

**CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EDICIÓN GENETICA DE *Clavispora lusitaniae* UTILIZANDO EL SISTEMA CRISPR-Cas9**

Alejandro Lara-Meléndez<sup>1</sup>, Teresa Ponce-Noyola<sup>1</sup>, Ana Carmela Ramos-Valdivia<sup>1</sup>, Josefina Barrera Cortés<sup>1</sup>, María Lourdes Villa-Tanaca<sup>2</sup> y Luis M. Salgado Rodríguez<sup>3</sup> <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV Zacatenco CDMX CP 07360, <sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN CDMX CP 11350, <sup>3</sup> Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA), IPN, Unidad Querétaro CP 11500  
alejandro.lara@cinvestav.mx.

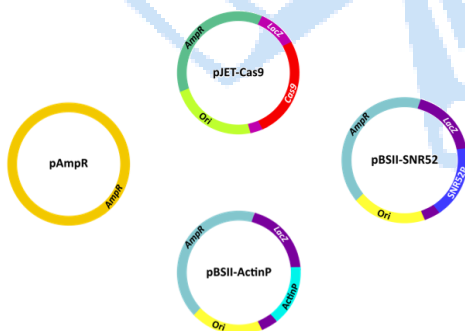
*Palabras clave: CRISPR/Cas9, Clavispora lusitaniae, biorrefinería.*

**Introducción.** *Clavispora lusitaniae* es una levadura ascomiceta que asimila celobiosa, hexosas y pentosas; tolera altas concentraciones de etanol y temperaturas de hasta 47°C, y produce etanol, xilitol, eritritol y glicerol entre otros metabolitos(1, 2). Sin embargo, se ve limitada por la eficiencia de utilización de sustratos como xilosa para producir etanol, co-asimilación de glucosa y xilosa para producir xilitol, eritritol y glicerol, inconveniente que se puede subsanar modificando el genoma de esta levadura enfocado en las rutas metabólicas de interés (3).

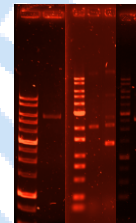
El objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema de edición genético en forma de plásmido editable, reusable y fácil de implementar en *C. lusitaniae*, para modificar a este organismo para su implementación en procesos de biorrefinería celulósica.

**Metodología.** Se diseñó *in silico* el mapa del plásmido con el sistema Cas9. Dicho sistema está optimizado para su expresión en el clado CTG. La obtención de los fragmentos se realizó por PCR, los cuales fueron clonados en vectores de transformación. Una vez clonados todos los fragmentos se realiza el ensamblaje por enzimas de restricción.

**Resultados.** Se cuenta con el armado de 4 plásmidos de clonación de los fragmentos que conformarán la construcción final.



**Fig 1.** Esquema de los plásmidos de clonación obtenidos.



**Fig 2.** Electroforesis de los plásmidos de clonación obtenidos. Cada uno cuenta con uno de los fragmentos que conformara el sistema de edición.

El patrón de restricción de cada plásmido muestra los fragmentos obtenidos del tamaño esperado.

**Conclusiones.** Los plásmidos construidos tienen los fragmentos del sistema de edición genética para *C. lusitaniae*.

**Agradecimiento.** A CONACyT por el otorgamiento de la beca de doctorado (CVU 933778).

**Bibliografía.**

- 1 Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., y De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcals fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 626-630.
- 2 Spindler, D. D., Wyman, C. E., Mohagheghi, A., y Grohmann, K. (1988). Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 17(1-3), 279-293.
- 3 Ochoa-Chacón, A., Ramos-Valdivia, A. C., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Martínez, A., & Ponce-Noyola, T. (2022). Fermentation performance of a Mexican native *Clavispora lusitaniae* strain for xylitol and ethanol production from xylose, glucose and cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*, 160.