



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Proteínas heterólogas en *Yarrowia lipolytica*: la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Roberto Méndez-Eslava, Didiana Gálvez-López, Miguel Salvador-Figueroa, Raymundo Rosas-Quijano\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

La expresión heteróloga de compuestos bioactivos en microorganismos surge como alternativa para satisfacer la demanda de productos básicos que necesita la sociedad moderna para la vida diaria. Este método busca competir con la producción tradicional que involucra síntesis química o enzimática, ya que presentan desventajas por contaminación ambiental o bajos rendimientos. En este sentido, *Yarrowia lipolytica* es un modelo de estudio desarrollado con las herramientas de la biología sintética y de la ingeniería metabólica, cuya finalidad ha sido la producción de diversos compuestos oleaginosos y, más recientemente, de proteínas recombinantes, que representan un mercado de cada vez mayor importancia para la industria biotecnológica. Entre las proteínas heterólogas expresadas en este sistema, la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. se presenta como proteína funcional debido principalmente a sus propiedades nutraceuticas y antihipertensivas. En esta revisión se describen los principales avances sobre la producción de moléculas de interés biotecnológico e industrial en los sistemas de levaduras no convencionales, específicamente, la expresión de proteínas heterólogas en *Y. lipolytica*; se considera como ejemplo el caso de la globulina 11S de *A. hypochondriacus* L. Finalmente, se resumen las perspectivas para este sistema, así como las limitantes que quedan por superar.

### Palabras clave:

Aditivos alimentarios  
Expresión heteróloga  
Ingeniería metabólica  
Levaduras  
Proteínas funcionales

### Keywords:

Food additives  
Heterologous expression  
Metabolic engineering  
Yeasts  
Functional proteins

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número, Colonia  
Solidaridad 2000, CP.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972.  
Correo-electrónico:  
raymundo.rosas@unach.mx

## Heterologous proteins in *Yarrowia lipolytica*: the 11S globulin from *Amaranthus hypochondriacus* L.

### Abstract

The heterologous expression of bioactive compounds in microorganisms arises as an alternative to satisfy the demand for basic products that modern society needs for daily life. This method seeks to compete with traditional production that involves chemical or enzymatic synthesis, since it has disadvantages due to environmental contamination or low yields. In this sense, *Yarrowia lipolytica* is a study model developed with the tools of synthetic biology and metabolic engineering, whose purpose has been the production of various oleaginous compounds and, more recently, recombinant proteins, which represent an increasingly important market for biotechnology industry. Among the heterologous proteins expressed in this system, 11S globulin from *Amaranthus hypochondriacus* L. is presented as a functional protein for food supplementation mostly due to its nutraceutical and antihypertensive properties. This review describes the main advances in the production of molecules of biotechnological and industrial interest in unconventional yeast systems, specifically, the expression of heterologous proteins in *Y. lipolytica*; the case of the 11S globulin from *A. hypochondriacus* L. is considered as an example. Finally, the perspectives for this system are summarized, as well as the limitations that remain to be overcome.

## 1. Introducción

La creciente demanda de productos básicos de uso farmacéutico y nutricional, que sean elaborados mediante procesos ambientalmente responsables, sin los inconvenientes en el uso de los sistemas de expresión tradicional motivan el desarrollo de nueva investigación relacionada con la producción de compuestos bioactivos sintetizados por microorganismos o de forma heteróloga (Aditya et al., 2016; Bilal et al., 2020; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b; Larroude et al., 2018; Waterlander et al., 2018). Diferentes modelos no convencionales han sido estudiados con este fin, de entre los cuales destaca la levadura *Yarrowia lipolytica*, es un sistema atractivo, debido a su antigüedad de uso en la elaboración de alimentos como panes, quesos y bebidas fermentadas; a su plasticidad metabólica y a otras características sobresalientes como modelo de estudio en investigación (Nicaud, 2012; Fukuda, 2013; Madzak, 2015; Zinjarde, 2014).

En este sentido, la biología sintética y la ingeniería metabólica mantienen esfuerzos en conjunto para desarrollar plataformas de expresión y secreción a nivel de laboratorio que son únicas, las cuales permiten incrementar los rendimientos y reducir los costos de producción de vacunas, hormonas y otras proteínas importantes para la industria (Abdel-Mawgoud et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Debido a ello, a la fecha más de 130 proteínas provenientes de más de 80 especies se han logrado expresar en esta levadura, algunas de ellas con aplicaciones terapéuticas, mientras que otras catalizan reacciones enzimáticas de interés industrial, y algunas más han sido empleadas como aditivos en productos alimenticios (Kim et al., 2014; Korpys-Woźniak et al., 2020; Madzak, 2015; Madzak et al., 2004; Porro et al., 2005; Song et al., 2007). De las proteínas empleadas como suplementos para alimentos, la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. ha llamado la atención de los investigadores por su potencial como proteína funcional, debido principalmente a su contenido en aminoácidos esenciales y por su posible aplicación como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades asociadas a la dieta, como la hipertensión (Castro-Martínez et al., 2012; Luna-Suárez et al., 2008; Luna-Suárez et al., 2010; Medina-Godoy et al., 2004; Muhammad et al., 2020; Nielsen et al., 1995; Valdez-Ortiz et al., 2005). La presente revisión aborda los principales avances relacionados con la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de levaduras no convencionales, como *Y. lipolytica*; se analizan las diferentes herramientas moleculares que se han desarrollado con este propósito y se destaca el potencial de esta levadura como modelo biotecnológico para la producción de proteínas que pueden emplearse en diferentes ámbitos de la industria, enfatizando el caso de la globulina 11S de *A. hypochondriacus* L., la cual puede usarse para la elaboración de alimentos funcionales, un área que ha sido poco explorada.

## 2. Proteínas recombinantes como productos de interés biotecnológico e industrial

Los materiales y productos que demanda la sociedad moderna para la vida diaria dependen principalmente de la industria de combustibles fósiles y de precursores de hidrocarburos, los cuales generan preocupación en la colectividad global ya que los gases y subproductos derivados de la industria petroquímica provocan la disminución de la calidad del aire y otras formas de contaminación medioambiental. La crisis ambiental motiva el desarrollo de una industria sostenible mediante el uso de materias primas renovables, la búsqueda de bioprecursores, y en general, de recurrir a procesos que no dañen al ecosistema; además del desarrollo de nuevas formas de producir alimentos para cubrir la demanda mundial, la cual incrementa con el paso del tiempo. Ejemplo de estos procesos son la biosíntesis y las fermentaciones realizadas por microorganismos (ambos procesos estudiados por la biotecnología), en lugar de emplear síntesis química o enzimática, que además son costosas y presentan bajos rendimientos (Aditya et al., 2016; Bilal et al., 2020; Waterlander et al., 2018).

La biotecnología permite la producción de proteínas no nativas en diversos sistemas, como los microorganismos, formando así proteínas recombinantes o heterólogas. Producir estas proteínas dentro de un sistema determinado confiere a este último habilidades que le permiten realizar nuevas tareas. La rápida creación y optimización de diversas cepas productoras de estas moléculas ha sido posible gracias al uso combinado de herramientas de la biología sintética y de la ingeniería genética (Larroude et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Algunas de estas proteínas tienen aplicaciones terapéuticas, y juegan un papel importante en la medicina molecular al contribuir en el tratamiento de varias enfermedades. Un ejemplo sobresaliente de la producción de proteínas terapéuticas en levaduras fue la expresión de la insulina humana recombinante en el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* en el año 1987. Desde entonces, decenas de nuevos productos farmacéuticos como vacunas y factores sanguíneos han sido expresados en este y otros sistemas. El valor estimado de mercado de las proteínas terapéuticas, incluidos los productos a base de ácidos nucleicos y los productos a base de células modificadas, es de 70-80 mil millones de dólares (USD) con una tasa anual de crecimiento de 7-15%, lo que supone un esquema de producción económicamente factible para la industria biotecnológica (Kim et al., 2014).

Para que un bioproceso sea económicamente viable, la relación entre los costos de producción y el precio de venta del producto en el mercado deben ser favorables. Por tanto, la reducción de los costos es fundamental en la industria de la bioproducción, se espera que el proceso mediado por microorganismos compita con la producción química convencional, la cual emplea materias primas como el petróleo. Como se mencionó anteriormente, la maquinaria enzimática de un microorganismo puede modificarse gracias

a las herramientas de la ingeniería metabólica, con la intención de solventar las demandas de la industria, o para resolver dificultades inherentes al proceso de producción de una molécula determinada. La ingeniería metabólica mejora los rendimientos y la productividad de las cepas de microorganismos, modificando las vías sintéticas e inactivando reacciones competitivas, promoviendo la síntesis selectiva de la molécula deseada y reduciendo la formación de subproductos, para minimizar así los costos en la sección *downstream* de un bioproceso. Se ha referido que en el futuro moléculas tales como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), metanol y metano podrían emplearse como fuentes de carbono para las cepas recombinantes, lo cual promovería el uso de este recurso, el cual es desechado por muchos sectores de la industria, además de que la competencia por el suministro es prácticamente inexistente, al mismo tiempo que son fuentes económicas de posibles sustratos. En este sentido, el objetivo de la ingeniería aplicada en la producción de proteínas heterólogas es el de convertir a una plataforma biotecnológica de expresión perfecta que incorpore todas las vías deseadas y pueda realizar un amplio número de actividades distintas, es decir, que una cepa sea capaz de degradar varios tipos de fuentes de carbono complejas, o de producir varias proteínas en un mismo microorganismo sin que esto represente un problema para la supervivencia del mismo. Sin embargo, se ha descrito que la carga metabólica afectaría el rendimiento del producto (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Más adelante se abordan las características de provecho y los aspectos limitantes relacionados con la carga genética en los sistemas de expresión.

### 3. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas

*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y las células de mamíferos son los sistemas hospedadores más utilizados para la producción de proteínas heterólogas con aplicaciones terapéuticas, y representan el 15%, 31% y 43%, respectivamente, de los productos biofarmacéuticos desarrollados; sin embargo, se ha reportado que presentan desventajas como la formación de cuerpos de inclusión, bajos rendimientos, crecimiento lento, se requiere de medios complejos y/o son susceptibles a la contaminación viral (Berlec y Štrukelj, 2013; Çelik y Çalık, 2012; Kim *et al.*, 2014).

El sistema de expresión ideal sería, entonces, una plataforma universal capaz de convertir de manera eficiente una amplia variedad de materias primas de bajo costo en productos de valor agregado. Sin embargo, los fenotipos relevantes para la producción de proteínas heterólogas suelen ser multifactoriales y con procesos metabólicos difíciles de descifrar. Las ventajas innatas de un sistema hospedero pueden incluir desde tolerancia a altas concentraciones de producto o precursor y tolerancia a las condiciones del procesamiento, dichos rasgos suelen ser complejos y difíciles de caracterizar, y por lo tanto no se transfieren de manera

sencilla a otra cepa u organismo preferido (Wagner y Alper, 2016).

Las levaduras, por su parte, han sido empleadas desde hace miles de años en la elaboración de alimentos como panes y quesos, y para producir bebidas alcohólicas a través de los procesos de fermentación, extendiéndose su uso cada vez más hasta emplearse en tareas menos tradicionales como la síntesis de proteínas terapéuticas, lo que hace que adquieran relevancia industrial (Kim *et al.*, 2014). Actualmente, las levaduras se encuentran por detrás de *E. coli* en cuanto al número de redes sintéticas que se han descrito, debido a su naturaleza eucariota. No obstante, a pesar de ser relativamente complejas, las levaduras poseen una variedad de ventajas que las vuelve atractivas como plataformas de expresión de proteínas; características como el crecimiento a alta densidad celular en una amplia variedad de fuentes de carbono, capacidad para realizar una variedad de modificaciones postraduccionales complejas, alta capacidad de secreción celular, poseen mayor tolerancia al proceso de fermentación industrial que otros sistemas bacterianos tradicionales, no son susceptibles a agentes infecciosos como los bacteriófagos, y se ha descrito que secretan pocas proteínas endógenas, lo que facilita el proceso de purificación de la proteína recombinante secretada. Si bien los hongos filamentosos también comparten muchas de estas características, a menudo son más difíciles de transformar con ADN exógeno (Blount *et al.*, 2012; Egermeier *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2014; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Aunque los primeros trabajos de biología sintética en levaduras comenzaron con el modelo *S. cerevisiae*, hoy se conoce que esta levadura produce hiperglicosilación de los productos y estructuras de glicanos potencialmente alergénicas, lo cual es desfavorable para la producción de algunas proteínas terapéuticas humanas. En la última década, el campo de aplicación en levaduras se ha extendido a otros modelos denominados no convencionales, como *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*. La secuenciación completa del genoma de algunas de estas levaduras ya se encuentra disponible en bases de datos públicas (De Schutter *et al.*, 2009; Dujon *et al.*, 2004; Ravin *et al.*, 2013). Algunos ejemplos de proteínas y otros productos expresados en estos sistemas pueden apreciarse en el Cuadro 1.

#### 3.1. *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* es una levadura oleaginosa dimórfica, no convencional, perteneciente al filo Ascomycota (subfilo: Saccharomycotina, antes llamado Hemiascomycetes), la cual se ha descrito que posee notable actividad lipolítica y proteolítica. Ha sido aislada de varios medios, entre ellos suelos, aguas marinas, micorrizas, carnes y alimentos lácteos, destacando varios quesos, además de tener relativa incidencia en aguas contaminadas con hidrocarburos (habitualmente habita entornos con sustratos de naturaleza hidrófoba) (Fukuda, 2013; Madzak, 2015; Nicaud, 2012; Zinjarde, 2014). Desde hace más de 50 años esta levadura ha ganado

popularidad entre académicos, investigadores y en la industria debido a que posee ventajas metabólicas distintivas, como tolerancia a los cambios de pH (tanto ácido como alcalino), concentración de sales, bajas temperaturas, baja actividad acuosa, posee una elevada capacidad de secreción (de manera natural secreta enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, esterases, fosfatasa y RNAsas), y permite el uso de diversos compuestos orgánicos como materias primas (alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos); esto la vuelve un microorganismo adecuado para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y para la expresión de metabolitos más allá de los ácidos grasos que típicamente se han estado trabajando en este modelo, que abarca productos derivados de pentosas fosfato, biocombustibles, metilcetonas, policétidos, terpenos, carotenoides, polímeros, enzimas, proteínas terapéuticas, nanopartículas, fármacos, nutraceuticos, ácidos orgánicos, aditivos y suplementos dietéticos, por mencionar algunos. También se ha propuesto como modelo de estudio del dimorfismo, del complejo mitocondrial, peroxisomas, acumulación de lípidos, y para la producción de diversas enzimas (Blazek et al., 2015; Celińska et al., 2018; Dulermo et al., 2017; Hanko et al., 2018; Jach et al., 2020; Kubiak et al., 2019; Larroude et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016a; Sekova et al., 2019; Vandermies y Fickers, 2019; Xie, 2017; Yan et al., 2018).

*Y. lipolytica* es una levadura de estado GRAS (generalmente reconocida como segura), designada así por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de EE. UU., por lo que se puede utilizar sin riesgo en los procesos industriales, es de fácil manipulación en condiciones de laboratorio, y entre lo más destacado de su fortaleza metabólica, esta puede acumular intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), precursores como acetyl-CoA y malonil-CoA; asimismo permite la manipulación de la vía de pentosas fosfato, lo que hace posible la generación de múltiples productos heterólogos (Bilal et al., 2020; Gálvez-López et al., 2019; Gao et al., 2017; Madzak, 2015; Markham y Alper, 2018; Miller y Alper, 2019; Wagner et al., 2018; Zinjarde, 2014).

#### 4. Principales proteínas heterólogas expresadas en *Yarrowia lipolytica*

La levadura *Y. lipolytica* se ha convertido en un sistema popular para la expresión y secreción de moléculas de interés industrial, destacando de entre ellas a las proteínas. El uso de esta levadura para la obtención de compuestos valiosos se ha desarrollado en dos direcciones conectadas entre sí: como un hospedador para la producción de proteínas heterólogas y como una célula biocatalizadora. Usar a *Y. lipolytica* como hospedador a menudo requiere de modificar su metabolismo, introducir nuevas enzimas catalizadoras por medio de la expresión de proteínas foráneas; esto a su vez precisa del desarrollo de promotores sintéticos, genes sintéticos con codones optimizados, factores de transcripción artificiales y de la inserción de casetes de expresión. A pesar de aplicarse con mayor frecuencia en los sistemas procarióticos, se ha

descrito que la optimización de codones puede mejorar la eficiencia de traducción de genes heterólogos en levaduras, permitiendo que coincidan con la secuencia de nucleótidos del organismo huésped (Kim *et al.*, 2014). El uso de esta levadura como huésped para la expresión heteróloga se inició hace poco más de 35 años, en 1984, por Pfizer Inc. (EE. UU.) y un equipo del INRA en Francia. Desde entonces, más de 130 proteínas, de más de 80 especies se han producido con éxito en este modelo. Al principio, el uso de levaduras como sistemas para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes se vio afectado debido a las diferencias que existían entre la ruta de N-glicosilación de las levaduras y la de los mamíferos, ya que las levaduras, al modificar las glicoproteínas con N-glicanos de alta manosa, ocasionan que se reduzca la vida media de las proteínas producidas, volviéndolas inmunogénicas para los humanos y otros mamíferos, y reduciendo así su utilidad. Sin embargo, en la actualidad, para *Y. lipolytica* se han desarrollado cepas que producen glicoproteínas compatibles con humanos, probadas *in vivo* (Kim et al., 2014; Korpys-Woźniak et al., 2020; Madzak et al., 2004; Madzak, 2015; Porro et al., 2005; Song et al., 2007;). Otra limitante en la producción de proteínas recombinantes es que, durante la secreción, a menudo se ven sujetas a una escisión proteolítica por las proteasas que existen en la superficie celular, lo que reduce el rendimiento final y afecta la calidad de los productos; sin embargo, la construcción de cepas deficientes de proteasas mediante la delección múltiple de algunos genes podría emplearse para resolver este problema (Wu et al., 2013). Las cepas de tipo silvestre se han utilizado para producir proteínas unicelulares SCP (Single Cell Proteins) destinadas a la alimentación del ganado. Por otra parte, la empresa polaca Skotan SA comenzó recientemente a comercializar biomasa de esta levadura para su uso como levadura forrajera en Europa, y a desarrollar aplicaciones prebióticas y probióticas para la industria alimentaria. Esta levadura también se ha modificado para la expresión de un péptido antimicrobiano (Zhao et al., 2013). Algunas enzimas de importancia económica que han sido expresadas en *Y. lipolytica* incluyen lipasas, proteasas, amilasas, mananasas y lacasas. Las lipasas, una subclase de esterases, catalizan la hidrólisis de lípidos y tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria, de detergentes, en biorremediación, como biocatalizadores para la producción de biodiesel y en química orgánica, además de utilizarse en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina. Las proteasas, enzimas capaces de hidrolizar diversos enlaces peptídicos por medio de diversos mecanismos catalíticos, tienen su principal aplicación en la industria alimentaria y de los detergentes, aunque también en el tratamiento de aguas residuales y en el ámbito médico. Las alfa amilasas son glucósido-hidrolasas muy importantes en el procesamiento del almidón. Las b mananasas son hemicelulasas capaces de hidrolizar los enlaces 1,4- $\beta$ -D manosídicos de las cadenas de manano y sus derivados, y se emplean en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica, así como en la industria de los alimentos y

piensos, de los detergentes, y en la extracción de petróleo. Las lacasas, por su parte, son oxidorreductasas de cobre capaces de oxidar una amplia gama de fenoles y arilaminas, y se pueden utilizar en la degradación de pesticidas, tintes e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Han et al., 2013; Madzak, 2015).

**Cuadro 1.** Proteínas heterólogas y otros productos de uso industrial expresados en diferentes especies de levaduras no convencionales.

Organismo	Productos
<i>H. polymorpha</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina Fitasa Hexosa oxidasa Hirudina Triacilglicerol lipasa Vacuna contra la hepatitis B
<i>K. lactis</i>	Ácido glicólico Ácido láctico Lactasa Quimosina
<i>P. pastoris</i>	Albúmina sérica humana Anticuerpo Anti-IL-6R Anticuerpo Anti-RSV Colágeno Ecalantida Factor de crecimiento HB-EGF Fosfolipasa C Insulina Interferón $\alpha$ 2b Isobutanol Nootkatona Ocriplasma Vacuna de la hepatitis
<i>Y. lipolytica</i>	$\omega$ -3 y $\omega$ -6 $\alpha$ -amilasa de <i>Oryza sativa</i> Ácido alfa-cetoglutárico Ácido alfa-linolénico Ácido cítrico Ácido eicosapentaenoico Ácido isocítrico Ácido itacónico Ácido succínico Biodiesel Citocromo P450 1A1 de <i>Homo sapiens sapiens</i> Endo- $\beta$ -1,4-mananasa de <i>Aspergillus aculeatus</i> Epóxido hidrolasa de <i>Rhodotorula araucariae</i> Eritritol Interferón $\alpha$ 2b de <i>Homo sapiens sapiens</i> Lacasa I de <i>Pycnopus cinnabarinus</i> Leucina aminopeptidasa II de <i>Aspergillus oryzae</i> Lipasa B de <i>Candida antárctica</i> Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> Lipasa extracelular YILIP2 Pancrelipasa Proquimosina de <i>Bos taurus taurus</i> Succinato Ácido gamma-linolénico Licopeno $\beta$ -caroteno

(Ekas et al., 2019; Kim et al., 2014; Madzak, 2015; Wagner y Alper, 2016).

## 5. Versatilidad de *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* también se ha empleado para producir ácidos grasos poliinsaturados, aceite unicelular y proteína unicelular. Los ácidos grasos poliinsaturados son comestibles, y aunque no son sintetizados por los mamíferos, son esenciales para la salud. Existe la intención de desarrollar cepas de *Y. lipolytica* productoras de  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, los cuales puedan ser utilizados como suplementación en piensos y alimentos, como alternativa económica y sostenible a la producción tradicional en la que estos compuestos se obtienen de aceites vegetales o del pescado. Se ha descrito que algunas cepas de esta levadura son capaces de producir biomasa con concentraciones de lisina, treonina y fenilalanina/tirosina más altos que los observados en la proteína de huevo estándar (Juszczak et al., 2013). DuPont Company ya comercializa biomasa de *Y. lipolytica* rica en ácido eicosapentaenoico (EPA) como alimento para peces, cuyo proceso ha sido optimizado y patentado (Verlasso™), además de suplementos dietéticos ricos en EPA (New Harvest™). Otros ejemplos de moléculas producidas por esta levadura y destinadas a la suplementación de alimentos incluyen al ácido cítrico, un conservador ampliamente utilizado por la industria, y a los carotenoides, pigmentos orgánicos lipofílicos empleados como colorantes y agentes antioxidantes. Por lo tanto, se conoce que esta levadura se utiliza con diversos fines en la industria alimentaria: en la fabricación de alimentos, la elaboración de aditivos y conservadores, la producción de biomasa como alimento o pienso, y en el proceso de transformación de los desechos alimentarios, por lo que se le considera como importante en aplicaciones relacionadas con comestibles. Los aspectos relacionados con la inocuidad de *Y. lipolytica* para su uso alimenticio refieren que naturalmente se le puede hallar en productos cárnicos, avícolas y lácteos, se consume como alimento y pienso, y a que se han obtenido aditivos de grado alimenticio de esta levadura (Madzak, 2015; Patsios et al., 2020; Zinjarde, 2014).

### 5.1. Cepas, vectores, vías de secreción y otros aspectos de ingeniería metabólica

La mayoría de los trabajos de expresión heteróloga han utilizado un número limitado de líneas de cepas endogámicas, entre las que destacan la cepa E129 y la serie de cepas Po1 (Po1d, f, g y h). La cepa E129 (MatA, lys11-23, leu2-270, ura3-302, xpr2-322) se produce a partir de múltiples cruces entre derivados de la cepa francesa de tipo silvestre W29 (MatA) y la cepa estadounidense YB423-12 (MatB). La serie de cepas Po1 se derivan únicamente de W29 y no contienen el retrotransposón Ylt1 que estaba ausente en esta cepa francesa de tipo silvestre. Po1d (MatA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322) presenta altos niveles de secreción, delección de proteasa extracelular alcalina (AEP, codificada por el gen XPR2), auxotrofia por Leu- y Ura- no reversibles, y producción de invertasa recombinante (el alelo ura3-302 corresponde a la ruptura de URA3 por el gen SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor

XPR2) permitiendo utilizar sacarosa o melaza como fuente de carbono. Las cepas Po1f, Po1g y Po1h fueron suprimidas para la proteasa extracelular ácida (alelo xpr1-2). Po1g también se equipó con una plataforma de acoplamiento pBR322 (ura3-302::URA3:pBR322) para futuras integraciones con vectores basados en pBR322 y retiene únicamente la auxotrofia por Leu-. Po1h fue modificada mediante la conversión del gen LEU2 para retener solamente la auxotrofia por Ura-. Todas estas cepas pueden ser adquiridas en la Biblioteca de Levaduras CIRM-Levures del INRA (<https://www6.inrae.fr/cirm/Levures>) y mediante el kit de expresión YLEX™ que puede adquirirse en Yeastern Biotech Co. (Taiwán) o Gentauro (Bélgica) (Madzak, 2015; Zinjarde, 2014).

En el área de la transformación de cepas, existen dos tipos de vectores con los cuales se puede transformar levaduras. Los primeros son los plásmidos episomales, también denominados como “replicativos”; el segundo tipo se refiere a los plásmidos que son linearizados con la intención de dirigir su integración en un locus preciso del genoma de la levadura, también conocidos como “integrativos”. Se sabe que ninguna cepa de *Y. lipolytica* posee episomas naturales, pero se han diseñado plásmidos replicativos que utilizan Secuencias de Replicación Autónoma / Centrómero (ARS / CEN) cromosómicas, las cuales son útiles cuando se requiere de expresión transitoria; no obstante, su uso para la expresión heteróloga se ve limitado por presentar un bajo número de copias (un promedio de uno a tres plásmidos por célula en condiciones selectivas) y a su alta frecuencia de pérdidas. Al respecto, los promotores inducibles ofrecen la ventaja de regular la expresión génica como respuesta a la presencia de determinadas moléculas químicas, las cuales pueden inducirla o reprimirla. Recientemente, se ha diseñado un plásmido mejorado de ARS / CEN fusionando un promotor corriente arriba de la región centromérica, aumentando así el número relativo de copias en un 80% y proporcionando un punto de partida para el desarrollo de plásmidos replicativos más potentes en esta levadura. Sin embargo, el uso de vectores integrativos sigue siendo la estrategia preferida empleada en la ingeniería de *Y. lipolytica* (Kim et al., 2014; Liu et al., 2014; Madzak, 2015; Shen et al., 2012;).

Se ha reportado que este sistema eucariota es eficaz en la secreción de moléculas. Para dirigir una proteína heteróloga a la vía secretora de *Y. lipolytica* con el fin de obtener su liberación en el medio de cultivo, de dirigirla a microcuerpos celulares como oleosomas o peroxisomas, o para su exposición en la superficie celular, se realiza una fusión traduccional con un señalizador adecuado en la secuencia madura de la proteína de interés; esto permite dirigir al nuevo polipéptido a la vía de secreción celular. En general, la secreción de proteínas requiere de múltiples etapas, e involucran los procesos de transcripción, traducción, translocación, y de modificaciones postraduccionales (plegamiento de proteínas, escisión de péptidos, glicosilación adicional, clasificación y finalmente secreción). Al respecto, se ha descrito que la sobreexpresión de factores de

plegamiento (chaperonas), o de enzimas redox, pueden mejorar la secreción de proteínas en el retículo endoplásmico; además, previenen la acumulación de proteínas mal plegadas (Hou et al., 2012; Kim et al., 2014). El direccionamiento de proteínas heterólogas a peroxisomas de *Y. lipolytica* se puede realizar mediante la fusión de una señal de direccionamiento peroxisómico (PTS) a su dominio C terminal. El tripéptido AKI, considerado como un PTS de consenso para los géneros relacionados *Yarrowia* y *Candida*, se ha utilizado para dirigir una polihidroxialcanoato sintasa bacteriana a los peroxisomas de *Y. lipolytica*, y el tripéptido SKL, más cercano al consenso PTS de *S. cerevisiae*, se ha utilizado para dirigir a la proteína verde fluorescente (GFP) a esta misma dirección (peroxisomas). Varias proteínas heterólogas se han dirigido a los oleosomas de *Y. lipolytica* y se han anclado en la superficie a través de la fusión al dominio C terminal de una oleosina vegetal, una proteína estructural incrustada en la membrana fosfolipídica de los oleosomas de las plantas (Haddouche et al., 2010; Madzak, 2015; Xue et al., 2013).

Algunos estudios reportan que los terminadores en los sistemas fúngicos pueden mejorar la producción de proteínas a partir de las transcripciones y pueden aumentar la abundancia de enzimas. Aunque los terminadores no se han caracterizado completamente para *Y. lipolytica*, los diseños sintéticos para *S. cerevisiae* siguen siendo funcionales en esta levadura, y en comparación con los terminadores endógenos comunes presentan una mejora del 70% en la expresión génica (Curran et al., 2015; Ito et al., 2013).

## 6. La globulina 11s de *Amaranthus hypochondriacus* L. como proteína funcional

La nutrición y el estilo de vida de los individuos juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión. De esta enfermedad se derivan otros padecimientos como la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, la enfermedad renal en etapa terminal, y el accidente cerebrovascular. Se reporta que en el 2010 aproximadamente un billón de personas alrededor del mundo padecían hipertensión, y se estimó que para el 2025 la cifra se haya incrementado en un 60% (Glasser, 2001; Madureira et al., 2010; Nakahara et al., 2010). Los fármacos hipotensores producidos químicamente para el tratamiento y prevención de la hipertensión, captopril, propranolol y losartán, provocan efectos secundarios como tos seca, alteraciones del gusto, erupciones cutáneas y otras disfunciones en los órganos humanos (FitzGerald y Meisel, 2000). En ese marco, se sabe que algunas proteínas presentes en alimentos como la leche, huevo, pescado, y en muchas plantas ejercen actividad antihipertensiva, y son coadyuvantes en la prevención y tratamiento de estos padecimientos, lo cual ha llamado la atención de los investigadores. Estas proteínas nutracéuticas contienen péptidos bioactivos que se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos que las conforman y pueden ser liberados en el cuerpo por medio de la proteólisis enzimática durante la

digestión gastrointestinal, en donde una vez libres actúan como compuestos reguladores con actividad similar a la de las hormonas. Gracias a su potencial para mejorar la salud, los péptidos bioactivos son atractivos para utilizarse como componentes en alimentos funcionales, aunado al hecho de que representan una alternativa menos costosa y más saludable que el uso de fármacos, debido a que no conllevan al desarrollo de efectos secundarios (Erdmann et al., 2008; Hong et al., 2008). Se ha descrito que el dipéptido Val-Tyr (VY) además de ser fácilmente absorbido por el torrente sanguíneo, ha demostrado poseer actividad antihipertensiva en diversos estudios realizados con ratones y humanos; así también los tripéptidos Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP). A este respecto, las semillas del amaranto (*A. hypochondriacus* L.) son consideradas una excelente fuente de proteínas debido a su composición equilibrada de aminoácidos esenciales como la lisina (3.7 - 7.6%) y de aminoácidos azufrados (3.1 - 7.1%), además de ser fuente de minerales, calcio, hierro, fósforo, ácido fólico y vitaminas A, B1, B2, B3 y C (Valdez-Ortiz et al., 2005). Se ha descrito que la subunidad ácida de la amarantina (una proteína de almacenamiento de tipo globulina con un coeficiente de sedimentación 11.9S) posee potencial como proteína funcional y nutracéutica para suplementar alimentos debido a que su composición de aminoácidos está cerca del balance óptimo requerido en la dieta humana, además de poseer una notable estabilidad térmica y propiedades emulsionantes. Esta globulina 11S o amarantina es una molécula homoeámera con una masa molecular de 398 KDa, una porción denominada proamarantina de 50-52 KDa, y dos subunidades similares a los disulfuros, la subunidad ácida de 32-34 KDa y la subunidad básica de 22-24 KDa; dicha proteína ha sido expresada en diferentes sistemas, como *Escherichia coli*, además de plantas de maíz y semillas de tabaco transgénico, obteniendo un notable mayor rendimiento que en el sistema nativo y sin reacciones alérgicas. Recientemente, algunas investigaciones se han enfocado en mejorar las propiedades nutracéuticas y funcionales de la globulina 11S, mediante la inserción de genes que codifican péptidos con actividad antihipertensiva. Castro-Martínez et al. en el 2012 realizaron un trabajo durante el cual modificaron la estructura de la globulina 11S en su tercera región variable, expresando cuatro dipéptidos Val-Tyr colocados en tándem, además de agregar el oligopéptido Arg-Ile-Pro-Pro en la región C-terminal, al mismo tiempo que ensayaron con variables como la temperatura, velocidad de agitación y oxigenación, obteniendo una producción máxima de 99 mg de proteína modificada/L, cantidades mayores a las obtenidas en cultivo en matraces pero con menor estabilidad que la proteína no modificada. Como dato adicional, se reporta que existe poca información documentada acerca de parámetros eficientes a escala de biorreactor para la producción de amarantina (Castro-Martínez et al., 2012; Luna-Suárez et al., 2008, 2010; Medina-Godoy et al., 2004; Muhammad et al., 2020; Nielsen et al., 1995).

## 7. Perspectivas y principales retos

A pesar de los avances logrados en la ingeniería aplicada en levaduras, se han reportado algunas limitantes durante el proceso de producción de proteínas heterólogas, lo cual supone un área de oportunidad para desarrollar nueva investigación; tal es el caso de la propensión de esta levadura por la unión de extremos no homólogos NHEJ (Non-homologous end-joining), un mecanismo de reparación del ADN en donde las aberturas de doble hebra se ligan directamente, sin un donante de homología, lo que complica las integraciones específicas. Otro ejemplo son los sistemas de plásmidos episomales relativamente inestables. Es por ello que uno de los principales desafíos por superar se centra en mejorar la eficiencia de transformación. La posibilidad de aumentar y/o ajustar la expresión génica es crucial tanto para la producción de proteínas heterólogas como para la ingeniería metabólica en sí. Una desventaja adicional surge de la naturaleza dimórfica de *Y. lipolytica*, lo cual puede conducir a dificultades en el bioprocésamiento, específicamente cuando las células son filamentosas, aunque los estudios han demostrado formas de limitar el crecimiento a la forma de levadura. No obstante, las dificultades de la eficiencia de biotransformación en esta levadura pueden ser superadas mediante el empleo de las nuevas herramientas y tecnologías de última generación de la ingeniería genética, como el sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas), emparejadas con la endonucleasa Cas9, que permiten la edición dirigida del genoma mediante la integración de un ARN guía para inducir una ruptura de doble hebra DSB (Double Strand Break) en un locus específico y sin la necesidad de utilizar marcadores (Bilal et al., 2020; Markham y Alper, 2018; Schwartz et al., 2016; Swietalski et al., 2020; Timoumi et al., 2018; Wagner y Alper, 2016). El desarrollo relativamente reciente de este y otros sistemas emergentes permiten usar a *Y. lipolytica* como levadura de ensamblaje, lo que aumenta sus posibilidades de uso en diversas aplicaciones, como biocatálisis o bioconversión inmovilizada, desarrollo de biosensores y vacunas vivas, o detección de alto rendimiento de nuevas actividades enzimáticas. La capacidad de las levaduras para ensamblar y mantener genomas bacterianos completos demuestra que tienen las herramientas y la capacidad para el alojamiento de grandes redes sintéticas, pero todavía falta estudiar la respuesta celular al estrés de la sobreproducción de proteínas heterólogas. Los programas de biología sintética existentes ya ofrecen características para la optimización automática mediante el uso de codones de genes heterólogos, y esquemas de ensamblaje de ADN. Para los diseños futuros en biología sintética de levadura, será crucial comprender, cuantificar y modelar los límites de capacidad de la célula nativa. El desarrollo de plataformas de alto rendimiento permitirá el uso de esta levadura para la producción y análisis estructural de proteínas, lo que a su vez posibilitará un mejor uso de *Y. lipolytica* como fábrica

celular, y como microorganismo genéticamente modificado (GMM) que sea plenamente aceptado socialmente para aplicaciones en el ámbito medioambiental y en la industria de alimentos destinados a humanos (aunque existe información publicada sobre los aspectos básicos y aplicados de esta levadura, hace falta una revisión extensa de las aplicaciones relacionadas con la alimentación). Por último, las lecciones aprendidas en el desarrollo de estas nuevas herramientas para *Y. lipolytica* conducirán a metodologías que se pueden aplicar a otras levaduras oleaginosas prometedoras, como *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Trichosporon oleaginosus* (Blount et al., 2012; Madzak, 2015; Markham y Alper, 2018; Wagner y Alper, 2016; Zinjarde, 2014).

## 8. Conclusión

El modelo de estudio *Yarrowia lipolytica* ha contribuido fuertemente en el conocimiento y aplicación de los avances tecnológicos y funcionales de la ingeniería metabólica para la producción de proteínas heterólogas. La globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. es una proteína con potencial para la elaboración de productos alimenticios debido a sus bondades nutracéuticas y a su posible uso como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión; no obstante, aún quedan aspectos por mejorar durante el proceso de producción de estas proteínas: aumentar la eficiencia de transformación de las cepas recombinantes, desarrollar nuevas posibilidades de uso de *Y. lipolytica* (por ejemplo, para la expresión de nuevas moléculas), la caracterización de genes, el estudio y desarrollo de cepas sobreproductoras, y sobre cómo incluir todas sus cualidades metabólicas en nuevos modelos de estudio o en una sola cepa sin comprometer la supervivencia de la célula en el proceso, además de realizar una revisión más detallada sobre las aplicaciones de esta levadura en el campo de la industria alimentaria y que refuerce su uso seguro para la elaboración de productos destinados al consumo humano (como suplementos y probióticos, entre otros).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Referencias

- Abdel-Mawgoud AM, Markham KA, Palmer CM, Liu N, Stephanopoulos G, Alper HS. 2018. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 50: 192-208.
- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, y Sebayang AH. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 631-653.
- Berlec A. y Štrukelj B. 2013. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts

- and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40(3-4): 257-274.
- Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng H. 2020. *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(4): 535-552.
- Blazek J, Hill A, Jamoussi M, Pan A, Miller J, Alper HS. 2015. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production. *Metabolic Engineering* 32: 66-73.
- Blount BA, Weenink T, Ellis T. 2012. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Letters* 586(15): 2112-2121.
- Castro-Martínez C, Luna-Suárez S, Paredes-López O. 2012. Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *Journal of Biotechnology* 158(1-2): 59-67.
- Çelik E y Çalik P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30(5): 1108-1118.
- Celińska E, Borkowska M, Białas W, Korpys P, Nicaud JM. 2018. Robust signal peptides for protein secretion in *Yarrowia lipolytica*: identification and characterization of novel secretory tags. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(12): 5221-5233.
- Curran KA, Morse NJ, Markham KA, Wagman AM, Gupta A, Alper HS. 2015. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast. *ACS Synthetic Biology* 4(7): 824-832.
- De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzép P, Van de Peer Y, Callewaert N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 27(6): 561-566.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Couciet JL. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995): 35-44.
- Dulermo R, Brunel F, Dulermo T, Ledesma-Amaro R, Vion J, Trassaert M, Thomas S, Nicaud JM, Leplat C. 2017. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 16(1): 31.
- Egermeier M, Russmayer H, Sauer M, Marx H. 2017. Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology* 8: 49.
- Ekas H, Deaner M, Alper HS. 2019. Recent advancements in fungal-derived fuel and chemical production and commercialization. *Current Opinion in Biotechnology* 57: 1-9.
- Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19(10):643-54.
- FitzGerald RJ, Meisel H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84(S1): 33-37.
- Fukuda R. 2013. Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77(6): 1149-1154.
- Gálvez-López D, Chávez-Meléndez B, Vázquez-Ovando A, Rosas-Quijano R. 2019. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Microbiology* 50(1): 23-31.
- Gao S, Tong Y, Zhu L, Ge M, Zhang Y, Chen D, Jiang Y, Yang S. 2017. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous  $\beta$ -carotene production. *Metabolic Engineering* 41: 192-201.
- Glasser SP. 2001. Hypertension syndrome and cardiovascular events. *Postgraduate Medicine* 110(5): 29-36.
- Haddouche R, Delessert S, Sabirova J, Neuvéglise C, Poirier Y, Nicaud JM. 2010. Roles of multiple acyl-CoA oxidases in the routing of carbon flow towards  $\beta$ -oxidation and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 10(7): 917-927.
- Han Z, Madzak C, Su WW. 2013. Tunable nano-oleosomes derived from engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering* 110(3): 702-710.
- Hanko EKR, Denby CM, Sánchez i Nogué V, Lin W, Ramirez KJ, Singer CA, Beckham GT, Keasling JD. 2018. Engineering  $\beta$ -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metabolic Engineering* 48: 52-62.
- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, Chi L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29(6): 1062-1071.
- Hou J, Tyo KEJ, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 12(5): 491-510.
- Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C, Tokuhiro K, Kitagawa T, Matsuyama T. 2013. Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 168(4): 486-492.
- Jach ME, Baj T, Juda M, Świder R, Mickowska B, Malm A. 2020. Statistical evaluation of growth parameters in biofuel waste as a culture medium for improved production of single cell protein and amino acids by *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* 10(1): 35.
- Juszczyk P, Tomaszewska L, Kita A, Rymowicz W. 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresource Technology* 137(00): 124-131.
- Kim H, Yoo SJ, Kang HA. 2014. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research* 15(1):1-16.
- Korpys-Woźniak P, Kubiak P, Białas W, Celińska E. 2020. Impact of overproduced heterologous protein characteristics on physiological response in *Yarrowia lipolytica* steady-state-maintained continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(22): 9785-9800.
- Kubiak M, Borkowska M, Białas W, Korpys P, Celińska E. 2019. Feeding strategy impacts heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica* fed-batch cultures-Insight into the role of osmolarity. *Yeast* 36(5): 305-318.
- Larroude M, Rossignol T, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. 2018. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances* 36(8): 2150-2164.
- Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. 2018. A synthetic biology approach to

- transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of  $\beta$ -carotene. *Biotechnology and Bioengineering* 115(2): 464-472.
- Ledesma-Amaro R y Nicaud JM. 2016a. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research* 61: 40-50.
- Ledesma-Amaro R y Nicaud JM. 2016b. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology* 34(10): 798-809.
- Liu L, Otoupal P, Pan A, Alper HS. 2014. Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function. *FEMS Yeast Research*. 14(7): 1124-1127.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A, Paredes-López O. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal*. 3(2): 209-219.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A, Paredes-López O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 148(4): 240-247.
- Madureira AR, Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* 93(2): 437-455.
- Madzak C. 2015. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(11): 4559-4577.
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. 2004. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109(1-2): 63-81.
- Markham KA y Alper HS. 2018. Synthetic Biology Expands the Industrial Potential of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology* 36(10): 1085-1095.
- Medina-Godoy S, Nielsen NC, Paredes-Lopez O. 2004. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 20(6): 1749-1756.
- Miller KK y Alper HS. 2019. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(23-24): 9251-9262.
- Muhammad A, Feng X, Rasool A, Sun W, Li C. 2020. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances* 43: 107555.
- Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, Uchida R. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-Like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2): 821-827.
- Nicaud JM. 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29(10): 409-418.
- Nielsen NC, Jung R, Nam YW, Beaman TW, Oliveira LO, Bassüner R. 1995. Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* 145(5-6): 641-647.
- Patsios SI, Dedousi A, Sossidou EN, Zdragas A. 2020. Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. *Sustainability* 12(4): 1398.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Recombinant Gene Expression* 31(3): 245-260.
- Ravin NV, Eldarov MA, Kadnikov VV, Beletsky AV, Schneider J, Mardanova ES, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA, Mardanov AV, Skryabin KG. 2013. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14(1): 837.
- Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. 2016. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology* 5(4): 356-359.
- Sekova VY, Dergacheva DI, Isakova EP, Gessler NN, Tereshina VM, Deryabina YI. 2019. Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH. *Metabolites* 9(12): 307.
- Shen MWY, Fang F, Sandmeyer S, Da Silva NA. 2012. Development and characterization of a vector set with regulated promoters for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 29(12): 495-503.
- Song Y, Choi MH, Park JN, Kim MW, Kim EJ, Kang HA, Kim JY. 2007. Engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of glycoproteins lacking the outer-chain mannose residues of N-glycans. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14): 4446-4454.
- Swietalski P, Hetzel F, Seitz I, Fischer L. 2020. Secretion of a low and high molecular weight  $\beta$ -glycosidase by *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 19(1): 100.
- Timoumi A, Guillouet SE, Molina-Jouve C, Fillaudeau L, Gorret N. 2018. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(9): 3831-3848.
- Valdez-Ortiz A, Rascón-Cruz Q, Medina-Godoy S., Sinagawa-García SR, Valverde-González ME, Paredes-López O. 2005. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology* 115(4): 413-423.
- Vandermies M y Fickers P. 2019. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms* 7(2): 40.
- Wagner JM y Alper HS. 2016. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology* 89: 126-136.
- Wagner JM, Liu L, Yuan SF, Venkataraman MV, Abate AR, Alper HS. 2018. A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 47: 346-356.
- Waterlander WE, Mhurchu CN, Eyles H, Vandevijvere S, Cleghorn C, Scarborough P, Swinburn B, Seidell J. 2018. Food Futures: Developing effective food systems interventions to improve public health nutrition. *Agricultural Systems* 160: 124-131.
- Wu M, Shen Q, Yang Y, Zhang S, Qu W, Chen J, Sun H, Chen S. 2013. Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40(6): 589-599.

- 
- Xie D. 2017. Integrating cellular and bioprocess engineering in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* for biodiesel production: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5: 65.
- Xue Z, Sharpe PL, Hong SP, Yadav NS, Xie D, Short DR, Damude HG, Rupert RA, Seip JE, Wang J, Pollak DW, Bostick MW, Bosak MD, Macool DJ, Hollerbach DH, Zhang H, Arcilla DM, Bledsoe SA, Croker K, McCord EF, Tyreus BD, Jackson EN, Zhu Q. 2013. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nature Biotechnology* 31(8): 734-740.
- Yan J, Han B, Gui X, Wang G, Xu L, Yan Y, Madzak C, Pan D, Wang Y, Zha G, Jiao L. 2018. Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. *Scientific Reports* 8(1): 758.
- Zhao MX, Chi Z, Chi ZM, Madzak C. 2013. The simultaneous production of single-cell protein and a recombinant antibacterial peptide by expression of an antibacterial peptide gene in *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 48(2): 212-217.
- Zinjarde SS. 2014. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry* 152: 1-10.