

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Campus de Araraquara

AMANDA GIULIANA DE ALMEIDA

**Análise da Produção de Endoglucanase por *E. coli* DH5 α Recombinante Contendo o
Plasmídeo PT7T3BsXA**

ARARAQUARA
2026

Amanda Giuliana de Almeida

**Análise da Produção de Endoglucanase por *E.coli* DH5 α Recombinante
Contendo o Plasmídeo PT7T3BsXA, vetor constitutivo**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade
de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de bacharel em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

**Araraquara
2026**

A447a

Almeida, Amanda Giuliana de

Análise da Produção de Endoglucanase por E. coli DH5
Recombinante Contendo o Plasmídeo PT7T3BsXA / Amanda
Giuliana de Almeida. -- Araraquara, 2026
101 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara
Orientador: Álvaro de Baptista Neto

1. Produção heteróloga. 2. Endoglucanase. 3. E.coli DH5 . 4.
Plasmídeo PT7T3BsXA. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar, fortalecer e iluminar cada passo desta jornada. À minha família, pelo amor e apoio incondicional: minha mãe, Abigail Aparecida da Silva, meu pai, Givando Ribeiro de Almeida, e meu irmão, Leonardo Felipe de Almeida; minha tia e madrinha, Sueli Aparecida Peregrine, meu tio e padrinho, Tércio Peregrine, minha tia Neusa Aparecida da Silva, meu tio Benedicto da Silva, e minha prima Aparecida Martins de Oliveira, que foi como uma segunda mãe para mim. Aos meus amigos de turma, Ieda Gabriela Nascimento, Victória Luíza Mameli, Izabela Barbosa e Thiago Dotti, por compartilharem risadas, desafios e momentos de aprendizado ao longo do curso. Ao meu professor e orientador, Dr. Álvaro de Baptista, agradeço pelo suporte, paciência e orientação, fundamentais para a realização deste TCC. Por fim, não poderia deixar de mencionar meus fiéis companheiros, meus cachorrinhos Safira, Babi e Jacob, que me ofereceram conforto, alegria e força nos momentos mais difíceis.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos e práticas em modificação genética, com foco na produção da enzima endoglucanase a partir da cepa *E. coli* DH5 α , geneticamente modificada por meio da inserção do plasmídeo PT7T3BsXA. A metodologia consistiu na análise da expressão heteróloga da enzima, testando diferentes condições de cultivo em meio SB suplementado com glicose, glicerol, sulfato de magnésio e combinações de sais sintéticos, a fim de identificar a influência dessas variáveis na produção e atividade da endoglucanase. Durante a experimentação foram empregadas técnicas de biotecnologia molecular, como transformação bacteriana, indução da expressão gênica e avaliação da atividade enzimática. Os resultados demonstraram variações significativas na expressão da enzima em função das condições de cultivo e das fontes de carbono utilizadas, evidenciando a importância da otimização do processo para a produção eficiente de enzimas recombinantes. Além da relevância científica e tecnológica, a endoglucanase apresenta potencial ambiental por atuar na degradação da celulose e favorecer o aproveitamento sustentável de resíduos lignocelulósicos. Nesse contexto, o estudo está alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, especialmente ao ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e ao ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao contribuir para o desenvolvimento de biotecnologias voltadas à inovação industrial e à utilização mais sustentável de recursos renováveis. Dessa forma, o trabalho contribui para o avanço do conhecimento em expressão heteróloga e para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas com potencial aplicação acadêmica, industrial e ambiental.

Palavras-chave: biotecnologia, *E. coli*, endoglucanase, expressão heteróloga, modificação genética, Organização das Nações Unidas, ODS9, ODS12

ABSTRACT

This study aimed to deepen knowledge and practical experience in genetic modification, focusing on the production of the enzyme endoglucanase from the *Escherichia coli* DH5 α strain, genetically modified through the insertion of the PT7T3BsXA plasmid. The methodology consisted of analyzing the heterologous expression of the enzyme under different cultivation conditions in SB medium supplemented with glucose, glycerol, magnesium sulfate, and combinations of synthetic salts, in order to identify the influence of these variables on endoglucanase production and activity. During the experimental procedures, molecular biotechnology techniques were employed, including bacterial transformation, gene expression induction, and enzymatic activity assessment. The results demonstrated significant variations in enzyme expression according to the cultivation conditions and carbon sources used, highlighting the importance of process optimization for the efficient production of recombinant enzymes. In addition to its scientific and technological relevance, endoglucanase presents environmental potential due to its role in cellulose degradation and in promoting the sustainable utilization of lignocellulosic residues. In this context, the study is aligned with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure) and SDG 12 (Responsible Consumption and Production), by contributing to the development of biotechnologies aimed at industrial innovation and the more sustainable use of renewable resources. Therefore, this work contributes to the advancement of knowledge in heterologous expression and to the development of biotechnological strategies with potential academic, industrial, and environmental applications.

Keywords: biotechnology, *E. coli*, endoglucanase, heterologous expression, genetic modification, United Nations, SDG 9, SDG 12.

Amanda Giuliana de Almeida

**Análise da Produção de Endoglucanase por *E. coli* DH5a Recombinante
Contendo o Plasmídeo PT7T3BsXA**

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

Data da defesa: 26 / 05 / 2026

BANCA EXAMINADORA

(Titulares):

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

Instituição (UNESP Araraquara) – Orientador(a)

Me. Mateus Scontri

Instituição (UNESP Araraquara)

Me. Júlio Gabriel Oliveira de Lima

Instituição (UNESP Araraquara)

(Suplentes):

Prof. Dr. Guilherme Peixoto

Instituição (UNESP Araraquara)

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento

Instituição (UNESP Araraquara)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural da celulose mostrando sua composição química, numeração dos átomos de carbono e sua unidade de repetição: a celobiose.....	16
Figura 2- Representação esquemática da estrutura molecular da celulose.....	22
Figura 3 –Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico, envolvendo a atuação sinérgica das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da celulose.....	23
Figura 4: Endoglucanase, estrutura em barril e sua estrutura química.....	24
Figura 5- <i>E. coli</i>	26
Figura 6 - Esquema reduzido de processos envolvidos na produção de biofármacos.....	28
Figura 7-Processo de transformação genética em bactérias <i>E. coli</i>	29
Figura 8- Ciclo de Krebs.....	35
Figura 9- Guia metabólica glicerol.....	37
Figura 10- Esquema do metabolismo da glicose em condições aeróbicas e anaeróbicas (Glicólise).....	38
Figura 11- Preparo de células competentes.....	49
Figura 12 - Placas de controle com positivo à esquerda, controle negativo à direita.....	50
Figura 13- Transformação bacteriana por choque térmico.....	52
Figura 14 - Crescimento Pós- Transformação.....	54
Figura 15- Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	59
Figura 16- Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	61
Figura 17- Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	62
Figura 18- Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	64
Figura 19- Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo em meio de sais com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	66
Figura 20- Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio de sais com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	67

Figura 21- Monitoramento da densidade óptica em longo do tempo em meio de sais com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	68
Figura 22- Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio de sais com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental).....	70
Figura 23- Evolução temporal da densidade óptica nos diferentes meios de cultivo.....	72
Figura 24- Comparação da densidade óptica entre os meios de cultivo em diferentes tempos experimentais.....	73
Figura 25- Produção de endoglucanase nos diferentes meios de cultivo.....	75
Figura 26- Comparação da atividade de endoglucanase entre os meios de cultivo em 24, 48 e 72 horas	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Composição do meio LB.....	43
Tabela 2– Composição do meio SB.....	44
Tabela 3- Composição do meio FSB.....	45
Tabela 4- Meio sintético criado.....	46
Tabela 5 - Preparo da solução de acetato de potássio 1 M (10 mL).....	55
Tabela 6 - Valores de absorbância e concentração da enzima em diferentes condições de tratamento térmico e diluição.....	58

SUMÁRIO

1.Introdução.....	16
2.Objetivos.....	19
3. Revisão bibliográfica.....	20
3.1 Enzimas.....	20
3.1.1 Definição e mecanismo da enzima.....	20
3.1.2 Mercado e demanda.....	21
3.2 Celulases.....	22
3.2.1 Endoglucanase.....	23
3.2.2 Exoglucanases.....	25
3.3 Produção heteróloga.....	25
3.3.1 <i>E. coli</i>	26
3.3.2. <i>E. coli</i> e seu metabolismo.....	27
3.3.3 Modificação genética da <i>E.coli</i>	27
3.3.4 Marcadores de seleção e uso de antibióticos.....	29
3.4 Variáveis e condições que afetam a síntese e atividade da celulase.....	30
3.4.1 Temperatura e pH.....	30
3.4.2 Fontes de carbono e nitrogênio.....	31
3.4.3 Aspectos Relacionados à condição e ao tempo de cultivo.....	31
3.4.4. A cepa <i>E. coli</i> DH5α e inserção do plasmídeo PT7T3BsXA.....	32
3.4.5 Estratégias de alimentação e seus efeitos sobre o crescimento celular e o metabolismo de <i>E. coli</i>	33
3.5 Rotas metabólicas.....	35
3.5.1 Ciclo de Krebs.....	35
3.5.2 Metabolismo de fontes de carbono em <i>E.coli</i>	37
3.5.2.1 Metabolismo do glicerol.....	37
3.5.2.2 Metabolismo da glicose.....	38
3.5.2.3 Comparação entre o Glicerol e Glicose como Fonte de carbono.....	39
3.5.3 O efeito regulador do sulfato de magnésio.....	40
3.6 Meios de cultivo.....	41
3.6.1 Meios complexos.....	41

3.6.2 Meios sintéticos.....	41
4. Materiais e métodos.....	43
4.1 Meios de Cultura.....	43
4.1.1 Meios Complexos.....	43
4.1.1.1 Preparo do Meio Luria Bertani.....	43
4.1.1.2 Preparo do meio SB.....	44
4.1.1.3 Preparo do meio FSB - <i>Frozen storage buffer</i>	45
4.1.2 Preparo do Meio Sintético.....	46
4.2 Preparação e manipulação celular.....	46
4.2.1. Preparo da solução de Ampicilina.....	46
4.2.2 Preparo de células quimiocompetentes.....	47
4.2.3 Transformação de células quimiocompetentes.....	50
4.2.4 Controle positivo e negativo.....	50
4.2.5 Cultivo das células transformadas.....	53
4.3 Ensaio enzimáticos.....	55
4.3.1 Preparo do CMC 4% (Carboximetilcelulose sódica).....	55
4.3.2 Determinação da concentração de enzima através de DNS.....	56
4.3.3 Determinação da curva de calibração da glicose em tubo de ensaio.....	57
5. Resultados e Discussões.....	58
5.1 Determinação de Temperatura ideal a ser utilizada para medir a atividade dos meios.....	58
5.2 Experimentos realizados em meio complexo.....	59
5.2.1 Crescimento celular (glicerol e $MgSO_4$).....	59
5.2.2 Atividade enzimática (glicerol e $MgSO_4$).....	61
5.2.3 Crescimento celular (glicose e $MgSO_4$).....	62
5.2.4 Atividade enzimática (glicose e $MgSO_4$).....	64
5.3 Experimentos realizados em meios sintéticos.....	66
5.3.1 Crescimento celular (glicerol e $MgSO_4$).....	66
5.3.2 Atividade enzimática (glicerol e $MgSO_4$).....	67

5.3.3 Crescimento celular (glicose e MgSO_4).....	68
5.3.4 Atividade enzimática (glicose e MgSO_4).....	70
5.3.5 Avaliação do crescimento celular nos diferentes meios de cultivo.....	71
5.3.6 Avaliação da atividade de endoglucanase nos diferentes meios de cultivo.....	74
5.3.7 Análise criteriosa de por que os meios com baixas Densidades ópticas tiveram atividade considerável no estudo.....	77
6. Conclusão.....	79
Referências	80
Anexos.....	89
ANEXOS A – Equações.....	89
Anexo A1- Concentração de Enzimas.....	89
Anexo A2- Coeficiente angular da reta.....	89
Apêndices.....	90
APÊNDICE B - Determina da curva de calibração da Glicose em 100°C	90
Apêndice B1 - Absorbância da Glicose em triplicata em diferentes diluições.....	90
Apêndice B2 - Diluição da concentração molar da glicose vs Absorbância 540 nm.....	91
Apêndice B3 - Concentração da glicose mM versus Absorbâncias 540 nm.....	91
APÊNDICE C –Tabelas de DO e atividade enzimática.....	92
Apêndice C1 – Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 24 h, diluição 1:10.....	92
Apêndice C2 – Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 48 h, diluição 1:10.....	92
Apêndice C3 – Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 72 h, diluição 1:10.....	93
Apêndice C4 - Atividade endoglucanase, 24h, sem diluição.....	93
Apêndice C5 - Atividade endoglucanase, 48h, diluição 1:5.....	94

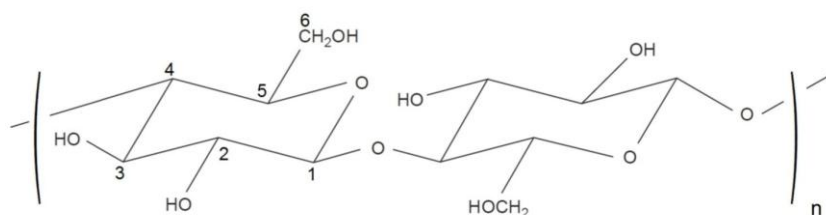
Apêndice C6 - Atividade endoglucanase, 72h, diluição 1:5.....	94
Apêndice C7 – Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 24 h, sem diluição.....	95
Apêndice C8 – Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 48 h, diluição 1:10.....	95
Apêndice C9 – Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 72 h, diluição 1:10.....	96
Apêndice C10 - Atividade endoglucanase, 24h, sem diluição.....	96
Apêndice C11 - Atividade endoglucanase, 48h, diluição 1:5.....	97
Apêndice C12 - Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5.....	97
Apêndice C13 – Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 24 h, diluição1:10.....	98
Apêndice C14 – Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 48 h, diluição1:10.....	98
Apêndice C15 – Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 72 h, diluição1:10.....	98
Apêndice C16 - Atividade endoglucanase, 24h, sem diluição.....	99
Apêndice C17 - Atividade endoglucanase, 48 h, diluição 1:5.....	99
Apêndice C18 - Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5.....	99
Apêndice C19 – Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 24 h, diluição1:10.....	100
Apêndice C20 – Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 48 h, diluição1:10.....	100
Apêndice C21 – Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 72 h, diluição1:10.....	100

Apêndice C22 - Atividade endoglucanase, 24 h, diluição 1:5.....	101
Apêndice C23 - Atividade endoglucanase, 48h, diluição 1:5.....	101
Apêndice C24 - Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5.....	101

1.Introdução

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é um polissacarídeo estrutural sendo o principal componente da estrutura rígida de células vegetais, sendo constituída por polímero de glicoses ligados por ligação do tipo β -1-4 (Loran et al, 2013). Como a celulose apresenta uma estrutura química complexa e de alta massa molecular, sua degradação requer a ação de enzimas específicas, produzidas por microrganismos, como as celulasas. Essas enzimas atuam na clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas, presentes na estrutura da celulose, promovendo sua hidrólise. Desse modo, a degradação da celulose tem como principal finalidade a obtenção de açúcares mais simples, como a glicose, que podem ser utilizados em diferentes processos metabólicos (Silva et al., 2020).

Figura 1- Fórmula estrutural da celulose mostrando sua composição química, numeração dos átomos de carbono e sua unidade de repetição: a celobiose.



fonte: adaptado de O'Sullivan, (1997)

É de suma importância compreender a estrutura da celulose e sua abundância na natureza, tal entendimento vem da importância para sua quebra obtendo um melhor aproveitamento do material celulósico em processos industriais. Nesse contexto, destaca-se a busca pela produção de enzimas em larga escala, como a endoglucanase, cuja utilização apresenta vantagens significativas, como a redução dos impactos ambientais quando comparada a processos químicos, contribuindo para a sustentabilidade dos processos industriais (Mendonça et al., 2020).

A produção de enzimas por microrganismos tem recebido grande atenção no campo da biotecnologia devido à sua ampla aplicabilidade em diversos processos industriais. Enzimas microbianas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, papel e celulose, têxtil,

farmacêutica e de biocombustíveis, uma vez que apresentam elevada especificidade catalítica e podem ser produzidas em larga escala por meio de processos fermentativos. Além disso, o uso de microrganismos como fontes de enzimas apresenta vantagens importantes, como menor custo de produção, maior facilidade de manipulação genética e possibilidade de otimização das condições de cultivo para aumentar a produtividade do processo. Estudos demonstram que diferentes espécies bacterianas são capazes de produzir enzimas de interesse industrial, os quais podem sintetizar enzimas extracelulares em diferentes matrizes de cultivo. Nesses casos, etapas posteriores de concentração e purificação, como processos de ultrafiltração, podem ser aplicadas para aumentar a concentração e a estabilidade das enzimas produzidas, favorecendo sua aplicação em processos industriais (Ruiz et al., 2017).

Diversos estudos demonstram que a produção heteróloga utilizando *E. coli* pode ser utilizada com sucesso para a expressão de enzimas hidrolíticas de interesse industrial. A expressão constitutiva de xilanases provenientes de microrganismos do gênero *Bacillus*, por exemplo, pode ser realizada em linhagens de *E. coli* utilizando promotores específicos capazes de dirigir a produção contínua da enzima recombinante. Esse tipo de estratégia permite a obtenção de níveis significativos de expressão proteica sem a necessidade de indutores químicos, o que pode reduzir os custos de produção e simplificar o processo fermentativo (Ruller et al., 2006). De forma semelhante, sistemas de expressão não induzidos têm sido investigados para a produção de xilanase em *E. coli*, avaliando diferentes fontes de nutrientes e estratégias de cultivo capazes de melhorar o desempenho do processo fermentativo e aumentar o rendimento enzimático (Mendonça et al., 2020).

Além dos aspectos genéticos envolvidos na expressão de proteínas recombinantes, fatores metabólicos e nutricionais exercem papel determinante no desempenho de culturas microbianas utilizadas em processos biotecnológicos. O metabolismo do glicerol, por exemplo, tem sido explorado como uma alternativa eficiente para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, uma vez que esse composto pode ser utilizado como fonte de carbono que favorece o crescimento celular e reduz a formação de subprodutos metabólicos indesejados. Modificações nas rotas metabólicas associadas ao metabolismo do glicerol podem aumentar significativamente a eficiência da produção de proteínas recombinantes, contribuindo para melhorar o rendimento global do processo (Chiang et al., 2020).

A composição do meio de cultivo também desempenha papel fundamental no crescimento celular e na produtividade de processos fermentativos. Íons inorgânicos, presentes

no meio podem influenciar diretamente a atividade enzimática, a estabilidade de proteínas e a regulação metabólica das células microbianas. Estudos demonstram que a relação entre carbono e magnésio no meio de cultivo pode afetar significativamente o rendimento celular em culturas de *E. coli*, além de influenciar processos metabólicos associados à acetilação proteica e à eficiência energética da célula (Christensen et al., 2017). De forma complementar, concentrações elevadas de sulfato de magnésio podem afetar processos celulares fundamentais, incluindo crescimento bacteriano, divisão celular e expressão gênica, evidenciando a importância do controle rigoroso da composição mineral do meio de cultivo em processos biotecnológicos (Nepal; Kumar, 2020).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição do meio de cultivo, visando a produção de enzimas utilizando o sistema de expressão em *E.coli* transformado com o vetor de produção da endoglucanase baseado no vetor PT7T3BsXA.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de endoglucanase por *E.coli* DH5 α recombinante contendo o plasmídeo PT7T3BsXA, analisando a influência de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento celular e a atividade enzimática, descritas por Ruller et. al (2006).

Para atingir esse objetivo, foram estabelecidos como objetivos específicos comparar o desempenho de diferentes meios de cultivo, incluindo o meio SB padrão, meios suplementados e meio sintético; avaliar os efeitos da glicose e do glicerol como fontes de carbono na produção da enzima; analisar a relação entre o crescimento celular e a atividade enzimática ao longo do cultivo; e verificar a estabilidade da endoglucanase produzida sob as diferentes condições experimentais estudadas.

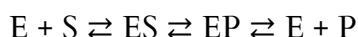
3. Revisão bibliográfica

3.1 Enzimas

3.1.1. Definição e mecanismo da enzima

As enzimas são proteínas que podem atuar como catalisadores das reações envolvidas na degradação ou hidrólise de moléculas, promovendo o aumento da velocidade dessas reações devido sua capacidade de diminuir a energia de ativação da molécula. Por essa razão, são denominadas biocatalisadores, e sua atividade catalítica depende da manutenção de sua conformação tridimensional. Assim, a desnaturação ou degradação de suas estruturas primária, secundária, terciária ou quaternária resulta na perda de sua atividade enzimática (Nelson; Cox, 2018).

A equação abaixo demonstra o modo de ação da enzima:



A reação enzimática envolve a formação reversível do complexo enzima–substrato (ES), decorrente da interação específica entre a enzima (E) e o substrato (S), seguida da conversão desse complexo em produto (P) e da liberação da enzima em sua forma original. Esse mecanismo promove a estabilização do estado de transição, resultando na redução da energia de ativação e no aumento da velocidade da reação catalisada (SEGEL, 1993). Uma característica importante das enzimas é a sua especificidade, permitindo a aplicação dela em uma reação específica, evitando a formação de produtos indesejados produzidos por reações que ocorram simultaneamente.

Existe um padrão para a classificação das enzimas em grupos, para isso é analisado qual o tipo de reação química determinada enzima catalisa, esse sistema é estabelecido pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). Esses grupos são divididos em seis classes principais: oxidoredutases, que catalisam reações de oxidação e redução; transferases, responsáveis pela transferência de grupos funcionais entre moléculas; hidrolases, que atuam na clivagem de ligações químicas por meio da adição de água; liases, que promovem a ruptura ou formação de ligações duplas sem consumo de ATP; isomerases, que

catalisam rearranjos intramoleculares; e ligases, que catalisam a formação de ligações covalentes com gasto de energia, geralmente proveniente do ATP (Nelson; Cox, 2018).

3.1.2. Mercado e demanda

Segundo Grand View Research (2024), o mercado mundial de enzimas ultrapassou a marca de US\$ 14,8 bilhões em 2024 e demonstra taxas de crescimento médio anual acima de 6,9% ao ano, devendo atingir aproximadamente US\$ 25,1 bilhões até 2033. Os principais segmentos responsáveis por essa expansão são as indústrias de alimentos e bebidas, farmacêutica, biocombustíveis, cosméticos e papel e celulose. Esses dados resultam não apenas da versatilidade das enzimas em aplicações industriais, mas também do aumento das exigências regulatórias e da demanda social por processos produtivos mais limpos e sustentáveis, em substituição às tecnologias convencionais baseadas em reagentes químicos agressivos (Langone, 2025).

Entretanto, ainda existem obstáculos físico químicos que impedem a utilização de enzimas em indústrias com maior potencial de produção. Nos processos industriais, o pH é um fator determinante para a atividade catalítica enzimática, uma vez que variações nesse parâmetro podem alterar a conformação da proteína e, conseqüentemente, sua eficiência (QIU *et al.*, 2025). Ademais, existe uma temperatura ótima associada a cada enzima geralmente relacionada ao ambiente de origem do organismo produtor nessa faixa de temperatura ela irá apresentar seu desempenho máximo (Kabir; Ju, 2023).

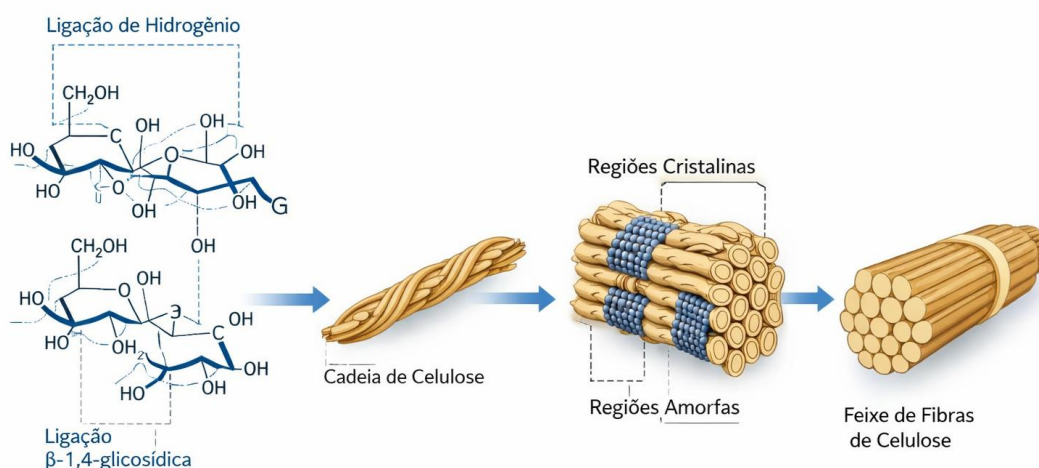
Em março de 2025 a (CNPEM) Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais anunciou a descoberta de uma nova enzima obtida a partir da biodiversidade brasileira que pode revolucionar a produção de bioenergia e bioprodutos. A enzima CelOCE destaca-se por acelerar a desconstrução da celulose, etapa fundamental na conversão da biomassa vegetal em glicose, insumo essencial para a produção de bioenergia e bioquímicos. Em combinação com outras enzimas industriais, foi capaz de aumentar a liberação de glicose em até 21% em condições semelhantes às industriais, indicando maior eficiência e redução de desperdícios em biorrefinarias. Além disso, sua descoberta contribui para novos entendimentos sobre a degradação natural da celulose e apresenta potencial para impulsionar uma economia de base biológica, de baixo carbono e circular, favorecendo a ampliação da produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais sem a necessidade de expansão de áreas agrícolas (Santos, 2025). Tendo em vista essas informações, é possível entender a grande importância do uso de enzimas atualmente para a indústria, considerando neste caso em específico o grupo das celulasas. Esse

interesse científico também se reflete no crescimento do mercado global de enzimas industriais, que tem apresentado expansão significativa nos últimos anos devido ao aumento da demanda por processos industriais ambientalmente sustentáveis e baseados em matérias-primas renováveis, de acordo com Future Market Insights, 2024; Grand View Research, 2024.

3.2 Celulases

As celulasas correspondem a um conjunto de enzimas de natureza hidrolítica capazes de promover a quebra da celulose, um biopolímero de cadeia longa constituído por repetições de celobiose, formadas por duas unidades de D-glicose conectadas por ligações β -1,4-glicosídicas. A resistência e a organização estrutural desse polímero estão associadas à extensa rede de ligações de hidrogênio estabelecidas entre os grupos hidroxila das moléculas de glicose, o que confere elevada estabilidade à macromolécula. Estruturalmente, as cadeias de celulose se associam em feixes denominados fibrilas elementares, que se organizam em microfibrilas contendo domínios com diferentes graus de ordenação, caracterizados como regiões cristalinas e amorfas (Sharma, et al, 2019).

Figura 2- Representação esquemática da estrutura molecular da celulose

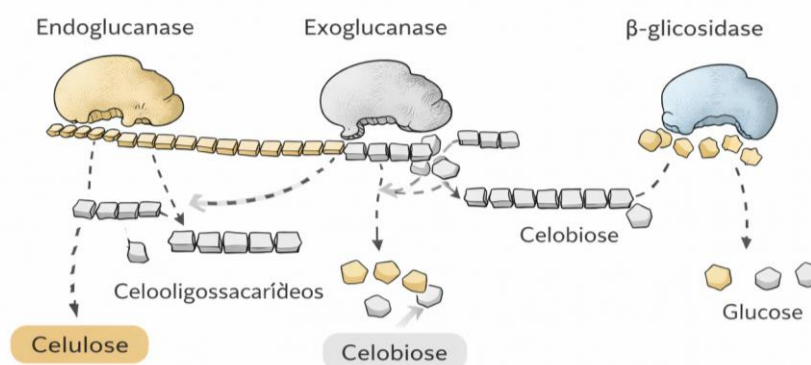


fonte: adaptado de Nascimento (2017)

As celulasas podem ser classificadas de acordo com o sítio de atuação na molécula de celulose, sendo capazes de atuar sobre diferentes materiais celulósicos e gerar como produtos glicose, celobiose e celooligossacarídeos. A hidrólise completa da celulose requer a ação

sinérgica de diferentes enzimas, incluindo as endoglucanases (EGs; EC 3.2.1.4), que promovem a clivagem interna das cadeias celulósicas, as exoglucanases (EC 3.2.1.91), responsáveis pela liberação de unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia, e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que convertem a celobiose e os oligossacarídeos em glicose (Lynd, et al, 2002).

Figura 3 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico, envolvendo a atuação sinérgica das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da celulose.



fonte: adaptado de Lynd (2002)

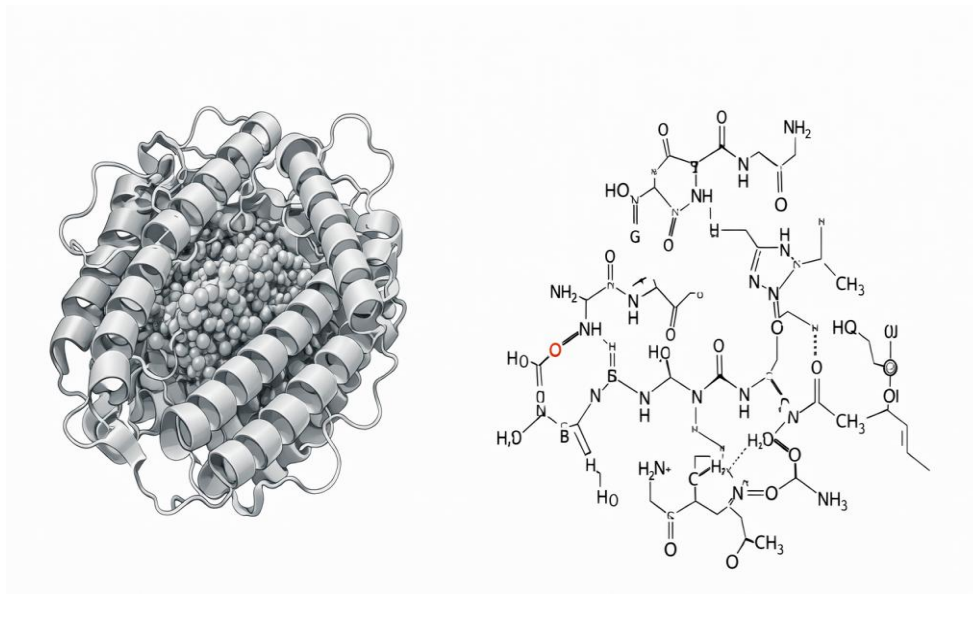
3.2.1 Endoglucanase

A endoglucanase é uma enzima hidrolítica do complexo celulolítico que catalisa a clivagem aleatória das ligações β -1,4-glicosídicas no interior das cadeias de celulose, atuando preferencialmente nas regiões amorfas do polímero. Essa ação promove a redução do grau de polimerização da celulose e a geração de novos terminais redutores e não redutores, aumentando a acessibilidade do substrato para a atuação subsequente das exoglucanases e β -glicosidases. Dessa forma, a endoglucanase exerce papel central na etapa inicial da hidrólise enzimática da celulose, sendo essencial para a eficiência da conversão do polímero em açúcares solúveis em processos biotecnológicos e industriais (Lynd, 2002)

A estrutura da endoglucanase pode ser compreendida como sendo uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 335 aminoácidos se organiza em uma proteína funcional. Sua conformação é baseada em um barril, uma forma comum entre enzimas desta família. A endoglucanase apresenta uma única subunidade catalítica, com estrutura compacta e laços

curtos, além de alguns elementos estruturais adicionais, como folhas β extras e hélices curtas, que contribuem para a estabilidade e a funcionalidade da enzima (Ravindran; Jacobson, 2014).

Figura 4: Endoglucanase, estrutura em barril e sua estrutura química



fonte: adaptado Davies e Shulein, (1997)

As aplicações industriais das endoglucanases são frequentemente restringidas pela perda de atividade catalítica sob temperaturas elevadas, comumente requeridas em processos biotecnológicos. Pequenos aumentos acima da temperatura ótima da enzima podem induzir alterações conformacionais, levando ao desdobramento parcial ou total da proteína e, conseqüentemente, à redução ou inativação de sua função catalítica. Nesse contexto, a estabilidade térmica constitui um fator crítico para a utilização eficiente dessas enzimas em escala industrial, tornando a estabilização térmica um requisito fundamental. A engenharia de proteínas surge, portanto, como uma abordagem estratégica para o desenvolvimento de endoglucanases termostáveis, ampliando seu potencial como biocatalisadores em processos industriais (Lynd, *et al.* 2002).

3.2.2 Exoglucanases

As exoglucanases, também chamadas de exocelobiohidrolases, atuam nas extremidades das cadeias de celulose, principalmente nas regiões cristalinas, promovendo a liberação de celobiose ou glicose. Essas enzimas podem agir tanto na extremidade redutora quanto na não redutora do polímero, clivando ligações β -1,4-glicosídicas. A extremidade

redutora apresenta um carbono anomérico livre, o que a torna mais reativa, enquanto a extremidade não redutora possui o carbono anomérico envolvido na ligação glicosídica, influenciando o modo de ação das exoglucanases (Gavand; Goyal, 2023).

A celulose possui como característica principal a presença de ligações β -glicosídicas, que são responsáveis pela sua estrutura rígida e resistente. De acordo com Nelson e Cox (2014), a celulose é “um polímero linear de unidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ ”, o que explica por que suas cadeias são longas e bem organizadas. Essa organização dificulta a quebra da molécula, tornando necessária a atuação de enzimas específicas. Nesse sentido, as exoglucanases desempenham um papel importante, pois conseguem atuar nas extremidades da celulose, quebrando essas ligações e liberando açúcares menores, como celobiose e glicose. Assim, a β -glicosidade não apenas define a estrutura da celulose, mas também influencia diretamente a forma como ela é degradada.

3.3 Produção heteróloga

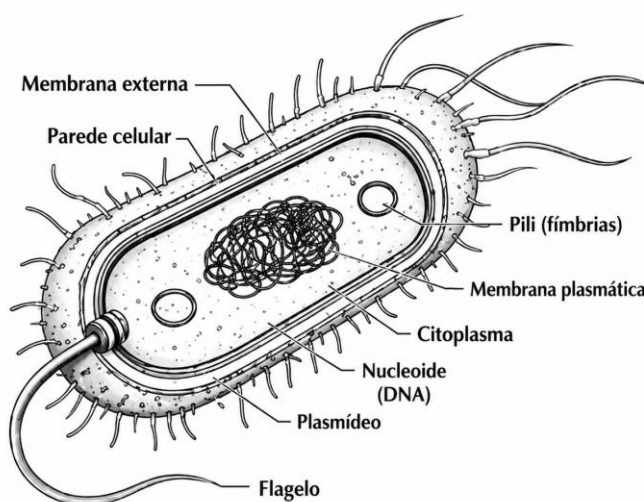
A produção heteróloga é uma estratégia amplamente utilizada na biotecnologia que consiste em expressar um gene de interesse em um organismo diferente daquele de origem, permitindo a obtenção de proteínas de forma mais eficiente e controlada. Nesse contexto, microrganismos como *E. coli* podem ser utilizados para produzir enzimas como as endoglucanases, que atuam na clivagem interna das cadeias de celulose, facilitando sua degradação. Segundo Rosano e Ceccarelli (2014), a produção heteróloga é “uma ferramenta fundamental para a obtenção de proteínas recombinantes em larga escala”, evidenciando sua importância em aplicações biotecnológicas. Dessa forma, essa abordagem permite não apenas a produção dessas enzimas em maiores quantidades, mas também a otimização de condições experimentais, contribuindo para o avanço de estudos e aplicações envolvendo a degradação da celulose.

3.3.1 *E. coli*

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, pertencente à família Enterobacteriaceae. Essa é uma bactéria que respira na ausência ou presença de oxigênio (anaeróbica facultativa), descoberta no intestino humano em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich (Feng, 2002). Porém ressaltar que as cepas utilizadas em laboratório são seguras e não oferecem riscos, o que contribui ainda mais para sua popularidade como modelo biológico.

Devido ao seu genoma amplamente caracterizado, facilidade de manipulação genética e cultivo em laboratório, *E. coli* é amplamente empregada como organismo modelo em estudos de microbiologia molecular e como hospedeira para a expressão heteróloga de proteínas recombinantes em processos biotecnológicos (Madigan et al., 2016)

Figura 5- *E.coli*



fonte: adaptado Dreamstime (2026)

No último século, a *E. coli* consolidou-se como um dos microrganismos mais profundamente investigados em todo o mundo. Suas características, como a facilidade de

manipulação genética, o rápido crescimento em condições simples, o conhecimento aprofundado de sua bioquímica e fisiologia, além da ampla gama de ferramentas genéticas disponíveis, fazem dela um organismo modelo ideal para aplicações industriais. Ademais, diversos compostos, tanto naturais quanto sintetizados artificialmente, podem ser produzidos por *E. coli*. Segundo Lee et al. (2018), esses avanços tornam *E. coli* uma plataforma cada vez mais robusta para bioprocessos industriais.

3.3.2 *E.coli* e seu metabolismo

Os organismos vivos, como a *E. coli*, desenvolveram mecanismos regulatórios complexos que lhes permitem ajustar seu metabolismo diante de variações ambientais. Esses sistemas de regulação exercem papel essencial na modulação de vias metabólicas, sendo particularmente importantes na engenharia metabólica. Apesar das tentativas utilizando modificações genéticas, ainda é difícil antecipar com exatidão quais ajustes são necessários nas redes metabólicas regulatórias para alcançar um fenótipo específico ou otimizar a produção de determinados compostos (Feng et al., 2002).

E. coli é um dos sistemas de expressão mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas, em razão de seu rápido crescimento, alto rendimento produtivo, amplo conhecimento de seu metabolismo e genoma, além da facilidade de transformação com DNA exógeno (Miret et al., 2020).

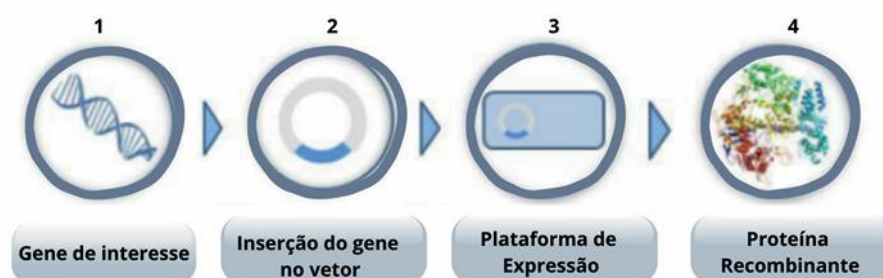
3.3.3 Modificação genética da *E.coli*

A cepa *E. coli* DH5 α é frequentemente escolhida como hospedeira para a produção de DNA plasmidial, devido à ausência da endonuclease I (**endA**) e da recombinase (**recA**), o que reduz a degradação e a recombinação do DNA plasmidial (Phue et al., 2008).

Ademais, *E.coli* DH5 α é uma cepa amplamente utilizada em laboratórios de biologia molecular, conhecida pela sua eficiência na clonagem de DNA, devido à sua alta competência para absorver plasmídeos e à ausência de sistemas de restrição que poderiam degradar o DNA estranho (Green; Sambrook, 2012). Essa cepa quando modificada geneticamente com o plasmídeo PT7T3BsXA, que carrega o gene de uma endoglucanase bacteriana, se transforma em uma biofábrica de enzimas com grande potencial para aplicações biotecnológicas. Entretanto, por não ser uma cepa desenvolvida especificamente para expressão heteróloga, sua capacidade de produção e secreção de proteínas é geralmente inferior à observada em outras

cepas, segundo Ruller et al. (2006). A figura 6 representa o processo de modificação genética que ocorre durante essas modificações.

Figura 6 - Esquema reduzido de processos envolvidos na produção de biofármacos.

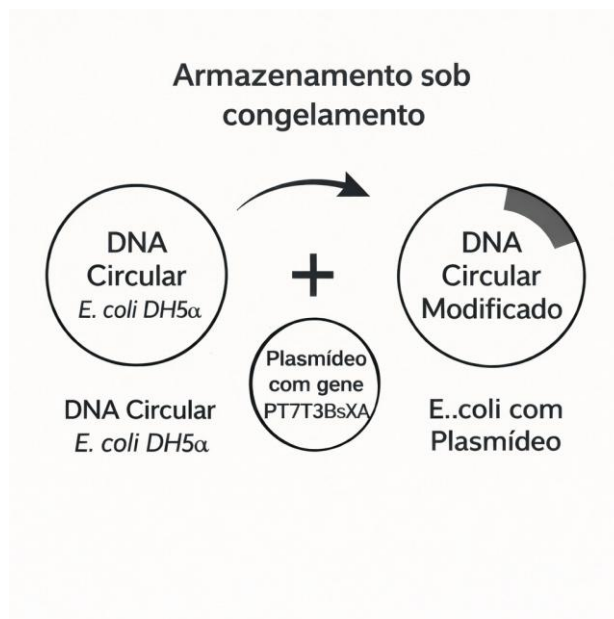


fonte: Silva (2023)

O microrganismo transformado é mantido em uma solução crioprotetora, que é uma solução de preservação utilizada para manter células bacterianas viáveis por longos períodos, geralmente contendo crioprotetores como glicerol e DMSO, que reduzem a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, o dano às membranas e ao DNA, permitindo que sejam armazenadas e posteriormente reativadas sem perda significativa de viabilidade (Auler; Lima; Figueiredo, 2014; Green; Sambrook, 2012).

A Figura 7, que será apresentada logo abaixo, ilustra o processo de transformação genética em bactérias *E. coli*, no qual um plasmídeo é introduzido na célula bacteriana, resultando em uma modificação do seu material genético. Inicialmente, observa-se a bactéria contendo apenas seu DNA circular nativo; em seguida, ocorre a adição do plasmídeo, que atua como vetor de inserção gênica. Como resultado desse processo, obtém-se uma *E. coli* recombinante, capaz de expressar novas características genéticas. Esse procedimento é amplamente utilizado em técnicas de biotecnologia e engenharia genética para a produção de proteínas recombinantes e estudos moleculares.

Figura 7-Processo de transformação genética em bactérias *E.coli*



fonte: própria autora, (2025)

Portanto, a *E.coli* é uma boa escolha para ser utilizada como hospedeira para a expressão heteróloga de enzimas celulíticas recombinantes, devido à sua elevada eficiência de expressão, facilidade de manipulação genética e rápido crescimento. O uso desse microrganismo permite aumentar a produtividade dessas enzimas e reduzir os custos associados às aplicações industriais relacionadas ao processamento da celulose (Ferreira *et al.*, 2018; Kim; Ku, 2018).

3.3.4 Marcadores de seleção e uso de antibióticos

Em experimentos de biologia molecular envolvendo a transformação genética de microrganismos, é fundamental a utilização de marcadores de seleção que permitam a identificação das células que incorporaram o DNA recombinante. Entre as estratégias mais utilizadas destaca-se o emprego de antibióticos, como a ampicilina, associada a genes de resistência presentes em plasmídeos.

A ampicilina é um antibiótico pertencente à classe dos β -lactâmicos, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese da parede celular bacteriana. Essa inibição ocorre por meio da ligação às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), impedindo a formação adequada da estrutura de peptidoglicano, o que leva à lise celular, especialmente em bactérias em fase de crescimento (Sambrook; Russell, 2001).

Em sistemas de clonagem e expressão heteróloga, os plasmídeos frequentemente carregam o gene *bla*, responsável pela codificação da enzima β -lactamase. Essa enzima confere resistência à ampicilina ao promover a hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico, inativando sua ação. Dessa forma, apenas as células transformadas com o plasmídeo são capazes de crescer em meios de cultura contendo ampicilina, permitindo a seleção eficiente dos microrganismos recombinantes.

Esse sistema de seleção é amplamente utilizado em estudos com *Escherichia coli*, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de aplicação, sendo essencial para garantir a manutenção e propagação de plasmídeos em cultivos laboratoriais.

3.4 Variáveis e condições que afetam a síntese e atividade da celulase

A síntese e a atividade das celulasas são influenciadas por um conjunto de variáveis físicas, químicas e biológicas que afetam tanto a produção da enzima pelo microrganismo quanto sua eficiência catalítica. Fatores como a fonte de carbono exercem papel fundamental na síntese enzimática, uma vez que substratos celulósicos e indutores específicos estimulam a produção de celulasas, enquanto açúcares simples podem causar repressão catabólica. Além disso, a fonte de nitrogênio, o pH, a temperatura de cultivo, a aeração, a agitação e o tempo de fermentação influenciam diretamente o crescimento microbiano e a secreção enzimática. No que se refere à atividade catalítica, parâmetros como pH e temperatura da reação, concentração de substrato, presença de inibidores, especialmente produtos finais como glicose e celobiose, bem como a estabilidade estrutural da enzima, são determinantes para a eficiência da hidrólise da celulose. Dessa forma, o controle adequado dessas variáveis é essencial para otimizar a produção e o desempenho das celulasas em processos biotecnológicos e industriais (Lynd *et al.*, 2002; Zhang; Lynd, 2004).

3.4.1 Temperatura e pH

A temperatura e o pH desempenham papéis determinantes na produção de enzimas microbianas, pois influenciam diretamente tanto o crescimento celular quanto a eficiência catalítica. Em relação à temperatura, a máxima eficiência do sítio ativo é alcançada em uma faixa ótima específica, sendo que pequenas variações em torno desse valor podem comprometer significativamente o rendimento do processo. Temperaturas superiores ao ideal tendem a

intensificar a taxa de morte celular, enquanto temperaturas inferiores reduzem a atividade metabólica do microrganismo e, conseqüentemente, a velocidade de síntese enzimática (Grahame; Bryksa; Yada, 2015).

As variações de pH afetam a ionização dos aminoácidos do sítio ativo, podem alterar a conformação da proteína e também influenciar o estado do substrato, modificando a eficiência catalítica. Como as enzimas possuem grupos ionizáveis em suas cadeias laterais, o pH do meio determina suas cargas elétricas e, conseqüentemente, a conformação estrutural mais favorável à atividade catalítica máxima (Marangoni, 2003).

3.4.2 Fontes de carbono e nitrogênio

As fontes de carbono e nitrogênio são essenciais para o crescimento bacteriano e para a produção da enzima endoglucanase, pois o carbono fornece energia e os blocos estruturais necessários para a síntese de biomassa e para o funcionamento celular, enquanto o nitrogênio é indispensável para a formação de aminoácidos e proteínas, incluindo a própria endoglucanase. Fontes orgânicas de nitrogênio, como peptona e extrato de levedura, favorecem tanto o crescimento quanto a produção da enzima, enquanto fontes inorgânicas podem ser menos eficazes ou até inibir a síntese enzimática. Assim, a disponibilidade e o equilíbrio dessas fontes nutricionais determinam diretamente a quantidade de biomassa produzida e a eficiência da secreção da enzima, ressaltando a importância de otimizar o meio de cultura para obter altos rendimentos de endoglucanase (Islam; Roy, 2021; Yang *et al.*, 2021).

3.4.3 Aspectos Relacionados à condição e ao tempo de cultivo

O cultivo de *E. coli* em laboratório pode ser realizado por diferentes estratégias, cada uma com características específicas quanto à complexidade, controle de parâmetros e objetivo experimental. Cultivo em batelada (batch) é o método mais simples e amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia e biotecnologia. Nesse modo de operação, todos os nutrientes são adicionados no início e a bactéria cresce até que um ou mais componentes do meio se esgotem, o que limita a densidade celular e pode causar acúmulo de metabólitos indesejáveis, como acetato, que inibem o crescimento e a produção proteica (Krause *et al.*, 2016).

Para superar limitações e alcançar altas densidades celulares, pode empregar o processo em batelada alimentada, no qual nutrientes (por exemplo, glicose ou glicerol) são

adicionados gradualmente durante a cultura para evitar o esgotamento rápido e controlar o crescimento, o que pode melhorar rendimentos de biomassa e produção de proteínas recombinantes. Estratégias de alimentação em meio suplementar podem ser aplicadas mesmo em culturas em frascos Erlenmeyer agitados, utilizando mecanismos para liberação controlada de substrato ou adição periódica de alimentação intermitente (Ganjave, 2021; Kopp, 2019).

3.4.4 A cepa *E. coli* DH5a e inserção do plasmídeo PT7T3BsXA.

No campo da engenharia genética e da biotecnologia molecular, a bactéria *E.coli* destaca-se como um dos sistemas hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, sendo considerada um organismo geneticamente modificado (OGM) quando utilizada para expressão heteróloga. Nesse sistema, genes de interesse, como os responsáveis pela produção de endoglucanases, são inseridos em plasmídeos e expressos na célula hospedeira por meio de processos de expressão heteróloga, permitindo a produção eficiente da enzima em larga escala.

A *E.coli* apresenta diversas características que a tornam um modelo amplamente empregado em bioprocessos industriais, incluindo rápido crescimento, facilidade de manipulação genética, amplo conhecimento sobre seu metabolismo e disponibilidade de diferentes sistemas de expressão gênica. Apesar dessas vantagens, a produção eficiente de proteínas heterólogas em *E. coli* pode apresentar desafios significativos, como a formação de corpos de inclusão, instabilidade proteica ou limitações metabólicas relacionadas ao acúmulo de subprodutos do metabolismo celular. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica e otimização das condições de cultivo torna-se fundamental para maximizar a eficiência da produção de enzimas recombinantes (Mital; Christie; Dikicioglu, 2021).

A eficiência dos processos de produção microbiana de metabólitos e enzimas depende diretamente da otimização das condições de cultivo e da compreensão das interações metabólicas que ocorrem no interior da célula microbiana. Nesse contexto, diferentes abordagens experimentais e computacionais têm sido utilizadas para melhorar a produtividade de processos fermentativos. Entre essas abordagens, ferramentas de modelagem matemática e métodos baseados em inteligência artificial têm sido aplicados para prever e otimizar parâmetros de cultivo, como composição do meio, concentração de nutrientes e condições ambientais. O uso de redes neurais artificiais, por exemplo, tem demonstrado grande potencial

na modelagem da produção de metabólitos microbianos, permitindo a análise de múltiplas variáveis simultaneamente e contribuindo para a otimização de processos fermentativos complexos (Singh *et al.*, 2015).

A modificação da *E. coli* DH5 α com o plasmídeo PT7T3BsXA é um exemplo de como ferramentas genéticas podem transformar uma bactéria comum em uma poderosa produtora de enzimas industriais, pois sua modificação gera a produção da enzima endoglucanase, podendo otimizar o processo e torná-lo viável em escala industrial, pois é uma enzima capaz de degradar celulose, pertencente à classe das celulasas e possui a capacidade de romper ligações β -1,4-glicosídicas na estrutura da celulose, promovendo a liberação de oligossacarídeos e açúcares redutores, especialmente a glicose (Teugjes; Van der Werf, 2000).

3.4.5 Estratégias de alimentação e seus efeitos sobre o crescimento celular e o metabolismo de *E. coli*

A estratégia de alimentação adotada durante cultivos microbianos exerce influência direta sobre o crescimento celular, o metabolismo e a formação de metabólitos. Em sistemas de alimentação simples, todos os nutrientes são disponibilizados no início do processo, resultando em elevadas concentrações de substrato durante as fases iniciais de crescimento. Nessas condições, *E. coli* apresenta rápida captação da fonte de carbono, o que pode levar ao fenômeno conhecido como metabolismo overflow, caracterizado pela formação de subprodutos metabólicos, principalmente acetato (Lee, 1996).

O acúmulo de acetato ocorre quando a taxa de assimilação de carbono excede a capacidade das vias respiratórias e do metabolismo central, provocando o redirecionamento do fluxo metabólico para vias fermentativas. Como consequência, há redução da eficiência metabólica, inibição do crescimento celular e diminuição da produtividade de proteínas recombinantes (Lee, 1996; Shiloach; Fass, 2005).

Como alternativa, a alimentação em batelada alimentada (fed-batch) utiliza o fornecimento controlado do substrato ao longo do cultivo, permitindo manter baixas concentrações da fonte de carbono no meio. Essa estratégia reduz a ocorrência do metabolismo overflow e a formação de metabólitos inibitórios, favorecendo o direcionamento do carbono para crescimento celular e síntese de biomoléculas de interesse (Lee, 1996).

Segundo Shiloach e Fass (2005), o controle da taxa de alimentação promove melhor equilíbrio metabólico, aumentando a densidade celular e reduzindo o acúmulo de compostos tóxicos. Dessa forma, a alimentação em batelada alimentada é amplamente empregada na produção de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*, uma vez que possibilita maior controle das condições fisiológicas da cultura e maior produtividade do processo biotecnológico.

Além dos efeitos sobre o crescimento celular, a alimentação controlada também contribui para a manutenção da atividade metabólica e da capacidade biossintética das células ao longo do cultivo. A redução da formação de acetato e de outros metabólitos inibitórios favorece condições fisiológicas mais adequadas para a expressão de proteínas recombinantes e para a produção de biomoléculas de interesse industrial.

Assim, a comparação entre alimentação simples e alimentação em batelada alimentada demonstra que o fornecimento gradual de nutrientes constitui uma estratégia eficiente para minimizar limitações metabólicas, reduzir a formação de subprodutos inibitórios e maximizar o crescimento celular e a produção de biomoléculas de interesse industrial.

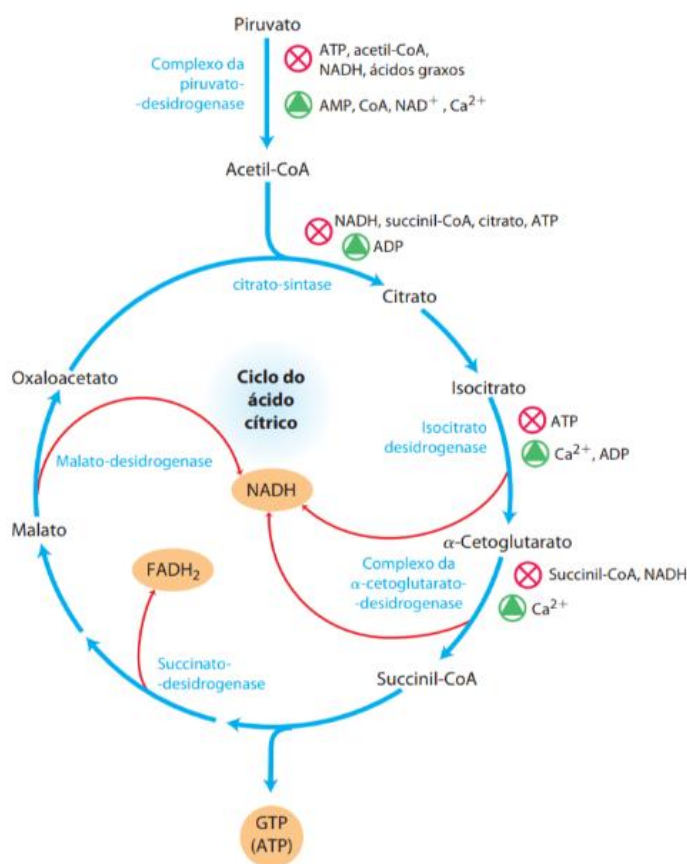
Neste estudo, optou-se pela utilização do sistema de alimentação simples devido à sua simplicidade operacional e por atender adequadamente aos objetivos propostos, que consistiram em avaliar a influência de diferentes composições de meios de cultivo sobre o crescimento celular e a produção enzimática. A utilização desse sistema permitiu manter condições experimentais padronizadas entre todos os tratamentos, possibilitando a comparação direta dos efeitos das diferentes fontes de carbono e da suplementação com sulfato de magnésio sobre a biomassa celular e a atividade enzimática. Além disso, a alimentação simples favoreceu a avaliação dos efeitos fisiológicos e metabólicos das condições nutricionais propostas, permitindo evidenciar as respostas celulares decorrentes das diferentes formulações dos meios sem a interferência de variáveis associadas ao controle contínuo da alimentação.

3.5 Rotas metabólicas

3.5.1 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs é uma das principais etapas da respiração celular aeróbica, ocorrendo na matriz mitocondrial das células eucarióticas. Nesse processo, o acetil-CoA, proveniente da glicólise e da β -oxidação dos ácidos graxos, é oxidado, resultando na produção de moléculas de alta energia, como NADH, FADH₂ e GTP/ATP (Guyton; Hall, 2017). Conforme apresentado na Figura 8, o ciclo envolve uma sequência de reações enzimáticas responsáveis pela oxidação do acetil-CoA e pela geração de intermediários energéticos essenciais.

Figura 8- Ciclo de Krebs



fonte: adaptado Nelson e Cox (2014)

O ciclo inicia-se com a condensação do acetil-CoA (2 carbonos) com o oxaloacetato (4 carbonos), formando citrato (6 carbonos). A partir desse ponto, o citrato passa por uma série de

reações enzimáticas que incluem isomerização, descarboxilações oxidativas, desidrogenações e hidratação (Sadava *et al.*, 2014).

Segundo Berg, Tymoczko e Stryer (2012), o citrato é convertido em isocitrato pela enzima aconitase. Em seguida, o isocitrato sofre descarboxilação oxidativa, formando α -cetoglutarato e liberando CO_2 . O α -cetoglutarato é então convertido em succinil-CoA, também com liberação de CO_2 . A succinil-CoA é transformada em succinato, com geração de GTP (equivalente a ATP). Posteriormente, o succinato é oxidado a fumarato, produzindo FADH_2 , o fumarato é hidratado a malato e, por fim, o malato é oxidado a oxaloacetato, permitindo a continuidade do ciclo.

Ao final de cada volta completa, são produzidas três moléculas de NADH, uma de FADH_2 , uma de GTP (ou ATP) e duas de CO_2 . As coenzimas reduzidas desempenham papel fundamental na cadeia transportadora de elétrons, onde seus elétrons são utilizados para a geração de ATP por fosforilação oxidativa

Além de sua função na produção de energia, o ciclo de Krebs também fornece intermediários metabólicos importantes para vias biossintéticas, como a síntese de aminoácidos e nucleotídeos.

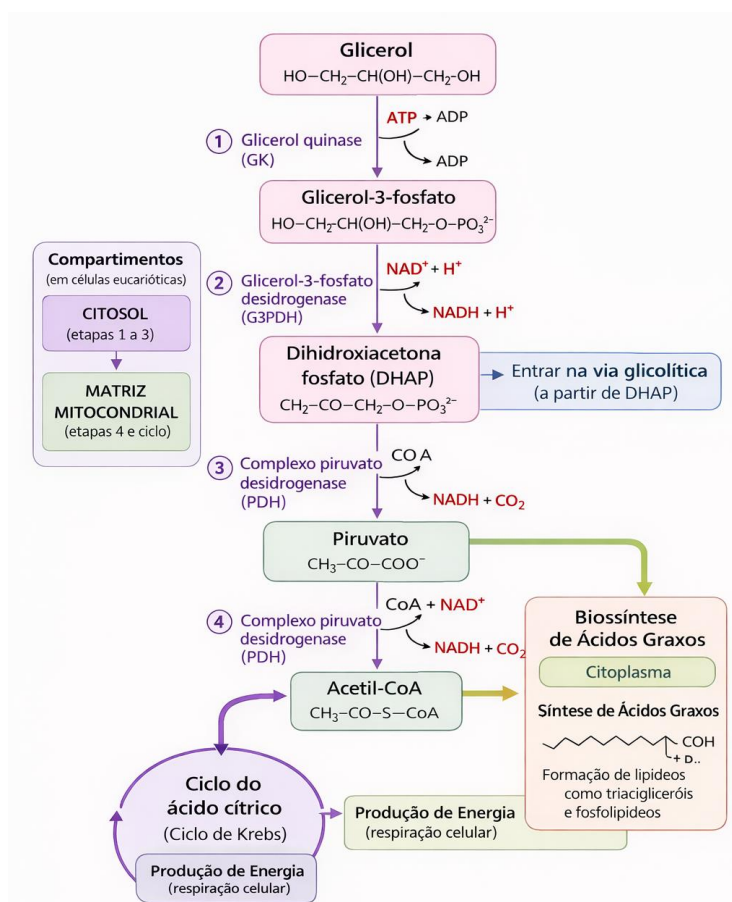
No contexto do presente trabalho, o ciclo de Krebs exerce papel fundamental no suporte metabólico de células de *E.coli* geneticamente modificadas, estando diretamente relacionado à geração de energia necessária para a manutenção celular e expressão gênica. A intensificação da atividade metabólica pode levar ao aumento da produção de subprodutos, como CO_2 e acetato, especialmente em condições de limitação de oxigênio. Esses compostos podem interferir no crescimento celular, alterar o pH do meio e reduzir a eficiência da expressão heteróloga. Dessa forma, compreender a dinâmica do ciclo e a formação de subprodutos metabólicos é essencial para a otimização das condições de cultivo e maximização da produtividade do sistema biotecnológico.

3.5.2 Metabolismo de fontes de carbono em *E. coli*

3.5.2.1 Metabolismo do glicerol

O glicerol pode ser utilizado por *Es. coli* como fonte de carbono ao ser metabolizado por duas vias principais: ele pode ser convertido em ácidos graxos, utilizados na formação de membranas e armazenamento de energia, ou pode entrar na via glicolítica, sendo transformado em piruvato, o que gera energia (ATP) e potencial redutor (NADH) para a célula. O piruvato, por sua vez, pode ser direcionado à gliconeogênese para a produção de açúcares, especialmente em condições de limitação de glicose, permitindo que *E. coli* cresça e se desenvolva mesmo na ausência dessa fonte de carbono mais comum (Zwaig, 2010; Liu, 2013). A representação das vias está na Figura 9.

Figura 9 - Guia metabólico do glicerol

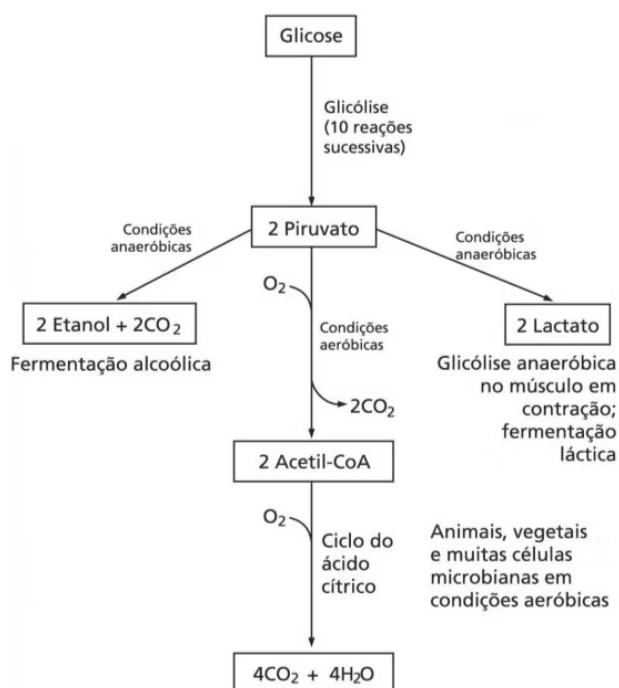


fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014)

3.5.2.2 Metabolismo da glicose

Conforme ilustrado na Figura 10, o metabolismo da glicose apresenta diferentes vias de processamento do piruvato, o qual, em condições aeróbicas, é convertido em acetil-CoA e direcionado ao Ciclo de Krebs, estabelecendo uma conexão direta com a produção de energia celular; em contrapartida, na ausência de oxigênio, esse intermediário é desviado para vias fermentativas, não sendo integrado ao ciclo.

Figura 10 - Esquema do metabolismo da glicose em condições aeróbicas e anaeróbicas (Glicólise)



fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

O piruvato (ou ácido pirúvico em sua forma protonada) é uma molécula-chave no metabolismo celular, especialmente no processo de produção de energia a partir da glicose. Ele é o produto final da glicólise, que é a etapa inicial da respiração celular. Em termos simples, quando ocorre a quebra de uma molécula de glicose (açúcar com 6 carbonos), ele forma duas moléculas de piruvato, cada uma com três átomos de carbono (Nelson; Cox, 2014).

A formação do piruvato ocorre no citoplasma das células, durante a glicólise, e não depende de oxigênio. Esse aspecto é importante porque permite que até células com pouca

disponibilidade de oxigênio (como músculos em esforço intenso) consigam gerar alguma energia (Guyton; Hall, 2017)

Após sua formação, o destino do piruvato vai depender da presença de oxigênio:

- Em ambientes aeróbicos (com oxigênio), o piruvato entra nas mitocôndrias e é convertido em acetil-CoA, entrando no Ciclo de Krebs para produção de mais energia.
- Em ambientes anaeróbicos (sem oxigênio), como em certos tipos de fermentação, ele pode ser convertido em lactato (em humanos) ou em etanol e CO₂ (em microrganismos) (Sadava, 2014).

Além de seu papel na produção de energia, o piruvato também serve como ponto de partida para outras vias metabólicas, sendo utilizado na síntese de aminoácidos, gliconeogênese (formação de glicose a partir de compostos não carboidratos), e como precursor para ácidos graxos (Berg; Tymoczko; Stryer, 2012). Portanto, o piruvato é mais do que apenas um "subproduto" da quebra da glicose: ele é uma molécula central que conecta diversas rotas metabólicas essenciais à vida.

3.5.2.3 Comparação entre o Glicerol e Glicose como Fonte de carbono

A glicose e o glicerol são duas fontes de carbono importantes para *E. coli*, mas diferem em eficiência metabólica, rotas bioquímicas e impacto fisiológico sobre a célula.

A glicose é a fonte de carbono preferencial de *E. coli*. Ela entra diretamente na glicólise, sendo convertida em piruvato e posteriormente em acetil-CoA, que alimenta o ciclo do ácido cítrico, gerando ATP, NADH e precursores biossintéticos essenciais (Nelson; Cox, 2018). Além disso, pode ser desviada para outras vias, como a via das pentoses-fosfato (produção de NADPH e ribose) e o armazenamento em glicogênio. Esse metabolismo direto e eficiente confere alto rendimento energético e crescimento celular rápido.

O glicerol, por outro lado, é uma fonte de carbono alternativa. Ele é convertido em intermediários que entram na glicólise, passando por etapas adicionais antes de formar piruvato. Parte do glicerol também pode ser utilizada na síntese de ácidos graxos. Embora possa sustentar o crescimento de *E. coli*, o metabolismo do glicerol é menos eficiente energeticamente e pode

levar a taxas de crescimento mais lentas em comparação com a glicose (Madigan, 2015). No entanto, o glicerol tem a vantagem de não reprimir a expressão de genes envolvidos em vias secundárias, como ocorre com a glicose em muitos sistemas de regulação por catabolito.

Em suma, enquanto a glicose oferece maior eficiência energética e rapidez no crescimento, o glicerol apresenta menor repressão metabólica e pode ser útil em processos que requerem expressão gênica específica ou condições menos competitivas por energia.

3.5.3 O efeito regulador do sulfato de magnésio

O sulfato de magnésio (MgSO_4) é um sal amplamente utilizado em meios de cultivo microbiológicos devido ao papel essencial do magnésio no metabolismo celular. Em cultivos bacterianos, especialmente com *Escherichia coli*, o MgSO_4 fornece íons Mg^{2+} , indispensáveis para diversas funções fisiológicas e bioquímicas da célula (Neidhardt *et al.*, 1990).

O íon magnésio (Mg^{2+}) atua como cofator em numerosas reações enzimáticas, incluindo aquelas envolvidas na glicólise, na biossíntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Além disso, exerce papel fundamental na estabilização de biomoléculas e estruturas celulares, como ATP, DNA, RNA e ribossomos, por meio da neutralização de cargas eletrostáticas associadas aos grupos fosfato. Essas funções são essenciais para a manutenção da atividade metabólica, da integridade estrutural e da eficiência funcional das células bacterianas (Zwaig; Burton; Ginsburg, 2010).

Em cultivos que utilizam glicose como fonte de carbono, especialmente sob condições de alta densidade celular, é comum a formação de acetato, fenômeno conhecido como metabolismo overflow ou de transbordamento. Esse processo ocorre quando a taxa de assimilação de glicose excede a capacidade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da cadeia respiratória, resultando no redirecionamento do carbono para vias fermentativas, como a via fosfotransacetilase-acetato quinase (Pta-AckA) (Wolfe, 2005; Madigan *et al.*, 2016). O acúmulo de acetato pode prejudicar o crescimento celular e a expressão proteica devido aos seus efeitos sobre o pH intracelular e o balanço energético da célula (Wolfe, 2005). Nesse contexto, a disponibilidade de magnésio contribui para a manutenção da atividade metabólica e da funcionalidade enzimática necessárias ao metabolismo bacteriano (Neidhardt; Ingraham; Schaechter, 1990).

Quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono, ocorre menor produção de compostos ácidos, reduzindo os efeitos negativos associados à acidificação do meio. Entretanto, enzimas envolvidas na assimilação e metabolização do glicerol, como a glicerol quinase e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, também dependem de Mg^{2+} para seu adequado funcionamento, mantendo a importância do $MgSO_4$ para a eficiência metabólica e o crescimento celular nessas condições (Liu *et al.*, 2013).

Dessa forma, a suplementação com sulfato de magnésio favorece o crescimento microbiano e a produção de biomoléculas ao assegurar a atividade enzimática e a integridade estrutural da célula. Como consequência, podem ser observados aumentos na densidade celular e na produção de proteínas ou enzimas funcionalmente ativas. De acordo com Christensen *et al.* (2017), a otimização da razão carbono/magnésio pode promover maior crescimento celular e reduzir a formação de subprodutos indesejáveis em *Escherichia coli*.

3.6 Meios de cultivo

3.6.1 Meios complexos

Os meios de cultivo complexos são amplamente utilizados em microbiologia devido à sua composição rica em nutrientes, porém quimicamente não definida. Esses meios contêm componentes como peptonas, extrato de levedura e triptona, que fornecem aminoácidos, vitaminas, sais minerais e outros fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento microbiano. Por apresentarem composição variável, não permitem o controle preciso das concentrações individuais de nutrientes, mas favorecem o crescimento rápido e eficiente de microrganismos, sendo frequentemente utilizados em cultivos laboratoriais e processos biotecnológicos (Madigan *et al.*, 2015).

3.6.2 Meios sintéticos

Os meios de cultura sintéticos são formulações compostas por substâncias químicas purificadas e conhecidas em quantidade definida, o que permite maior controle sobre as condições do cultivo microbiano, formando um sistema tampão mais forte. Entre suas principais funções está a capacidade de estabilizar o equilíbrio químico e fisiológico do meio, garantindo condições ideais para o crescimento celular e a atividade metabólica.

A estabilização do pH é um dos fatores mais importantes no cultivo de microrganismos. Para isso, os meios sintéticos geralmente contêm sistemas tampão, como sais de fosfato, que evitam variações bruscas de pH causadas pelo metabolismo celular, principalmente pela produção de ácidos ou bases durante a assimilação de nutrientes (Madigan *et al.*, 2015).

Além disso, componentes como sais de amônio, cloreto de sódio e citrato atuam na regulação do equilíbrio iônico e osmótico, fornecendo íons essenciais para a célula e ajudando a manter a estabilidade do meio. Esses sais, além de nutrientes, contribuem para o funcionamento de enzimas e para a integridade das membranas celulares (Neidhardt *et al.*, 1990).

4. Materiais e métodos

4.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para o cultivo da *E. coli* modificada com o plasmídeo pT7T3BSXa foram preparados com base nos protocolos descritos por Ruller (2006), Sambrook e Russell (2001), Mendonça *et al.* (2020) e Schaepe *et al.* (2014).

4.1.1. Meios Complexos

4.1.1.1 Preparo do Meio Luria Bertani

Materiais

Tabela 1– Composição do meio LB

Componente	Concentração (g/L)	Pesar para 100 mL
Triptona	10	1
Extrato de Levedura	5	0,5
NaCl	10	1

fonte: Sambrook e Russell (2001)

Métodos

O meio Luria Bertani (LB) foi preparado de acordo com a composição apresentada na Tabela 1. Inicialmente, triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio (NaCl) foram pesados nas quantidades adequadas para um volume final de 100 mL e transferidos para um béquer de 500 mL. Em seguida, os componentes foram dissolvidos em água ultrapura, completando-se o volume final para 100 mL.

Posteriormente, o pH do meio foi ajustado para 7,0 mediante a adição de solução de HCl 0,1 M. Após o ajuste do pH, o meio foi submetido à esterilização em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Para o preparo do meio sólido, foi adicionado ágar bacteriológico à concentração de 20 g/L antes do processo de esterilização.

4.1.1.2 Preparo do Meio SB

Materiais

Tabela 2– Composição do meio SB

Componente	Concentração (g/L)	Pesar para 500 mL
Triptona	35	17,5
Extrato de Levedura	20	10
NaCl	10	5

fonte: Mendonça (2020)

Métodos

Procedimentos preparo meio SB

O meio Super Broth (SB) foi preparado de acordo com a composição apresentada na Tabela 2. Inicialmente, triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio (NaCl) foram pesados nas quantidades necessárias para um volume final de 500 mL e transferidos para um béquer de 1 L. Em seguida, os componentes foram dissolvidos em água ultrapura, completando-se o volume final para 500 mL.

Posteriormente, o pH do meio foi ajustado para 7,0 por meio da adição de solução de HCl 0,1 M. Após o ajuste do pH, o meio foi distribuído em nove frascos Erlenmeyer, contendo 50 mL em cada recipiente. Os frascos foram vedados com algodão hidrófobo (algodão anidro), papel pardo e elástico, a fim de permitir a troca gasosa e evitar contaminações durante o cultivo. Por fim, os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

4.1.1.3 Preparo do Meio FSB - *Frozen storage buffer*

Tabela 3- Composição do meio FSB

componente	Concentração	Pesar p/ 100 mL
KCl	100 mM	0,74g
MnCl ₂ .4H ₂ O	45 mM	0,89g
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mM	0,15g
Co(NH ₃) ₆ Cl ₃	3 mM	0,08g
Acetato de Potássio	3 mM	10 mL de solução 1M pH 7,5
Glicerol	10%	10 mL

fonte: Sambrook e Russell (2001)

Métodos

Procedimentos preparo meio FSB

O meio FSB (Frozen Storage Buffer) foi preparado de acordo com a composição apresentada na Tabela 3. Inicialmente, os componentes foram adicionados sequencialmente, conforme a ordem apresentada na tabela, em aproximadamente 70 mL de água ultrapura, sob agitação constante até completa dissolução.

Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 6,4 utilizando solução de HCl 0,1 N. Durante essa etapa, evitou-se a correção posterior com solução básica, uma vez que variações excessivas do pH poderiam comprometer a composição do tampão. Caso o pH inicial apresentasse valor inferior a 6,4, a solução era descartada e um novo preparo era realizado.

Após o ajuste do pH, o volume final foi completado para 100 mL com água ultrapura, sendo o pH novamente verificado para garantir a manutenção do valor estabelecido. Posteriormente, a solução foi esterilizada por filtração utilizando membrana com porosidade de 0,22 µm e armazenada em tubos Falcon estéreis.

Para utilização no preparo das células competentes, uma alíquota de 35 mL do meio FSB previamente filtrado foi novamente esterilizada por filtração em filtro-agulha de 0,20 µm, em condições assépticas dentro de cabine de fluxo laminar. Por fim, a solução foi mantida sob refrigeração a -20 °C até sua utilização.

4.1.2 Preparo do Meio Sintético

Tabela 4- Meio de cultura sintético criado

Sais	concentração g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,46
NH_4Cl	0,5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,6
K_2HPO_4	14,6
$(\text{NH}_4)_2$ Citrato	1
NaCl	1,65

fonte: Adaptado de Schaepe (2014)

A Tabela 4 apresenta a composição do meio de cultura sintético usado no experimento, listando os sais e suas respectivas concentrações em gramas por litro (g/L).

4.2 Preparação e manipulação celular

4.2.1 Preparo da solução de Ampicilina

Durante o cultivo de *E. coli*, foi utilizada a ampicilina como agente seletivo. A ampicilina é um antibiótico β -lactâmico que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, levando à lise celular. Dessa forma, apenas células que possuem o plasmídeo contendo o gene de resistência à ampicilina (*bla*), responsável pela produção da enzima β -lactamase, são capazes de sobreviver em meio seletivo (Sambrook; Russell, 2001; Madigan *et al.*, 2015).

A solução estoque de ampicilina foi preparada na concentração de 100 mg/mL (1 g para 10 mL de água destilada), conforme especificações do fabricante. A esterilização foi realizada por filtração em membrana de 0,22 μm , e a solução foi armazenada em microtubos estéreis a -18 °C até sua utilização.

4.2.2 Preparo de células quimiocompetentes

O preparo do pré-inóculo e das células competentes foi realizado conforme Sambrook e Russell (2001).

Materiais necessários

- Tubos de centrifuga com capacidade de 250 mL, previamente autoclavados e estéreis;
- Gelo;
- Tubos para congelamento estéreis;
- Meios de cultura previamente descritos;
- Solução FSB gelada;

Procedimento

Foi preparada uma placa contendo meio LB sólido, sem antibiótico. A partir de um criotubo de *Escherichia coli* DH5 α estoque, o microrganismo foi inoculado com alça de platina e incubado a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, as colônias foram inoculadas em 200 mL de meio LB. Foi utilizada a proporção aproximada de uma colônia para cada 10 mL de meio de cultura, totalizando cerca de 20 a 30 colônias. Para evitar a formação de grumos e favorecer o crescimento homogêneo, as colônias foram previamente ressuspensas em 5 mL de meio LB antes da inoculação no volume total.

A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm, sendo a densidade óptica monitorada a 600 nm até atingir valores entre 0,3 e 0,4. O tempo de incubação foi de aproximadamente 2 a 3 horas.

Após atingir a densidade óptica desejada, a cultura foi incubada em gelo por 10 minutos. Em seguida, o volume total foi transferido para tubos de centrifuga estéreis (100 mL por tubo) e centrifugado a 2200 $\times$ g por 12 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas cuidadosamente, mantendo-se em gelo, em 35 mL de solução FSB gelada por tubo (aproximadamente 70 mL

para 200 mL de cultura). A suspensão foi incubada em gelo por 15 minutos e, posteriormente, reunida em um único tubo.

A amostra foi novamente centrifugada a $2200 \times g$ por 12 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet celular foi ressuspensão em 16 mL de solução FSB gelada.

Foram adicionados 560 µL de DMSO, com homogeneização por inversão, seguida de incubação em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionada uma segunda alíquota de 560 µL de DMSO, seguida de nova homogeneização e incubação em gelo por 15 minutos.

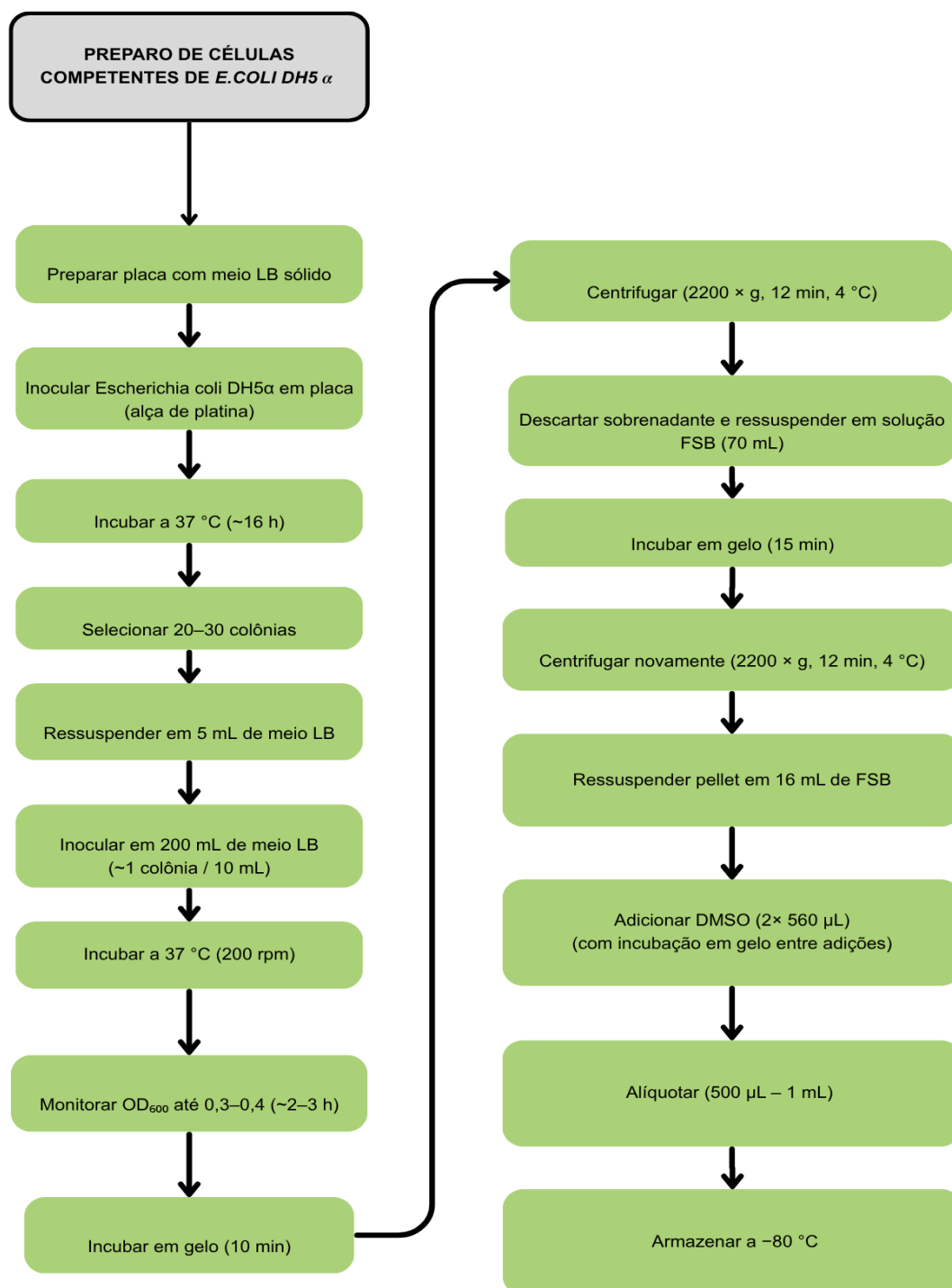
Alíquotas de 500 µL a 1 mL foram distribuídas em 10 criotubos estéreis e imediatamente transferidas para o freezer a -80 °C, sendo mantidas nessas condições até a utilização.

Para facilitar a visualização das etapas envolvidas no preparo das células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α, a Figura 11 apresenta o fluxograma resumindo a sequência experimental adotada, desde a obtenção das colônias até o armazenamento das células competentes a -80 °C.

A obtenção de células quimiocompetentes baseia-se na alteração controlada da permeabilidade da membrana celular, permitindo que moléculas de DNA exógeno sejam posteriormente internalizadas durante o processo de transformação bacteriana. No protocolo empregado, a utilização da solução FSB associada ao tratamento em baixas temperaturas promove modificações na superfície celular, reduzindo a repulsão eletrostática entre a membrana bacteriana e o DNA plasmidial. Além disso, a manutenção das células em fase exponencial de crescimento (DO600 entre 0,3 e 0,4) favorece a obtenção de uma população celular metabolicamente ativa e mais suscetível à aquisição de competência.

A adição gradual de DMSO desempenha papel importante na estabilização das células durante o preparo e armazenamento, contribuindo para a preservação da viabilidade celular após o congelamento. Esse procedimento permite que as células mantenham sua capacidade de transformação por períodos prolongados quando armazenadas a -80 °C. Dessa forma, a combinação entre crescimento controlado, tratamento com FSB, adição de DMSO e armazenamento em ultrabaixa temperatura constitui uma estratégia amplamente empregada para a obtenção de células competentes de *E. coli* com elevada eficiência de transformação. A Figura 11 ilustra o Fluxograma do Preparo de células competentes em etapas sequenciadas.

Figura 11 - Preparo de células competentes



fonte: própria autora, (2026)

4.2.3 Transformação de células quimiocompetentes

Para a transformação, 100 microlitros de microrganismo congelado em gelo (vagarosamente) foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL, aos quais foi adicionado o DNA, utilizando 1 μ L de solução a 100 ng/ μ L.

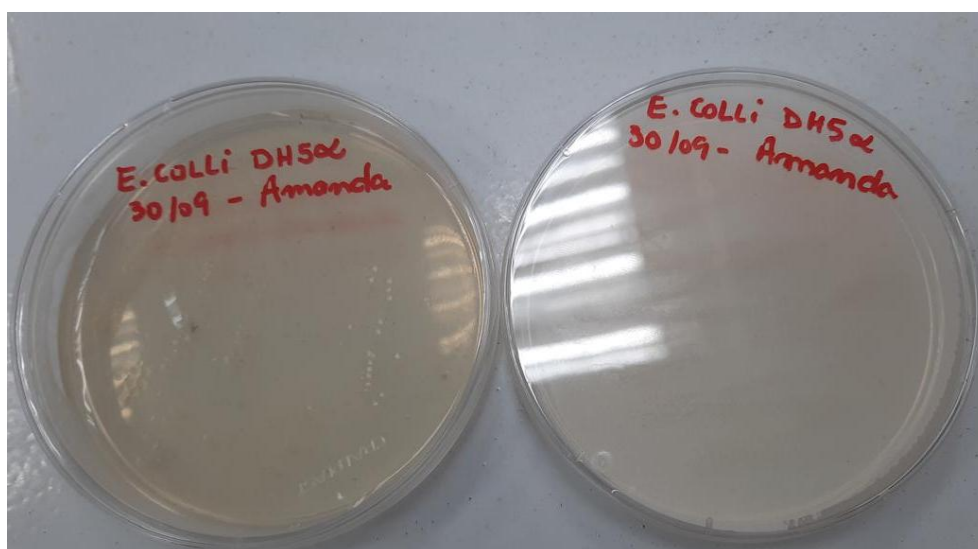
A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42 °C por 90 segundos. Posteriormente, os tubos foram novamente incubados em gelo por 2 minutos.

Foram adicionados 900 μ L de meio LB, e as amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 1 hora.

4.2.4 Controle positivo e negativo

Realizou-se a inoculação da célula transformada em uma única placa, contendo alíquota de 100 μ L em meio sólido LB com ampicilina, ocorrendo o crescimento da bactéria de interesse e a não contaminação do processo, pois a *E.coli DH5 α* transformada é resistente a ampicilina. Uma outra placa sem a inoculação foi utilizada como controle, para mostrar que somente a bactéria desejada cresceu na placa positiva, mostrando a esterilização eficiente. Na Figura 12, é possível observar o crescimento das colônias na placa com ampicilina.

Figura 12 - Placas de controle com positivo esquerda, controle negativo à direita



fonte: própria autora, (2025)

As colônias da placa com resultado positivo, foram inoculadas em um erlen com 50 mL de meio LB e colocada em shaker à 37°C e 200 rpm e foram retiradas ao atingir uma densidade ótima de 0,3 A, leitura realizada em espectrofotômetro em 600 nm, utilizando água como referência, foram guardados 1000 µL em solução crioprotetora de 10% de glicerol, distribuídos em 10 criotubos e guardados em ultrafreezer -80°C.

O DNA plasmidial é adicionado às células competentes ainda em gelo e permanece associado à superfície celular durante a incubação. A entrada efetiva do plasmídeo ocorre durante o choque térmico a 42 °C, quando alterações transitórias na membrana aumentam sua permeabilidade e permitem a passagem do DNA para o interior da célula. Após o retorno ao gelo e a recuperação em meio LB, as células passam a expressar os genes presentes no plasmídeo, incluindo o marcador de resistência utilizado na seleção

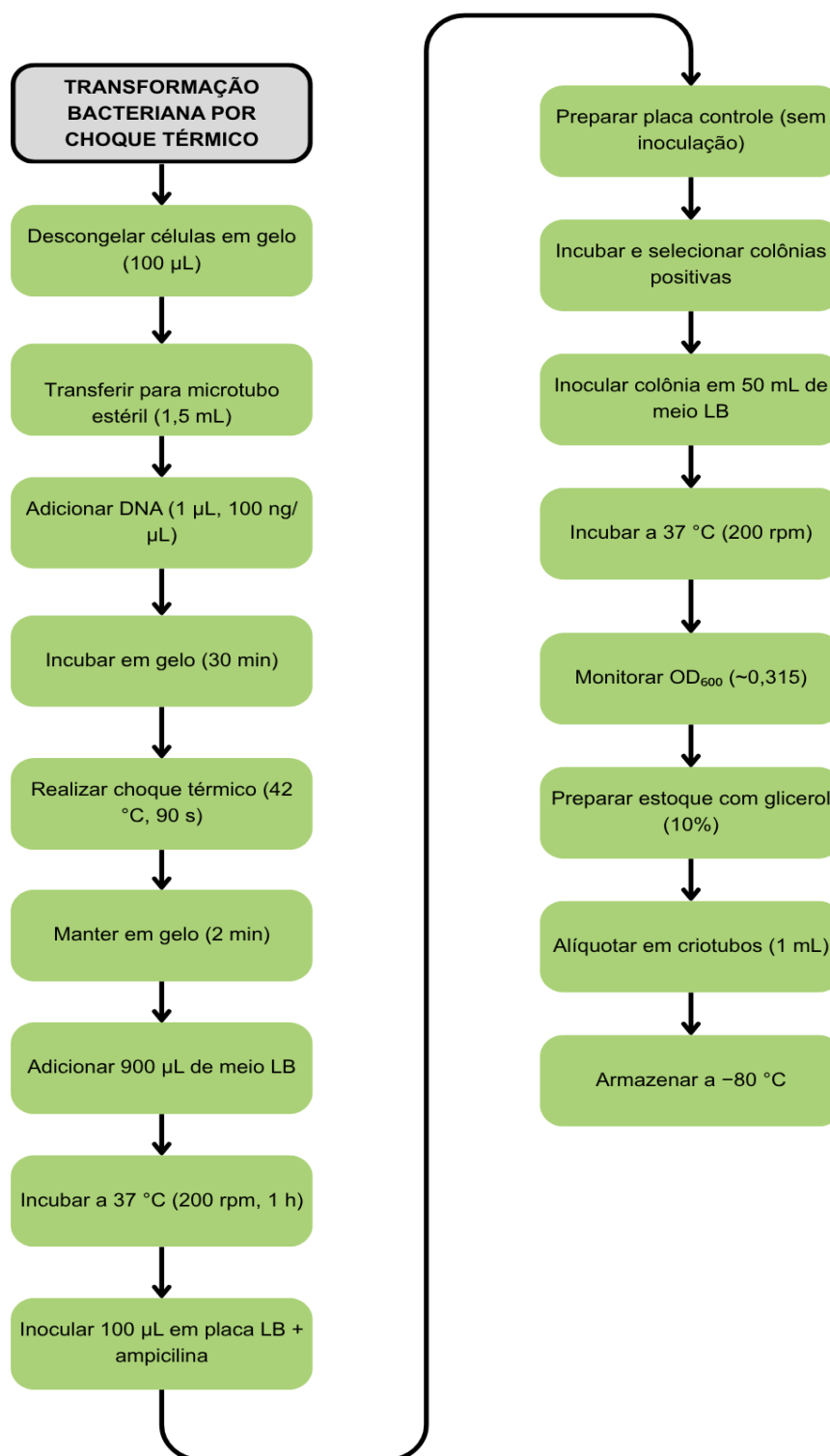
Após o choque térmico, a etapa de recuperação em meio LB é fundamental para o sucesso da transformação bacteriana. Durante esse período, as células restauram a integridade da membrana plasmática, retomam seu metabolismo e iniciam a expressão dos genes presentes no plasmídeo introduzido. Entre esses genes encontra-se o marcador de resistência à ampicilina, que permite a seleção das células efetivamente transformadas quando cultivadas em meio contendo o antibiótico.

A utilização do plasmídeo PT7T3BsXA possibilita a introdução do gene de interesse na linhagem hospedeira, permitindo sua manutenção e posterior expressão em *Escherichia coli*. Além do gene codificador da enzima, o plasmídeo contém um marcador de resistência à ampicilina, utilizado para a seleção das células transformadas e para garantir a estabilidade genética do sistema durante os cultivos subsequentes.

A seleção em meio contendo ampicilina baseia-se na presença do gene de resistência transportado pelo plasmídeo. Dessa forma, apenas as células que incorporaram o DNA plasmidial são capazes de crescer na presença do antibiótico, enquanto as células não transformadas têm seu crescimento inibido. Esse procedimento permite confirmar o sucesso da transformação e obter culturas contendo exclusivamente os microrganismos de interesse.

A Figura 13 ilustra um Fluxograma das Etapas de Transformação bacteriana por choque térmico de forma sequenciada.

Figura 13 - Transformação bacteriana por choque térmico



fonte: própria autora, (2026)

4.2.5 Cultivo das células transformadas

Foram preparadas duas placas de petri com meio Luria Bertani com concentração 10 μ L ampicilina/10 mL meio. Ademais, houve o preparo de três erlenmeyers contendo meio SB no volume de 50 mL em cada.

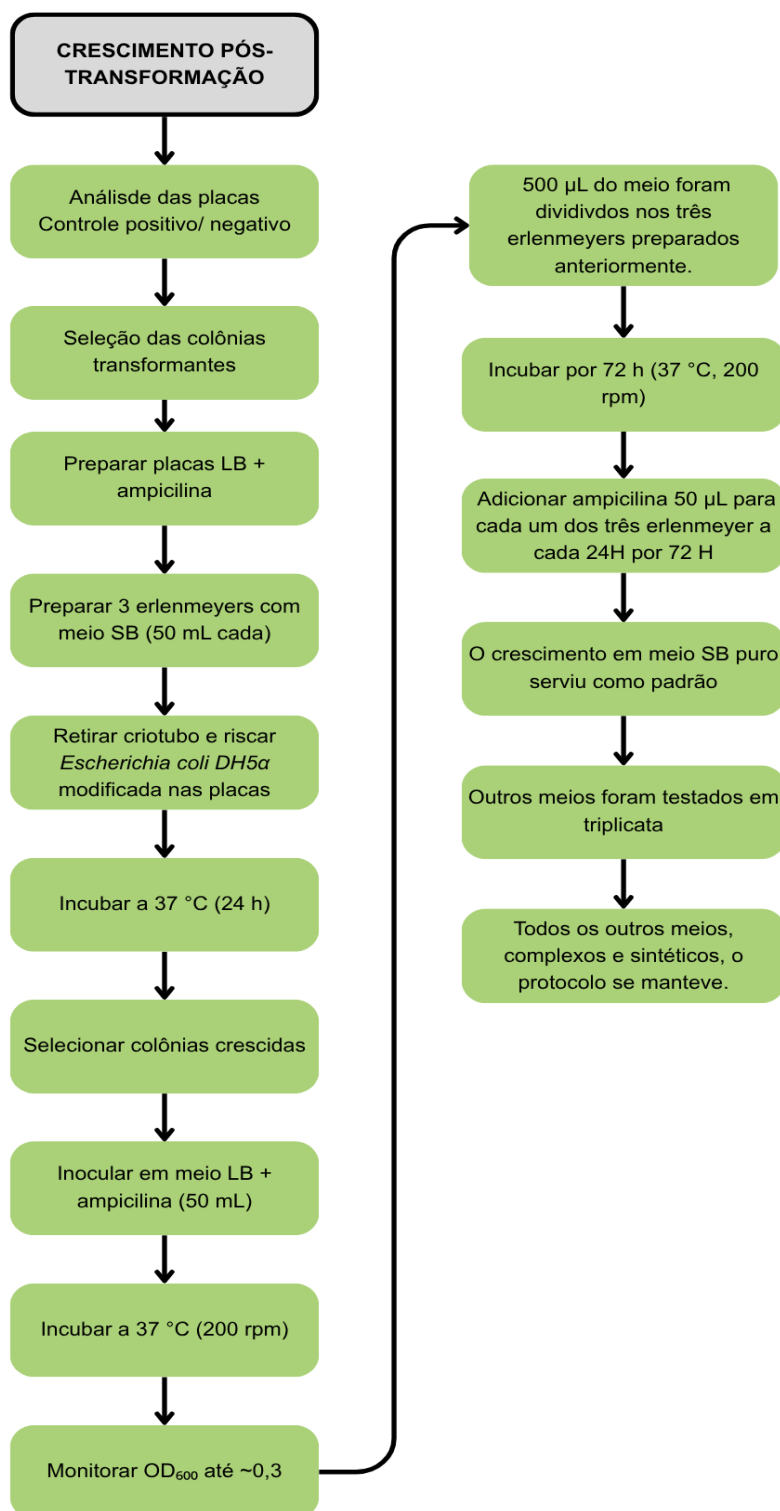
Houve a retirada de um dos criotubos contendo as células agora modificadas e a riscagem nas duas placas de petri preparadas anteriormente, esperou-se o crescimento das colônias em uma estufa a 37°C durante 24 horas. No dia posterior houve a verificação do crescimento das colônias e a sua coleta para ser inoculada no meio LB líquido, contendo ampicilina na concentração 50 μ L ampicilina/50 mL, que foi colocado em um shaker a 37°C em 200 rpm.

Após o cultivo atingir um crescimento celular com densidade óptica de 0,3, foram adicionados 500 μ L desse meio nos três erlenmeyers preparados anteriormente com meio SB, e acrescentados 50 μ L de ampicilina para cada erlenmeyer com 50 mL. A cada 24 horas a ampicilina foi reforçada na mesma concentração, tendo duração de 72 horas.

O crescimento em meio SB puro serviu como padrão para a análise dos outros meios que foram testados posteriormente, em triplicata. Em todos os outros meios, complexos ou sintéticos, o protocolo se manteve.

A Figura 14 ilustra um Fluxograma de Crescimento Pós- Transformação das bactérias modificadas geneticamente.

Figura 14 - Crescimento Pós- Transformação



fonte: própria autora, (2026)

4.3 Ensaios enzimáticos

4.3.1 Preparo do CMC 4% (Carboximetilcelulose sódica)

A solução de carboximetilcelulose (CMC) a 4%, presente na Tabela 5, foi preparada conforme Gosh (1987).

Tabela 5- Preparo da solução de acetato de potássio 1 M (10 mL)

Reagentes	Peso (g)
CH ₃ COOK	0,9814
Água Destilada	10 ml

fonte: Gosh (1987)

Inicialmente, foram pesados 0,9814 g de acetato de potássio, os quais foram dissolvidos em aproximadamente 8 mL de água ultrapura. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,5 mediante a adição de solução de ácido acético 0,5 M. Após o ajuste do pH, o volume final foi completado para 10 mL com água ultrapura.

Por fim, a solução foi armazenada a -20 °C até sua utilização.

Materiais Utilizados

- Balança analítica;
- pHmetro;
- água destilada;
- agitador magnético;
- placa de leitura;
- solução de acetato de potássio 100 mM pH 5,0;

Métodos

Inicialmente, foi preparado um tampão acetato de potássio 100 mM em pH 5,0. Para isso, água Milli-Q foi transferida para um béquer, e o pH ajustado para 5,0 utilizando solução de ácido acético 0,5 M. Em seguida, o volume foi completado para 10 mL.

Posteriormente, foram pesados 4 g de carboximetilcelulose (CMC) em um béquer de 200 mL. Em seguida, adicionaram-se 90 mL do tampão acetato de potássio 100 mM previamente preparado. A mistura foi homogeneizada manualmente com auxílio de um bastão

de vidro, visando desfazer os aglomerados formados durante a dispersão do polímero. Não foi utilizado agitador tipo vortex, uma vez que a intensa agitação favorece a formação de grumos de difícil dispersão, dificultando a hidratação homogênea da CMC.

A suspensão foi mantida em repouso até completa dissolução da CMC, processo que ocorreu após aproximadamente duas horas. Quando necessário, a suspensão era mantida em repouso por até 24 horas, seguida de nova homogeneização com bastão de vidro para promover a completa solubilização do material.

Após a dissolução da CMC, o pH da solução foi verificado utilizando fita indicadora. Em seguida, o volume final foi ajustado para 100 mL com o tampão acetato de potássio 100 mM (pH 5,0). A solução foi armazenada sob refrigeração e o pH monitorado antes de cada utilização. Quando o valor de pH se encontrava fora da faixa de 4,8 a 5,5, uma nova solução era preparada.

4.3.2 Determinação da concentração de enzima através de DNS

A determinação da atividade de endoglucanase foi realizada conforme escrito por Miller (1959), com adaptações, e na padronização de ensaios de celulasas proposta por Ghose (1987).

Métodos utilizados

Inicialmente, as amostras destinadas à análise foram separadas e, quando necessário, diluídas adequadamente para permitir a leitura dentro da faixa linear do espectrofotômetro. Em seguida, microtubos de 2,0 mL foram identificados de acordo com cada amostra, sendo todas as análises realizadas em triplicata.

Para o ensaio enzimático, foram adicionados 90 µL de solução de carboximetilcelulose (CMC) a 4% em cada microtubo, seguidos da adição de 10 µL da amostra enzimática correspondente. O branco da reação foi preparado utilizando 90 µL de solução de CMC a 4% e 10 µL de água ultrapura. Posteriormente, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vortex e incubados em banho-maria a 60 °C por 10 minutos.

Após a incubação, os microtubos foram resfriados em gelo por 5 minutos para interromper a reação enzimática. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente DNS a cada tubo, procedendo-se nova homogeneização em vórtex. Posteriormente, os microtubos

foram submetidos a aquecimento em banho seco a 100 °C por 5 minutos para o desenvolvimento da coloração característica da reação.

Ao término do aquecimento, os tubos foram novamente resfriados em gelo por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água destilada a cada microtubo, seguido de homogeneização em vórtex. Por fim, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da atividade enzimática, conforme as equações apresentadas no Anexo A.

4.3.3 Determinação da curva de calibração da glicose em tubo de ensaio

A curva de calibração de glicose foi construída a partir de soluções padrão de concentrações conhecidas, conforme o princípio descrito por Miller (1959), presente neste trabalho no Anexo B.

5. Resultados e Discussões

5.1. Determinação de Temperatura ideal a ser utilizada para medir a atividade dos meios

A absorbância apresentada na Tabela 6, refere-se à quantificação de açúcares redutores liberados durante a hidrólise do substrato, determinada pelo método do DNS, proporcionando o cálculo da atividade da endoglucanase em cada diluição e temperatura testadas.

Tabela 6– Valores de absorbância e concentração enzimática em diferentes condições de tratamento térmico e diluição

Amostras	70°C sem diluir	70°C diluído 5 vezes	60°C sem diluir	60°C diluído 5 vezes
1.1	0,598	0,303	0,864	0,147
1.2	0,665	0,290	0,640	0,129
1.3	0,575	0,290	0,793	0,112
2.1	0,457	0,277	0,852	0,219
2.2	0,386	0,252	0,770	0,184
2.3	0,553	0,255	0,643	0,192
3.1	0,590	0,200	0,919	0,257
3.2	0,652	0,276	0,861	0,256
3.3	0,468	0,248	0,732	0,176
média	0,549	0,266	0,786	0,186
concentração U/L	1087,789	526,073	1556,436	367,877

fonte: própria autora, (2025)

A partir dos valores obtidos, foram calculadas as atividades enzimáticas para cada condição experimental. Observa-se que a condição a 60 °C sem diluição apresentou a maior atividade enzimática (1556,436 U/L), seguida pelas condições a 70 °C sem diluição (1087,789 U/L), 70 °C diluído 5 vezes (526,073 U/L) e 60 °C diluído 5 vezes (367,877 U/L). Esses resultados indicam que a temperatura de 60 °C favorece a atividade da endoglucanase em comparação a 70 °C.

Esse comportamento indica que a endoglucanase apresenta maior estabilidade e eficiência catalítica em temperaturas mais próximas de 60 °C. A redução da atividade observada a 70 °C pode estar associada à desnaturação térmica parcial da enzima, levando à perda de sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, da atividade catalítica. Além disso, temperaturas mais elevadas podem intensificar processos de inativação enzimática e instabilidade estrutural. De acordo com Lehninger Principles of Biochemistry, enzimas possuem uma faixa ótima de temperatura, fora da qual sua atividade pode ser comprometida devido à desnaturação proteica, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. Embora os

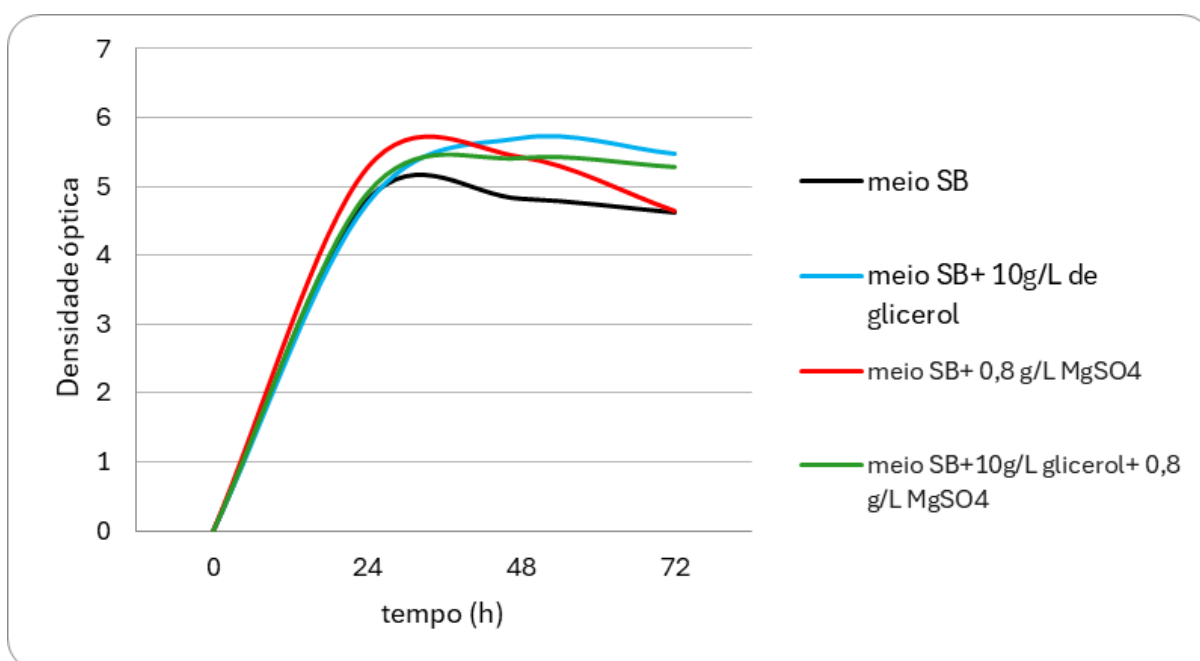
dados diluídos favoreçam a leitura, a temperatura pode desnaturar a enzima, então optou-se pela menor.

5.2. Experimentos realizados em meio complexo

As Figuras 15 a 18 apresentam os gráficos de densidade óptica (DO) e atividade enzimática em meios complexos, acompanhados de suas respectivas análises e discussões.

5.2.1 Crescimento celular (glicerol e MgSO_4)

Figura 15 - Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora (2025). Dados utilizados: Apêndices C1, C2, C3.

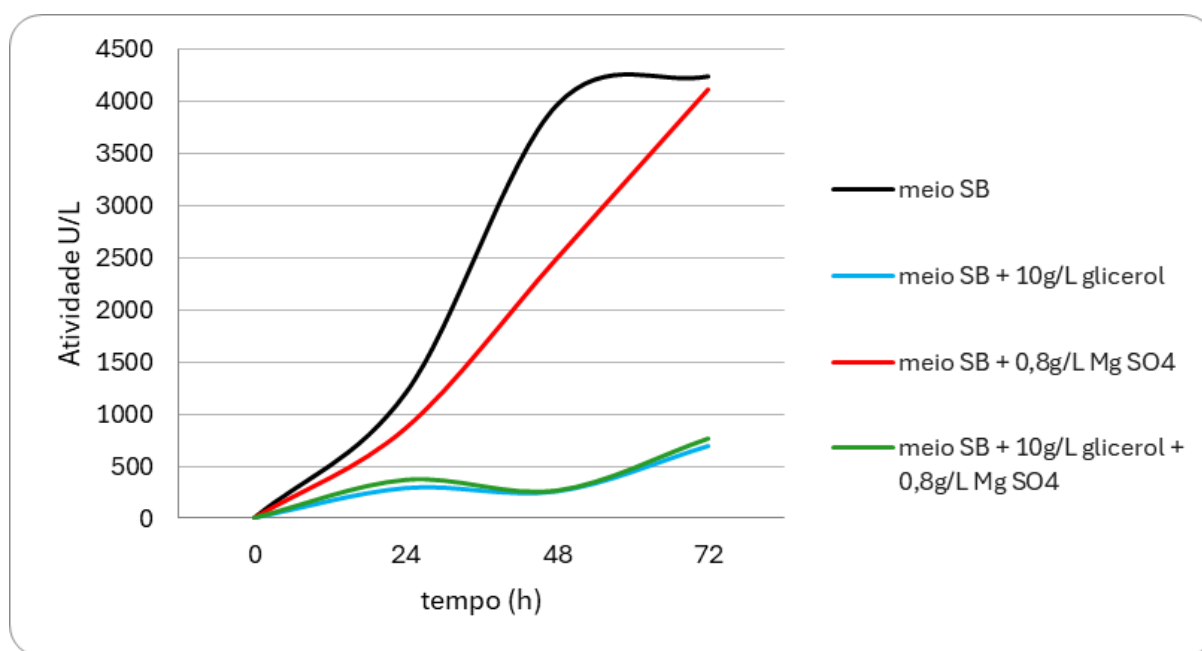
Na comparação entre as diferentes condições de cultivo, o meio SB puro (controle) apresentou o menor pico de densidade óptica (~5,0) e uma leve queda após 24–30 h, indicando limitação no crescimento e possível entrada na fase de declínio celular. A suplementação com 10 g/L de glicerol resultou no maior valor final de densidade óptica (~5,7–5,8), com crescimento contínuo até 48 h e posterior estabilização, evidenciando o papel do glicerol como fonte adicional de carbono que favorece o crescimento celular. Esses resultados corroboram estudos que demonstram a utilização eficiente de fontes de carbono alternativas por *E. coli*, promovendo maior acúmulo celular e produtividade metabólica, inclusive em cultivos recombinantes, em que o glicerol é metabolizado de forma eficaz para síntese de proteínas e biomoléculas (Chiang *et al.*, 2020; Christensen *et al.*, 2017).

A adição isolada de 0,8 g/L de MgSO_4 promoveu um crescimento inicial rápido, com pico acentuado ($\sim 6,0$ em 30 h), seguido por uma queda mais brusca, sugerindo que o sulfato de magnésio estimula o crescimento inicial, mas não sustenta a cultura a longo prazo. Essa observação está alinhada com estudos que indicam que íons de magnésio modulam o crescimento, divisão celular e expressão gênica em *E. coli*, além de desempenharem papéis fundamentais em processos enzimáticos e na estabilização de ribossomos e membranas (Nepal; Kumar, 2020; Berg *et al.*, 2012; Guyton; Hall, 2017).

A condição combinada de glicerol e MgSO_4 proporcionou um crescimento expressivo e sustentado (pico de $\sim 5,5$ – $5,6$), com estabilidade até 72 h, indicando um melhor desempenho geral e sinergia entre os nutrientes. Esses resultados reforçam a importância da otimização simultânea de fontes de carbono e minerais, conforme observado em cultivos recombinantes de *E. coli*, em que o ajuste adequado de glicerol e magnésio contribui para um crescimento equilibrado, maior produtividade e viabilidade celular (Chiang *et al.*, 2020; Christensen *et al.*, 2017). O glicerol melhora significativamente o crescimento celular, o MgSO_4 acelera o início do crescimento, e a combinação de ambos fornece a condição mais eficiente e equilibrada, enquanto o meio SB isolado apresenta menor eficácia em termos de densidade óptica e estabilidade do cultivo. Resultados semelhantes já foram observados em outros trabalhos, nos quais a escolha estratégica de fontes de carbono e minerais foi determinante para a produtividade e viabilidade celular em *E. coli* (Chen *et al.*, 1997; Schaepe *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019).

5.2.2 Atividade enzimática (glicerol e MgSO_4)

Figura 16 - Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025). Dados utilizados: Apêndices C4, C5, C6.

Na comparação das condições avaliadas, o meio SB puro apresentou o maior pico de atividade enzimática, alcançando aproximadamente 4200 U/L por volta de 60 horas, com um rápido aumento após 20 horas e estabilização subsequente, indicando alta eficiência sem necessidade de suplementação (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017). A adição isolada de MgSO_4 ao meio SB resultou em atividade igualmente elevada, próxima a 4000 U/L, demonstrando que o sulfato de magnésio não comprometeu o desempenho e sustentou o crescimento de forma semelhante ao controle, embora com um padrão de crescimento mais gradual (Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020). A importância dos íons Mg^{2+} como cofatores enzimáticos e sua atuação na estabilização da maquinaria celular já foi amplamente reconhecida na literatura, reforçando sua contribuição para a manutenção da atividade catalítica mesmo sem fontes adicionais de carbono (Chiang *et al.*, 2020; Mital *et al.*, 2021).

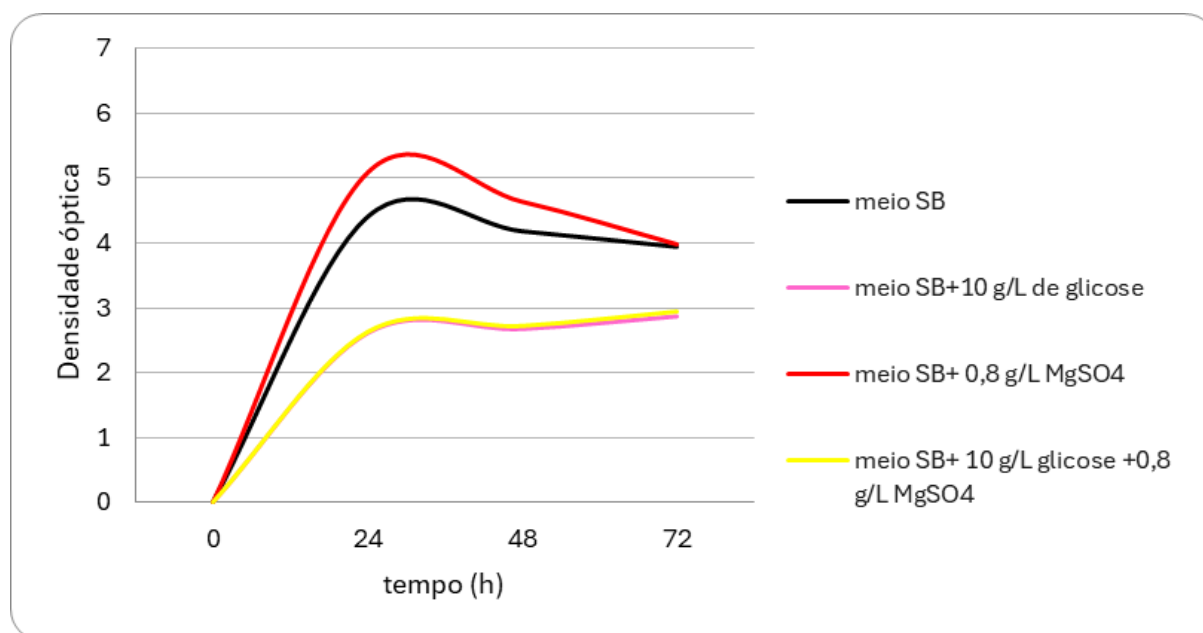
Em contraste, os meios suplementados com glicerol, tanto isoladamente quanto combinados com MgSO_4 , apresentaram atividade significativamente reduzida, inferior a 800 U/L durante todo o período, sugerindo que o glicerol pode inibir a atividade enzimática, possivelmente por alterar o metabolismo celular ou interferir na assimilação de nutrientes

essenciais (Ruller *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2020). Estudos anteriores indicam que o acúmulo de subprodutos do metabolismo do glicerol, como o acetato, pode causar acidificação do meio e inibição enzimática em *E. coli* (Christensen *et al.*, 2017; Chiang *et al.*, 2020).

Portanto, o meio SB puro e o meio SB com MgSO_4 foram as condições de melhor desempenho, enquanto os meios contendo glicerol demonstraram os piores resultados em termos de atividade. Embora a suplementação com glicerol tenha promovido maior densidade óptica, esse aumento de biomassa não se refletiu em maior atividade endoglucanase, indicando um desacoplamento entre crescimento celular e produção enzimática (Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021).

5.2.3 Crescimento celular (glicose e MgSO_4)

Figura 17 - Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora (2025). Dados utilizados: Apêndices C7, C8, C9.

A análise comparativa entre as condições experimentais revelou que o meio SB suplementado com MgSO_4 promoveu o maior crescimento celular, atingindo densidade óptica máxima próxima a 5,5 por volta de 24 horas, sugerindo que o MgSO_4 atua como cofator enzimático essencial e estimula a proliferação celular (Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020). Tal comportamento pode ser atribuído à função dos íons Mg^{2+} na estabilização de

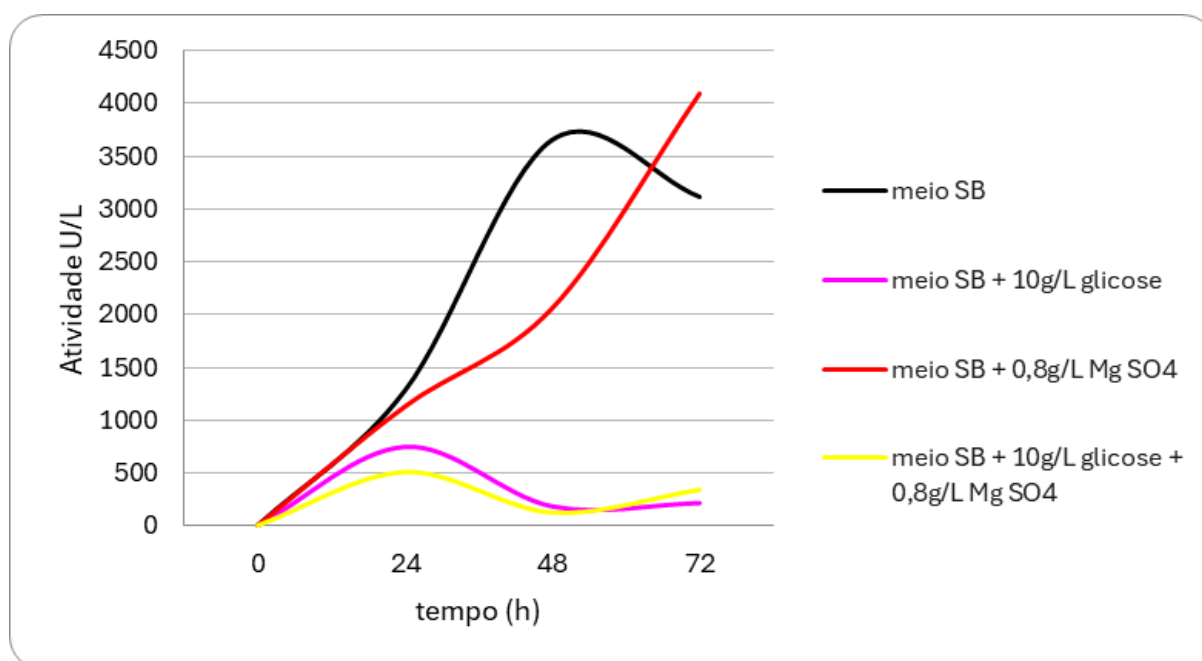
ribossomos, membranas e na ativação de diversas enzimas do metabolismo central, conforme discutido na literatura bioquímica (Chiang *et al.*, 2020; Mital *et al.*, 2021; Ruller *et al.*, 2006).

O meio SB puro apresentou crescimento consistente com pico em torno de 4,5 entre 24 e 30 horas, seguido de redução da biomassa, indicando possível transição para fase estacionária ou de declínio (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017). Em contraste, os meios suplementados com glicose, isoladamente ou em combinação com MgSO_4 , exibiram crescimento limitado, com densidade óptica máxima em torno de 3,0 e estabilização precoce, indicando que a glicose não favorece o crescimento celular neste contexto e pode até inibir o metabolismo da *E. coli* (Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020).

Essa inibição pode estar relacionada ao acúmulo de metabólitos como o acetato, um subproduto comum do metabolismo da glicose, cuja toxicidade e efeito inibitório sobre o crescimento já foram amplamente documentados (Christensen *et al.*, 2017; Chiang *et al.*, 2020). Assim, conclui-se que o MgSO_4 melhora significativamente o crescimento em meio SB, enquanto a presença de glicose reduz a eficiência, tornando os meios suplementados com glicose os menos eficazes (Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021).

5.2.4 Atividade enzimática (glicose e MgSO_4)

Figura 18 - Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio SB suplementado com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025). Dados utilizados: Apêndices C10, C11, C12.

A comparação entre as condições experimentais revelou que o meio SB suplementado com MgSO_4 apresentou a maior atividade enzimática, ultrapassando 4200 U/L ao final de 72 horas, com um perfil de produção constante e crescente, sugerindo que o magnésio atua como cofator otimizando a expressão ou estabilidade da enzima (Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020). Esse comportamento está em consonância com a importância do íon magnésio na ativação enzimática e estabilização de estruturas moleculares essenciais para a síntese proteica (Chiang *et al.*, 2020; Mital *et al.*, 2021; Ruller *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2012; Guyton; Hall, 2017).

O meio SB puro também apresentou boa atividade, com pico de aproximadamente 3700 U/L entre 50 e 55 horas, seguido por declínio típico decorrente do esgotamento de nutrientes ou acúmulo de subprodutos, fenômeno comum em cultivos bacterianos que pode comprometer a produção enzimática (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017; Lee, 1996; Schaepe *et al.*, 2014).

Por outro lado, os meios contendo glicose, isoladamente ou combinados com MgSO_4 , mostraram baixa produção enzimática, com picos inferiores a 700 U/L e platôs precoces, indicando que a glicose exerce impacto catabólico negativo, inibindo a ativação dos genes responsáveis pela produção da enzima (Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020). Estudos anteriores destacam que a presença de glicose pode desencadear repressão catabólica, reduzindo a expressão gênica e a eficiência metabólica em *E. coli* (Christensen *et al.*, 2017; Chiang *et al.*, 2020; Chen, 1997; Silva, 2019).

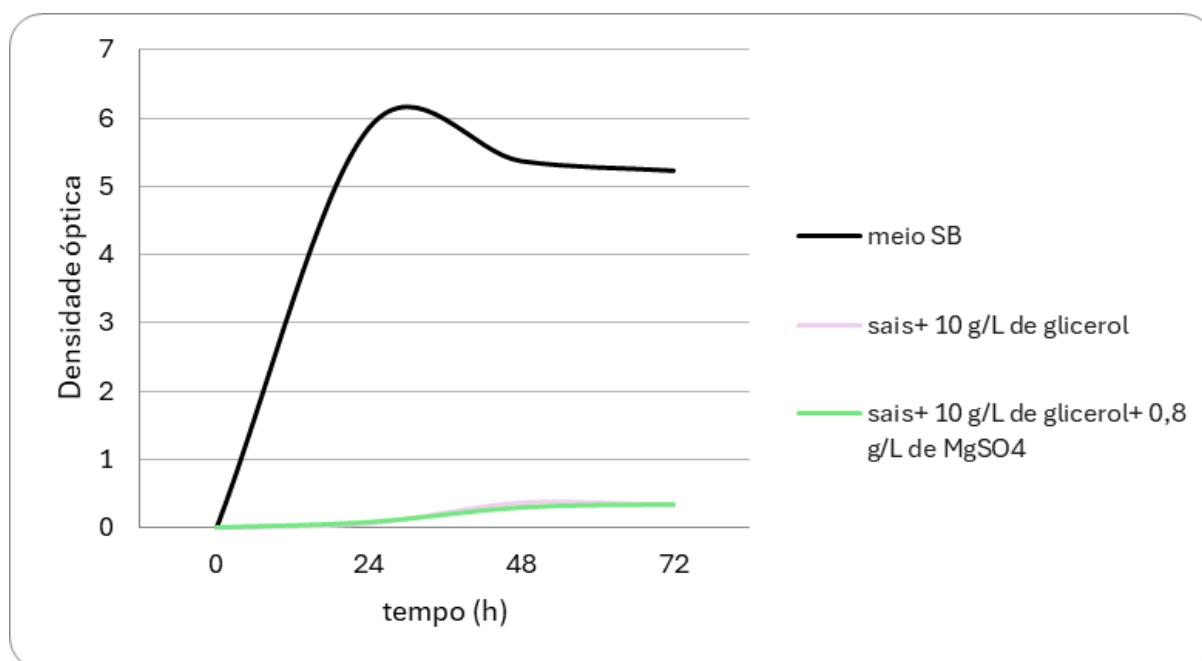
Ademais, a presença de MgSO_4 não foi suficiente para superar o efeito inibitório do ácido acético, confirmando que o magnésio é benéfico isoladamente, mas seu efeito positivo é baixo quando a glicose está presente no meio (Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021).

5.3. Experimentos realizados em meios sintéticos

As Figuras 19 a 22 apresentam os gráficos de densidade óptica (DO) e atividade enzimática em meios sintéticos, acompanhados de suas respectivas análises e discussões.

5.3.1 Crescimento celular (glicerol e MgSO_4)

Figura 19 - Monitoramento da densidade óptica ao longo do tempo suplementado em meio de sais com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025).Dados utilizados: Apêndices C13, C14, C15.

A comparação entre as condições experimentais revelou que o meio SB proporcionou o crescimento celular mais expressivo, com pico de densidade óptica superior a 6,0 entre 24 e 30 horas, seguido de uma leve diminuição e estabilização em torno de 5,2; indicando que esse meio contém os nutrientes essenciais para um crescimento eficiente e manutenção da biomassa (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017; Nelson; Cox, 2018; Berg *et al.*, 2012).

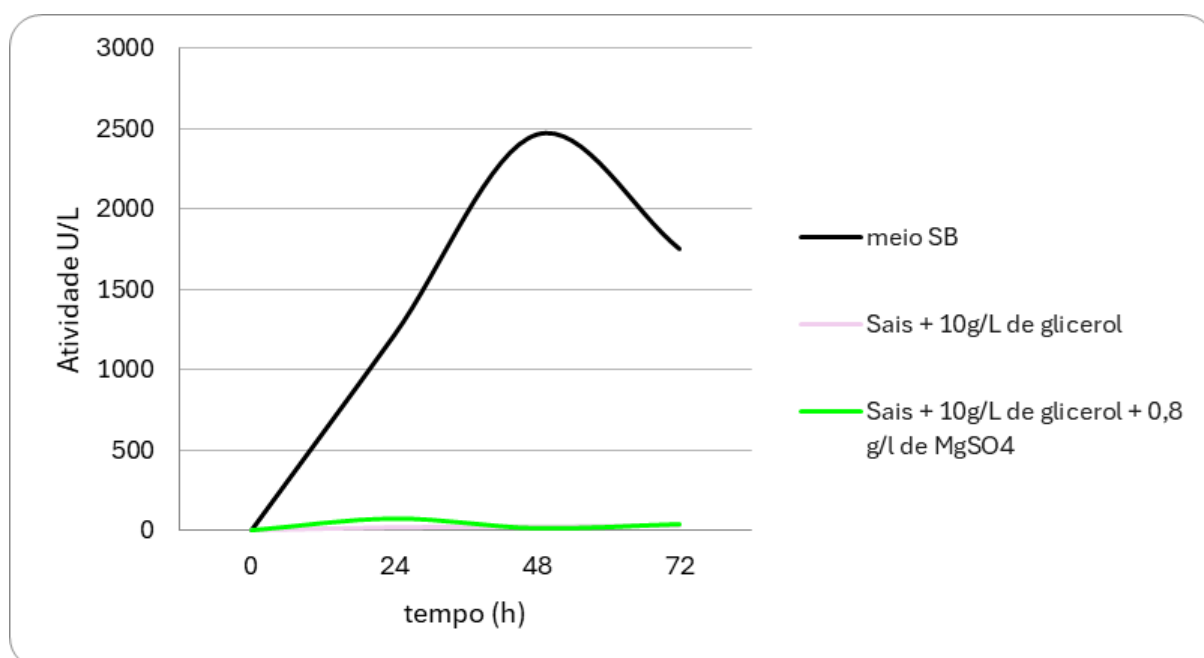
Em contraste, os meios contendo apenas sais e glicerol, ou com sua adição de MgSO_4 , apresentaram crescimento celular muito limitado, com densidade óptica inferior a 0,5 durante todo o experimento, evidenciando que o glicerol como única fonte de carbono em meio mínimo não é suficiente para sustentar o crescimento (Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 1997). Embora o meio formulado contenha um sistema tampão fosfato eficaz ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) com pH teórico em torno de 7,7 e utilize glicerol como fonte de

carbono, o que favorece a estabilidade do pH durante o cultivo, o crescimento de *E. coli* pode ser inviabilizado, sendo o mais notório a ausência de nutrientes orgânicos essenciais, como aminoácidos, vitaminas e bases nitrogenadas, que são imprescindíveis principalmente para cepas laboratoriais auxotróficas, como DH5 α , as quais apresentam mutações em vias biossintéticas (Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020; Neidhardt *et al.*, 1990; Sambrook; Russell, 2001).

Portanto, ainda que o pH, temperatura e a fonte de carbono estejam adequados, a ausência de uma fonte orgânica complexa (como peptona ou extrato de levedura) pode limitar o crescimento de *E. coli* em condições laboratoriais (Ruller *et al.*, 2006; Mital *et al.*, 2021).

5.3.2 Atividade enzimática (glicerol e MgSO₄)

Figura 20 - Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio de sais com glicerol e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025). Dados utilizados: Apêndices C16, C17, C18.

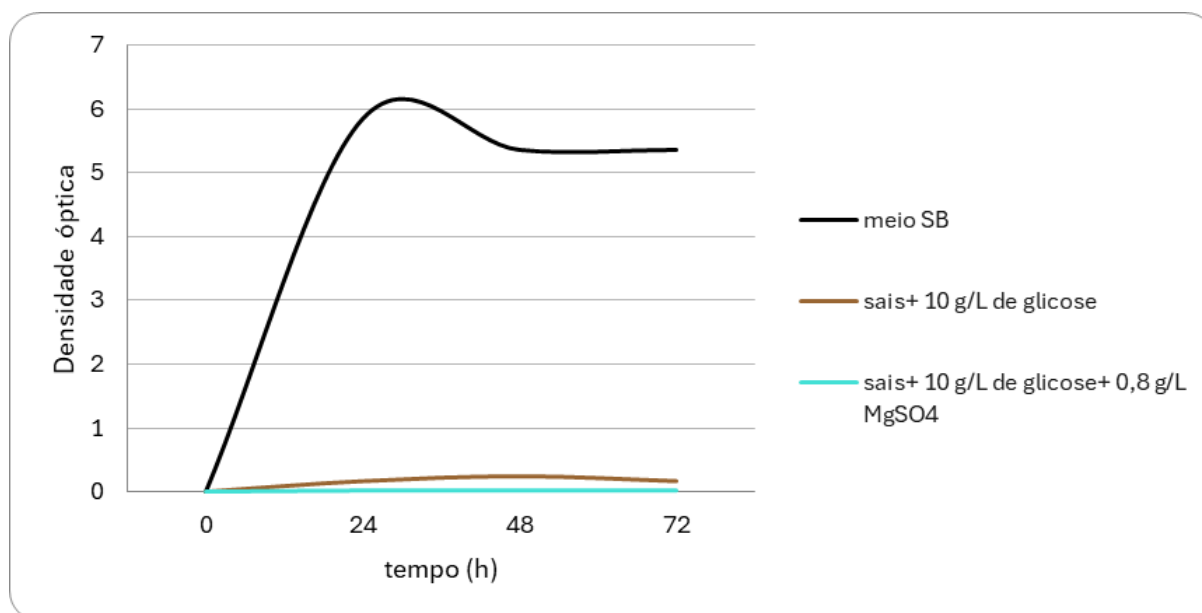
A comparação das condições experimentais demonstrou que o meio SB completo apresentou a maior atividade enzimática, atingindo um pico em torno de 2500 U/L por volta das 48 horas, seguido de uma leve queda que pode estar associada ao esgotamento de nutrientes ou regulação negativa da produção enzimática, fenômeno comum em cultivos bacterianos que limita a expressão gênica e atividade enzimática (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017; Lee, 1996; Schaepe *et al.*, 2014).

O meio mínimo, mesmo suplementado com sais e magnésio, não foi suficiente para induzir ou sustentar a síntese enzimática, apresentando atividade extremamente baixa, inferior a 100 U/L durante todo o experimento. Esse resultado indica que o meio mínimo carece dos nutrientes essenciais para a produção enzimática, tais como nitrogênio, fosfato, oligoelementos e aminoácidos, que são imprescindíveis para o crescimento celular e a biossíntese proteica (Berg *et al.*, 2012; Guyton; Hall, 2017; Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020; Nelson; Cox, 2014; Ruller *et al.*, 2006; Mital *et al.*, 2021).

Além disso, a presença de glicerol nos meios mínimos não foi suficiente para suprir essa demanda nutricional, corroborando dados de crescimento celular que indicam forte limitação nesse meio (Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021).

5.3.3 Crescimento celular (glicose e MgSO_4)

Figura 21 - Monitoramento da densidade óptica em longo do tempo em meio de sais com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025). Dados utilizados: Apêndices C19, C20, C21.

As diferentes condições experimentais evidenciaram que o meio SB completo proporcionou o melhor crescimento celular, com a densidade óptica atingindo um pico em torno de 6,2 entre 24 e 30 horas. Após esse período, houve uma leve redução, estabilizando-se em aproximadamente 5,3, o que indica manutenção da biomassa e disponibilidade adequada de

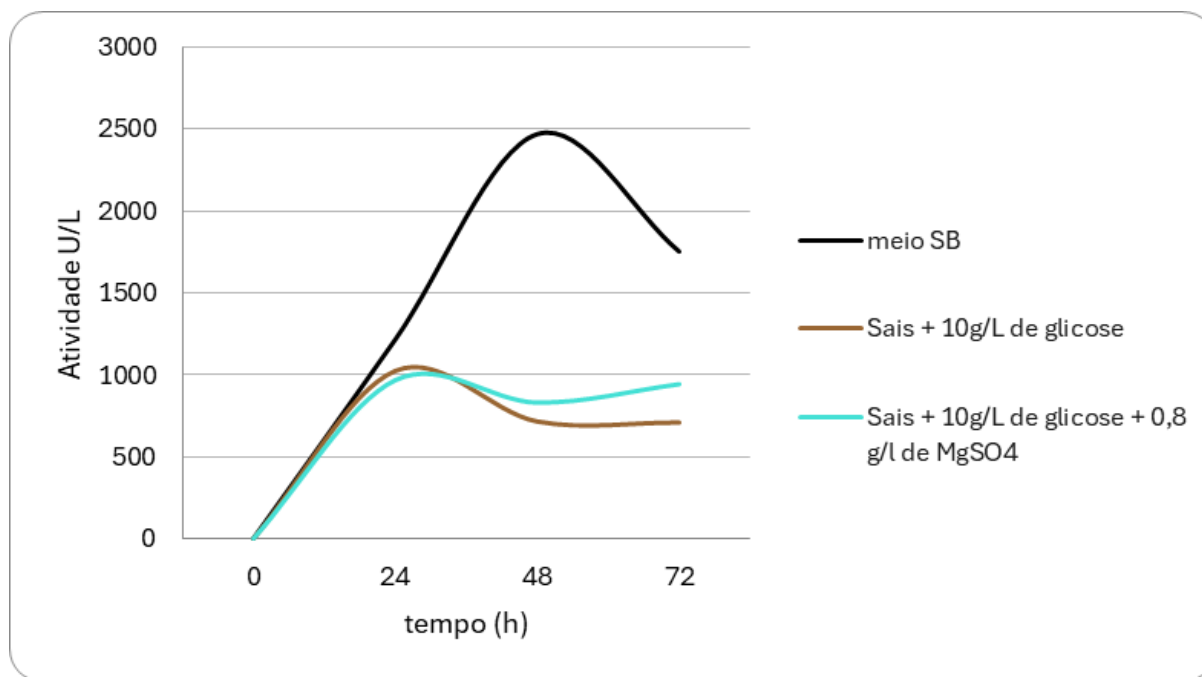
nutrientes essenciais ao longo do tempo. Esse desempenho reforça a importância de um meio de cultivo equilibrado, que contenha fontes adequadas de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas para sustentar a atividade metabólica e o crescimento bacteriano (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017; Nelson; Cox, 2018; Nelson; Cox, 2014).

Em contrapartida, os meios compostos apenas por sais e glicose, com ou sem a adição de MgSO_4 , resultaram em crescimento bastante restrito, com densidade óptica inferior a 0,6 durante todo o experimento. Esse resultado indica que a glicose, quando utilizada como única fonte de carbono em um meio mínimo, não é suficiente para sustentar o crescimento celular de forma eficaz, devido à ausência de outros nutrientes essenciais, como fontes de nitrogênio, fosfato e vitaminas (Berg *et al.*, 2012; Guyton; Hall, 2017; Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020; Ruller *et al.*, 2006; Mital *et al.*, 2021).

A adição de MgSO_4 , por sua vez, não foi capaz de reverter essa limitação, o que sugere que o baixo crescimento observado se deve a uma carência nutricional mais ampla, e não apenas à falta de magnésio, como também já relatado em estudos com *E. coli* sob condições restritivas de nutrientes (Lee, 1996; Chen *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021).

5.3.4 Atividade enzimática (glicose e MgSO_4)

Figura 22- Monitoramento da atividade ao longo do tempo em meio de sais com glicose e sulfato de magnésio (em condição experimental)



fonte: própria autora, (2025). Dados utilizados: Apêndices C22, C23, C24.

A análise das condições experimentais mostrou que o meio SB foi o mais eficiente na produção enzimática, alcançando um pico de aproximadamente 2500 U/L por volta de 48 horas. Após esse período, observou-se uma leve queda na atividade, possivelmente relacionada à regulação negativa, ao esgotamento de substratos ou ao início da fase estacionária, o que demonstra que esse meio oferece um ambiente nutricionalmente equilibrado para sustentar altos níveis de produção enzimática. Os resultados indicam que a produção de endoglucanase não está diretamente associada ao crescimento celular, caracterizando um perfil de produção não associada ao crescimento, possivelmente regulado por mecanismos de repressão metabólica e disponibilidade de nutrientes. A estabilidade observada no SB está diretamente ligada à sua composição complexa, rica em diferentes fontes de nitrogênio, fósforo, minerais e vitaminas, componentes fundamentais para a expressão gênica e síntese de proteínas (Ghose, 1987; Ruiz *et al.*, 2017; Berg *et al.*, 2012; Guyton; Hall, 2017; Nelson; Cox, 2018; Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020; Ruller *et al.*, 2006; Mital *et al.*, 2021).

Em contrapartida, o meio contendo apenas sais e glicose apresentou um pico máximo de cerca de 1000 U/L nas primeiras 24 horas, seguido de uma queda acentuada, sugerindo

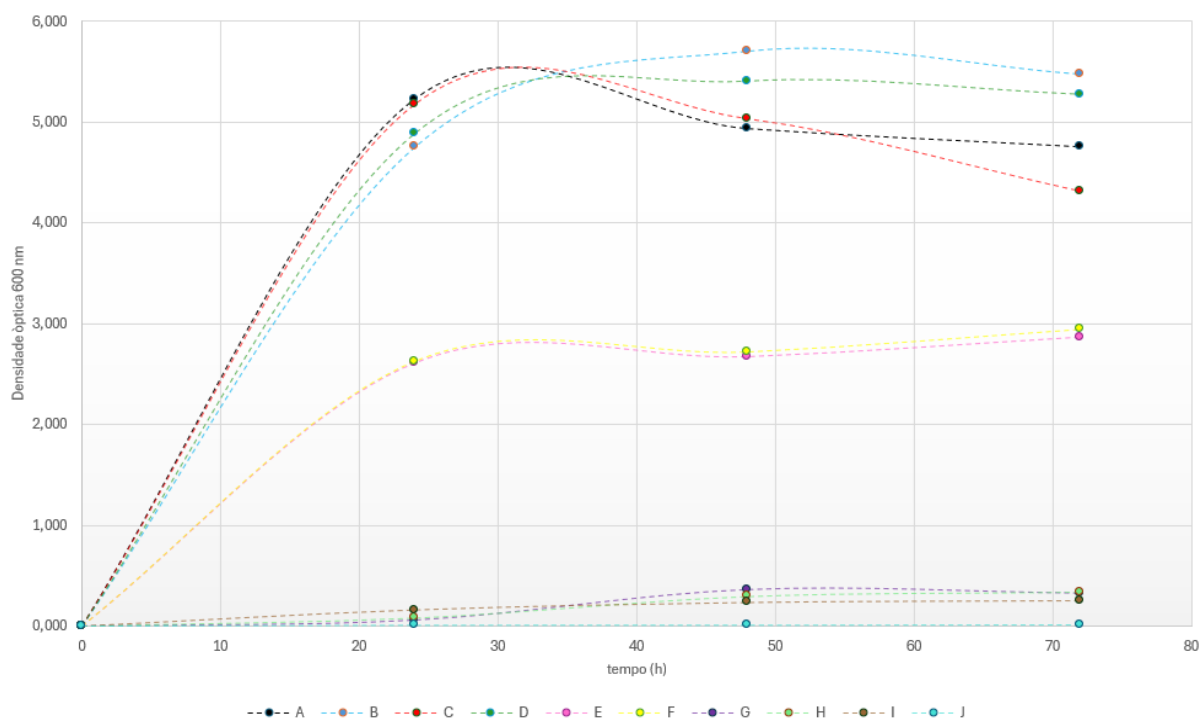
limitação nutricional, evidência de que a glicose isoladamente não é capaz de sustentar uma expressão enzimática eficiente. Quando se adicionou MgSO_4 a esse meio, observou-se um comportamento semelhante, embora com leve aumento da atividade enzimática a partir das 30 horas, alcançando quase 1000 U/L ao final do experimento. Isso sugere que o magnésio atua como cofator ou estabilizador enzimático, mas sua presença isolada não compensa a ausência de outros nutrientes essenciais, o que limita significativamente a eficiência do meio em comparação ao SB (Nelson; Cox, 2014; Berg *et al.*, 2012; Christensen *et al.*, 2017; Nepal; Kumar, 2020).

Esses dados reforçam que a composição nutricional do meio exerce forte influência sobre o desempenho enzimático, sendo o SB claramente mais eficaz. Já os meios mínimos, mesmo quando suplementados com MgSO_4 , apresentaram desempenho bastante inferior (Silva *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 1997; Schaepe *et al.*, 2014; Chiang *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021). Ao analisar o Gráfico 8, nota-se a baixa produção de endoglucanase nesses meios, o que parece estar relacionado à ausência de crescimento da linhagem *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo PT7T3BsXA, indicando que o déficit nutricional compromete diretamente a produção da enzima, baseado em Ruller *et. al* (2006).

5.3.5 Avaliação do crescimento celular nos diferentes meios de cultivo

As Figuras 23 e 24 apresentam os resultados de densidade óptica obtidos ao longo do cultivo nos diferentes meios experimentais. A Figura 23 demonstra a evolução temporal do crescimento celular durante as 72 horas de cultivo, enquanto a Figura 24 permite a comparação direta entre os meios avaliados nos diferentes tempos experimentais. Esses resultados possibilitam analisar a influência das diferentes fontes de carbono e da suplementação com sulfato de magnésio sobre a formação de biomassa celular.

Figura 23- Evolução temporal da densidade óptica nos diferentes meios de cultivo



- A — meio SB
 B — meio SB + 10 g/L de glicerol
 C — meio SB + 0,8 g/L de MgSO₄
 D — meio SB + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO₄
 E — meio SB + 10 g/L de glicose
 F — meio SB + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO₄
 G — sais + 10 g/L de glicerol
 H — sais + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO₄
 I — sais + 10 g/L de glicose
 J — sais + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO₄

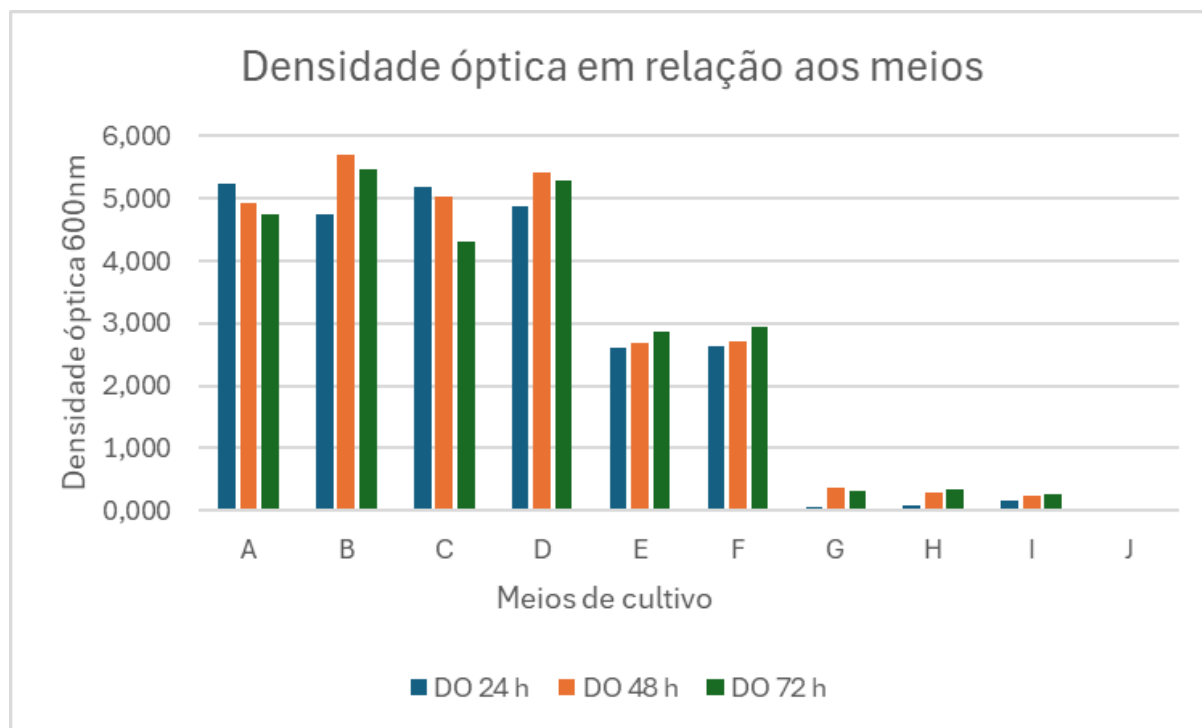
fonte : própria autora (2026)

Os meios contendo SB (A, B, C e D) apresentaram os maiores valores de densidade óptica ao longo do cultivo, atingindo valores próximos a 5,5 após 48 horas. A suplementação com glicerol e MgSO₄ não promoveu diferenças expressivas em relação ao meio SB isolado, indicando que a composição nutricional do meio complexo foi o principal fator responsável pelo elevado crescimento celular.

Os meios contendo SB suplementado com glicose (E e F) apresentaram crescimento intermediário, com densidade óptica próxima de 3,0, enquanto os meios formulados apenas com sais minerais (G, H, I e J) resultaram em crescimento limitado durante todo o período experimental. Esses resultados demonstram que a disponibilidade de nutrientes complexos

presentes no meio SB exerceu maior influência sobre o crescimento bacteriano do que a adição isolada de fontes de carbono ou de sulfato de magnésio.

Figura 24- Comparação da densidade óptica entre os meios de cultivo em diferentes tempos experimentais



A — meio SB
 B — meio SB + 10 g/L de glicerol
 C — meio SB + 0,8 g/L de MgSO_4
 D — meio SB + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO_4
 E — meio SB + 10 g/L de glicose
 F — meio SB + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO_4
 G — sais + 10 g/L de glicerol
 H — sais + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO_4
 I — sais + 10 g/L de glicose
 J — sais + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO_4

fonte : própria autora (2026)

A comparação da densidade óptica entre os diferentes meios de cultivo demonstrou que os meios contendo SB (A, B, C e D) apresentaram os maiores valores de crescimento celular em todos os tempos avaliados. Entre eles, os meios suplementados com glicerol (B e D) alcançaram as maiores densidades ópticas após 48 e 72 horas, indicando que essa fonte de carbono favoreceu a multiplicação celular quando associada ao meio complexo.

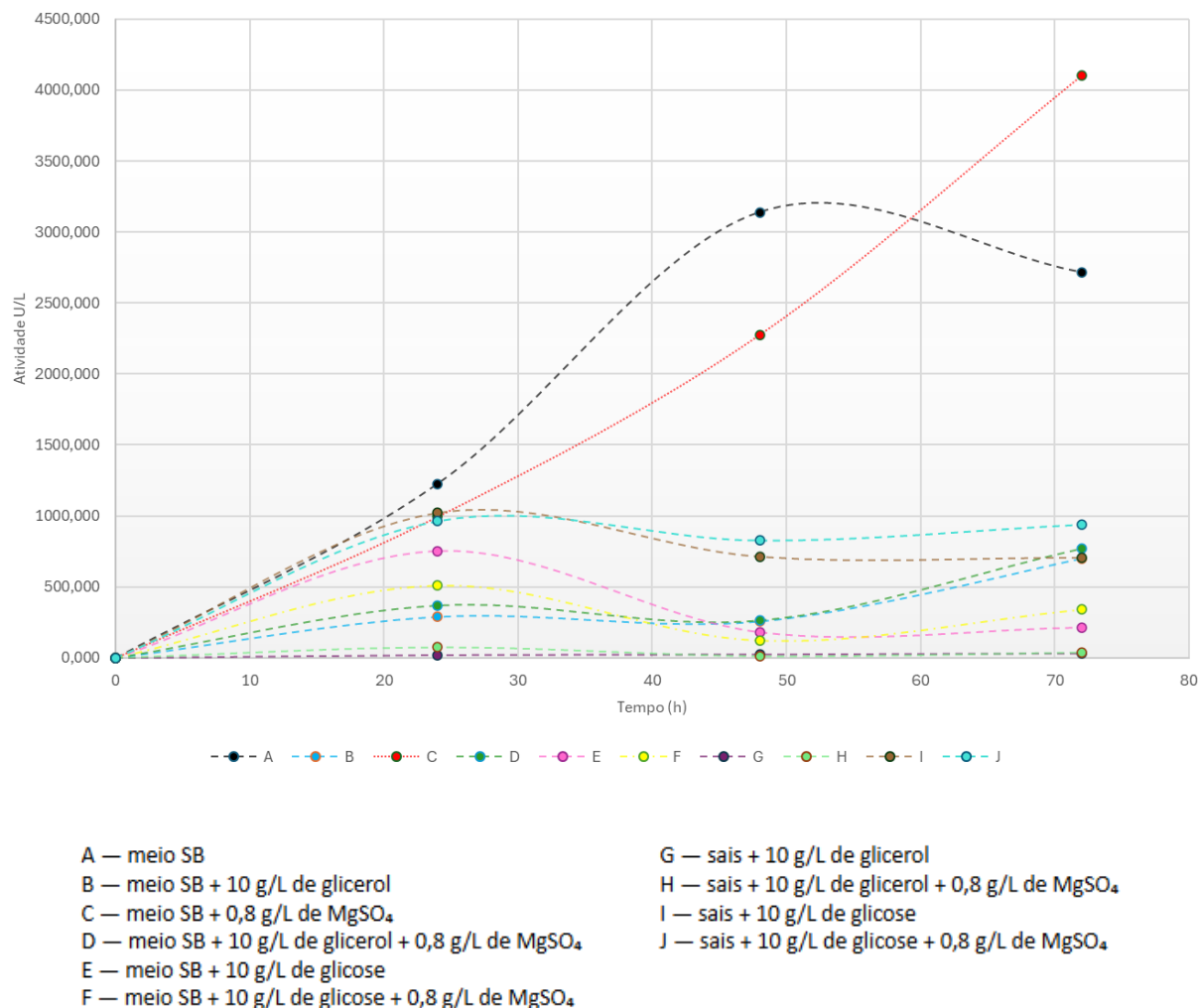
Os meios contendo glicose em SB (E e F) apresentaram crescimento intermediário, com densidade óptica próxima de 3,0 ao final do cultivo. Em contrapartida, os meios formulados apenas com sais minerais (G, H, I e J) apresentaram crescimento bastante reduzido,

independentemente da suplementação com glicose, glicerol ou MgSO_4 . Esses resultados evidenciam que a composição nutricional do meio SB exerceu influência mais significativa sobre o crescimento celular do que a adição isolada de fontes de carbono ou sulfato de magnésio.

5.3.6 Avaliação da atividade de endoglucanase nos diferentes meios de cultivo

As Figuras 25 e 26 apresentam os resultados referentes à atividade de endoglucanase produzida nos diferentes meios de cultivo. A Figura 25 ilustra a evolução temporal da atividade enzimática ao longo das 72 horas de cultivo, enquanto a Figura 26 permite a comparação da produção de endoglucanase entre os meios avaliados nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A análise desses resultados possibilita identificar as condições nutricionais mais favoráveis para a expressão da enzima e avaliar a relação entre crescimento celular e atividade enzimática.

Figura 25- Produção de endoglucanase nos diferentes meios de cultivo



fonte : própria autora (2026)

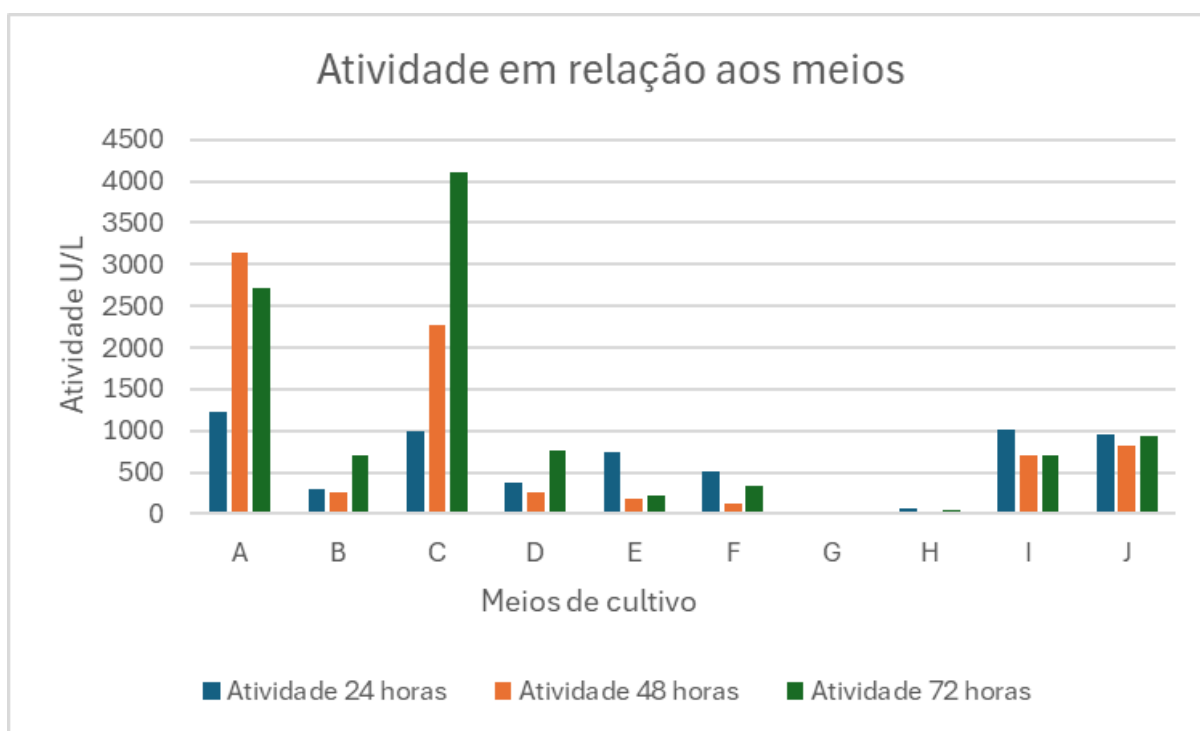
A atividade enzimática variou significativamente entre os meios de cultivo avaliados, evidenciando forte influência da composição do meio sobre a produção de endoglucanase. Os maiores valores foram observados nos meios C (SB + MgSO_4) e A (SB), que atingiram aproximadamente 4100 U/L e 2750 U/L após 72 horas de cultivo, respectivamente. O meio C apresentou aumento contínuo da atividade ao longo do tempo, indicando condições favoráveis para a expressão e produção da enzima.

Os meios D e J apresentaram atividades intermediárias, alcançando valores próximos a 800–1000 U/L ao final do cultivo. Em contraste, os meios contendo glicose (E e F) apresentaram redução da atividade enzimática após 24 horas, sugerindo possível repressão

metabólica ou menor direcionamento dos recursos celulares para a produção da enzima. Os meios formulados apenas com sais minerais (G, H e I) apresentaram as menores atividades ao longo do experimento.

De maneira geral, os resultados indicam que a presença do meio complexo SB favoreceu a produção de endoglucanase e que a suplementação com MgSO_4 , especialmente no meio C, contribuiu para o aumento da atividade enzimática.

Figura 26- Comparação da atividade de endoglucanase entre os meios de cultivo em 24, 48 e 72 horas



A — meio SB

B — meio SB + 10 g/L de glicerol

C — meio SB + 0,8 g/L de MgSO_4

D — meio SB + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO_4

E — meio SB + 10 g/L de glicose

F — meio SB + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO_4

G — sais + 10 g/L de glicerol

H — sais + 10 g/L de glicerol + 0,8 g/L de MgSO_4

I — sais + 10 g/L de glicose

J — sais + 10 g/L de glicose + 0,8 g/L de MgSO_4

fonte : própria autora (2026)

A atividade enzimática apresentou grande variação entre os meios avaliados, demonstrando que a composição do meio exerceu forte influência sobre a produção de endoglucanase. O maior valor foi observado no meio C (SB + 0,8 g/L de MgSO_4), que atingiu aproximadamente 4100 U/L após 72 horas de cultivo, representando o melhor desempenho

entre todas as condições testadas. O meio A (SB) também apresentou elevada atividade, alcançando cerca de 2700 U/L ao final do experimento.

Os meios D, I e J apresentaram atividades intermediárias, enquanto os meios G e H exibiram os menores valores durante todo o período experimental. Além disso, observou-se que alguns meios contendo glicose (E e F) apresentaram redução da atividade enzimática ao longo do cultivo, sugerindo que essa fonte de carbono pode não ter favorecido a expressão da enzima nas condições avaliadas.

De modo geral, os resultados indicam que o meio SB favoreceu a produção de endoglucanase e que a suplementação com MgSO_4 promoveu aumento expressivo da atividade enzimática, especialmente quando utilizado sem a adição de outras fontes de carbono.

5.3.7 Análise criteriosa de por que os meios com baixas Densidades ópticas tiveram atividade considerável no estudo

Os meios formulados apenas com sais minerais (G, H, I e J) apresentaram baixas densidades ópticas ao longo do cultivo, indicando crescimento celular limitado quando comparados aos meios contendo SB. Esse comportamento pode ser atribuído à menor disponibilidade de nutrientes complexos, como aminoácidos, peptídeos e vitaminas, necessários para sustentar elevadas taxas de crescimento bacteriano (Madigan *et al.*, 2016).

Entretanto, apesar da reduzida formação de biomassa, alguns desses meios apresentaram atividade enzimática considerável, especialmente os meios I e J. Esse resultado sugere que a produção de endoglucanase não esteve diretamente relacionada ao crescimento celular, mas ao estado fisiológico das células durante o cultivo.

De acordo com Fatokun *et al.* (2016), a produção de enzimas microbianas nem sempre ocorre em paralelo ao crescimento celular máximo, podendo ser intensificada em condições de limitação nutricional. Nessas condições, as células reduzem a taxa de divisão celular e passam a ativar mecanismos de adaptação ao estresse, redirecionando parte de seus recursos metabólicos para processos associados à sobrevivência.

Segundo Ejaz, Sohail e Ghanemi (2021), a síntese de enzimas extracelulares pode representar uma estratégia adaptativa utilizada pelos microrganismos para aumentar a disponibilidade de nutrientes no ambiente. Dessa forma, em vez de direcionar energia

predominantemente para a produção de nova biomassa, as células podem investir na síntese de proteínas capazes de ampliar sua capacidade de obtenção de recursos.

Esse comportamento pode explicar a atividade enzimática observada nos meios contendo apenas sais minerais. Embora o crescimento celular tenha sido reduzido, as células remanescentes podem ter permanecido metabolicamente ativas e direcionado parte de seu metabolismo para a expressão da endoglucanase. Assim, a limitação nutricional possivelmente promoveu uma mudança fisiológica caracterizada pela redução do crescimento e pelo aumento relativo do investimento metabólico em mecanismos de sobrevivência, incluindo a produção da enzima heteróloga.

Os resultados obtidos reforçam, portanto, que a atividade enzimática não depende exclusivamente da quantidade de células presentes no cultivo, mas também do estado metabólico e fisiológico dessas células. Esse comportamento é consistente com a observação de que o meio C (SB + 0,8 g/L de MgSO_4) apresentou a maior atividade enzimática do estudo, mesmo sem apresentar a maior densidade óptica, evidenciando que a produção de endoglucanase não esteve diretamente correlacionada ao acúmulo de biomassa.

6. Conclusão

Os resultados demonstraram que a composição do meio de cultivo influencia diretamente o crescimento celular e a produção de endoglucanase recombinante por *E. coli*. O meio SB apresentou o melhor desempenho geral, promovendo elevada densidade celular e alta atividade enzimática, evidenciando a importância de nutrientes orgânicos complexos para sustentar a atividade metabólica e a síntese proteica.

A suplementação do meio SB com MgSO_4 favoreceu a produção enzimática, resultando na maior atividade observada após 72 horas. Entretanto, em meios contendo apenas sais minerais, o magnésio não foi suficiente para compensar a ausência de fontes complexas de carbono e nitrogênio, indicando que seu efeito positivo depende de uma formulação nutricional adequada.

A adição de glicerol e glicose não promoveu ganhos consistentes na produção de endoglucanase. Embora o glicerol tenha aumentado a densidade óptica em algumas condições, esse crescimento não se refletiu em maior atividade enzimática, corroborando a observação de Ruller et al. (2006) de que *E. coli* DH5 α apresenta limitações para expressão proteica quando comparada a linhagens voltadas à produção heteróloga. Já a glicose exerceu efeito inibitório sobre a atividade enzimática, possivelmente devido à repressão catabólica e ao acúmulo de metabólitos como o acetato.

Nos meios sintéticos, o crescimento celular foi limitado, mas observou-se atividade enzimática relativamente expressiva em relação à biomassa produzida, sugerindo a ativação de mecanismos de adaptação ao estresse nutricional. Esses resultados indicam que a produção de endoglucanase não está diretamente associada ao crescimento celular, sendo fortemente modulada pelas condições de cultivo. Assim, o meio SB suplementado com MgSO_4 mostrou-se a condição mais favorável para a produção da enzima, reforçando a importância da otimização do meio para aplicações biotecnológicas e industriais.

REFERÊNCIAS

- AULER, N. M. F.; LIMA, D. P.; FIGUEIREDO, R. C. *Técnicas de conservação de microrganismos*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 35, n. 1, p. 15-20, 2014.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTSMA, P. Properties and applications of cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, n. 3, p. 234–240, 1993.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- CARREÓN-RODRÍGUEZ, O. E. *et al.* Glucose transport in *Escherichia coli*: from fundamentals to transport engineering. *Microorganisms*, v. 11, n. 6, p. 1588, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061588>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- CHAVEZ, J. D. Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- CHEN, R. *et al.* Acetate metabolism and the inhibition of *Escherichia coli* growth by acetate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 2, p. 114–121, 1997.
- CHIANG, C. J.; HO, Y. J.; HU, M. C.; CHAO, Y. P. Rewiring of glycerol metabolism in *Escherichia coli* for effective production of recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, v. 13, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01848-z>. Acesso em: 10 ago. 2025.
- CHRISTENSEN, D. G.; ORR, J. S.; RAO, C. V.; WOLFE, A. J. Increasing growth yield and decreasing acetylation in *Escherichia coli* by optimizing the carbon-to-magnesium ratio in peptide-based media. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03034-16>. Acesso em: 10 ago. 2025.
- DAVIES, G. J.; SCHÜLEIN, M. *The structure and function of cellulases*. *Journal of Biotechnology*, v. 57, n. 1–3, p. 1–17, 1997.
- DREAMSTIME. *Escherichia coli bacteria illustration*. Disponível em: <https://www.dreamstime.com>. Acesso em: 12 ago. 2025

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, v. 6, n. 4, p. 44, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.3390/biomimetics6040044>. Acesso em: 10 ago. 2025.

FERREIRA, R. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *Escherichia coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, p. 81, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1089-0>. Acesso em: 10 ago. 2025.

FENG, P. et al. Enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Manual analítico bacteriológico*. 8. ed. rev. A. Washington, DC: FDA, 2002. Cap. 4.

FATOKUN, A. A. et al. Classical optimization of cellulase and xylanase production by a marine *Streptomyces* species. **Applied Sciences**, Basel, v. 6, n. 10, p. 286, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.3390/app6100286>. Acesso em: 10 ago. 2025.

GAVANDE, P. V.; GOYAL, A. Exoglucanase (exocellobiohydrolase) and its role in cellulose degradation. In: *Microbial Resource Technologies for Sustainable Development*. [S. l.]: Elsevier, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/exoglucanase>. Acesso em: 25 jul. 2025.

GANJAVE, P. et al. *Fed-batch cultivation strategies for enhanced recombinant protein production in microbial systems*. **Biotechnology Advances**, v. 52, p. 107815, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107815>. Acesso em: 26 jul. 2025

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>. Acesso em: 26 fev. 2026.

GOMES, M. M. O. dos S. et al. Aplicações biotecnológicas da enzima endoglucanase microbiana. In: *A pesquisa em ciências biológicas: desafios atuais e perspectivas futuras*. [S.l.]Atena Editora, 2021. p. 1–12.

GRAND VIEW RESEARCH. *Enzymes market size, share & trends analysis report*. 2024. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.

Acesso em: 10 abr. 2026.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. *Tratado de fisiologia médica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

ISLAM, F.; ROY, N. Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and *in vitro* efficacy as anti-biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87901-9>. Acesso em: 10 ago. 2025.

KABIR, M. F.; JU, L.-K. *On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics*. **Process Biochemistry**, v. 130, p. 734-746, 2023. DOI: 10.1016/j.procbio.2023.05.031. Acesso em: 30 jul. 2025.

KIM, D.; KU, S. Bacillus cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 503, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020503>. Acesso em: 10 ago. 2025

Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.

KOPP, J. et al. *Controlled feeding in shake flask fed-batch cultures: improving microbial growth and product yield*. **Journal of Biotechnology**, v. 305, p. 45-56, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.012>. Acesso em: 25 jul. 2025.

KRAM, K. E.; FINKEL, S. E. Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>. Acesso em: 25 jul. 2025.

KRAUSE, M. et al. *Comparison of batch, fed-batch and continuous cultivation for recombinant protein production*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2037-2048, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7322-4>. Acesso em: 25 jul. 2025.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 98–105, 1996.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

LI, Lihong et al. Engenharia metabólica combinada com engenharia enzimática para superprodução de ectoína em *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, v. 390, p. 129862, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129862>. Acesso em: 24 jul. 2025.

LIU, L. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of chemicals derived from glycerol. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 5, p. 797–805, 2013.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. van; PRETORIUS, I. S. *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>. Acesso em: 14 mar. 2026.

LORAN, M. A. et al. *Bioquímica*. 5. ed. São Paulo: Pearson, 2013.

MADIGAN, M. T. et al. *Brock Biology of Microorganisms*. 14. ed. Boston: Pearson, 2015.

MARANGONI, Alejandro G. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. John Wiley & Sons, 2003.

MARSCHALL, L.; SAGMEISTER, P.; HERWIG, C. *Tunable recombinant protein expression in Escherichia coli: promoter systems and genetic constraints*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 501–512, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8045-z>. Acesso em: 30 jul. 2025

MENDONÇA, E. H. M. et al. Recombinant xylanase production by *Escherichia coli* using a non-induced expression system with different nutrient sources. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 37, p. 29–39, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43153-019-00004-x>. Acesso em: 25 jul. 2025.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 27 ago. 2025.

MIRET, J.; ROMÁN, R. W.; BENITO, M.; CASABLANCAS, A.; GUILLÉN, M.; ÁLVARO, G.; GONZÁLEZ, G. Development of a highly efficient production process for

recombinant protein expression in *Escherichia coli* NEB10 β . *Biochemical Engineering Journal*, v. 159, p. 107612, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107612>. Acesso em: 25 jul. 2025.

MITAL, S.; CHRISTIE, G.; DIKICIOGLU, D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories*, v. 20, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01698-w>. Acesso em: 13 fev. 2026.

MORI, Matteo; MARINARI, Enzo; DE MARTINO, Andrea. A yield-cost tradeoff governs *Escherichia coli*'s decision between fermentation and respiration in carbon-limited growth. arXiv preprint arXiv:1703.00748, 2017. DOI: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1703.00748>. Acesso em: 13 fev. 2026.

NASCIMENTO, L. S. **Desenvolvimento e caracterização de aerogéis de celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.

NEIDHARDT, F. C.; BLOCH, P. L.; SMITH, D. F. Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 119, n. 3, p. 736–747, 1974.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEPAL, S.; KUMAR, P. Growth, cell division, and gene expression of *Escherichia coli* at elevated concentrations of magnesium sulfate: Implications for habitability of Europa and Mars. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050637>. Acesso em: 25 jul. 2025.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, Dordrecht, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

PHUE, J. N. *et al.* Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78,

n. 4, p. 825–832, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1364-2>. Acesso em: 30 jul. 2025.

PONTRELLI, S. *et al.* *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, v. 50, p. 16–46, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>. Acesso em: 26 jul. 2025.

RAVINDRAN, P.; JACOBSON, K. B. *Structural insights into endoglucanases: architecture, stability, and catalytic mechanisms*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 15, p. 2783–2798, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.012>. Acesso em: 26 mar. 2026.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 172, 2014.

RUIZ, S. P.; MIYOSHI, J. H.; GIMENEZ, G. G.; MARTINEZ, C. O.; ABREU FILHO, B. de; MATIOLI, G. Biosynthesis of industrial enzymes by free and immobilized *Alicyclobacillus* spp. in different matrices and the use of ultrafiltration in the enzymes concentration. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1058–1064, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170109>. Acesso em: 26 mar. 2026.

RULLER, R. *et al.* Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5 α under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 43, p. 9–15, 2006.

SANQUETTA, C. R. *et al.* Mercado de celulose no Brasil e em cinco grandes países. *BIOFIX Scientific Journal*, v. 5, n. 2, p. 189, 2 jul. 2020.

SANTANA, Marília de Oliveira. Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa*. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

SANTOS, C. A. *et al.* A metagenomic ‘dark matter’ enzyme catalyses oxidative cellulose conversion. **Nature**, v. 620, p. 123–130, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08553-z>. Acesso em: 25 fev. 2026.

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

SADAVA, David et al. *Vida: a ciência da biologia*. v. 1. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

SCHAEPE, S. et al. Evitar a superalimentação em culturas de alta densidade celular de *E. coli* durante a produção de proteínas heterólogas. *Revista de Biotecnologia*, v. 192, p. 146–153, dez. 2014.

SEGEL, Irwin H. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: Wiley, 1993.

SHARMA, P. et al. *Cellulose structure and enzymatic hydrolysis: insights into fibril organization and accessibility*. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107502, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>. Acesso em: 8 ago. 2025.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density: a historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 5, p. 345–357, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>. Acesso em: 2 mar. 2026.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 345–357, 2005.

SILVA, A. B. et al. Importância dos elementos traço no cultivo de microrganismos para produção biotecnológica. *Revista Brasileira de Biotecnologia*, v. 15, n. 3, p. 123–130, 2020.

SILVA, R. O. et al. Influência de fontes de carbono na expressão heteróloga em *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v. 36, p. 45–52, 2019.

SILVA, T. P. et al. Obtenção de celulasas microbianas: uma breve revisão. In: *Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 3*. [S.l.]: Atena Editora, 2020. p. 100–110.

SINGH, N.; GOEL, G.; SINGH, N.; PATHAK, B. K.; KAUSHIK, D. Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. **Food Bioscience**, v. 11, p. 17-22, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.001>. Acesso em: 13 ago. 2025

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>. Acesso em: 13 ago. 2025.

SOUZA, D. T. de; ANDREANI, L.; VALADARES, L. F. Celulose: pontos de vista. (2015)

SOTO, R.; CASPETA, L.; BARRÓN, B.; GOSSET, G.; RAMÍREZ, O. T.; LARA, A. R. High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 165–171, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.06.003>. Acesso em: 13 ago. 2025.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305–311, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80231-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80231-0). Acesso em: 30 jul. 2025.

TEUGJES, M.; VAN DER WERF, M. J. Biocatalytic production of glycolic acid from ethylene glycol by a genetically engineered strain of *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 379–385, 2000.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Curva de calibração da glicose em tubo de ensaio. POP–MA006 Rev.00. Elaborado por Juliana Alves Piccoli em 22 abr. 2014. Aprovado por André Lellis em 10 jun. 2014. 4 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Determinação da atividade de endoglucanase em tubos tipo Eppendorf com leitura em espectrofotômetro. POP–MA009 Rev.00. Elaborado por Noéli Z. C. de Souza em 07 abr. 2014. Aprovado por André T. Lellis em 10 jun. 2014. 6 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Meios de cultivos avaliados (*E. coli*). POP–PS002 Rev.001. Elaborado por Mariana Taíse Zerbini em 05 ago. 2014. Aprovado por André Lellis em 05 ago. 2014. 1 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Preparo de pré-inóculo de *E. coli*. POP–PS001 Rev.00. Elaborado por Luana de Andrade em 02 nov. 2013. Aprovado por Cecília Caruso em 27 fev. 2014. 1 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Preparo de solução ADNS. POP–PS008 Rev.00. Elaborado por Elenira H. M. Mendonça em 14 nov. 2013. Aprovado por André T. Lellis em 25 mar. 2014. 1 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Preparo e transformação de células quimiocompetentes. Procedimento Operacional Padrão – POP–BM003 Rev. 001. Elaboração: Kelly Pereira da Silva; Mariana Taíse Zerbini. Aprovação: Cecília Caruso. 19 ago. 2013. 8 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Produção de endoglucanase nativa em shaker. POP–BP002 Rev.00. Elaborado por Luana de Andrade em 28 jan. 2014. Aprovado por Cecília Caruso em 27 fev. 2014. 2 p.

VERDARTIS Desenvolvimento Biotecnológico. Solução de CMC 4% (carboximetil celulose sódica). POP–PS007 Rev.00. Elaborado por Elenira Mendonça em 16 maio 2014. Aprovado por André T. Lellis em 16 maio 2014. 1 p.

WOLFE, A. J. The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005. DOI: 10.1128/MMBR.69.1.12-50.2005. Acesso em: 23 ago. 2025.

YANG, F. et al. Optimization of nitrogen sources for cellulase production by *Bacillus subtilis*. In: studies on microbial cellulase production and regulation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2021.

ZERBINI, Mariana Taíse; LELLIS, André. POP_PS002 – Meios de cultivo para *E. coli*. Procedimento Operacional Padrão, Revisão 001, 05 ago. 2014. 1 p.

ZHANG, X. et al. Salt stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 11, p. 3138–3145, 2003.

ZWAIG, N.; BURTON, R. M.; GINSBURG, A. S. *Biochemistry of bacterial metabolism*. 2. ed. New York: Academic Press, , 2010.

ANEXOS

Anexo A – Equações

Anexo A1- Concentração de Enzimas

$$Ce = \frac{\left(\frac{ABS}{\alpha}\right) Vr}{tr} \cdot 1000$$

Sendo:

Ce: concentração de enzima dada por U/L

ABS: valor de absorbância lida no comprimento de onda de 540 nm (uABS).

α : coeficiente angular da curva da calibração da endoglucanase (uABS.($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)⁻¹).

tr: tempo de reação em minutos (no caso do presente protocolo 5 min)

Vr: o volume de reação em mL (no caso do presente protocolo, 0,1mL = 0,09 mL de xilano + 0,01 mL de amostra)

Ve: o volume de enzima adicionada para ser medida (no caso do presente protocolo 0,01mL de amostra)

Anexo A2- Coeficiente angular da reta

$$\alpha = \frac{\Sigma ABS}{\Sigma \left(\frac{C}{MMx} \cdot 1000\right)}$$

Sendo:

α : o coeficiente angular da reta ($\mu\text{ABS} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}$)

ABS: o valor da absorbância lida no espectrofotômetro (μABS)

C : concentração de glicose ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

MMx: valor da massa molar da glicose (180,15g/mol)

Os dados obtidos através desse processo foram fundamentais para a determinação da curva de calibração da glicose através da metodologia MILLER (1959). A partir do coeficiente da reta da equação determinou-se a atividade enzimática da equação do Anexo A1.

APÊNDICES

Apêndice B- Determina da curva de calibração da Glicose em 100° C

Através do Apêndice B1 , apresentado a seguir, foi possível determinar a curva de calibração da glicose, realizando o teste em triplicata para maior segurança dos dados, para posteriormente encontrar o α que é coeficiente angular da curva, Anexo A2, e aplicar na equação de concentração enzimática (Ce), Anexo A1.

Anexo B1- Absorbância da Glicose em triplicata em diferentes diluições

amostras	abs 540 nm	média	desvio padrão
1.0	0,022	0,023	0,001
1.1	0,024		
1.2	0,022		
2.0	0,078	0,076	0,002
2.1	0,075		
2.2	0,074		
3.0	0,158	0,155	0,005
3.1	0,158		
3.2	0,149		
4.0	0,195	0,190	0,004
4.1	0,187		
4.2	0,188		
5.0	0,253	0,258	0,005
5.1	0,259		
5.2	0,262		
6.0	0,306	0,300	0,006
6.1	0,298		
6.2	0,295		
7.0	0,35	0,357	0,006
7.1	0,361		
7.2	0,36		
8.0	0,437	0,432	0,007
8.1	0,424		
8.2	0,435		
9.0	0,466	0,468	0,012
9.1	0,458		
9.2	0,481		
10.0	0,536	0,536	0,002
10.1	0,537		
10.2	0,534		

fonte: própria autora, (2025)

O Apêndice B1 apresenta os valores de absorbância da glicose medidos em triplicata a 540 nm, incluindo médias e desvios padrão para diferentes amostras. Esses dados evidenciam a repetibilidade e precisão das medidas em diferentes concentrações.

O Apêndice B2 apresenta os valores de concentração de glicose utilizados na construção da curva de calibração, expressos em mg/mL e convertidos para concentração molar (mM), juntamente com suas respectivas leituras de absorbância a 540 nm. Esses dados serviram como base para a determinação da relação entre concentração e absorbância, permitindo a obtenção da equação de regressão linear utilizada nos cálculos posteriores de concentração enzimática.

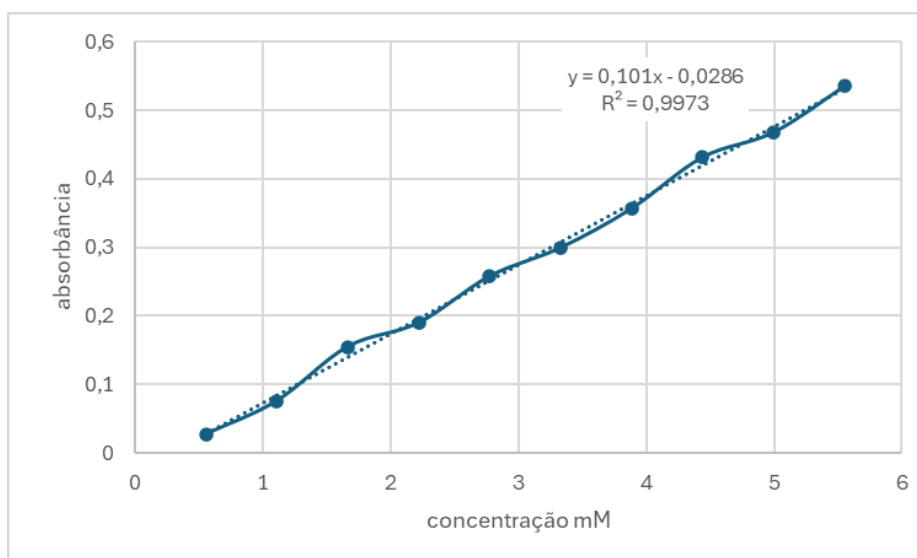
Apêndice B2- Diluição da concentração molar da glicose vs Absorbância 540 nm

eppendorfs	concentração de glicose (mg/mL)	eixo x concentração (mM)	eixo y absorbância
1	0,1	0,555	0,023
2	0,2	1,11	0,076
3	0,3	1,665	0,155
4	0,4	2,22	0,19
5	0,5	2,775	0,258
6	0,6	3,33	0,3
7	0,7	3,886	0,357
8	0,8	4,441	0,432
9	0,9	4,996	0,468
10	1	5,551	0,536

fonte: própria autora, (2025)

O Apêndice B3 apresenta a curva de calibração construída a partir dos dados experimentais do Apêndice B2.

Apêndice B3 - Concentração da glicose mM versus Absorbância 540 nm



fonte : própria autora, (2025)

Apêndice C – Tabelas de DO e atividade enzimática

Observações gerais:

Todas as atividades enzimáticas descritas nas tabelas foram realizadas a temperatura constante de 60 °C, salvo indicação de maior estabilidade enzimática;

Apêndice C1- Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 24 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,435	4,350	4,800	0,423
	0,519	5,190		
	0,486	4,860		
meio SB + 10g/L de glicerol	0,466	4,660	4,753	0,114
	0,472	4,720		
	0,488	4,880		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,520	5,200	5,260	0,053
	0,528	5,280		
	0,530	5,300		
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L MgSO₄	0,473	4,730	4,887	0,160
	0,505	5,050		
	0,488	4,880		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C2- Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 48 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,466	4,660	4,823	0,144
	0,488	4,880		
	0,493	4,930		
meio SB + 10g/L de glicerol	0,577	5,770	5,707	0,174
	0,584	5,840		
	0,551	5,510		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,547	5,470	5,423	0,108
	0,530	5,300		
	0,550	5,500		
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L MgSO₄	0,528	5,280	5,407	0,112
	0,549	5,490		
	0,545	5,450		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C3- Densidade óptica com glicerol e sulfato de magnésio em meio SB, 72 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,435	4,350	4,623	0,337
	0,500	5,000		
	0,452	4,520		
meio SB + 10g/L de glicerol	0,539	5,390	5,480	0,115
	0,544	5,440		
	0,561	5,610		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,462	4,620	4,643	0,059
	0,460	4,600		
	0,471	4,710		
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L MgSO₄	0,512	5,120	5,277	0,199
	0,550	5,500		
	0,521	5,210		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C4- Atividade endoglucanase, 24 h, sem diluição

	abs 540 nm	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,583	0,606	0,020	1199,340
	0,614			
	0,620			
meio SB + 10g/L glicerol	0,216	0,146	0,060	289,769
	0,110			
	0,113			
meio SB + 0,8g/L Mg SO₄	0,505	0,435	0,072	861,386
	0,438			
	0,362			
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L Mg SO₄	0,219	0,186	0,031	368,977
	0,157			
	0,183			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C5- Atividade endoglucanase, 48 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,354	1,770	2,003	0,281	3967,000
	0,385	1,925			
	0,463	2,315			
meio SB + 10g/L glicerol	0,035	0,175	0,130	0,069	257,430
	0,033	0,165			
	0,010	0,050			
meio SB + 0,8g/L Mg SO4	0,284	1,420	1,258	0,140	2491,750
	0,237	1,185			
	0,234	1,170			
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L Mg SO4	0,021	0,105	0,133	0,041	264,030
	0,036	0,180			
	0,023	0,115			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C6- Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,420	2,100	2,142	0,569	4240,920
	0,319	1,595			
	0,546	2,730			
meio SB + 10g/L glicerol	0,088	0,440	0,353	0,117	699,670
	0,080	0,400			
	0,044	0,220			
meio SB + 0,8g/L Mg SO4	0,171	0,855	2,077	1,165	4112,210
	0,440	2,200			
	0,635	3,175			
meio SB + 10g/L glicerol + 0,8g/L Mg SO4	0,090	0,450	0,388	0,053	768,980
	0,071	0,355			
	0,072	0,360			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C7- Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 24 h, sem diluição

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,416	4,160	4,410	0,236
	0,444	4,440		
	0,463	4,630		
meio SB + 10g/L de glicose	0,247	2,470	2,610	0,121
	0,268	2,680		
	0,268	2,680		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,521	5,210	5,090	0,108
	0,506	5,060		
	0,500	5,000		
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L MgSO₄	0,262	2,620	2,630	0,036
	0,260	2,600		
	0,267	2,670		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C8- Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 48 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,388	3,880	4,187	0,266
	0,436	4,360		
	0,432	4,320		
meio SB + 10g/L de glicose	0,249	2,490	2,673	0,159
	0,277	2,770		
	0,276	2,760		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,478	4,780	4,640	0,131
	0,462	4,620		
	0,452	4,520		
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L MgSO₄	0,281	2,810	2,723	0,110
	0,276	2,760		
	0,260	2,600		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C9- Densidade óptica com glicose e sulfato de magnésio em meio SB, 72 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,364	3,640	3,947	0,270
	0,415	4,150		
	0,405	4,050		
meio SB + 10g/L de glicose	0,284	2,840	2,867	0,031
	0,290	2,900		
	0,286	2,860		
meio SB + 0,8g/L MgSO₄	0,406	4,060	3,983	0,068
	0,393	3,930		
	0,396	3,960		
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L MgSO₄	0,305	3,050	2,947	0,162
	0,303	3,030		
	0,276	2,760		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C10- Atividade endoglucanase, 24 h, sem diluição

	abs 540 nm	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,566	0,647	0,081	1280,530
	0,647			
	0,727			
meio SB + 10g/L glicose	0,281	0,379	0,149	751,160
	0,306			
	0,551			
meio SB + 0,8g/L Mg SO₄	0,551	0,570	0,045	1128,050
	0,621			
	0,537			
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L Mg SO₄	0,266	0,257	0,010	508,250
	0,258			
	0,246			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C11- Atividade endoglucanase, 48 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,254	1,270	1,847	0,500	3656,770
	0,425	2,125			
	0,429	2,145			
meio SB + 10g/L glicose	0,027	0,135	0,092	0,048	181,520
	0,008	0,040			
	0,020	0,100			
meio SB + 0,8g/L Mg SO4	0,171	0,855	1,040	0,566	2059,410
	0,118	0,590			
	0,335	1,675			
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L Mg SO4	0,015	0,075	0,062	0,015	122,110
	0,013	0,065			
	0,009	0,045			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C12- Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,263	1,315	1,573	0,292	3115,510
	0,378	1,890			
	0,303	1,515			
meio SB + 10g/L glicose	0,027	0,135	0,108	0,028	214,520
	0,016	0,080			
	0,022	0,110			
meio SB + 0,8g/L Mg SO4	0,522	2,610	2,067	1,074	4092,410
	0,166	0,830			
	0,552	2,760			
meio SB + 10g/L glicose + 0,8g/L Mg SO4	0,054	0,270	0,172	0,087	339,930
	0,021	0,105			
	0,028	0,140			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C13- Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 24 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,595	5,950	5,850	0,118
	0,572	5,720		
	0,588	5,880		
Sais + 10g/L de glicerol	0,011	-	0,058	0,041
	0,076	-		
	0,088	-		
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO₄	0,084	-	0,080	0,008
	0,085	-		
	0,071	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C14- Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 48 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,519	5,190	5,363	0,212
	0,530	5,300		
	0,560	5,600		
Sais + 10g/L de glicerol	0,006	-	0,360	0,307
	0,560	-		
	0,514	-		
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO₄	0,204	-	0,297	0,213
	0,146	-		
	0,540	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C15- Densidade óptica meio SB + sais + glicerol e sulfato de magnésio, 72 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,502	5,020	5,223	0,196
	0,541	5,410		
	0,524	5,240		
Sais + 10g/L de glicerol	0,012	-	0,325	0,271
	0,494	-		
	0,469	-		
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO₄	0,259	-	0,341	0,186
	0,210	-		
	0,553	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C16- Atividade endoglucanase, 24 h, sem diluição

	abs 540 nm	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,581	0,613	0,030	1214,521
	0,641			
	0,618			
Sais + 10g/L de glicerol	0,006	0,010	0,007	19,142
	0,005			
	0,018			
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO4	0,036	0,038	0,030	75,908
	0,069			
	0,010			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C17- Atividade endoglucanase, 48 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,129	0,645	1,245	0,586	2465,347
	0,255	1,275			
	0,363	1,815			
Sais + 10g/L de glicerol	0,000	0,000	0,012	0,012	23,102
	0,001	0,005			
	0,006	0,030			
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO4	0,003	0,015	0,007	0,007	13,201
	0,001	0,005			
	0,000	0,000			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C18- Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,058	0,290	0,885	0,745	1752,475
	0,129	0,645			
	0,344	1,720			
Sais + 10g/L de glicerol	0,003	0,015	0,015	0,005	29,703
	0,004	0,020			
	0,002	0,010			
Sais + 10g/L de glicerol + 0,8 g/l de MgSO4	0,006	0,030	0,020	0,017	39,604
	0,006	0,030			
	0,000	0,000			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C19- Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 24 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,595	5,950	5,850	0,118
	0,572	5,720		
	0,588	5,880		
Sais + 10g/L de glicose	0,011	-	0,162	0,133
	0,259	-		
	0,216	-		
Sais + 10g/L de glicose+ 0,8 g/l de MgSO4	0,010	-	0,013	0,003
	0,016	-		
	0,013	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C20 - Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 48 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,519	5,190	5,363	0,212
	0,530	5,300		
	0,56	5,600		
Sais + 10g/L de glicose	0,008	-	0,237	0,199
	0,368	-		
	0,334	-		
Sais + 10g/L de glicose+ 0,8 g/l de MgSO4	0,017	-	0,014	0,003
	0,012	-		
	0,012	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C21- Densidade óptica meio SB + sais + glicose e sulfato de magnésio, 72 h, diluição 1:10

	abs 600 nm	diluição	média	desvio padrão
meio SB	0,502	5,020	5,223	0,196
	0,541	5,410		
	0,524	5,240		
Sais + 10g/L de glicose	0,013	-	0,254	0,210
	0,392	-		
	0,358	-		
Sais + 10g/L de glicose+ 0,8 g/l de MgSO4	0,015	-	0,019	0,006
	0,016	-		
	0,025	-		

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C22- Atividade endoglucanase, 24 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,581	0,613	0,030	1214,521
	0,641			
	0,618			
Sais + 10g/L de glicose	0,620	0,516	0,100	1021,122
	0,506			
	0,421			
Sais + 10g/L de glicose + 0,8 g/l de MgSO4	0,473	0,487	0,019	965,017
	0,509			
	0,480			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C23- Atividade endoglucanase, 48 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,129	0,645	1,245	0,586	2465,347
	0,255	1,275			
	0,363	1,815			
Sais + 10g/L de glicose	0,085	0,425	0,360	0,061	712,871
	0,070	0,350			
	0,061	0,305			
Sais + 10g/L de glicose + 0,8 g/l de MgSO4	0,092	0,460	0,418	0,060	828,383
	0,070	0,350			
	0,089	0,445			

fonte: própria autora, (2025)

Apêndice C24 - Atividade endoglucanase, 72 h, diluição 1:5

	abs 540 nm	diluição	média	desvio padrão	atividade
meio SB	0,058	0,290	0,883	0,745	1749,175
	0,128	0,640			
	0,344	1,720			
Sais + 10g/L de glicose	0,078	0,390	0,357	0,049	706,271
	0,076	0,380			
	0,060	0,300			
Sais + 10g/L de glicose + 0,8 g/l de MgSO4	0,075	0,375	0,475	0,089	940,594
	0,101	0,505			
	0,109	0,545			

fonte: própria autora, (2025)