

Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura

Martha Guerrero-Olazarán, Eddy. L. Cab-Barrera, Luis J. Galán-Wong y José M. Viader-Salvadó

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Ave. Pedro de Alba s/n, Col. Ciudad Universitaria
66450 San Nicolás de los Garza, N.L. México
Tel (52 81) 8376-4537 E-mail: mguerrer@fcb.uanl.mx

Resumen

Las Ciencias del Mar y la acuicultura no han quedado al margen de la aplicación de los nuevos avances alcanzados en la Biotecnología Molecular y ésta última ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la Biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de éstas presentes en concentraciones muy bajas en su ambiente natural.

En este trabajo se describen los enfoques que la acuicultura ha dado a la producción de proteínas recombinantes. También se analizan los criterios requeridos para la selección de un sistema de expresión para producir estas proteínas y se comparan los hospederos unicelulares más empleados para estos fines.

Por último se analizan las propiedades de tripsinas y tripsinógenos de especies acuáticas en especial del Camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y los resultados obtenidos con el empleo de *Pichia pastoris* para la producción la forma recombinante de esta proteína de gran interés en la acuicultura.

Introducción

En los últimos 50 años las Ciencias Biológicas han logrado avances espectaculares en el conocimiento sobre el material genético y su manipulación, lo cual ha impactado en el desarrollo la Biotecnología.

La genómica y la proteómica son disciplinas emergidas de la Biotecnología Molecular, se enfocan al estudio de la estructura y función de los genes y sus productos, las proteínas, y se han visto implicadas en el desarrollo de las Ciencias de la Salud, Ciencias Naturales, Ciencias Sociales e incluso en el desarrollo de áreas del conocimiento menos próximas como son las Ciencias Exactas y las Ciencias Económicas.

Las Ciencias del Mar no han quedado al margen de la aplicación de la Biotecnología. Así en 1992 la Organización para la Cooperación Económica y de Desarrollo definió a la Biotecnología Marina como “La aplicación de principios científicos y de ingeniería en el uso directo o indirecto de organismos acuáticos, partes o productos derivados de éstos en su forma natural o modificada al procesamiento de materiales para proveer de bienes y servicios”.

La Biotecnología en la Acuicultura

La acuicultura es una industria global multi-millonaria en la cual se propagan o cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas y cuya actividad complementa la demanda de los productos obtenidos a través de la industria pesquera tradicional.

La industria acuícola se encuentra actualmente en constante expansión debido a la demanda creciente de estos recursos y a la incapacidad de satisfacer dicha demanda a través de la industria pesquera tradicional, por lo cual se espera que ésta se incremente en un 500% en los siguientes 25 años.

A través del empleo de la genómica y la proteómica en esta actividad es posible impactar en la modificación y mejoramiento genético para el desarrollo de cepas resistentes a enfermedades, el mejoramiento en la tasa de crecimiento y conversión de alimentos de especies cultivables, el control hormonal de los ciclos reproductivos, la identificación y tratamiento de enfermedades, el desarrollo de vacunas para el tratamiento de enfermedades, el desarrollo sostenible de la acuicultura compatible con un medio ambiente (Melamed *et al.* 2002).

La Biotecnología de Proteínas Recombinantes

La Biotecnología de proteínas está implicada en el aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales

tales como plantas, animales o bien microorganismos, para su subsiguiente empleo en diversas aplicaciones. La tecnología del DNA recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la Biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Se considera una proteína recombinante o proteína heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo. Actualmente se ofrecen en el mercado internacional una gran variedad de proteínas recombinantes para un amplio abanico de aplicaciones, incrementándose día a día la lista de estos productos, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Walsh & Headon 1995).

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y el avance logrado en la optimización de bioprocesos con organismos recombinantes ofrece una amplia gama de posibilidades para la producción de proteínas nativas o modificadas con nuevas y mejores propiedades.

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de DNA que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero, además de recibir las moléculas de DNA recombinante.

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el bioproceso que se empleará para su producción (Tabla 1). El origen biológico de la proteína es importante ya que generalmente un sistema de expresión eucariota es más eficiente para sintetizar una

proteína de origen eucariota que un sistema de expresión procariota. Respecto a las propiedades químicas y biológicas de la proteína es importante analizar su secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización prematura de la transcripción, la secuencia aminoacídica para evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico y tipo de modificaciones postraduccionales presentes, la estabilidad al pH, temperatura y proteólisis, la posible toxicidad sobre el hospedero, el destino celular deseado (extracelular o intracelular) y el grado de pureza deseado. Un tercer factor a considerar es la aplicación que se le dará posteriormente a la proteína, si ésta se aplicará en las áreas biomédica (agentes terapéuticos, vacunas y diagnóstico clínico) o de alimentos (procesos industriales, aditivos y nutraceúticos) para emplearla en humanos, animales o plantas, o en el área de la Química de la transformación como la industria del papel, textil y del cuero, farmacéutica y química, o bien como reactivo en el área de la química analítica o en el medio ambiente como fuente de energía o tratamiento de residuos. Por último se tiene que considerar el bioproceso que se empleará para su producción específicamente el tipo y condiciones operacionales de cultivo, la escala de producción de la proteína de interés según si sólo se requieren unos pocos miligramos para fines de investigación o en la escala de gramos o kilogramos para fines industriales, además de evaluar el costo del bioproceso.

Tabla 1. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión

ORIGEN DE LA PROTEÍNA	<ul style="list-style-type: none"> • Procariota • Eucariota 		
PROPIEDADES DE LA PROTEÍNA	• Secuencia nucleotídica	• Uso de codones preferenciales	
	• Propiedades químicas	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño • pI • Modificaciones postraduccionales 	
	• Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Proteólisis • pH • Temperatura 	
	• Toxicidad		
	• Destino celular	<ul style="list-style-type: none"> • Extracelular • Intracelular 	
	• Grado de pureza		
APLICACIÓN	• Biomedicina	<ul style="list-style-type: none"> • Agente terapéutico • Vacunas • Diagnóstico 	<ul style="list-style-type: none"> • Humanos • Animales • Plantas
	• Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Procesos Industriales • Aditivos • Nutracéuticos • Suplemento alimenticio 	
	• Química de la Transformación	<ul style="list-style-type: none"> • Industria del Papel • Industria Textil y del Cuero • Industria Farmacéutica • Industria Química 	<ul style="list-style-type: none"> • Catálisis enzimática • Síntesis estereoselectiva
	• Reactivo Químico	• Reactivo analítico	
	• Medio ambiente	<ul style="list-style-type: none"> • Energía y combustibles • Tratamiento de residuos 	
BIOPROCESO	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo • Condiciones de cultivo • Escala • Costo 		

Actualmente se emplean una gran variedad de hospederos que van desde organismos unicelulares tales como bacterias, hongos, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas.

Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* ha sido la más empleada para estos fines, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus lactis*, etc. (Walsh & Headon 1995). Debido al nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética, *E. coli* ofrece varias ventajas (Tabla 2) respecto a otros hospederos, lo que ha permitido el desarrollo de una gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes. Sin embargo, el empleo de *E. coli* tiene también desventajas, tales como su ineficiencia para secretar proteínas al medio de cultivo y además éstas suelen precipitar como cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular. Adicionalmente, la síntesis de las proteínas heterólogas en *E. coli* induce a un incremento de la proteólisis celular, cuenta con un sistema ineficiente para realizar modificaciones postraduccionales y genera endotoxinas dañinas para la salud.

Si se emplea *Bacillus subtilis*, se tiene la ventaja de la secreción de la proteína heteróloga, sin embargo esta bacteria secreta una gran cantidad de proteasas, además se dispone de una menor cantidad de vectores de expresión, elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes y se ha reportado menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económica de proteínas de eucariotas superiores de interés industrial y/o académico (Buckholz & Gleeson 1991, Romanos *et al.* 1992). Las levaduras ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Además las levaduras mantienen las ventajas de los microorganismos al ser unicelulares, de fácil manipulación y rápido crecimiento. Por otro lado tienen una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales (Eckart & Bussineau 1996), lo cual les da una ventaja para la producción de proteínas de origen eucariota.

El empleo de *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero en un sistema de expresión eucariota ofrece la ventaja de ser uno de los organismos eucariotes mejor caracterizado, su genoma ha sido totalmente secuenciado y es considerado como organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) americana. Por estos motivos, muchos de los sistemas de expresión desarrollados para la producción de proteínas heterólogas están basados en *S. cerevisiae*. Las limitaciones de este microorganismo se han puesto de manifiesto al aumentar de manera significativa el número de sistemas de expresión basados en levaduras no convencionales (no *Saccharomyces*), los cuales exhiben mejores prestaciones como productores de ciertas proteínas heterólogas. Entre estos nuevos microorganismos hospederos se incluyen *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, los cuales constituyen la base de diversos procesos desarrollados a escala industrial (Buckholz & Gleeson 1991, Gellisen & Hollenberg 1997, Muller *et al.* 1998).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de diferentes hospederos para la producción de proteínas recombinantes.

BACTERIAS	
<i>Escherichia coli</i>	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Buen nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética.</p> <p>Se cuenta con gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes.</p> <p>Fácil manipulación.</p> <p>Cultivos baratos con altas densidades celulares.</p> <p>Niveles moderados de producción de la proteína recombinante .</p>	<p>Ineficiente secreción de la proteína al medio de cultivo.</p> <p>Formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular.</p> <p>La síntesis de las proteínas heterólogas induce a un incremento de la proteólisis celular.</p> <p>Realiza pocas modificaciones postraduccionales.</p> <p>Generación de endotoxinas dañinas para la salud humana y animal.</p>
<i>Bacillus subtilis</i>	
<p>Secreción de la proteína heteróloga.</p>	<p>Secreta una gran cantidad de proteasas afectando el rendimiento del producto recombinante.</p> <p>Dispone de pocos vectores de expresión y elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes comparado con <i>E. coli</i>.</p> <p>Menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.</p>
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<p>Sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la Biología Molecular y la Fisiología.</p> <p>Genoma totalmente secuenciado.</p> <p>Vectores de expresión y cepas disponibles.</p> <p>Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial.</p> <p>Cultivos baratos.</p> <p>Se producen altos niveles de la proteína recombinante.</p> <p>Realiza modificaciones postraduccionales.</p> <p>Es considerado como organismo GRAS.</p>	<p>Produce hiperglicosilaciones.</p> <p>Baja eficiencia en la secreción de la proteína heteróloga.</p>
<i>Pichia pastoris</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Emplea los promotores más fuertes y eficientemente regulados de los conocidos. • Vectores de expresión y cepas disponibles. • Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial. • Secreción eficiente de la proteína heteróloga. • Medios de cultivos son baratos y formulados libre de toxinas y pirógenos. • Los cultivos alcanzan altas densidades celulares. • Altos niveles de producción. • Bajos niveles de secreción de proteínas endógenas facilitando la purificación de la proteína heteróloga. 	<ul style="list-style-type: none"> • Produce patrones glicosilaciones no deseables para algunas proteínas. • Actividad proteolítica. • Algunas proteínas no se producen de forma eficiente.

- | | |
|---|--|
| • Realiza modificaciones postraduccionales. | |
|---|--|

El sistema de expresión basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha ganado aceptación como hospedero para la producción de proteínas recombinantes (Romanos 1995, Escamilla-Treviño *et al.* 1999, Cereghino & Cregg 2000). *Pichia pastoris* comparte las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae* pero supera a ésta de 10 a 100 veces en los niveles de producción de proteínas heterólogas (Cregg *et al.* 1993, Romanos 1995, Guerrero-Olazarán & Viader-Salvadó 2003). Ambas levaduras se han utilizado en la producción de muchas proteínas eucariotas y en la mayoría de los casos la productividad de *P. pastoris* ha sido muy superior a la de *S. cerevisiae* (Romanos 1995, Cereghino & Cregg 2000). *Pichia pastoris* comparada con *S. cerevisiae*, presenta importantes ventajas para la expresión de proteínas heterólogas. En *P. pastoris* el promotor usado para transcribir genes heterólogos proviene del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris* cuya expresión es regulada por metanol. Este promotor es uno de los más eficientes y fuertemente regulados de los conocidos actualmente. Esta capacidad para mantener los cultivos con la expresión heteróloga “apagada” en ausencia de metanol es importante para minimizar el efecto tóxico que presentan muchas proteínas heterólogas sobre el hospedero (Cereghino & Cregg 1999). Por otro lado, mientras que *S. cerevisiae* presenta dificultades para conseguir elevadas densidades celulares, *P. pastoris* es relativamente fácil de cultivar a densidades celulares de ~100 g/L, en peso seco. Además, *S. cerevisiae* puede presentar baja eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas (Cereghino & Cregg 1999, Guerrero-Olazarán & Viader-Salvadó 2003). Adicionalmente, la glicosilación en el proceso de post-traducción en *P. pastoris* se lleva a cabo con oligosacáridos más pequeños que en *S. cerevisiae*, reduciendo los fenómenos de hiperglicosilación de muchas proteínas de eucariotas expresadas en este último sistema (Romanos 1995, Higgins & Cregg 1998). Cabe destacar los bajos niveles de secreción al medio de cultivo de proteínas endógenas en *P. pastoris*, lo cual supone una gran ventaja para la purificación de la proteína recombinante producida. Finalmente, el medio de cultivo empleado para el cultivo de *P. pastoris* en un biorreactor es una mezcla definida de sales, oligoelementos, biotina y fuente de carbono y nitrógeno que no resulta ser caro y puede ser

formulado libre de toxinas y pirógenos (Higgins & Cregg 1998, Viader-Salvadó & Guerrero-Olazarán 2003).

Las Proteínas Recombinantes en la Acuicultura

El desarrollo de la Biotecnología de las proteínas recombinantes en acuicultura se ha enfocado en la aplicación de éstas para incrementar la eficiencia y productividad de la práctica acuícola (Macouzet *et al.* 1999, Melamed *et al.* 2002). Para su producción se han empleado diversos sistemas de expresión, siendo los más frecuentes los basados en bacterias (Chan *et al.* 2003, Luo *et al.* 2003, Villacis *et al.* 2004), levaduras (Yodmuang *et al.* 2004, Udomkit *et al.* 2004, Aoki *et al.* 2003) y células de insecto (Lin *et al.* 2002).

Uno de los primeros estudios en este campo ha sido el desarrollo de hormonas y estimuladores de crecimiento de especies marinas los cuales junto a las de otras especies animales, como la hormona del crecimiento bovina, se han empleado para promover el crecimiento de diversas especies cultivables (McLean *et al.* 1997, Peterson *et al.* 2004). Otro campo muy explorado ha sido el estudio de genes y sus elementos reguladores así como la producción de proteínas para el desarrollo del conocimiento sobre la fisiología de especies cultivables (Yodmuang *et al.* 2004, Luo *et al.* 2003, Villacis *et al.* 2004).

El enfoque en este campo ha sido muy diverso y amplio ya que se han producido proteínas con diversas funciones fisiológicas, tales como hormonas (Gu *et al.* 2000, Udomkit *et al.* 2004), proteínas reguladoras del crecimiento (Chan *et al.* 2003) y enzimas con diversas actividades (Aoki *et al.* 2003, Huang *et al.* 2004, Jónsdóttir *et al.* 2004, Ohta *et al.* 2003). Un enfoque especial ha sido la expresión de genes que codifican para proteínas que actúan de alérgenos en los humanos (Villacis *et al.* 2004, Bi *et al.* 2004).

Otra de las áreas de gran interés ha sido la prevención de enfermedades a través del empleo de vacunas de origen recombinante o bien el diagnóstico de enfermedades infecciosas a

través del desarrollo de anticuerpos dirigidos contra antígenos recombinantes del organismo patógeno (Lin *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Luo *et al.* 2003, Kim *et al.* 2004).

Por último, a pesar que en el campo de la nutrición de especies cultivables el empleo de proteínas recombinantes aún es reducido, existe un gran potencial de su aplicación en el procesado de alimentos o como aditivos en los mismos para incrementar la eficiencia de sus características nutricionales.

Función Biológica y Propiedades del Tripsina

La tripsina es una serín-proteasa que tienen un peso molecular alrededor de 24-25 kDa (Walsh 1970, Cohen & Gertler 1981), está presente en el tracto digestivo de una gran variedad de mamíferos y juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas en animales. Esta enzima lleva a cabo la catálisis de reacciones de hidrólisis de enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos básicos, tales como lisina y arginina reduciendo el tamaño de proteínas grandes y haciéndolas accesibles a posterior degradación por otras proteasas. Las serín-proteasas se caracterizan por un mecanismo catalítico común que involucra la presencia de una triada formada por tres residuos específicos de serina, histidina y ácido aspártico. Se han descrito tres mecanismos de regulación de la actividad de serín-proteasas, síntesis y almacenamiento en el páncreas de una proenzima inactiva (zimógeno), activación del zimógeno por proteólisis controlada e inactivación de las proteasas por la formación de complejos con inhibidores específicos (Neurath 1984). El tripsinógeno (zimógeno de la tripsina), se secreta al intestino delgado y se activa a tripsina mediante un corte proteolítico específico catalizado por la enzima enteropeptidasa o enteroquinasa que sólo se produce en el intestino. La enteroquinasa es una serín-proteasa que reconoce de forma específica la secuencia aminoacídica (Asp)₄ Lys-↓-X y activa al tripsinógeno liberándose tripsina por ruptura de un pequeño péptido (Keil 1971). La tripsina formada a partir del tripsinógeno activa a otras moléculas de tripsinógeno y a otros zimógenos como el quimotripsinógeno y la proelastasa (Walsh 1970). La síntesis

y mantenimiento del tripsinógeno ayuda a mantener la integridad de las células secretoras y a ejecutar una activación y secreción rápida.

Muchas enzimas de mamíferos también están presentes en organismos acuáticos (Haard 1998). Sin embargo se han observado variaciones entre las enzimas de estos dos grupos como diferencias en el peso molecular, composición de aminoácidos, pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad, características de inhibición y propiedades cinéticas (De-Vecchi & Coppes 1996). Generalmente, las tripsinas de peces son estables a un pH alcalino, al contrario de las tripsinas de mamíferos que son más estables a pH ácido (De-Vecchi & Coppes 1996, Haard 1992, Haard & Simpson 1994). Por otro lado, la termoestabilidad de las tripsinas de peces varía con la especie (De-Vecchi & Coppes, 1996).

En los crustáceos, el hepatopáncreas es un órgano que combina las funciones del hígado y el páncreas de los mamíferos y produce una gran cantidad de proteasas digestivas (Tsai *et al.* 1991). La tripsina de camarón fue aislada y caracterizada por primera vez en las glándulas digestivas de *Penaeus setiferus* (Gates & Travis 1969) y más tarde en otras especies de *Penaeus* (Lee & Lawrence 1982, Honjo *et al.* 1990, Galgani *et al.* 1985). En la glándula digestiva de *Litopenaeus japonicus*, la tripsina constituye aproximadamente el 6% de las proteínas totales solubles, siendo la tripsina una de las proteasas más importantes en este organismo (Galgani *et al.* 1985). Es importante remarcar la ausencia de pepsina en el tracto digestivo del camarón, éstos carecen de estómago verdadero y no cuentan con células secretoras de ácido, por lo que su digestión se lleva a cabo a un pH básico o neutro. Extractos enzimáticos de hepatopáncreas del Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* presentan tres isoformas de tripsina (Klein *et al.* 1996, Le Moullac *et al.* 1996). Dos de estas isoformas (Le Moullac 1994) y las tres isoformas de la tripsina de *L. vannamei* (Sainz *et al.* 2004a) han sido aisladas y caracterizadas sus propiedades físico-químicas. Al igual que en otros camarones y especies marinas (Lu *et al.* 1990, Martínez *et al.* 1988), las tres isoformas de tripsina de *Litopenaeus vannamei* presentan un punto isoeléctrico ácido.

Las tripsinas de *L. vannamei* presentan prácticamente máxima actividad en un amplio intervalo de temperatura (40-70°C) (Le Moullac 1994, Sainz *et al.* 2004a) estando el máximo a 50-55°C (Le Moullac 1994), a diferencia de la temperatura de máxima actividad de tripsina en otros organismos que suele ser en un intervalo estrecho (Jiang *et al.* 1991). En general, las tripsinas aisladas de animales marinos son aniónicas a pH neutro y tienen una actividad óptima a temperaturas más altas que la temperatura del animal o de su hábitat natural (Shahidi *et al.* 2001). Además la tripsina del *L. vannamei* presenta actividad en un intervalo amplio de pH de 6 a 11 (Le Moullac 1994, Sainz *et al.* 2004a) mientras que en otros organismos e incluso otros camarones el intervalo de pH de máxima actividad es mucho más estrecho (Jiang *et al.* 1991). Las tripsinas de otros organismos diferentes de crustáceos también tienen un máximo de actividad a pH alcalino como la tripsina de pollo cuyo pH óptimo es 8 (Guyonnet *et al.* 1999). Por otro lado, la actividad específica de las tripsinas de *L. vannamei* utilizando BAPNA como sustrato es 6 veces mayor que la de *P. indicus* (Le Moullac 1994, Honjo *et al.* 1990) y no tiene actividad exopeptidasa (Le Moullac 1994).

En 1996 Klein *et al.* describieron la secuencia de los DNAc de cinco isoformas de tripsina de la glándula digestivas del camarón *L. vannamei* (Klein *et al.* 1996). Además, clonaron y caracterizaron una secuencia de DNAc que propusieron codifica para un polipéptido de 255 aminoácidos correspondiente a una proenzima de tripsina (tripsinógeno). A pesar de la descripción de esta secuencia nucleotídica, durante mucho tiempo no se pudo detectar o aislar el tripsinógeno de *L. vannamei* por lo que algunos autores sugirieron que en los camarones el tripsinógeno se activa muy rápido a tripsina en lugar de almacenarse como precursor inactivo como en los mamíferos, o bien que en los camarones no se sintetizaba el tripsinógeno sino que la síntesis es directamente a tripsina (Gates & Travis 1969). Sin embargo, recientemente Gallegos-López *et al.* detectaron la presencia de transcritos de tripsinógeno empleando ensayos de retrotranscripción acoplados a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con RNA extraído de hepatopáncreas de *L. vannamei* y oligonucleótidos específicos para tripsinógeno diseñados a partir de la secuencia de DNAc

descrita por Klein *et al.* (Gallegos-López *et al.* 2004, Klein *et al.* 1996). También recientemente se ha podido ya detectar el tripsinógeno en el hepatopáncreas de *L. vannamei* mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos para tripsinógeno obtenidos a partir de un péptido sintético diseñado con la secuencia de DNAc descrita por Klein *et al.* (Sainz *et al.* 2004b, Klein *et al.* 1996). Con estos resultados recientes queda demostrado la presencia y síntesis de tripsinógeno de *L. vannamei* aunque no queda claro todavía el mecanismo de activación a tripsina, sobre todo porque la secuencia descrita de tripsinógeno de *L. vannamei* no posee secuencia de reconocimiento para enteroquinasa como lo tienen las tripsinas de mamíferos.

Producción de Tripsinógeno Recombinante de Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus Vannamei*

Actualmente las tripsinas que se encuentra en el mercado se obtienen principalmente a partir de tejido pancreático de animales en sacrificio ya sea bovino o porcino, sin embargo a pesar de que se emplean varios procesos para su purificación, las tripsinas obtenidas contienen actividades trazas de otras proteasas pancreáticas que son indeseables en algunos procesos industriales o de laboratorio (Hanquier *et al.* 2000). Aunado a esto, los estrictos lineamientos y regulaciones de la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos y otros organismos internacionales han conducido a la necesidad de uso de tripsina pura de origen recombinante sobre todo en el procesamiento de proteínas para uso farmacéutico y en investigación (Hanquier *et al.* 2000).

Debido a la importancia de esta enzima en los procesos digestivos del camarón Blanco del Pacífico *L. vannamei*, al gran interés mundial sobre el cultivo de esta especie para fines comerciales, al costo elevado de las formulaciones proteicas para la elaboración de dietas empleadas en la nutrición de este organismo, y a la necesidad de contar de tripsinas puras con alta actividad catalítica y sin otras actividades traza, decidimos intentar producir la tripsina o el tripsinógeno del camarón *L. vannamei* en un sistema de expresión y así contar

con una fuente pura y homogénea de dicha enzima o su zimógeno para el estudio de sus propiedades y su potencial aplicación en la acuicultura de esta especie cultivable.

Distintos reportes mencionan las dificultades encontradas al tratar producir una tripsina en forma recombinante, siendo los problemas más comunes la actividad proteolítica contra proteínas endógenas del hospedero como ha sido el caso de tripsina recombinante de rata producida en *Escherichia coli* (Higaki *et al.* 1989), e inestabilidad de la proteína debido a una autodigestión de la tripsina, inadecuado plegamiento y degradación del producto recombinante por proteasas endógenas (Yee & Blanch 1993, Woldike & Kjeldsen 1999). Por tal razón la estrategia para la producción de tripsinas recombinantes se fundamenta en la síntesis de su precursor natural inactivo (tripsinógeno). Debido a la toxicidad de las tripsinas recombinantes sobre su hospedero, al momento de seleccionar un sistema de expresión para esta enzima se ha de pensar en utilizar un sistema de expresión con promotores fuertemente regulables para poder realizar fermentaciones a alta densidades celulares antes de inducir la producción de esta enzima o de su forma inactiva y preferentemente promover su secreción hacia al medio de cultivo para evitar la toxicidad hacia el hospedero, y así aumentar la posibilidad de obtener mayores rendimientos de producción de esta proteína y permitir el empleo de esquemas de purificación sencillos y de costos bajos. Además el tripsinógeno del camarón *L. vannamei* es una proteína eucariótica y al menos su forma activa (tripsina) es una proteína parcialmente glicosilada (Le Moullac 1994, Sainz *et al.* 2004a) y se desea producir esta proteína en cantidades suficientes para emplearla en aplicaciones del área de la acuicultura.

Estos factores inducen a pensar en la selección del sistema de expresión de *Pichia pastoris* para la producción de la forma recombinante de tripsinógeno del camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, ya que este sistema de expresión cuenta con un promotor finamente regulable que se puede inducir después de tener una densidad celular deseada, estrategia útil si la proteína recombinante resulta ser tóxica para el hospedero. Además, *P. pastoris* reúne los criterios favorables para el desarrollo de procesos escalables a nivel

industrial y ha mostrado resultados satisfactorios con la producción de otras serín-proteasas como ha sido el caso de una forma modificada de tripsinógeno bovino (Hanquier *et al.* 2003) y la enteroquinasa de la misma especie (Vozza *et al.* 1996). Adicionalmente, un análisis realizado sobre el uso de codones en el DNAc tripsinógeno del camarón Blanco del Pacífico reveló que es comparable con otras proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris* y la distribución de sus codones preferenciales es similar a la de *P. pastoris*, asegurando la eficiencia de la traducción de esta proteínas (Escamilla-Treviño 2002). Por otro lado, la secuencia codificante del tripsinógeno de camarón *L. vannamei* no cuentan con regiones similares a la secuencia de terminación de la transcripción en *P. pastoris*, y en caso de proteólisis por la acción de las proteasas del hospedero existen alternativas para evitarlas o disminuirlas.

Con esta información se decidió utilizar el sistema de expresión de *Pichia pastoris* para la producción del tripsinógeno del camarón *L. vannamei*, por lo que empleando técnicas de Biología Molecular se llevó a cabo la construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar tripsinógeno de Camarón Blanco del Pacífico *L. vannamei* (Escamilla-Treviño 2002) y se evaluó la producción del tripsinógeno en biorreactores de 5 L (Viader-Salvadó *et al.* 2004).

Para la construcción de las cepas recombinantes se empleó el DNAc que codifica para el tripsinógeno de *L. vannamei* según la secuencia descrita por Klein *et al.* a partir de un plásmido que fue proporcionado por Alain Van Wormhoudt (Marine Biology Laboratory, URM-IFREMER-14-College de France, Concarneau Cedex, France). Dicho DNAc fue clonado fusionado a la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* en el vector de expresión pPIC9 del sistema de expresión de *P. pastoris* (Invitrogen, San Diego, CA) que posee el promotor *AOX1* obteniéndose el vector pPIC9Tg. Dicho vector recombinante fue caracterizado con enzimas de restricción y PCR, y se empleó para transformar por la técnica de esferoplastos la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Las cepas recombinantes obtenidas fueron analizadas por su genotipo mediante PCR, verificando la

integración de los vectores clonados, y fenotipo mediante su crecimiento en metanol como única fuente de carbono. Se obtuvieron cepas His⁺ Mut⁺ que integraron satisfactoriamente el vector pPIC9Tg corroborando dicha integración mediante un análisis por PCR del DNA genómico de las cepas recombinantes obtenidas.

Las cepas recombinantes fueron cultivadas bajo condiciones de inducción, en un medio mínimo amortiguado conteniendo metanol al 0.75% (BMM). En el análisis por electroforesis en geles de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de los medios de cultivo libre de células no se detectó la banda esperada correspondiente al peso molecular del tripsinógeno del Camarón Blanco del Pacífico (26.7 kDa) según lo reportado por Klein *et al.*, sin embargo sí se observó una banda de 31 kDa (Fig. 1), cuya identidad como tripsinógeno fue corroborada por un análisis de Western blot (Fig. 2) empleando anticuerpos específicos contra la tripsina de esta especie, lo cual indica una posible glicosilación de la proteína recombinante. La detección de la presencia de transcritos de tripsinógeno por RT-PCR producidos por las cepas recombinantes cultivadas bajo condiciones de inducción empleando oligonucleótidos específicos diseñados en base a la secuencia del DNAc reportada por Klein *et al.* confirmó la expresión del gen heterólogo en el sistema empleado.

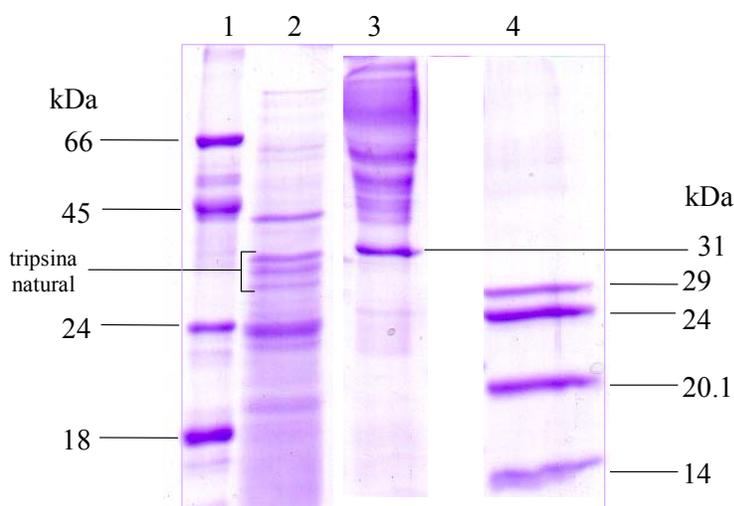


Figura 1. Análisis de proteínas secretadas al medio de cultivo. Gel de SDS-Poliacrilamida 12% teñido con azul de Coomassie. Carril 1 y 4: Marcador de peso Molecular. Carril 2: Extracto proteico de glándulas

Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E., Galán-Wong, L.J. y Viader-Salvadó, J.M. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

digestivas de *Litopenaeus vannamei*. Carril 3: Proteínas secretadas por una cepa recombinante cepa GS115-tripsinógeno inducida con metanol.

Con el fin de obtener mayor eficiencia en los niveles de producción del tripsinógeno recombinante de camarón para contar con una fuente suficiente de la proteína recombinante para su purificación y posterior caracterización bioquímica, se inició un estudio para determinar las condiciones de fermentación en un biorreactor de 5 L. Las fermentaciones se realizaron en un fermentador BioFlo III (New Brunswick Scientific Co., Inc) empleando tres etapas, siendo la primera una fermentación en lote de glicerol y las otras dos etapas en lote alimentado con glicerol y metanol, respectivamente. Se realizaron diferentes fermentaciones para evaluar el efecto del pH y temperatura durante la etapa de inducción-producción en la producción del tripsinógeno de camarón. Los resultados obtenidos indicaron claramente que a pH 3 disminuyen los niveles de producción del tripsinógeno recombinante, probablemente por una inestabilidad de la misma a pH 3 por ser este pH inferior a su punto isoeléctrico teórico. Por otro lado, trabajando a baja temperatura (22°C) y a pH 5 durante la etapa de inducción-producción, se encontró una producción mayor que en ensayos de fermentación a 30°C.

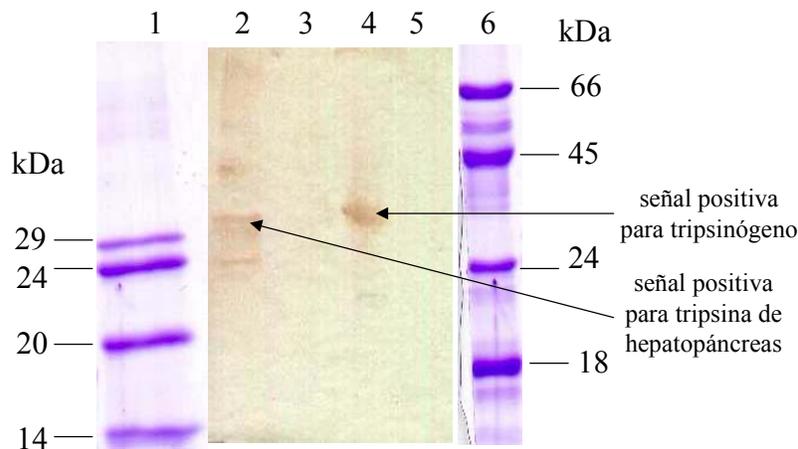


Figura 2. Análisis de Western blot del medio de cultivo libre de células transformadas con el DNAc de tripsinógeno después de 48 h de inducción con metanol. Carril 1 y 6: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto proteico de glándulas digestivas de *Litopenaeus vannamei* como control positivo. Carril 3 y 5: Control negativo. Carril 4: Medio de cultivo de cepas de tripsinógeno cultivadas bajo condiciones de inducción (31 kDa).

Discusión y Conclusiones

Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E., Galán-Wong, L.J. y Viader-Salvadó, J.M. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

El análisis de las propiedades conocidas de la tripsina y tripsinógeno del camarón *L. vannamei* y junto con el interés de aplicarlas en el área de acuicultura, se seleccionó el sistema de expresión de *Pichia pastoris* para la producción de tripsinógeno de camarón. Las cepas recombinantes de *P. pastoris* construidas producen y secretan el tripsinógeno de camarón de forma muy eficiente, después de realizar previamente un cultivo a altas densidades celulares en condiciones en las que el promotor empleado para regular el DNAc heterólogo se encuentra reprimido. Además, el hecho que la tripsina de camarón tenga actividad a un intervalo de temperaturas de 40-70°C (Le Moullac 1994, Sainz *et al.* 2004a) favorece la inhibición de la autoactivación y por lo tanto la toxicidad sobre el hospedero a las condiciones de temperatura de cultivos de *P. pastoris*. ($\leq 30^{\circ}\text{C}$). Para el caso de tripsinógeno bovino, otros autores (Hanquier *et al.* 2003) tuvieron que hacer una mutación en el sitio de activación para poder disminuir la autoactivación y aumentar así los niveles de producción en fermentaciones con *Pichia pastoris*.

Actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un proceso de purificación del tripsinógeno del camarón *L. vannamei* que conlleva una ultradiafiltración del medio de cultivo libre de células y una posterior cromatografía de intercambio aniónico.

Con una fuente constante de tripsinógeno de camarón se podrán hacer estudios de funcionalidad, especialmente para entender el proceso de activación o bien conocer factores de activación que podrían ser utilizados como aditivos de alimentos para camarón, ya que esta enzima no posee secuencia de reconocimiento de enteroquinasa como lo tiene el tripsinógeno bovino (Klein *et al.* 1996). Así mismo se podrá diseñar una prueba de digestibilidad *in vitro* de proteínas para camarón con una probable mayor correlación con las pruebas de digestibilidad *in vivo*, o bien utilizarla para la producción de hidrolizados de proteína de pescado, etc.

Agradecimientos

Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E., Galán-Wong, L.J. y Viader-Salvadó, J.M. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

Agradecemos los apoyos económicos del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), al Dr. Alain Van Wormhoudt por proporcionar un pÁsmido con la secuencia del DNAC del tripsinÓgeno del camarón *Litopenaeus vannamei*, al Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por facilitar muestras biológicas así como las amenas discusiones sobre el tema y a Luis Lauro Escamilla-Treviño, Juan Antonio Gallegos-López y José Antonio Fuentes-Garibay quienes a través del desarrollo de sus tesis de doctorado o licenciatura participaron en la parte experimental del presente trabajo.

Bibliografía

- Aoki H., Ahsan M.N., Watabe S. (2003) Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. *Protein Expression and Purification* **31**, 213-221.
- Bi X.Z., Chew F.T. (2004) Molecular, proteomic and immunological characterization of isoforms of arginine kinase, a cross-reactive invertebrate pan-allergen, from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, S226.
- Buckholz R.G., Gleeson M.A. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* **9**, 1067-1072.
- Cereghino G.P.L., Cregg J.M. (1999) Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. *Current Opinion Biotechnology* **10**, 422-427.
- Cereghino G.P.L., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 45-66.
- Chan Y.H., Cheng C.H.K., Chan K.M. (2003) Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and -II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **135**, 613-624.
- Chen L-L., Leu J-H., Huang C-J., Chou C-M., Chen S-M., Wang C-H., Lo C-F., Kou G-H. (2002) Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* **293**, 44-53.
- Cohen T., Gertler A. (1981) Pancreatic proteolytic enzymes from carp *Cyprinus carpio* I. Purification and physical properties of trypsin, chymosin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology* **69B**, 647-653.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., Rascke W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **11**, 905-910.
- De-Vecchi S.D., Coppes Z. (1996) Marine fish digestive proteases —relevance to food industry and south-west Atlantic region—a review. *Journal of Food Biochemistry* **20**, 193-214.
- Eckart M.R., Bussineau C.M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current Opinion Biotechnology* **7**, 525-530.
- Escamilla-Treviño L.L. (2002) Producción de tripsina del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N.L. (México).

- Escamilla-Treviño L.L., Viader-Salvadó J.M., Guerrero-Olazarán M. (1999) Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* **2**, 27-33.
- Galgani F.G., Benyamin Y., Van Wormhoudt A. (1985) Purification, properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81B**, 447-452.
- Gallegos-López J.A. (2004) Síntesis y clonación molecular del DNAc de α -glucosidasa de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
- Gates B.J., Travis J. (1969) Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (*Penaeus setiferus*). *Biochemistry* **8**, 4483-4489.
- Gellisen G., Hollenberg C. (1997) Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, and *Kluyveromyces lactis* — a review. *Gene* **190**, 87-97.
- Gu P.-L., Yu K.L., Chan S.-M. (2000) Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Letters* **472**, 122-128.
- Guerrero-Olazarán M., Viader-Salvadó J.M. (2003) *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes. In: *Procesos Biotecnológicos*. (ed. by Galán-Wong L.J., Elías-Santos M., Tamez-Guerra P., Quintero-Ramírez R., Quintero-Zapata I.), pp. 136–156. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza.
- Guyonnet V., Thuscik F., Long P.L., Polanowski L.A., Travis J. (1999) Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken. *Journal of Chromatography A* **852**, 217–225.
- Haard N.F. (1992) A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **1**, 17–35.
- Haard N.F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In: *Seafoods chemistry, processing technology and quality* (ed. by Shahidi F., Botta J.R.), pp. 11–33. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.
- Haard N.F. (1998). Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technology* **53**, 64–67.
- Haard N.F., Simpson B.K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: *Fisheries processing: biotechnological applications* (ed. by Martin A.M.), pp. 132–154. Chapman and Hall, London, UK.
- Hanquier J., Sorlet Y., Desplancq D., Baroche L., Ebtinger M., Lefèvre J.F., Pattus F., Hershberger C.L., Vertès A.A. (2003) A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1108–1113.
- Hanquier J.M., Hbrshberger C.L., Desplanca D., Lardson J.L., Rosteck P.R. (2000) Production of soluble recombinant trypsinogen analogs. WO 00/17332, PCT/US99/21047.
- Higaki J.N., Evin L.B., Craik C.S. (1989). Introduction of a cysteine protease active site into trypsin. *Biochemistry* **28**, 9256-9263.
- Higgins D.R., Cregg J.M. (1998) Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology **103** (ed. by Higgins D.R., Cregg J.M.), Humana Press, Totowa, NJ.
- Honjo I., Kimura S., Nonaka M. (1990) Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**(10), 1627-1634.
- Huang C.-C., Sritunyalucksana K., Söderhäll K., Song Y.-L. (2004) Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase *Developmental & Comparative Immunology* **28**, 279-294.
- Jiang S.T., Moody M., Chen H.C. (1991) Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Science* **56**, 322–326.
- Jónsdóttir G., Bjarnason J.B., Gudmundsdóttir Á. (2004) Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. *Protein Expression and Purification* **33**, 110-122.
- Keil B. (1971) Trypsin. In: *The Enzymes*. 3rd ed. Vol. III. pp. 249-275. Academic Press. New York.
- Kim D.K., Jang I.K., Seo H.C., Shin S.O., Yang S.Y., Kim J.W. (2004) Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture* **237**, 21-30.

- Klein B., Moullac L.G., Sellos D., Wormhoudt A.V. (1996) Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moulting Cycle. *Journal. Biochemistry. Cell biology.* **28**(5), 551-563.
- Le Moullac (1994) Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Memoire pour l'optention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Montpellier (France).
- Le Moullac G.L., Klein B., Sellos D., van Wormhoudt A. (1996) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **208**, 107-125.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1982) A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp; influence of diet, age and species. *Physiologist* **25**, 241
- Lin S-T., Chang Y-S., Wang H-C., Tzeng H-F., Chang Z-F., Lin J-Y., Wang C-H., Lo C-F., Kou G-H. (2002) Ribonucleotide reductase of shrimp white spot syndrome virus (WSSV): expression and enzymatic activity in a baculovirus/insect cell system and WSSV-infected shrimp. *Virology* **304**, 282-290.
- Lu P.J., Liu H.C., Tsai I.H. (1990) The midgut trypsin of shrimp (*Penaeus monodon*), biology and chemistry. *Hoppe-Seyler* **371**, 851-857.
- Luo T., Zhang X., Shao Z., Xu X. (2003) *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp. *Penaeus monodon FEBS Letters* **551**, 53-57.
- Macouzet M., Simpson B.K., Lee B.H (1999) Cloning of fish enzymes and other fish protein genes. *Critical Reviews in Biotechnology* **19**, 179-196.
- Martínez A., Olsen R.L. Serra J.L. (1988) Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiol* **91**, 677-684.
- McLean E, Devlin R.H., Byatt J.C., Clarke W.C, Donaldson E.M (1997) Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Aquaculture* **156**, 113-128.
- Melamed P., Gong Z., Fletcher G., Hew C.L. (2002) The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture* **204**, 255-269.
- Muller S., Sandal S., Kamp-Hansen P., Dalboge H. 1998 Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Y. lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283.
- Neurath H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
- Ohta S., Nishikawa A., Imamura K. (2003) Molecular cloning and expression of pyruvate kinase from globefish (*Fugu rubripes*) skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **135**, 397-405.
- Peterson B.C., Small B.C., Bosworth B.G. (2004) Effects of bovine growth hormone (Posilac®) on growth performance, body composition, and IGF1s in two strains of channel catfish. *Aquaculture* **232**, 651-663.
- Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Romanos R. (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Current Opinion Biotechnology* **6**, 527-533.
- Sainz J.C., García-Carreño F., Hernández-Cortés P. (2004a) *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **138**, 155-162.
- Sainz J.C., García-Carreño F., Sierra-Beltrán A., Hernández-Cortés P. (2004b) Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology* **24**, 266-273.
- Shahidi F., Janak Kamil Y.V.A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology.* **12**, 435-464.
- Tsai I.H., Lu P., Chuang J.L. (1991) The midgut enzymes of shrimp *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*. *Biochemica Biophysica* **1080**, 59-67.

- Udomkit A., Treeratrakool S., Panyim S. (2004) Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **298**, 79-91.
- Viader-Salvadó J.M., Fuentes-Garibay J.A., Castillo-Galván M., Castillo-Galván M., Galán-Wong L., Guerrero-Olazarán M. (2004) Producción de tripsinógeno del camarón *Litopenaeus vannamei* en cepas recombinantes *Pichia pastoris* a nivel fermentador. BIOTEC'04. Universidad de Oviedo y Sociedad Española de Biotecnología, Oviedo (España).
- Viader-Salvadó J.M., Guerrero-Olazarán M. (2003) Monitoreo y control de bioprocesos con *Pichia pastoris*. En: *Procesos Biotecnológicos*. (ed. by Galán-Wong L.J., Elías-Santos M., Tamez-Guerra P., Quintero-Ramírez R., Quintero-Zapata I.), pp. 232-237, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza.
- Villacis J.F., Lehrer N., Vogel L., Schick Tanz S., Randow S., Reese G., El-Dahr J.M., Vieths S., Lehrer S.B. (2004) Comparison of IgE reactivity of recombinant and natural pen a 1 by RAST and mediator release. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **113**, S148 .
- Vozza L.A., Wittwer L., Higgins D.R., Purcell T.J., Beergseid M., Collins-Racie L.A., LaVallie E.R., Hoeffler J.P. (1996). Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **14**, 77-81.
- Walsh G., Headon D.R. (1995) Protein Biotechnology. pp. 1, 13-15. John Wiley and Sons.
- Walsh K. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods in Enzymology* **19**, 41-63.
- Woldike H.F., Kjeldsen T.B. (1999) Process for producing trypsin (trypsinogen). *United States Patent* 5.945.328.
- Yee L., Blanch, H.W. (1993). Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 781-790.
- Yodmuang S., Udomkit A., Treeratrakool S., Panyim S. (2004) Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **312**, 101-114.