

Expresión heteróloga de *xilanasas* y *aspartil* proteasas de hongo

Heterologous expression of *xylanases* and *aspartyl* proteases fungal

PÉREZ-RODRÍGUEZ, Joany^{1†}, VIGUERAS-MORALES, Yajaira Sulim², IBARRA-GARCIA, José Antonio², ÁLVAREZ-CERVANTES, Jorge², y MERCADO-FLORES, Yuridia^{1*}

¹*Universidad Politécnica de Pachuca. México.*

²*Instituto Politécnico Nacional. Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*

ID 1^{er} Autor: *Joany, Pérez-Rodríguez* / **ORC ID:** 0000-0003-3715-2633, **Researcher ID Thomson:** V-8559-2018, **CVU CONACYT ID:** 423548

ID 1^{er} Coautor: *Yajaira Sulim, Viguera-Morales* / **ORC ID:** 0000-0001-6710-5497, **Researcher ID Thomson:** V-8553-2018, **CVU CONACYT ID:** 858288

ID 2^{do} Coautor: *José Antonio, Ibarra-García* / **ORC ID:** 0000-0002-5016-0622, **CVU CONACYT ID:** 30792

ID 3^{er} Coautor: *Jorge, Álvarez-Cervantes* / **ORC ID:** 0000-0002-1764-9880, **CVU CONACYT ID:** 268049

ID 4^{to} Coautor: *Yuridia, Mercado-Flores* / **ORC ID:** 0000-0003-3278-2783, **CVU CONACYT ID:** 122168

J. Pérez, Y. Viguera, J. Ibarra, J. Álvarez e Y. Mercado

yuridiamercado@upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

The xylanases and aspartyl proteases derived from fungi are hydrolytic enzymes with an industrial application. Its importance lay in its biochemical properties, because they reduce time and costs in the production processes, due to its high specificity and selectivity. However, the current demand for these enzymes is not satisfied for the production using the native strain, this because yields low concentrations of the enzymes and requires high biomass density and production costs turns elevated. Thus in recent years, thanks to genetic engineering, new tools have been developed to increase the yield in the production of these enzymes and improve their characteristics, one of which is the heterologous expression. This tool has allowed the obtaining of recombinant proteins through different expression systems, such as, bacteria, yeasts and filamentous fungi. By means of the heterologous expression, the overproduction of heterologous xylanases and aspartyl proteases has been facilitated. Nevertheless, there are aspects to improve or to take in account, and as such there is a constant research to improve these techniques and make them more efficient.

Enzimas, Proteínas Heterólogas, Ingeniería Genética

1. Introducción

Las enzimas son moléculas biológicas complejas, que actúan como catalizadores que intervienen en los procesos metabólicos de los seres vivos, y tienen importancia a nivel biológico, científico e industrial (Beg *et al.*, 2001). Las bacterias, hongos y levaduras tienen la capacidad de excretar diferentes tipos de enzimas durante su crecimiento, siendo las hidrolíticas las que se producen en mayor cantidad. Entre las más importantes se encuentran las celulasas, pectinasas, xilanasas, xilosidasas y proteasas; utilizadas en diferentes procesos industriales (Motta *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). El uso de estas proteínas en diferentes sectores industriales, como es el papelerero, textil, alimentos, producción de bioetanol, entre otros, se debe principalmente a sus propiedades bioquímicas, disminuyendo tiempos y costos en los procesos, comparado con los tradicionales debido a su especificidad y selectividad (Ahmed *et al.*, 2012).

La producción en los últimos años ha evolucionado gracias al uso de procesos de fermentación, utilizando microorganismos seleccionados, sin embargo, la demanda actual del mercado no se satisface debido a la baja concentración, alta densidad de los tejidos y costos de producción (Palma *et al.*, 2002; Binod *et al.*, 2013). La industria en los últimos años, ha tenido que buscar nuevas alternativas para satisfacer sus necesidades, por lo que se ha dado a la tarea de buscar enzimas que cumplan con propiedades específicas, tales como estabilidad en un amplio intervalo de valores de pH y temperatura, alta actividad específica y resistencia a productos químicos, así como también condiciones de facilidad de uso, por lo que las enzimas nativas no son suficientes para satisfacer la demanda, debido al bajo rendimiento (Davids *et al.*, 2013). La ingeniería genética provee de nuevas herramientas para mejorar las características requeridas. Por ejemplo, la expresión heteróloga es importante en la producción de enzimas de interés industrial (Ahmed *et al.*, 2009), como las xilanasas y proteasas.

2. Producción de xilanasas y aspartil proteasas

Las xilanasas representan uno de los mercados de mayor éxito para las hemicelulosas comerciales. Esto debido a su uso potencial en aplicaciones de diversos sectores de la industria, por lo que hay una tendencia creciente en la producción de estas enzimas. Estas proteínas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis del xilano. Son producidas principalmente por microorganismos como bacterias y hongos, que participan en la degradación de la pared celular de plantas, junto a otras enzimas que hidrolizan polisacáridos (Wong *et al.*, 1988; Subramaniyan y Prema, 2002; Goswami y Pathak, 2013). La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes sistemas de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general controlado por dos mecanismos; por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales como el xilano, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como xilosa, arabinosa o xilobiosa (Mandal, 2015). Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de estas actividades, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes (Polizeli *et al.*, 2005).

Los hongos filamentosos son productores de xilanasas desde un punto de vista industrial, excretan las enzimas en el medio y sus niveles son más altos que los producidos en levaduras o bacterias. Por otra parte, además de las xilanasas, los hongos producen varias enzimas auxiliares requeridas para la degradación del xilano (Goswani y Pathak, 2003; Motta *et al.*, 2013). Las especies de los hongos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* *Penicillium*, *Neurospora* y de bacterias como *Ruminococcus*, *Fibrobacteres*, *Clostridium* se consideran grandes productores de xilanasas (Kulkarni *et al.*, 1999; Motta *et al.*, 2013).

Sin embargo, las xilanasas son principalmente producidas por *Trichoderma* y *Aspergillus* a escala industrial (Fengxia *et al.*, 2008). Por otra parte, las enzimas proteolíticas, también conocidas como proteasas o peptidasas, son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, produciendo péptidos o aminoácidos libres. Constituyen una gran familia de enzimas, divididas en endopeptidasas (EC 3.4.21-99) y exopeptidasas (EC 3.4.11-19), clasificadas según la posición del péptido vínculo para ser escindido (Gupta *et al.*, 2002; Sabotic y Kos, 2012).

Las proteasas de ácido aspártico, también conocidas como aspartil proteasas se encuentra en el grupo de las endopeptidasas y dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3 a 4) y tienen puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3 a 4.5. Sus masas moleculares están entre los 30 a 45 kDa. Se pueden encontrar en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y virus, en donde desempeñan diferentes e importantes funciones (Horimoto *et al.*, 2009).

Una de las propiedades más significativas de este tipo de proteasas es su aplicación en la industria láctica, específicamente en la fabricación de quesos debido a su capacidad de coagular proteínas de la leche. Debido a esto, las proteasas ácidas microbianas han reemplazado a la enzima de ternera (cuajo), facilitando la expansión de la industria de la fabricación de queso. Además, juegan un papel prominente en el ablandamiento de la carne y en la panificación (Kumar y Takagi, 1999). La demanda que existe en el mercado de estas enzimas ha generado el desarrollo de nuevas estrategias para la producción, utilizando herramientas de ingeniería genética, como es el mejoramiento de cepas productoras o el uso de sistemas de expresión heteróloga, permitiendo la obtención de grandes cantidades de estas proteínas (Motta *et al.*, 2013).

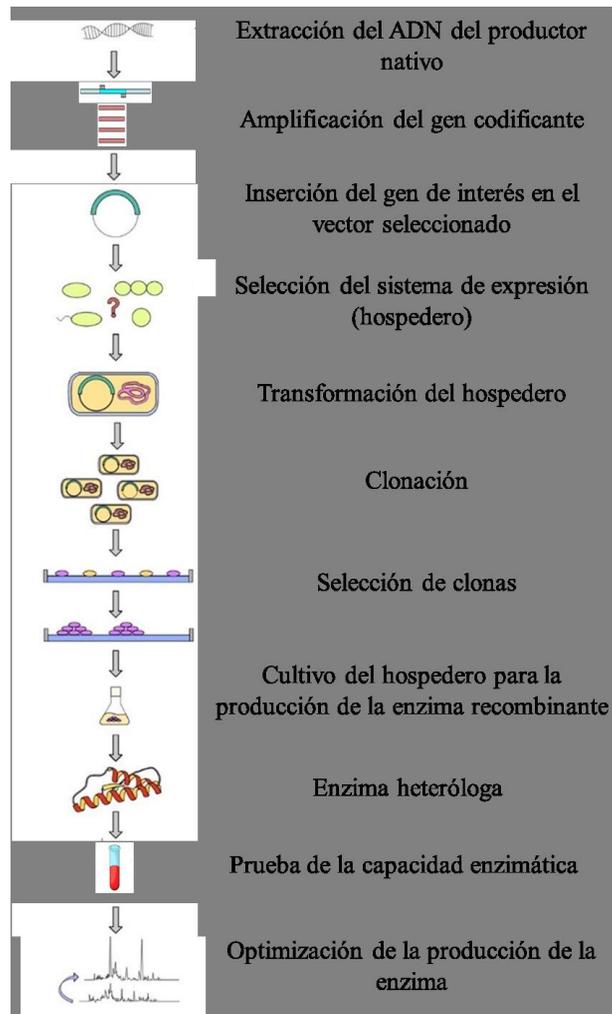
3. Sistemas de expresión de proteínas

Las técnicas de DNA recombinante junto con los avances sobre el conocimiento de la fisiología y el metabolismo microbiano, han permitido el diseño de procesos donde los microorganismos se utilizan como factorías celulares, mejorando con esto las características específicas de las enzimas ya estudiadas y produciendo cepas modificadas que expresan a gran escala en hospederos de expresión heteróloga (Juturu y Wu, 2012).

Debido a esto, en la última década, han aumentado de forma exponencial la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico e industrial. Las fases necesarias para la producción comercial de proteínas son: clonación del gen de interés en un vector de expresión, transformación del microorganismo hospedero (sistema de expresión), proceso de selección de los transformantes, crecimiento del microorganismo y expresión en biorreactores y por último, recuperación y purificación de la proteína (Figura 2.1) (Ongley *et al.*, 2013).

El tipo de sistema de expresión a utilizar se selecciona en función de diferentes parámetros, como el rendimiento de la producción, el éxito en las modificaciones y el procesamiento post-traducciona, el plegamiento y la glicosilación de las proteínas de interés, la viabilidad económica y el posterior proceso de purificación. Para este fin se han empleado bacterias, levaduras y hongos. Hay diversos reportes descritos de clonación de un gran número de enzimas de varias fuentes. Cabe señalar que las enzimas recombinantes muestran mejores propiedades que las enzimas nativas (Juturu y Wu, 2012; Sharma y Kumar, 2013).

Figura 2.1 Pasos para la expresión heteróloga de enzimas



3.1 Bacterias

Las bacterias son microorganismos que son utilizados como sistemas de expresión de proteínas recombinantes de los cuales *Escherichia coli* es el organismo de mayor elección. El amplio conocimiento que se tiene de esta procarionta permite su uso con mayor frecuencia en la producción de proteínas industriales y farmacéuticas (Petsch y Anspach, 2000).

Las proteínas recombinantes sobreexpresadas en este sistema, se acumulan en el citoplasma o en el espacio periplásmico. Para la expresión de rutina, las cepas de *E. coli* BL21 y K12 se usan con mayor frecuencia (Phillips *et al.*, 1984). Las dificultades que presenta este sistema es que la proteína recombinante forme cuerpos de inclusión, generando problemas de inactivación e insolubilidad (Fischer *et al.*, 1993). La mayoría de los problemas son el resultado de la diferencia entre el uso de codones de *E. coli* y la proteína sobreexpresada, por ejemplo, para proteínas eucariotas.

El uso de codones que tengan estos organismos puede ser diferente al de *E. coli* y podrían ser especialmente un obstáculo (Dong *et al.*, 1996). De tal forma, si una proteína de origen eucariótico contiene un elevado número de codones de bajo uso en *E. coli* puede llevar a una insuficiencia de los tRNAs correspondientes y conducir a la terminación prematura de la traducción, el desplazamiento del marco de lectura y la incorporación errónea de aminoácidos. Para evitar este tipo de problemas, se han desarrollado cepas que pueden sobreexpresar algunos de los tRNAs de estos codones de baja frecuencia en la bacteria y así se pueda llevar a cabo una buena traducción. Dentro de estas se encuentran las cepas BL21 CodonPlus-RIL, BL21 CodonPlus-R y Rosetta (Kurland y Gallant, 1996). Alternativamente se pueden usar otros hospederos bacterianos que pueden reducir este problema (Terpe, 2006).

Diversas cepas de *Bacillus*, bacteria Gram-positiva, también son empleadas en la producción de proteínas heterólogas, debido a que poseen la capacidad de alta secreción y exportación de proteínas directamente al medio extracelular. En contraste con *E. coli*, se sabe poco de esta bacteria, sobre la formación de enlaces disulfuro y la isomerización (Westers *et al.*, 2004). Sin embargo, los genomas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* han sido secuenciados y estas bacterias no producen exotoxinas o endotoxinas dañinas (Demaina y Vaishnavb, 2009).

B. subtilis es un procariote bien estudiado y ha sido empleado exitosamente en la producción de proteínas heterólogas, su capacidad de secretar directamente en el medio, es una de las mayores ventajas (Li *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque la transformación en este sistema parece ser más fácil, la producción de proteasas que hidrolizan a las proteínas recombinantes podría ser un problema (Murashima *et al.*, 2002).

Otro potencial problema es la modificación post-traduccional de la proteína de origen eucariótico debido que para su función o estructuración se requiere de la adición de grupos funcionales que no obtendrá de la bacteria usada para la expresión heteróloga (Demaina y Vaishnavb, 2009). En tal caso, y para seleccionar adecuadamente el organismo en que se expresará la proteína, se recomienda hacer un análisis bioinformático, por lo que de ser necesarias estas modificaciones se recomienda usar uno de los modelos descritos en la siguiente sección.

3.2 Levaduras

La expresión heteróloga de proteínas en levaduras es altamente atractiva porque provee beneficios adicionales a los sistemas de expresión en bacterias, entre los cuales se encuentran la habilidad para realizar modificaciones post-traduccionales, producir altos niveles de densidad celular y secretar proteínas en el medio de cultivo. Además, las levaduras son libres de toxinas y la mayoría tiene el *status* GRAS (por sus siglas en inglés “generally recognized as safe” y que significa “generalmente reconocido como seguro”). Las dos cepas de levadura más utilizadas son *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Demaina y Vaishnavb, 2009). *S. cerevisiae* es el modelo eucariótico más estudiado para la expresión heteróloga. Su genoma se encuentra completamente secuenciado.

Las mutantes por delección son fácilmente adquiribles y secreta altas cantidades de proteínas en el medio de cultivo. Otra ventaja que presenta es que las proteínas exógenas pueden dirigirse a los compartimentos unidos a la membrana los cuales se aíslan fácilmente para experimentos bioquímicos (Van-Khue y Rajini, 2004). Por otra parte, *P. pastoris* es ampliamente utilizada en la expresión de proteínas heterólogas, debido a que presenta ventajas como: mayor productividad de la proteína de interés, capacidad de secreción, formación de enlaces disulfuro, crece en soluciones con altas concentraciones de metanol y genera bajos costos de producción. Además, este sistema evita la hiperglicosilación (Gellison *et al.*, 1992). Por lo tanto esta levadura ha emergido como un excelente hospedero para la producción comercial de enzimas debido a su alta expresión bajo sus propios promotores o aquellos inducibles con metanol (Juturu y Wu, 2012).

3.3 Hongos filamentosos

Las características conocidas de alta productividad de los hongos filamentosos están en parte relacionadas con sus capacidades inherentes de crecimiento rápido y la gran producción de biomasa en sustratos de bajo costo en fermentadores relativamente simples. Estos organismos son secretores excepcionalmente buenos (Cherry y Fidantsef, 2003). El desarrollo de la tecnología recombinante aprovecha el poder de muchos de estos hongos como hospederos en la producción de proteínas recombinantes específicas como productos finales con aplicaciones en los sectores agrícola, alimentario, biomédico, farmacéutico, energético e industrial (Schuster *et al.*, 2002).

Con este fin, la investigación actual se lleva a cabo en mecanismos celulares para control interno de la calidad de proteínas, estrés de secreción, genómica funcional relacionada con la expresión y secreción de proteínas, modificación postraduccional, aplicación de promotores de expresión alternativos, identificación de factores de transcripción específicos y vinculación de la fisiología fúngica para la productividad.

Además del rendimiento, es igualmente importante que una proteína heteróloga dada se produzca en una forma activa y funcional, por lo que el plegamiento, el procesamiento proteolítico y la adición de glucanos como las principales modificaciones, se llevan a cabo correctamente en estos microorganismos (De Pourcq *et al.*, 2010; Ward, 2012).

Los hongos filamentosos que dominan la escena como hospederos de producción recombinante son *A. niger*, *A. oryzae* y *T. reesei* que se reproducen asexualmente. Consecuentemente, la mayoría de la información sobre la expresión de proteínas heterólogas proviene de estudios que usan estos microorganismos genéticamente bien caracterizados (Nevalainen y Peterson, 2014). Un competidor más reciente para la producción de productos génicos recombinantes heterólogos es *Chrysosporium lucknowense*, las ventajas que posee este organismo son: altas frecuencias de transformación, producción de proteínas a pH neutro, baja viscosidad del caldo de fermentación y tiempos cortos de producción (Emalfarb *et al.*, 2003).

4. Clonación de genes de xilanasas y proteasas de hongos

La búsqueda y selección de xilanasas y proteasas microbianas para aplicaciones industriales, ha permitido la introducción de la tecnología de ADN recombinante (Sunna y Antranikian, 1997), en donde los principales retos en la producción de estas enzimas son obtener una forma pura de estas a partir de una preparación fúngica. Los genes que codifican para estas proteínas se han clonado en hospedadores homólogos y heterólogos con el objetivo de sobrepoducirlas, sin alterar sus propiedades para adaptarse a aplicaciones comerciales (Baba *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 2009). Se han clonado y expresado varios genes de estas enzimas para mejorar la producción, la utilización del sustrato y otras propiedades comercialmente útiles (Chand and Mishra, 2003).

4.1 Clonación en *E. coli*

Como ya se mencionó, *E. coli* ha sido ampliamente utilizada para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes incluyendo xilanasas y proteasas de hongos (Tabla 2.1). Esto se debe principalmente a la amplia elección de vectores y facilidad de clonación de ADN de interés, sin embargo, la principal limitante es que no todas las proteínas se secretan de manera eficiente (Sorensen y Mortensen, 2005).

Existen diversos reportes acerca de la expresión heteróloga de xilanasas en *E. coli*, como es el caso del trabajo de Krisana *et al.*, (2005) quienes reportaron la expresión de una xilanasas heteróloga de *Aspergillus cf. niger* la cual mostró un peso molecular de 20.1 kDa por SDS-PAGE. Otro caso es el de la xilanasas codificada por el gen *xynII*, el cual fue clonado en el vector pET-28a (+), y expresado en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Zhou *et al.*, 2008). El gen *Xyn2* que codifica para una endo- β -1,4-xilanasas de *Trichoderma reesei*, fue clonado y expresado en *E. coli* BL21, la proteína heteróloga fue purificada por cromatografía de afinidad por columna de Ni²⁺-NTA, la cual presentó un pH y temperatura óptimos de 5.0 y 50°C, respectivamente (Jun *et al.*, 2009).

Li *et al* (2010) realizaron la clonación del gen *SAP6*, que codifica para la proteasa ácida de *Metschnikowia reukaufii*. La expresión de dicha proteína se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión pET-24a, logrando obtener una enzima recombinante de 54 kDa, con una temperatura y un pH óptimo de 40°C y 3.4, respectivamente. Determinaron que la actividad enzimática se ve afectada por los inhibidores Cu⁽²⁺⁾, Mg⁽²⁺⁾, Zn⁽²⁺⁾ y Ag⁽⁺⁾.

También se encontró que la proteína recombinante purificada tenía actividad coagulante de la leche. De igual forma, Jarai *et al.* (1994), expresó una proteasa de tipo aspártica de *Aspergillus niger*, con la capacidad de coagular las proteínas de la leche. La expresión la realizó en *E. coli*, con ayuda del vector pSE103. Esta proteína es codificada por el gen *pepE* y la proteína heteróloga posee un peso molecular de 43 kDa, un pH óptimo de 3 y es estable a un amplio intervalo de temperaturas.

Por otro lado, también se han logrado expresar aspartil proteasas importantes en la industria del Sake, tal como lo mencionan Kitano *et al* (2002), quienes expresaron una proteasa de *Aspergillus oryzae*, que es codificada por el gen *pepA*.

La enzima expresada en *E. coli* DH5 α , presentó un peso molecular de 48 kDa, fue estable a un amplio intervalo de temperatura (30-42°C), con una temperatura óptima de 42°C y es activa a pH ácidos. Doua *et al.* (2014), lograron expresar una proteasa aspártica de *Trichoderma asperellum*, importante para el biocontrol de hongos fitopatógenos. La proteasa recombinante es codificada por el gen *Asp55*, la cual se expresó en *E. coli* BL21, se purificó y evaluó la actividad enzimática mostrando un efecto inhibitor sobre *Alternaria alternata*.

Tabla 2.1 Xilanasas y proteasas heterólogas expresadas en *E. coli*.

Fuente	Gen	Vector	Hospedero	PM (kDa)	pH	Temp. °C	Importancia biotecnológica	Referencia
Xilanasas								
<i>Aspergillus niger</i> BCC14405	<i>Xyn</i>	pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> DH5 α	20.1	-	-	Degradación de residuos agroindustriales.	Krisana <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus usamii</i> E001	<i>xynII</i>	pET-28a(+)	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	20	4.6	50	No se ha determinado	Zhou <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30	<i>Xyn2</i>	pET28 α	<i>E. coli</i> BL21	24	5.0	50	Blanqueamiento de la pulpa kraft	Jun <i>et al.</i> , 2009
Aspartil Proteasas								
<i>M. reukauffi</i>	SAP6	pET-24a	<i>E. coli</i>	54	3.4	42	Coagulante de la leche	Li <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. oryzae</i>	<i>pepA</i>	pUCII8	<i>E. coli</i>	48		42	Producción del sake	Kitano <i>et al.</i> , 2002.
<i>Niger</i>	<i>pepE</i>	pSE103	<i>E. coli</i>	43	3.0	-	Coagulante de la leche	Jarai <i>et al.</i> , 1994
<i>T. asperellum</i>	<i>Asp55</i>	pGEX	<i>E. coli</i>	55.4	5.5	30	Con posible aplicación en el control biológico	Doua <i>et al.</i> , 2014.

4.2 Clonación en levaduras

Varios genes de xilanasas y proteasas de hongos han sido clonados y expresados en las levaduras *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Esto se debe, a que, por una parte, la primera proporciona un procesamiento postraduccional eficiente como la glicosilación y secreta solo unas pocas proteínas; por lo tanto, la purificación es más fácil (Das y Shultz 1987). Mientras que la segunda posee una alta eficiencia de secreción, alcanza altas densidades celulares en medios cultivos de bajo costo y la relativa facilidad de ampliación al proceso industrial (Cregg, 1999; Berrin *et al.*, 2000). La tabla 2.2 muestra xilanasas y proteasas expresadas heterológamente en estos ascomicetos.

La endo- β -1,4-xilanasas de *Trichoderma reesei* que es codificada por el gen *XYN2*, fue expresada en *S. cerevisiae* exitosamente, con un peso molecular de 27 kDa en condiciones desnaturizantes, esta enzima se reguló bajo el control de los promotores *ADH2* y *PGK1* en medio enriquecido (La Grange *et al.*, 1996). Más tarde Ganga *et al.*, (1998) expresaron una xilanasas de *Aspergillus nidulans* en *S. cerevisiae*, la enzima heteróloga fue secretada, cuando la levadura fue crecida en un medio mínimo que contenía glucosa como única fuente de carbono. Otra xilanasas también expresada en *S. cerevisiae* es la reportada por Parachin *et al.*, (2009), la cual fue parcialmente caracterizada, mostrando un peso molecular de 21.2 kDa y un punto isoeléctrico de 7.02.

De la misma manera, se han podido expresar proteasas aspárticas de diferentes fuentes en la levadura *S. cerevisiae*. Por ejemplo; la proteasa de *Trichoderma harzianum*, codificada por el gen *SA76*, se expresó en el vector *pYES2*, la masa molecular de la proteasa fue de 55 kDa y un pI de 4.5, con una temperatura óptima de 45°C y un pH óptimo de 3.5. El sobrenadante de cultivo de *S. cerevisiae* que expresó la proteasa aspártica fue capaz de inhibir el crecimiento de cinco hongos fitopatógenos (Liu y Yang, 2007). Yamashita *et al* (1986), expresaron una aspartil proteasa de *Saccharomycopsis fibuligera* en *P.pastoris*, por medio del vector *pYII*, obteniendo una proteasa de 39 kDa, estable a un amplio intervalo de temperatura (20-60°C) y valores de pH (2.6-5).

P. pastoris también es un sistema de expresión muy utilizado para xilanasas y proteasas ácidas. Berrin *et al.*, (2000) realizaron la producción eficiente de una xilanasas recombinante de *A. niger* en esta levadura, obteniendo rendimientos de hasta 60 mg/L en medio sintético. La enzima purificada mostró un peso molecular de 19.8 kDa, y un pH y temperatura óptima de 3.5 y 50°C respectivamente.

Las xilanasas codificadas por los genes *XylB*, *Xyn2*, *XynC* de *A. niger*, *Trichoderma reesei* Rut C-30 y *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente, también fueron clonadas en el vector pPICZαA. Estas enzimas heterólogas mostraron un pH y temperaturas óptimos que van de 5-6.0 y 50-70 °C, respectivamente (Ruaglek *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009; Huy *et al.*, 2011). Otro caso de éxito en la producción de enzimas heterólogas en *P. pastoris* es el de una proteasa producida por *Mucor circinelloides*, la cual se expresó con el vector pGAPZα-A. La caracterización de la proteína recombinante permitió determinar que presentó un peso molecular de 37 kDa, con un pH óptimo de 3.6 y una temperatura óptima de 24°C (Gama *et al.*, 2013). Este mismo sistema de expresión fue el que utilizó Takenaka *et al.* (2017), para expresar una aspartil proteasa originaria de *Aspergillus repense*, permitiéndoles adquirir una proteína recombinante con mejores rendimientos (14 veces mayor) con respecto a la cepa silvestre, además se obtiene fácilmente mediante precipitación con acetona y la recuperación final fue del 83%.

Yang *et al.* (2013) logró expresar una aspartil proteasa de *Trichoderma asperellum* en *P. pastoris*, que es codificada por el gen *TaAsp*. Se purificó y caracterizó la enzima recombinante, determinando un peso molecular de 43 kDa, la actividad se mantuvo relativamente estable a 25-60°C y pH 3.0-9.0, lo que indicó su potencial de aplicación en biocontrol. El valor de pH óptimo y la temperatura de la actividad de la enzima fueron pH 4.0 y 40°C, y bajo esta condición, con caseína como sustrato, la actividad fue de 18.5 U/mL. Yegin y Fernandez-Lahore (2013), reportaron la expresión de una proteasa ácida de *Mucor mucedo* en *P. pastoris*, el gen que codifica para esta proteína se clonó en el vector pGAPZαA. La máxima producción de la enzima se observó con un pH de 3.5 a 20°C.

La enzima recombinante fue purificada y mostró una notable sensibilidad al tratamiento térmico y quedó completamente inactivada después de la incubación a 55°C por 10 min, por lo que podría considerarse como una candidata potencial para ser usada como coagulante de la leche para la industria de queso. La proteinasa aspártica extracelular de *Rhizopus microsporus*, es codificada por el gen *Rmap* el cual se logró clonar y expresar a través de *P. pastoris* mediante el uso del vector pKJII3, obteniendo una enzima recombinante de una masa molecular de 35 kDa, la cual es estable a un amplio intervalo de valores de pH, con aplicación en la terapia antimicótica (Schoen *et al.*, 2002).

Tabla 2.2 Xilanasas y proteasas heterólogas expresadas en levaduras

Fuente	Gen	Vector	Hospedero	PM (kDa)	pH	Temp. (°C)	Importancia biotecnológica	Referencia
Xilanasas								
<i>T. reesei</i> QM6a	<i>Xyn2</i>	pDLGI	<i>S. cerevisiae</i> Y294		4.0	60	Blanqueamiento de la pulpa kraft	La Grange <i>et al.</i> , 1996
<i>A. nidulans</i>		pYLC1	<i>S. cerevisiae</i>	22	6-5	58	No se ha determinado	Ganga <i>et al.</i> , 1998
<i>Cryptococcus flavus</i>	<i>CfXYN1</i>	pGEM-T	<i>S. cerevisiae</i> MFL	21.2	3.0	50	No se ha determinado	Parachin <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i>	<i>XylA</i>	pHIL-D2	<i>P. pastoris</i>	19.8	3.5	50	No se ha determinado	Berrin <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus terreus</i> BCC129		pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	33	5.0	60	Blanqueamiento de la pulpa kraft Piensos para animales	Chantasingh <i>et al.</i> , 2006
<i>A. niger</i>	<i>XylB</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	21	5.0	58	Piensos para animales	Ruaglek <i>et al.</i> , 2007
<i>T. reesei</i> Rut C-30	<i>Xyn2</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>		6.0	50]	Piensos para animales	He <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>XynB</i>	pGAPzαA	<i>P. pastoris</i>		5.0	50	Piensos para animales	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>P. chrysosporium</i>	<i>XynC</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>		5.0	70	No se ha determinado	Huy <i>et al.</i> , 2011
Aspartil Proteasas								
<i>T. harzianum</i>	<i>SA76</i>	pYES2	<i>S. cerevisiae</i>	55			No se ha determinado	
<i>T. harzianum</i>	<i>SA76</i>	pYES2	<i>S. cerevisiae</i>	55			Posible aplicación en el control biológico	Liu & Yang, 2007.
<i>S. fibuligera</i>	<i>STA1</i>	pYII	<i>S. cerevisiae</i>	39	3.6	48	Posible aplicación en el control biológico	Yamashita <i>et al.</i> , 1986
<i>M. circinelloides</i>	<i>MCAP</i>	pGAPZα-A	<i>P. pastoris</i>	37	3.6	24	No se ha determinado	Gama <i>et al.</i> , 2013.
<i>A. repens</i>	<i>PepA_Mk82</i>	pGEM-T	<i>P. pastoris</i>	41	2	60	Hidrólisis y decoloración de pigmentos rojos	Takenaka <i>et al.</i> , 2007.
<i>T. asperellum</i>	<i>TaAsp</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	42	4.0	40	Posible aplicación en el control biológico	Yang <i>et al.</i> , 2013
<i>M. mucedo</i>	<i>DSM809</i>	pGAPZαA	<i>P. pastoris</i>	32	3.5	20	No se ha determinado	Yegin y Fernandez-Lahore, 2013.
<i>R. microsporus</i>	<i>RMAP</i>	pKJII3	<i>P. pastoris</i>	35	2.5		Terapia antimicótica	Schoen <i>et al.</i> , 2002

4.3 Clonación y expresión en hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son atractivos hospederos para la expresión de proteínas, por su habilidad natural de secretar grandes cantidades de proteína al medio. Sin embargo, solo existen pocos reportes sobre la expresión heteróloga en estos microorganismos (Ahmed et al., 2009), como es el caso del gen *xyn2* del hongo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*, que codifica para una xilanasa, el cual fue clonado el vector pUC18 y expresado en *T. reesei*. La enzima heteróloga mostró un peso molecular de 23 kDa (Faria et al., 2002).

Otro caso de la expresión heteróloga en *T. reesei* es el reportado por Salles et al (2007), quienes realizaron la clonación de dos genes *xyn5* y *xyn6* que codifican para xilanasas de la familia 11, los cuales fueron aislados del hongo filamentoso termotolerante *Acrophialophora nainiana*.

Otro sistema hospedero que ha sido empleado es *Aspergillus niger* como lo reporta Decelle et al., (2004), quienes clonaron y expresaron tres genes que codifican para endo-1,4- β - xilanasas en este sistema. Las enzimas heterólogas mostraron buenas características bioquímicas. Las xilanasas XynA, XynB y XynC tuvieron una masa molecular de 52, 30 y 50 kDa, respectivamente. La temperatura y pH óptimos oscilaron entre los 4.5 y 70 °C para las tres enzimas. Por otra parte, Dickson et al. (1987), reportaron la expresión de una aspartil proteasa de *Mucor miehei*, usando al hongo *Mucor circinelloides* como hospedero, lo cual les permitió conseguir una mayor concentración de enzima con respecto a la cepa silvestre.

5. Conclusión

La expresión heteróloga de proteínas es una herramienta útil para la producción de enzimas microbianas de importancia industrial como las xilanasas y aspartil proteasas, las cuales son producidas en la cepa original en bajos rendimientos. Esta herramienta biotecnológica ha sido investigada utilizando diferentes hospedadores ya sean bacterianos, levaduriformes y hongos filamentosos, sin embargo, siguen siendo pocos los reportes de este tipo de enzimas, aun tomando en cuenta la importancia industrial que tienen. Probablemente esto se debe, a que se requiere de más investigación para dilucidar los mecanismos con los cuales esta técnica puede ser mejorada y también ser más eficiente.

6. Referencias

- Ahmed S., Imdad, S.S., Jamil, A. (2012). Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electron. Journal of Biotechnology*. 15: 1-8.
- Ahmed S., Riaz S., Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases:an overview. *Applied Microbiology Biotechnology*. 84:19-35.
- Baba T., Shinke, R., Nanmori, T. (1994). Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes, β -xilosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Environment Microbiology*. 60:2252-8.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 326-338.
- Berrin J.G., Wiliamson G., Puigserver A., Chaix J.C., McLauchlan W.R., Juge, N. (2000). High level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 19:179–187.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikaiwari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013). Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 72:271-286.
- Chand S., Mishra, P. (2003). Research and application of microbial enzymes-India's contribution. *Advances Biochemical Engeneering Biotechnology*. 85:95–124.

- Cherry J. R., Fidantsef A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 438-443.
- Cregg J.M. (1999). Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Fernandez JM, Hoeffler JP. Gene expression systems. Academic, New York. pp 157–191.
- Das, R.C., y Shultz, J.L. (1987). Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. 3:43–48.
- Das R.C., Shultz, J.L. (1987). Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. 3:43–48.
- Dauids T., Schmidt, M., Böttcher D., Bornscheuer, U.T. (2013). Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 17:215-20.
- De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert, N. (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1617–1631.
- Decelle B., Tsang A., Storms, R.K. (2004). Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-*b*-xylanases. *Current Genetics*. 46:166-175.
- Demaina A.L., Vaishnavb P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27:297-306.
- Dickinson L., Harboe M., Van Heeswijck R., Stroman P., Jepsen, L.P. (1987). Expression of Active *Mucor miehei* Aspartic Protease in *Mucor Circinelloides*. *Carlsberg Research Communications*. 52: 243-252.
- Dong H., Nilsson L., Kurland C.G. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rate. *Journal of Molecular Biology*. 260:649-663.
- Doua K., Wanga Z., Zhang R., Wanga N., Fana H., Diaoa G., Liua Z. (2014). Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene *Asp55* from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*. 169: 915–923.
- Emalfarb M.A., Burlingame R.P., Olson P.T., Sinitsyn A.P., Parriche M., Bousson J.C. (2003). Transformation system in the field of filamentous fungal hosts. US Patent, US: 6,573,086.
- Faria P., Te'o V.S.J., Bergquist P.L., Azevedo M.O., Nevalainen K.M.H. (2002). Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*. 34:119-123.
- Fengxia L., Mei L., Zhaoxin L., Xiaomei B., Haizhen Z., Yi W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*. 99:5938-5941.
- Fischer B., Summer I., Goodenough P. (1993). Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*. 41: 3-13.
- Gama J.A., Kangwa M., Fernandez-Lahore, M. (2013). Cloning and expression of an active aspartic proteinase from *Mucor circinelloides* in *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology*. 13:250.
- Ganga A., Querol A., Valles S., Ramón D., MacCabe A., Piñaga, F. (1998). Heterologous Production in *Saccharomyces cerevisiae* of Different *Aspergillus nidulans*. Xylanases of Potential Interest in Oenology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78:315-320.
- Gellison G., Janowicz Z.A., Weydemann U., Melber K., Strasser A.W.M., Hollenberg C.P. (1992). High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*. 10:179–189.

- Goswami G.K., Pathak R.R. (2013). Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2:237-246.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:15–32.
- He J., Yu B., Zhang K., Ding X., Chen D. (2009). Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC Biotechnology*. 9:1-10.
- Horimoto Y., Dee D., Yada R. (2009). Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnology*. 25: 318-324.
- Huy N.D., Kim S.W., Park S.M. (2011). Heterologous expression of endo-1,4-beta-xylanaseC from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111:654-657.
- Jaraia G., Homberghb H., Buxtona F. (1994). Cloning and characterization of the *pepE* gene of *Aspergillus niger* encoding a new aspartic protease and regulation of *pepE* and *pepC*. *Gene*. 145: 171-178.
- Jun H., Bing Y., Keying Z., Xuemei D., Daiwen C. (2009). Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and activity of the enzyme on fiber-boudb substrates. *Protein Expression and Purification*. 67: 1-6.
- Juturu, V y Wu, J.C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30: 1219-1227.
- Kitano, H., Kataoka, K., Furukawa, K., y Hara, S. (2002). Specific Expression and Temperature-Dependent Expression of the Acid Protease-Encoding Gene (PepA) in *Aspergilhs oryzae* in Solid-State Culture (Rice-Koji). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93: 563-567.
- Krisana, A., Rutchadaporn, S., Jarupan, G., Lily, E., Sutipa, T., y Kanyawim, K. (2005). Endo β -1,4-xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. *Journal Biochemical Molecular Biology* 38:17–23.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:411-456
- Kumar C.G., Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*.17:561–594.
- Kurland C., Gallant J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology* 7:489–493.
- La Grange D., Pretorius I., Zyl W.H.V. (1996). Expression of a *Trichoderma reesei* b-Xylanase Gene (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Enviroment Microbiology*. 62: 1036–1044.
- Li H., Liu J., Wu J., Xue Y., Gan L., Long M. (2014). Comparative Analysis of Enzymatic Hidrolysis of Miscanthus Xylan using *Aspergillus niger*, *Hypocrea orientalis*, and *Trichoderma reesei* Xylan-degrading Enzymes. *BioResources*. 9: 2191-2202.
- Li J., Chi Z., Wang X. (2010). Cloning of the SAP6 gene of *Metschnikowia reukaufii* and its heterologous expression and characterization in *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 165: 173-182.
- Li W., Zhou X., Lu P. (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*. 155:605–610.

- Liu Y., Yang Q. (2007). Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 277:173-181.
- Mandal A. (2015). Review on Microbial Xylanases and their Applications. *International Journal of Life Sciences*. 4:178-187.
- Motta F.L., Andrade C.C.P., Santana M.H.A. (2013). A review of xylanase production by the fermentation of Xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel AK, da Silva SS (eds) *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass Techniques, Applications and Commercialization*. INTECH, Chennai, pp251-275.
- Murashima K., Chen C.L., Kosugi A., Tamaru Y., Doi R.H., Wong S.L. (2002). Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of bacteriology*. 184:76–81.
- Nevalainen H., Peterson R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*. 75:1-10.
- Ongley S.E., Bian X., Neilan B.A., Muller R. (2013). Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. RSC publishing. *Natural Product Reports*.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M., McCarthy I., Del Rio L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:521-530.
- Parachin N.S., Siqueira S., De Faria F.P., Goncalves F.A.T., Pepe L.M.D.M. (2009). Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYNI in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59:52–57.
- Petsch D., Anspach F.B. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*. 76:97–119.
- Phillips T.A., Van Bogelen R.A., Neidhardt F.C. (1984). *Ion* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of bacteriology*. 159:283–287.
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 577-591.
- Ruanglek V., Sriprang R., Ratanaphan N., Tirawongsaroj P., Chantasigh D., Tanapongpipat S., Pootanakit K., Eurwilaichitr L. (2007). Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:19-25.
- Sabotic J., Kos J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:1351-1375.
- Salles B.C., Te’o V.S.J., Gibbs M.D., Bergquist P.L., Filho E.X.F., Ximenes E.A., Nevalainen K.M.H. (2007). Identification of two novel xylanase-encoding genes (xyn5 and xyn6) from *Acrophialophora nainiana* and heterologous expression of xyn6 in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*. 29:1195-1201.
- Schoen C., Reichard Y.U., Monodz M., Kratzin H.D., y Ruè Chel R. (2002). Molecular cloning of an extracellular aspartic proteinase from *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during infection. *Medical Mycology*. 40: 61-71.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:426-435.
- Sharma M., Kumar A. (2013). Xylanases: An overview. *British Biotechnology Journal*. 3:1-28.

- Sorensen H.P., Mortensen K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal Biotechnology*. 115:113–128.
- Subramaniyan S., Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases. *Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Reviews in Biotechnology*. 22:33–64.
- Sunna A., Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17:39-67.
- Takenaka S., Umeda M., Senba H., Koyama D., Tanaka K., Yoshida K., Doi M. (2017). Heterologous expression and characterisation the *Aspergillus* aspartic protease involved in the hydrolysis and decolorisation of red-pigment proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97: 95-101.
- Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:211–222.
- Van-Khue T., Rajini R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 287: 580–589.
- Ward O. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 30: 1119–1139.
- Westers L., Westers H., Quax W.J. (2004). *Bacillus subtilis* as a cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1694:299–310.
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N. (1988). Multiplicity xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*. 52: 305-317.
- Yamashita I., Hirata D., Machida M., Fukui S. (1986). Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the Secretable Acid Protease Gene from *Saccharomycopsis jibuligera*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50:109-113.
- Yang X., Cong H., Jinzhu C., Zhang J. (2013). Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29:2087–2094.
- Yegin S., Fernandez-Lahore M. (2013). A Thermolabile Aspartic Proteinase from *Mucor mucedo* DSM 809: Gene Identification, Cloning, and Functional Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 54:661–672.
- Zhou C., Bai J., Deng S., Wang J., Zhu J., Wu M., Wang W. (2008). Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usarii* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 99:831–838.