UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

BRUNO NALIN

ELOISA LOPES LEONEL

FABIANE DE OLIVEIRA BARBAN

GABRIEL TUCHAPS KHATER

JULIANA DULCINI MARQUES

LEONARDO SENTANIN

PRODUÇÃO DE *Pfu* DNA POLIMERASE POR *Escherichia coli*

Araraquara

2025

BRUNO NALIN

ELOISA LOPES LEONEL

FABIANE DE OLIVEIRA BARBAN

GABRIEL TUCHAPS KHATER

JULIANA DULCINI MARQUES

LEONARDO SENTANIN

PRODUÇÃO DE *Pfu* DNA POLIMERASE POR *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profª. Drª. Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara

2025

P963 Produção de *Pfu* DNA Polimerase por *Escherichia coli* / Bruno Nalin ... [et al.]. – Araraquara, 2025.
87 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Cultivo. 2. Proteínas recombinantes. 3. *Pfu* DNA polimerase. 4. *Escherichia coli.* I. Nalin, Bruno. II. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

Esta ficha não pode ser modificada

BRUNO NALIN

ELOISA LOPES LEONEL

FABIANE DE OLIVEIRA BARBAN

GABRIEL TUCHAPS KHATER

JULIANA DULCINI MARQUES

LEONARDO SENTANIN

PRODUÇÃO DE *Pfu* DNA POLIMERASE POR *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 25/06/2025

Banca Examinadora:

_____

Profª. Drª. Danielle Biscaro Pedrolli
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

_____

Aluno de pós-graduação. Almiro Pires da Silva Neto
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

_____

Aluno de pós-graduação. Leonardo Ferro Tavares
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

RESUMO

A produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos revolucionou a biotecnologia ao viabilizar a obtenção de biomoléculas com alto grau de pureza, aplicáveis em diferentes áreas como diagnóstico, pesquisa e indústria. Entre essas proteínas, destaca-se a *Pfu* DNA Polimerase, enzima originária da arqueobactéria *Pyrococcus furiosus*, amplamente empregada em técnicas de biologia molecular pela sua elevada fidelidade na replicação do DNA. Neste trabalho, objetivou-se quantificar a enzima *Pfu* DNA Polimerase por meio de cultivo de *Escherichia coli*, avaliando parâmetros relacionados ao crescimento celular, consumo de substratos e concentração proteica. A metodologia adotada envolveu a indução da expressão gênica em meio de cultivo líquido, com coleta de amostras em diferentes tempos de incubação para monitoramento do processo. A quantificação das proteínas totais foi realizada por meio do método de Bradford, utilizando uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) e análise de regressão linear no software Microsoft Excel®. Ensaios em biorreator também foram conduzidos, com controle de pH, temperatura e aeração, além do acompanhamento do consumo de lactose e glicerol como fontes de carbono. Os resultados demonstraram crescimento celular adequado e consumo completo do glicerol, indicando sua viabilidade como fonte energética. A lactose, por sua vez, não foi metabolizada, sugerindo ter atuado exclusivamente como indutor. Contudo, a ausência da banda correspondente à enzima nas análises de SDS-PAGE indicou que não houve produção detectável da *Pfu* DNA Polimerase nas condições avaliadas. Tal resultado pode estar relacionado a falhas na indução, limitações nutricionais do meio, instabilidades no sistema de expressão, ou ainda a interferências técnicas durante as etapas de purificação e visualização por eletroforese.

Palavras-chave: cultivo; proteínas recombinantes; *Pfu* DNA Polimerase; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The production of recombinant proteins in microbial systems has revolutionized biotechnology by enabling the acquisition of biomolecules with a high degree of purity, applicable in various fields such as diagnostics, research, and industry. Among these proteins, *Pfu* DNA Polymerase stands out—a thermostable enzyme derived from the archaeon *Pyrococcus furiosus*, widely used in molecular biology techniques due to its high fidelity in DNA replication. This study aimed to quantify the *Pfu* DNA Polymerase enzyme through the cultivation of *Escherichia coli*, evaluating parameters related to cell growth, substrate consumption, and protein concentration. The adopted methodology involved the induction of gene expression in liquid culture medium, with sample collection at different incubation times to monitor the process. Total protein quantification was performed using the Bradford method, with a calibration curve based on bovine serum albumin (BSA) and linear regression analysis conducted in Microsoft Excel®. Bioreactor assays were also carried out under controlled pH, temperature, and aeration, along with monitoring the consumption of lactose and glycerol as carbon sources. The results demonstrated proper cell growth and complete consumption of glycerol, indicating its viability as an energy source. Lactose, on the other hand, was not metabolized, suggesting it acted solely as an inducer. However, the absence of a band corresponding to the enzyme in SDS-PAGE analyses indicated no detectable production of *Pfu* DNA Polymerase under the evaluated conditions. This result may be related to induction failures, nutritional limitations of the medium, instabilities in the expression system, or technical interferences during the purification and electrophoresis visualization steps.

Keywords: cultivation; recombinant protein; *Pfu* DNA Polymerase; *Escherichia coli.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupo de células *E. coli.* 12

Figura 2 – Funcionamento do Operon Lac e os genes que o compõe. 15

Figura 3 – Metabolismo do Glicerol ao entrar nas células de *E. coli.* 16

Figura 4 – Representação molecular das interações entre a tag de afinidade poli-histidina e duas matrizes de cromatografia por metais imobilizados. 19

Figura 5 – Curva de calibração de proteínas totais pelo método de Bradford. 32

Figura 6 – Curva de crescimento celular em meio Mínimo durante 24 horas. 39

Figura 7 – Análise da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por SDS-PAGE no meio Mínimo com diferentes momentos de indução. 41

Figura 8 – Análise da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por SDS-PAGE no meio LB, com indução no início do cultivo em DO_{600} 0,4. 42

Figura 9 – Análise da produção da enzima Pfu DNA Polimerase por SDS-PAGE. 43

Figura 10 – Crescimento microbiano no cultivo em reator. 47

Figura 11 – Visualização da liberação proteica em SDS-PAGE após lise ultrassônica de *E. coli.* 53

Figura 12 – Cromatograma da purificação da diluição do volume de 5 µL. 55

Figura 13 – Cromatograma da purificação da diluição do volume de 25 µL. 55

Figura 14– Cromatograma da purificação da diluição do volume de 50 µL. 56

Figura 15 – Cromatograma da purificação da protease nsP2pro do vírus Chikungunya usando cromatografia de exclusão por tamanho e gel de SDS-PAGE com a protease purificada. 57

Figura 16 – SDS-PAGE das frações obtidas na purificação da *Pfu* DNA Polimerase. 59

Figura 17 – SDS-PAGE das frações obtidas na etapa de purificação da *Pfu* DNA Polimerase. 60

Figura 18 – Análise por SDS-PAGE da purificação da *Pfu* DNA Polimerase. 62

Figura 19 – Avaliação da atividade enzimática da *Pfu* DNA Polimerase purificada por PCR. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de concentração média de proteínas totais para os cultivos induzidos no início e com DO_{600} de 0,1 de crescimento celular. 44

Tabela 2 – Concentração de lactose (g/L) no cultivo em escala de bancada determinado por HPLC. 46

Tabela 3 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do sobrenadante do reator determinado por HPLC. 49

Tabela 4 – Concentração de proteínas totais para variação da razão massa de células:volume de tampão com 4 ciclos no sonicador. 50

Tabela 5 – Concentração de proteínas totais usando a razão 0,1g:1mL e variando o número de ciclos no sonicador. 50

Tabela 6 – Resultados da concentração de DQO obtida para o sobrenadante do reator. 65

Tabela 7 – Dados do crescimento microbiano (DO_{600}) do cultivo em escala de bancada. 77

Tabela 8 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do cultivo em escala de bancada determinado por HPLC. 77

Tabela 9 – Dados de proteínas totais pelo método de Bradford do cultivo em escala de bancada. 78

Tabela 10 – Dados do crescimento microbiano (DO_{600}) do cultivo em reator. 78

Tabela 11 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do sobrenadante do reator determinado por HPLC. 79

Tabela 12 – Valores de absorbância obtidos pelo método de Bradford para a variação da razão massa de células:volume de tampão para as amostras de 24h do reator. 79

Tabela 13 – Valores de absorbância obtidos pelo método de Bradford para a variação do número de ciclos no sonicador com a razão 0,1g:mL para as amostras de 24h do reator. 80

Tabela 14 – Estimativa da concentração e média de DQO obtidas por absorbância do sobrenadante. 80

Tabela 15 – Correlação da absorbância em 600 nm com espectrofotômetro e leitora de microplacas. 82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 ASPECTOS GERAIS: *ESCHERICHIA COLI* 12
2.2 METABOLISMO DE *E. COLI* E SEU COMPORTAMENTO EM MEIO MÍNIMO 13
2.2.1 OPERON LAC 14
2.3 DNA POLIMERASE 17
2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 18
2.5 ANÁLISE E VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS - ELETROFORESE 21
2.6 ESCALONAMENTO DE BIOPROCESSO 23
2.7 TRATAMENTO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS 25
3 OBJETIVOS 29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29
4 MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1 CULTIVO EM ESCALA DE BANCADA 30
4.2 CULTIVO EM BIORREATOR 31
4.3 CURVA DE BSA PELO MÉTODO DE BRADFORD E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS 32
4.4 ROMPIMENTO CELULAR 34
4.5 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE 35
4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA 36
4.7 ANÁLISES EM HPLC 37
4.8 TRATAMENTO E EMBASAMENTO TEÓRICO PARA REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS 38
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1 CULTIVO EM ESCALA DE BANCADA 41
5.1.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR DE *E. COLI* 41

5.1.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE *PFU* DNA POLIMERASE 42
5.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....46
5.1.4 ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL E LACTOSE EM HPLC.....46
5.2 CULTIVO EM BIORREATOR 49
5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ROMPIMENTO CELULAR.....52
5.4 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....56
5.5 TRATAMENTO E ESTUDO DE REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS 65
6 CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS.....70
APÊNDICE A – CURVA BSA PELO MÉTODO DE BRADFORD 78
APÊNDICE B – DADOS BRUTOS 80
APÊNDICE C – CÁLCULOS 84

1 INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes em bioprocessos revolucionou a bioquímica e a biotecnologia, proporcionando meios mais eficientes e escaláveis de obtenção de biomoléculas com alto grau de pureza. Com essa tecnologia, tornou-se possível substituir métodos tradicionais que exigiam a extração de proteínas a partir de grandes quantidades de tecidos animais ou vegetais, ou de fluidos biológicos complexos (Zhou *et al*., 2011). Atualmente, a obtenção de proteínas recombinantes é a principal estratégia considerada por pesquisadores que necessitam de proteínas purificadas, dada a sua versatilidade e aplicabilidade em processos industriais, diagnósticos, pesquisas estruturais e desenvolvimento de produtos comerciais (Walsh, 2018).

Para a produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos algumas técnicas de engenharia genética são utilizadas envolvendo a clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão, sua inserção em um hospedeiro apropriado, indução (quando necessário) e posterior purificação. Nesse processo, diversos fatores podem comprometer a eficiência do sistema. Entre os principais desafios estão o baixo crescimento celular, a formação de corpos de inclusão, a inatividade da proteína e a ausência de expressão detectável (Nag *et al*., 2022).

Entre os exemplos mais relevantes de proteínas recombinantes produzidas em sistemas bacterianos, destacam-se as enzimas utilizadas em biologia molecular, como as DNA polimerases termofílicas. Essas enzimas, originalmente isoladas de organismos extremófilos, são amplamente empregadas em reações de PCR devido à sua estabilidade térmica e fidelidade na replicação do DNA (Cline; Braman; Hogrefe, 1996). A produção dessas enzimas em bactérias como *Escherichia coli* permite sua obtenção em larga escala e com alto grau de pureza, sendo essencial para aplicações laboratoriais e industriais (Ventura; Villaverde, 2006).

No campo da biotecnologia, destaca-se a polimerase *Pfu*, derivada da arqueobactéria hipertermofílica *Pyrococcus furiosus*. Essa enzima tem atividade exonucleásica 3′–5′, que lhe confere capacidade de correção de erros durante a síntese de DNA (Zheng *et al*., 2016). A enzina possui uma taxa de erro extremamente baixa ($1{,}3 \times 10^{-6}$ erros/bp por duplicação) em comparação a outras polimerases (Cline;

Braman; Hogrefe, 1996). Tendo em vista essas características, a *Pfu* é amplamente utilizada em reações de PCR que requerem amplificação precisa, como na clonagem molecular, mutagênese dirigida e sequenciamento de DNA (Prakash *et al*., 2005).

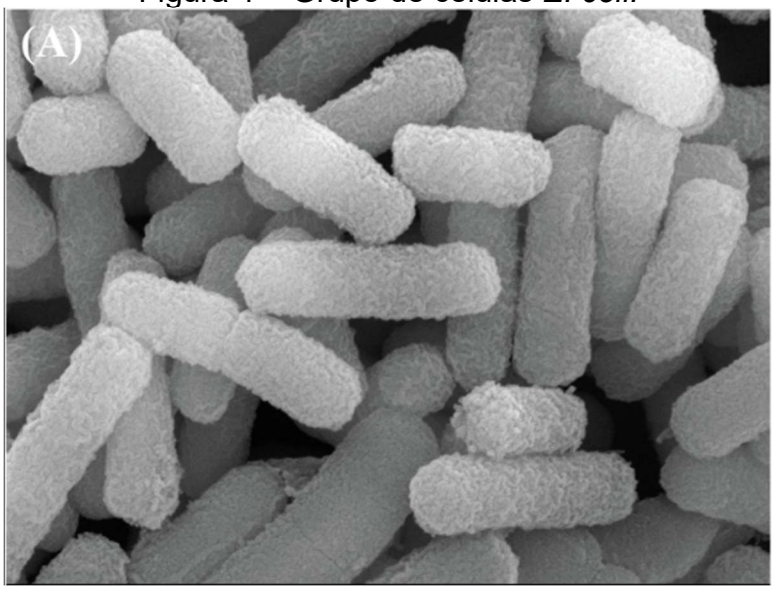
A expressão recombinante da enzima *Pfu* DNA Polimerase em *Escherichia coli* constitui uma alternativa viável e eficiente para sua produção em larga escala, sendo amplamente explorada em estudos que visam otimizar as condições de cultivo, indução e purificação, com o objetivo de preservar sua atividade catalítica e estabilidade estrutural (Zheng *et al*., 2016). No estudo de Zheng *et al*. (2016), a enzima *Pfu* foi expressa com sucesso e purificada por cromatografia de afinidade, apresentando atividade específica de 31.292 U/mg e 29.751 U/mg, por meio de eluição com gradiente contínuo e eluição isocrática, respectivamente. Complementarmente, Nuryana *et al*. (2023) realizaram a otimização de códons do gene da *Pfu* para expressão em *E. coli*, alcançando a produção de uma enzima funcional, termoestável e com rendimento satisfatório, também por purificação com cromatografia de afinidade. Esses resultados reforçam a viabilidade e a eficácia da produção da *Pfu* DNA Polimerase em sistemas heterólogos, especialmente em contextos que exigem enzimas de alta fidelidade para aplicações como PCR, clonagem molecular e mutagênese dirigida. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo a produção e quantificação da enzima *Pfu* DNA Polimerase em cultivo microbiano, contribuindo para o aprimoramento de protocolos de expressão e purificação de proteínas recombinantes com potencial biotecnológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS: *Escherichia coli*

A *Escherichia coli (E. coli)* pertence à família *Enterobacteriaceae* e ao filo *Proteobacteria*, é gram-negativa, com formato de bastonete (Figura 1) e aeróbia facultativa. É a espécie de microrganismo mais conhecida e mais estudada atualmente, estando presente de forma natural em humanos e animais de sangue quente, auxiliando na homeostase intestinal e síntese de vitaminas. Entretanto, algumas cepas adquirem fatores de virulência, se tornando altamente patogênicas, podendo causar infecções no trato urinário, intestinal e meningites (Souza *et al.,* 2016).

Figura 1 – Grupo de células *E. coli.*



Fonte: Xiang *et al*. (2019).
Legenda: Imagem obtida através de microscopia eletrônica de varredura.

Apesar de microrganismo modelo e apresentar diversas vantagens, o genoma da *E. coli* é altamente mutável e adaptável a mudanças, repleto de transposons, plasmídeos adquiridos ou partes de bacteriófagos que podem transmitir fatores de virulência à bactéria, tornando-a patogênica (Coura *et al.,* 2014). Além disso, em seres humanos e animais imunossuprimidos, a presença da *E. coli* no intestino pode causar

diarreia e desconfortos pois o microrganismo, ao se aderir na mucosa intestinal, libera toxinas causando modificações na célula e dano ao tecido (Vasconcelos *et al.,* 2010).

E. coli também é estudada para aplicações em biorremediações para tratamento de efluentes, sendo capaz de degradar compostos como hidrocarbonetos e metais pesados e colaborando para maior controle ambiental (Singh, 2011).

2.2 METABOLISMO DE *E. coli* E SEU COMPORTAMENTO EM MEIO MÍNIMO

O metabolismo central da *E. coli* é baseado em rotas metabólicas conhecidas como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a via das pentoses. Essa diversidade metabólica permite que a bactéria utilize diferentes fontes de carbono e energia (Glicose, Glicerol, Frutose, etc.), além de sintetizar a maioria dos compostos necessários para seu crescimento celular, como aminoácidos, nucleotídeos e lipídios (Madigan *et al.,* 2016).

Para manutenção e sobrevivência, as células precisam de macronutrientes como Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Hidrogênio e micronutrientes como Potássio, Magnésio, Ferro, Cálcio e entre outros elementos a depender da necessidade metabólica do microrganismo. Todos esses nutrientes devem ser ofertados no ambiente em que estão para manutenção do seu metabolismo. Os meios de cultivo em laboratórios desempenham esse papel, e podem ser divididos em meios complexos ou definidos. Os meios complexos (Luria Bertani, por exemplo) levam esse nome pois os componentes presentes não podem ser mensurados uma vez que possuem em sua composição extratos de levedura, de carne e soja. Muitas das vezes os meios complexos são os mais utilizados devido a sua facilidade no preparo e o ótimo desempenho de crescimento dos microrganismos cultivados. Entretanto, quando se pretende expressar uma via sintética específica, o uso de meio definido, isto é, aqueles nos quais se sabe a composição exata, pode ser mais vantajoso (Madigan *et al.,* 2016)

No meio definido, são ofertados apenas os nutrientes essenciais: Carbono, sais e Nitrogênio. Dessa maneira, a célula é obrigada a ativar rotas biossintéticas completas para a sintetizar vitaminas, aminoácidos e cofatores a partir do zero. Apesar de se observar um crescimento mais lento nesse tipo de meio de cultivo, em estudos

onde se deseja o maior controle de expressão gênica e uso dos metabólitos com precisão, o cultivo em meio definido ou meio mínimo, se torna vantajoso (Madigan *et al.,* 2016). O uso da *Escherichia coli* nessas situações também é extremamente oportuno já que é um microrganismo capaz de sintetizar todos os nutrientes necessários através de compostos simples derivados dos produtos e subprodutos do seu metabolismo central (Tortora, 2017).

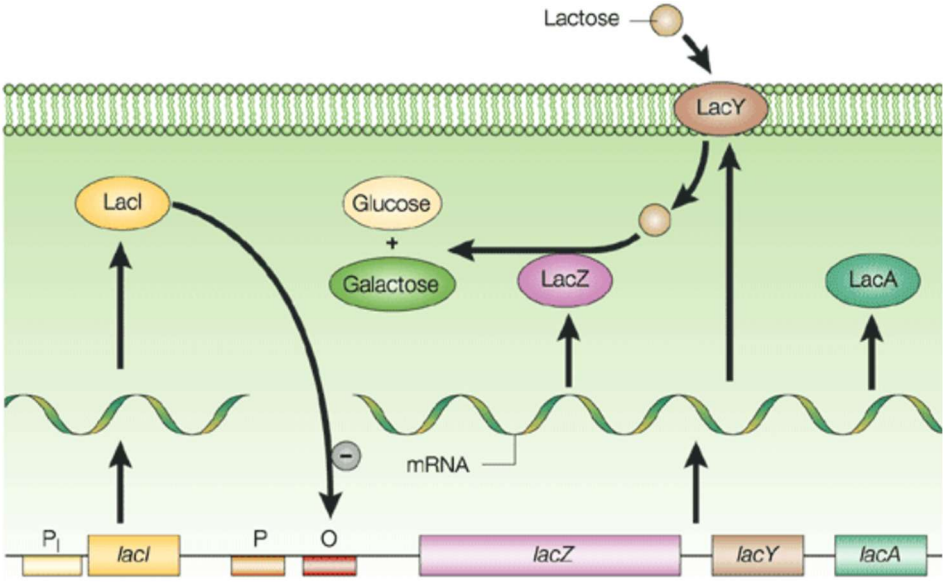
2.2.1 OPERON LAC

Apesar da fonte de carbono mais utilizada ser a Glicose, em experimentos nos quais se deseja a expressão de um gene regulado por um Operon Lac, o uso dessa fonte de carbono torna-se inviável. Esse operon está presente naturalmente no genoma da *E. coli*, mas também é muito utilizado na biologia sintética foi adaptado para regulação de expressão de genes heterólogos (Kopp, 2017).

O Operon Lac é composto por três genes: *lacZ*, *lacY* e *lacA* responsáveis por codificar β-galactosidase, permease de lactose e a transacetilase, respectivamente. Além disso, esse sistema possui três elementos regulatórios: o gene *lacI* que codifica uma proteína repressora (*Lac*I), o promotor onde a RNA polimerase se liga para iniciar a transcrição e o operador, onde a *Lac*I se liga para reprimir a ação da RNA polimerase (Figura 2). A regulação do operon lac é baseada em um sistema de ligação e liberação do repressor. Na ausência de lactose, o repressor *Lac*I se liga ao operador, impedindo a transcrição dos genes e na presença de lactose, esta é convertida em alolactose, que atua como indutor, ligando-se ao repressor *Lac*I e provocando uma mudança conformacional que impede sua ligação ao DNA. Isso libera o operador, permitindo que a RNA polimerase transcreva os genes do operon (Madigan *et al.,* 2016).

Além disso, a regulação é influenciada pela repressão catabólica, na qual a presença de glicose inibe a ativação completa do operon, mesmo na presença de lactose. Isso ocorre por meio do sistema CRP-cAMP, onde, em níveis baixos de glicose, o cAMP se acumula e se liga ao CRP (proteína reguladora do catabolismo), formando um complexo ativador que se liga ao promotor do operon lac e estimula a transcrição (Madigan *et al.,* 2016).

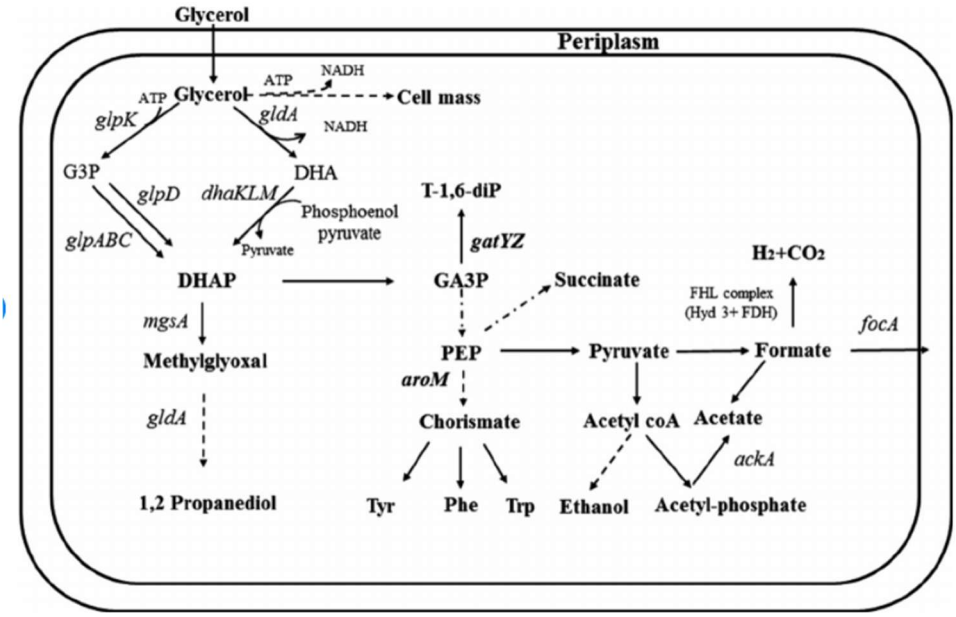
Figura 2 – Funcionamento do Operon Lac e os genes que o compõe.



Fonte: Howard (2014).
Legenda: Sistema regulatório do Operon Lac. Onde *lacZ, lacY* e *lacA* são os genes que o compõe; LacZ, LacY e Lac as proteínas codificadas por esses genes*; lacI*, P (promotor) e O (operador) são acessórios regulatórios responsáveis por ativar ou não o circuito de acordo com a presença de lactose ou glicose.

Dessa forma, uma fonte alternativa de carbono muito utilizada em situações como essa é o glicerol. De maneira equivalente (Figura 3), o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato e depois em dihidroxiacetona fosfato (DHAP), intermediário da glicólise, permitindo sua integração eficiente ao metabolismo energético para geração de energia na célula (Tran, 2015).

Figura 3 – Metabolismo do Glicerol ao entrar nas células de *E. coli.*



Fonte: Tran (2015).

Legenda: O glicerol é transportado para o interior da célula e convertido em diferentes intermediários metabólicos, como G3P (gliceraldeído-3-fosfato) e DHAP (dihidroxiacetona-fosfato), através das ações das enzimas GlpK, GlpD e GldA. Esses intermediários seguem para diferentes rotas fermentativas que levam à produção de metabólitos como 1,2-propanodiol, succinato, formiato, etanol e acetato. A formação de formiato a partir de piruvato é catalisada pelo complexo FHL (formiato-hidrogeno-liase), resultando na liberação de H_2 e CO_2. A figura também destaca a rota de síntese de aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe, Trp) a partir do PEP via corismato. As linhas contínuas indicam fluxos principais, enquanto as linhas tracejadas representam vias alternativas ou conversões secundárias.

O uso do glicerol como fonte de carbono, além de evitar a repressão catabólica, é vantajoso em outros âmbitos. É comum que em cultivos com *E. coli* haja a acidificação do meio devido a subprodutos ácidos liberados, mas quando se usa o glicerol, há menor liberação desses subprodutos, o que permite maior controle do pH e manutenção da viabilidade celular por períodos mais longos. Além disso, o crescimento é feito de forma mais lenta, o que pode auxiliar em processos que exigem maior controle da fase exponencial e indução gênica, não se tornando uma desvantagem (Terol, 2019). Por fim, o glicerol é uma fonte de carbono abundante e de baixo custo, que pode ser obtida como subproduto de outros processos como da produção de biodiesel, tornando seu uso vantajoso em termos de custo e de efetividade (Kopp, 2017).

2.3 DNA POLIMERASE

A DNA polimerase é um grupo de enzimas responsáveis por acrescentar novos nucleotídeos complementares em sequência de carbono 5’ para 3’, em um processo de síntese de novas cadeias de DNA complementares a partir de uma fita molde, processo chamado de replicação. (Hadi *et al.*, 2024 apud Din *et al*., 2020; Bu *et al*., 2005). Alguns tipos de DNA polimerases possuem atividade 3’ para 5’ exonuclease, que é a capacidade de corrigir erros durante a replicação ou reparo do DNA, agindo como um mecanismo de revisão ou proofreading (Farooq *et al*., 2024).

Dois tipos de DNA polimerases possuem interesses industriais e acadêmicos: a *Taq* DNA Polimerase e *Pfu* DNA Polimerase. A *Taq* polimerase proveniente do organismo *Thermus aquaticus* e a *Pfu* polimerase, proveniente do organismo hipertermófilo *Pyrococcus furiosus*. (Hadi *et al.*, 2024). A primeira, apesar de conseguir a amplificação do DNA, possui algumas desvantagens como menor termoestabilidade e sua incapacidade de corrigir erros por meio da falta da ação exonuclease. Além disso, a *Taq* DNA Polimerase é um único polipeptídeo com a massa molecular de 94 kDa (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010). Por sua vez, a *Pfu* DNA Polimerase é uma enzima que possui massa molecular de 90 kDa (Hu; Wang; Liu, 2015) e que possui maior interesse em técnicas de sequenciamento, clonagem e PCR de alta fidelidade por sua maior termoestabilidade, alta fidelidade e capacidade de correção de erros pela exonuclease 3' para 5'. (Farooq *et al*., 2024).

A DNA polimerase, em especial a *Pfu* DNA Polimerase, desempenha um papel fundamental em diversas aplicações da biotecnologia moderna. Ela é muito utilizada em reações de PCR de alta precisão, clonagem gênica, análise de genomas microbianos, metagenômica ambiental e diagnósticos clínicos. A capacidade de amplificar sequências de DNA com baixíssima taxa de erro torna a *Pfu* DNA Polimerase uma ferramenta muito importante para a criação de construções genéticas precisas e para o estudo de adaptações microbianas em ambientes extremos. Além disso, seu uso em microbiologia diagnóstica permite a detecção precisa de mutações e genes de resistência em patógenos e na amplificação do DNA de microrganismos, sendo um avanço no monitoramento e controle de doenças infecciosas e reduzindo

consideravelmente a probabilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos (Farooq *et al*., 2024).

A *Pfu* DNA polimerase apresenta uma taxa de erro extremamente baixa ($1{,}3 \times 10^{-6}$ erros/bp por duplicação) em comparação a outras polimerases comuns (Cline; Braman; Hogrefe, 1996). Desse modo, durante a pandemia de COVID-19, a utilização de DNA polimerases termoestáveis com alta especificidade foi de extrema importância para a realização de testes de RT-qPCR, garantindo diagnósticos confiáveis.

2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os processos de purificação de proteínas recombinantes são amplamente empregados em diversas áreas da biotecnologia, com destaque para a produção de enzimas, como a *Pfu* DNA polimerase. Essa etapa produção exige um rigoroso controle de qualidade, a fim de garantir a pureza e a segurança do produto final (Farooq, *et al*., 2024).

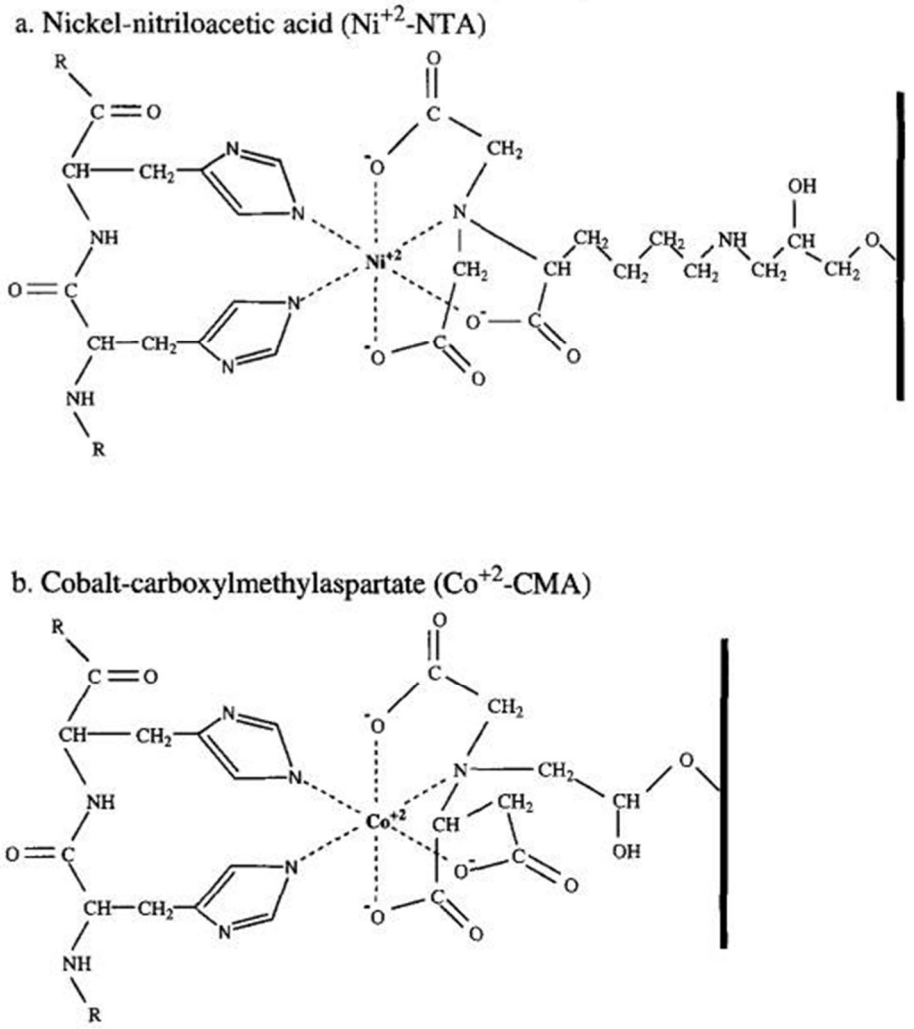
Para aumentar a eficiência e a seletividade da purificação, é comum a utilização de marcadores de afinidade peptídica, inseridos na extremidade N- ou C- terminal da proteína de interesse. Tais marcadores possibilitam a purificação por cromatografia de afinidade, em especial por meio da técnica conhecida como IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (Bresolin; Miranda; Bueno, 2009).

A IMAC baseia-se na afinidade de certos resíduos de aminoácidos, como a histidina, por íons metálicos de transição imobilizados em uma matriz cromatográfica. Esses metais, como Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, interagem com os grupos doadores de elétrons presente no anel imidazol da histidina, formando ligações coordenadas. Dessa forma, proteínas contendo sequência His-tag (poli-histidina) são seletivamente retidas na matriz (Bresolin; Miranda; Bueno, 2009).

Conforme ilustrado na Figura 4, os complexos metálicos imobilizados empregados na IMAC, como Ni^{2+}-NTA e Co^{2+}-CMA, apresentam estruturas coordenadas com ligantes que garantem estabilidade e especificidade na fixação da proteína com a histidina expostas na matriz. O níquel, é o mais utilizado devido a sua

forte afinidade com cadeias His-tag, no entanto, o cobalto pode apresentar maior especificidade, mesmo com menor capacidade de ligação (Bornhorst; Falke, 2000).

Figura 4 – Representação molecular das interações entre a tag de afinidade poli-histidina e duas matrizes de cromatografia por metais imobilizados.



Fonte: Bornhorst; Falke (2000).

Legenda: Modelos da interação entre a tag de polihistidina e duas matrizes de cromatografia de afinidade por metal imobilizado: (a) matriz Ni2+-NTA e (b) matriz Co2+-CMA. Em ambos, os íons metálicos formam ligações com a matriz e com dois resíduos de histidina da tag.

Após a retenção, a eluidas das proteínas da coluna é realizada com tampões contendo imidazol, que competem com os resíduos de histidina pelos sítios de ligação do metal, promovendo a liberação seletiva da proteína de interesse (Bornhorst; Falke, 2000).

Apesar da ampla utilização da IMAC, devido a sua grande especificidade e simplicidade na purificação de proteínas marcadas com His-tag, outras técnicas cromatográficas podem ser empregadas de forma complementar ou alternativa, dependendo das características físico-químicas da proteína de interesse. A cromatografia por troca iônica, do inglês *Ion Exchange Chromatography* (IEX), possibilita a separação com base na carga superficial das proteínas, sendo útil em casos de baixa afinidade metálica. Essa técnica consiste na interação eletrostática reversível entre os grupos carregados da superfície da proteína e os grupos funcionais de carga oposta presente na matriz da coluna. A afinidade de ligação se deve pelo ponto isoelétrico (pI) da proteína e do pH do tampão utilizado. Após a ligação, a eluição é realizada por meio de um gradiente de força iônica, por exemplo aumentando a concentração de sais como o NaCl, que competem pelos sítios de ligação, promovendo a liberação seletiva das proteínas de diferentes cargas (Castro *et al.*, 2021).

Já a cromatografia por exclusão molecular, do inglês *Size Exclusion Chromatography* (SEC), promove a separação de moléculas de acordo com seu tamanho hidrodinâmico em solução, ou seja, seu raio efetivo. A separação ocorre por meio da interação das moléculas com a estrutura porosa da resina da coluna. A etapa de eluição segue uma ordem, na qual as moléculas com maior peso molecular eluem primeiro, devido a sua exclusão aos poros, enquanto moléculas menores, são eluidas posteriormente, devido ao acesso aos poros da resina. Essa técnica é comumente utilizada para remover agregados ou contaminantes, contribuindo para homogeneidade da amostra purificada (Brusotti *et al.,* 2018).

A automação desses processos tem sido viabilizada por sistemas como o *AKTA*, desenvolvido pela *Cytiva*, anteriormente conhecida como *GE healthcare Life Sciences*, é comumente utilizado para otimizar, controlar e aumentar a reprodutividade na purificação de proteínas. Isso se deve pela detalhada programação de gradientes de eluição, monitoramento contínuo por detectores UV e coleta automática de frações (Rajendar, *et al.*, 2022). O *software UNICORN*, integrado no sistema *AKTA*, oferece uma interfase gráfica que facilita a padronização dos métodos cromatográficos, como IMAC, IEX ou SEC. Essa integração ajuda os usuários no desenvolvimento e escalonamento do processo (Hollander *et al*., 2021).

Na produção de *Pfu* DNA Polimerase em *Escherichia coli*, a combinação da cromatografia por IMAC com a automação oferecida pelo *AKTA*, representa uma estratégia eficiente, capaz de alcançar até 95% de pureza. Contudo, sua eficácia pode ser limitante quando a amostra apresenta baixas concentrações de proteínas marcadas. Nesses casos, pode ser necessário empregar estratégias complementares, como o uso de diferentes marcadores de afinidade ou a combinação da His-tag com técnicas cromatográficas complementares, como por exemplo a troca iônica ou exclusão por tamanho (Bornhorst; Falke, 2000).

2.5 ANÁLISE E VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS - ELETROFORESE

A análise de proteínas é uma etapa crucial em diversas áreas das ciências biológicas, como bioquímica, biologia molecular e biotecnologia. Entre os métodos mais utilizados para essa finalidade, destaca-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), uma técnica consolidada para a separação de proteínas com base em seu peso molecular aparente (Laemmli, 1970; Walker, 2009).

De maneira geral, a eletroforese é um processo que permite a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos, sob a ação de um campo elétrico. No caso das proteínas, a migração por um gel pode ser influenciada por sua forma tridimensional, carga elétrica e tamanho. Para minimizar essas variáveis e garantir que a separação ocorra com base apenas no peso molecular, é utilizado o SDS, um detergente aniônico que desnatura as proteínas e as envolve com cargas negativas uniformes, eliminando as diferenças naturais de carga entre elas (Sambrook; Russel, 2001).

O SDS interage com as proteínas em uma proporção média de 1,4 gramas de SDS por grama de proteína, conferindo uma razão constante de carga por massa. Com isso, a velocidade de migração das proteínas no gel torna-se proporcional ao logaritmo do seu peso molecular, o que permite a estimativa do tamanho das proteínas

por comparação com marcadores moleculares previamente conhecidos (Rath *et al*., 2009).

O gel utilizado na SDS-PAGE é composto por uma rede tridimensional de poliacrilamida, formada pela copolimerização de acrilamida com bisacrilamida. A densidade dessa matriz influencia o tamanho dos poros, sendo ajustada conforme a faixa de peso molecular das proteínas analisadas. Géis com concentrações entre 10% e 15% de acrilamida são adequados para separar proteínas na faixa de 10 a 100 kDa (Hames, 1998).

O método foi sistematizado por Laemmli (1970), que introduziu o uso padronizado de SDS e tampões específicos, tornando a técnica altamente reprodutível e amplamente adotada em laboratórios ao redor do mundo. Desde então, a SDS-PAGE passou a ser uma ferramenta essencial em rotinas experimentais, sendo aplicada em análises de expressão gênica, estudos de purificação proteica e processos de controle de qualidade na indústria biotecnológica (Walker, 2009).

Após a corrida eletroforética, as proteínas separadas no gel são reveladas por meio de técnicas de coloração. A coloração com azul de *Coomassie* é a mais comumente empregada por ser simples e apresentar bom contraste. Para aplicações que exigem maior sensibilidade, utiliza-se a coloração por prata, capaz de detectar quantidades ínfimas de proteína, embora envolva procedimentos mais complexos (Chevallet; Luche; Rabilloud, 2006).

A SDS-PAGE é amplamente empregada em múltiplos contextos: desde a confirmação da expressão de proteínas recombinantes, avaliação de pureza e determinação de massa molecular até a detecção de modificações pós-traducionais. Contudo, por ser realizada em condições desnaturantes, essa técnica não fornece informações sobre a estrutura nativa ou atividade funcional das proteínas. Além disso, a sensibilidade da detecção depende diretamente do método de coloração utilizado (Chevallet; Luche; Rabilloud, 2006).

Além da SDS-PAGE, outras técnicas de eletroforese têm aplicações relevantes. A eletroforese nativa (native PAGE), por exemplo, é realizada sem a presença de agentes desnaturantes, permitindo a separação de proteínas em seu estado funcional. Essa técnica mantém a estrutura terciária e as interações entre subunidades, sendo

útil para a análise de complexos proteicos, oligomerização e atividade enzimática (Hames, 1998).

Outro método é a eletroforese em gel de agarose, amplamente empregada na separação de ácidos nucleicos, como DNA e RNA, devido à sua matriz menos densa e porosa (Sambrook; Russell, 2001).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) representa um avanço em resolução, combinando duas etapas distintas de separação: a primeira baseada no ponto isoelétrico das proteínas (*isoelectric focusing*, ou IEF), e a segunda por SDS-PAGE, separando as proteínas pelo peso molecular. Essa abordagem permite uma análise proteômica mais abrangente, com a visualização de centenas de proteínas simultaneamente em uma única corrida (Rabilloud *et al*., 2010).

Além disso, a eletroforese capilar é uma técnica moderna que emprega capilares de sílica preenchidos com tampões, onde a separação ocorre sob alta voltagem. Essa técnica oferece alta resolução, baixo consumo de amostra e é amplamente utilizada em análises automatizadas e quantitativas (Walker, 2009).

Cada tipo de eletroforese apresenta vantagens e limitações, sendo escolhido conforme o objetivo experimental. A SDS-PAGE, por sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade, continua sendo uma das técnicas mais empregadas, especialmente para análise de pureza, expressão de proteínas recombinantes e verificação de tamanho aparente de proteínas desnaturadas (Walker, 2009).

2.6 ESCALONAMENTO DE BIOPROCESSO

O aumento de escala (*scale-up*) de processos biotecnológicos é uma etapa crítica no desenvolvimento de bioprocessos, pois envolve a transição de cultivos em escala de bancada (como frascos agitados ou biorreatores de bancada) para volumes maiores em biorreatores piloto ou industriais. Esse processo visa manter a produtividade e a qualidade do produto obtido em escala de bancada, enfrentando desafios relacionados à transferência de massa, homogeneidade do meio, controle de parâmetros operacionais e comportamento fisiológico dos microrganismos (de Mello *et al*., 2023).

A principal dificuldade do aumento de escala é preservar o desempenho observado nos cultivos em bancada, onde há maior controle e homogeneidade do sistema. Ao ampliar o volume, surgem gradientes de concentração de oxigênio, nutrientes, temperatura e pH que afetam diretamente o crescimento celular e a produção metabólica. Isso ocorre devido à diminuição da área superficial por volume, à redução da eficiência de aeração e à alteração das características hidrodinâmicas (Xia *et al*., 2015).

O critério de escala mais utilizado tradicionalmente é a manutenção da taxa de transferência de oxigênio (kLa), parâmetro essencial para cultivos aeróbios. Entretanto, outros critérios podem ser adotados, como a potência por volume (P/V), tempo de mistura, taxa de cisalhamento e taxa de crescimento específica (μ), dependendo das necessidades do microrganismo ou do produto de interesse (Rastädter *et al*., 2023).

Além disso, o tipo de biorreator adotado influencia diretamente na estratégia de aumento de escala. Biorreatores de tanque agitado são os mais comuns em cultivos industriais, sendo versáteis e adequados para culturas microbianas. No entanto, para células mais sensíveis ao cisalhamento, como células animais ou vegetais, utilizam-se biorreatores de leito fixo, leito fluidizado ou de membrana (Cerri, 2009).

Um estudo recente publicado por Hadi *et al*. (2024) no *World Journal of Microbiology and Biotechnology* apresentou uma abordagem inovadora para o escalonamento do bioprocesso, combinando um sistema de indução por lactose no início do cultivo com um meio de cultivo definido quimicamente para otimizar a produção de *Pfu* DNA Polimerase em um biorreator de 5 L. Os resultados demonstraram não apenas um aumento significativo no rendimento da enzima, mas também a viabilidade econômica e técnica desse método para aplicações em escala industrial.

O estudo realizado por Hadi *et al*. (2024) demonstra de forma convincente que a integração de três elementos-chave: um meio de cultivo definido quimicamente, um sistema de indução por lactose no início do cultivo e a otimização cuidadosa dos parâmetros físico-químicos em biorreator de 5 litros. Tal estratégia foi extremamente eficiente para a produção em escala da *Pfu* DNA Polimerase. Os impressionantes resultados obtidos revelam um rendimento proteico significativamente superior

(atingindo 71 mg/L) quando comparado aos métodos convencionais que utilizam IPTG como indutor. Além disso, a pesquisa comprovou que a enzima mantém sua plena atividade funcional mesmo quando produzida em maior escala, um aspecto crítico para aplicações práticas. Esta abordagem integrada não apenas supera as limitações dos métodos tradicionais, como também estabelece um novo padrão para a produção eficiente e sustentável desta importante enzima biotecnológica.

O monitoramento e controle de parâmetros como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e agitação são essenciais durante o aumento de escala. Tecnologias como sensores online, que são dispositivos que permitem o monitoramento em tempo real de parâmetros críticos (pH, temperatura, agitação e oxigênio dissolvido) durante processos biotecnológicos, como fermentações em biorreatores. Eles são fundamentais para garantir a reprodutibilidade, eficiência e qualidade da produção, especialmente durante o escalonamento de processos, modelagem computacional e controle automatizado são utilizadas para assegurar que as condições ótimas sejam mantidas (Schügerl, 1987).

A modelagem matemática e a simulação computacional têm se mostrado ferramentas importantes para prever o comportamento do sistema em maior escala, reduzindo o número de testes empíricos e os custos envolvidos. Modelos baseados em dados experimentais permitem simular cenários e identificar gargalos no processo, aumentando a previsibilidade e a eficiência do scale-up (Paliwal; Dutta, 2023).

Por fim, é fundamental que o processo de aumento de escala seja gradual, passando por etapas intermediárias, como biorreatores piloto (10–100 L), antes de alcançar a escala industrial (>1000 L), garantindo a reprodutibilidade dos resultados e a viabilidade econômica do processo (Paliwal; Dutta, 2023).

2.7 TRATAMENTO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS

O tratamento de resíduos, especialmente os de origem farmacêutica e hospitalar, representa um desafio ambiental e sanitário significativo, exigindo abordagens eficazes, sustentáveis e seguras. Entre as estratégias mais discutidas atualmente está o reaproveitamento de resíduos, principalmente no contexto da economia circular. De acordo com Sapkota; Periathamby (2023), o reaproveitamento

por meio de programas de devolução de medicamentos e recuperação energética de resíduos sólidos farmacêuticos tem se mostrado viável e ambientalmente responsável, especialmente quando há envolvimento direto de fabricantes na logística reversa.

Entretanto, quando se trata de resíduos que contêm antibióticos, o problema se torna mais complexo. A presença contínua de antibióticos em efluentes tratados contribui para a disseminação de genes de resistência, colocando em risco tanto ecossistemas quanto a saúde pública (Pruden *et al*., 2013).

O tratamento convencional em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) mostra-se insuficiente para degradar muitos antibióticos. Nesse sentido, têm ganhado destaque as chamadas tecnologias de oxidação avançada (AOPs), como ozonização, fotocatálise e processos Fenton. Estudos recentes demonstram que essas tecnologias alcançam eficiências superiores a 90% na remoção de compostos como amoxicilina, tetraciclina e sulfadiazina (Manali, Jaspal, 2023). A integração dessas tecnologias com cavitação acústica ou ultrassônica também tem sido explorada como forma de potencializar os processos de degradação (Gaudino *et al*., 2021).

Outro ponto importante no tratamento de resíduos é o uso de autoclaves. Essa técnica de esterilização térmica utiliza vapor pressurizado (geralmente a 121 °C por 15 a 60 minutos) para inativar microrganismos patogênicos. Autoclaves são amplamente empregadas em hospitais e laboratórios, sendo eficazes na descontaminação de materiais perfurocortantes, tecidos contaminados e resíduos biológicos em geral (Hassan; Shareefdeen, 2021). No entanto, estudos indicam que a autoclavação não degrada totalmente antibióticos termoestáveis, que permanecem ativos mesmo após o tratamento térmico (Mendonça *et al*., 2020).

Diante desse cenário, a integração de diferentes métodos de tratamento vem sendo cada vez mais adotada. Processos híbridos que combinam autoclavação com tecnologias de oxidação avançada e tratamento biológico têm demonstrado bons resultados, no qual há geração simultânea de resíduos infectantes e químicos. Essa abordagem permite maior eficiência na remoção de microrganismos e compostos farmacêuticos, promovendo um modelo de tratamento mais robusto e ambientalmente adequado (Pariente *et al*., 2022).

Os reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) são amplamente utilizados no tratamento de águas residuárias devido à sua eficiência na remoção de matéria orgânica e produção de biogás. Nesses sistemas, o efluente flui ascendente através de um manto de lodo granular, onde microrganismos anaeróbios degradam os poluentes, convertendo-os em metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) (Lobato, 2011). A principal vantagem desse reator é a alta taxa de retenção de biomassa, permitindo tempos de detenção hidráulica (TDH) curtos e cargas orgânicas elevadas. Além disso, a produção de biogás pode ser aproveitada como fonte de energia renovável, contribuindo para a sustentabilidade do processo (Costa; Filho; Giordano, 2014).

Contudo, o bloco digestor também é uma estrutura fundamental em sistemas de tratamento anaeróbio, projetada para promover a estabilização da matéria orgânica por meio da ação de microrganismos em condições controladas. Esses blocos são comumente utilizados em reatores como os UASB e digestores de lodo, onde a degradação da matéria orgânica ocorre em compartimentos estratificados, garantindo maior eficiência na produção de biogás (metano – CH_4) e na redução de sólidos (Chenicharo, 2007). A configuração do bloco digestor permite a separação de fases (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), otimizando o processo e reduzindo o tempo de detenção hidráulica (TDH) (van Haandel; Lettinga, 1994).

Devido à sua versatilidade, os blocos digestores são amplamente empregados no tratamento de efluentes domésticos, industriais e agropecuários, especialmente em locais com altas cargas orgânicas. Sua construção pode ser em concreto, fibra de vidro ou materiais geossintéticos, adaptando-se a diferentes escalas de operação Entre as principais vantagens estão a redução de lodo residual, a geração de energia renovável (biogás) e a menor demanda por área física em comparação a sistemas aeróbios (Sperling, 2007). No entanto, seu desempenho depende de parâmetros como temperatura, pH e relação carbono/nitrogênio (C/N), exigindo monitoramento constante para evitar desequilíbrios no processo (Metcalf & Eddy, 2014).

Portanto, o tratamento de resíduos demanda soluções específicas que considerem tanto a eficiência na inativação microbiológica quanto a degradação de contaminantes químicos. A escolha das tecnologias adequadas deve ser pautada por critérios técnicos, ambientais e econômicos, e deve, sempre que possível, estar

alinhada aos princípios da sustentabilidade e da economia circular (van Haandel; Lettinga, 1994).

3 OBJETIVOS

Produção e purificação de *Pfu* DNA polimerase por *Escherichia coli* geneticamente modificada.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes meios de cultivo;
- Testar diferentes tempos de indução da expressão gênica do *operon*;
- Aplicar a metodologia de Bradford para quantificação de proteínas totais;
- Testar diferentes condições de rompimento utilizando a sonicação;
- Aplicar métodos de *downstream* como cromatografia e eletroforese;
- Estudar o reaproveitamento de resíduos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO EM ESCALA DE BANCADA

Para avaliar a produção de *Pfu* DNA Polimerase, foi utilizada a linhagem de*. Escherichia coli* BL21 (DE3) geneticamente modificada pela inserção do plasmídeo pSU1334-PFU DNA Pol-histag, fornecida pela Universidade Estadual Paulista – UNESP FCFar. Esse plasmídeo permite a produção da *Pfu* DNA Polimerase além de conceder a possibilidade de realizar a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, devido a calda HisTag acoplada a proteína.

A linhagem foi estriada em placas de Petri (100 mm x 15 mm) contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina 50 µg/mL, incubadas a 37 °C por 16h em estufa do modelo Solab SL-223. Em seguida, preparou-se um pré-inóculo com colônias isoladas em tubo de ensaio com 5 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de ampicilina, incubado sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 16 h em incubadora orbital refrigerada com agitação (TECNAL TE-421, Brasil).

Após a etapa de pré-inóculo, as bactérias foram inoculadas em dois meios de cultura distintos: LB e Mínimo. Para isso, adicionou-se 500 µL do pré-inóculo em triplicata em cada meio. Os cultivos foram preparados em *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL do inóculo preparado.

Para avaliar a produção da *Pfu* DNA Polimerase, foram testados dois diferentes meios de cultivo: o meio LB (Luria Bertani), um meio complexo amplamente utilizado, e um meio mínimo definido. O meio Mínimo foi composto por 0,6 % (m/v) de glicerol, tampão fosfato-cítrico (4 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 13.3 g/L KH_2PO_4, 1.7 g/L ácido cítrico) e 20 mM $MgSO_4$, 0,017 mM de tiamina e solução de elementos traço contendo 0,25 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 g/L de citrato de amônio e ferro III, 0,15 g/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,5 g/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,25 g/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,3 g/L de H_3BO_3, 1,3 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, e 0,84 g/L de EDTA, conforme adaptado do meio químico definido por Hadi *et al.* (2024). Ambas estas soluções foram previamente filtradas em membrana de 0,22 µm.

Foram realizados dois cultivos em meio Mínimo, de maneira a variar o momento de indução, a partir de uma solução de lactose 1% (m/v), previamente filtrada em

membrana de 0,22 µm. A lactose foi adicionada em momentos distintos: no início do cultivo (Cultivo 1) e após a densidade óptica (DO) de crescimento celular atingir 0,1 (Cultivo 2) em comprimento de onda de 600 nm, medida com 200 µL de cada amostra em leitora de microplacas (PerkinElmer EnSpire MLD2300, EUA). Paralelamente, para o meio LB, a lactose foi adicionada somente quando a DO alcançou 0,4 em comprimento de onda de 620 nm, utilizando 1 mL de cada amostra em um espectrofotômetro UV-Vis (BEL, modelo V-M5). A diferença na medição das DOs se deu pelo fato de que no cultivo em meio Mínimo não havia volume de amostra suficiente para realizar a medição em espectrofotômetro UV-Vis e, a relação entre os valores (0,1 e 0,4) se deu através da correlação de absorbância realizada no Apêndice C, na qual o valor de 0,1 em leitora de microplacas equivale ao valor de 0,4 em espectrofotômetro UV-Vis.

O cultivo em meio LB foi conduzido em colaboração com o discente André Luiz Ribeiro de Souza, que executou integralmente todas as etapas do processo, seguindo o mesmo protocolo. Já o cultivo em meio Mínimo foi realizado de forma independente, seguindo, também, o mesmo protocolo descrito.

Assim, todos os cultivos foram colocados em agitação em uma incubadora orbital refrigerada com agitação (TECNAL TE-421, Brasil) a 200 rpm e 37 °C durante 24 horas, como descrito por Hadi *et al.* (2024).

4.2 CULTIVO EM BIORREATOR

A linhagem estocada a -80 °C foi estriada em placa contendo meio LB (Luria Bertani) ágar com 50 µg/mL de ampicilina em estufa a 37 °C durante 16h. Após o crescimento, foram inoculadas algumas colônias em LB líquido, com 50 µg/mL de ampicilina, em tubos de ensaio com volume final de 5 mL. Este pré inóculo foi cultivado em incubadora agitada a 37 °C, 200 rpm por 16h. Após esse período, foi realizado um inóculo no meio Mínimo em frascos *erlenmeyer* de 250 mL com um volume final de 50 mL e 10% (v/v) da cultura anterior e 50 µg/mL de ampicilina. As condições de crescimento foram as mesmas.

O reator utilizado foi do tipo tanque agitado e aerado, com volume útil de 2 L e utilizando dois impelidores do tipo Rushton. O volume final utilizado foi de 1,5 L, a

quantidade de inóculo adicionada foi de 10% (v/v) e houve também a adição de ampicilina a uma concentração final de 50 µg/mL e o cultivo foi realizado a 37 °C, a pH 7, com 0,5 vvm e a 500 rpm durante 24h. Conforme o melhor resultado obtido no cultivo em escala de bancada, a indução foi realizada com lactose 1% (m/v) na DO_{600} de células de 0,1 (Cultivo 2), lida em leitora de microplacas em placa transparente de 96 poços a 600 nm com os mesmos equipamentos usados na etapa anterior. Durante as 24h de cultivo foram retiradas amostras em 0h, 1h, 3h, 5h e 24h para medição da DO_{600}, quantificação de proteínas, de lactose e glicerol. Todas as análises realizadas foram feitas em triplicata analítica.

4.3 CURVA DE BSA PELO MÉTODO DE BRADFORD E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

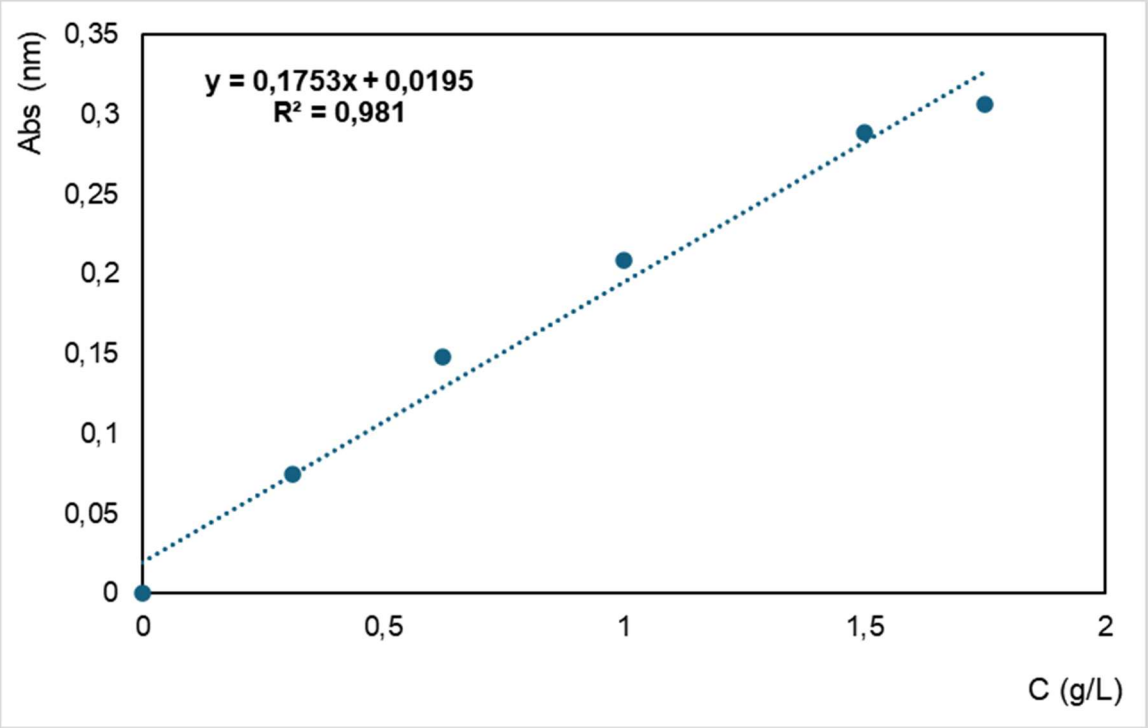
A quantificação de proteínas totais foi realizada por meio do método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na formação de um complexo entre o corante azul de Coomassie G-250 e resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos presentes nas proteínas. O pico de absorção do complexo formado ocorre em 595 nm, comprimento de onda no qual a absorbância foi medida, sendo o limite de detecção do método estimado em 2×10^{-5} mg·L^{-1} (MIWA *et al*., 2008).

Para a construção da curva de calibração padrão, foram preparadas soluções de albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 0,3125; 0,325; 1,0; 1,5 e 1,75 g/L, a partir de uma solução estoque de 40 g/L. Em tubos tipo Eppendorf, foram adicionados 20 µL de cada padrão ou amostra, seguidos de 1 mL do reagente de Bradford. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas em repouso por 5 minutos.

A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Perkins Elmer EnSpire®), utilizando placa de 96 poços e comprimento de onda de 595 nm. Com os dados obtidos, foi construída a curva de calibração, e as concentrações de proteína nas amostras foram determinadas com base nas médias das triplicatas das absorbâncias, garantindo maior precisão analítica.

A curva de calibração foi construída com base na leitura espectrofotométrica das diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA), como mostra a Figura 5.

Figura 5 – Curva de calibração de proteínas totais pelo método de Bradford.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

Legenda: Curva de calibração para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Curva obtida a partir de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA), utilizada como padrão. A absorbância foi medida a 595 nm após 5 minutos de reação com o reagente de Bradford. A equação da reta foi determinada por regressão linear: y = 0,1753x + 0,0195 (R^2 = 0,981). A curva foi utilizada para estimar a concentração de proteínas nas amostras do cultivo microbiano.

Os valores de absorbância medidos a 595 nm apresentaram boa linearidade em relação às concentrações aplicadas, resultando na Equação 1.

$$y = 0,1753x + 0,0195 \quad (1)$$

4.4 ROMPIMENTO CELULAR

O rompimento celular foi realizado a fim de liberar as proteínas intracelulares, inclusive a DNA polimerase de interesse, e para que fosse possível a quantificação dessas proteínas e a análise por eletroforese. No cultivo em escala de bancada as amostras com 24h de cultivo foram coletadas e centrifugadas (Hitachi: high-Speed Refrigerated Centrifuge (CR 22N)) a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C e apenas as células sedimentadas foram armazenadas. Os pellets foram ressuspensos em tampão Tris/HCl (20mM, pH 8) e essa solução celular foi submetida a sonicação (QR850, Eco-Sonics) durante 4 ciclos, sendo um ciclo a exposição às ondas ultrassônicas durante 2 min a 20kHz e pausa de 2 min no gelo (Hu; Wang; Liu, 2015). Ao finalizar os ciclos, a suspensão foi centrifugada novamente, nas mesmas condições anteriores, para que os detritos celulares fossem sedimentados e o sobrenadante foi utilizado para as análises posteriores.

Já para as amostras do cultivo realizado em reator, foram testados alguns parâmetros a fim de otimizar o processo de rompimento com as amostras do fim do cultivo, em 24h. Primeiramente, foi testado diferentes razões massa de célula:tampão de diluição (0,025g:1mL; 0,05g:1mL; 0,075g:1mL; 0,1g:1mL) e fixando as condições no sonicador ultrassônico com 4 ciclos a 20kHz. O tampão utilizado foi um tampão fosfato composto por 20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de cloreto de sódio e 30 mM de imidazol (pH = 7,4). A mudança do tampão nesta etapa foi necessária para que as células fossem ressuspensas no mesmo tampão utilizado na purificação por coluna, que foi realizado logo em seguida.

As amostras do cultivo em reator foram submetidas a centrifugação assim como feito anteriormente e o pellet de células foi ressuspenso dessa vez em tampão fosfato. Após o rompimento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min até que o sobrenadante ficasse translúcido, sendo que algumas amostras precisaram de centrifugações subsequentes para a obtenção de um sobrenadante sem resquícios celulares. Esse sobrenadante foi submetido a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford para que fosse escolhida a melhor razão massa:volume, isto é, quanto maior a quantidade de proteínas, melhor a razão.

Após determinada a melhor razão, foi testado a influência do número de ciclos no sonicador (2 ciclos, 4 ciclos, 6 ciclos e 8 ciclos). Da mesma forma, após o rompimento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi submetido a análise de proteína totais para a escolha do melhor número de ciclos de acordo com a quantidade de proteínas. Dessa forma, foi possível determinar o melhor número de ciclos e a melhor razão. As amostras de 2, 6 e 8 ciclos foram submetidas ainda a eletroforese (SDS-PAGE).

4.5 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Após a otimização do rompimento celular, a amostra com a razão de 0,1g:1mL e com rompimento de 6 ciclos foi aquecida a 80 °C por 5 minutos em banho seco a fim de eliminar outras proteínas que não a *Pfu* DNA Polimerase, visto que esta é uma proteína termoestável. Após aquecida, essa amostra foi ainda centrifugada a 10.000 rpm, a 22 °C durante 10 min para eliminar as proteínas precipitadas antes da inserção na coluna de purificação.

A purificação da *Pfu* DNA Polimerase foi realizada por cromatografia de afinidade, visto que esta enzima possui a sequência HisTag. Assim, para essa purificação, foi utilizada a coluna cromatográfica de níquel HisTrap Sepharose HP 1 mL, que permitiu com que as enzimas *Pfu* DNA Polimerase marcadas com a His-Tag fossem atraídas pelos íons metálicos da coluna e separadas do restante do sobrenadante contendo as proteínas totais, obtido após o rompimento. Esta coluna foi anexada pelo equipamento de cromatografia líquida preparativa AKTA Prime Plus (Cytiva) e o sistema foi equilibrado utilizando um tampão de ligação, contendo 20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de cloreto de sódio e 20 mM de imidazol, e um tampão de eluição, com as mesmas concentrações de fosfato de sódio e cloreto de sódio e 500 mM de imidazol, ambos com pH 7,4 e filtrados por microfiltração, com filtros de membrana de 0,22 µm (Amersham Biosciences).

Para estimar a capacidade de ligação da coluna, ou seja, a quantidade máxima de enzima que a matriz da coluna consegue adsorver de forma eficiente antes de saturar, foram diluídos diferentes volumes (5, 25 e 50 µL) da amostra contendo as proteínas totais, pós rompimento celular e precipitação por aquecimento, em 1 mL de

água destilada. Essas amostras diluídas foram filtradas utilizando filtros de 0,22 µm e injetadas no equipamento contendo a coluna anexada.

Após a injeção dessas amostras, a proteína de interesse foi eluida por meio de um gradiente de imidazol, aumentando a concentração do tampão de eluição em 10 % a cada 2 minutos da purificação, em um fluxo de 0,3 mL/min e com pressão da coluna em 0,3 MPa (Amersham Biosciences). Assim, foi possível coletar frações purificadas, indicadas pelos picos identificados pelo equipamento no comprimento de onda próximo de 280 nm, que detecta a presença da enzima durante a purificação (Amersham Biosciences), da amostra injetada, com diferentes concentrações de imidazol em tubos de ensaio.

As frações coletadas, as quais o cromatograma identificou a presença da enzima de interesse, foram submetidas a ultrafiltração utilizando concentradores Vivaspin, com filtro de 10 kDa e membrana de polietersulfona (Sartorius Stedim Biotech), em micro tubos tipo *Eppendorf* de 2 mL. Estas frações foram diluídas 20x e centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, com o objetivo de retirar o imidazol das amostras purificadas. Além disso, também foi testado realizar somente diluições com o tampão de Laemmli, de maneira a identificar a interferência do imidazol na eletroforese.

4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Para a análise da produção e purificação da *Pfu* DNA Polimerase em escala de bancada e em biorreator, foram realizadas cinco eletroforeses em gel de SDS-PAGE.

Em primeiro lugar, para análise da produção da enzima em escala de bancada, foram realizadas duas eletroforeses, a partir das amostras rompidas pelo sonicador (Ultronique Desruptor 500 W), sendo a primeira para as amostras retiradas do cultivo em meio Mínimo e a segunda para as retiradas do cultivo em LB. Essas amostras foram adicionadas ao gel de eletroforese em triplicata, sendo uma delas com o cultivo induzido com lactose desde o início e a segunda com indução em DO_{600} 0,1.

A análise da produção da enzima em biorreator foi realizada por meio de uma eletroforese contendo uma amostra de cada um dos testes de diferentes ciclos do sonicador, como descrito no tópico 4.3, a fim de avaliar em qual quantidade de ciclos houve maior liberação de proteínas totais e da enzima de interesse.

Já para a análise da purificação da enzima, foram feitas duas eletroforeses. A primeira contendo as frações purificadas, das diluições de 5 e 50 µL, e a segunda, com as frações purificadas da diluição de 25 µL, além de duas frações que passaram por ultrafiltração com tubos Vivaspin, como descrito em 4.5. Além disso, na primeira eletroforese, também foi adicionado uma amostra contendo a *Pfu* DNA Polimerase não purificada e aquecida a 80 °C (descritos na metodologia 4.5), de maneira a fazer um comparativo com as frações purificadas e verificar se houve a eliminação das proteínas contaminantes.

Para a realização das eletroforeses, as amostras contendo o lisado celular ou as frações purificadas foram preparadas de acordo com o método de Laemmli (1970) e o protocolo Bio-Rad Laboratories (2025). Diante disso, 100 µL destas amostras foram adicionadas a 200 µL de tampão de Laemmli (tris-HCl 1M pH=6,8 7% (v/v), glicerol 20% (v/v), SDS 10% (m/v), beta-mercaptoetanol 5% (v/v)) e levados a banho seco por 10 minutos a 100 °C. Em seguida, coletaram-se 10 µL desta solução para serem inseridas em cada poço do gel. Para a montagem dos géis, utilizou-se o gel de separação de policacrilamida 12 % (m/v), a 80 V e corrente contínua de 20 mA por 3 horas. O tampão de corrida foi preparado com solução tris 25 mM e glicina 0,192 mM, pH=8,3, adicionada de 500 µL SDS 10% (m/v).

Após a corrida, realizou-se a fixação dos géis por 30 minutos, utilizando uma solução de metanol:ácido acético:água (5:1:4), seguida da revelação, overnight, com sulfato de amônio (50 g/L), ácido fosfórico (1,2% v/v), Coomassie Brilliant Blue G250 (0,5 g/L), metanol (50% v/v). Por fim, foi feita a descoloração em banhos de água e etanol 46 % v/v, permitindo a visualização, no Bio-Rad Gel Doc XR+ Gel Documentation System, verificando se houve ou não a purificação da proteína de interesse, com uma banda marcada em 90 kDa (Hu; Wang; Liu, 2015).

4.7 ANÁLISES EM HPLC

Para a análise do consumo de lactose e glicerol, foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE). As concentrações de açúcares foram determinadas em um cromatógrafo Shimadzu-LC 20AD, equipado com a coluna de troca catiônica AMINEX HPX-87H (BIO-RAD©), operando em modo isocrático. A fase

móvel consistiu em uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, com um tempo de corrida de 13 minutos, vazão de 0,6 mL/min a 60 °C, e um volume de injeção de 20 µL (de Oliveira, 2020). As amostras utilizadas para análise foram obtidas a partir do sobrenadante do cultivo, previamente centrifugado (10.000 rpm/10 min) para remoção das células. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm e diluído adequadamente para garantir que as concentrações de lactose e glicerol se mantivessem dentro da faixa de detecção do equipamento.

A equação 2 representa a regressão linear para o glicerol, enquanto a equação 3 refere-se à lactose.

$$y = 192767x - 1224,96 \quad (2)$$

$$y = 260518x - 477,05 \quad (3)$$

Em que x representa a concentração de glicerol ou lactose (g/L) e y corresponde à área do pico observada nas análises de HPLC.

4.8 TRATAMENTO E EMBASAMENTO TEÓRICO PARA REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS

Após o cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada, os resíduos foram separados em duas frações: os sobrenadantes foram colocados em um recipiente de vidro e as células sedimentadas em tubos de centrífuga. Ambos foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos, com o objetivo de inativar os microrganismos e degradar a ampicilina presente no meio de cultivo. Após o tratamento térmico, todos os resíduos foram descartados em lixeiras adequadas.

Parte dos resíduos de sobrenadante foram utilizados para um estudo teórico de reaproveitamento dos resíduos gerados durante a produção da enzima. Neste estudo, analisou-se o potencial de geração de biogás a partir desses resíduos e para isso foi realizado um cálculo teórico para a demanda química de oxigênio (DQO) inicial e final do sobrenadante. A DQO inicial do sobrenadante foi calculada com base na concentração de glicerol e lactose obtidos por HPLC nos pontos retirados no início do

cultivo. Para isso, utilizaram-se as equações de combustão do glicerol e da lactose, descritas respectivamente como Equação 4 e Equação 5 a seguir:

$$2C_3H_8O_3 + 7O_2 \rightarrow 6CO_2 + 8H_2O \quad (4)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O \quad (5)$$

Já para o cálculo da demanda Química de Oxigênio final, primeiramente foi realizado uma diluição de 20x do resíduo de sobrenadante. Depois, foram pipetados 2,5 mL desta amostra diluída, 1,5 mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado com sulfato de prata, em tubos de digestão de vidro borossilicato. A adição do ácido foi realizada lentamente, devido a reação ser exotérmica. Esses reagentes foram homogeneizados por agitação manual por 2 minutos. Ademais, o branco foi preparado em outro tubo, contendo água destilada e a soluções de dicromato de potássio e ácido sulfúrico.

Posteriormente, os tubos foram postos em um bloco digestor, previamente estabilizado na temperatura de 150 °C, por 2 horas. Ao final deste tempo, os tubos foram resfriados e realizados as leituras em espectrofotômetro UV-Vis (BEL, V-M5), em comprimento de onda de 620 nm.

Dessa forma, os valores de DQO final do resíduo de sobrenadante, em g/L, foi obtido por meio da Equação 6, previamente fornecida.

$$y=0,2948x + 0,0132 \quad (6)$$

Logo após a análise das amostras, foi feito o tratamento térmico e descartado em lixeiras adequadas.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software Microsoft Excel*®, por meio da ferramenta de regressão linear e análise de dados. A regressão linear foi empregada para construção da curva de calibração de quantificação de proteínas, na

análise dos dados referentes ao consumo de lactose e glicerol e para medição da DQO no estudo de tratamento e reaproveitamento de resíduos, permitindo a obtenção de uma equação da reta com base na relação entre as concentrações conhecidas e os valores de absorbância. Posteriormente, essa equação foi aplicada na substituição dos valores experimentais, viabilizando o cálculo preciso das concentrações de proteínas e açúcares nas amostras analisadas. Já a ferramenta de análise de dados foi utilizada para realizar o teste T nos resultados de crescimento celular e concentração de proteínas totais no cultivo em escala de bancada, visando determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre as condições testadas.

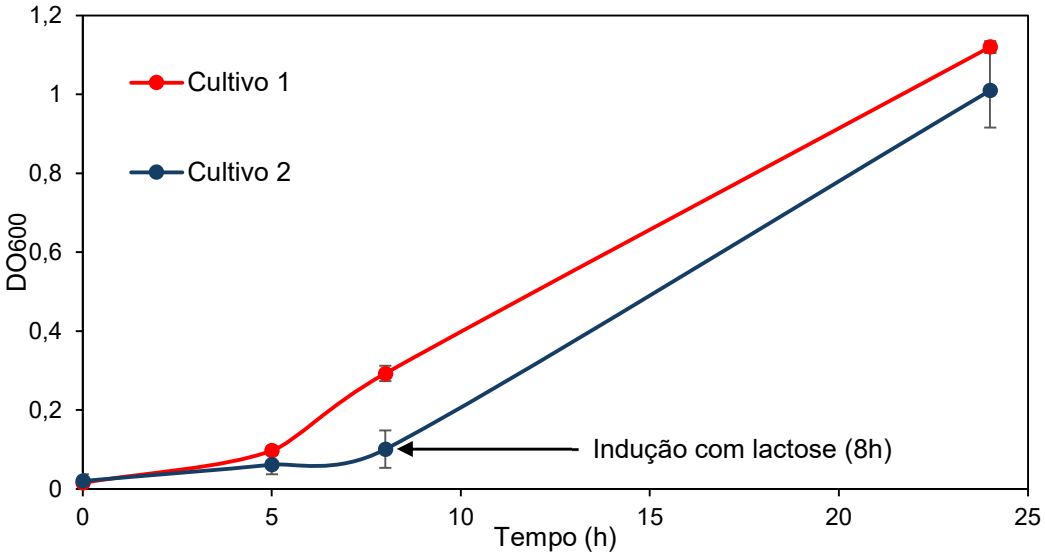
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO EM ESCALA DE BANCADA

5.1.1 Análise do crescimento celular de *E. coli*

O crescimento celular em meio Mínimo foi observado a partir dos dados de absorbância obtidos durante o período de 24 horas, como ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Curva de crescimento celular em meio Mínimo durante 24 horas.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

Legenda: O Cultivo 1 indica o perfil de crescimento celular em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose desde o início, o Cultivo 2 indica o perfil de crescimento celular em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose após os valores de DO_{600} de crescimento celular chegarem a 0,1 em leitora de microplacas.

Com base na Figura 6, para avaliar se a diferença do crescimento celular foi estatisticamente significativa, foi realizado a análise de teste T, o qual revelou que não houve diferença significativa entre os perfis de crescimento celular, portanto eles ficaram semelhantes ao logo do período de 24 horas. No entanto, nota-se que o Cultivo 1 destacou-se pelos maiores valores de absorbância, indicando maior densidade celular em relação ao Cultivo 2. Embora o Cultivo 2 tenha seguido o mesmo perfil de crescimento, apresentou valores ligeiramente inferiores ao do Cultivo 1.

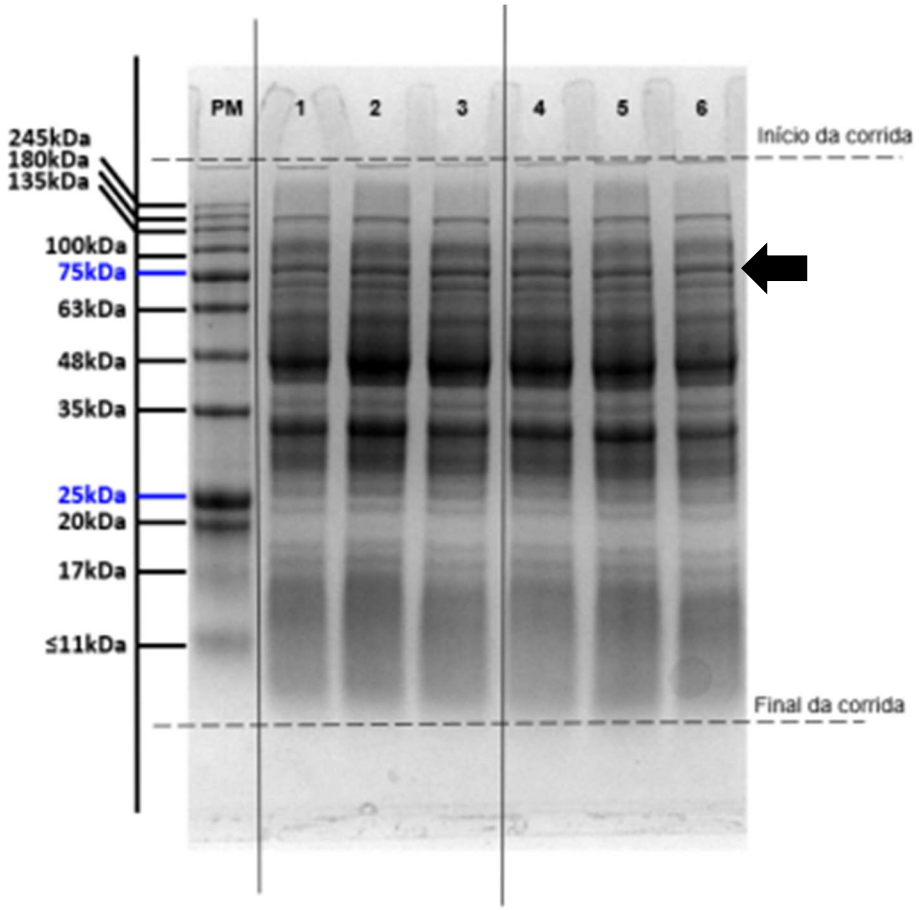
Apesar dessa diferença, a proximidade entre as curvas e do desvio no ponto final atingir o mesmo valor de maior absorbância, demonstra que a indução após os valores de DO_{600} atingirem 0,1 também permitiu alta multiplicação celular.

A ligeira diferença observada entre os cultivos pode estar relacionada ao momento de indução, no qual a indução desde o início pode ter estimulado simultaneamente o crescimento celular junto do glicerol, e a produção proteica, enquanto a indução tardia permitiu que a bactéria tivesse a adaptação mais lenta às condições do meio.

5.1.2 Análise da produção de *Pfu* DNA Polimerase

A análise de eletroforese em gel de SDS-PAGE é uma etapa essencial para avaliar a produção de proteínas, porém não se teve certeza de que houve a produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Análise da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por SDS-PAGE no meio Mínimo com diferentes momentos de indução.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

Legenda: PM indica o marcador molecular (kDa), as faixas de 1 a 3 indicam as amostras contendo indução por lactose desde o início do cultivo, as faixas de 4 a 6 indicam as amostras contenda indução por lactose a partir do valor de 0,1 referente a DO_{600} de crescimento celular, a seta indica a posição referente a possível banda de *Pfu* DNA Polimerase.

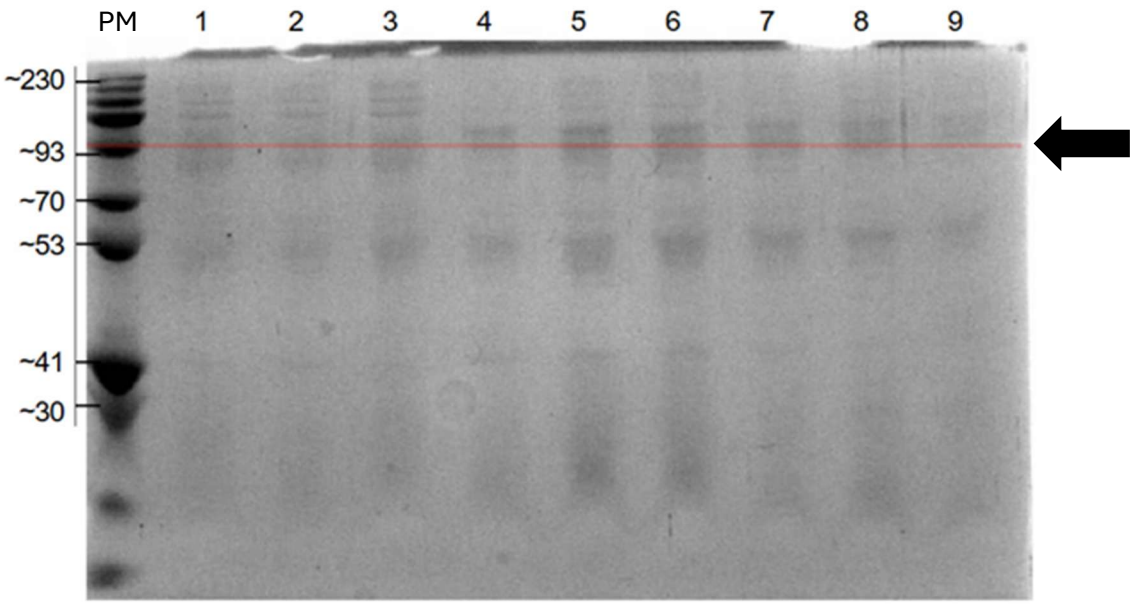
Observa-se, na Figura 7, que existe uma banda mais escura presente em todas as canaletas do gel entre as marcações de 100 e 75 kDa, criando a hipótese de que pode haver *Pfu* DNA polimerase, mas ao mesmo tempo, como não houve nenhum processo de purificação das amostras, é possível que sejam outras proteínas que também possuem peso molecular de 90 kDa. Entretanto, para ter certeza de que a banda representa a enzima de interesse, é necessário realizar processos de purificação da enzima e efetuar, novamente, a eletroforese em gel de SDS-PAGE, visando observar a mesma banda destacada entre 100 e 75 kDa.

Ainda assim, assumindo que a banda presente entre as marcações de 100 e 75 kDa seja a *Pfu* DNA polimerase, não foi possível identificar diferenças significativas

de tamanho e intensidade dessas bandas, não sendo possível dizer em qual das condições de indução (no início do cultivo ou ao atingir DO_{600} de 0,1 do crescimento celular) houve uma maior produção da enzima.

Além disso, ao comparar a análise da eletroforese do cultivo realizado em LB, ilustrado pela Figura 8, não foi possível observar as bandas referentes a *Pfu* DNA Polimerase.

Figura 8 – Análise da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por SDS-PAGE no meio LB, com indução no início do cultivo em DO_{600} 0,4.



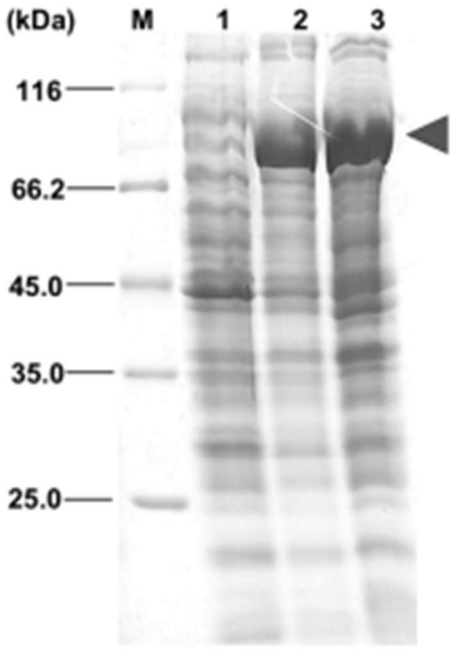
Fonte: Souza, (2025)
Legenda: PM indica o marcador molecular (kDa); as faixas de 1 a 3 indicam as amostras após 2,5 horas de cultivo, as faixas de 4 a 6 indicam as amostras após 6,5 horas de cultivo, as faixas 7 a 9 indicam as amostras após 23 horas de cultivo, a seta indica a posição referente a possível banda de *Pfu* DNA Polimerase.

O resultado obtido da eletroforese, observado na Figura 8 pode se dar ao fato de que as amostras pipetadas em cada poço do gel estavam mais diluídas que as amostras do meio Mínimo. Dessa forma, não houve possibilidade de confirmar qual dos meios de cultura, LB e Mínimo, permitiu a maior produção de *Pfu* DNA Polimerase.

No estudo de Hadi *et al.* (2024), a análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE, representada pela Figura 9, foi empregada para avaliar a expressão da *Pfu* DNA

polimerase sob diferentes condições de indução com lactose em cultivo com meio Mínimo. A comparação das bandas proteicas entre estas condições visa evidenciar o impacto do momento de indução na produção da enzima, considerando que a lactose atua simultaneamente como fonte de carbono e indutor da expressão gênica.

Figura 9 – Análise da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por SDS-PAGE.



Fonte: Hadi *et al*. (2024)

Legenda: M indica o marcador molecular (kDa), a faixa 1 indica o controle negativo, a faixa 2 indica a fração solúvel de Pfupol produzido pelo método de indução, a faixa 3 indica a fração solúvel de Pfupol produzido pelo método de indução desde o início; o símbolo triangular indica a banda proteica desejada.

A intensidade das bandas observadas no gel de SDS-PAGE, Figura 9, para a *Pfu* DNA Polimerase (90 kDa) reflete diretamente a quantidade relativa da enzima expressa sob as diferentes condições testadas. Portanto, é possível observar que Hadi *et al.* (2024) obteve produção de *Pfu* DNA Polimerase ao realizar o cultivo em meio Mínimo uma vez que as bandas observadas na Figura 9 estão muito intensas, maiores que as demais bandas e presentes na faixa de 90 kDa.

Além disso, aspectos metodológicos, como a diluição excessiva das amostras de cultivo em LB antes da eletroforese comprometeram a detecção da *Pfu* DNA polimerase no presente estudo. Essa limitação técnica contrasta com os resultados

apresentados por Hadi *et al*. (2024), nos quais as bandas correspondentes à enzima foram claramente visualizadas, indicando alta quantidade de proteína.

5.1.3 Quantificação de Proteínas Totais

Devido ao fato de que na Figura 7, que mostra a produção da enzima em ambos os cultivos, não foi possível diferenciar qual das duas condições de indução obteve uma maior produção da enzima *Pfu* DNA polimerase, foi realizado a quantificação de proteínas totais, por meio da curva de Bradford descrita pela Equação 1, após o rompimento celular, como descrito na metodologia 4.3. A Tabela 1 a seguir mostra a concentração média de proteínas liberadas de cada uma das condições de indução testadas em triplicata.

Tabela 1 – Valores de concentração média de proteínas totais para os cultivos induzidos no início e com DO_{600} de 0,1 de crescimento celular.

Condição de Indução	**Concentração média µg/µL**
Cultivo 1	1,024±0,286
Cultivo 2	1,134±0,106

Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

Para verificar se a diferença entre os valores apresentados na Tabela 1 foi estatisticamente significativo, foi realizado um teste T, o qual não revelou uma diferença significativa. Logo, para posterior cultivo em biorreator, visto que não houve diferenças estatísticas significativas tanto para o crescimento celular, quanto na concentração de proteínas totais, qualquer uma das condições de indução poderia ser realizada e foi escolhido a condição do Cultivo 2.

5.1.4 Análise do consumo de glicerol e lactose em HPLC

A quantificação do consumo de glicerol e lactose foi feita exclusivamente no meio Mínimo, uma vez que o objetivo dessa etapa consistiu em avaliar o crescimento celular

e produção da *Pfu* DNA Polimerase em um meio alternativo ao LB. Assim, as análises em HPLC para a lactose foram feitas somente com as amostras do ponto final de cada cultivo, devido ao descarte por engano das demais amostras. No caso do glicerol, seu consumo foi determinado por meio da comparação entre as concentrações inicial e final do cultivo e devido ao pouco tempo para realização dos experimentos, não houve avaliação da variação da concentração de glicerol.

A concentração inicial de glicerol obtida foi de 6,74 g/L, enquanto para os demais pontos não houve detecção da presença desse metabólito A ausência de glicerol residual ao final do crescimento celular sugere que este foi 100% consumido pelas células, indicando que esse composto foi eficientemente metabolizado como fonte de carbono pela linhagem *E. coli* BL21 (DE3). Esse resultado confirma a viabilidade do glicerol como principal fonte de carbono para o crescimento celular nas condições avaliadas.

A ausência de produção da *Pfu* DNA Polimerase pode estar relacionada ao consumo precoce do glicerol como fonte de carbono. É provável que o esgotamento completo desse substrato tenha ocorrido antes que as células bacterianas alcançassem a fase metabólica necessária para a síntese proteica, comprometendo assim a expressão da enzima.

As concentrações de lactose foram obtidas a partir da Equação 2 com ajuste da diluição de 15x e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração de lactose (g/L) no cultivo em escala de bancada determinado por HPLC.

Amostras	**Concentração média de lactose (g/L)**
1	9,241±0,239
2	9,949±1,021
3	8,542±0,095
4	8,591±0,852
5	9,930±0,215
6	8,566±0,097

Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

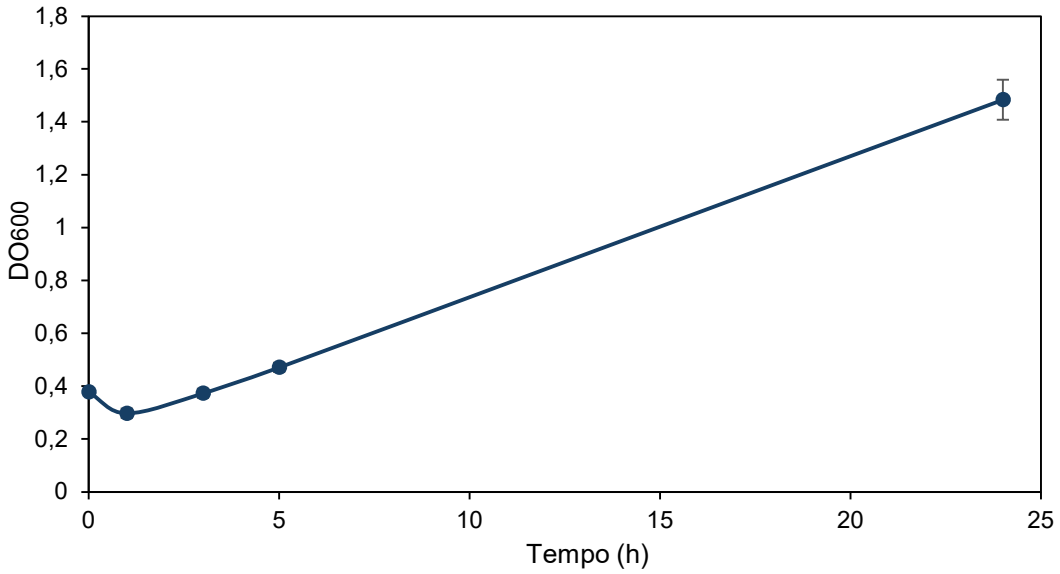
Legenda: As amostras de 1 a 3 indicam os sobrenadantes dos pontos retirados após 24 horas dos cultivos com indução desde o início e as amostras de 4 a 6 indicam os sobrenadantes dos pontos retirados após 24 horas dos cultivos que receberam lactose após os valores de DO_{600} de crescimento celular chegar a 0,1 em leitora de microplacas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, verificou-se a presença de concentrações significativas de lactose no final do cultivo. Esse resultado sugere que o glicerol foi preferencialmente metabolizado como principal fonte de carbono para o crescimento celular e a lactose atuou majoritariamente como indutor, visto que se adicionou 10 g/L de lactose quando o valor da DO_{600} atingiu 0,1 e, observando a Tabela 2, vê-se que praticamente não houve consumo de lactose. Entretanto, devido à impossibilidade de analisar amostras do início do cultivo, não há como determinar com exatidão que a lactose foi consumida parcialmente durante o cultivo em escala de bancada. Contudo, análises mais completas realizadas durante os cultivos em biorreator, no qual foi possível monitorar todo o perfil de consumo desde a inoculação até a fase estacionária, permitiram uma avaliação mais precisa da dinâmica de utilização desses substratos.

5.2 CULTIVO EM BIORREATOR

Os resultados de crescimento obtidos podem ser observados na Figura 10 e os dados brutos estão apresentados no Apêndice A.

Figura 10 – Crescimento microbiano no cultivo em reator.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: O gráfico apresenta dados do crescimento microbiano de *E. coli* durante 24h em meio Mínimo, com indução a partir de 1h de cultivo. Todos os dados foram analisados com triplicata analítica

Durante o cultivo, um desafio foi enfrentado. Ao inocular, pode-se observar que o valor da DO_{600} ultrapassou a DO_{600} de indução de 0,1. Por isso, a lactose foi introduzida no reator o mais rápido possível e foi após 1h do início do cultivo. Isso pode ter acontecido pois, como o pré inóculo foi feito em frascos *erlenmeyers*, a *E. coli* provavelmente teve um crescimento mais elevado do que no pré inóculo em tubo feito no cultivo em escala de bancada. Portanto, o mais correto a ser feito seria ter inoculado um volume menor de pré inóculo no reator e usado proporções de volume de inóculo e DO_{600} inicial.

Os resultados de crescimento obtidos mostraram-se satisfatórios, em comparação com os resultados obtidos no cultivo em escala de bancada no qual a DO_{600} final obtida foi de aproximadamente 1. Isso mostra que, com o aumento de escala, há um crescimento melhor de cerca de 32% e isso pode ser explicado pelo

maior fornecimento de oxigênio na cultura. Em cultivos feitos em frascos menores, o fornecimento de oxigênio se torna limitado, afetando diretamente no crescimento celular.

Ao observar a Figura 10, percebe-se ainda que não foi possível identificar as fases do crescimento microbiano devido a insuficiência de pontos analisados. Para identificar as fases exponencial e estacionária do cultivo, seria necessário a análise de mais amostras durante os pontos de 5h, 24h e após as 24h.

Ao comparar os resultados obtidos com o trabalho de Jesuino (2020), a DO_{600} obtida se mostra de acordo com dados da literatura. No trabalho citado, a autora utiliza o mesmo meio definido para cultivo de uma linhagem modificada de *E. coli* produtora de GFP e após 10h de cultivo, quando já foi atingida a fase estacionária, a DO_{600} foi de 2,9, lida em espectrofotômetro. Considerando que a leitura no espectrofotômetro é aproximadamente 2,2 vezes maior que na leitora de microplacas (ver correlação no apêndice A), podemos dizer que foi atingida uma DO_{600} de aproximadamente 1,3. O que indica um crescimento muito parecido com o obtido no presente trabalho. Entretanto, devido às aproximações feitas, há grande janela de erros, então pode-se dizer que foi obtido um crescimento adequado e esperado.

5.2.1 Quantificação da fonte de Carbono e do indutor (Lactose) por HPLC

Após a centrifugação das amostras retiradas em diferentes tempos durante o cultivo, os sobrenadantes foram submetidos a análises em HPLC para quantificação da fonte de carbono (Glicerol) e do indutor (Lactose) de produção da DNA polimerase. Os dados obtidos (disponíveis no Apêndice A) foram submetidos as equações 1 e 2 e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do sobrenadante do reator determinado por HPLC.

Amostras	Concentração média de lactose (g/L)	Concentração média de glicerol (g/L)
Branco*	0	5,380
0h	0,000±0,000	4,965±0,051
1h	9,052±0,147	4,348±0,071
3h	9,549±0,593	4,452±0,047
5h	9,903±0,430	4,990±0,063
24h	9,799±0,549	0,00±0,00

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: *No qual o branco é composto pelo meio de cultivo.

A concentração inicial de glicerol medida foi de 5,38 g/L, próxima ao valor previsto de 6 g/L (0,6% m/v) na formulação do meio. Observou-se consumo completo após 24 horas de cultivo, indicando uso eficiente do glicerol como fonte de carbono e que ao final das 24h o crescimento já tinha atingido a fase estacionária. Durante as primeiras horas, não foi possível identificar consumo expressivo do glicerol, o que condiz com os dados de crescimento, uma vez que não houve aumento expressivo da DO_{600} nas primeiras 5h de cultivo. Além disso, utilizando as concentrações de fonte de nitrogênio e de carbono (glicerol) adicionadas no meio, pode-se observar uma razão molar de 2,45:1 para carbono: nitrogênio (ver cálculos no Apêndice B), o que tornou possível o consumo total do glicerol.

Após a adição de lactose ao meio (DO_{600} = 0,297 no tempo de 1h), observou-se que sua concentração variou entre 9 e 9,7g/L, dessa forma, não foi possível afirmar se houve ou não consumo de lactose. Além disso, talvez o tempo de cultivo não foi o suficiente para as células começarem o consumo da lactose como fonte de carbono secundária.

5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ROMPIMENTO CELULAR

As células sedimentadas por centrifugação coletadas no fim do cultivo (24h) em reator foram rompidas para quantificação das proteínas totais através da Equação 7 Os dados brutos de absorbância obtidos estão dispostos no Apêndice A. As Tabelas 4 e 5 mostram os resultados obtidos para cada condição testada, isto é, a variação da razão massa de células: volume de tampão e número de ciclos no sonicador.

Tabela 4 – Concentração de proteínas totais para variação da razão massa de células:volume de tampão com 4 ciclos no sonicador.

Razão massa:volume (g:mL)	**Proteínas totais (mg/mL)**
0,025:1	0,521
0,05:1	0,781
0,075:1	0,861
0,1:1	1,232

Fonte: Elaborado pelos autores, (2025).

Tabela 5 – Concentração de proteínas totais usando a razão 0,1g:1mL e variando o número de ciclos no sonicador.

Número de ciclos	**Proteínas Totais (mg/mL)**
2	0,926
4	1,232
6	2,527
8	2,424

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

A Tabela 4 mostra que o aumento da razão aumenta também a concentração de proteínas totais. Esse comportamento era o esperado uma vez que quanto maior essa razão, maior densidade de células e consequentemente também mais proteínas serão liberadas. Entretanto, é preciso se atentar a essa questão uma vez que uma solução muito densa pode prejudicar a eficiência do sonicador. Neste caso, não foi possível observar esse limite, portanto a razão escolhida foi de 0,1g:1mL que mostrou maior rendimento de proteínas.

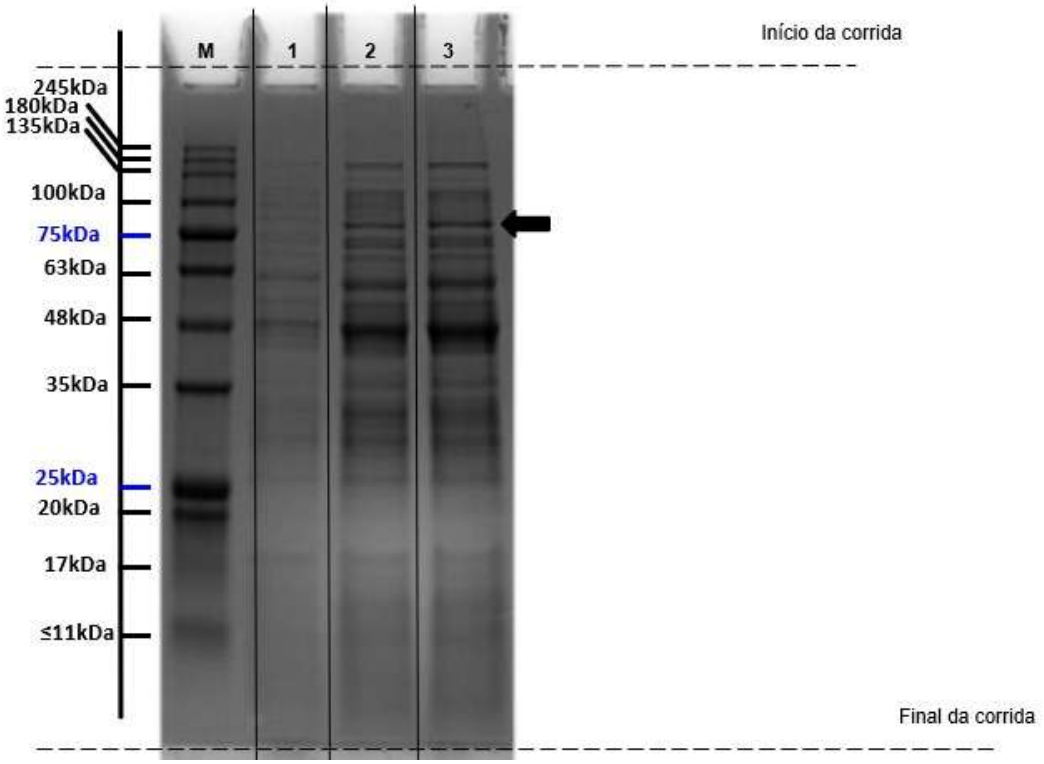
Apesar de não ter sido possível perceber o efeito comentado acima neste trabalho, Lupatini *et al* (2017) mostrou esse comportamento em seu estudo, onde demonstrou que um aumento excessivo de biomassa no sonicador, tem efeito negativo na liberação de proteínas. O autor realizou o rompimento de *Spirulina platensis* para análise de proteínas e carboidratos liberados. Foi observado que um aumento de 30 a 60 g/L de biomassa teve efeito negativo na extração de proteínas e que o rendimento do processo aumentava em concentrações mais baixas. Dessa forma, embora neste trabalho o aumento da biomassa foi favorável, deve-se considerar que foram usadas concentrações mais baixas do que o estudo citado, por isso foi possível ver este efeito. Entretanto, em altas concentrações de biomassa, a sonificação pode ocorrer de forma limitada devido à alta densidade celular que atrapalha a passagem das ondas ultrassônicas, a redução da capacidade de cavitação ou ainda devido a saturação de proteínas na solução, não sendo possível detectá-las mesmo que com o rompimento funcionando melhor (Lupatini, *et al*, 2017).

De acordo com a Tabela 5, foi feito um estudo acerca do número de ciclos necessário no sonicador para verificar se 4 ciclos, feito até o momento, era o número ideal ou se com menos a quantidade de proteínas já atingiria um platô. Ao observar os resultados apresentados na Tabela 5 percebe-se um aumento das proteínas ao aumentar o número de ciclos de 2 para 6. Já no aumento de 6 para 8 ciclos, não houve um aumento da concentração de proteínas totais, indicando que não há necessidade de utilizar mais de 6 ciclos e que neste ponto, todas as células já estavam rompidas. Ainda é possível apontar que 4 ciclos utilizados até o momento eram insuficientes no rompimento, já que no aumento de 4 para 6 ciclos, a concentração de proteínas dobrou.

Um comportamento semelhante ao obtido foi observado no estudo de Badjona *et al* (2024) onde foram testados diferentes tempos de sonicação, variando entre 10 e 60 minutos para o isolamento de proteínas do feijão faba. A análise proteica final indicou um tempo ideal de 40 minutos de sonicação, pois após isso, não houve aumento significativo de proteínas no meio. Este efeito pode ocorrer devido a saturação de proteínas do meio ou indica que, mesmo após longos períodos de exposição ao ultrassom, não há mais proteínas para serem extraídas, ou seja, que todas as células já foram rompidas. Além disso, altos períodos de sonicação podem superaquecer a amostra, gerando desnaturação proteica e um valor falso ao fim do processo. Todas essas questões apontam a necessidade de otimização desse processo, sempre buscando condições ideais. Dessa forma, através dos experimentos realizados, conclui-se que a condição em que houve maior teor de proteínas liberadas foi a com razão de 0,1g:1mL rompida com 6 ciclos no sonicador.

A fim de visualizar a presença da proteína e a intensidade das bandas, foi feita uma eletroforese conforme Figura 11.

Figura 11 – Visualização da liberação proteica em SDS-PAGE após lise ultrassônica de *E. coli*.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: Onde M indica o marcador molecular (kDa), e os números de 1 a 3 indicam as amostras com a razão de 0,1g:1mL de massa de células:volume de tampão rompidas com 2, 6 e 8 ciclos, respectivamente. A seta indica a banda correspondente a DNA polimerase (90kDa).

Dessa forma, foi possível observar a influência do número de ciclos para análise do método de rompimento celular. Sendo que em 2 ciclos a intensidade das bandas é fraca e aumenta com o aumento do número de ciclos.

Com base nisso, é possível comparar estes resultados com o trabalho desenvolvido por Bhilare *et al*., 2019, que modelam matematicamente a lise ultrassônica em *E. coli* empregando ferramentas estatísticas como regressão linear múltiplas, que consiste na estimativa do coeficiente para linhas ou hiperplano que melhor será ajustado para os dados experimentais (Breiman, Friedman., 1997) e redes neurais, sendo muito utilizado para prever e sugerir condições ótimas a partir de quatro variáveis de entrada que alimentam dois “neurônios”’ que ajustam os dados de saída, sendo eles: atividade da enzima, proteína total e grau de lise (Maran, Priya., 2015).

Segundo o estudo de Bhilare *et al.* 2019, acredita-se que a eficiência das rupturas em bactérias depende de três principais variáveis, sendo elas: concentração

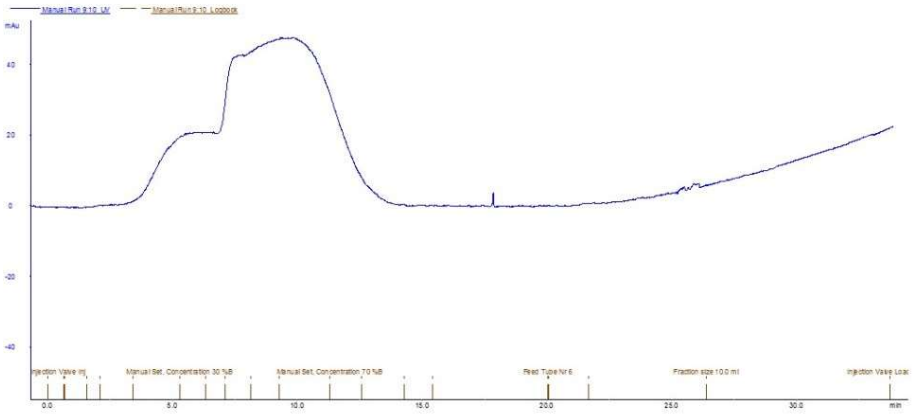
de biomassa e volume, duty-cycle (relação do tempo dos pulsos com o intervalo da máquina desligada) e o tempo de sonicação. Segundo o modelo, pode-se prever que para 300 g/L de massa e utilizando 1 min de sonicação com 12 pulsos de 5s, obtenha aproximadamente 4,2 g/L de concentração de proteína (nitrilase). Isto é, ao utilizar pulsos curtos para lisar *E. coli*, antes de serem analisadas em SDS-PAGE, apresenta-se uma melhor eficiência na lise celular e assim, intensifica-se a banda correspondente da proteína de interesse, porém, ao atingir um número limitado de ciclos, o resultado não apresenta variação significativa, pois praticamente todas as células estão rompidas e não há mais proteínas intracelulares a serem liberadas e consequentemente, sem maiores intensidade das bandas.

Portanto, aplicando esse raciocínio, juntamente com os resultados de proteínas totais, pode-se confirmar que utilizando a razão de 0,1:1 com 6 ciclos de rompimento, é a condição ideal para liberação de proteínas intracelulares da linhagem utilizada no trabalho.

5.4 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

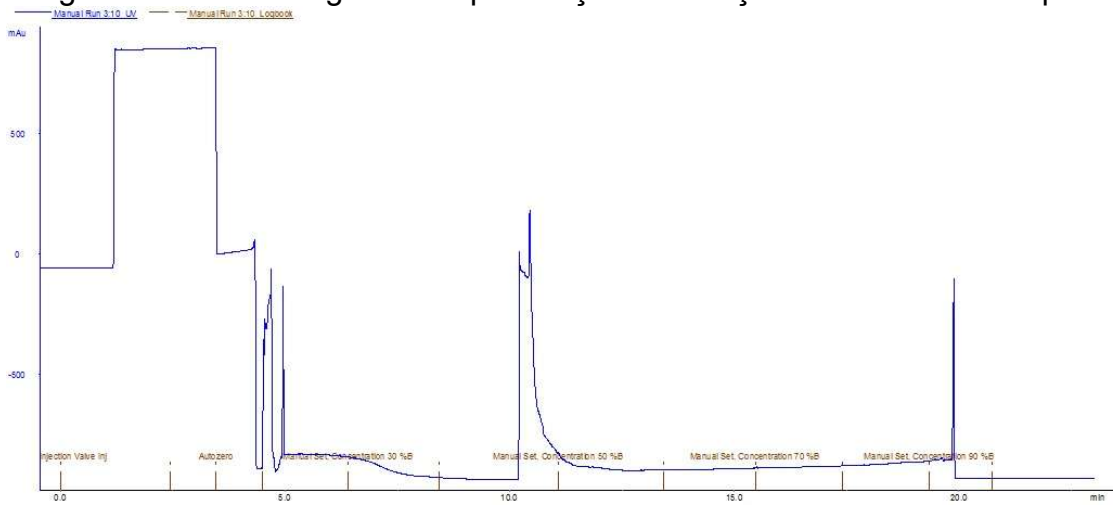
A partir das três diluições das amostras contendo a *Pfu* DNA Polimerase pré purificada por precipitação por aquecimento, realizadas para avaliar a quantidade máxima de enzima capaz de ser adsorvida na coluna, obtiveram-se três cromatogramas, como mostra as Figuras 12, 13 e 14, resultante do processo de purificação por afinidade, utilizando a coluna HisTrap.

Figura 12 – Cromatograma da purificação da diluição do volume de 5 µL.



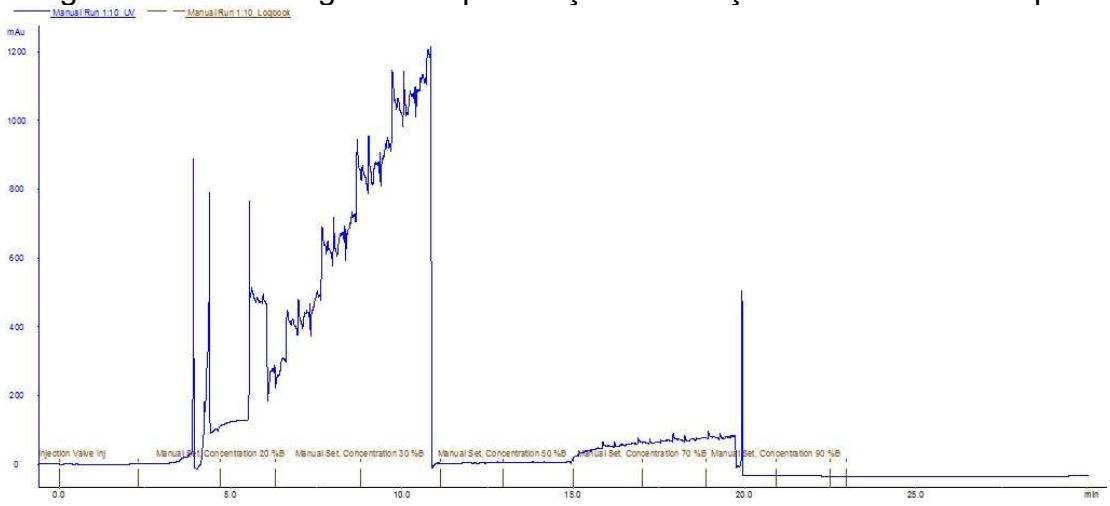
Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Onde o eixo x indica o tempo, em segundos, de corrida da amostra purificada e o eixo y indica a absorbância em mAu

Figura 13 – Cromatograma da purificação da diluição do volume de 25 µL.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Onde o eixo x indica o tempo, em segundos, de corrida da amostra purificada e o eixo y indica a absorbância em mAu

Figura 14– Cromatograma da purificação da diluição do volume de 50 µL.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Onde o eixo x indica o tempo, em segundos, de corrida da amostra purificada e o eixo y indica a absorbância em mAu

A partir dos cromatogramas, nota-se que na Figura 12 não houve massa suficiente do rompido celular para a observação de uma separação completa. Já na Figura 14, observa-se que houve problema na injeção da amostra, uma vez que o ruído observado a partir de 6 minutos de fluxo indica uma provável injeção de ar na coluna. Por fim, a Figura 13 mostra um pico mais definido, a partir da concentração de 40 e 50 % do tampão de eluição, que indica a fração a qual provavelmente houve a eluição da enzima *Pfu* DNA Polimerase. Ademais, a Figura 13 também mostra a presença de dois picos entre as concentrações de 20 e 30 % do tampão de eluição, o que pode ser a presença de outras proteínas contaminantes na amostra injetada, ou algum outro tipo de interferência na coluna, devido a erros na injeção da amostra ou o mal manuseio do equipamento, durante a purificação. Observa-se também um pico entre as concentrações de 80 e 90% do tampão de eluição, que provavelmente indica presença de ar na coluna.

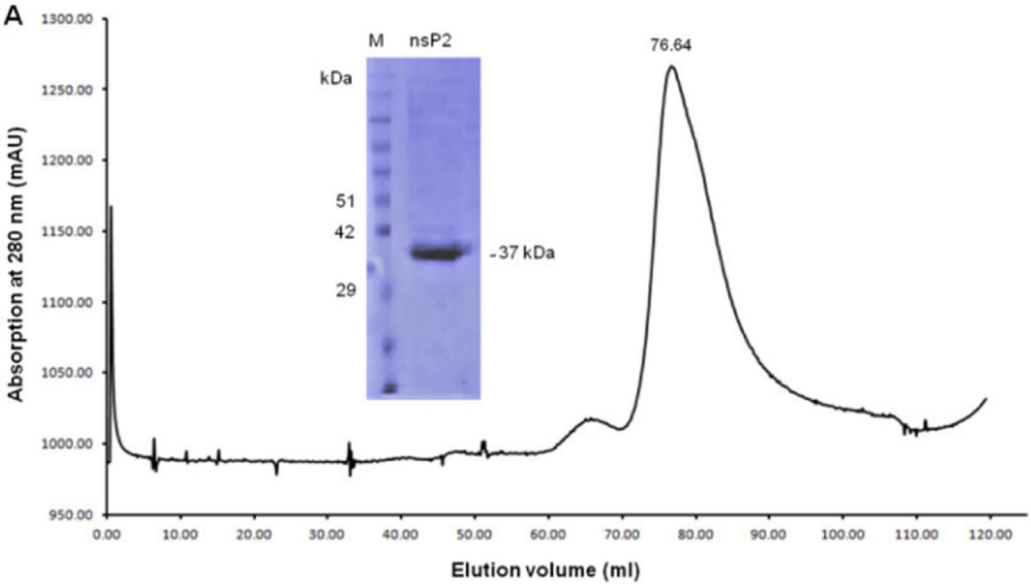
Observando-se as Figuras 12, 13 e 14, é possível dizer que a amostra de 25 µL obteve a melhor purificação, uma vez que houve a formação de um pico com melhor resolução e com uma menor interferência na coluna, como por exemplo, injeção de ar. No entanto é possível que esta amostra não tenha sido purificada da maneira correta, por erros de manipulação do equipamento, já que o pico identificado foi coletado em uma única fração, em vez de ser coletado em mais de uma fração,

visto que a proteína purificada pode estar distribuída em diferentes pontos da identificação deste pico.

Além disso, para uma maior precisão da purificação, era necessário iniciar a eluição, a partir do gradiente de imidazol, após o aumento e a diminuição da absorbância, mostrado pelo *software* do equipamento, indicando a lavagem das proteínas que não possuem a cauda de poli Histidina, o que não foi realizado durante a purificação das amostras injetadas no equipamento, podendo também indicar erros nesse processo de purificação executado.

A partir desta discussão, é possível comparar a purificação e o cromatograma utilizando o mesmo equipamento (AKTA) entre este estudo e a pesquisa de Narwal *et al.*, 2018, que visava determinar a estrutura cristalina da protease cisteína nsP2pro do vírus Chikungunya (CHIKV) e investigar sua função catalítica e mecanismos de regulação do sítio ativo, com foco na importância do resíduo Asn547. Para purificação da proteína de interesse, Narwal *et al.*, 2018 realizou uma purificação utilizando uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho anexada ao AKTA, resultando o cromatograma referente a Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma da purificação da protease nsP2pro do vírus Chikungunya usando cromatografia de exclusão por tamanho e gel de SDS-PAGE com a protease purificada.



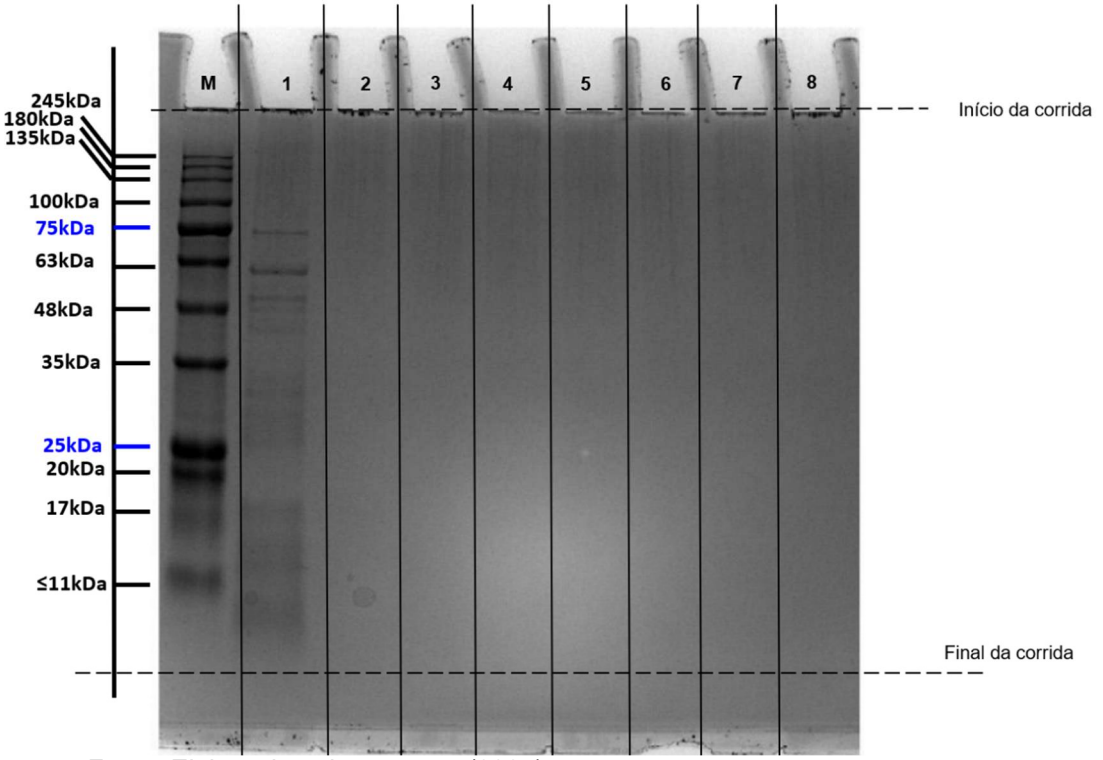
Fonte: Narwal *et al*. (2018)

Legenda: O cromatograma de filtração em gel da protease nsP2 do vírus Chikungunya (CHIKV nsP2pro) após ser carregado em uma coluna Superdex 75. O gel inserido na figura mostra o perfil em SDS-PAGE da CHIKV nsP2pro purificada, no qual a faixa M corresponde aos marcadores de peso molecular (kDa) e a faixa indicada por nsP2 exibe a CHIKV nsP2pro purificada.

A Figura 15 mostra a formação de um único pico principal de eluição, o que indica que a amostra a ser purificada foi injetada corretamente, visto que não há ruídos ou presença de picos que indicam presença de ar na coluna e a proteína de interesse se encontra na forma homogênea e livre de contaminantes. Portanto, para obter uma melhor purificação e uma melhor resolução do cromatograma, deve-se melhorar a estratégia de pré-purificação, de maneira a evitar a formação de mais de um pico, como indicado na Figura 13 (no caso desses picos serem referentes a presença de proteínas contaminantes da amostra injetada) e realizar a injeção da amostra de maneira cautelosa, evitando o aparecimento de picos e ruídos que indicam a presença de ar na coluna, como ocorreu na Figura 14.

Dessa maneira, para avaliar o sucesso desta purificação, deve-se analisar e discutir o resultado das eletroforeses das frações coletadas pelo equipamento de cromatografia líquida preparativa AKTA Prime Plus, como mostram as Figuras 16 e 17.

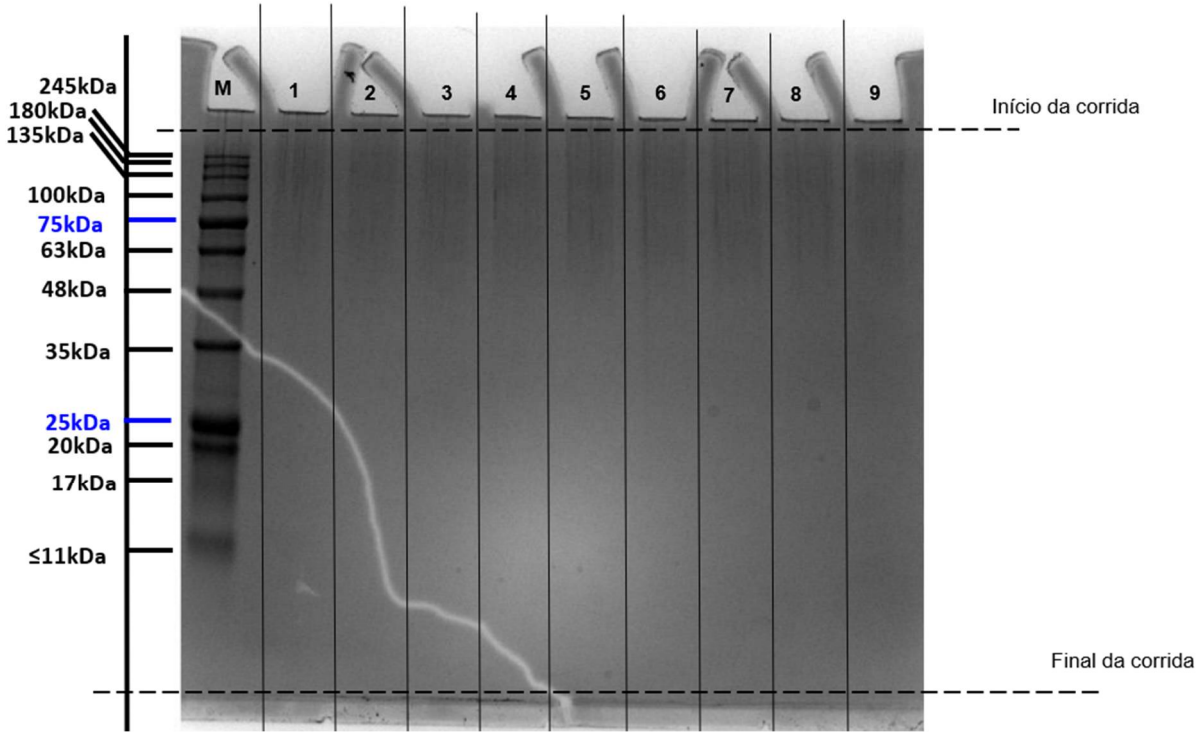
Figura 16 – SDS-PAGE das frações obtidas na purificação da *Pfu* DNA Polimerase.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: Onde M indica o marcador molecular (kDa), a faixa 1 indica a amostra contendo a *Pfu* DNA Polimerase não purificada e aquecida a 80 °C por 5 minutos, as faixas de 2 a 5 indicam as amostras da diluição do volume de 50 µL, com frações eluídas de: 80%, 30%, 20% e 10% de tampão de eluição respectivamente e as faixas de 6 a 8 indicam as amostras da diluição do volume de 5 µL, com frações eluídas com: 60%, 40% e 30% de tampão de eluição, respectivamente.

Figura 17 – SDS-PAGE das frações obtidas na etapa de purificação da *Pfu* DNA Polimerase.



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: Onde M indica o marcador molecular (kDa), as faixas de 1 a 7 indicam as amostrasa diluição do volume de 25 µL, com frações eluídas de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 80% de tampão de eluição respectivamente e as faixas 8 e 9 indicam as amostras da diluição do volume de 25 µL, que passaram por um processo de ultrafiltração utilizando tubos concentradores Vivaspin, eluídas em 40% e 50% de tampão de eluição, respectivamente.

De acordo com as Figuras 16 e 17, pode-se notar uma ausência da banda de 90 kDa correspondente à enzima *Pfu* DNA polimerase, indicando a falta de recuperação da proteína. No primeiro gel da Figura 16, a Faixa 1, foi submetida previamente a uma etapa de aquecimento a 80 °C por 5 min antes da corrida do gel a fim de retirar possíveis impurezas e proteínas contaminantes para análise em eletroforese. As faixas subsequentes, são provenientes das frações eluidas do equipamento de cromatografia líquida preparativa AKTA Prime Plus. Com base nesses resultados, não foi observada a banda de 90 kDa nem na amostra que foi somente aquecida a 80 °C por 5 minutos e nem nas amostras que foram purificadas.

Uma hipótese para o fato de que não foi possível observar nenhuma banda com nitidez no gel de eletroforese seria a possibilidade de interferência do tampão de eluição do cromatógrafo AKTA, que contém imidazol, e este, poderia interferir no resultado do gel. Quanto a identificação da banda de 90 kDa da enzima de interesse,

uma hipótese seria a pouca concentração da proteína de interesse nas frações purificadas. Pensando nisso, utilizou-se a ultrafiltração com tubos de Vivaspin para obter uma amostra mais concentrada, conforme visto na Figura 22, nas faixas 8 e 9, que também não obtiveram uma banda na região de 90 kDa.

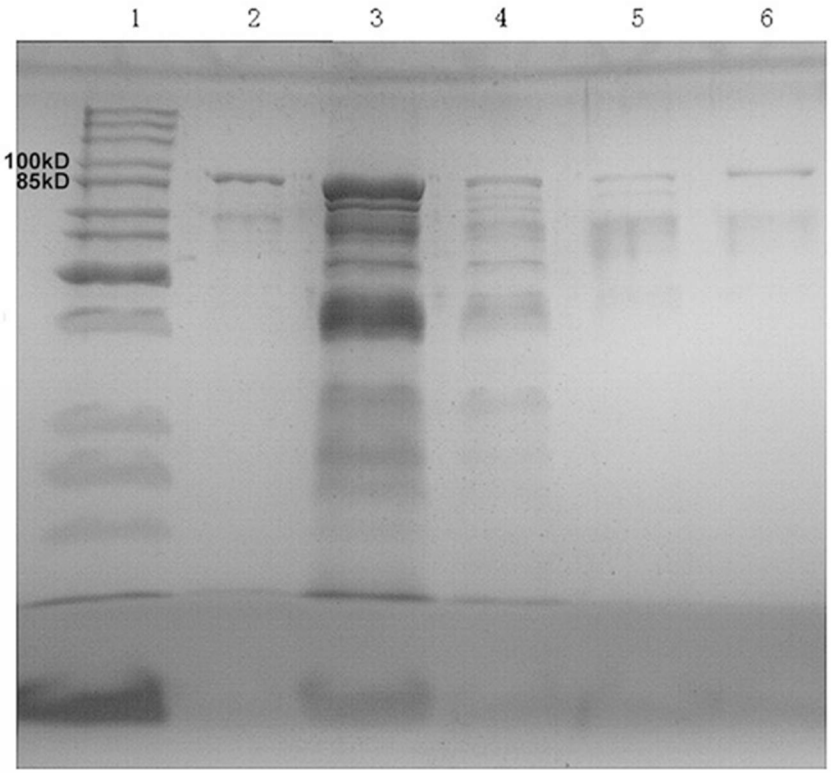
Quanto a coleta das frações purificadas pelo AKTA, esta não foi realizada da maneira correta, uma vez que foi coletado toda a fração do pico em um único tubo de ensaio, quando na verdade, a partir da formação do pico, deveriam ser coletadas mais de uma fração, visto que a enzima purificada poderia estar distribuída em diferentes pontos de identificação deste pico.

A partir destes resultados, é possível afirmar que não houve produção da *Pfu* DNA Polimerase, o que pode ter acontecido por algumas causas, como problemas de indução realizado pela lactose, problemas com o meio Mínimo utilizado no cultivo em biorreator, o qual provavelmente esgotou a fonte de carbono antes que a enzima pudesse ser produzida, ou uma possível instabilidade do plasmídeo presente nas células de *E.coli* BL21.

Uma possibilidade para a enzima não ter sido produzida envolve a proporção de equilíbrio de nitrogênio e fonte de carbono do meio, uma razão de 2,45:1, como pode ser visto no Apêndice B. À medida que o glicerol foi totalmente consumido, a célula também esgotou a fonte de nitrogênio ($NH4^+$) do meio, que são: $(NH_4)_2HPO_4$ e citrato de amônio e ferro III. Sendo assim, mesmo após inserir a lactose como indutor, ainda havia nitrogênio suficiente para utilizar a molécula como nova fonte de carbono, o que não aconteceu (Madigan *et al*., 2016).

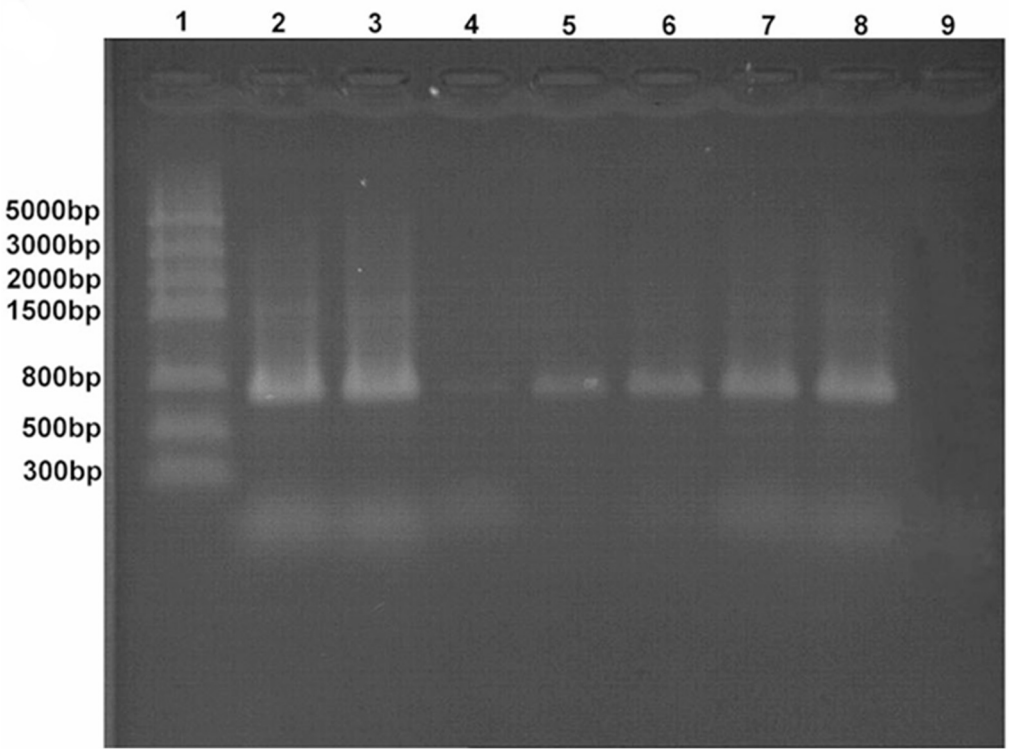
Além disso, a literatura indica que a produção bem-sucedida da *Pfu* DNA Polimerase em *E. coli* frequentemente envolve o uso de meio de cultura LB, indução com IPTG (Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídio) e rompimento celular por lisozima, como realizado no estudo de Zheng, Wang e Bi (2016). No referido trabalho, a eficácia do protocolo foi validada após a purificação por cromatografia de afinidade com coluna acoplada com íons de níquel, semelhante a coluna HisTrap Sepharose HP 1 mL utilizada neste estudo, que resultou na obtenção de uma enzima bioativa, confirmada por PCR. A Figura 18 mostra o resultado da produção e purificação da enzima, enquanto a Figura 19 mostra o gel de agarose resultante da reação de PCR.

Figura 18 – Análise por SDS-PAGE da purificação da *Pfu* DNA Polimerase.



Fonte: Zheng, Wang e Bi, (2016)
Legenda: Onde o número 1 indica o marcador molecular (kD), o número 2 indica uma enzima *Pfu* DNA Polimerase comercial, usada como controle positivo, o número 3 indica o lisado celular pré-tratado por aquecimento, o número 4 indica o material que não se ligou a coluna e os números 5 e 6 indicam as frações que obtiveram pico de eluição, contendo a enzima *Pfu* DNA Polimerase.

Figura 19 – Avaliação da atividade enzimática da *Pfu* DNA Polimerase purificada por PCR.



Fonte: Zheng, Wang e Bi (2016)
Legenda: Onde o número 1 indica o marcador molecular (bp), o número 2 indica fragmento de DNA amplificado por uma enzima *Pfu* DNA Polimerase comercial, usada como controle positivo, o número 3 indica fragmento de DNA amplificado pela enzima *Pfu* DNA Polimerase purificada, os números de 4 a 8 indica maior intensidade da apmplificação do fragmento de DNA, com uma maior quantidade de *Pfu* DNA Polimerase e o número 9 indica o controle negativo, sem a adição da enzima.

Dessa maneira, para confirmar as hipóteses levantadas, seria necessário repetir os experimentos descritos neste presente estudo, de maneira a confirmar os problemas identificados e conseguir uma produção efetiva da *Pfu* DNA Polimerase.

5.5 TRATAMENTO E ESTUDO DE REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS

A produção de DNA polimerase por *Escherichia coli* BL21 (DE3) resultou na geração de resíduos com potencial para reaproveitamento energético, como o sobrenadante rico em matéria orgânica, especialmente devido à presença da lactose, utilizada como indutor da expressão gênica, mas não consumida durante o cultivo pela bactéria. Entretanto, a presença de antibiótico no meio de cultivo, necessário para a

manutenção do plasmídeo recombinante, impôs um obstáculo adicional. A remoção ou degradação desse composto é essencial para viabilizar a digestão anaeróbia, uma vez que a ampicilina pode inibir a atividade das arqueias metanogênicas e de outras bactérias envolvidas na produção de biogás, além de trazer segurança para que não há descarte do antibiótico no meio ambiente.

Foi conduzido um estudo teórico para estimar a viabilidade da produção de biogás a partir desses resíduos, caso fossem tratados adequadamente para aplicação em digestores anaeróbios industriais. A partir dos dados obtidos por HPLC no início do cultivo, constatou-se que o meio de cultivo inicial continha 5,38 g/L de glicerol e 9,8 g/L de lactose. Utilizando as respectivas Equações 4 e 5 de combustão descritas na metodologia 4.8, foi possível estimar a Demanda Química de Oxigênio (DQO) inicial de cada composto. De acordo com a estequiometria da reação de combustão do glicerol e considerando sua massa molar, estimou-se 6,56 g/L de DQO. Já para a lactose, de acordo com a sua estequiometria da reação de combustão e considerando sua massa molar, estimou-se 10,98 g/L de DQO. Assim, a DQO total inicial estimada do meio de cultivo foi de 17,54 g/L. Os cálculos detalhados utilizados para essas estimativas estão descritos no Apêndice B.

Também foi possível determinar a DQO final restante do meio após o cultivo, isto é, a quantidade de matéria orgânica presente após o cultivo, utilizando a curva de calibração descrita na Equação 6. Os dados de absorbância obtidos podem ser observados no Apêndice A e os resultados na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6 – Resultados da concentração de DQO obtida para o sobrenadante do reator.

Amostra	Concentração DQO (g/L)	Média ± DP
1	10,298	
2	11,044	10,547±0,431
3	10,298	

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Onde as amostras 1, 2 3 representam uma triplicata analítica e DP o desvio padrão

Os resultados obtidos foram de acordo com o esperado, uma vez que apenas o glicerol foi consumido como fonte de carbono e a lactose atuou apenas como indutor, desta forma, obtêm-se um meio ainda rico em matéria orgânica que pode ser utilizado para produção de biogás, o qual pode ser convertido em energia renovável.

Diante disso, observou-se uma remoção de 7 g/L de matéria orgânica pela diferença entre o DQO inicial e DQO final do meio do cultivo, pela presença apenas da lactose como matéria orgânica no meio de cultura final. Com base na conversão teórica de 0,40 L de CH_4 por grama de DQO removida (Metcalf & Eddy, 2014), estimou-se uma produção potencial de 2,8 L de biometano. Considerando uma eficiência prática de 60%, a produção real foi estimada em 1,7 L de CH_4.

Projetando esse processo para uma escala industrial com 1000 L de meio de cultivo, e mantendo os parâmetros de eficiência, a produção de biometano poderia ser significativamente ampliada. Para essa aplicação, o uso de reatores anaeróbios do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) se mostra ideal, desde que seja feito o controle da carga orgânica (recomendada entre 2 a 6 kg DQO/m³·dia), com alimentação contínua ou semicontínua. Um dos desafios técnicos é a presença de antibióticos como a ampicilina no meio, que deve ser removida antes da digestão anaeróbia. Métodos como o processo de Fenton ou o aquecimento podem ser utilizados, embora apresentem limitações de eficiência e risco de formação de subprodutos tóxicos. (Pignatello; Oliveros; Makay, 2006; Andreozzi *et* al., 2005)

Alternativamente, uma proposta mais robusta seria a modificação genética da linhagem produtora, eliminando a necessidade do antibiótico ao integrar os genes de interesse diretamente no genoma, o que também reduziria riscos ambientais relacionados à liberação de antibiótico. Ainda assim, qualquer efluente ou biomassa residual contendo OGM deve passar por tratamento de inativação antes de ser enviado a uma estação de tratamento de efluentes (ETE).

Esses resultados reforçam o potencial de integração entre bioprocessos industriais e tecnologias de bioenergia, promovendo uma abordagem mais sustentável por meio do reaproveitamento dos resíduos gerados. Em uma planta de fabricação, pode-se imaginar a aplicação do biogás produzido como fonte de energia no próprio processo de fabricação, formando um processo circular e rentável. (Silveira, 2024).

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da produção da enzima *Pfu* DNA Polimerase por *Escherichia coli* BL21 (DE3), em pequena e grande escala, utilizando meio Mínimo com glicerol como fonte de carbono e lactose como indutor da expressão gênica. Além disso, foram avaliadas diferentes estratégias, rompimento celular e purificação da enzima, além do reaproveitamento dos resíduos gerados. Os resultados demonstraram houve crescimento celular e consumo completo do glicerol em ambas as escalas de cultivo, indicando sua viabilidade como fonte energética. A lactose, por sua vez, não foi metabolizada, sugerindo que atuou apenas como indutor da expressão. O processo de rompimento celular foi otimizado a partir da avaliação de diferentes proporções de massa celular em relação ao volume de tampão, bem como da variação no número de ciclos de sonicação, resultando em maior liberação de proteínas totais e melhor qualidade do sobrenadante para as etapas subsequentes de purificação. No entanto, a ausência da banda correspondente à enzima nas análises de SDS-PAGE indica que não houve produção detectável da *Pfu* DNA Polimerase nas condições testadas. Este desfecho pode estar relacionado a fatores como falhas na indução, limitações nutricionais do meio ou instabilidades no sistema de expressão. Também se consideram possíveis falhas técnicas e operacionais na etapa de purificação e na interferência do tampão de eluição na visualização das eletroforeses. É necessário, portanto, realizar a repetição dos experimentos com foco na otimização dos parâmetros de cultivo, indução e purificação, além da revisão de procedimentos operacionais para a redução de falhas operacionais e técnicas. Tais ajustes são fundamentais para validar a proposta de produção da enzima em meio Mínimo e para o desenvolvimento de um processo eficiente e reprodutível. Assim, mesmo diante das limitações encontradas, o estudo contribui para o avanço no uso de meios alternativos na biotecnologia industrial.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al*. **Biologia Molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **HisTrap HP, 1 ml and 5 ml**. Uppsala: Amersham Biosciences, 2004.

ANDREOZZI, R. *et al*. Thermal and Acid Hydrolysis of β-Lactam Antibiotics in Aqueous Solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 53, n. 1, p. 61-66, jan. 2005.

ASFLOUR, H. Z. *et al*. Large-scale production of bioactive terrein by *Aspergillus terreus* strain S020 isolated from the Saudi coast of the Red Sea. **Biomolecules,** v. 9, n. 9, p. 480, 2019.

BLATTNER, F. R. *et al*. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, set. 1997. DOI: 10.1126/science.277.5331.1453. Disponível em: https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453. Acesso em: 20 de jun. 2025.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: **Methods in enzymology.** Academic Press, 2000. p. 245-254. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8. Disponível em: https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8. Acesso em: 15 jun. 2025.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p 248-254, 1976.

BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J. H. Predicting multivariate responses in multiple linear regression. **Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology**, v. 59, n. 1, p. 3-54, 1997. DOI: 10.1111/1467-9868.00054. Disponível em: https://doi.org/10.1111/1467-9868.00054. Acesso em: 19 jun. 2025.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

BHILARE, K. D. *et al*. Machine learning modelling for the ultrasonication-mediated disruption of recombinant *E. coli* for the efficient release of nitrilase. **Ultrasonics**, v. 98, p. 72-81, 2019. DOI: 10.1016/j.ultras.2019.06.006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.06.006. Acesso em:19 jun. 2025.

BRIGANTI, L. E. R. P. P. L. D. B. **Clonagem e expressão de genes de Klebsiella pneumoniae responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em cepa mutante de *Escherichia coli*.** Orientador: Jonas Contiero. 2012. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

BRUSOTTI, G. et al. Advances on size exclusion chromatography and applications on the analysis of protein biopharmaceuticals and protein aggregates: a mini review. **Chromatographia**, v. 81, n. 1, p. 3-23, 2018. DOI:10.1007/s10337-017-3380-5. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10337-017-3380-5. Acesso em: 29 jun 2025.

CASTRO, L. S. et al. Interferon-based biopharmaceuticals: Overview on the production, purification, and formulation. Vaccines, v. 9, n. 4, p. 328, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9040328. Disponível em: https://doi.org/10.3390/vaccines9040328. Acesso em: 29 jun 2025.

CERRI, O. M. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. 2009. 179 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios.** ed. 2. Rio de Janeiro, 2007.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

CHUBUKOV, V. *et al*. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity Chemicals. **Systems Biology and Applications** v. 2, n. 16009, abr. 2016. DOI:10.1038/npjsba.2016.9. Disponível em: https://doi.org/10.1038/npjsba.2016.9. Acesso em: 20 de jun. 2025.

CLINE, J.; BRAMAN, J. C.; HOGREFE, H. H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 18, p. 3546-3551, 15 set. 1996. DOI: 10.1093/nar/24.18.3546. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3546. Acesso em: 20 jun. 2025.

COSTA, E.S; BARBOSA, O. F.; GIORDANO, G. **Reatores Anaeróbios de Manda de Lodo (UASB):** Uma abordagem concisa. 1. ed. Rio de Janeiro: COAMB, 2014. Disponível em: https://www.docsity.com/pt/docs/uasb-uma-abordagem-concisa/5742489 . Acesso em: 20 jun. 2025.

COURA, F. M. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34 , n. 9, set 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000900001. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000900001. Acesso em: 20 de jun. 2025.

DATE, M.; JASPAL, D. Pharmaceutical wastewater remediation: a review of tartigoreatment techniques. **Industrial & Engineering Chesmistry Research,** v. 62, 2023.

DE MELLO, M. F. A. *et al*. Strategies and engineering aspects of the scale-up of bioreactors for different bioprocesses. **Systems Microbiology and**

Biomanufacturing, v. 4, p. 365-385, 2023. DOI: 10.1007/s43393-023-00205-z. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s43393-023-00205-z. Acesso em: 16 jun. 2025.

ESVELT, K. M.; CARLSON, J. C.; LIU, D. R. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. **Nature**, v. 472, p. 499–503, 2011. DOI: 10.1038/nature09929. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nature09929. Acesso em: 20 jun. 2025.

FAROOQ, H. A. *et al*. A comprehensive review of *Pfu* DNA polymerase: extraction, production and applications**. International Journal of Science and Research Archive**, v. 13, n. 2, p. 929-946, 2024. Disponível em: https://ijsra.net. Acesso em: 20 jun. 2025.

GAUDINO, C. E. *et al*. Degradation of antibiotics in wastewater: new advances in cavitational treatments. **Molecules,** v. 26, n. 3, p. 617, 2021. DOI: 10.3390/molecules26030617. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules26030617. Acesso em: 20 jun. 2025.

HADI, M. I. *et al*. An efficient approach for overproduction of DNA polymerase from *Pyrococcus furios*us using an optimized autoinduction system in *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 324, 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-03724-7. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11274-024-03724-7. Acesso em: 20 jun. 2025.

HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

HASSAN, F. M.; SHAREEFDEEN, Z. Recent developments in sustainable management of healthcare waste and treatment technologies. **Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems**, v. 10, jun. 2022. DOI: 10.13044/j.sdewes.d8.0392. Disponível em: https://doi.org/10.13044/j.sdewes.d8.0392. Acesso em: 20 jun. 2025.

HOLLANDER, C. *et al*. A custom ÄKTA avant configuration enabling automated parallel protein purification. **Protein Expression and Purification,** [s.l.], v. 185, p. 105900, 2021. DOI: 10.1016/j.pep.2021.105900. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105900. Acesso em: 20 jun. 2025.

HOWARD, A. The lactose operon of *Escherichia coli*. **Nature Education**. Disponível em: The lactose operon of *Escherichia coli*. | Learn Science at Scitable. Acesso em: 18 de jun. 2025.

HU, J. H.; WANG, F.; LIU, C. Z. Development of an efficient process intensification strategy for enhancing *Pfu* DNA polymerase production in recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 651-659, 2015. DOI: 10.1007/s00449-014-1304-4. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00449-014-1304-4. Acesso em: 19 jun. 2025.

JESUINO, A. C. B. M. **Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção de proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)**. 2020. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). Araraquara, 2020.

KOPP, J. *et al*. Impact of Glycerol as Carbon Source onto Specific Sugar and Inducer Uptake Rates and Inclusion Body Productivity in *E. coli* BL21(DE3). **Bioengineering** (Basel). v. 4, p. 365-385, out. 2017. DOI: 10.3390/bioengineering5010001. Disponível em: https://doi.org/10.3390/bioengineering5010001. Acesso em: 19 de jun. 2025.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. Disponível em: https://doi.org/10.1038/227680a0. Acesso em: 21 jun. 2025.

LOBATO, L. C. da S. **Aproveitamento Energético de Biogás Gerado em Reatores UASB Tratando Esgoto Doméstico** Orientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo. 2011. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: http://hdl.handle.net/1843/ENGD-8KYNF3. Acesso em: 17 jun. 2025.

LUNDBERG, K. S. *et al.* High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**, v. 108, n. 1, p. 1-6, 1991. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90488-L. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90488-L. Acesso em: 20 jun. 2025.

LUPATINI, A. L. *et al*. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p. 1028-1035, 2017. Disponível em: DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.036. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.036. Acesso em: 20 jun. 2025.

MADIGAN, M. T. *et al*. **Microbiologia de Brock***.* 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Comparison of response surface methodology and artificial neural network approach towards efficient ultrasound-assisted biodiesel production from muskmelon oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23,p. 192-200, 2015. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.019. Acesso em: 26 maio 2025.

MAWANG, C. I.; AZMAN, A. S.; FUAD, A. S. M.; AHAMAD, M. Actinobacteria: an eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants. **Biotechnology Reports**, v. 32, dez. 2021. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00679. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00679.. Acesso em: 20 jun. 2025.

MERAMO-HURTADO, S. *et al.* Inherent safety assessment of industrial-scale production of chitosan microbeads modified with TiO_2 nanoparticles. **Biomolecules**,

v. 11, n. 4, p. 568, 2021. DOI: 10.3390/biom11040568. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biom11040568. Acesso em: 20 jun. 2025.

METCALF; EDDY. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2014.

MIWA, A. C. P. *et al.* Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 207-213, 2008. DOI: 10.1590/S1413-41522008000200014. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1413-41522008000200014. Acesso em: 22 jun. 2025.

NAG, N.; KHAN, H.; TRIPATHI, T. Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli.* In: **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods.** Chapter 1: Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli*. Academic Press, 2022. p. 1-12. DOI: 10.1016/B978-0-323-90264-9.00001-5. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90264-9.00001-5. Acesso em: 21 jun. 2025.

NARWAL, M. *et al*. Crystal structure of chikungunya virus nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site**. International Journal of Biological Macromolecules,** Amsterdam, v. 116, p. 451-462, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.007. Acesso em: 19 jun. 2025.

NURYANA, I. et al. Codon optimization of a gene encoding DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 129, 2023. DOI: 10.1186/s43141-023-00605-7. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s43141-023-00605-7. Acesso em: 30 jun. 2025.

OLIVEIRA, J. M. Produção de corantes por *Talaromyces amestolkiae* sob estresse metabólico. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, v. 12, n. 2, p. 25-32, 2020.

PALIWAL, A.; DUTTA, H. **Mathematical Modeling in Fermentation Process**, 2023.

Pariente, M. I. *et al.* Critical review of technologies for the on-site treatment of hospital wastewater: From conventional to combined advanced processes. **Journal of Eviromental Management,** v. 320, out. 2022. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115769. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115769. Acesso em: 21 jun. 2025.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 1-84, 2006. DOI: 10.1080/10643380500326564. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10643380500326564. Acesso em: 20 jun. 2025.

PRAKASH, S.; JOHNSON, R. E.; PRAKASH, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 317–353, jul. 2005. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250. Acesso em: 17 jun. 2025.

PRUDEN, A. *et al.* Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. **Environmental Health Perspectives,** v. 122, p. 878-885, jun. 2013. DOI: 10.1289/ehp.1206446. Disponível em: https://doi.org/10.1289/ehp.1206446. Acesso em: 17 jun. 2025.

RABILLOUD, T.; LELONG, C.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 11, p. 2064-2077, 2010. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.05.016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016. Acesso em: 18 jun. 2025.

RAJENDAR, B. *et al*. Multi angle light scattering as a process analytical technology tool for real-time monitoring of molar mass of protein-polysaccharide conjugate fractions. **Journal of Chromatography Open**, v. 2, p. 100045, 2022. DOI: 10.1016/j.jcoa.2022.100045. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100045. Acesso em: 15 jun. 2025.

RASTADTER, K. *et al*. kLa based scale-up cultivation of the extremophilic archaeon Sulfolobus acidocaldarius: from benchtop to pilot scale. **Bioengineering and Biotechnology,** Viena, v. 11, ago. 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1160012. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1160012. Acesso em: 16 jun. 2025.

RATH, A. et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 6, p. 1760-1765, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0813167106. Disponível em: https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106. Acesso em: 18 jun. 2025.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology,** v. 5, p. 172, 2014. SCHU. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172. Acesso em: 19 jun. 2025.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, J. C. F. **Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de L-aparaginase II.** Orientador: Michele Vitolo. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmaceûticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SAPKOTA, B.; PARIATAMBY, A. Pharmaceutical waste management system - Are the current techniques sustainable, eco-friendly and circular? A review. **Waste Management,** v. 168, p. 83-97, ago. 2023. DOI: 10.1016/j.wasman.2023.05.052. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.05.052. Acesso em: 20 jun. 2025.

SCHUGERL, K.; WASE, D. A. J. **Bioreaction engineering**. Characteristics Features of Bioreactors. John Wiley and Sons, 1991.

SILVEIRA, E. **Vinhaça para gerar energia:** Além de fertilizante, resíduo do etanol poderá ser utilizado para produzir eletricidade. 238. ed. São Paulo: pesquisafapesp, 2015.

SINGH, J.R. *et al*. Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. **Gene**, v. 480, n. 1-2, p.1-9, jul. 2011. DOI: 10.1016/j.gene.2011.03.001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.03.001. Acesso em: 20 de jun. 2025.

SOUZA, C. *et al*. Caracterização molecular de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções extraintestinais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 55–60, 2016. DOI: 10.5123/S2176-62232016000200010. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000200079. Acesso em: 19 jun. 2025.

SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

TEROL, G. L. *et al*. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. **Microbial Cell Factories,** v. 18, n. 151, 2019. DOI: 10.1186/s12934-019-1202-1. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1. Acesso em: 20 de jun. 2025.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Taq DNA Polymerase (native). Part no. 18038.pps, Manual MAN0001335, Rev. date: 7 jun. 2010*. [S.l.]: Thermo Fisher Scientific, 2010. 4 p. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/taqnative_pps.pdf. Acesso em: 19 jun. 2025.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017

TRAN, K. T. *et al.* Beneficiais knockouts in *Escherichia coli* for producing hydrogen from glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 99. jan. 2025. DOI: 10.1007/s00253-014-6338-7. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-014-6338-7. Acesso em: 21 de jun. 2025.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Anaerobic Sewage Treatment: A Practical Guide for Regions with a Hot Climate**. Chichester: Wiley, 1994.

VASCONCELOS, F.R. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77. set. 2010. DOI: 10.1590/1808-1657v77p4052010. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p4052010. Acesso em: 20 de jun. 2025.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 179–185, 2006. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.00. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.00. Acesso em: 30 jun. 2025.

WALKER, J. M. **The protein protocols handbook**. 3. ed. Totowa: Humana Press, 2009.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals:** Biochemistry and Biotechnology. 2. ed. Chichester: Wiley, 2018.

WOOD, D. W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. **Current Opinion in Structural Biology**, Amsterdam, v. 26, p. 54-61, jun. 2014. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.04.006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.04.006. Acesso em: 18 jun. 2025.

XIA, J. *et al*. Advances and Pratices of Bioprocess Scale-up. *In:* BAO, J; YE, Q.; JIANGZHONG, J. **Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II.** p. 137-151.

XIANG, Q. *et al.* Synergistic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by plasma-activated water and mild heat. **Food Control,** v. 106, dez. 2019.

ZAIA, D. A.; ZAIA, C. T. B.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000600020. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020. Acesso em: 17 jun. 2025.

ZHENG, W.; WANG, Q.; BI, Q. Construction, Expression, and Characterization of Recombinant *Pfu* DNA Polymerase in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 35, p. 145-153, 2016. DOI: 10.1007/s10930-016-9651-4. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10930-016-9651-4. Acesso em: 19 jun. 2025.

ZHOU, Y. *et al.* Production of recombinant human DNA polymerase delta in a Bombyx mori bioreactor**. *PLoS one***, v. 6, n. 7, p. e22224, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022224. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022224. Acesso em: 15 jun. 2025.

APÊNDICE A – CURVA BSA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A curva de calibração obtida apresentou coeficiente de determinação ($R^2 > 0,98$), valor superior ao mínimo considerado ideal (≥ 0,95), indicando forte correlação linear entre a concentração de proteína e a resposta óptica. Essa linearidade é essencial, pois permite que pequenas variações na concentração das amostras sejam refletidas de forma proporcional na absorbância, reduzindo o risco de superestimação ou subestimação dos dados medidos (Moosavi; Ghassabian, 2018).

A equação gerada (Equação 6) pode, portanto, ser empregada como modelo matemático válido para o cálculo das concentrações de proteína liberadas após o rompimento celular, aplicável tanto a cultivos em pequena quanto em larga escala.

A escolha pela reconstrução da curva de calibração foi motivada pela necessidade de adequação ao intervalo de concentrações obtido nas amostras da produção de Pfu DNA Polimerase, permitindo corrigir possíveis desvios na quantificação e minimizar variações analíticas. Além disso, a padronização das leituras em triplicata contribuiu para a redução de erros sistemáticos, assegurando maior confiabilidade e robustez aos resultados.

REFERÊNCIAS

MOOSAVI,S. M.; GHASSABIAN, S. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. **Calibration and Validation of Analytical Methods – A Sampling of Current Approaches**. London: InTech, 2028. DOI: 10.5772/intechopen.72932. Disponível em: http:/dx.doi.org/10.5772/intechopen.72932. Acesso em: 20 jun. 2025.

APÊNDICE B – DADOS BRUTOS

Tabela 7 – Dados do crescimento microbiano (DO_{600}) do cultivo em escala de bancada.

Tempo (horas)	DO_{600} cultivo 1	DO_{600} cultivo 2
0	0,016	0,021
24	0,098	0,062
27	0,293	0,101
48	1,121	1,011

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: O DO_{600} cultivo 1 indica os dados de crescimento celular em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose desde o início, o DO_{600} cultivo 2 indica os dados de crescimento celular em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose após os valores de DO_{600} de crescimento celular chegarem a 0,1 em leitora de microplacas.

Tabela 8 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do cultivo em escala de bancada determinado por HPLC.

Amostras	Área para cálculo da concentração de lactose	Área para cálculo da concentração de glicerol
Branco*	158150,000	85400,000
1	160011,000	0,000
2	172311,000	0,000
3	147873,333	0,000
4	148721,333	0,000
5	171983,000	0,000
6	148292,333	0,000

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: No qual o branco é composto pelo meio de cultivo. Todas as áreas dos picos foram obtidas do cromatograma após a corrida em HPLC. As amostras de 1 a 3 indicam os pontos retirados após 48 horas dos cultivos com indução desde o início e as amostras de 4 a 6 indicam os pontos retirados após 48 horas dos cultivos que receberam lactose após os valores de DO_{600} de crescimento celular chegar a 0,1 em leitora de microplacas.

Tabela 9 – Dados de proteínas totais pelo método de Bradford do cultivo em escala de bancada.

Amostras	Absorbância
Cultivo 1	0,256
	0,162
	0,179
Cultivo 2	0,239
	0,203
	0,213

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: O Cultivo 1 indica os dados de proteínas totais em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose desde o início, o Cultivo 2 indica os dados de proteínas totais em meio Mínimo, com glicerol como fonte de carbono e com indução por lactose após os valores de DO_{600} de crescimento celular chegarem a 0,1 em leitora de microplacas.

Tabela 10 – Dados do crescimento microbiano (DO_{600}) do cultivo em reator.

Tempo (horas)	DO_{600}
0*	0,378
1	0,297 ± 0,018
3	0,373 ± 0,017
5	0,471 ± 0,017
24	1,484 ± 0,076

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Legenda: *Dado lido apenas uma vez, sem triplicata.

Tabela 11 – Concentração de glicerol e lactose (g/L) do sobrenadante do reator determinado por HPLC.

Amostras	Área para cálculo da concentração de lactose	Área para cálculo da concentração de glicerol
Branco*	0	1399939
0h	0	258208,667
1h	117433,000	56163,000
3h	107367,667	36159,500
5h	119809,333	64525,000
24h	127161,000	0,000

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: *No qual o branco é composto pelo meio de cultivo. Todas as áreas dos picos foram obtidas do cromatograma após a corrida em HPLC.

Tabela 12 – Valores de absorbância obtidos pelo método de Bradford para a variação da razão massa de células:volume de tampão para as amostras de 24h do reator.

Razão (g:mL)	Absorbância
0,025	0,111
0,05	0,137
0,075	0,151
0,1	0,216

Fonte: Elaborado pelos autores 2025.
Legenda: Os valores de absorbância foram obtidos após o tempo de reação pela leitura em leitora de microplacas a 595nm.

Tabela 13 – Valores de absorbância obtidos pelo método de Bradford para a variação do número de ciclos no sonicador com a razão 0,1g:mL para as amostras de 24h do reator.

Número de ciclos	Absorbância
2	0,182
4	0,216
6	0,241*
8	0,232 *

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Os valores de absorbância foram obtidos após o tempo de reação pela leitura em leitora de microplacas a 595nm. *Valores com fator de diluição igual a 2.

Tabela 14 – Estimativa da concentração e média de DQO obtidas por absorbância do sobrenadante.

Absorbância	Concentração DQO (g/L)	Média ± DP
0,165	10,298	
0,176	11,044	10,547±0,431
0,165	10,298	

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).
Legenda: Onde DP = desvio padrão

APÊNDICE C – CÁLCULOS

- Cálculo da proporção de nitrogênio e carbono no meio de cultivo Mínimo utilizado

A razão molar entre carbono e nitrogênio (C:N) do meio de cultivo foi estimada com base na concentração dos componentes adicionados. As principais fontes de carbono foram o glicerol (6 g/L) e o ácido cítrico (1,7 g/L). Considerando suas respectivas massas molares (92,09 g/mol e 192,12 g/mol) e o número de átomos de carbono por molécula (3 e 6, respectivamente), foi calculado um total aproximado de 0,2487 mol de carbono por litro.

As fontes de nitrogênio foram o fosfato de amônio dibásico [$(NH_4)_2HPO_4$, 4 g/L], que fornece dois átomos de nitrogênio por molécula, e o citrato de amônio e ferro III (10 g/L), estimado com massa molar de aproximadamente 245 g/mol e um átomo de nitrogênio por molécula. Essas fontes resultam em um total de 0,1014 mol de nitrogênio por litro.

Com base nesses valores, a proporção molar carbono:nitrogênio (C:N) do meio é de aproximadamente 2,45:1.

- Cálculos da DQO inicial do meio do cultivo: estimativa

Através dos dados obtidos do HPLC em módulos anteriores, sabe-se que no início estavam presentes 5,38 g/L de glicerol e 9,8 g/L de lactose. Dessa forma, podemos estimar a DQO para cada um desses carboidratos.

Calculando a DQO inicial do glicerol:

A equação de combustão do glicerol é representada pela equação 3.

Logo pode-se assumir que 1 mol de glicerol consome 3,5 mols de oxigênio na sua combustão. Sendo a massa molar do oxigênio (O_2) de 32 g/mol e do glicerol ($C_3H_8O_3$) de 92 g/mol podemos determinar a DQO específica (g O_2 / g glicerol):

$$DQO_{gli} = (3{,}5 \times 32) \div 92 = 1{,}216 \text{ g oxigênio/ g glicerol}$$

Como no início havia 5,38 g/L de glicerol, multiplicando esse valor pela DQO_{gli} têm-se 6,56 g/L de DQO_{glic} no início.

Calculando a DQO inicial da lactose:

Partindo do mesmo princípio, têm-se a reação de combustão representada pela equação 4.

Assim, 1 mol de lactose consome 12 mols de oxigênio. Sendo a massa molar da lactose de 342 g/mol, o cálculo de DQO pode ser feito da seguinte forma:

$$DQO_{lac} = (12 \times 32) \div 342 = 1{,}12 \text{ g oxigênio/ g lactose}$$

Como no início havia 9,8 g/L de glicerol, multiplicando esse valor pela DQO_{lac} têm-se 10,98 g/L de DQO_{lac} no início. Dessa forma, pode se estimar o valor da DQO total inicial sendo de 17,54 g/L (DQO_{lac} + DQO_{glic}).

- Correlação da absorbância em 600 nm com espectrofotômetro e leitora de microplacas

Tabela 15 – Correlação da absorbância em 600 nm com espectrofotômetro e leitora de microplacas.

Espectrofotômetro			**Leitora de Placas (200 µL)**			**Leitora de Placas (100 µL)**		
A1	**A2**	**Média**	**A1**	**A2**	**Média**	**A1**	**A2**	**Média**
0,773	0,754	0,7635	0,3480	0,3448	0,3464	0,1821	0,1640	0,1730
0,431	0,450	0,4405	0,1790	0,1890	0,1840	0,0866	0,0853	0,0859
0,056	0,125	0,0905	0,0464	0,0477	0,0470	0,0214	0,0198	0,0206

Fonte: obtida através de aluno parceiro do laboratório.
Legenda: A1 indica absorbância 1 e A2 absorbância 2.