

Otimização metabólica de *Komagataella phaffii* para síntese de etileno glicol a partir de fontes renováveis

Torres, N. A. M.^{1*}; Andrade, T. M. G.²; Carneiro, C. V. G.¹; Trichez, D.²; Reis, V. C. B.²; Almeida, J. R. M.²

¹Universidade de Brasília. ²Embrapa.

*E-mail do autor apresentador: nath.aline03@gmail.com

Resumo

O avanço da biotecnologia tem impulsionado a busca por alternativas sustentáveis à utilização de matérias-primas de origem fóssil. Nesse cenário, a biomassa lignocelulósica destaca-se como fonte promissora para a geração de compostos de valor científico, ambiental e econômico, com destaque para a produção de etileno glicol. Por suas propriedades físico-químicas atua como bloco construtor fundamental na indústria, sendo indispensável na síntese de polímeros, fibras de poliéster, resinas, plásticos e fluidos anticongelantes. Por meio da inserção da via de Dahms, composta pelas enzimas xilose desidrogenase (XDH), xilonato desidratase (XD) e aldolase (ALDO), em linhagens de *Komagataella phaffii* (Linhagem JA122), tornou-se possível metabolizar a xilose, açúcar abundante em hidrolisados de biomassa lignocelulósica, para obter esse importante composto industrial. No entanto, foi observado que essa linhagem também converte glicolaldeído (GA) em ácido glicólico (AG) por meio da ação de uma aldeído desidrogenase (ALDH) endógena. O objetivo do projeto é aumentar a eficiência de produção de EG em *K. phaffii* por meio de engenharia genética. Para isso foram identificados genes putativos que codificam aldeído desidrogenase (ALDH) para serem silenciados, além de superexpressar possíveis candidatas a aldeído redutases (ALDR). Para atingir os objetivos propostos, foram construídos cassetes de deleção baseados no sistema mazF para promover o silenciamento dos genes-alvo, e cassetes de superexpressão visando potencializar a atividade da aldeído redutase e, assim, aumentar a eficiência de produção das linhagens recombinantes. Além disso, será realizada mutagênese sítio-dirigida na enzima xilonato desidratase (XD), considerada um gargalo para o acúmulo de ácido xilônico, importante intermediário da via. Até o momento, três linhagens recombinantes com silenciamento de ALDH foram obtidas e avaliadas quanto aos níveis de produção de EG e AG em processos fermentativos. Essas linhagens não apresentaram diferença significativa em relação ao controle para a produção de EG, indicando que os genes testados provavelmente não estão envolvidos como ALDH no metabolismo deste composto. Quatro cassetes de superexpressão foram construídos e

estão prontos para serem transformados em *K. phaffii*. Além disso, já foram obtidos quatro amplicons contendo a mutação sítio-dirigida na enzima XD. Paralelamente, foi conduzido um processo fermentativo utilizando hidrolisado de biomassa para avaliar a produção de EG pelas leveduras modificadas. Fermentações em batelada alimentada, conduzidas em fermentador de bancada com aproximadamente 2 litros, sob temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm, demonstraram que, em meio com xilose, a produção alcançou 3,2 g/L, enquanto em hidrolisado atingiu 1,5 g/L, resultados superiores aos relatados para linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* reconhecidas na literatura

Palavras-chaves: Silenciamento gênico; Superexpressão enzimática; Mutagênese Dirigida; Hidrolisado.

Referências

Carneiro, C.V.G.C., Trichez, D., Bergmann, J.C., Reis, V.C.B., Wagner, N., Walther, T., Almeida, J.R.M. de, 2024. Engineering *Komagataella phaffii* for ethylene glycol production from xylose. *AMB Expr* 14, 131. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01795-0>

Dharmaraja, J.; Shobana, S.; Arvindnarayan, S.; Francis, R. R.; Jeyakumar, R. B.; Saratale, R. G.; Ashokkumar, V.; Bhatia, S. K.; Kumar, V.; Kumar, G. Lignocellulosic Biomass Conversion Via Greener Pretreatment Methods Towards Biorefinery Applications. *Bioresource Technology*, [S. L.], V. 369, P. 128328, 2023.

Jiao, J.; Wang, S.; Liang, M.; Zhang, Y.; Xu, X.; Zhang, W.; Liu, B. Basal Transcription Profiles Of The Rhamnose-Inducible Promoter *Plra3* And The Development Of Efficient *Plra3*-Based Systems For Markerless Gene Deletion And A Mutant Library In *Pichia Pastoris*. *Current Genetics*, [S. L.], V. 65, N. 3, P. 785–798, 2019.

Salusjärvi, L.; Havukainen, S.; Koivistoinen, O.; Toivari, M. Biotechnological Production Of Glycolic Acid And Ethylene Glycol: Current State And Perspectives. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [S. L.], V. 103, N. 6, P. 2525–2535, 2019.