

Engenharia Metabólica de *Pichia pastoris* para Produção de Ácido Xilônico

Fernanda Justen^{1,2*}, Talita G. S. Ramos^{1,2}, João R. M. de Almeida²

Introdução

A crise energética e as pressões ambientais tem gerado interesse industrial pela biomassa lignocelulósica como fonte de matéria-prima renovável, devido às suas aplicações para a produção de combustíveis e produtos químicos (LI et al., 2015). A biomassa vegetal é composta de lignina, celulose e hemicelulose, e quando hidrolisada, pode liberar uma fração substancial de xilose. A xilose é uma pentose, principal componente da hemicelulose, podendo ser oxidada em ácido xilônico e convertida em etanol ou reduzida ao xilitol (TOIVIARI et al., 2013). Segundo Werpy e Petersen (2004) o ácido xilônico é um dos produtos químicos desejáveis de ser produzido a partir de açúcares. Ele pode ser utilizado na indústria como agente de complexação ou quelante, na agricultura, indústria alimentícia e produtos farmacêuticos. A conversão da xilose em ácido xilônico é realizada pela enzima xilose desidrogenase (XDH). Alguns microrganismos não conseguem utilizar a xilose como única fonte de carbono, sendo a levedura *Pichia pastoris* um desses (INAN et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo construir linhagens recombinantes de *P. pastoris* capazes de produzir ácido xilônico.

Métodos

A partir de um screening de sequências gênicas depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), possíveis genes codificantes para xilose desidrogenase (XDH) foram selecionados e sintetizados. Os genes nomeados *AM*, *CO*, *TM* foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xba* I e ligados ao vetor integrativo pGAPZ B previamente digerido com as mesmas enzimas. *Escherichia coli* XL10-Gold foi transformada e clones carregando os plasmídeos positivos pGAP-AM, pGAP-CO e pGAP-TM foram obtidos. Os plasmídeos foram linearizados com *Sac* II e posteriormente utilizados para transformar a linhagem X33 de *P. pastoris*. Os transformantes foram selecionados por resistência à ZeocinaTM e pela integração do gene via PCR.

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;

*fernanda.justen@colaborador.embrapa.br; joão.almeida@embrapa.br

Resultados e Conclusões

Os genes *AM*, *CO*, *TM* codificantes para XDH foram clonados no plasmídeo pGAPZB em *E. coli*, obtendo os plasmídeos recombinantes pGAPZ B-AM, pGAPZ B-CO e pGAPZ B-TM. A confirmação da construção destes plasmídeos recombinantes foi realizada empregando-se a digestão com as enzimas de restrição Eco RI e XbaI, resultando na liberação dos genes *AM*, *CO* e *TM* e linearização dos plasmídeos. Após a construção, os plasmídeos foram linearizados e transformados em *P. pastoris*. Linhagens expressando os genes *AM*, *CO*, *TM* foram selecionadas. Finalmente, as linhagens foram crescidas e a produção de ácido xilônico foi avaliada em cultivos de frascos. A produção de ácido xilônico foi positiva para uma linhagem obtida com rendimentos acima de 50% do máximo teórico.

Apoio Financeiro

Este trabalho é financiado pela Embrapa, CAPES, CNPq.

Referências

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOXI) promoter of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Malden, v. 92, n. 6, p. 585-589, 2001.

LI, P.; SUN, H. B.; CHEN, Z.; LI, Y.; ZHU, T. C. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 14, artigo 22, 2015.

TOIVARI, M.; VEHKOMAKI, M. L.; NYGARD, Y.; PENTTILA, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 133, p. 555-562, 2013.

WERPY, T.; PETERSEN, G. (Coord.). **Top value added chemicals from biomass: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. Oak Ridge: U.S. Department of Energy, 2004. 76 p.