

## EDICIÓN DE *YARROWIA LIPOLYTICA* MEDIANTE GOLDEN GATE PARA LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*

David Torres<sup>1</sup>, Jorge Rodríguez<sup>1</sup>, Francisco Valero<sup>2</sup>, Georgina Sandoval<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Sede Guadalajara. Guadalajara, Jal. 44270. <sup>2</sup> Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental. Bellaterra, Barcelona. 08193. Email: [datorres\\_al@ciatej.edu.mx](mailto:datorres_al@ciatej.edu.mx), [gsandoval@ciatej.mx](mailto:gsandoval@ciatej.mx).

*Palabras clave:* *Yarrowia lipolytica*, CALB, Golden Gate.

**Introducción.** La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), proviene de una levadura aislada del lago Vanda en 1969, y es considerada como la lipasa perfecta debido a sus propiedades físicas y químicas que le permite llevar a cabo reacciones para la elaboración de biopolímeros, vitaminas, medicamentos y biocombustibles, entre otros productos (1). Esta enzima ha sido expresada recombinantemente en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) y comercialmente en *Aspergillus niger*, sin embargo, su producción en *Yarrowia lipolytica* inducible por eritritol ha sido prometedora y poco explorada en comparación con las factorías celulares antes mencionadas (2). Además, la inducción por eritritol es segura a escala industrial y evita el uso de inductores hidrofóbicos que dificultan la purificación de la enzima recombinante. Por otra parte, la metodología Golden Gate (GG) permite la edición genética rápida, eficiente y adaptable a diferentes tipos de cepas (3). Por ello, el objetivo fue transformar *Y. lipolytica* mediante GG para expresar CALB de forma inducible.

**Metodología.** El gen de CALB se optimizó para *Y. lipolytica*, y se diseñó el vector de expresión con el gen *hph* como marcador de resistencia a higromicina B, promotor inducible por eritritol, y terminador Lip2. El ensamblaje del vector de expresión se realizó mediante GG (4), a partir del GG toolkit de Addgene. El proceso de clonación se muestra en la Figura 1; se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  de acuerdo con Reyes *et al* (5), y en *Y. lipolytica* con el método del acetato de litio. Se elaboraron placas de YPG suplementadas con tributirina (1%) y eritritol (1%), y se realizó PCR para verificar la transformación de CALB en *Y. lipolytica*.



Fig. 1. Proceso de clonación de CALB en *Y. lipolytica*.

**Resultados.** El ensamble y clonación del vector fueron verificados mediante PCR, amplificando el gen de *calb* exitosamente. El marcador de resistencia permitió una adecuada selección, sin recurrir a modificaciones

adicionales para generar cepas auxotrófas (Figura 2, A). Las placas con eritritol y tributirina presentan halos de hidrólisis en las cepas transformadas a las 24 h, y no así en las silvestres (Figura 2, B).

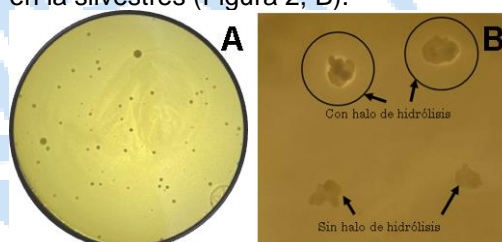


Fig. 2. Colonias de *Y. lipolytica* transformada con CALB en medio selectivo con higromicina B (A); y comparación de células transformadas y no transformadas de *Y. lipolytica* en placa con tributirina y eritritol a las 24 h (B); las células transformadas están encerradas en un círculo y presentan halo de hidrólisis.

**Conclusiones.** La metodología GG permitió la eficiente transformación de CALB inducible por eritritol en *Y. lipolytica*. Además, se mostró que las placas de YPG con tributirina y eritritol son óptimas para diferenciar visualmente las cepas transformadas de las silvestres mediante la formación de halo. Con base a lo reportado previamente y debido a la capacidad de secreción que tiene la propia levadura (2) se esperaba un mayor halo. Esto puede ser por las diferentes cepas y condiciones usadas, por lo que se tendrá que comprobar estas hipótesis. Posteriormente se realizará el cultivo en medio líquido y modificaciones genéticas que mejoren la producción de CALB.

**Agradecimiento.** A CONACYT por la beca doctoral con número de CVU 625756. Al LIBBA-BI-CIATEJ donde se realizó este trabajo.

### Bibliografía.

- Ortiz C., Ferreira M. L., Barbosa O., dos Santos J. C. S., Rodrigues R. C., Berenguer-Murcia Á., Briand L. E., & Fernandez-Lafuente R. (2019). *Science Technology*. Vol 9: 2380-2420.
- Theron C. W., Vandermies M., Telek S., Steels S., & Fickers P. (2020). *Scientific Reports*. Vol 10(1): 1741.
- Bird J. E., Marles-Wright J., & Giachino, A. (2022). *ACS Synthetic Biology*. Vol 11(11): 3551-3563.
- Larroude M., Park Y. K., Soudier P., Kubiak M., Nicaud J. M., & Rossignol T. (2019). *Microb Biotechnol*. Vol 12(6): 1249-1259.
- Reyes A. L., Valero F., & Sandoval G. (2023). *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 61: 61-68.