

## Secreción de renina de hongo recombinante en *Kluyveromyces lactis*

G. FERBEYRE, E. MARTÍNEZ, I. TORRENS, J. AGUIAR, A. VILLARREAL, T. GONZÁLEZ, A. SILVA y J. MORALES

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1990

Aprobado en abril de 1991

### RESUMEN

*Kluyveromyces lactis* es una levadura industrial cuyo uso como hospedero para la expresión de genes heterólogos cobra interés creciente. El método de transformación desarrollado en el presente trabajo rinde  $5 \times 10^2$  transformantes por microgramo de ADN replicativo y de 5 a 10 colonias por  $10 \mu\text{g}$  de ADN integrativo. Sólo el 16% de las colonias transformantes pierde la información que porta el locus de integración, el resto permanece con fenotipo  $\text{lac}^+$ .

El gen de la renina del hongo *Mucor pusillus* fue expresado en *Kluyveromyces lactis* bajo el control del promotor LAC4 y la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima fue secretada eficientemente al medio de cultivo y los niveles de secreción fueron dependientes de la adición de lactosa durante el crecimiento y del pH de crecimiento. La enzima recombinante parece secretarse como un precursor que se autoprocesa de forma pH dependiente.

Las propiedades de la enzima recombinante fueron indistinguibles de las de la enzima natural, según ensayos biológicos e inmunológicos.

### SUMMARY

*Kluyveromyces lactis* is an industrial yeast that is turning interesting for the expression of heterologous genes. Transformation in our hands usually results in  $5 \times 10^2$  transformants per  $\mu\text{g}$

of replicative plasmid and 5 to 10 colonies per  $10 \mu\text{g}$  of integrative DNA. Only 16% of the transformants lose the information from the integration locus, the rest remains with  $\text{lac}^+$  phenotype.

The gene for fungal rennin from *Mucor pusillus* was expressed in *Kluyveromyces lactis* under the control of the LAC4 promoter and the  $\alpha$  factor secretion signal from *Saccharomyces cerevisiae*. The enzyme was efficiently secreted into the culture medium being the secretion levels dependent on the addition of lactose during the growing time and on the pH of growing. The recombinant enzyme seems to be secreted as a precursor that natures in a pH-dependent way.

The properties of the recombinant enzyme were indistinguishable from those of the natural enzyme by biological and immunological assays.

### INTRODUCCION

*Kluyveromyces lactis* constituye actualmente una opción interesante para la expresión de genes heterólogos. Se ha reportado la expresión de proquimosina (Van der Berg *et al.*, 1990); albúmina humana (Hote *et al.*, 1990), y la interleuquina  $1\beta$  (Dodet, 1990), utilizando las señales de regulación del gen LAC4 que codifica la  $\beta$ -galactosidasa (Sheetz y Dickson, 1980; Lacy y Dickson, 1981).

La industria del queso ha utilizado como sustitutos de la quimosina bovina las proteasas aspárticas de hongos cigomicetos conocidas como reninas de *Mucor*. El gen de una proteasa aspártica de *Mucor pusillus* llamada también renina de hongo fue clonado por Tonouchi *et al.* (1986). La secuencia de dicho gen codifica para una proteína de 427 aminoácidos y peso molecular de 38,6 kDa, cuyos primeros 66 residuos corresponden a la preprosecuencia.

Estos mismos autores (Yamashita *et al.*, 1987) expresaron este gen en *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor GAL7 y encontraron que la enzima era secretada al medio de cultivo en forma de un cimógeno de 51 kDa de peso molecular, que se convertía en proteína madura de 46 kDa (Hiramatsu *et al.*, 1989). La secuencia aminoacídica de la renina de hongo contiene tres sitios posibles de glicosilación (Asn 79, Asn 113 y Asn 188), y en *Saccharomyces cerevisiae* se secreta en forma altamente glicosilada en comparación con la renina de hongo natural.

Una mutación en dos de los sitios de glicosilación redujo considerablemente el nivel de secreción de esta enzima en levaduras (Aikawa *et al.*, 1990).

En el presente trabajo se reporta la expresión y secreción al medio de cultivo en *Kluyveromyces lactis* de la renina del hongo *Mucor pusillus*, cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio utilizando la Reacción en cadena de la polimerasa\*.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas de *E. coli* y levaduras

*E. coli* MC1066 (F<sup>-</sup>, hsdR<sup>-</sup>, hsdM<sup>+</sup>, rps 1, galU, gaK, trpC, pyrP, leuB600, delta lac x 74, kan<sup>r</sup>).

*Kluyveromyces lactis* VD1 (K<sup>-</sup>, pKD1<sup>0</sup>,  $\alpha$ , ura A, arg, lis) y MD2/1 (K<sup>-</sup>, pKD1<sup>+</sup>,  $\alpha$ , ura A, arg, lis).

Las cepas de *Kluyveromyces lactis* fueron crecidas en medio YP (Sherman *et al.*, 1986) o GO (Galzy y Slonimski, 1957) suplementados con 2% glucosa o 2% glicerol.

### Enzimas y reactivos

Las enzimas de restricción, T4 ligasa y ADN polimerasa fragmento Klenow, fueron obtenidas de ENZIBIOT, CIGB (Cuba). La fosfatasa alcalina (CIP) y la nucleasa S1 provienen de Boehringer Mannheim (Alemania). Los isótopos radioactivos fueron obtenidos de Amersham Int. (R.U.) y la lactosa de BDH, Ltd. (R.U.).

### Técnicas de trabajo con ADN

Se realizaron básicamente según Maniatis *et al.*, 1982. La secuenciación de ADN plasmídico de doble cadena se hizo siguiendo a Chen y Seeburg (1985) y la Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de acuerdo con Saiki *et al.* (1988).

Para la realización del *Southern blot*, se usaron muestras de 10  $\mu$ g de ADN de los transformantes y controles, digeridas con la enzima Xba I y fueron aplicadas y corridas en un gel de agarosa 0,8% en tampón Tris acetato. Posteriormente, el ADN fue transferido del gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa según Southern *et al.*, 1975, e hibridado con una sonda del gen de renina de hongo de 1,1 kb marcada con  $\alpha$ P<sup>32</sup>ATP (300 Ci/mmol, Amersham, R.U.) por el método de *random priming* (Feiberg y Vogelstein, 1983).

El *Dot blot* del ADN de las colonias transformantes se realizó según Maniatis *et al.*, 1982, utilizando muestras de ADN de 10  $\mu$ g que después de fijadas a un filtro de nitrocelulosa fueron hibridadas con la misma sonda descrita para el *Southern blot*.

### Plasmidios y construcciones

El plasmidio pCXJ es un derivado del pKD1 de *Kluyveromyces drosophilorum* (Bianchi *et al.*, 1987).

El pRH3 que porta el gen de la renina del hongo *Mucor pusillus* fue obtenido en nuestro laboratorio\* al igual que el pBS61 que porta el promotor sGAP, la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* y la región de terminación de

\* Resultados no publicados.

la transcripción del gen GAP. El fragmento de 1,2 kb del pRH3 digerido con BamHI y tratado con nucleasa S1 fue clonado en el vector pBS61 digerido con HindIII, tratado con nucleasa S1 y CIP. El plasmidio resultante se nombró pBS62 y porta el gen de la renina de hongo acoplado a la señal de secreción del factor  $\alpha$ . Utilizando la RCP, el fragmento de 1,4 kb del pBS62 con dicha fusión fue amplificado utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores:

5'GGAGCTCATGAGATTTTCCTTCAATTTTTAC 3'

5'GAAACCGAAGGCCTATGCTCTTGTTGATT 3'

La banda amplificada se dirigió con SacI y Eco RV y fue subclonada en un vector *Blue Scrypt*

El pELR4 se preparó digiriéndolo con HindIII y tratándolo con CIP y se le acopló la banda de 2,8 kb del pJAAS12 (obtenido en nuestro laboratorio) digerido con HindIII. Esta banda contiene el terminador de la transcripción del gen LAC4, el marcador URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* y la región 3' del gen LAC4. La construcción final se llamó pELR5 (figura 2).

### Transformación de *Kluyveromyces lactis*

La transformación se realizó según el procedimiento reportado por Sreekrishna *et al.*, 1984. Los transformantes prototróficos para el uracilo fueron seleccionados en placas GO con hidrolizado de caseína 0,5%.

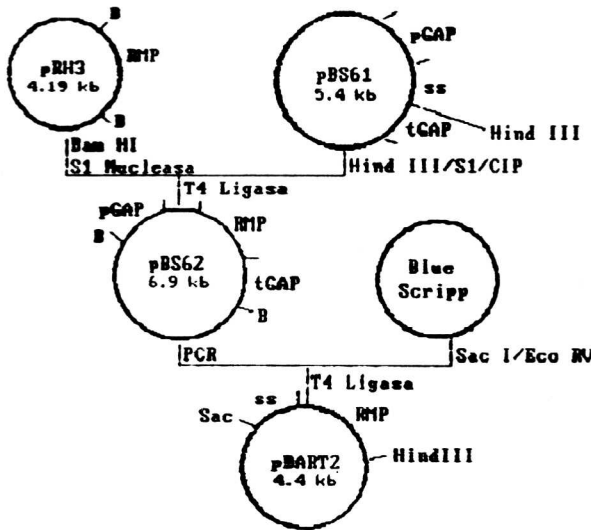


FIG. 1. Construcción de una fusión entre el gen de la renina de hongo y la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*.

digerido igual. El plasmidio resultante se nombró pBART2 (figura 1).

La banda SacI-HindIII del pBART2 se unió al promotor LAC4 en el plasmidio pBSLAC4 obtenido en nuestro laboratorio\*. Para ello, el pBSLAC4 se preparó digiriéndolo con Eco RV y tratándolo con CIP, y la banda SacI-HindIII tratándola con nucleasa S1. El plasmidio resultante se nombró pELR4.

### Análisis de proteínas

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida conteniendo SDS se realizó según Laemmli (1970), el *Western blot* según Towbin *et al.* (1979) utilizando anticuerpos anti-renina de hongo obtenidos según Morales *et al.* (en preparación) y la prueba de coagulación de la leche según Arima *et al.* (1970). Las muestras para la electroforesis se prepararon según Zaworski y Gill, 1988.

\* Resultados no publicados.

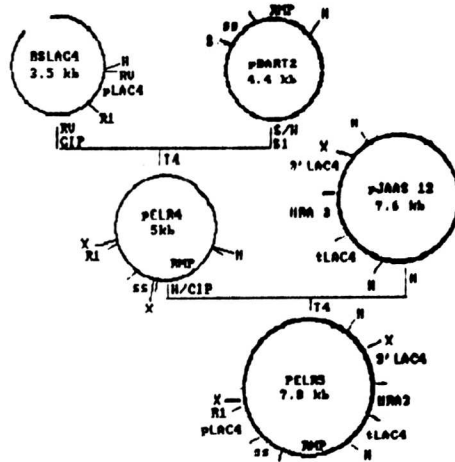


FIG. 2. Construcción de un vector integrativo para la expresión de renina de hongo en *Kluyveromyces lactis*.

## RESULTADOS

### Construcción de un vector integrativo para expresión de renina de hongo en *Kluyveromyces lactis*

Las figuras 1 y 2 muestran los pasos seguidos para construir el vector integrativo pELR5. El "casete" de expresión se libera de la construcción después de digerir con las enzimas SacI y XhoI y consta del promotor del gen LAC4 de *Kluyveromyces lactis*, la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen de la renina del hongo *Mucor pusillus*,

el terminador de la transcripción del gen LAC4, el marcador de selección URA3 y la región 3' no traducible del gen LAC4.

### Transformación de *Kluyveromyces lactis*

En la tabla 1 se comparan los resultados de transformación replicativa (con pCXJ) e integrativa (con pELR5) de dos cepas diferentes de *Kluyveromyces lactis*. La transformación integrativa utilizando el modelo de desplazamiento génico predice que: 1) se pierde la información que porta el locus de integración (LAC4) y 2) los transformantes son altamente estables.

Tabla 1  
TRANSFORMACION DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Cepa	Número de Colonias <sup>a</sup>			Viabilidad	Reversión %	Estabilidad	
	ura +/pCXJ +	ura +/RH +	lac-/R + %			10	100 <sup>b</sup>
VD1	550	5-10	15	5 x 10 <sup>6</sup>	0,5	100%	98%
MD2/1	224	-	-	5 x 10 <sup>6</sup>	10	-	-

<sup>a</sup> La presencia del pCXJ y RH (renina de hongo) se determinó por hibridación de *Dot blot* de ADN de los transformantes.

<sup>b</sup> La estabilidad se registró después de 10 y 100 generaciones, comparando el número de colonias que crecen en medio sin uracilo, con las que crecen en medio con uracilo.

Para comprobar estas características, los transformantes de la cepa VD1 se crecieron en medio GO suplementado con arginina 20  $\mu\text{g/ml}$ , lisina 10  $\mu\text{g/ml}$  y glucosa 2% o lactosa 1% como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la tabla 1. Solo 15% de los transformantes fueron fenotípicamente *lac*<sup>-</sup>.

En cambio, estos resultaron ser altamente estables. Ello sugiere que ocurrió integración al cromosoma en la gran mayoría de los transformantes por un mecanismo diferente al previsto y que no ocurrió replicación autónoma inestable de los fragmentos de ADN introducidos.

Para corroborar esta hipótesis se realizaron hibridaciones de *Southern blot* después de digerir el ADN con Xba I. La figura 3 muestra los patrones obtenidos del análisis de cuatro transformantes que expresaban renina de hongo. La banda

de 3,8 kb es la esperada según el modelo de integración por desplazamiento génico, pero la banda mayor parece haberse generado por doble integración o integración ilegítima.

### Expresión y secreción de renina de hongo

La expresión y secreción de renina de hongo fue seguida por la prueba de coagulación de la leche y dependió del pH del medio, de la adición del inductor y del transformante en cuestión.

Cuando el pH es superior a 7, en ninguna de las condiciones experimentales se detectó actividad de coagulación de la leche. Esta es detectable a pH entre 5 y 6, pero es máxima si se disminuye el pH del medio a 4, se incuba a temperatura ambiente entre una y dos horas y se eleva el pH hasta 5,5.

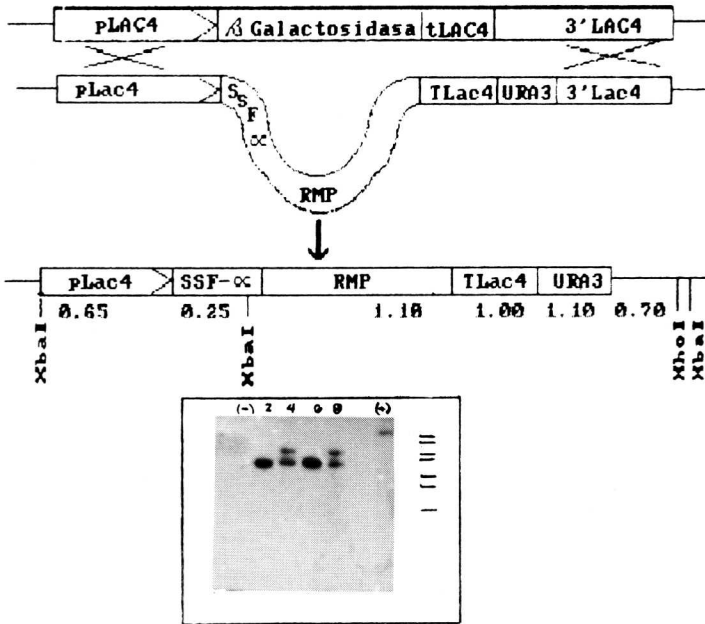


FIG. 3. Esquema de integración por interrupción génica y Southern blot de transformantes de la cepa VD1 con el plásmido pELR5. De izquierda a derecha: control negativo, cepas KED 2, KED 4, KED 6 y KED 8 y control positivo (plásmido pELR 5). Los marcadores de peso molecular son los correspondientes al lambda HindIII.

La expresión mostró considerable variación entre los transformantes (tabla 2). El medio rico resultó ser más adecuado para la secreción de renina de hongo y la adición de lactosa 1% fue indispensable para obtener un alto nivel de secreción en ambos medios.

migra de acuerdo con un peso molecular de 46 000 dalton y cuya cantidad aumenta con el tiempo de cultivo. Nótese que a las 24 horas aparece una banda por encima de la banda correspondiente a la renina de hongo madura de 46 000 dalton, que posee aproximadamente 56 000 dalton.

Tabla 2  
EXPRESION DE RENINA DE HONGO EN *K. LACTIS*

Transformante	Renina de hongo (mg/ml)			
	GO		YP	
	G	L	G	L
1	n.d	2.0	n.d	5.0
2	1.1	4.0	2.5	20.0
3	n.d	n.d	n.d	2.0
4	n.d	3.0	0.5	10.0
5	n.d	n.d	n.d	n.d
6	n.d	2.0	2.5	4.0
7	n.d	n.d	n.d	1.0
8	0.5	3.0	1.0	8.0
9	0.7	2.8	0.6	6.0
10	n.d	n.d	n.d	3.0
11	n.d	2.5	2.0	7.0
12	1.4	3.4	3.0	15.0
13	1.7	4.1	2.9	14.0
14	n.d	n.d	n.d	n.d
15	n.d	n.d	0.7	3.0
16	1.2	2.4	1.5	9.0

Los cultivos se crecieron durante 24 horas en medio YP o GO con glucosa 2% y a las 24, 72, 96 y 120 horas de crecimiento se les añadió glucosa (G) 0,5% o lactosa (L) 1%. nd: no hecho.

En la figura 4 se presenta una electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida 15% conteniendo SDS del sobrenadante de la cepa KED 2. Se observa la expresión de una proteína cuyo peso molecular aproximado es de 46 000 dalton, similar al de la proteína natural purificada.

En la figura 5 se muestra un Western blot realizado con una electroforesis similar a la anterior. El antisuero antirrenina de hongo reconoce una banda proteica que

Esta banda desaparece completamente 72 horas después del comienzo de la inducción, lo que sugiere que ha ocurrido una maduración espontánea de esta enzima en el medio de cultivo durante el período de crecimiento.

En la figura 6 se muestra la acumulación de renina de hongo en el medio de cultivo durante el crecimiento. Nótese que se detecta seis veces más actividad en el cultivo inducido con lactosa que en el no inducido.

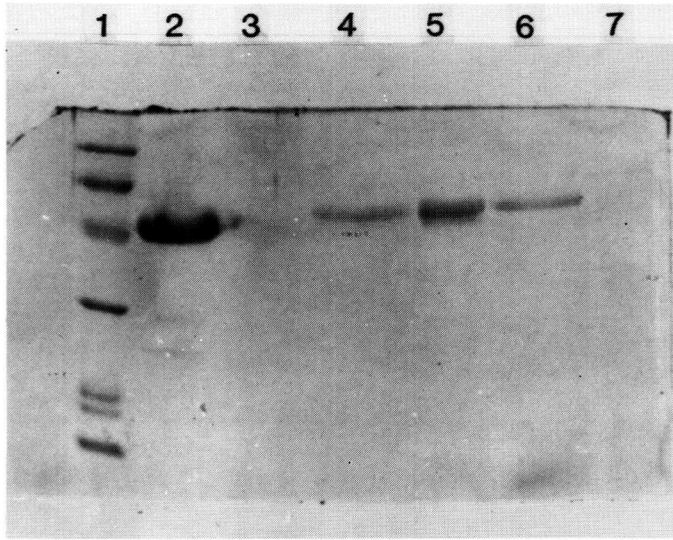


FIG. 4. Electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida conteniendo SDS de la cepa KED 2. De izquierda a derecha: 1) marcadores de peso molecular (94 000, 67 000, 43 000, 29 000, 20 000, 18 400 y 14 300; 2) renina de hongo; 3-6) sobrenadantes de cultivos de la cepa KED 2 después de inducción con lactosa durante 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente; 7) sobrenadante de cultivo de la cepa VD1 transformada con pCXJ (control negativo).

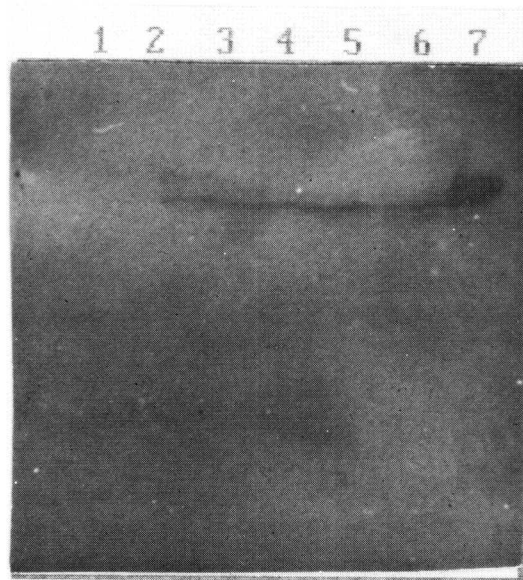


FIG. 5. Western blot de las proteínas del medio de cultivo de la cepa KED 2 crecida inicialmente en glucosa e inducida posteriormente con lactosa. 1) Control Negativo (ver figura 4); 2-5) cepa KED 2 después de 24, 48, 72 y 96 horas de inducción con lactosa; 6) renina de hongo.



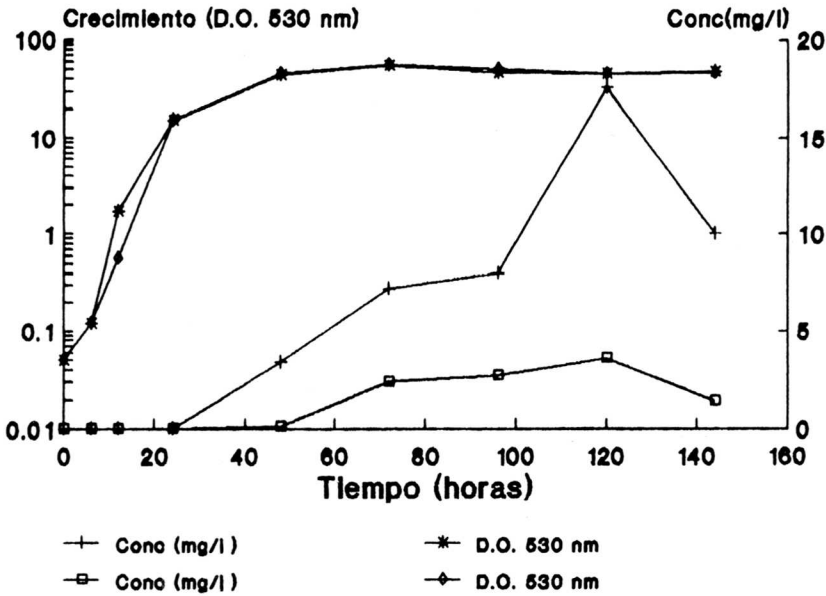


FIG. 6. Cinética de crecimiento y secreción de la cepa KED 2 inducida (\*) (+) y no inducida (◇) (□) con lactosa.

## DISCUSION

En el presente trabajo se reporta la construcción de una cepa de *Kluyveromyces lactis* capaz de secretar eficientemente la renina del hongo *Mucor pusillus* de forma madura y con propiedades indistinguibles de la enzima natural.

El análisis del Southern blot revela la presencia de bandas no esperadas según una disrupción génica por desplazamiento. En un estudio sobre la integración de ADN en el locus TRP de *Kluyveromyces lactis* (Stark y Milner, 1989), encontraron bandas inexplicables según el modelo de ruptura de genes en una etapa (Rhostein, 1983). Ellos sugirieron que en esta levadura existe una gran frecuencia de integración no homóloga.

Nuestras cepas recombinantes derivadas de la cepa VD1 muestran dependencia sobre la lactosa en la secreción de renina de hongo. Ello concuerda con lo reportado

por Dixon y Markin, 1980, para la  $\beta$ -galactosidasa. Sin embargo Van den Berg *et al.*, 1990, encontraron que la expresión de proquimosina bovina en *Kluyveromyces lactis* SL56 no requiere lactosa y es fuertemente reprimida por glucosa. Breuning (1989) descubrió que la variación en cuanto a represión por glucosa de las diferentes cepas de *Kluyveromyces lactis* se debe al alelo LAC9 que posee la cepa en cuestión. Por otra parte, la represión por glucosa depende también del alelo del locus RAG1. Las cepas rag 1<sup>+</sup> son reprimidas por glucosa y las rag 1<sup>-</sup> no lo son (Fukuhara, 1990).

El peso molecular de la renina de hongo según la secuencia aminoacídica del gen clonado es de 36 000 dalton para la pro-renina y de 30 000 dalton para la renina de hongo madura. Sin embargo, la proteína expresada en el medio de cultivo migra de acuerdo con un peso molecular de 46 000 dalton, lo que sugiere que está glicosilada.



Aunque no se realizaron experimentos para demostrar si la proteína se secreta en forma de cimógeno o en forma madura, los resultados del Western blot sugieren que se secreta inicialmente como pro-renina. A favor de esta hipótesis está el hecho de que la actividad aumenta al tratar el medio de cultivo con HCl hasta pH 4. Por otra parte, *Kluyveromyces lactis* mantiene un pH entre 7 y 8 durante su crecimiento en nuestras condiciones de cultivo (resultados no mostrados), lo que facilitó la detección de la pro-renina. Hiramatsu *et al.* (1989), encontraron que en *Saccharomyces cerevisiae* la renina de hongo se activa a pH 4 por un proceso fundamentalmente autocatalítico, pero donde también participa una proteasa de la levadura.

En conclusión, *Kluyveromyces lactis* posee varias características como hospedera para la producción de proteínas heterólogas que la hacen un blanco muy atractivo para futuros proyectos de expresión. La optimización de las condiciones de crecimiento en relación con la expresión de genes heterólogos y la expresión de nuevas proteínas en esta cepa se abordan en este momento en nuestro laboratorio.

## REFERENCIAS

- AIKAWA, J.; T. YAMASHITA; M. NISHIYAMA; S. HORINOUCHE y T. BEPPU (1990). Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of mucor rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* **265**: 13955-13959.
- ARIMA, K.; J. YU y S. IWASAKI (1970). Milk clotting enzymes from *Mucor pusillus var lindt.* *Methods Enzymol* **19**: 446-459.
- BIANCHI, M. M.; C. FALCONE; C. X. JIE; M. WESSLOWSK-LOUVEL; L. FRONTALI y H. FUKUJARA (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors from the 1,6  $\mu$ m circular plasmid pKD1. *Current Genet.* **12**: 185-192.
- BREUNING, K. D. (1989). Glucose repression of LAC4 gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 422-427.
- CHEN, E. Y. y P. H. SEEBURG (1985). Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170.
- DIXON, R. C. y J. MARKIN (1980). Physiological studies of beta galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142**: 777-785.
- BODET, B. (1990). Production de protéines recombinantes: quel système choisir. *Biofuture*, N° **91**: 20-29.
- FEINBERG, A. P. y B. VOGELSTEIN (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**: 6-13.
- FUKUHARA, H. (1990). *Kluyveromyces* plasmids and their potential industrial use. *6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Abstract Book*, p. 45.
- GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). Variation physiologique de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Comptes. Rend. Acad. Sci. (Paris)* **245**: 2423-2433.
- HIRAMATSU, R.; J. AIKAWA; S. HORINOUCHE y T. BEPPU (1989). Secretion of the zymogen form of mucor rennin, an aspartic proteinase of mucor pusillus and its conversion to the mature form. *J. Biol. Chem.* **264**: 16862-16866.
- HOTE, L.; R. FLEER; P. BRUNEAU; P. YEH; N. AMELLA y J.F. MAYAUX (1990). Secretion of human serum albumin under control of the LAC4 promoter of *K. lactis*. *6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*, 12-18 August, *Abstract Book*, p. 173.
- LACY, R.L. y R.C. DICKSON (1981). Transcriptional regulation of the *Kluyveromyces lactis* beta galactosidase gene. *Mol. Cell Biol.* **1**: 629-634.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* **227**: 680-685.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- ROTHSTEIN, R. J. (1983). One step gene disruption. *Methods Enzymol.* **101**: 202-211.
- SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND; S. STOFFEL; S. J. SCHARF; R. HIGUCHI; G. T. HORN; K. B. MULLIS y H. A. ERLICH (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

- SHEETZ, R. M. y R. C. DICKSON (1980). LAC4 is the structural gene for beta-galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **98**: 729-745.
- SHERMAN, F.; G. R. FINK y J. B. HICKS (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Lab., New York, USA.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-518.
- SREEKRISHNA, K.; T. D. WEBSTER y R. C. DICKSON (1984). Transformation of *Kluyveromyces lactis* with kanamycin (G418) resistance gene of Tn903. *Gene* **28**: 73-81.
- STARK, M. J. R. y J. S. MILNER (1989). Cloning and analysis of the *Kluyveromyces lactis* TRP1 gene: a chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histone H3. *Yeast* **5**: 35-50.
- TONOUCHI, N.; H. SHOUN; T. UOZUMI y T. BEPPU (1986). Cloning and sequencing of a gene for mucor rennin, an aspartic protease from *Mucor pusillus*. *Nucleic Acid. Res.* **14**: 7557-7568.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN y J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- VAN DEN BERG, J.; K.J. VAN DER LAKEN; A.J.J. VAN OOYEN; T.C.H. M. RENNERS; K. RIETVELD; A. SCHARP; A.J. BRAKE; R.J. BISHOP; K. SCHULTZ; D. MOYER; M. RICHMAN y J.R. SHUSTER (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology* **8**: 135-139.
- YAMASHITA, Y. N.; N. TONOUCHI; T. UOZUMI y T. BEPPU (1987). Secretion of mucor rennin, a fungal aspartic protease of *Mucor pusillus* by recombinant yeast cells. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 462-467.
- ZAWORSKI, P.G. y G.S. GILL (1988). Precipitation and recovery of proteins from culture supernatants using zinc. *Analytical Biochemistry* **173**: 440-444.