

Engenharia metabólica de *Pichia pastoris* para produção de ácido glicérico

Talita G. S. Ramos^{1,2*}; Fernanda Justen^{1,2}; João R. M. Moreira².

Introdução

A produção de biodiesel aumentou consideravelmente no mundo, passando de 4 milhões de m³ para 19 milhões de m³ entre 2005 e 2010. Como a produção de biodiesel resulta na formação de glicerina bruta na proporção de 10:1 m³ a valoração desse coproduto é de importância para a economicidade da cadeia produtiva. Desta forma tem sido proposta a conversão da glicerina por rota microbiana a produtos químicos com maior valor agregado (ALMEIDA et al., 2012). A glicerina pode ser convertida a ácido glicérico, o qual pode ser utilizado em indústrias químicas, farmacêuticas e na produção de polímeros e surfactantes (HABE et al., 2009a). A produção de ácido glicérico se dá pela oxidação da glicerina por desidrogenases. Desidrogenases não são enzimas altamente específicas, podendo oxidar diferentes substratos (HABE et al., 2009b).

Neste trabalho, novas glicerol desidrogenases foram identificadas por análises filogenéticas e utilizadas para construir linhagens de *Pichia pastoris* capazes de produzir ácido glicérico.

Métodos

Genes codificantes de glicerol desidrogenase GDH foram identificados com base em análises filogenéticas de sequências disponíveis no banco de dados NCBI. Para tanto, sequências de enzimas previamente descritas foram utilizadas como padrão em alinhamentos na base de dados. Posteriormente, as sequências obtidas foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas, a partir das quais genes de interesse foram selecionadas para síntese. Os genes CC, AP e BS foram sintetizados e depois clonados no vetor de expressão pGAPZB, gerando os plasmídeos pGAP-CC, pGAP-AP, pGAP-BS. Cada um dos plasmídeos foi linearizado com a enzima de restrição *Pme I* e utilizado para transformar *P. pastoris* X-33. Transformantes positivos foram selecionados e a produção de ácido glicérico avaliada em fermentações contendo glicerol. O ácido glicérico produzido foi identificado e quantificado por cromatografia líquida.

1 Universidade de Brasília Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900;

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*talitagabrielasr@gmail.com; joao.almeida@embrapa.br

Resultados e Conclusões

Os genes de glicerol desidrogenase CC, AP e BS foram identificados por análises filogenéticas. Após síntese, três genes foram clonados no vetor de expressão pGAPZB para *P. pastoris*. Posteriormente, os plasmídeos com os genes de interesse foram transformados na levedura, gerando linhagens capazes de produzir ácido glicérico. Fermentações em condições aeróbicas demonstraram a eficiência das linhagens construídas de produzirem ácido glicérico.

Apoio Financeiro

CNPq ,CAPES e Embrapa Agroenergia

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 48, p. 1-16, 2012.

HABE, H.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; SAKAKI, K. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 3, p. 445–452, 2009a.

HABE, H.; SHIMADA, Y.; YAKUSHI, T.; HATTORI, H.; ANO, Y.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; ITAGAKI, M.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H.; MATSUSHITA, K.; SAKAKI, K. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 75, n. 24, p. 7760–7766, 2009b.