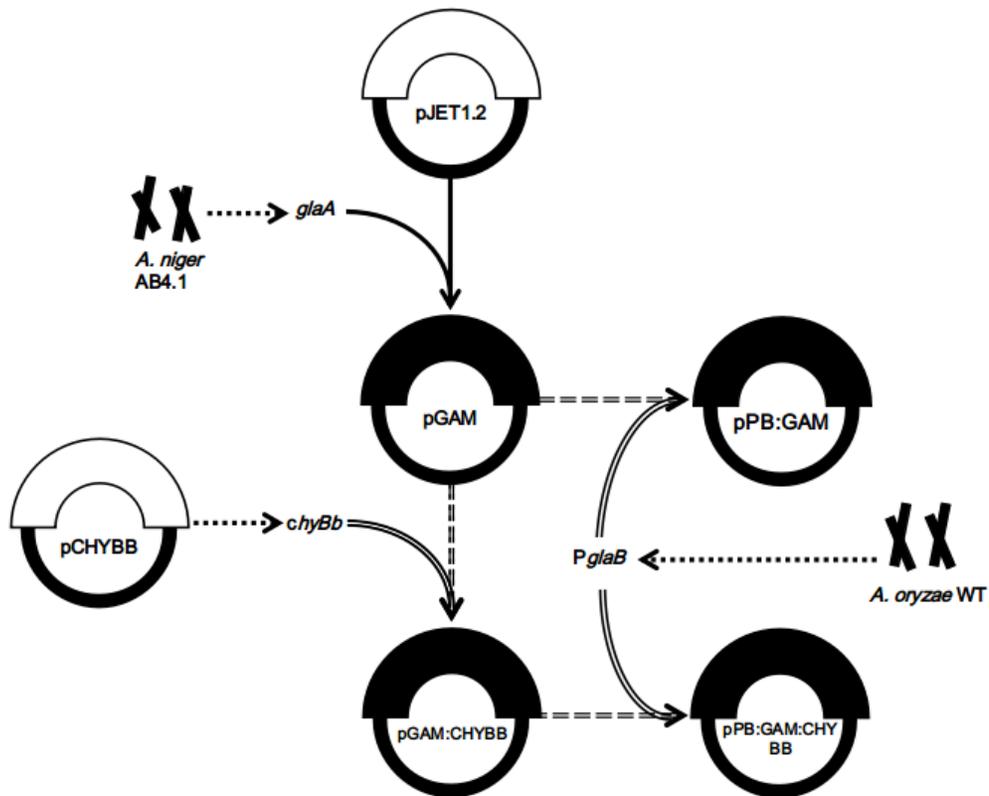


Figura 5-2. Estrategia para la construcción de los vectores de expresión. Doble x, DNA cromosomal; líneas sólidas, clonación convencional; líneas punteadas, amplificación por PCR; líneas dobles, iVEC.

## 5.8 ANÁLISIS DE CLONAS: PCR DE COLONIA, DIGESTIÓN, Y SECUENCIACIÓN

Se analizaron máximo 26 colonias por cada ronda de selección utilizando el siguiente protocolo: las presuntas clonas positivas se subcultivaron en cajas de medio selectivo fresco y, tras 12 horas a 37 °C, se dispersó una asada en 15 µl de una solución de TE y 0.1% de Triton X-100. Se lisó a 96 °C por 5 minutos, se refrigeró por 20 minutos, y se centrifugó por 40 segundos. Se amplificó el inserto, o regiones específicas del inserto (según se especifique en los resultados), utilizando 1 µl de este sobrenadante en 5 µl de master mix de polimerasa OneTaq® en las concentraciones que indica el fabricante (New England Biolabs): 1X de OneTaq standard buffer, 200 µM de dNTP's, 0.2 µM de cada primer, y 0.025

U/μl de reacción de polimerasa. Los productos de la reacción se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa. Una selección de clonas positiva fue digerida con distintas endonucleasas y analizadas electroforéticamente en geles de agarosa.

De las clonas que mostraron los patrones de digestión esperados, se eligieron dos al azar que fueron secuenciadas parcialmente por el método Sanger en el laboratorio LANGEBIO del CINVESTAV. Las secuencias verificadas por secuenciación fueron la coyuntura del péptido de fusión, la región del terminador de *glaA*, y el promotor de *glaB* utilizando respectivamente los primers SpPIG18\_F, SpPIG18\_R, y P*glaB*\_F. La construcción del vector de selección fue verificada a través de su funcionalidad.

## 5.9 TRANSFORMACIÓN DE *Aspergillus niger*

Dado que en los vectores de expresión no se incluyó un marcador de selección, las transformantes de la cepa *A. niger* AB4.1 fueron seleccionadas al contra transformar los vectores de expresión con el vector de selección pPYRG, que confiere la prototrofia mediante el gen nativo *pyrG* que codifica para la orotidina 5'-fosfato deshidrogenasa (Meyer *et al.*, 2010).

La transformación mediada por ondas de choque fue realizada según Gómez-Lim *et al.*, (2015) con adaptaciones para el generador electrohidráulico MEXILIT sugeridas por Dra. Blanca Millán: 150 ondas de choque por muestra, frecuencia de 0.5 Hz, intensidad de 20 Kv y la temperatura del agua se mantuvo de acuerdo al ambiente ( $T \approx 25$  °C); las muestras consistieron en 500 μl de una suspensión de  $2 \times 10^5$  conidiosporas por ml de medio mínimo, y una concentración de vector de selección de 50 μg/ml. Esta suspensión fue contenida en una pipeta de transferencia de polietileno (41 mm de largo y 13 mm de diámetro), sellada manualmente con calor. Se probaron dos niveles en la proporción de vector seleccionable:vector de expresión de 1:1 y 1:3 para los cuatro vectores, y se incluyó un tratamiento control (suspensión de conidiosporas sin DNA), que sirvió

a manera de control negativo al sembrar en medio mínimo y a manera de control de viabilidad al sembrar en medio suplementado. Se incluyeron dos réplicas.

La transformación por fusión de protoplastos fue realizada según Debets & Bos (1986) para la obtención de protoplastos y de acuerdo a Wernars *et al.* (1985) para la transformación. Brevemente, medio completo para *Aspergillus* suplementado con uridina (1 mg/ml), vitaminas, y casaminoácidos fueron inoculados con  $8 \times 10^8$  conidiosporas recién cosechadas y cultivados de 18-20 horas. El micelio (10 g peso húmedo) fue filtrado y lavado usando miracloth y digerido en una solución lítica compuesta por 10 mg/ml de enzimas de *Trichoderma harzianum* (Sigma #L1412), 10 mg/ml de albúmina sérica bovina, NaCl 0.7 M y de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M a pH de 5.8. La digestión fue estimada microscópicamente hasta observar de 50 a 100 protoplastos en un campo. Los protoplastos fueron filtrados con miracloth y precipitados y lavados secuencialmente primero con una solución de KCl 0.7 M y después dos veces con una solución (S/C) de sorbitol 1M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Los protoplastos fueron resuspendidos a una concentración de  $1 \times 10^8$ /ml, de los que 200  $\mu$ l fueron usados para cada tratamiento, añadiendo 2.2  $\mu$ g de DNA seleccionable (pPYRG) y un exceso molar de 2.8x (pPB:GAM:CHYBb) a 4.4x (pGAM:CHYBb) para los vectores de expresión. Tras mezclar se añadieron 50  $\mu$ l de buffer PEG 6000 (USB Corporation) al 25%, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, y Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Se reposó en hielo por 20 minutos, y luego se agregaron 2 ml del mismo buffer seguido de reposo de 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 4 ml de la solución S/C, se precipitaron los protoplastos y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de la solución S/C. De este volumen se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l y 25  $\mu$ l, se ajustaron hasta 1 ml con la solución S/C, y se añadieron a 4 ml de medio mínimo para *Aspergillus* previamente fundido (sacarosa 1.0 M y 1.3% de agar). Esta mezcla fue esparcida en placas de medio mínimo para *Aspergillus* (sacarosa 0.2 M y 1.8 % de agar) e incubados de tres a cuatro días a 31 °C.

## 5.10 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES

Las colonias positivas fueron resembradas en medio mínimo fresco sólido. Se analizó la presencia del vector de expresión utilizando PCR de colonia. Primero se hizo un miniprep de DNA genómico (Liu *et al.*, 2000): un pequeño pellet obtenido en un cultivo de 48 se desgarró manualmente con un palillo y 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 400 mM [pH 8.0], EDTA 60 mM [pH 8.0], NaCl 150 mM, 1% SDS) y se dejó incubar 10 minutos. Se añadió buffer de acetato de sodio 3 M pH 4.8 seguido del mismo volumen de isopropanol, lavado con 300 µl de etanol al 70%, y resuspendido en 50 µl de buffer TE. Se tomaron 0.5 µl como fuente de DNA molde para reacciones de 10 µl de PCR usando polimerasa *OneTaq* (New England Biolabs), bajo los siguiente parámetros de reacción: D<sub>0</sub>=94 °C, 3'; (D=94 °C, 20"; A=49-52 °C, 30"; E=62 °C, 1'30")x35; E<sub>f</sub>=68 °C, 7'. Los primers usados fueron SpPIGF18\_FWD & REV (T<sub>a</sub>=49 °C); Fus\_Chyl\_F & R (T<sub>a</sub>=52 °C) para amplificar el gen *chyBb*; y Pglab\_F & R (T<sub>a</sub>=52 °C) para amplificar el promotor de *glab*.

## 5.11 ENSAYOS DE EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Para el vector inducible en medio líquido, las transformantes positivas fueron fermentadas en 2 ml con el medio de Gheshlaghi y se siguió una prueba de coagulación de acuerdo a Emtage *et al.* (1983): el sobrenadante fue diluido 1/2 y 1/10 utilizando 100 mM de buffer de fosfatos 6.0 y 50 µl fueron añadidos a 200 µl de sustrato de leche descremada (12% de leche Svelty®, 25 mM de buffer de fosfatos pH 6.0, y 20 mM de CaCl<sub>2</sub>). Se mezclaron las diluciones y el sobrenadante directo con el sustrato en una microplaca de 96 pozos y fue incubada a 40 °C por al menos 15 minutos. La placa fue volteada sobre papel absorbente y se dejó drenar antes de fotografiar. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de la cepa N402, y como estándar se utilizó quimosina recombinante de camello (CHY-MAX M®, Chr. Hansen).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 MODIFICACIÓN DEL cDNA DE PROQUIMOSINA DE BÚFALO

El proceso de secreción de proteínas recombinantes en hongos ha logrado impulsarse mediante péptidos de fusión pero los niveles de recuperación aún son inferiores a los de proteínas fúngicas. Angov *et al.* (2008) demostraron que un enfoque de modificación en el uso de codones, denominado *armonización*, incrementaba los rendimientos de proteínas recombinantes en *E. coli* a través del plegamiento. Dado que éste es un proceso cotraduccional, estos investigadores hallaron que el uso de codones sinónimos no es arbitrario sino que la traducción de codones infrecuentes sucede a la de regiones altamente estructuradas, de modo que a lo largo de tramos de traducción lenta, el péptido naciente es pausadamente procesado en el citoplasma para favorecer su correcto plegamiento.

La metodología de Angov *et al.* (2008) aprovecha el amplio conocimiento de estructuras terciarias en las proteínas de *E. coli* para utilizar los mismos codones frecuentemente usados en regiones inestructuradas, en los motivos inestructurados de la proteína heteróloga identificados empíricamente. En este trabajo, en cambio, la sustitución de codones se hizo en la cadena polipeptídica completa al igualar la frecuencia de uso a nivel genómico del organismo donador con la del organismo de expresión.

El alineamiento de la secuencia de cDNA nativa y modificada se muestra en la Figura 6-1. Se hicieron 156 modificaciones, conservándose en un 85.8% la identidad de la secuencia original. A pesar de que el motivo consensuado como señal de poliadenilación en eucariotas superiores (AAUAAA) no suele encontrarse en hongos, se procuró que no fuera introducido en la modificación de las bases porque podrían convertirse en señales prematuras de terminación.

Dado que en *S. cerevisiae* en vez de este hexanucleótido la señal de poliadenilación está difusamente caracterizada por extensiones ricas en AT's

(Gouka *et al.*, 1997a), se cuidó que el GC% (56%) no distará del nativo (58%). Sin embargo, la ocurrencia de dinucleótidos AT en el cDNA sí aumentó de 45 en el nativo a 62 en el modificado. Gouka *et al.* (1997a) encontraron que el gen nativo de *aglA* se truncaba posiblemente por tramos ricos en AT río arriba del sitio poliadenilación críptica. En genes de plantas se presentan hasta 142 ocurrencias de AT en un cDNA de 1,503 pb, como es el caso de la  $\alpha$ -galactosidasa, en pronunciado contraste con el cDNA de la glucoamilasa A de *A. niger*, donde hay 70 ocurrencias a lo largo de 1,900 pb. El aumento de ocurrencias en el gen modificado de *chyBb* pudiera comprometer la expresión a nivel post-transcripcional pero esto sólo podría determinarse estudiando el tamaño del mRNA heterólogo mediante Northern blots o en su defecto RT-PCR, y comparándolo con la secuencia nativa.

Por otro lado, se observó que no fueran introducidas señales consenso para el mecanismo de *splicing*: tramos de polipirimidinas y las regiones consenso reconocidas en los intrones, GTANGT en el extremo 5' (donador SS), y CTRAC en el punto de ramificación cercano al extremo 3', como han sido descritas para *A. nidulans* por Kupfer *et al.* (2004). El primer motivo no se encuentra en el gen nativo de la proquimosina de búfalo pero sí tres ocurrencias del punto de ramificación; el gen modificado tuvo sólo dos ocurrencias de esta secuencia consenso.

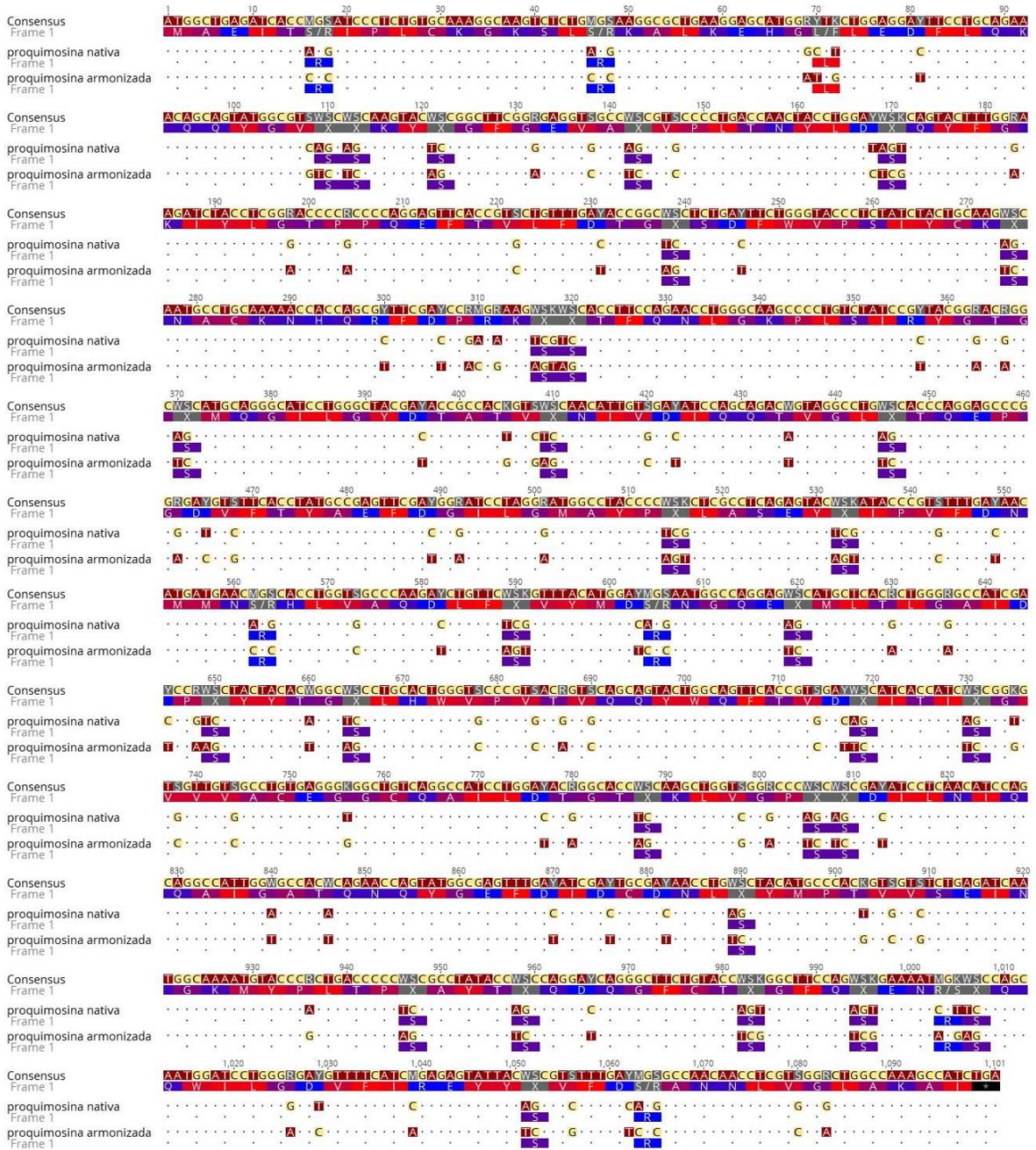
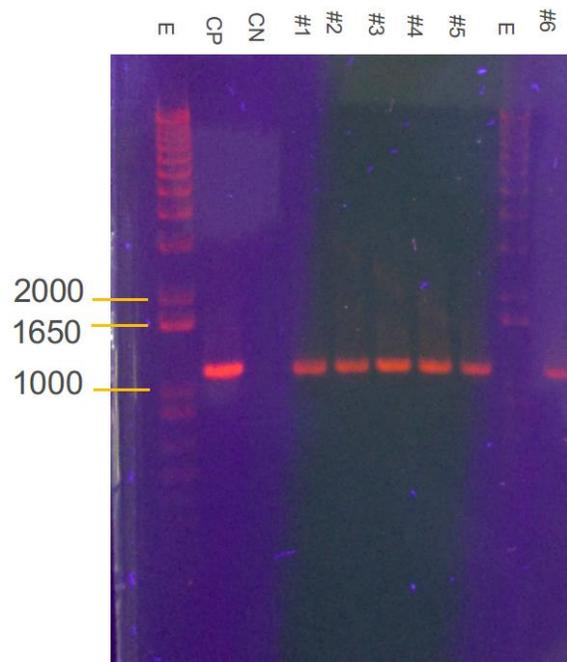


Figura 6-1. Alineamiento del cDNA nativo y armonizado de la proquimosina de búfalo.

### 6.2 CONSTRUCCIÓN Y ANOTACIÓN DE VECTORES

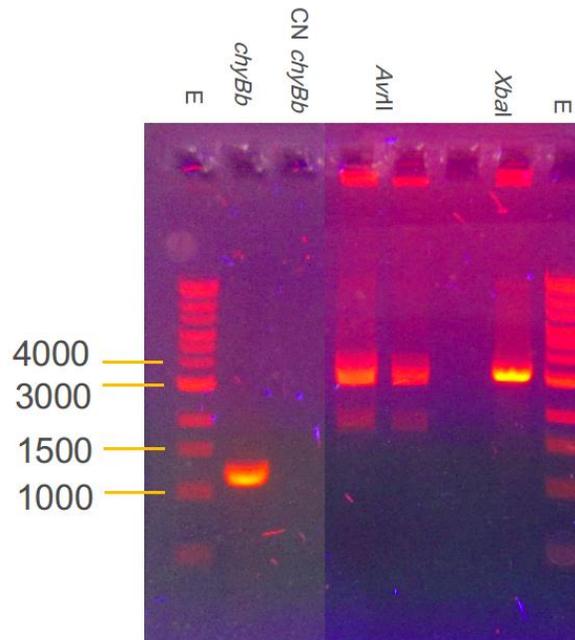
En la Figura 8-1(Anexo) se muestra el mapa del vector pCHYBb donde el laboratorio T4 Oligo clonó el gen modificado de la proquimosina de búfalo. Este vector fue transformado por nosotros en *E. coli* y minipreps de 6 clonas

seleccionadas fueron analizadas por PCR utilizando los primers RT-PCR\_F y RT-PCR\_R, que amplifican una secuencia de 1,100 pb. (Figura 6-2).



**Figura 6-2. Clonas pCHYBb del #1-6. El amplicón esperado es de 1,100 pb. CP: control positivo, 0.5 ng del vector resuspendido. CN: control negativo. E: escalera 1 kb (Invitrogen)**

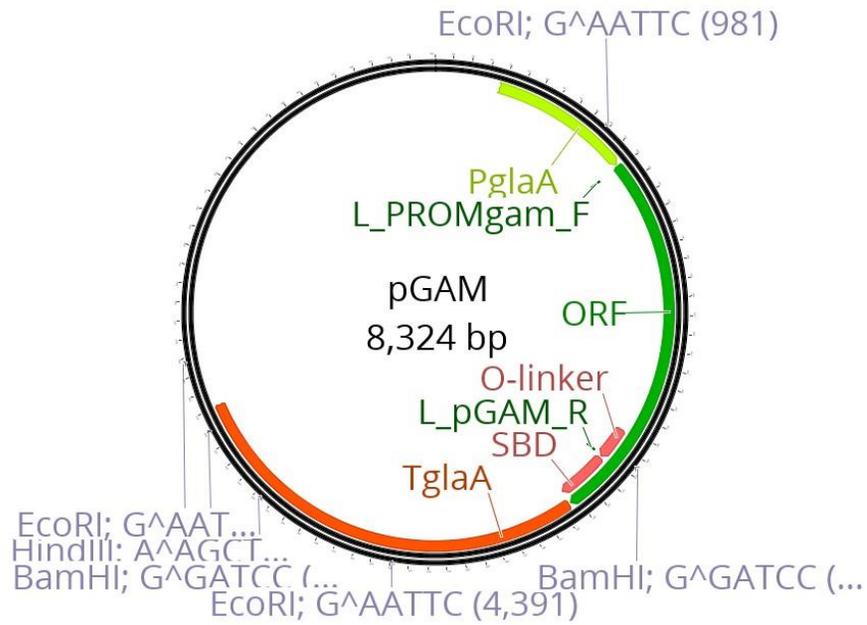
Se eligió al azar la clona pCHYBb#3, que fue digerida con *AvrI* (New England Biolabs) y *XbaI* (Invitrogen), y se muestra en la Figura 6-3 junto con el inserto (gen *chyBb*) aislado por PCR con primers quiméricos. El producto de esta reacción fue usada para subclonar mediante iVEC dado que uno de los dos sitios de restricción *XbaI* estaba siendo bloqueado por metilación, como se aprecia en la Figura 6-3, la digestión con esta endonucleasa sólo linearizaba el vector.



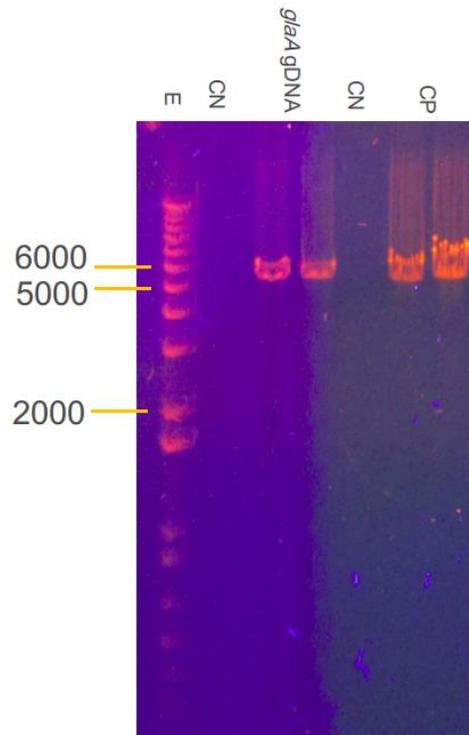
**Figura 6-3.** *chyBb* liberado de pCHYBb mediante PCR. pCHYBb digerido con *AvrI* (una banda de 2.98 kb) y con *XbaI* (dos bandas: 1.1 kb y 1.8 kb, ver discusión). E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

### 6.2.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EN MEDIO LÍQUIDO (pGAM)

Para la construcción *in vitro* del vector pGAM (Figura 6-4) se clonó el gen aislado en el vector pJET1.2. En la Figura 6-5 se observa un gel resolviendo el gen *glaA* truncado hasta 5.33 kb para la construcción del vector pGAM. Los límites de la secuencia fueron determinados en el extremo del promotor según lo indican Verdoes *et al.* (1994), y en el extremo de terminador se decidió truncarlo arbitrariamente 2.4 kb después del codón de terminación. El mapa del plásmido fue dibujado utilizando la secuencia de MycoCosm (2017).

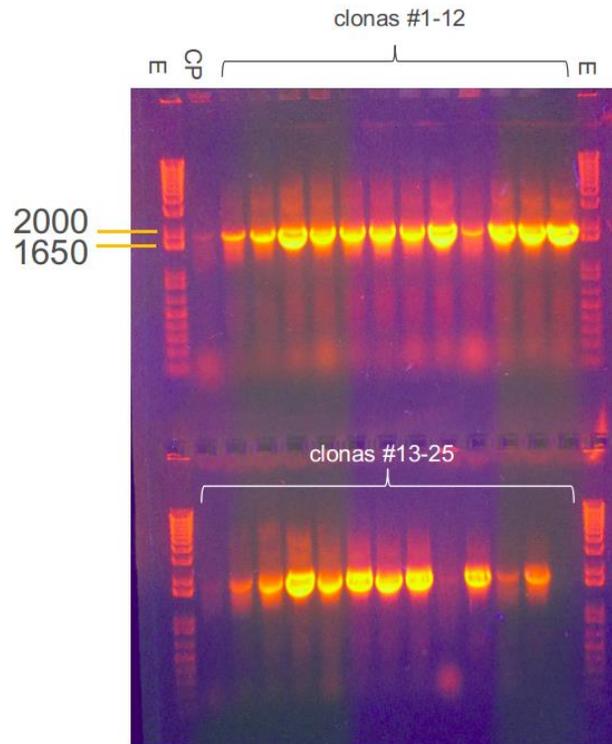


**Figura 6-4. Mapa del vector de expresión inducible por almidón crudo en medio líquido**



**Figura 6-5. Amplificación del gen *glaA* usando DNA genómico. CP: amplificación del plásmido pPIGPYRG. E: escalera 1 kb (Invitrogen).**

Tras la clonación del gen *glaA*, se obtuvieron alrededor de 230 colonias, de las cuales se esperaba que arriba de un 90% fueran clonas positivas ya que el control de ligación negativo (pJET1.2 sin inserto), produjo 21 colonias. De éstas, 25 fueron seleccionadas al azar para analizarse mediante PCR, amplificando la región de los primeros 1,857 pb del ORF de *glaA*, usando los *primers* L\_PROMgam\_F y L\_pGAM\_R. Se obtuvieron 22 clonas positivas (Figura 6-5).



**Figura 6-6. PCR de colonia de pGAM. Se amplificó una secuencia de 1.86 kb y se determinaron 22 clonas positivas. CP: 8 ng del amplicón purificado de *glaA*. E: escalera de 1 kb (Invitrogen).**

Posteriormente, se seleccionó la clona #8 y fue digerida con *HindIII*, *EcoRI*, y *BamHI*. El patrón de digestión se resolvió en electroforesis en gel y se muestra en la Figura 6-7.

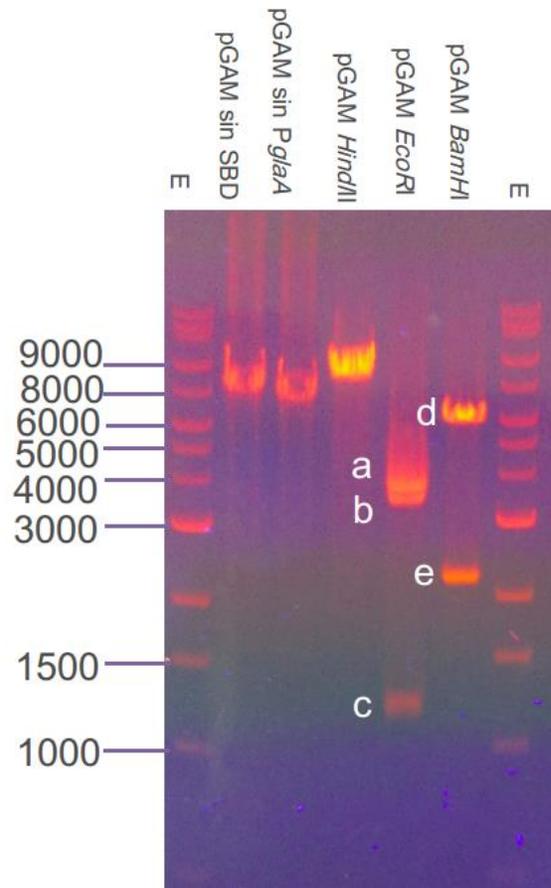
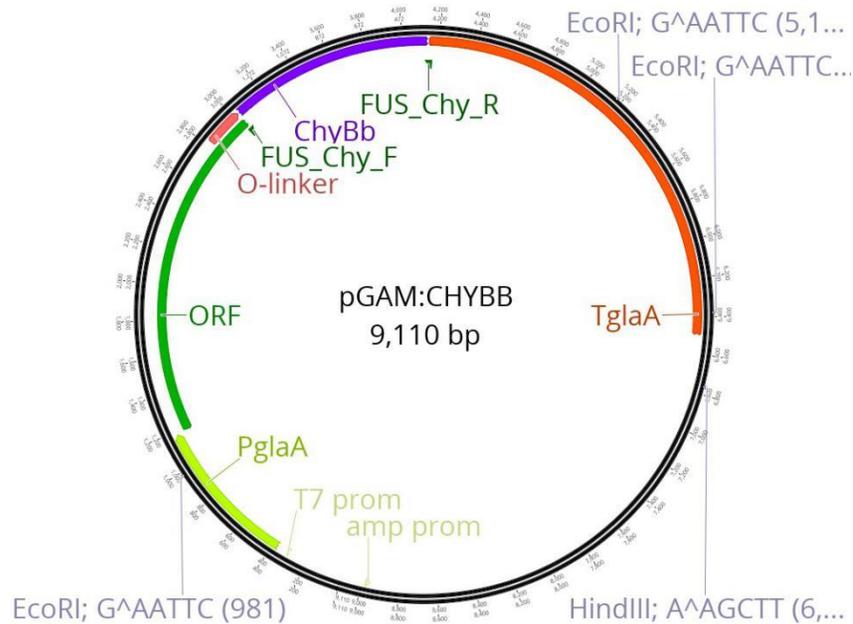


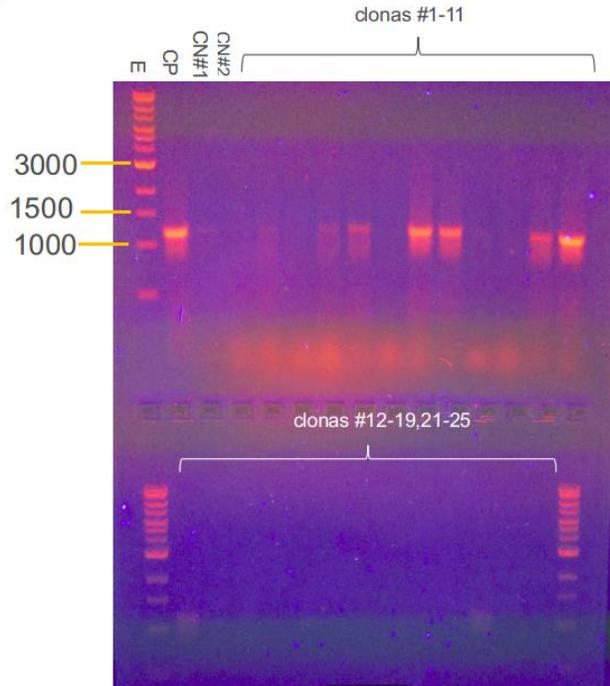
Figura 6-7. pGAM linearizado de dos maneras mediante PCR: omitiendo el sitio de unión al sustrato de GAM (SBD), y omitiendo la región promotora *PglA*; los pesos esperados son de 8,009 y 7,511 pb respectivamente. Digestiones de pGAM con *HindIII* (plásmido linearizado 8.3 kb), *EcoRI* (tres fragmentos: a de 3.7 kb, b de 3.4 kb, y c de 1.2 kb), y *BamHI* (dos fragmentos: d de 6.1 kb, y e de 2.2 kb). E: escalera de 1 kb (New England Biolabs).

Para construir el vector pGAM:CHYBb (Figura 6-8) y el vector pPB:GAM (Figura 6-10), se linearizó el vector pGAM#8 de dos maneras: omitiendo la secuencia codificante del SBD, y omitiendo el promotor nativo (Figura 6-7). Adicionalmente, la capacidad para que este vector pudiera ser amplificado con los primers de linearización sin el promotor nativo -dado que el de ida (F) se alinea adentro del inserto y el de venida (R) afuera- nos permitió confirmar el sentido en el que *glaA* había sido clonado en pJET1.2.

El gen *chyBb* se aisló previamente con PCR, añadiéndose extremos homólogos de 22 pb al dominio linker y el terminador de *glaA* como se muestra en la Figura 6-2. Tras subclonar en pGAM linerizado sin el SBD, se obtuvieron 68 colonias. El control negativo (pGAM linearizado sin SBD) produjo en cambio 41 colonias, por lo tanto se anticipaba una incidencia de recircularización de 60.3%, o 39% de clonas positivas. Se analizaron 24 colonias mediante PCR amplificando el gen *chyBb* con Fus\_Chy\_F y Fus\_Chy\_R. Se obtuvieron 9 clonas positivas, como se observa en la Figura 6-9. Se eligieron las clonas #6 y #11 para analizar por patrón de digestión (Figura 6-12). Dado que el patrón de digestión era el esperado de acuerdo al análisis *in silico*, se eligieron ambas clonas para analizarse a lo largo de dos regiones mediante secuenciación capilar.



**Figura 6-8. Mapa del vector de expresión de proquimosina de búfalo inducible por almidón crudo en medio líquido**

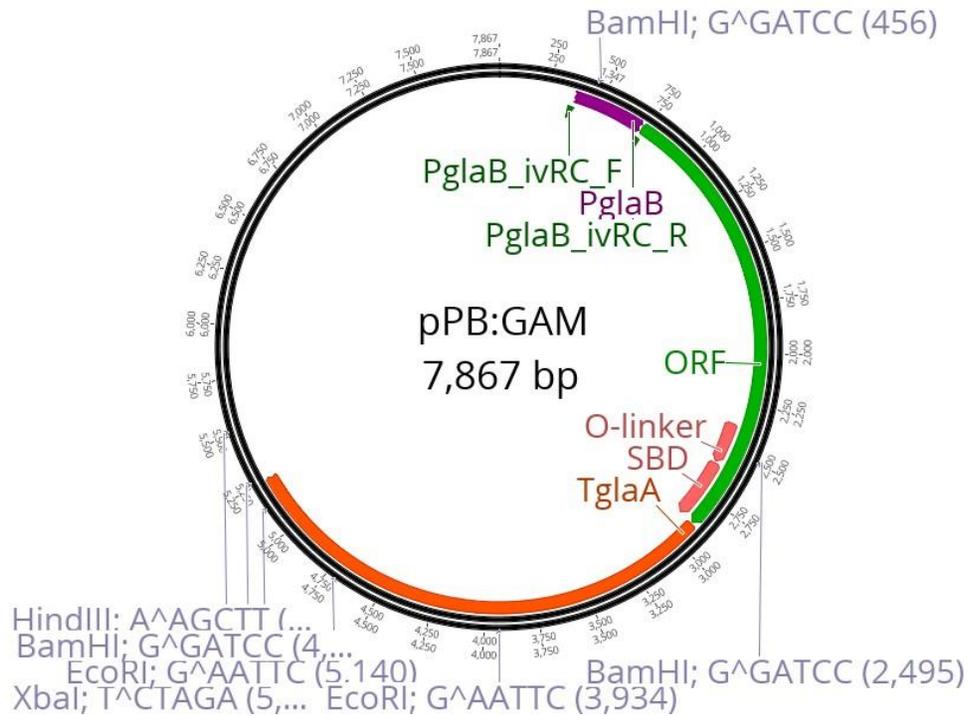


**Figura 6-9. PCR de colonia de pGAM:CHY. Se amplificó el inserto *chyBb* de 1.16 kb y se determinaron 9 clonas positivas. E: escalera de 1 kb (New England Biolabs). CP: 8 ng de inserto purificado *chyBb*. CN#1: superficie del agar donde se esparció la mezcla de transformación. CN#2: colonia con vector pGAM sin SBD, recircularizado, y subcultivado en medio sólido fresco.**

### 6.2.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EN MEDIO SÓLIDO (pPB:GAM)

El vector pGAM linearizado sin promotor nativo fue cotransformado con el promotor de *glaB* de *A. oryzae* previamente aislado mediante PCR de alta fidelidad con extremos homólogos al vector pJET1.2 (20 pb) y al extremo 5' del ORF de *glaA* (30 pb). La secuencia de *PglaB* de 356 pb fue delimitada según Ishida *et al.* (2006) y el aislamiento se muestra en el gel de la Figura 6-18; nótese que el tamaño del amplicón se espera de 406 pb debido a los extremos homólogos. De la construcción pPB:GAM se obtuvieron 69 colonias, mientras que la transformación con únicamente vector linearizado (pGAM sin *PglaA*) produjo 21 colonias, por lo que se esperaba una eficiencia de construcción correcta de aproximadamente 70%. Se analizaron 25 colonias y se obtuvieron 14 clonas positivas, amplificando el promotor de *glaB*, como se muestra en la Figura 6-11.

Las clonas #2, #9 y #18 fueron elegidas para analizarse por patrón de digestión. La Figura 6-12 y Figura 6-13 muestran que las tres colonias generan el patrón de digestión esperado según el análisis *in silico*.



**Figura 6-10. Mapa del vector de expresión inducible por almidón gelatinizado en medio sólido**

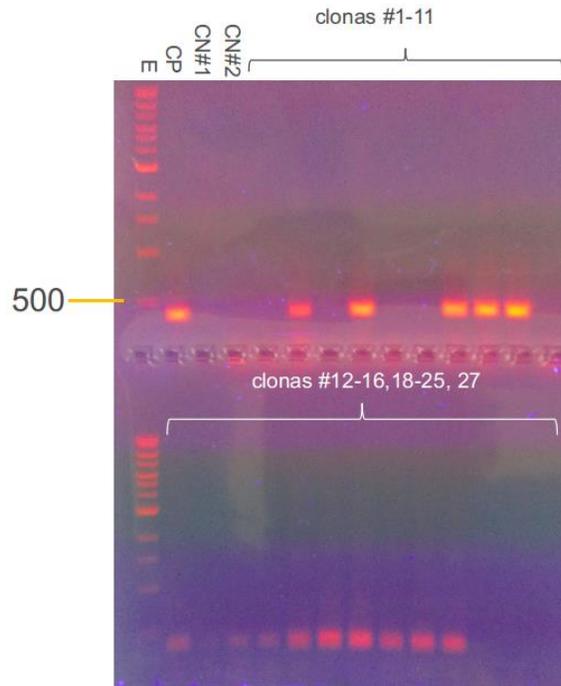


Figura 6-11. PCR de colonia de pPB:GAM. Se amplificó el inserto *PglaB* de 406 pb. CP: 8 ng de inserto purificado *PglaB*. CN#1: superficie del agar donde se esparció la mezcla de transformación. CN#2: colonia con vector pGAM sin *PglaA*, recircularizado, y subcultivado en medio sólido fresco

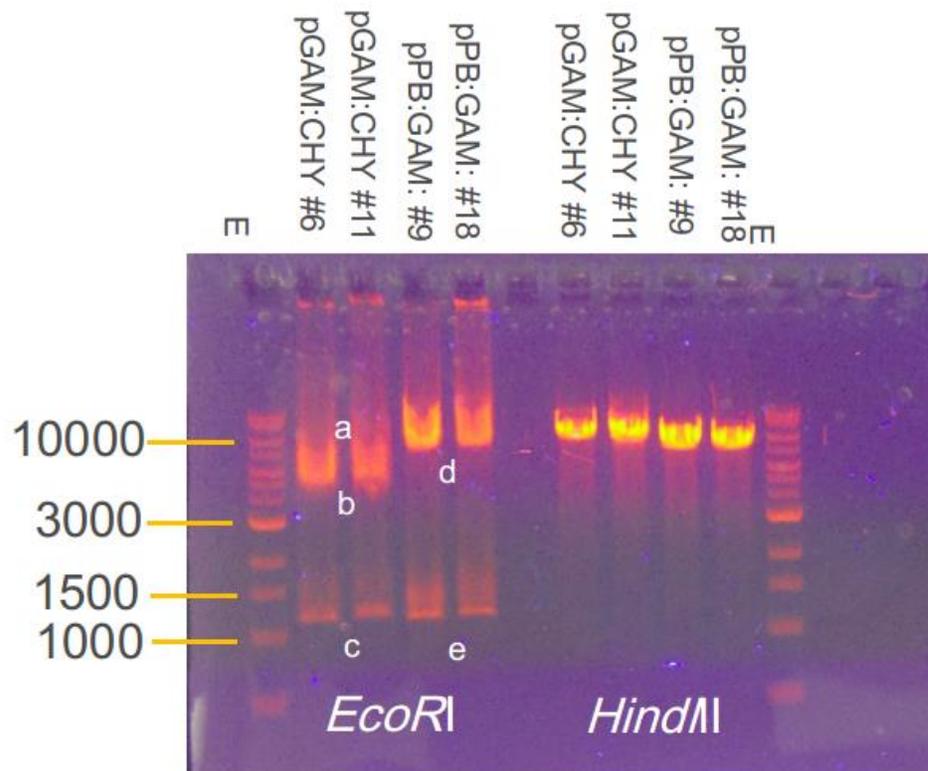


Figura 6-12. Patrón de digestión de cuatro clonas. *EcoRI* sobre pGAM:CHYBb (tres fragmentos: a de 4.2 kb, b de 3.8 kb, c de 1.2 kb). *EcoRI* sobre pPB:GAM (dos fragmentos: d de 6.6 kb y e de 1.2 kb). *HindIII* lineariza ambos vectores, pGAM:CHYBb (9.1 kb) y pPB:GAM (7.8 kb). E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

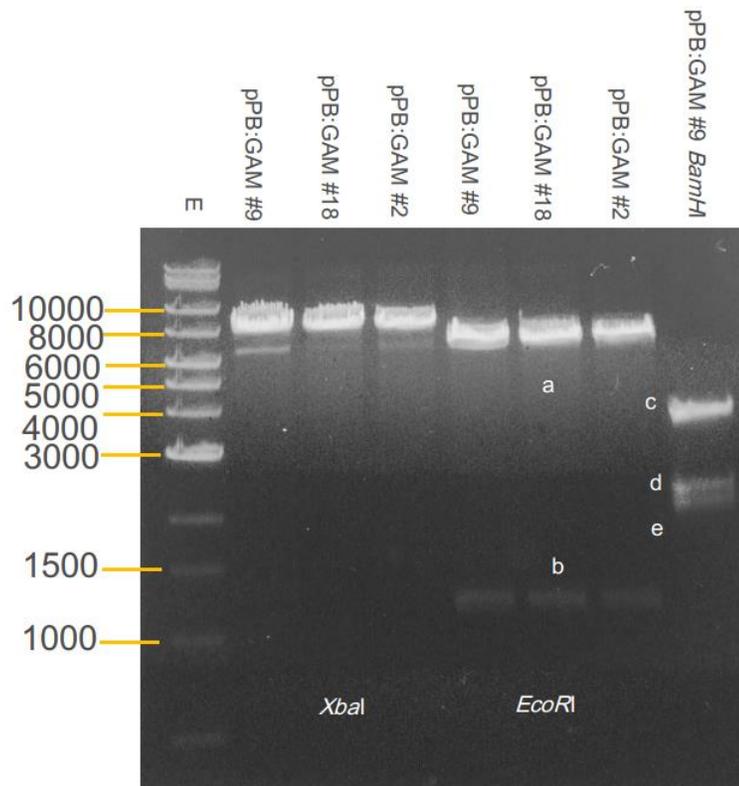
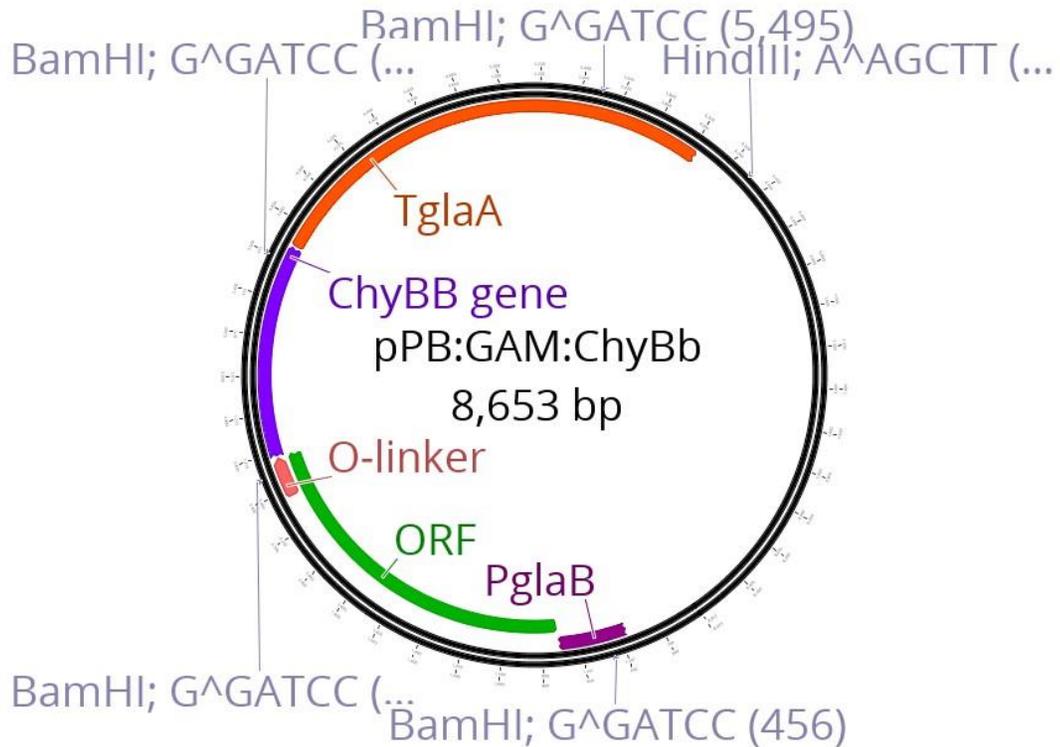


Figura 6-13. Clonas de pPB:GAM analizadas con tres distintas endonucleasas: *XbaI* (lineariza el vector de 7.8 kb), *EcoRI* (dos fragmentos: a de 6.6 kb y b de 1.2 kb), *BamHI* (tres fragmentos: c de 3.62 kb, d de 2.2 kb, y e de 2.04 kb). E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

Se eligió la clona de pGAM:CHYBb#6 para ser utilizado como vector de recepción al clonar el inserto *PglaB* usando iVEC. Alternativamente, a manera de respaldo, se eligió el vector pPB:GAM#9 como vector de recepción para subclonar el inserto *chyBb*. Estas dos rutas representan dos maneras distintas de llegar al mismo producto: el vector de expresión inducible en medio sólido pPB:GAM:CHYBb (Figura 6-14).



**Figura 6-14. Mapa del vector de expresión de proquimosina de búfalo inducible por almidón gelatinizado en medio sólido.**

Al clonar *PglA*B en el vector pGAM:CHYBb#6, linearizado omitiendo el promotor nativo, se obtuvieron 32 colonias, mientras que en la transformación únicamente con pGAM:CHYBb#6 linearizado se obtuvieron 16 colonias, es decir que se podrían esperar 50% de clonas positivas. En cambio, el número de colonias producto de la subclonación de *chyBb* en pPB:GAM#9 linearizado sin el SBD fue 74 y el control negativo 55, esto implicaba que era más improbable (26%) encontrar clonas positivas en esta transformación, por lo tanto se analizaron primero las colonias de la transformación primeramente descrita. Se buscó el inserto de *PglA*B mediante PCR de colonia en 25 colonias, y se determinó la presencia de 11 colonias positivas (Figura 6-15).

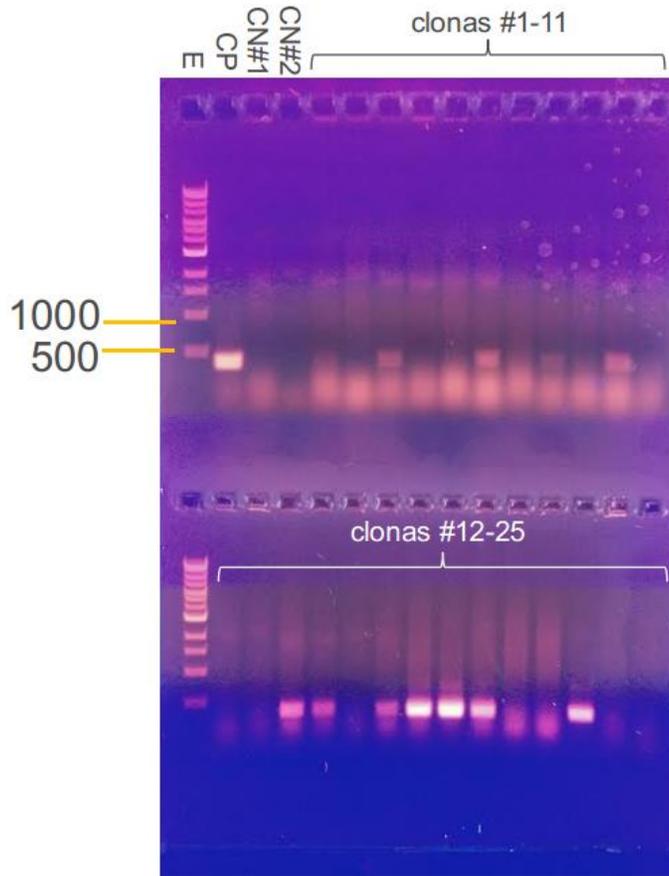


Figura 6-15. PCR de colonia de pPB:GAM:CHYBb. Se amplificó el inserto *PglA*B de 406 pb. CP: 8 ng de inserto purificado *PglA*B. CN#1: superficie del agar donde se esparció la mezcla de transformación. CN#2: colonia con vector pGAM:CHYBb sin *PglA*A, recircularizado, y subcultivado en medio sólido fresco. E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

Entre las clonas positivas de pPB:GAM:CHYBb se eligieron las #6,18 y 23 para un subsecuente análisis de patrón de digestión, resuelto en el gel de la Figura 6-16, donde se muestra que las clonas #6 y 23 se fragmentan como era esperado de acuerdo al análisis *in silico*. Ambas clonas fueron analizadas en tres regiones mediante secuenciación capilar.

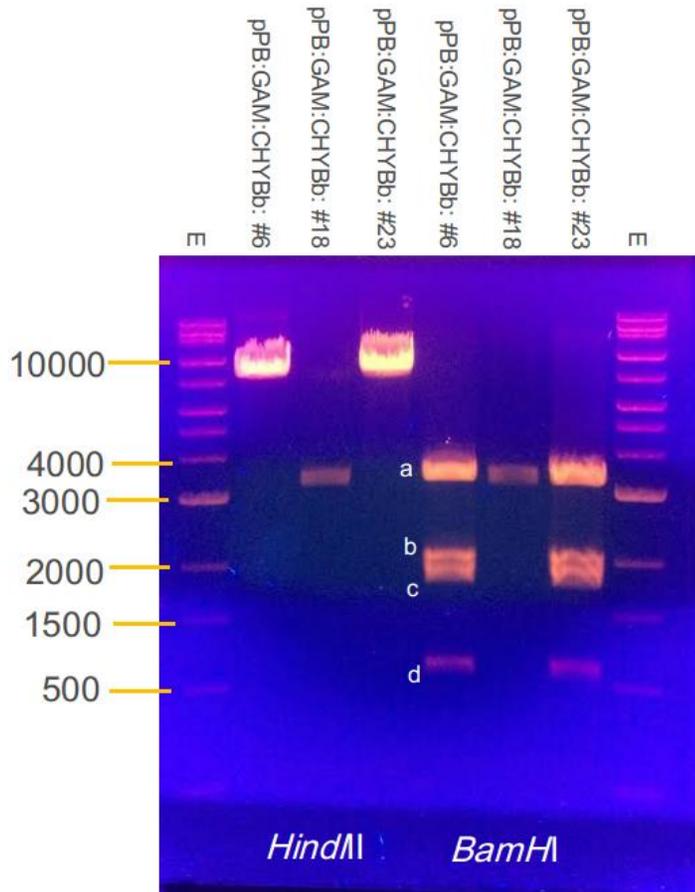


Figura 6-16. Patrón de digestión de tres clonas pPB:GAM:CHYBb. *HindIII* lineariza (8.65 kb). *BamHI*, cuatro fragmentos (a de 3.6 kb, b de 2.0 kb, c de 1.9 kb, y d de 1.1 kb). E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

### 6.2.3 VECTOR DE SELECCIÓN (pPYRG)

El vector de selección pPYRG (Figura 6-17) fue construido utilizando el vector de clonación pJET1.2 y un fragmento de 3.8 kb del gen *pyrG*, cuya funcionalidad fue demostrada por van Hartingsveldt *et al.* (1987). El aislamiento del gen fue a partir de la cepa *A. niger* N402 (*csp*) (Bos *et al.*, 1988), y se muestra en la Figura 6-18.

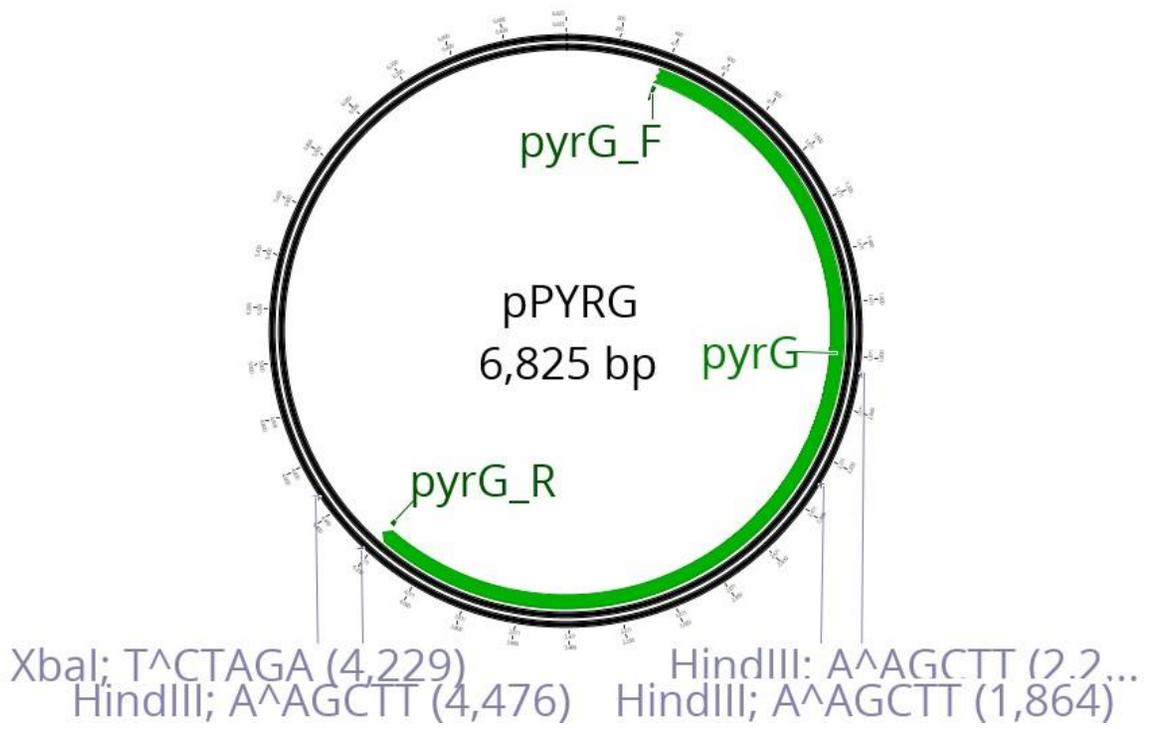
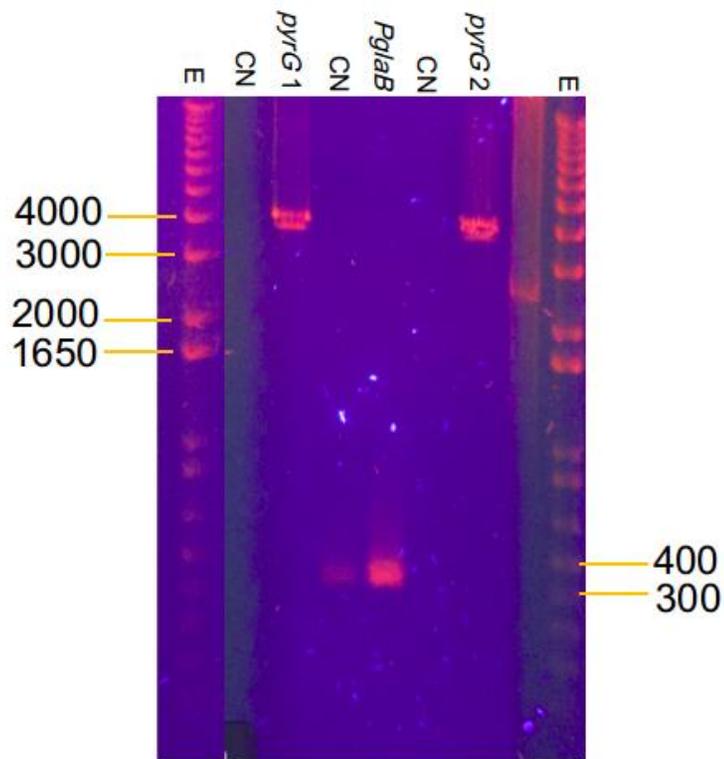
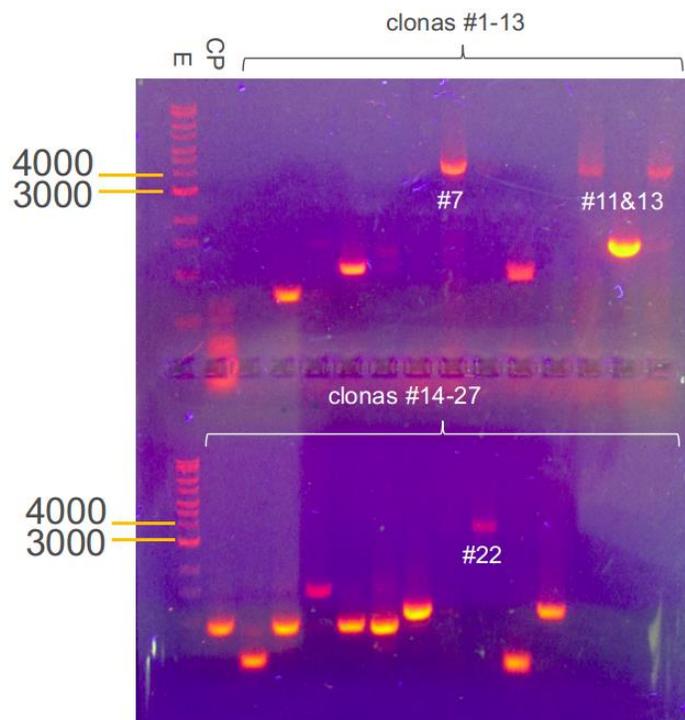


Figura 6-17. Mapa del vector de selección basado en el gen *pyrG* de *A. niger*.



**Figura 6-18. Aislamiento del gen *pyrG* de 3.85 kb, 1 con polimerasa Q5®, y 2 con polimerasa Phusion (New England Biolabs), y el promotor del gen *glaB* E: escalera de 1 kb (Invitrogen).**

Tras la ligación y transformación se obtuvieron alrededor de 200 colonias, mientras que en la transformación realizada únicamente con el vector pJET1.2 se observaron menos de 20 colonias. Se analizaron 27 colonias y se buscaron positivas amplificando el inserto completo (Figura 6-19). El control positivo de esta reacción no produjo el amplicón deseado sino un emborrón de bajo peso molecular, que pudo haberse debido a ineficientes rondas de polimerización ya que el DNA molde podía haberse encontrado en exceso. Sin embargo, aunque se encontró heterogeneidad en los amplicones obtenidos entre todas las clonas, las cuatro colonias que produjeron un amplicón del tamaño del inserto buscado (3.85 kb), se analizaron ulteriormente con endonucleasas (Figura 6-20).



**Figura 6-19. PCR de colonia de pPYRG. Se amplificó el gen *pyrG* (3.85 kb). CP: 15 ng de amplicón aislado *pyrG*. E: escalera 1 kb (New England Biolabs).**

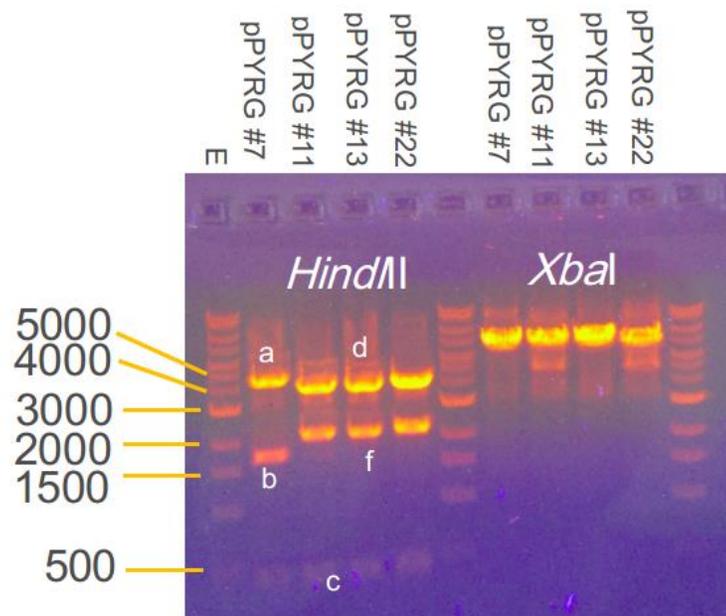


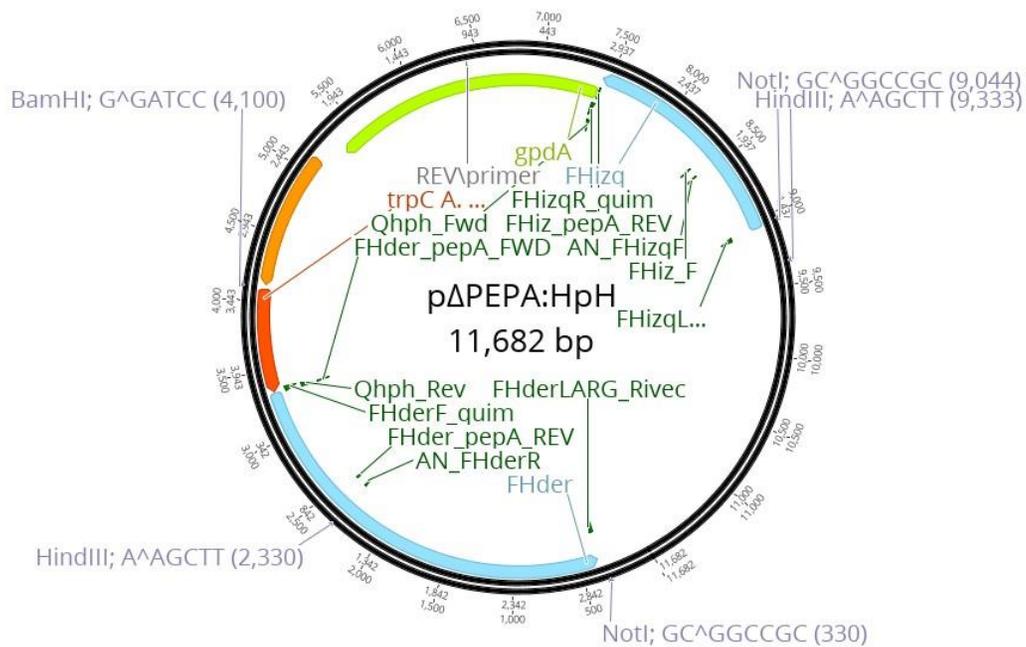
Figura 6-20. Patrones de digestión de 4 clonas pPYRG. Clona #7 digerida por *HindIII* genera tres fragmentos (a de 4.65 kb, b de 1.75 kb y c de 469 pb). Clona #11, 13 y 22 digeridas por *HindIII* genera tres fragmentos (d de 4.2 kb, f de 2.1 kb y c de 469 pb). *XbaI* lineariza el vector (6.83 kb). E: escalera 1 kb (New England Biolabs).

Sin importar el sentido en el que haya sido clonado *pyrG* en el vector pJET1.2, la digestión con *HindIII* habría de liberar tres fragmentos, aunque de distinto tamaño: clonado en el sentido 3' a 5' del gen, la digestión produciría un fragmento de 4.65 kb (a), 1.75 kb (b) y de 469 pb (c). Clonado en el sentido 5' a 3' del gen, la digestión produciría fragmentos de 4.2 kb (d), 2.1 kb (f), y de 469 pb (c). Por lo tanto, las cuatro colonias son clonas del vector pPYRG. Se eligió la clona pPYRG#13, y la correcta clonación (*i.e.* ausencia de mutaciones atribuibles a la actividad de la polimerasa) fue probada transformando *Aspergillus niger* AB4.1 mediante fusión de protoplastos (Wernars *et al.*, 1985; Debets & Bos, 1986). La eficiencia de transformación fue de 4 a 8 transformantes por ug de DNA.

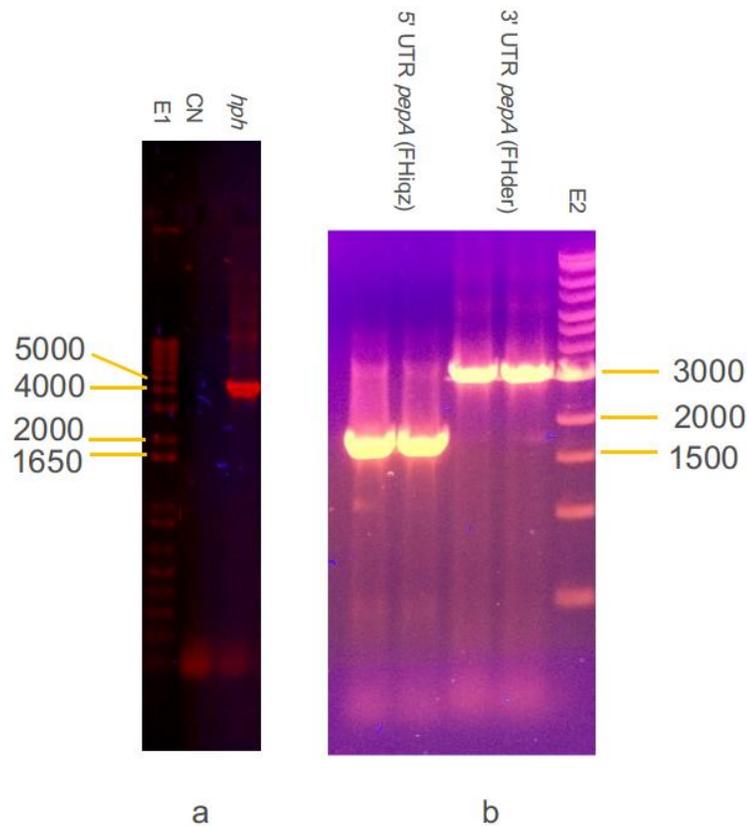
#### 6.2.4 VECTOR DE INTERRUPCIÓN (pΔPEPA:HPH)

Para la construcción del vector de interrupción pΔPEPA:HPH (Figura 6-21), primero se muestra en la Figura 6-22 el aislamiento de las tres secuencias (los flancos homólogos del gen *pepA* y el dispositivo de resistencia para la higromicina

del vector pAN7.1) para la clonación simultánea en pJET1.2 mediante iVEC. En pAN7.1 el gen de higromicina B transferasa está controlado por secuencias reguladoras de la transcripción originales de *A. nidulans* (*PgpdA* y *TtrpC*) funcionales en *A. niger* (Punt *et al.*, 1987). En los extremos de nuestro dispositivo de interrupción se agregó un sitio de restricción *NotI* para la liberación del inserto y de este modo inducir el doble entrecruzamiento (Berka *et al.*, 1990).



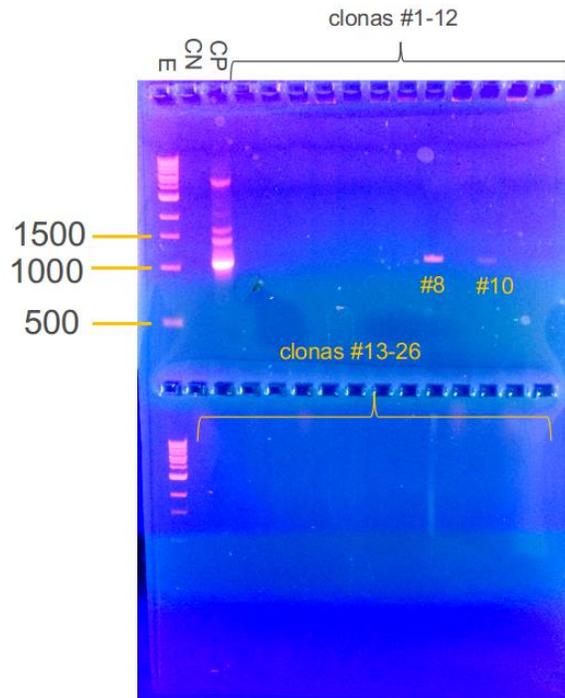
**Figura 6-21. Mapa del vector de reemplazo del gen *pepA* basado en el marcador de selección para higromicina B**



**Figura 6-22. (a) Amplificación de la unidad de expresión de higromicina B transferasa *hph* con secuencias regulatorias de hongos filamentosos (4.15 kb), tomada del vector pAN7.1. E1: escalera 1 kb (Invitrogen). (b) amplificación genómica del 5' UTR (1.6 kb) y 3'UTR (2.9 kb) del gen *pepA*. E2: escalera 1 kb (New England Biolabs).**

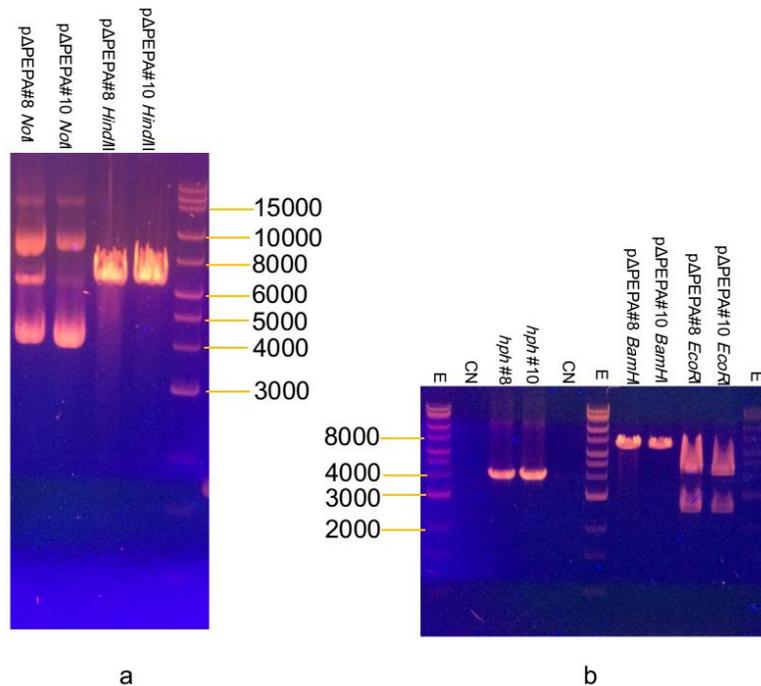
La transformación con la mezcla completa de secuencias originó 102 colonias, mientras que la transformación únicamente con pJET1.2 generó 14 colonias. En este caso no es posible anticipar una eficiencia de construcciones correctas por dos razones, que el vector pudiera cerrarse con sólo una o dos de las tres partes, y porque pJET1.2 tiene un sistema de control positivo en el gen tóxico (*eco47IR*) que codifica cuando se cierra sin insertos.

Las primeras 26 colonias se analizaron por PCR al amplificar una subsecuencia de 1.05 kb perteneciente al inserto FHizq (primers sencillos AN\_FHizqF y FHizq\_pepA\_R). El resultado se muestra en la Figura 6-23.



**Figura 6-23. PCR de colonia para el vector pΔPEPA:HPH. Se amplificó una subsecuencia de 1055 pb. CN: pJET1.2 cerrado. CP: 14 ng de FHizq purificado. E: escalera 1 kb (New England Biolabs)**

A pesar de que el control positivo mostró especies de mayor peso molecular, la banda del tamaño esperado fue la especie preferentemente amplificada a juzgar por su intensidad. Se encontraron dos colonias presuntamente positivas y se analizaron ulteriormente mediante digestiones con endonucleasas, resultados apreciables en la Figura 6-24.



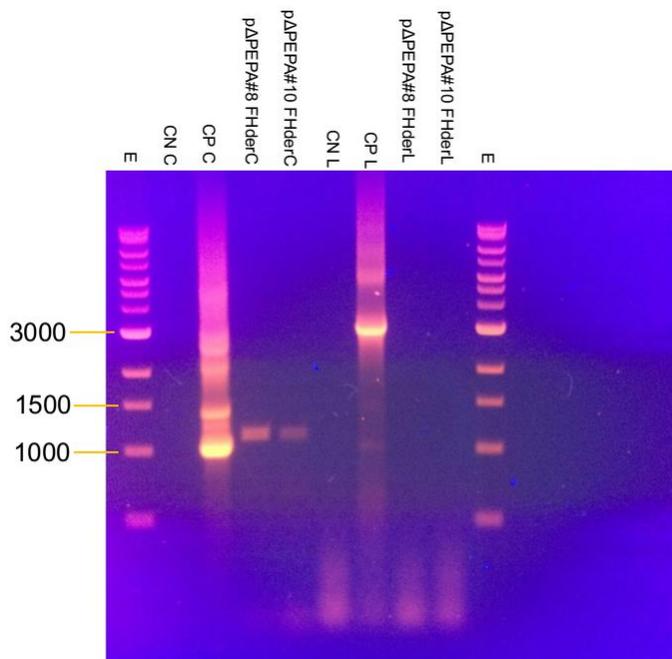
**Figura 6-24. Análisis de dos clonas pΔPEPA:HPH mediante digestiones sencillas con *NotI* y *HindIII*. (b) Las mismas clonas digeridas con *BamHI* y *EcoRI*; también se muestran las bandas de una amplificación del unidad de expresión *hph*. E: escalera 1 kb (New England Biolabs).**

La digestión con *NotI* generó un patrón similar para ambas clonas: una banda de aproximadamente 9.0 kb, otra de aproximadamente 7.0 kb (más intensa para la clona #8), y de 4.0 kb. Esto no coincide con los fragmentos esperados de acuerdo al mapa del plásmido, ya que *NotI* debía liberar la unidad de reemplazo ΔPEPA:HPH (8.7 kb) y dejar un fragmento de 2.97 kb. La digestión con *HindIII* produjo una única banda de aproximadamente 6.5 kb, un patrón típico de un único sitio de restricción que lineariza un vector, sin embargo, de acuerdo a la predicción *in silico*, se esperaba que generará dos fragmentos, de 7.0 y 4.7 kb.

Para conocer el tamaño de vector se digirió con una endonucleasa cuyo corte predecía linearizar el plásmido, *BamHI*. No obstante, como se muestra en la Figura 6-24b, el tamaño resultante es de aproximadamente 7.0 kb, cuando se esperaba de 11.6 kb. La digestión con *EcoRI* generó patrones similares para ambas clonas, difícil de interpretar pero donde pudieran discernirse fragmentos de

aproximadamente 2.5 kb y 4.5 kb. De acuerdo a la secuencia planeada de esta molécula, se deberían producir tres fragmentos, de 7.9 kb, 2.5 kb, y de 1.2 kb, tras la digestión con *EcoRI*.

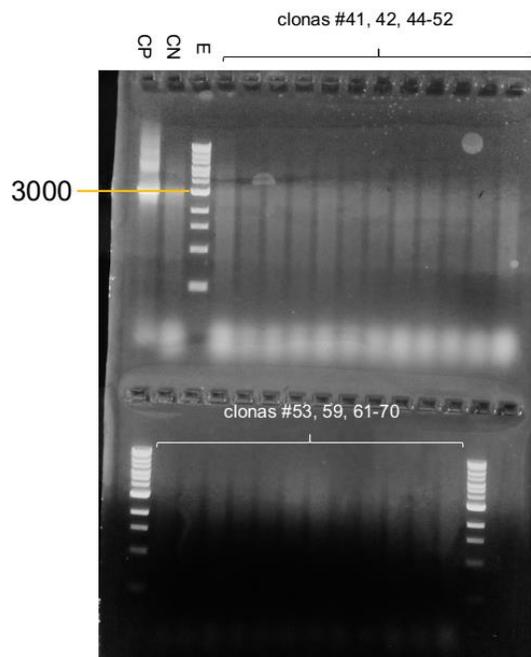
Estas clonas fueron parcialmente caracterizadas al amplificar el gen *hph* (primers quiméricos Qhph\_F y Qhph\_R), y se encontró que efectivamente estaba presente en ambas clonas (Figura 6-24b). Confirmada la presencia del FHizq y el gen *hph*, restaba buscar la tercera parte de la unidad de expresión, el inserto FHder. Para esto se amplificaron las clonas utilizando dos juegos de primers, FHderF\_quim y FHderLARG\_Rivec, y FHderF\_quim y AN\_FHderR, respectivamente para el inserto completo y un subsecuencia con el extremo 5' en común. Los resultados se muestran en la Figura 6-25.



**Figura 6-25.** Dos pares de primers fueron usados para amplificar una secuencia corta (C) de 1.05 kb, y una larga (L) de 2.9 kb, del inserto FHder en las clonas pΔPEPA:HPH. E: escalera 1 kb. CP: 800 pg de inserto FHder.

El análisis indicó que las clonas albergaban una versión incompleta del inserto FHder (2.9 kb) ya que no fue posible amplificarlo, sin embargo una subsecuencia

sí pudo ser amplificada; esto significa que ambas clonas tienen una secuencia en común de al menos 1.05 kb del inserto FHder, extremo 5'. Dado que la correcta selección de clonas del vector p $\Delta$ PEPA:HPH podía estar de alguna manera limitada por la clonación completa del FHder, se analizaron un conjunto de 26 colonias distintas producto del mismo evento de transformación, usando el inserto completo FHder como criterio de selección (primers FHderF\_quim y FHderLARG\_Rivec).



**Figura 6-26. PCR de colonia amplificando el inserto completo FHder. CP: 800 pg de amplicón FHder purificado. E: escalera 1 kb (New England Biolabs).**

La Figura 6-26 muestra que un nuevo conjunto de colonias no contenían el inserto completo y por lo tanto no pudieron ser seleccionadas colonias para análisis posteriores. Esta baja ocurrencia de correctas clonaciones en iVEC ha sido reportada por Jacobus & Gross (2015), quienes hicieron un ensamblaje de tres partes (incluyendo vector), y la eficiencia bajó de 94% a 60%; García-Nafría *et al.* (2016) practicaron un ensamblaje de 5 partes con 14% de eficiencia. Todo esto supone que la selección de clonas positivas para un ensamblaje de cuatro partes como el nuestro requiere de una búsqueda entre más colonias. Una alternativa

para evitar múltiples fragmentos de DNA que reducen la eficiencia de correcto ensamblaje, podría ser con dos clonaciones sencillas consecutivas: clonar el gen *pepA* de extremo a extremo en pJET1.2, linearizarlo por el centro del inserto, y subclonar el gen *hph* con iVEC.

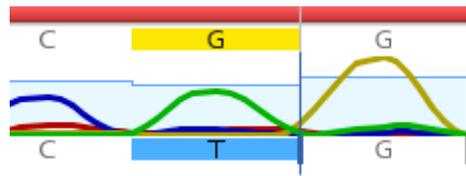
### 6.3 CONFIRMACIÓN DE CONSTRUCCIONES MEDIANTE SECUENCIACIÓN

Para verificar que los plásmidos de expresión hubiesen sido correctamente contruidos se analizó la estructura primaria de algunos segmentos esenciales para el funcionamiento en un sistema de expresión heteróloga, a saber: el punto de unión del ORF truncado de *glaA* con el comienzo del cDNA de la proquimosina de búfalo, el resto de nucleótidos codificantes de ésta, y el promotor proveniente del gen *glaB* de *A. oryzae*. Las secuencias fueron obtenidas por secuenciación capilar utilizando los primers SpPIG18\_FWD, SpPIG18\_REV y PglaB\_F. Las cuatro clonas analizadas fueron pGAM:CHYBb#6 y #11, y pPB:GAM:CHYBb#6 y 23.

Secuenciando con el primer SpPIG18\_FWD, que se hibrida casi 300 pb rio arriba del sitio de fusión, se obtuvo el electroforeograma para la clona pGAM:CHYBb#6 (Figura 8-2). Se determinó que al menos 745 nt alcanzan a dar una lectura confiable, con 100% consenso de identidad (nt 2,796-3,540, numeración del plásmido), por lo tanto la coyuntura de la fusión GAM:CHY está en el marco de lectura correcto. En el cDNA de la proquimosina de búfalo abarcado por esta reacción hay 100% consenso de identidad hasta la posición #503 (partiendo del codón de inicio). Sin embargo, con el fin de analizar la secuencia completa del cDNA posteriormente, al hacer el traslape con la secuenciación el primer SpPIG18\_REV, se decidió interpretar la lectura de la secuencia hasta la posición #610 únicamente realizando la corrección de un surco.

Para la clona pGAM:CHYBb#11 el electroforeograma se muestra en la Figura 8-3. De esta reacción de polimerización se determinó que al menos 792 nt daban una lectura confiable, sin embargo, en la posición #2940 (numeración del

plásmido), se encontró una ambigüedad denotada por una K (G/T de acuerdo a la notación IUPAC). El reporte de esta base, timina (T) en vez de una guanina (G), no pudo ser corregido manualmente ya que el electroforeograma mostraba que la señal de la base consensada, G, aparecía como ruido basal igual que las otras bases nitrogenadas adenina (A) y citosina (C). El detalle se muestra en la Figura 6-27. No se encontraron sustituciones ni surcos en la región del *chyBb* hasta la posición #565.



**Figura 6-27. Sustitución no corregible en la posición #2940 de pGAM:CHY#11.**

Con el primer SpPIG18\_FWD sobre el vector pPB:GAM:CHYBb#6 se obtuvieron lecturas confiables de más de 720 nt con 100% del consenso de identidad (nt 2,362-3,081), los cuales incluyen la coyuntura GAM:CHYBb fusionada sin defectos, por lo que el marco de lectura abierto no se altera. Sin hacer correcciones, del cDNA de *chyBb* se cubre con 100% de consenso hasta la posición #498, y haciendo dos correcciones legítimas de una sustitución y un surco, es posible extenderlo hasta la posición #578 (Figura 8-4).

De la clona pPB:GAM:CHYBb#23 una lectura con 100% de consenso de identidad se extiende 730 nt (2,357-3086). Esta lectura incluye la coyuntura de PBGAM:CHYBb en una región de alta calidad y alcanza a cubrir hasta la posición #503 del cDNA de *chyBb*, y tras la corrección legítima de dos surcos, es posible hacer lecturas confiables hasta la posición #579 (Figura 8-5).

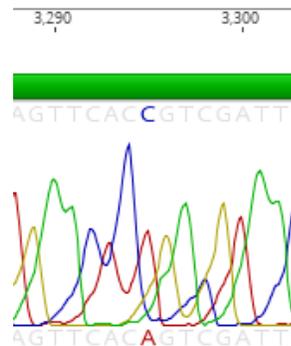
La secuencia de la región 3' de *glaA*, correspondiente al terminador, fue verificada usando el primer antisentido SpPIG18\_REV para las dos clonas de ambos vectores. Para la clona pGAM:CHYBb#6 se obtuvo una lectura de calidad aceptable de al menos 680 nt. Dicha lectura alcanza la posición #3,580 (posición del plásmido), lo que implica que es posible verificar la secuencia completa del

cDNA de *chyBb* al traslaparlo con la lectura dada por SpPIG18\_FWD ya que se llega a la posición #537 (desde el extremo 3', numeración *chyBb*) corrigiendo sustituciones aparentes producto de la baja calidad al final de la lectura y donde era posible interpretar la base correcta a través del ruido de fondo (Figura 8-6).

En cuanto a la clona pGAM:CHYBb#11, se obtuvo una lectura de calidad aceptable de aproximadamente 640 nt con un consenso de identidad de 98.89%. Aquellas sustituciones demostraron ser reportes equívocos hechos por el programa; las bases correctamente consensadas pudieron ser interpretadas como picos fácilmente distinguibles entre el ruido de fondo (Figura 8-7). Comparado con la clona #6, no fue posible traslapar una lectura confiable hasta el último nt interpretado con seguridad en la secuencia obtenida por SpPIG18\_FWD, y sólo se alcanzó una lectura sin ambigüedades hasta la posición #477 de la secuencia del cDNA de *chyBb* (recordar que el primer es antisentido).

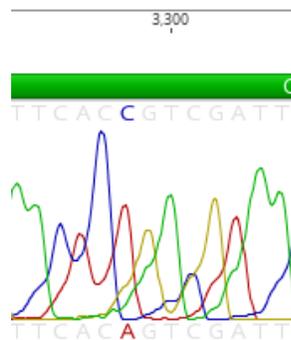
Para el vector de expresión inducible en medio sólido, de la clona pPB:GAM:CHYBb#6 se obtuvo una lectura de calidad aceptable de aproximadamente 740 nt con 99.1% de consenso de identidad; las sustituciones no fueron tomadas en cuenta ya que los picos de la base correcta se encuentran malinterpretados por algunas regiones de calidad pobre, por ejemplo la que se reporta en la base del nt #3,251: en este punto un dímero de citosina no pudo ser interpretado correctamente por la anticipación de un pico intenso de timina, no obstante, por la irregularidad de su frecuencia no son picos confiables y pueden ser revocados (Figura 8-8). La secuencia que abarca el cDNA de *chyBb* alcanza a ser interpretable sin ambigüedades hasta la posición #474 (desde el extremo 3', recordar que esta reacción se realizó en el sentido contrario), lo que permite ser empalmado hasta la lectura generada por SpPIG18\_FWD con 100% de consenso. Sin embargo, entre las sustituciones aparecidas, una de ellas no se trata de un error en el reporte automático de la base (#3,298), donde se reporta una adenina en vez de una citosina, y no es posible corregirlo manualmente debido a la

intensidad de la señal y a la ausencia tanto del pico correcto oculto entre el ruido de fondo, como de alguna adenina inmediata (Figura 6-27).



**Figura 6-27. Sustitución identificada en la clona pPB:GAM:CHYBb#6 que no pudo ser corregida manualmente.**

La clona pPB:GAM:CHYBb#23 generó lecturas de 760 nt con calidad aceptable, extensión que presentó consenso de identidad de 99.7%, provocadas por sustituciones, una de ellas corregible manualmente debido a una imposibilidad del programa para reportar la base correcta a través del ruido de fondo (Figura 8-9); la otra, corresponde, igualmente que la clona #6 de este mismo vector una sustitución no ambigua en la posición #3,298 (Figura 6-28).



**Figura 6-28. Sustitución no corregible en la clona pPB:GAM:CHYBb#23 ubicada en la misma posición que en la clona homónima #6.**

Aparentemente esta posible mutación es improbable ya que la tasa de error estimada para la polimerasa Q5® es muy baja ( $0.44/10^{-6}$  nt, en estudios de rondas sencillas), comparada con la extensión total del vector linearizado (8.3 kb) que

después de 30 ciclos sumaría no más de  $2.5 \times 10^5$  nt. No es trivial, sin embargo, calcular de los 0.7 fmoles de la reacción cuántos son efectivamente comenzados a polimerizar para hacer una estimación exponencial. Esta transversión, cualquiera que haya sido la causa, es de carácter silenciosa ya que en el código genético estándar los codones ACC y ACA son sinónimos de treonina. La lectura de la secuencia de *chyBb* se extendió hasta la posición #473 (desde el extremo 3'), por lo tanto es posible completar la lectura mediante la secuencia aportada por la reacción del primer SpPIG18\_FWD.

En el vector pPB:GAM:CHYBb se analizó el reemplazo del promotor nativo de *glaA* por el promotor heterólogo *PglaB* ya que la función de un elemento de regulación *cis* depende específicamente de los motivos internos (Ishida *et al.*, 2000). Usando el *primer* *PglaB\_F*, que se alinea al comienzo de la secuencia de *PglaB*, se obtuvo que para la clona pPB:GAM:CHYBb#6 había 98.7% de consenso de identidad abarcando una lectura de calidad de 630 nt. Esta lectura incluye los 356 nt de *PglaB* y 274 nt del extremo 5' del ORF de *glaA*. En dicha extensión se encontraron tres sustituciones en la secuencia de *PglaB*, en las posiciones 604 (A por G), 610 (C por T), 624 (C por T) y 665 (G por T) -numeración del plásmido. Sin embargo, esta falta de consenso surgió sólo en contraste con la secuencia reportada por Cerqueira *et al.* (2014), ya que cuando fue alineada con la secuencia promotora del ORF de *glaB* tal como está publicada por Hata *et al.*, (1998), la secuencia *PglaB* alcanza un 100% de consenso, y así es como se muestra en la Figura 8-10. En el extremo 5' del ORF de *glaA* también se encontraron sustituciones en la posición 817 (T por G) y 829 (G por A), ubicados en el primer exón, y en la posición 942 (T por G) y 1010 (T por G), del primer intrón. Todas estas son ambigüedades que pudieron ser corregidas manualmente ya que había picos de intensidad comparable no reconocidos por el programa de reporte de base.

De la clona pPB:GAM:CHYBb#23 se obtuvo una lectura de calidad aceptable extendiéndose aproximadamente 500 nt desde el principio del promotor hasta

mediados del primer intrón de *glaA* (Figura 8-11). En esta secuencia se encontraron las mismas cuatro inconsistencias en el promotor de *glaB* con respecto a Cerqueira *et al.* (2014), y fueron modificadas manualmente en los mapas del plásmido bajo el mismo razonamiento que la clona anteriormente descrita. Similarmente, al final de la lectura, las sustituciones aparentes en el ORF de *glaA* fueron debidas a la mala calidad de la extensión de la cadena y a la separación electroforética de una secuencia ya muy larga, así que fueron corregidas manualmente.

Dado que la construcción de pPB:GAM:CHYBb fue derivada del vector pGAM:CHYBb#6, la región en común que fue secuenciada (5' del ORF de *glaA*) sirvió para asumir que en las clonas pGAM:CHYBb no hubiera mutaciones producto de la polimerasa o la exposición a la radiación UV (aunque de onda larga) del transiluminador, respectivamente usadas durante la amplificación y el aislamiento de *glaA* para la clonación inicial, ni en la subclonación de *chyBb*.

Para el vector pGAM:CHYBb se eligió la clona #6 ya que sólo en esta clona pudo confirmarse la ausencia de mutaciones en la secuencia completa del gen de la proquimosina, y también en las lecturas de buena calidad que abarcaron la al exón 5 de *glaA*. Para el vector pPB:GAM:CHYBb se eligió la clona #23 ya que la lectura del cDNA de *chyBb* es de mejor calidad.

#### 6.4 TRANSFORMACIÓN DE *Aspergillus niger*

Se manipuló la cepa *A. niger* AB4.1 (*cspA1*, *pyrG*) (van Hartingsveldt *et al.*, 1987) debido a que su auxotrofia para la síntesis de uridina puede ser curada eficientemente con el marcador *pyrG* (Arentshorst *et al.*, 2015), además, esta cepa se deriva de *A. niger* NRRL3 (N400 en otros ceparios), cuyo genoma ha sido curado a mano y se encuentra publicado, lo que facilita la clonación de secuencias por PCR, como fue demostrado en este caso (MycCosm, 2017).

Nuestro protocolo de cotransformación mediada por ondas de choque no produjo ninguna clona transformante, sin embargo, se descartó que la causa se

debiera a factores biológicos ya que se había probado la capacidad seleccionable del vector pPYRG, y con el control positivo se confirmó la viabilidad de las esporas. Por lo tanto, son las condiciones en la generación de ondas de choque las que no estaban siendo efectivas, y esto se podría deber a un efecto destructivo de las ondas sobre el material genético, como sugieren Gómez-Lim *et al.*, (2015), sin embargo ni ellos ni nosotros procedimos a comprobar esta posibilidad (analizando la mezcla de transformación mediante electroforesis antes y después de la exposición a la ondas). El efecto destructivo del pDNA podría ser mayor que dicho artículo ya que en este trabajo se utilizó una intensidad de onda aproximadamente tres veces mayor (20 kV contra 7.5). Empero, esta diferencia en la intensidad estaba justificada ya que en un generador electrohidráulico con reflector elipsoidal la focalización de las ondas es menor que un generador piezoeléctrico, y de este modo se compensa la disipación de la energía, además de que el rango de intensidad de estos generadores es de 15 a 30 Kv (Loske, 2007).

En cuanto a la cantidad de ondas de choque, Gómez-Lim *et al.*, (2015) probaron distintos valores, de 50 a 400 ondas, y únicamente los tratamientos de 100 y 200 ondas produjeron transformantes, por lo que se supone que con más exploración en el número de ondas se podrían encontrar condiciones de transformación para el generador MEXILITH.

La cotransformación por fusión de protoplastos produjo para el vector de expresión pPB:GAM:CHYBb un total de 21 transformantes y se observó una eficiencia de transformación de 9 a 26 transformantes/ug de DNA seleccionable, y un promedio de 16.6. Para el vector pGAM:CHYBb se obtuvieron 14 transformantes y una eficiencia de 2 a 5 transformantes/ug y un promedio de 4. Se demostró que no eran transformantes abortivas al subcultivar en medio mínimo fresco.

Esta eficiencia de entre 4 y 26 transformantes/ug de DNA es baja o moderada comparada con la de otros reportes para *Aspergillus niger* usando distintas

versiones del mismo marcador y otras metodologías para la preparación y fusión de los protoplastos. En dichas investigaciones se ha reportado una eficiencia de 50 transformantes/ug de pGW613, un vector con un inserto de 5.0 kb del gen *pyrG* en el plásmido pBR325 (Goosen *et al.*, 1987); en otro estudio, el vector pAB4.1, con un inserto de 3.8 kb del gen *pyrG* clonado en el plásmido pUC19 produjo 40 transformantes/ug (van Hartingsvelt *et al.*, 1987).

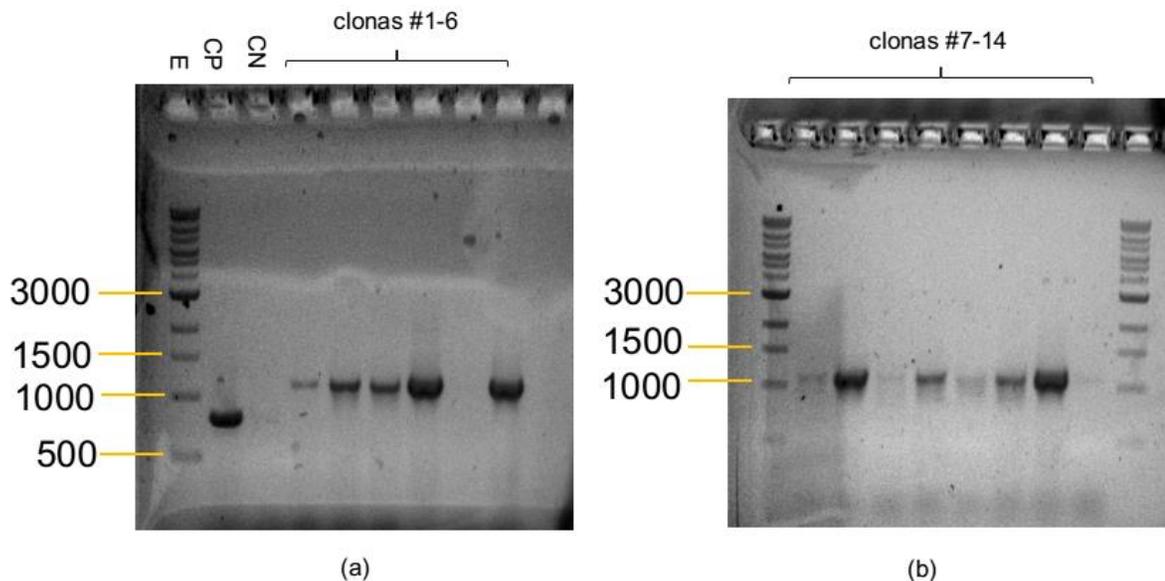
Nuestro vector pPYRG estaba basado en el vector pAB4.1, así que la comparación con este vector es más válida que con otros que contengan fragmentos de mayor o menor tamaño, sin embargo, la naturaleza del vector de recepción también impacta sobre los eventos de transformación, sobre todo a nivel cualitativo, como lo han demostrado van Hartingsvelt *et al.*, (1987), quienes observaron que este vector se podía integrar haciendo reemplazos, integrando el vector completo en tándem, o bien el vector completo en diferentes locaciones, y estas distintas formas de integración podían ocurrir vía la secuencia del vector receptor pUC19.

La eficiencia de transformación también es dependiente de la preparación de las células y del método de fusión, por ejemplo, con el vector pAB4.1 una investigación transformando con el método de Yelton *et al.* (1984) reporta eficiencias de 100 transformantes/ug (Mattern *et al.*, 1987). Además, no se descartó que errores de carácter humano en el tratamiento de los protoplastos, de manera análoga al lote el estado de las enzimas líticas (de Bekker *et al.*, 2009), impactaran en la eficiencia de transformación.

Adicionalmente, con la generación de estas cepas *pyr*<sup>+</sup> demostramos que el vector pJET1.2 puede ser usado para integraciones en *A. niger*. Sin embargo, estudios sobre la naturaleza de éstas integraciones y el destino de este vector, son necesarios.

La integración del vector de expresión fue investigada mediante PCR. Para buscar la presencia del vector pGAM:CHYBb se utilizaron los primers Fus\_Chyl\_F & R para amplificar la secuencia *chyBb* más alrededor de 20 nt a izquierda y

derecha, generando teóricamente un amplicón de 1153 pb. El resultado se muestra en la Figura 6-29.

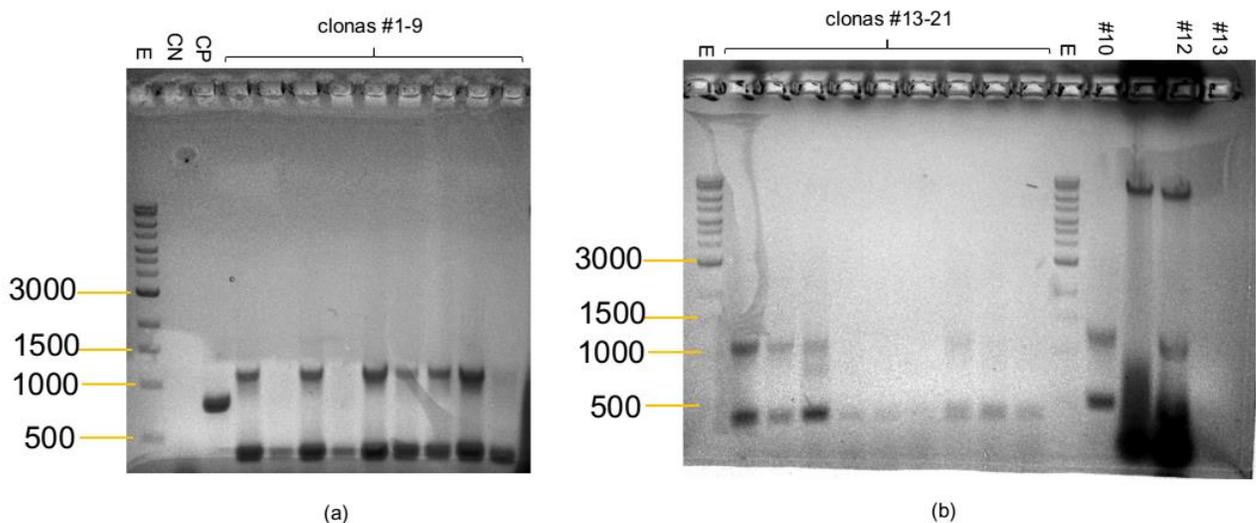


**Figura 6-29. (a) Transformantes gamchy #1 al 6, todas contienen el gen *chyBb* (1,153 pb) salvo la #5; CP: región de 808 pb en el gen nativo *glaA*; CN: *A. niger* AB4.1 amplificado con primers para *chyBb*. E: escalera de 1 kb (New England Biolabs). (b) Transformantes #7 a 14, aunque de intensidad irregular, en todas se observan bandas de *chyBb*.**

Se determinó que al menos 9 de las 14 clonas eran positivas, la #1-4, 6, 8, 10, 12, y 13. Esto implica que la eficiencia de cotransformación fue de 64%. Se consideró negativa la clona #5 y presuntamente negativas las clonas #7, 9, 11 y 14 debido a la extremadamente baja intensidad de las bandas y a que siguen después de una banda de mucha intensidad, por lo que se consideran posibles falsas positivas. No obstante, estas clonas también fueron conservadas para subsecuentes análisis. Para los ensayos preliminares de expresión se seleccionaron todas las clonas excepto gamchy#5.

Las clonas cotransformantes del vector inducible en estado sólido pPB:GAM:CHYBb fueron identificadas mediante la presencia tanto del gen *chyBb* y el promotor de *glaB* (406 pb), amplificados simultáneamente en una misma

reacción usando dos juegos de primers. Los amplicones resueltos se muestran en la Figura 6-30.



**Figura 6-30. (a) Transformantes pbgamchy #1 a 9. Las clonas positivas muestran amplificación tanto del gen *chyBb* (1,153 pb) como del promotor de *glaB* (406 pb); CP: región de 808 pb en el gen nativo *glaA*; CN: *A. niger* AB4.1 amplificado con primers para *chyBb* y *PglaB*. E: escalera de 1 kb (New England Biolabs). (b) Transformantes pbgamchy #13 a 21, al final #10, 12 (mezclado con miniprep del gDNA), y 13.**

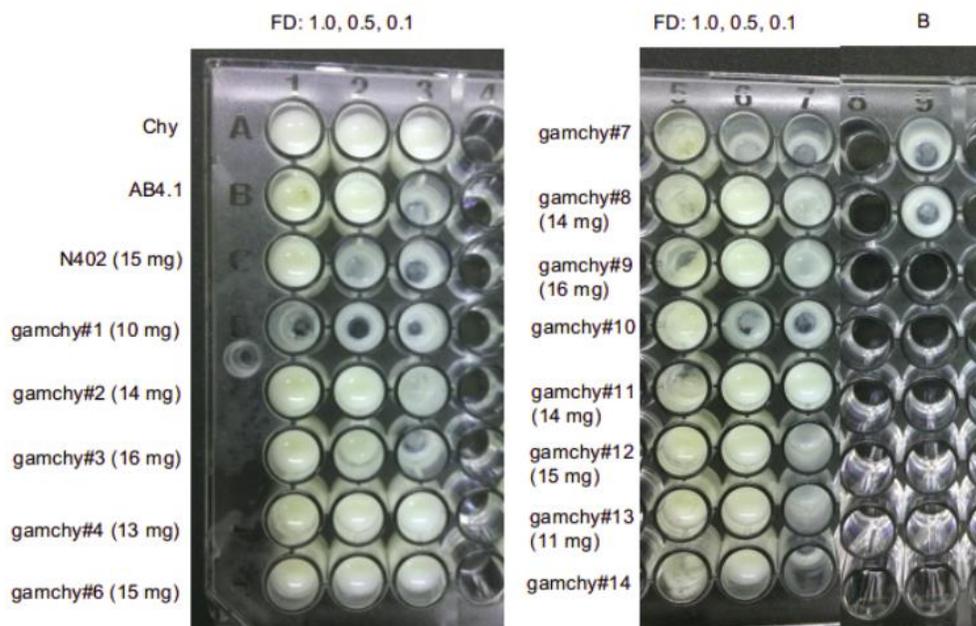
Se obtuvieron 12 clonas positivas de 21, por lo tanto una eficiencia de cotransformación de 57.1%, mayor a la eficiencia para pGAM:CHYBb pero esto coincide con adición de una proporción menor de vector de expresión durante el protocolo de transformación. Clonas presuntamente positivas son la #9 y la #20, que también se reservaron en conservas para analizarse ulteriormente.

Dado que algunas clonas amplificaron únicamente el promotor de *glaB*, se consideraron negativas, esto pudiera estar sugiriendo una integración dispersa del vector, sin embargo, esta investigación lo atribuye a una amplificación dispereja debido a que el tiempo de polimerización limitante fue el del inserto mayor. El sustento de este fenómeno está en el hecho de que no se encontraron transformantes que únicamente tuvieran el inserto correspondiente a *chyBb*, lo que debió de haber ocurrido si se tratara de una integración dispersa e incompleta

del vector. La sobreamplificación de *PglaB* también se sustenta en que cuando ésta aparece únicamente, la banda en ninguno de los casos observados llega a ser tan intensa como en las transformantes positivas para ambos genes.

## 6.5 ENSAYOS DE EXPRESIÓN

Se hizo una prueba preliminar de coagulación láctea para evaluar la capacidad de secreción de todas las clonas positivas determinadas por PCR. En la Figura 6-31 se muestra el resultado.



**Figura 6-31. Ensayo de coagulación láctea. CHY-MAX M (chy), controles negativos (*A. niger* AB4.1 y *A. niger* N402), clonas positivas (gamchy#1-14, peso del micelio entre paréntesis), factor de dilución (FD), y blanco (B).**

La cepa AB4.1 mostró dificultad para desarrollar somáticamente en el medio de Gheshlaghi y esporuló tempranamente. Wang *et al.* (2003), en cultivos sumergidos de *A. oryzae*, encontraron que la aparición de conidiosporas siempre iba acompañado de elevadas actividades proteolíticas. Así que se decidió considerar como control negativo sólo a la cepa N402. Se encontró que las cepas gamchy#4, gamchy#6 y gamchy#11 coagularon el sustrato hasta en la última

dilución. La biomasa acumulada indicó que la cepa gamchy#4 podía ser una mejor productora, ya que el micelio alcanzó sólo 13 mg, mientras que el micelio de la #6 y #11 fue de 15 y 14 mg respectivamente, de modo que la secreción específica de quimosina podría ser mayor. Las clonas #4 y #6 coinciden con la amplificación de bandas intensas en la PCR analítica (Figura 6-29).

La ocurrencia de coagulación en los controles negativos puede deberse a la presencia de proteasas capaces de desestabilizar las micelas de caseína. Bailey *et al.* (1988) encontraron que en una fermentación de 4 días de *Aspergillus niger*, cada mililitro de sobrenadante tenía 4 unidades coagulación láctea. En el sobrenadante de las transformantes control (plásmido vacío) de *A. nidulans*, Cullen *et al.* (1988) también encontraron actividad de coagulación láctea, de al menos 1/10 de las transformantes positivas.

La actividad proteolítica de *A. niger* podría provenir de proteasas como PEPA y PEPB, cuya expresión es inducida en las condiciones ácidas propias de un cultivo prolongado y durante la fase autolítica, y puede estar desreprimida por péptidos en el medio de cultivo. Esta fermentación duró siete días y el medio, aunque suplementado con una fuente de nitrógeno primaria (hidróxido de amonio), estuvo suplementado con 34 g/l de peptona y 0.5 g/l de extracto de levadura. Ahamed *et al.* (2005) mostraron cómo un medio definido aumentaba la actividad proteolítica en el sobrenadante de *A. niger* NRRL3 de 100 U/l hasta casi 400 U/l cuando se añadía extracto de levadura a 3 g/l, y de aproximadamente de 120 U/l a 400 U/l cuando se agregaba peptona a 2 g/l. Además, a pesar del buffer de dilución, no se puede descartar totalmente que en una dilución 1/2 la acidez haya sido suficiente para provocar coagulación en la leche.

Transformantes como la gamchy#4 y #6 podrían ser seleccionadas para fermentaciones en matraz utilizando un medio de cultivo diseñado para limitar la expresión de proteasas celulares, primeramente mediante regulación de pH con citrato de sodio (pH 6.1) (Ward *et al.* 1990), y en segundo término mediante represión utilizando urea, una fuente preferida de nitrógeno insensible a la

desrepresión por proteína hasta en una proporción de 1% (Jarai & Buxton, 1994). Este rigor en las condiciones de fermentación tiene el propósito de compensar los bajos niveles de expresión de proquimosina obtenidos en una cepa de *A. niger* con el fenotipo nativo de *glaA* como la AB4.1, ya que de estos cassettes de expresión se podría sacar mayor provecho en cepas hipersecretoras de glucoamilasa (Ward *et al.*, 1990).

Las muestras del cultivo habrían de ser tomadas a los 4 días de fermentación, cuando, de acuerdo a Ward *et al.* (1990), todavía hay proquimosina que no ha sido activada. De este modo, tras la activación, se esperaría encontrar aumentos en la capacidad de coagular del sobrenadante. Además, según Mackenzie *et al.* (1994), a este tiempo de fermentación y con el mismo medio de cultivo, la cepa AB4.1 habrá acidificado entre pH 6 y 5, por lo que teóricamente la proteasa aspártica mayoritaria (PEPA) no se habrá expresado en significativas cantidades. Lo anterior implica que si la proquimosina está siendo expresada, aún no se habrá degradado extensamente y la actividad de coagulación láctea podrá distinguirse de la proteólisis por PEPA.

## 7. CONCLUSIONES

El uso de PCR de alta fidelidad acoplado a técnicas de construcción independientes de endonucleasas tipo II facilitan considerablemente la construcción de vectores y permiten hacer construcciones sin dejar secuencias superfluas, aspecto de particular importancia para las fusiones de proteínas. Sin embargo, ensamblajes de múltiples partes como el propuesto para el vector de interrupción p $\Delta$ PEPA:HPH, aún requieren de labor artesanal intensiva para encontrar las clonas correctas.

Por otro lado, la técnica iVEC fue de gran utilidad para una modificación directa del gen *glaA* de *A. niger* contenido en el vector pGAM, y así obtener fácilmente un vector de expresión alternativo regulado por el promotor de la glucoamilasa B de *A. oryzae* cuya explotación es muy prometedora y sigue sin ser reportada. Adicionalmente, la secuencia *PglaB* implica que este vector es bifuncional, y servirá también para cepas *A. oryzae* en donde la expresión de proquimosina de búfalo fusionada también es de interés.

Las 21 transformantes positivas que en este proyecto se presentan requieren de análisis fisiológicos y moleculares más profundos para determinar su capacidad de expresión, no obstante, la utilidad intrínseca de los vectores construidos deberá de ser puesta a prueba en cepas con potencial industrial, previamente adaptadas al sistema de expresión que se está proponiendo, i.e. deficientes en actividad proteolítica extracelular e hipersecretoras de glucoamilasa A, ya que la expresión de proteínas heterólogas generalmente se alcanza en niveles bajos en cepas silvestres o sus derivadas, como la de *A. niger* AB4.1 usada en este proyecto.

## 8. ANEXO

### 8.1 MAPAS DE VECTORES

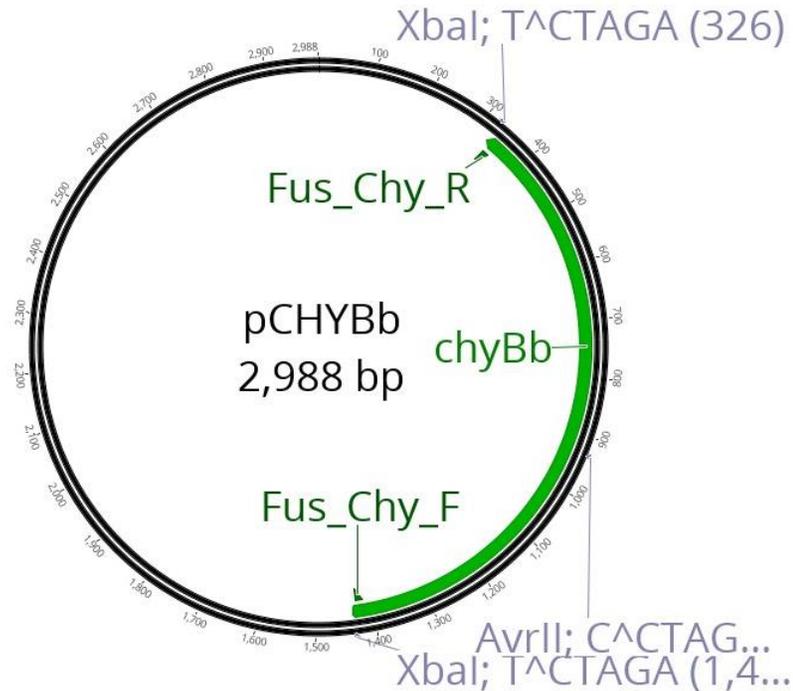


Figura 8-1. Mapa del vector pCHYBB donde fue clonado el cDNA sintético de la proquimosina de búfalo.

### 8.2 OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS

Se muestran en dirección 5'-3'. En el caso de primers quiméricos, las regiones subrayadas corresponden las secuencias de hibridación.

glaA\_F: GATCCGAACTCCAACCGG

glaA\_R: TGTTTCCCATGATGGATAAGCC

PglaB\_ivRC\_F: GCTCGAGTTTTTCAGCAAGACCAGTGAGAACTAAGAGAATG

PglaB\_ivRC\_R:

GCTCAGGGCGAGTAGAGATCGGAACGACATGATGGTGGTGA<sup>CTTCCAAG</sup>

L\_PROMgam\_F: ATGTCGTTCCGATCTCTACTCG

L\_PROMgam\_R: TCTTGCTGAAAACTCGAGCC

Fus\_Chyl\_F: ATCAACCTCCTGTACCACTCCCATGGCTGAGATCACCCG

Fus\_Chyl\_R: TATAGCGAAATGGATTGATTGTTCAGATGGCTTTGGCCAG

L\_pGAM\_F: ACAATCAATCCATTTTCGCTATAGTTAAAGG

L\_pGAM\_R: GGGAGTGGTACAGGAGGTTG

pyrG\_F: TAACTGAAGTGACATAGGGTTCG

pyrG\_R: GACTTCCTAATACCGCCTAGTC

Qhph\_F: CTCTCTTGCTTGACATTCTCGTGGAAATCCCTTGTATCTCTAC

Qhph\_R: GCAGATCATAGACTCCACTTCAGTTCGAGTGGAGATGTGGAG

FHizqLARG\_FiVEC:

GAATATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATATTCCGCACCAGTCTCACG

FHizqR\_quim:

TGAGCCTGTGTGTAGAGATACAAGGGAATTCCACGAGAATGTCAAGCAAGAG

FHderF\_quim:

GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGAACTGAAGTGGAGTCTATGATC

FHderLARG\_Rivec:

CTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTATCTGCTGCCCTCCT

SpPIG18\_FWD: CTGGTCTTATGCTGCTCTG

SpPIG18\_REV: CTGTCTGTCTGGTCTTCTAC

PglaB\_F: CCAGTGAGAACTAAGAGAATG

RT-PCR\_F: TAGAATGGCTGAGATCACCC

RT-PCR\_R: TCTAGATCAGATGGCTTTGG

AN\_FHizqF: GCGTCGTAGCTTCTTCC

AN\_FHderR: GCTTGAAGTTGAATGCGAAATC

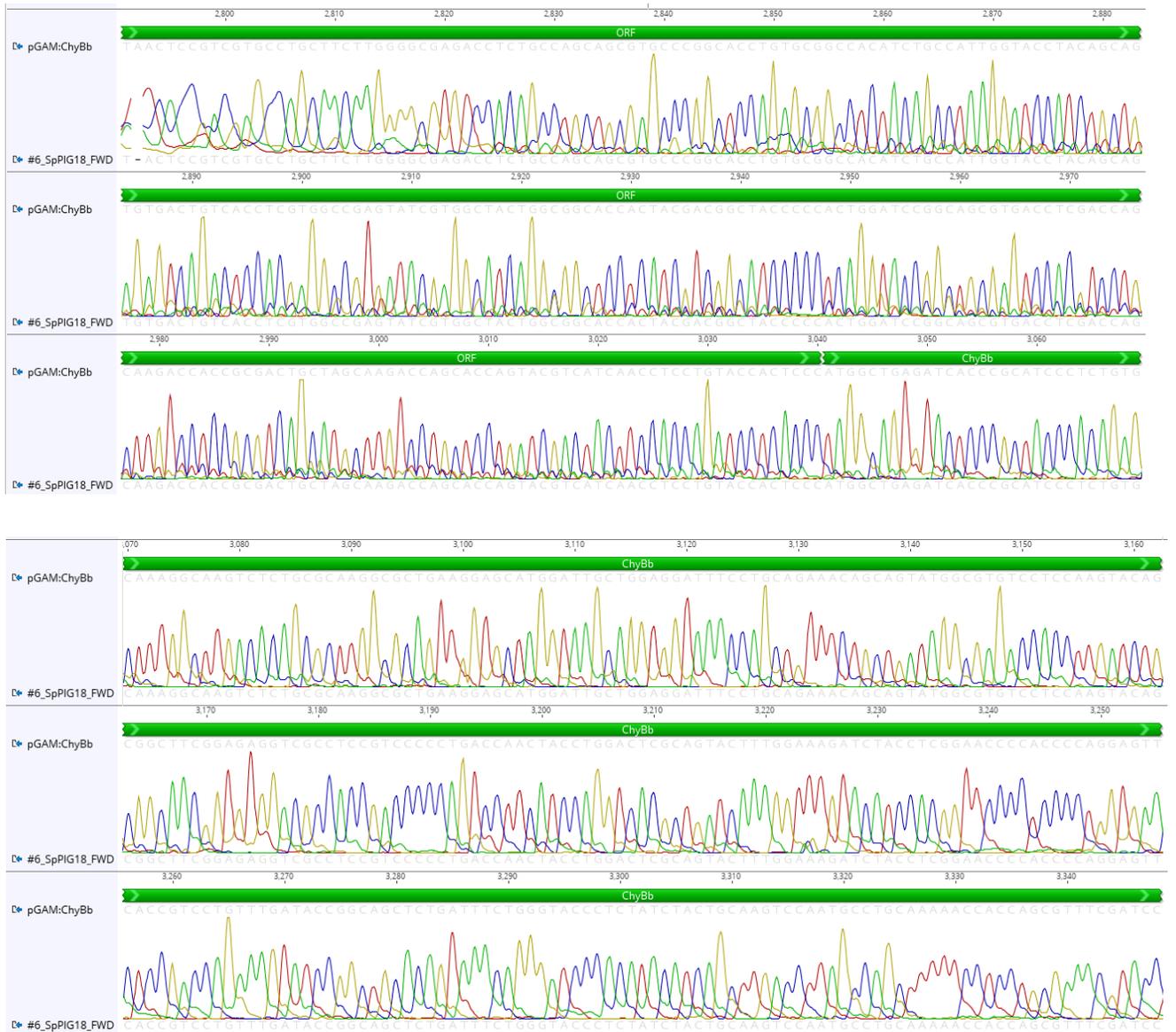
FHizq\_pepA\_R: CACGAGAATGTCAAGCAAGAG

### 8.3 CONDICIONES DE PCR

**Tabla 8-1. Condiciones de reacción para PCR. D<sub>0</sub>, desnaturalización inicial; D, desnaturalización, A, alineamiento; E, extensión; E<sub>f</sub>, extensión final; C, ciclos.**

Componente	DNA molde/ ul de reacción	Oligonucleótidos	D <sub>0</sub>	D	A	E	E <sub>f</sub>	C
<i>glaA</i>	900pg, gDNA <i>A. niger</i> AB4.1	<i>glaA</i> _F <i>glaA</i> _R	94 °C, 5'	98 °C, 10"	66 °C, 30"	72 °C, 3'	72 °C, 7'	34
<i>chyBb</i>	50 pg, pCHYBB	<i>Fus</i> _Chy_F <i>Fus</i> _Chy_R	98 °C, 30"	98 °C, 10"	65 °C, 30"	72 °C, 30"	72 °C, 7'	30
<i>pyrG</i>	730pg, gDNA <i>A. niger</i> N402	<i>pyrG</i> _F <i>pyrG</i> _R	94 °C, 5'	98 °C, 10"	65 °C, 30'	72 °C, 2'	72 °C, 7'	35
pGAM-linearizado sin promotor	70 pg, pGAM	L_PROMgam_F L_PROMgam_R	98 °C, 30"	98 °C, 10"	66 °C, 30"	72 °C, 4'	72 °C, 7'	30
pGAM-linearizado sin SBD	70 pg, pGAM	L_pGAM_F L_pGAM_R	98 °C, 30"	98 °C, 10'	66 °C, 30"	72 °C, 4'	72 °C, 7'	30
<i>PglaB</i>	700 pg, gDNA <i>A. oryzae</i> WT	<i>PglaB</i> _ivRC_F <i>PglaB</i> _ivRC_R	98 °C, 30"	98 °C, 10"	60 °C, 30"	72 °C, 30"	72 °C, 7'	36
pGAM:CHYB B-linearizado sin promotor	70 pg, pGAM:CHYBB	L_PROMgam_F L_PROMgam_R	98 °C, 30"	98 °C, 10"	66 °C, 30"	72 °C, 4'	72 °C, 7'	30
FHizq <i>pepA</i>	900 pg, gDN <i>A. niger</i> AB4.1	FHizqLARG_Fiv EC FHizqR_quim	94 °C, 5'	98 °C, 10"	64 °C, 30"	72 °C, 1'30"	72 °C, 7'	35
FHder <i>pepA</i>	900 pg, gDN <i>A. niger</i> AB4.1	FHderF_quim FHderLARG_Riv ec	94 °C, 5';	98 °C, 10"	61 °C, 30"	72 °C, 1'30"	72 °C, 7'	35
<i>hph</i>	40 pg, pAN7.1	Qhph_F Qhph_R	98 °C, 30"	98 °C, 10"	57 °C, 30"	72 °C, 3'20"	72 °C, 7'	35

## 8.4 ELECTROFOREOGRAMAS



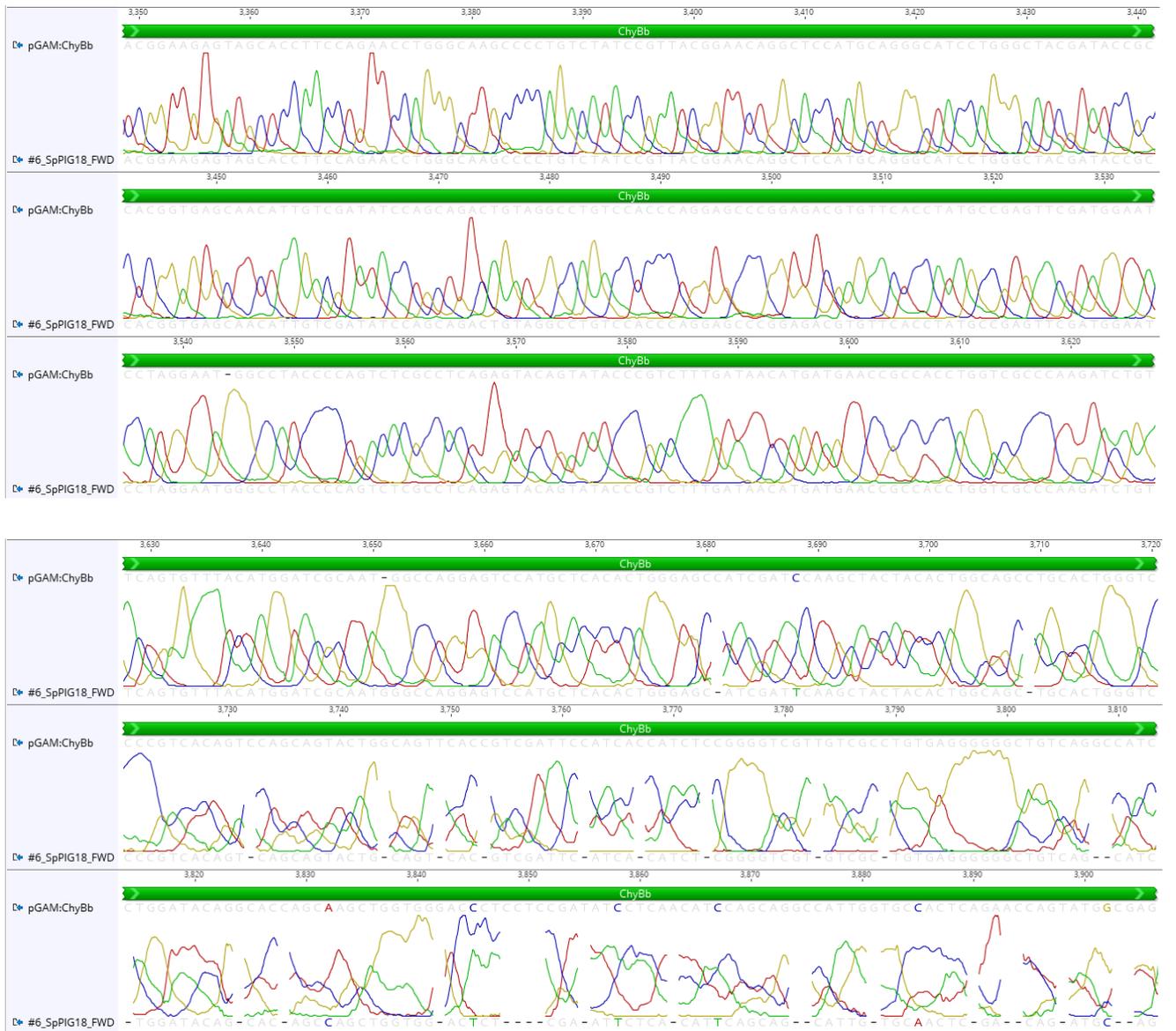
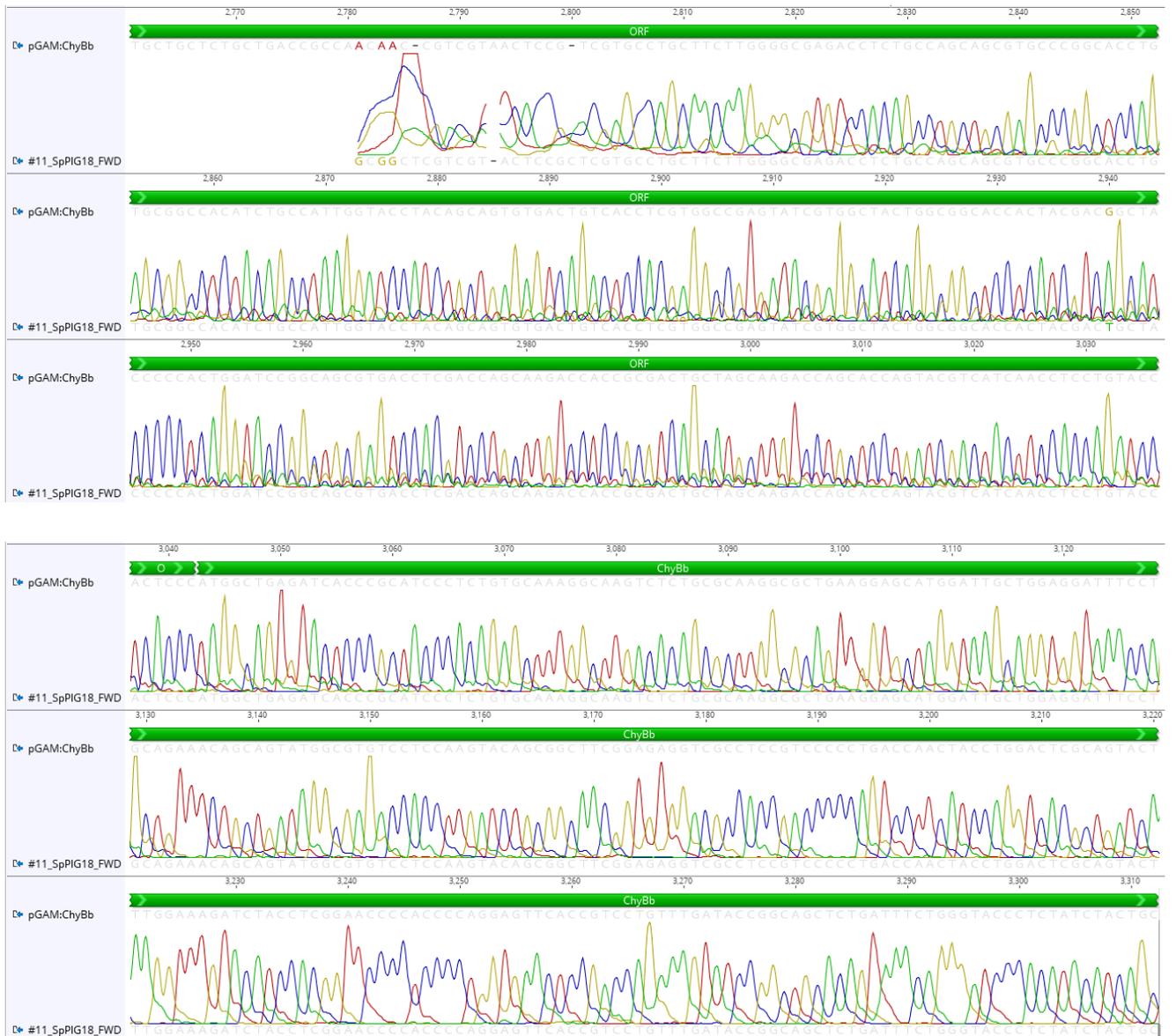


Figura 8-2. Clona pGAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18\_FWD.



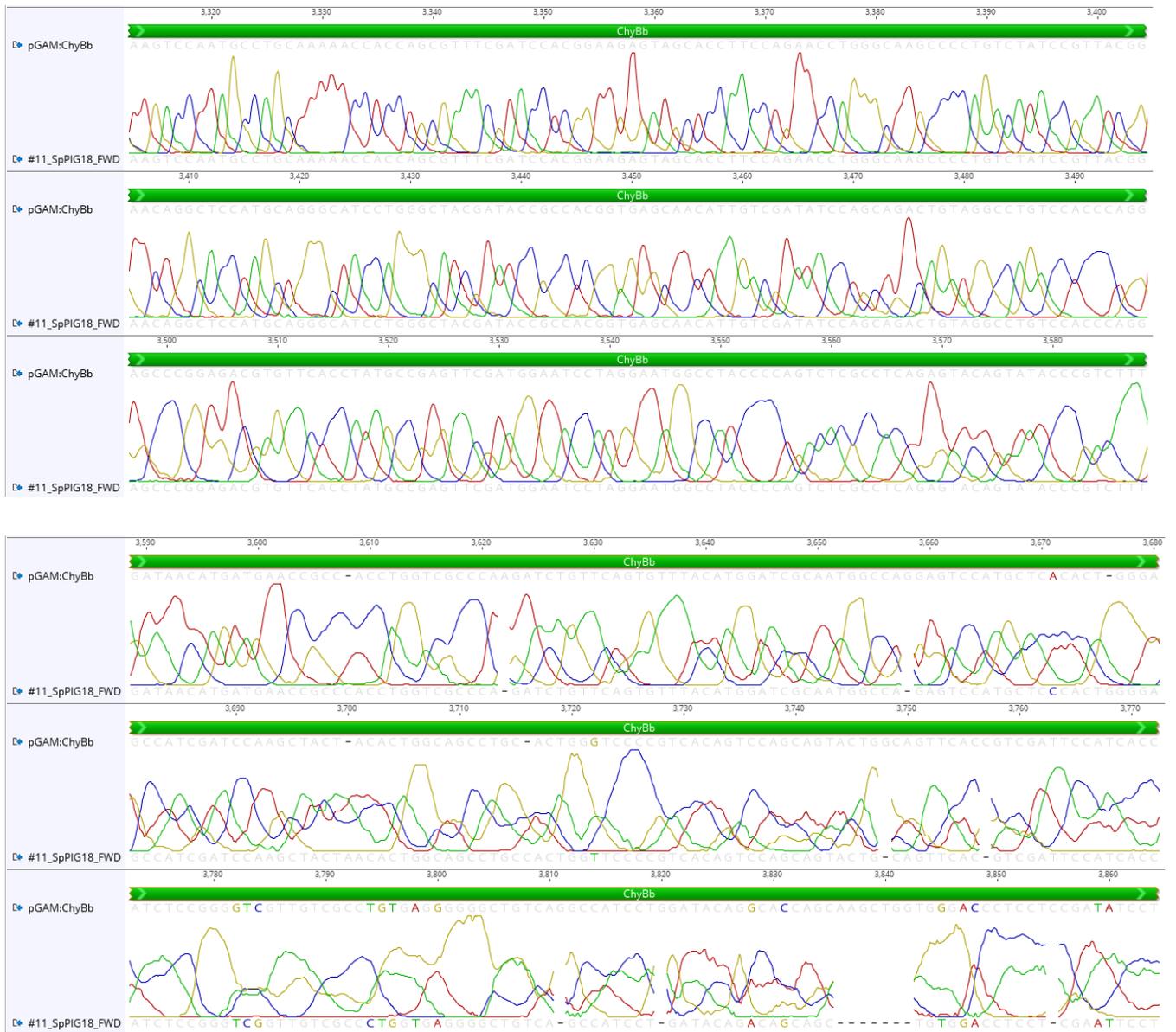
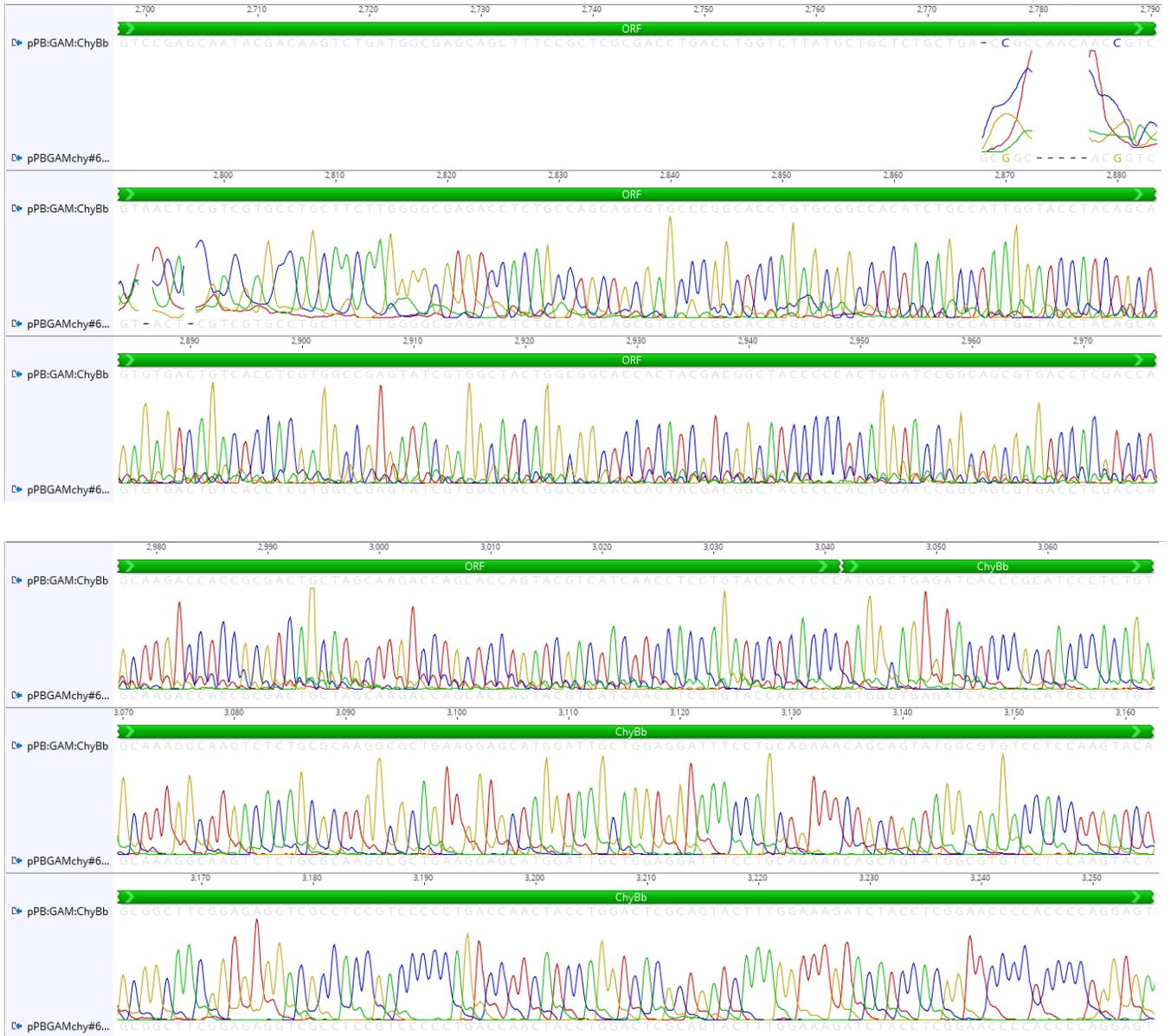


Figura 8-3. Clona pGAM:CHYBb#11, secuencia SpPIG18\_FWD.



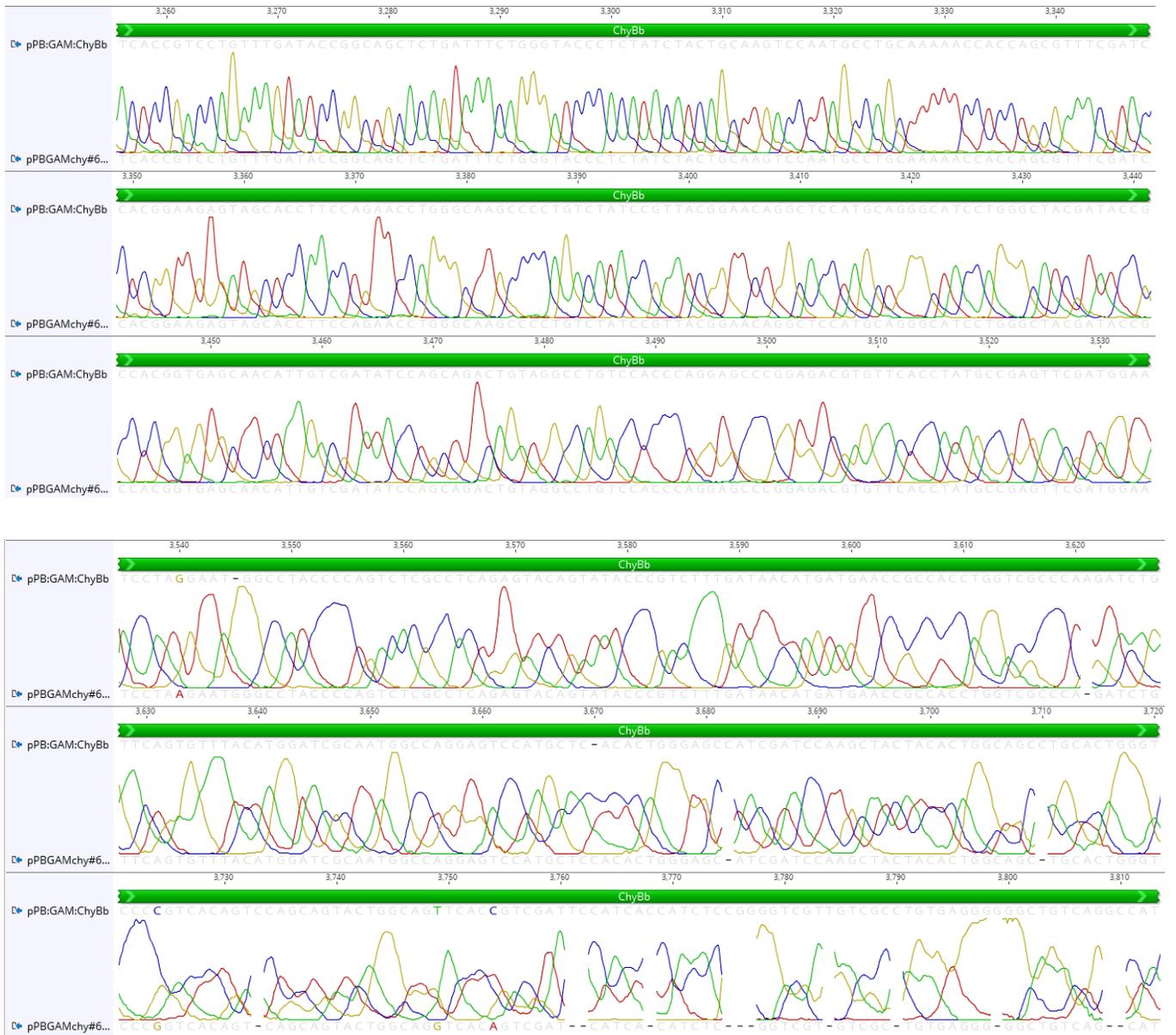
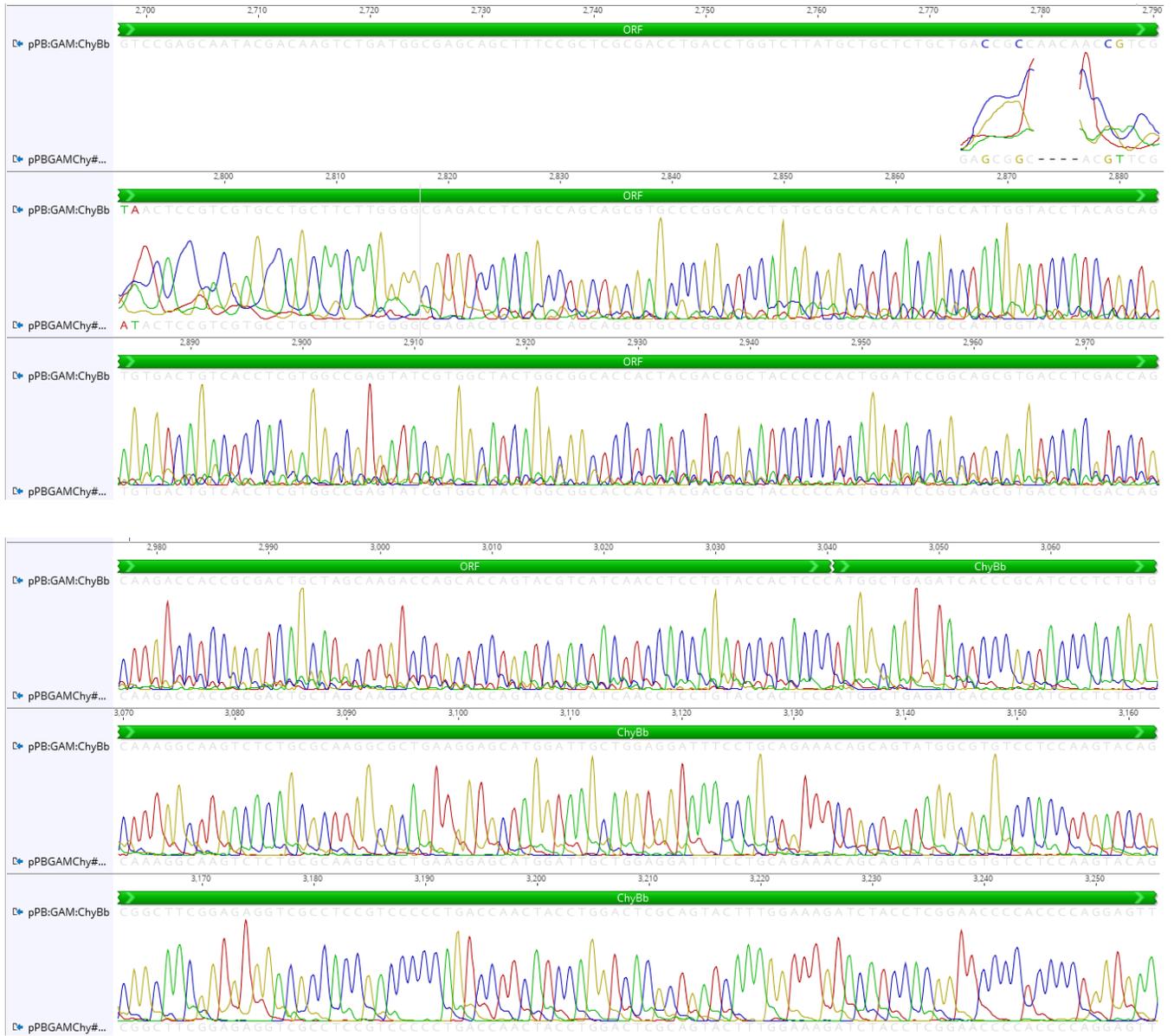
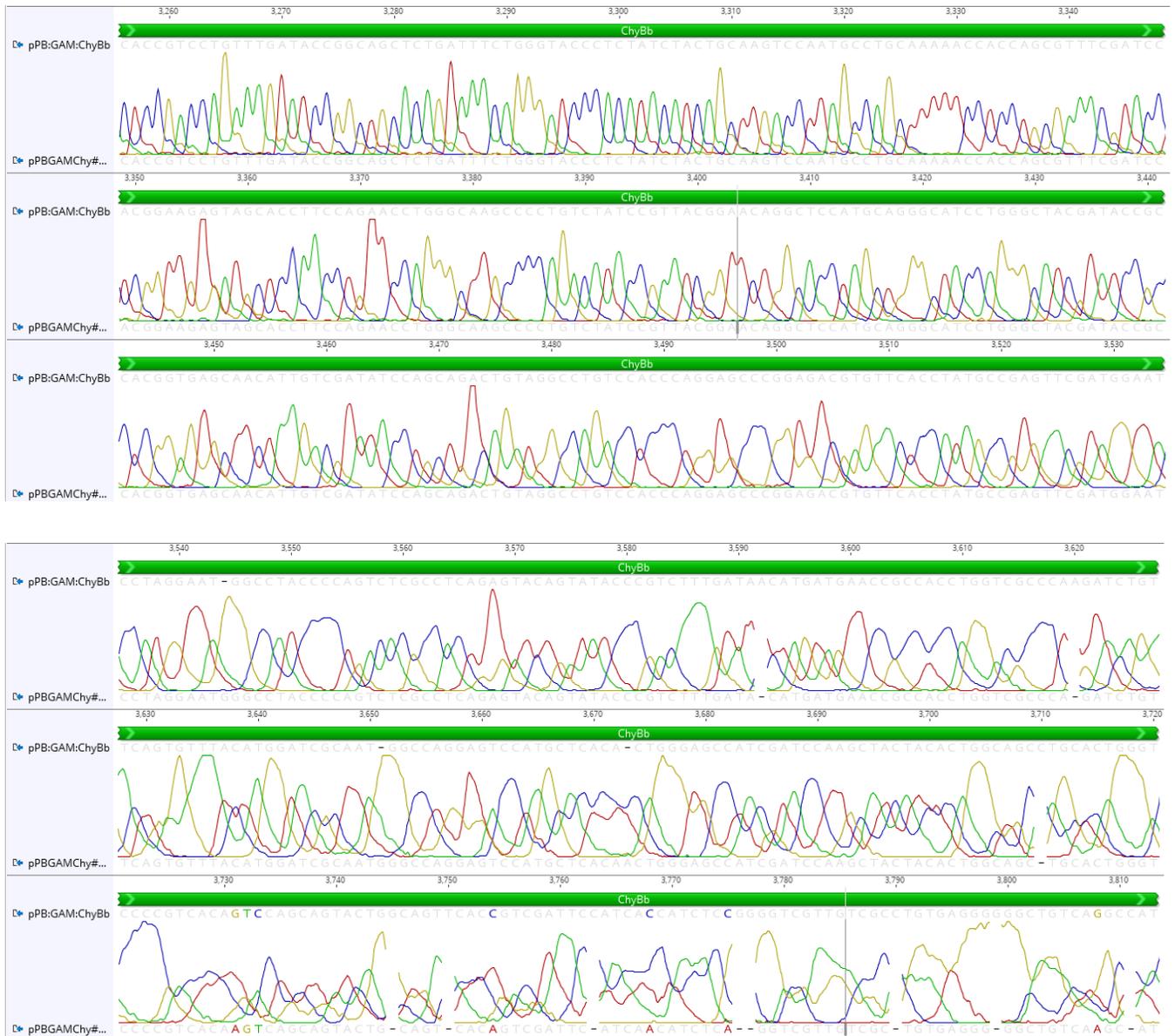
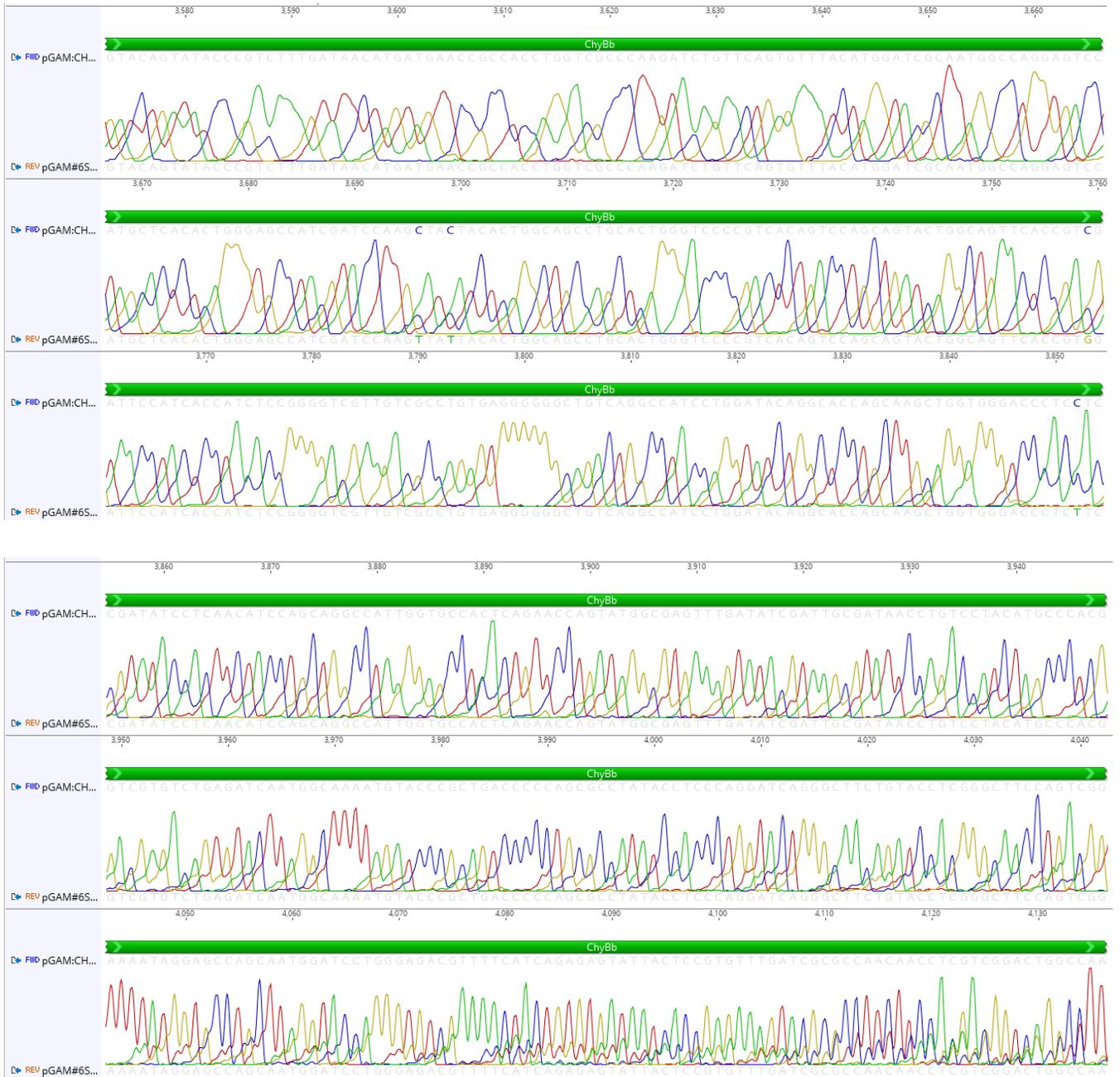


Figura 8-4. Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18\_FWD.





**Figura 8-5. Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia SpPIG18\_FWD.**



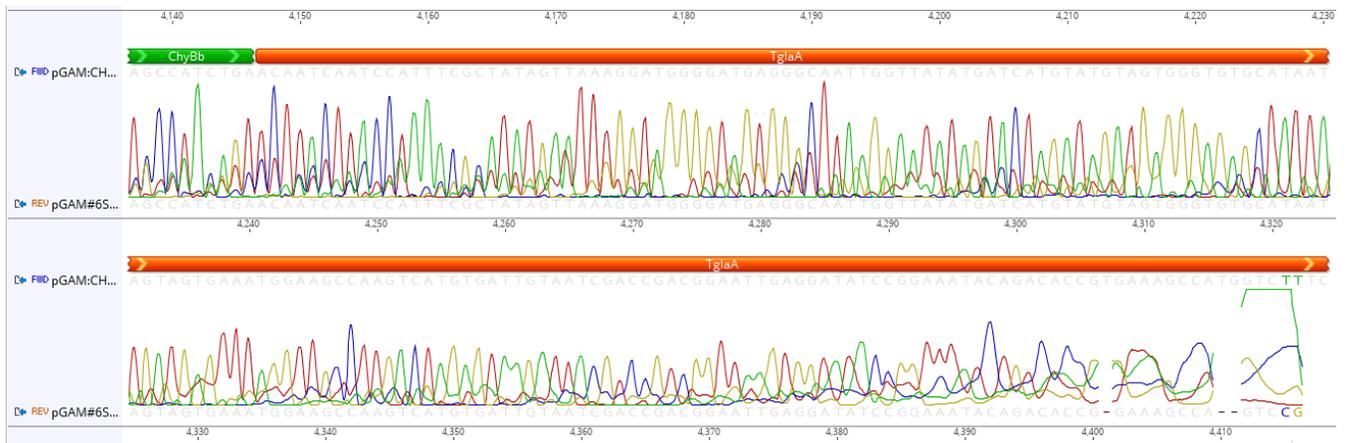
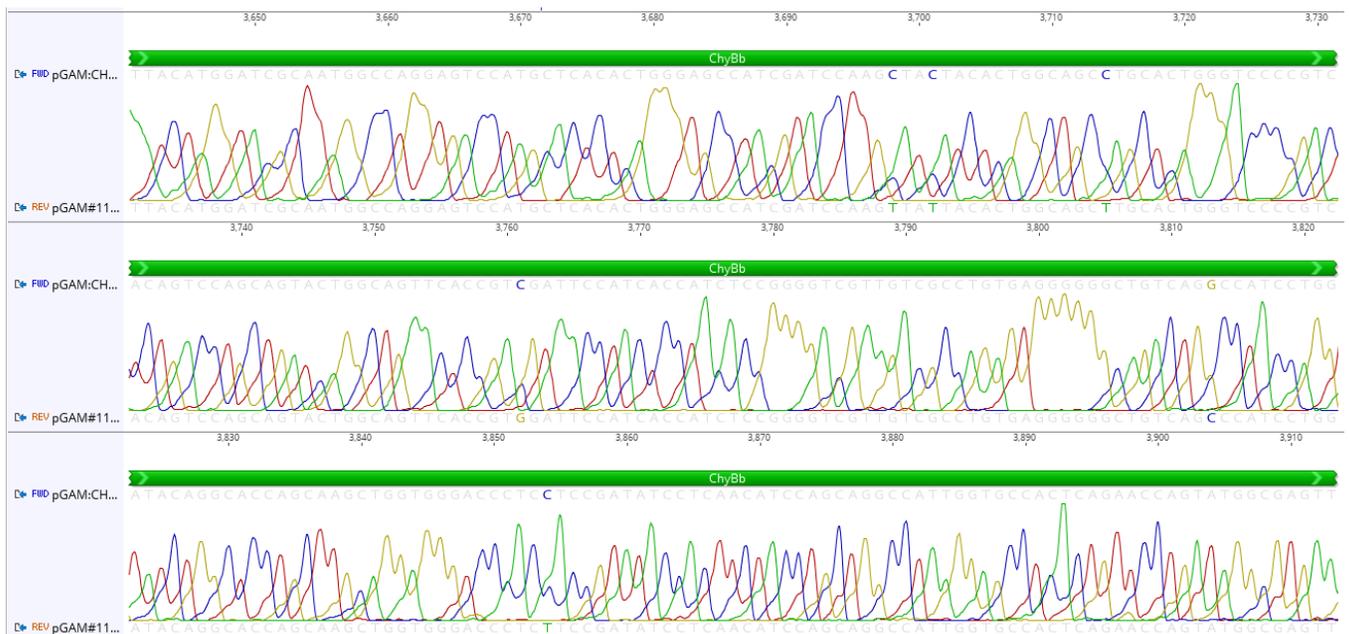


Figura 8-6. Clona pGAM:CHYBb#6, secuencia SpPIG18\_REV.



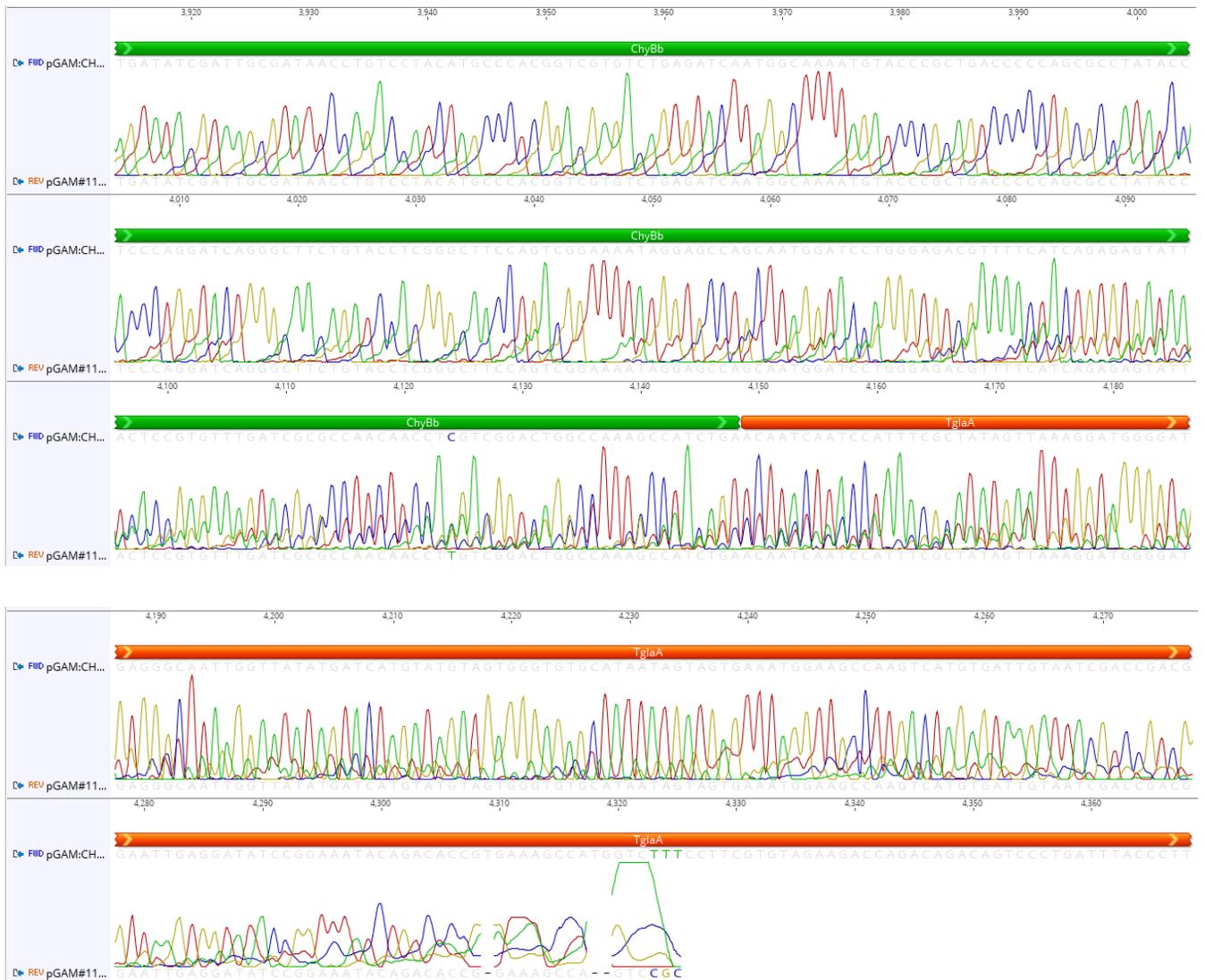
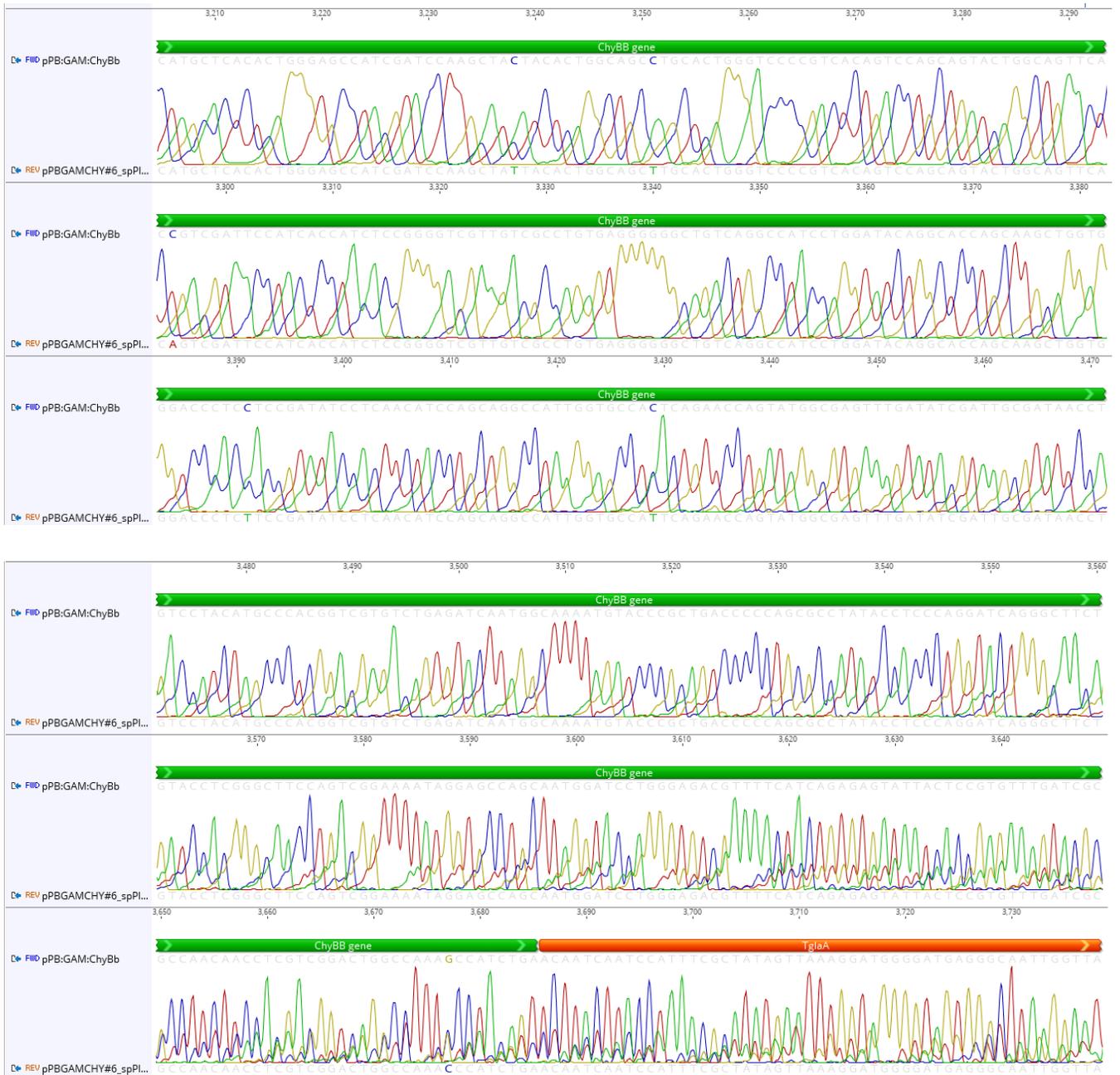
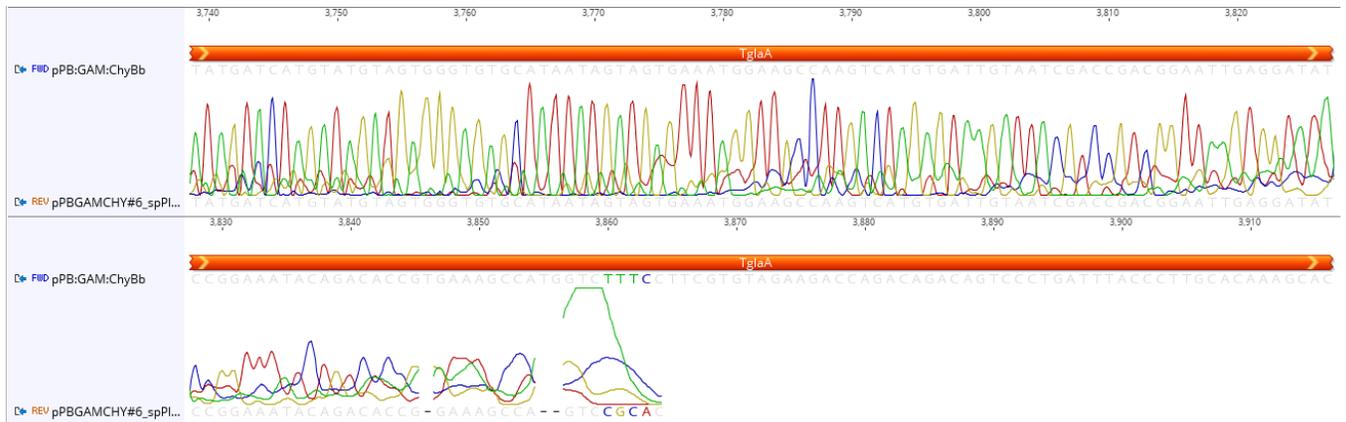
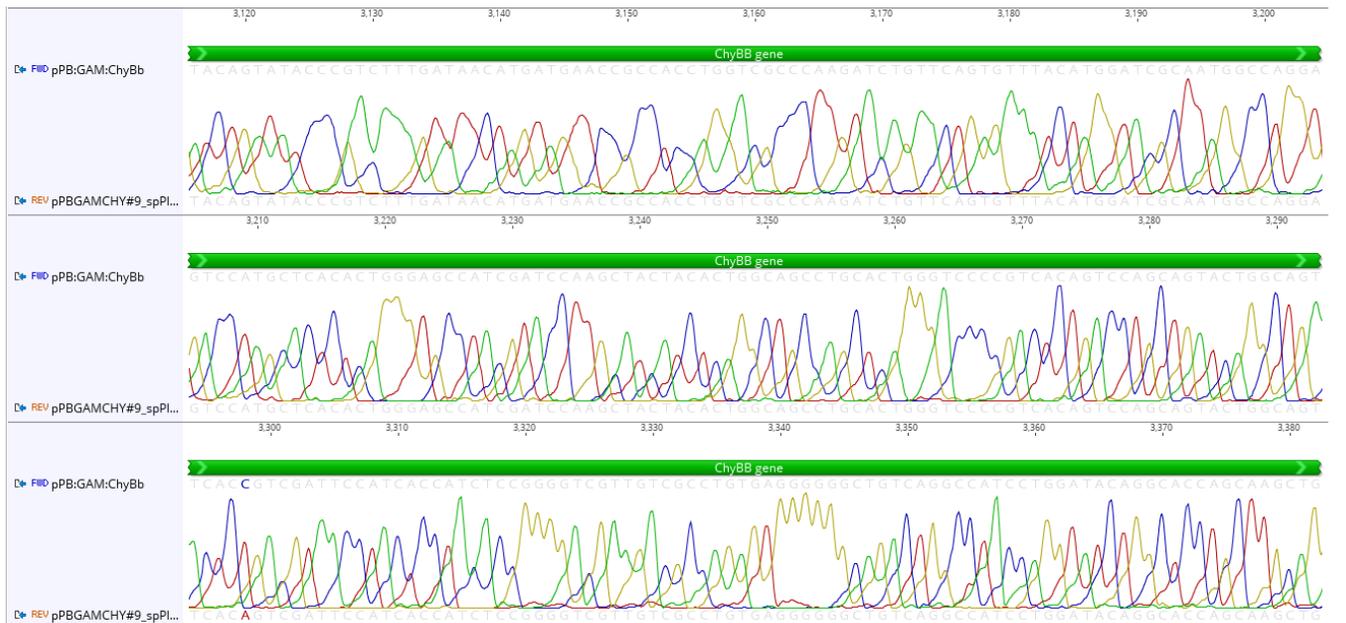


Figura 8-7. Clona pGAM:CHYBb#11, secuencia SpPIG18\_REV.





**Figura 8-8. Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia spPIG18\_REV.**



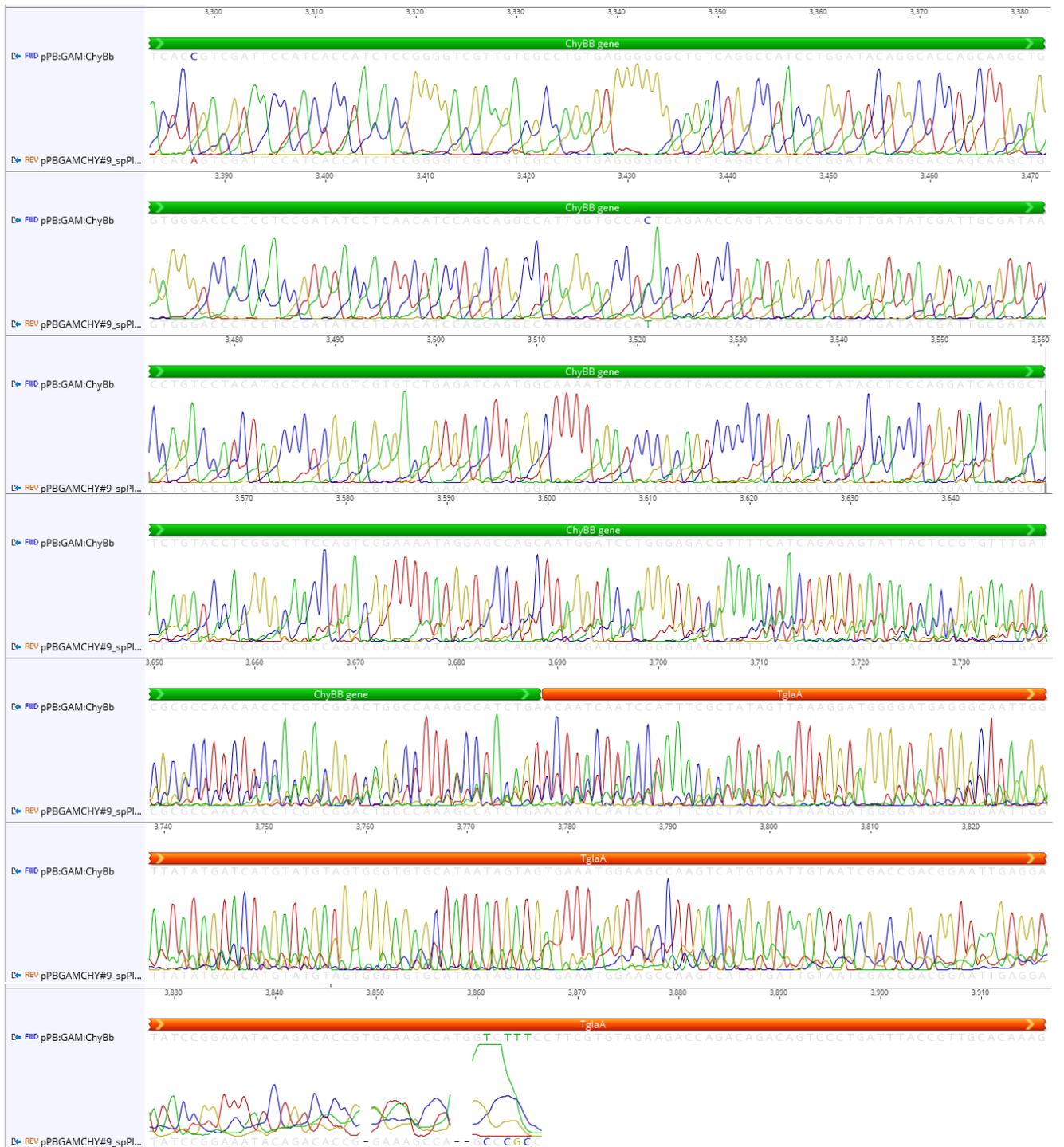
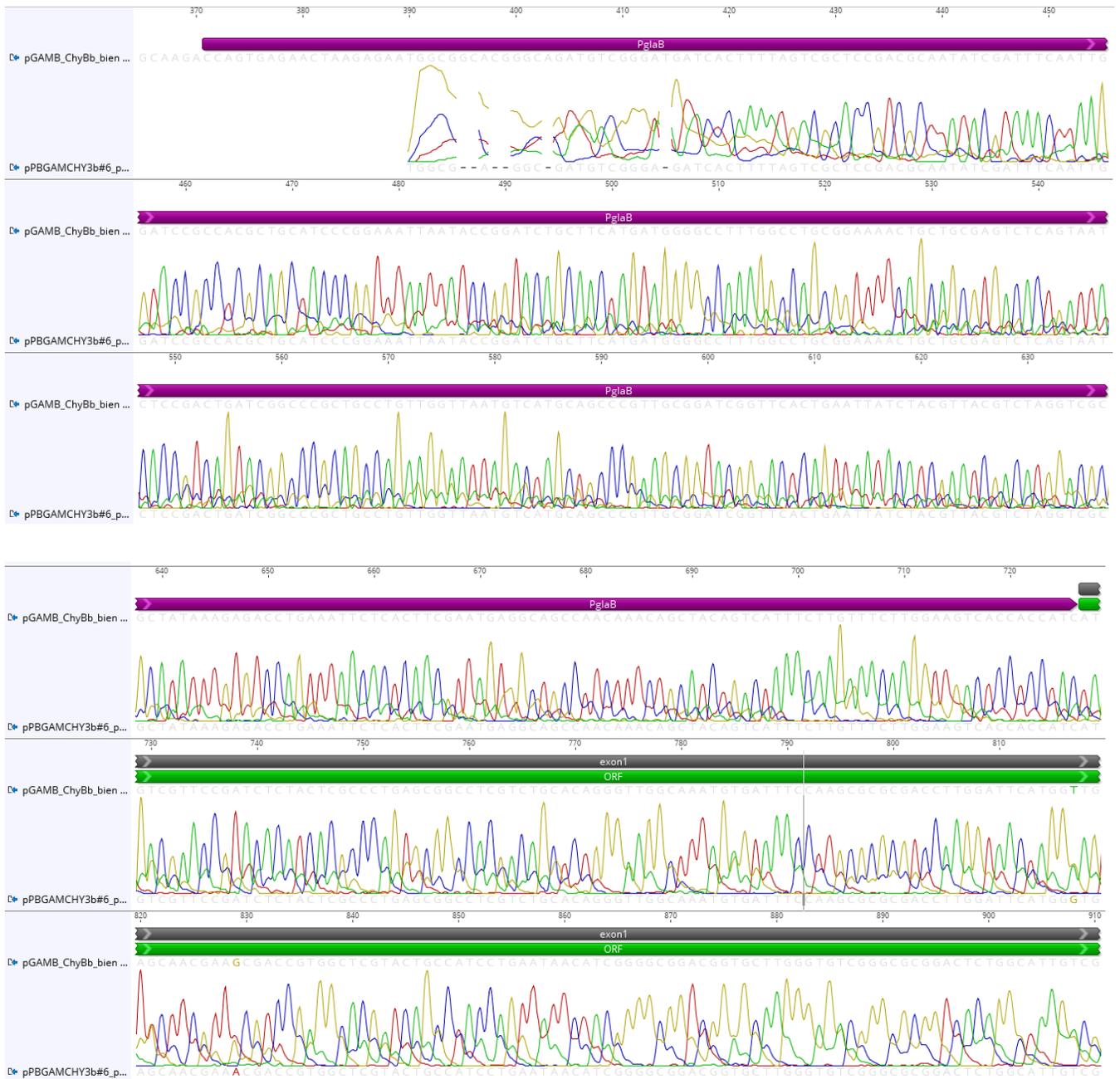
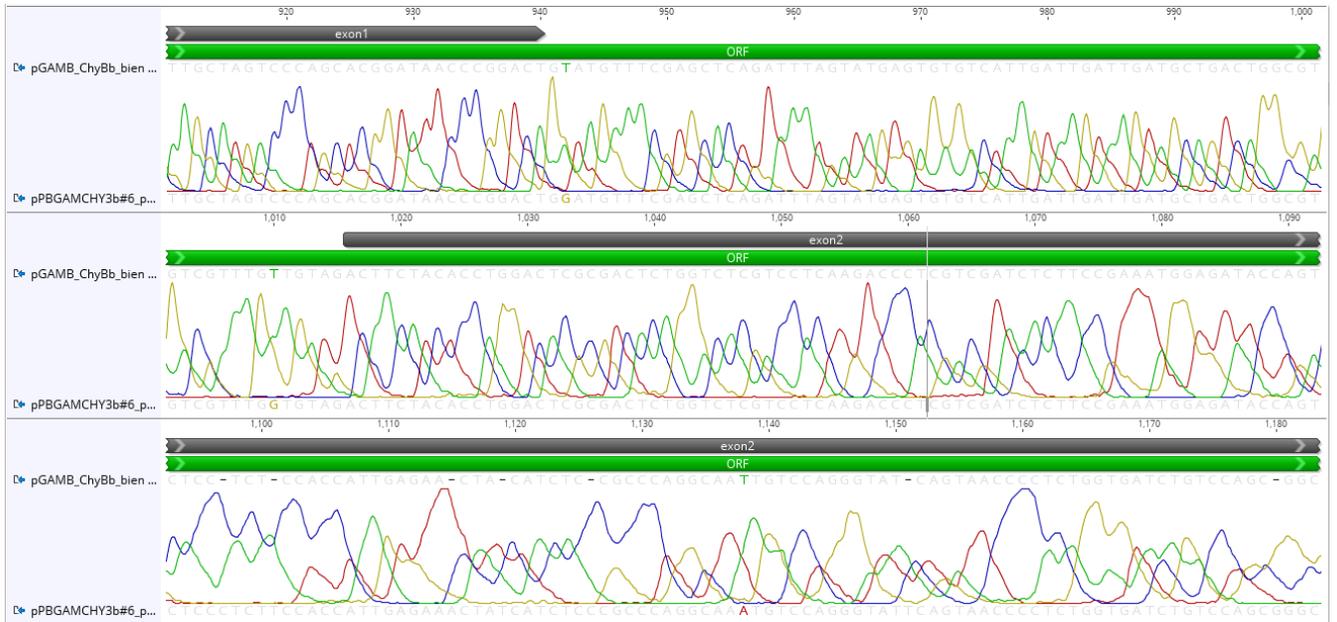
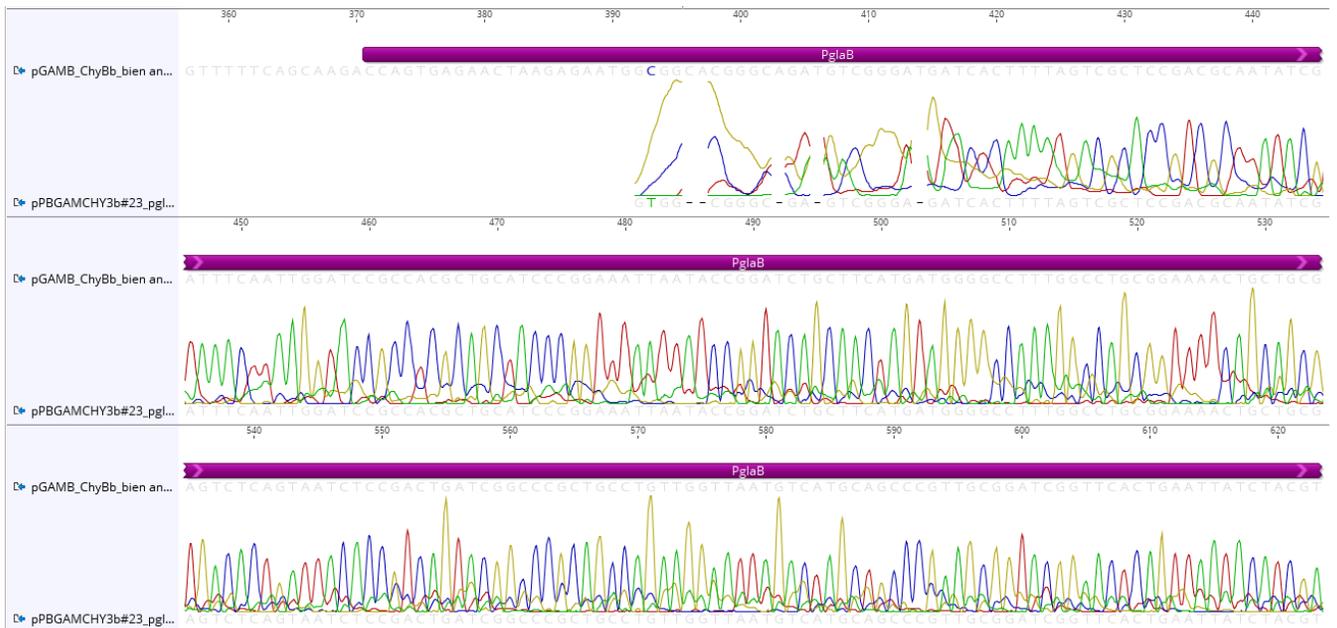


Figura 8-9. Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia spPIG18\_REV.





**Figura 8-10. Clona pPB:GAM:CHYBb#6, secuencia PglA\_B\_F.**



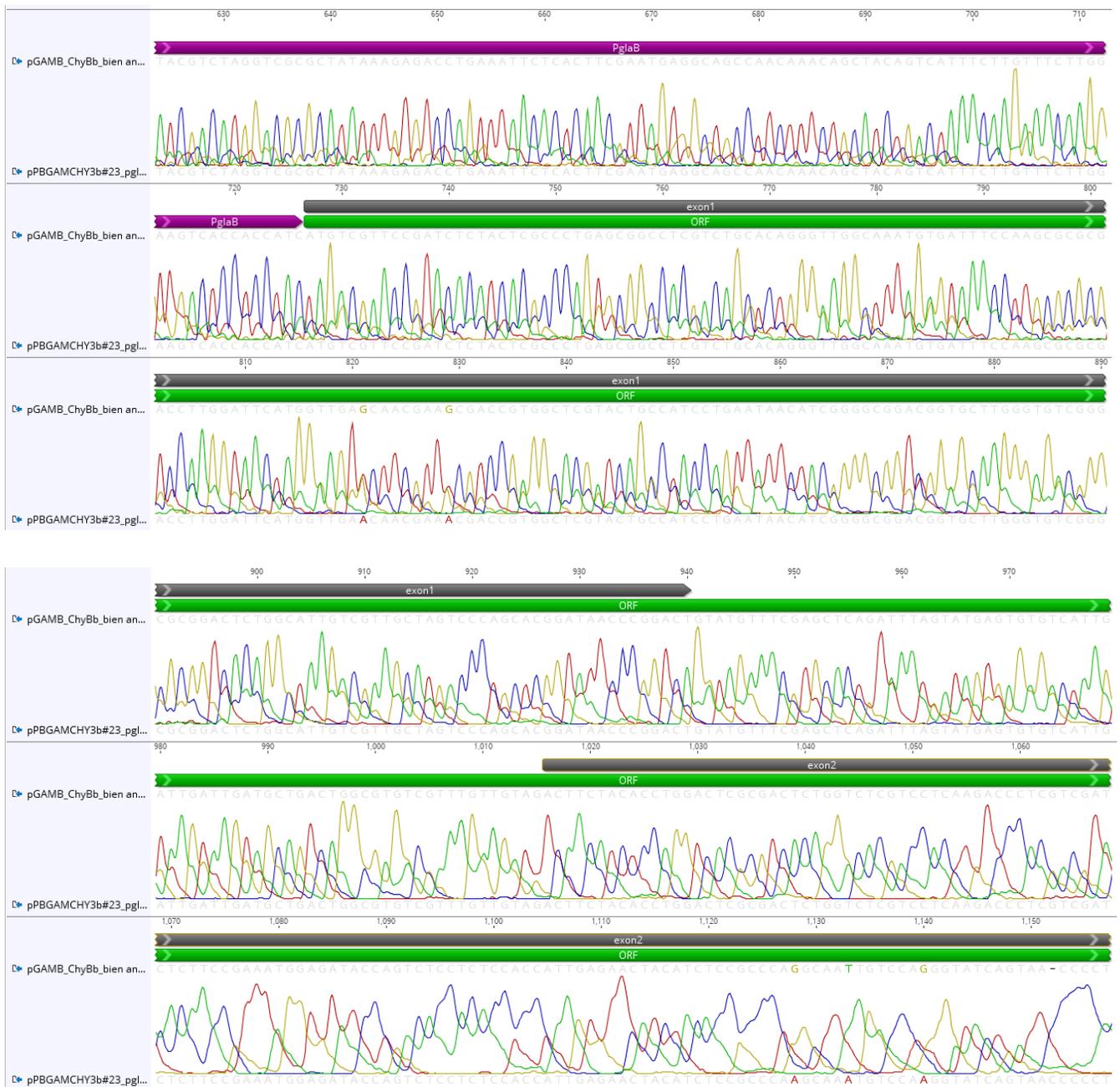


Figura 8-11. Clona pPB:GAM:CHYBb#23, secuencia PglA\_B\_F.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, G., Khan, S. A., Khaskheli, M., Qureshi, M. A., & Ahmad, I. (2013). Production and properties of rennet from buffalo calves abomasa. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(1 Sup), 5-9
- Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., Van De Vondervoort, P. J., Culley, D., Thykaer, J., ... & Berka, R. M. (2011). Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research*, 21(6), 885-897.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., & Lyon, J. A. (2008). Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS one*, 3(5), e2189.
- Arentshorst, M., Lagendijk, E. L., & Ram, A. F. (2015). A new vector for efficient gene targeting to the *pyrG* locus in *Aspergillus niger*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2(1), 2.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds). (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. NY:Wiley & Sons.
- Archer, D. B., Jeenes, D. J., MacKenzie, D. A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., ... & Dobson, C. M. (1990). Hen egg white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. *Nature Biotechnology*, 8(8), 741-745.
- Archer, D.B. & Wood, D. A (1995). Fungal exoenzymes. En Neil A. R. Grow & Geoffrey M. Gadd (Eds.), *The Growing Fungus* (pp. 137-155). London: Chapman & Hall
- Bailey, M. J., & Siika-aho, M. (1988). Production of microbial rennin. *Biotechnology Letters*, 10(3), 161-166.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P., & Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and biophysical research communications*, 112(1), 284-289.
- Bansal, N., Drake, M. A., Piraino, P., Broe, M. L., Harboe, M., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 19(9), 510-517.
- Bartnicki-Garcia, S. (1991). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hypha morphogenesis. En Heath, I B. (Ed), *Tip growth of plant and fungal cells*. San Diego: Academic Press.
- Beppu, T. (1983). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 1(3), 85-89.
- Berka, R. M., Ward, M., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Kodama, K. H., Carlomagno, L. P., & Thompson, S. A. (1990). Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene*, 86(2), 153-162.

Berka, R. M., Bayliss, F. T., Bloebaum, P., Cullen, D., Dunn-Coleman, N. S., Kodama, K. H., ... & Rey, M. W. (1991). *Aspergillus niger* var. *awamori* as a host for the expression of heterologous genes. En Jeffrey, J. W. & Baldwin, T. O. (Eds), *Applications of Enzyme Biotechnology* (pp. 273-292). U.S.: Springer

Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W., & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLoS one*, 10(9).

Bijl, E., van Valenberg, H., Sikkes, S., Jumelet, S., Sala, G., Olieman, K., ... & Huppertz, T. (2014). Chymosin-induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-s1-casein and genetic variants of beta-casein. *International Dairy Journal*, 39(2), 215-221.

Bines, V. E., Young, P., & Law, B. A. (1989). Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *Journal of dairy research*, 56(4), 657-664.

Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I., Høegh, I., & Fiil, N. P. (1984). Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *The EMBO Journal*, 3(7), 1581.

Bodie, E. A., Armstrong, G. L., & Dunn-Coleman, N. S. (1994). Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination. *Enzyme and microbial technology*, 16(5), 376-382.

Bos, C. J., Debets, A. J. M., Swart, K., Huybers, A., Kobus, G., & Slakhorst, S. M. (1988). Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Current genetics*, 14(5), 437-443.

Braaksma, M., & Punt, P. J. (2008). *Aspergillus* as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production. En Goldman, G. H. & Osmani, S. A. (Eds), *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, 441-455.

Broekhuijsen, M. P., Mattern, I. E., Contreras, R., Kinghorn, J. R., & Van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993). Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of biotechnology*, 31(2), 135-145.

Bryksin, A. V., & Matsumura, I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 48(6), 463.

Campbell, E. I., Unkles, S. E., Macro, J. A., van den Hondel, C., Contreras, R., & Kinghorn, J. R. (1989). Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase. *Current genetics*, 16(1), 53-56.

Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Ortega, N., Colina, A., Casqueiro, J., & Martín, J. F. (2003). Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH- regulated promoters and secretion using two different pre- pro sequences. *Biotechnology and bioengineering*, 83(3), 249-259.

Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2014). The Aspergillus Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* 42 (1); D705-10

Chitpinyol, S. & Crabbe, M. J. C.. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61, 395-418.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244

Conesa, A., Punt, P. J., van Lwijk, N., & van den Hondel, C. A. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*, 33(3), 155-171.

Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana (2008). *The Consortium: History of The Organization*. Recuperado de <https://www.mozzarelladop.it/>.

Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J. R., van den Hondel, C. A., & Fiers, W. (1991). Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Nature Biotechnology*, 9(4), 378-381.

Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 113(1), 51-56.

Cregg, J. M. (2007). Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems. En Higgins, D. & Cregg, J. (Eds), *Pichia protocols*. (pp. 1-10). U.S.: Humana Press.

Cullen, D., Gray, G. L., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Lamsa, M. H., Rey, M. W., ... & Berka, R. M. (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/technology*, 5(4), 369-376.

Corredig, M., & Salvatore, E. (2016). Enzymatic coagulation of milk. En McSweeney, P. & Mahony, J. (Eds), *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 287-307). N. Y.: Springer.

Dalgleish, D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. En Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., & Guinee, T. (Eds), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (pp. 69-100). U.S.: Springer.

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual review of food science and technology*, 3, 449-467.

de Bekker, C., Wiebenga, A., Aguilar, G., & Wösten, H. A. (2009). An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*. *Journal of microbiological methods*, 76(3), 305-306.

Debets, A. J. M., & Bos, C. J. (1986). Isolation of small protoplasts from *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics Reports*, 33(1), 24.

Dunn-Coleman, N. S., Bloebaum, P., Berka, R. M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., *et al.* (1991). Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(10), 976–981.

Elagamy, E. I. (2000). Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *Journal of dairy research*, 67(1), 73-81.

Emtage, J. S., Angal, S., Doel, M. T., Harris, T. J., Jenkins, B., Lilley, G., & Lowe, P. A. (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3671-3675.

Espinoza-Molina, J. A., Acosta-Muñiz, C. H., Sepulveda, D. R., Zamudio-Flores, P. B., & Rios-Velasco, C. (2016). Codon Optimization of the “Bos Taurus Chymosin” Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 58(10), 657-664.

Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden gate cloning. *DNA Cloning and Assembly Methods*, 119-131.

Foltmann, B., Pedersen, V. B., Jacobsen, H., Kauffman, D., & Wybrandt, G. (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(6), 2321-2324.

Foltman, B. (1979). Prochymosin and chymosin (prorenning and rennin). *Methods Enzymol.* 19:421-436.

Fowler, T., Berka, R. M., & Ward, M. (1990). Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Current genetics*, 18(6), 537-545.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science* 2nda edición. N. Y.: Springer

Ganzlin, M., & Rinas, U. (2008). In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. *Journal of biotechnology*, 135(3), 266-271.

García-Nafria, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: a single-tube universal cloning system exploiting bacterial in vivo assembly. *Scientific reports*, 6, 27459.

Gheshlaghi, R. E. Z. A., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Douglas, P. L. (2005). Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 754-760. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Goff, C. G., Moir, D. T., Kohno, T., Gravius, T. C., Smith, R. A., Yamasaki, E., & Taunton-Rigby, A. (1984). Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 27(1), 35-46.

Gómez-Lim, M. A., Ortíz, D. M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2015). Transformation of Fungi Using Shock Waves. En van den Berg, M. & Maruthachalam, K. (Eds), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1*(pp. 3-18). Suiza: Springer International Publishing.

Goosen, T., Bloemheuvel, G., Gysler, C., de Bie, D. A., van den Broek, H. W., & Swart, K. (1987). Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene. *Current genetics*, 11(6-7), 499-503.

Gouka, R. J., Punt, P. J., Hessing, J. G., & van den Hondel, C. A. (1996). Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), 1951-1957.

Gouka, R. J., Punt, P. J., & Van Den Hondel, C. A. M. J. J. (1997a). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(1), 1-11.

Gouka, R. J., Punt, P. J., & van den Hondel, C. A. (1997b). Glucoamylase gene fusions alleviate limitations for protein production in *Aspergillus awamori* at the transcriptional and (post) translational levels. *Applied and environmental microbiology*, 63(2), 488-497.

Grappin, R., Rank, T. C., & Olson, N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 531-540.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.

Harboe, M., Broe, M. L., & Qvist, K. B. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. En Law, B. A. & Tamime, A. Y. (Eds.), *Technology of Cheesemaking* 2nda edición (pp. 98-129). U. K.: Wiley-Blackwell.

Harkki, A., Uusitalo, J., Bailey, M., Penttilä, M., & Knowles, J. K. C. (1989). A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Nature Biotechnology*, 7(6), 596-603.

Harris, T. J. R., Lowe, P. A., Lyons, A., Thomas, P. G., Eaton, M. A. W., Millican, T. A., ... & Doel, M. T. (1982). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic acids research*, 10(7), 2177-2187.

Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., & Imayasu, S. (1997). Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84(6), 532-537.

Hata, Y. & Ishida, H. (1998). The glucoamylase-encoding gene highly expressed in solid-state culture (koji-making). *Journal of the Brewing Society of Japan* 93(12), 922-931.

Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., & Imayasu, S. (1998). Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 207(2), 127-134.

Henriksen, C. M., Nilsson, D., Hansen, S., & Johansen, E. (1999). Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. *International Dairy Journal*, 9(1), 17-23.

Hidaka, M., Sasaki, K., Uozumi, T., & Beppu, T. (1986). Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene*, 43(3), 197.

Hisada, H., Sano, M., Ishida, H., Hata, Y., & Machida, M. (2013). Identification of regulatory elements in the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) promoter from *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), 4951-4956.

INCHEM, (sin fecha). Chymosins A and B from genetically modified microorganisms. Recuperado de <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je08.htm>

Integrated DNA Technologies (2017). OligoAnalyzer 3.1. Recuperado de <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., & Imayasu, S. (1998). Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86(3), 301-307.

Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Suginami, K., & Imayasu, S. (2000). Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Current genetics*, 37(6), 373-379.

Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., & Abe, Y. (2006). Improvement of the *glaB* promoter expressed in solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (5), 1181–1187,

Jacobus, A. P., & Gross, J. (2015). Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 10(3), e0119221.

Jajesniak, P., & Wong, T. S. (2015). QuickStep-Cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids. *Journal of biological engineering*, 9(1), 15.

Jarai, G., & Buxton, F. (1994). Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Current genetics*, 26(3), 238-244.

Jeenes, D. J., Mackenzie, D. A., Roberts, I. N., & Archer, D. B. (1991). Heterologous Protein Production by Filamentous Fungi. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 9(1), 327-367.

Jeenes, D. J., Marczinke, B., MacKenzie, D. A., & Archer, D. B. (1993). A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*. *FEMS microbiology letters*, 107(2-3), 267-271.

Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., Lorentzen, A. M., ... & Larsen, S. (2013). Camel and bovine chymosin: the relationship between

their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(5), 901-913

Jones, D. H. & Howard, B. H. (1991). A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10, 62–66.

Kawaguchi, Y., Kosugi, S., Sasaki, K., Uozumi, T., & Beppu, T. (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agricultural and biological chemistry*, 51(7), 1871-1877

Kasuzo (2007a). Codon usage databse. Recuperado de <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=89462>

Kasuzo (2007b). Codon usage databse. Recuperado de <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=5061>

Kappeler, S. R., van den Brink, H.J., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhon, Z., Bech Hansen, E., 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.

Klessen, C., Schmidt, K. H., Gumpert, J., Grosse, H. H., & Malke, H. (1989). Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Applied and environmental microbiology*, 55(4), 1009-1015.

Korman, D. R., Bayliss, F. T., Barnett, C. C., Carmona, C. L., Kodama, K. H., Royer, T. J., ... & Berka, R. M. (1990). Cloning, characterization, and expression of two  $\alpha$ -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Current genetics*, 17(3), 203-212.

Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PloS one*, 10(9), e0137466.

Koutinas, A.A., Wang, R., Webb, C. (2003). Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochemical Engineering Journal* 14: 93-100.

Kumar, A., Sharma, J., Grover, S., Kumar Mohanty, A., & Kumar Batish, V. (2007). Molecular cloning and expression of goat (*Capra hircus*) prochymosin in *E. coli*. *Food biotechnology*, 21(1), 57-69.

Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., & Batish, V. K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology*, 30(4), 243-258.

Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., ... & Murphy, J. W. (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryotic cell*, 3(5), 1088-1100.

- Li, M. Z., & Elledge, S. J. (2012). SLIC: a method for sequence-and ligation-independent cloning. *Gene Synthesis: Methods and Protocols*, 51-59.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 471-471.
- Liu, W. G., Wang, Y. P., Zhang, Z. J., Wang, M., Lv, Q. X., Liu, H. W., ... & Lu, M. (2017). Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. *Protein Expression and Purification*, 135, 78-82.
- Loske, A. M. (2007). *Shock waves physics for urologists*. México: Univeridad Nacional Autónoma de México.
- Loske, A. M., Campos-Guillen, J., FERNandez, F. R. A. N. C. I. S. C. O., & Castaño-Tostado, E. (2011). Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(3), 502-510.
- Loske, A. M., Fernández, F., Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortíz-Vázquez, E., & Gómez-Lim, M. A. (2014). Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics*, 54(6), 1656-1662.
- Lubertozzi, D., & Keasling, J. D. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology advances*, 27(1), 53-75
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743.
- Luo, F., Jiang, W. H., Yang, Y. X., Li, J., & Jiang, M. F. (2016). Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(9), 1363.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J., & Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 58(2), 201-216.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., ... & Abe, K. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1157.
- MacKenzie, D. A., Gendron, L. C., Jeenes, D. J., & Archer, D. B. (1994). Physiological optimization of secreted protein production by *Aspergillus niger*. *Enzyme and microbial technology*, 16(4), 276-280.
- Marston, F. A., Lowe, P. A., Doel, M. T., Schoemaker, J. M., White, S., & Angal, S. (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 2(9), 800-804.
- Martín, J. F. (2015). Fungal transformation: from protoplasts to targeted recombination systems. En van den Berg, M. & Maruthachalam, K. (Eds), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1*(pp. 3-18). Suiza: Springer International Publishing.

Mattern, I., van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C., Punt, P., Oliver, R., Dingemanse, M., ... & van den Hondel, C. (1987). New Gene-Transfer Systems for *Aspergillus niger*. En Chaloupka, J. & Krumphanzl, V. (Eds), *Extracellular enzymes of microorganisms* (pp. 51-55). Springer US.

Mattern, I. E., van Noort, J. M., van den Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N., & van den Hondel, C. A. (1992). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Molecular and General Genetics MGG*, 234(2), 332-336.

McSweeney, P. L. H. (1993). Primary proteolysis of caseins in cheddar cheese. PhD Thesis, University College Cork.

McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A., & Højrup, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine  $\alpha$  s1,-casein. *Journal of Dairy Research*, 60(3), 401-412.

McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2- 3), 127-144.

Mellor, J., Dobson, M. J., Roberts, N. A., Tuite, M. F., Emtage, J. S., White, S., ... & Kingsman, S. M. (1983). Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 24(1), 1-14.

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*, 26(2), 177-185

Meyer, V., Ram, A. F., & Punt, P. J. (2010). Genetics, genetic manipulation, and approaches to strain improvement of filamentous fungi. En Baltz, R. H., Demain, A. L., & Davies, J. E. (Eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 3era edición (pp. 318-329). Washington: ASM Press.

Meyer, V., Wanka, F., van Gent, J., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A., & Ram, A. F. (2011). Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 77(9), 2975-2983.

Meyer, V., Fiedler, M., Nitsche, B., & King, R. (2015). The cell factory *Aspergillus* enters the big data era: opportunities and challenges for optimising product formation. En Krull, R. Bley, T. *Filaments in Bioprocesses* (pp. 91-132). Springer International Publishing.

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(2-3), 205–217.

Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Kaushik, J. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2003). Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Research*, 70(1), 37–43

Moir, D., Mao, J. I., Schumm, J. W., Vovis, G. F., Alford, B. L., & Taunton-Rigby, A. (1982). Molecular cloning and characterization of double-stranded cDNA coding for bovine chymosin. *Gene*, 19(1), 127-138.

Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., & Martin, J. F. (1999). Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1168-1174.

Motohashi, K. (2017). Seamless Ligation Cloning Extract (SLICE) Method Using Cell Lysates from Laboratory *Escherichia coli* Strains and its Application to SLiP Site-Directed Mutagenesis. In *Vitro Mutagenesis: Methods and Protocols*, 349-357.

Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1979). Proteolytic specificity of chymosin on bovine  $\alpha$ 1-casein. *Journal of Dairy Research*, 46(4), 641-651.

MycoCosm (2017). *Aspergillus niger* NRRL3. Recuperado de [https://genome.jgi.doe.gov/Aspni\\_NRRL3\\_1/Aspni\\_NRRL3\\_1.home.html](https://genome.jgi.doe.gov/Aspni_NRRL3_1/Aspni_NRRL3_1.home.html)

Nakayama, H., & Shimamoto, N. (2014). Modern and simple construction of plasmid: saving time and cost. *Journal of Microbiology*, 52(11), 891-897.

Ngiam, C., Jeenes, D. J., Punt, P. J., Van Den Hondel, C. A., & Archer, D. B. (2000). Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 775-782.

Nishimori, K., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., & Beppu, T. (1981). Cloning in *Escherichia coli* of the structural gene of prorennin, the precursor of calf milk-clotting enzyme rennin. *Journal of biochemistry*, 90(3), 901-904.

Nishimori, K., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., & Beppu, T. (1982). Nucleotide sequence of calf prorennin cDNA cloned in *Escherichia coli*. *Journal of biochemistry*, 91(3), 1085-1088.

Nishimori, K., Shimizu, N., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., & Beppu, T. (1984). Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene*, 29(1), 41-49.

Nosedá, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., & Galvagno, M. A. (2013). Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under *AOX1* promoter. *Protein expression and purification*, 92(2), 235-244.

Nosedá, D. G., Blasco, M., Recúpero, M., & Galvagno, M. Á. (2014). Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible *AOX1* promoter. *Protein expression and purification*, 104, 85-91.

Nunberg, J. H., Meade, J. H., Cole, G., Lawyer, F. C., McCABE, P., Schweickart, V., Tal, R., Wittman, V. P., Flatgaard, E. F. & Innis, M. A. (1984). Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Molecular and Cellular Biology*, 4(11), 2306-2315.

Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3448-3457.

OpenWetWare (2013). TOP10 chemically competent cells. Recuperado de [https://openwetware.org/wiki/TOP10\\_chemically\\_competent\\_cells](https://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells).

O'Sullivan, M., & Fox, P. F. (1991). Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnology*, 5(1), 19-32.

Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. En Balbás, P. & Lorence, A. (Eds), *Recombinant gene expression* (pp. 15-51). NJ: Humana Press.

Parente, D., de Ferra, F., Galli, G., & Grandi, G. (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters*, 77(2-3), 243-249.

Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... & Andersen, M. R. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2), 221.

Pronobis, M. I., Deutch, N., & Peifer, M. (2016). The Miraprep: a protocol that uses a Miniprep kit and provides Maxiprep yields. *PLoS one*, 11(8), e0160509.

Pungerčar, J., Štrukelj, B., Gubenšek, F., Turk, V., & Kregar, I. (1990). Complete primary structure of lamb preprochymosin deduced from cDNA. *Nucleic acids research*, 18(15), 4602-4602.

Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56(1), 117-124.

Punt, P. J., Dingemans, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93(1), 101-109.

Quan, J., & Tian, J. (2009). Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS one*, 4(7), e6441.

Ramezani, F., Sadr Mohammad Beigi, S., Ahmadian, G., Soudi, M., & Ghandili, S. (2013). Heterologous Expression of Bovine Prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(1), 59-63.

Roberts, I. N., Jeenes, D. J., MacKenzie, D. A., Wilkinson, A. P., Sumner, I. G., & Archer, D. B. (1992). Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic prophospholipase A 2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene*, 122(1), 155-161.

Rodriguez-Iglesias, A., & Schmoll, M. (2015). Protoplast Transformation for Genome Manipulation in Fungi. En van den Berg, M. & Maruthachalam, K. (Eds), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1*(pp. 3-18). Suiza: Springer International Publishing.

Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., & Pungerčar, J. (2001). Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *Journal of dairy science*, 84(5), 1020-1026.

Schuetze, T., & Meyer, V. (2017). Polycistronic gene expression in *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 162.

Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M., & Sellami Kamoun, A. (2012). Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. *The Scientific World Journal*, 2012.

Simons, G., Rutten, G., Hornes, M., Nijhuis, M., & van Asseldonk, M. (1991). Production of prochymosin in lactococci. En Dunn, B. M. (Ed), *Structure and Function of the Aspartic Proteinases* (pp. 115-119).U.S.: Springer.

Singh, T. K., Young, N. D., Drake, M., & Cadwallader, K. R. (2005). Production and sensory characterization of a bitter peptide from  $\beta$ -casein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 1185-1189

Smith, R. A., Duncan, M. J., & Moir, D. T. (1985). Heterologous protein secretion from yeast. *Science*, 229, 1219-1224.

Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4), 327-345.

Thomson, S. A. (1991). Fungal aspartic proteinases. En Long, A. S. & Berka, R. M. (Eds), *Molecular industrial mycology: systems and applications for filamentous fungi*. N.Y.: Marcel Dekker.

Tsuchiya, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., & Tamura, G. (1993). Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(2-3), 327-332.

Tsuchiya, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., & Tamura, G. (1994). High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(5), 895-899.

Tyagi, A., Kumar, A., Yadav, A. K., Saklani, A. C., Grover, S., & Batish, V. K. (2016). Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 217-224.

Uchiyama, H., Uozumi, T., Beppu, T., & Arima, K. (1980). Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6), 1373-1381.

Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., & Villa, T.G.. (2008). Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10606–10610.

Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., & Villa, T.G.. (2012). Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *Journal of dairy science* 65: 609-613.

van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J., Renniers, T. C., Rietveld, K., Schaap, A., ... & Richman, M. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Nature Biotechnology*, 8(2), 135-139.

van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L., & Visser, J. (1997a). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in biotechnology*, 15(7), 256-263.

van den Hombergh, J. P., Gelpke, M. D. S., Vondervoort, P. J., Buxton, F. P., & Visser, J. (1997). Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*—effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins. *The FEBS Journal*, 247(2), 605-613.

van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. (1987). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Molecular and General Genetics*, 206(1), 71-75.

van Rooijen, G., Glenn, K.R., Shen, Y. & Boothe, J. (2008). Commercial Production of Chymosin in Plants. Patent US7390936B1.

Vega-Hernández, M. C., Gómez-Coello, A., Villar, J., & Claverie-Martín, F. (2004). Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *Journal of biotechnology*, 114(1), 69-79.

Verdoes, J. C., Punt, P. J., Stouthamer, A. H., & van den Hondel, C. A. (1994). The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger glucoamylase-encoding gene*. *Gene*, 145(2), 179-187.

Wang, R., Law, R. C. S., & Webb, C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40(1), 217-227.

Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., & Liu, D. (2015a). Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 111, 75-81.

Wang, Y., Liu, Y., Chen, J., Tang, M. J., Zhang, S. L., Wei, L. N., ... & Wei, D. B. (2015b). Restriction-ligation-free (RLF) cloning: a high-throughput cloning method by in vivo homologous recombination of PCR products. *Genet. Mol. Res*, 14, 12306-15.

Ward, M., Wilson, L. J., Kodama, K. H., Rey, M. W., & Berka, R. M. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Nature Biotechnology*, 8(5), 435-440.

Ward, M.. (1991). Chymosin production in *Aspergillus*. En Long, A. S. & Berka, R. M. (Eds), *Molecular industrial mycology: systems and applications for filamentous fungi*. N.Y.: Marcel Dekker.

Ward, M., Wilson, L. J., & Kodama, K. H. (1993). Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for intergrated plasmid, to overproduce heterologous proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 39(6), 738-743.

Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X., Wyatt, R. D., & Conneely, O. M. (1995). A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Nature Biotechnology*, 13(5), 498-503.

Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., ... & Tsurushita, N. (2004). Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 2567-2576.

Ward, O. P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology advances*, 30(5), 1119-1139.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., & Harrison, S. C. (2014). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Pearson

Wei, Z. Y., Zhang, Y. Y., Wang, Y. P., Fan, M. X., Zhong, X. F., Xu, N., ... & Xing, S. C. (2016). Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 624.

Wernars, K., Goosen, T., Wennekes, L. M. J., Visser, J., Bos, C. J., Van den Broek, H. W. J., ... & Pouwels, P. H. (1985). Gene amplification in *Aspergillus nidulans* by transformation with vectors containing the *amdS* gene. *Current genetics*, 9(5), 361-368.

Wernars, K., Goosen, T., Wennekes, B. M., Swart, K., van den Hondel, C. A., & van den Broek, H. W. (1987). Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes. *Molecular and General Genetics*, 209(1), 71-77.

Willmitzer, L., Sonnwald, U., Rober, M. & Carlsen, S.K. (1992). Transgenic Plants Expressing Industrial Enzymes. Patent WO1992001042 A1

Yacoubou, J. (2012, Agosto 21). Microbial Rennets and Fermentation Produced Chymosin (FPC): How Vegetarian Are They?. Recuperado de <http://www.vrg.org/blog/2012/08/21/microbial-rennets-and-fermentation-produced-chymosin-fpc-how-vegetarian-are-they/>

Yelton, M. M., Hamer, J. E., & Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), 1470-1474.

Yuan, X. L., Goosen, C., Kools, H., van der Maarel, M. J., van den Hondel, C. A. J., Dijkhuizen, L., & Ram, A. F. (2006). Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 152(10), 3061-3073.

Yuan, W., Ke, T., Du, M., Chu, X., Hu, F., & Hui, F. (2010). Gene synthesis of the bovine prochymosin gene and high-level expression in *Kluyveromyces lactis*. *Chinese journal of biotechnology*, 26(9), 1281-1286.

Zhang, L., Jiang, Y., Zhang, J., & Yang, Z. (2009). Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. *Chinese journal of biotechnology*, 25(8), 1160-1165.

Zhang, N. & An, Z. (2010). Heterologous protein expression in yeast and filamentous fungi. En Baltz, R. H., Demain, A. L., & Davies, J. E. (Eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 3era edición (pp. 145-156). Washington DC: ASM Press.