



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VICTOR ÂNGELO CAVALCANTE MIRANDA

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE ENDOGLUCANASE DE *Moniliophthora*
***perniciosa* EM *E. coli*: OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO**

FORTALEZA

2026

VICTOR ÂNGELO CAVALCANTE MIRANDA

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE ENDOGLUCANASE DE *Moniliophthora*
perniciosa EM *E. coli*: OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel Guimarães
Benevides.

FORTALEZA

2026

VICTOR ÂNGELO CAVALCANTE MIRANDA

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE ENDOGLUCANASE DE *Moniliophthora*
perniciosa EM *E. coli*: OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovado em 30/06/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dra Raquel Guimarães Benevides (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr André Luis Coelho da Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. ^a Dra Marjory Lima Holanda Araújo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional ao longo desta jornada acadêmica. Obrigado por estarem ao meu lado em cada decisão tomada e por todo incentivo, compreensão e confiança; sem vocês este caminho teria sido muito mais difícil.

Um agradecimento especial aos meus primos, Mônica, Vitória e William, pelo acolhimento, pelos conselhos e por compartilharem suas experiências da vida universitária, tornando essa trajetória mais leve e enriquecedora. Em especial à Mônica, por sempre me ouvir nos momentos em que precisei desabafar e aliviar as tensões do dia a dia.

Agradeço também aos amigos que conquistei ao longo da graduação, com quem compartilhei desafios, conquistas, dificuldades acadêmicas e momentos de descontração. Em especial, à Maria Ester, Ester, Júlia e Levi, pelas conversas, pelo apoio mútuo e pela amizade construída durante esses anos.

Sou profundamente grato a todos os mestrandos e doutorandos do Laboratório de Proteínas Vegetais (Labtox), não apenas pelo conhecimento compartilhado e pelos ensinamentos transmitidos, mas também pela amizade e pelas conversas que tornaram os intervalos entre os experimentos mais agradáveis.

Agradeço à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio concedido por meio da bolsa de iniciação científica, fundamental para minha formação acadêmica e para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço também ao professor André Luis e a toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBmol) pelo apoio prestado durante a realização deste trabalho, pela disponibilidade em compartilhar a infraestrutura do laboratório e pelo auxílio na disponibilização de reagentes e equipamentos fundamentais para a execução dos experimentos.

Por fim, expresso minha sincera gratidão à professora Raquel Guimarães, por sua excelente orientação, paciência e dedicação. Sua condução cuidadosa durante a fase experimental, aliada aos seus ensinamentos e conselhos, foi fundamental para o desenvolvimento e a realização desta pesquisa.

RESUMO

O aumento da produção agroindustrial tem intensificado a geração de resíduos lignocelulósicos, tornando necessária a busca por alternativas sustentáveis para seu aproveitamento. Esses materiais são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, estruturas recalcitrantes que demandam tratamentos eficientes para sua degradação. Nesse contexto, as celulasas destacam-se por sua capacidade de hidrolisar a celulose, gerando açúcares fermentescíveis com potencial aplicação biotecnológica. Entre essas enzimas, as endoglucanases atuam na clivagem de ligações β -1,4-glicosídicas internas da celulose amorfa. Fungos fitopatógenos, como *Moniliophthora perniciosa*, constituem fontes promissoras dessas enzimas, incluindo a endoglucanase EG45, alvo deste estudo. O trabalho teve como objetivo avaliar a expressão heteróloga da EG45 a partir de pET-32a em *Escherichia coli*, visando identificar condições favoráveis para sua produção recombinante. Para isso, foram avaliadas diferentes cepas hospedeiras (BL21 Star, C41 e C43), concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) e temperaturas de cultivo (16, 20, 25 e 30 °C). A expressão da proteína foi analisada por SDS-PAGE, permitindo a seleção das condições mais promissoras para posterior avaliação da solubilidade por lise celular via sonicação e análise das frações solúvel e insolúvel. Os resultados demonstraram expressão da EG45 na maioria das condições testadas, com maiores níveis observados nas cepas BL21 Star e C41. Além disso, foi identificado um padrão de saturação da expressão a partir de 0,5 mM de IPTG, não sendo observados ganhos expressivos com concentrações superiores do indutor. Em relação à temperatura, as maiores intensidades de expressão foram verificadas a 25 °C e 30 °C. A análise de solubilidade revelou predominância da proteína na fração insolúvel, indicando a formação de corpos de inclusão. Embora as cepas BL21 Star e C43 tenham apresentado menor acúmulo de proteína insolúvel, sugerindo a possibilidade de uma fração solúvel não detectada, a cepa C41 foi selecionada para a continuidade do bioprocesso por combinar elevado rendimento de expressão e maior estabilidade metabólica associada ao sistema T7. Dessa forma, a concentração de 0,5 mM de IPTG, a temperatura de 25 °C e a cepa C41 foram definidas como as condições mais promissoras para futuras etapas de otimização e escalonamento da produção recombinante da endoglucanase EG45.

Palavras-chave: celulase; produção recombinante; BL21 Star(DE3); C41(DE3).

ABSTRACT

The increase in agro-industrial production has intensified the generation of lignocellulosic residues, making it necessary to seek sustainable alternatives for their utilization. These materials are mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, recalcitrant structures that require efficient treatments for their degradation. In this context, cellulases stand out due to their ability to hydrolyze cellulose, generating fermentable sugars with potential biotechnological applications. Among these enzymes, endoglucanases act by cleaving internal β -1,4-glycosidic bonds in amorphous cellulose. Phytopathogenic fungi, such as *Moniliophthora perniciosa*, represent promising sources of these enzymes, including the endoglucanase EG45, which is the focus of this study. The aim of this work was to evaluate the heterologous expression of EG45 in *Escherichia coli* in order to identify favorable conditions for its recombinant production. For this purpose, different host strains (BL21 Star, C41, and C43), IPTG concentrations (0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mM), and cultivation temperatures (16, 20, 25, and 30 °C) were evaluated. Protein expression was analyzed by SDS-PAGE, allowing the selection of the most promising conditions for subsequent solubility assessment through cell lysis by sonication and analysis of the soluble and insoluble fractions. The results demonstrated EG45 expression under most of the tested conditions, with the highest levels observed in the BL21 Star and C41 strains. Furthermore, a saturation pattern of expression was identified from 0.5 mM IPTG onward, with no significant gains observed at higher inducer concentrations. Regarding temperature, the highest expression intensities were detected at 25 °C and 30 °C. Solubility analysis revealed a predominance of the protein in the insoluble fraction, indicating the formation of inclusion bodies. Although the BL21 Star and C43 strains showed lower accumulation of insoluble protein, suggesting the possibility of an undetected soluble fraction, the C41 strain was selected for continuation of the bioprocess because it combined high expression yield with greater metabolic stability associated with the T7 expression system. Thus, an IPTG concentration of 0.5 mM, a cultivation temperature of 25 °C, and the C41 strain were defined as the most promising conditions for future optimization and scale-up of recombinant endoglucanase EG45 production.

Keywords: cellulase; recombinant production; BL21 Star(DE3); C41(DE3).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.....	15
Figura 2 – Representação esquemática do sinergismo entre celulasas	17
Figura 3 – Mapa esquemático do vetor de expressão pET-32a.	27
Figura 4 – Representação esquemática da construção da proteína recombinante EG45, destacando seus principais elementos estruturais	31
Figura 5 – Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em <i>E. coli</i> BL21 Star(DE3) (cepa 21).....	32
Figura 6 – Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em <i>E. coli</i> C43(DE3) (cepa 43).....	32
Figura 7 – Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em <i>E. coli</i> C41(DE3) (cepa 41).....	33
Figura 8 – Análise da solubilidade da proteína recombinante EG45 em diferentes cepas de <i>E. coli</i> (cepas 21, 41 e 43), cultivadas a 16 °C e induzidas com 0,5 mM e 2,0 mM de IPTG em eletroforese (SDS-PAGE).....	36
Figura 9 – Análise da solubilidade da proteína recombinante EG45 em diferentes cepas de <i>E. coli</i> (cepas 21, 41 e 43), cultivadas a 30 °C e induzidas com 0,5 mM e 2,0 mM de IPTG em eletroforese (SDS-PAGE).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das celulasas e suas funções	16
Tabela 2 – Comparação entre os principais sistemas hospedeiros utilizados na expressão heteróloga de proteínas, destacando suas vantagens e desvantagens....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Resíduos agroindustriais e biorrefinarias.....	12
2.2	Biomassa lignocelulósica e estrutura da celulose.....	13
2.3	Celulases e atuação na hidrólise da celulose	15
2.4	Fungos como fonte de celulases	17
2.5	Endoglucanase de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (EG45).....	20
2.6	Expressão heteróloga de enzimas	20
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral.....	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Aspectos éticos da pesquisa.....	25
4.2	Construção do gene sintético e transformação bacteriana em <i>E. coli</i>	26
4.3	Cultivo celular e expressão de endoglucanase com indutor	27
4.4	Preparo da amostra e aplicação em SDS-PAGE	28
4.5	Lise por sonicação.....	29
4.6	Análise eletroforética da fração solúvel e insolúvel	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	Escolha do vetor de expressão e características da proteína de fusão	30
5.2	Análise eletroforética de indução com IPTG	31
5.3	Avaliação da solubilidade da enzima por eletroforese	36
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o aumento da demanda por alimentos têm intensificado a pressão sobre o setor agroindustrial, especialmente no que se refere à geração de resíduos. Como consequência, observa-se um aumento significativo na produção desses materiais (BORGES; MARTINS; BASSO, 2025). Paralelamente, a forte dependência de combustíveis fósseis no setor energético e industrial agrava esse cenário, contribuindo para a emissão de gases de efeito estufa e para o esgotamento de recursos não renováveis (PADILHA et al., 2026). Dentre os principais tipos de resíduos, destacam-se os de natureza lignocelulósica, provenientes tanto das atividades agrícolas quanto do processamento industrial (ASTUDILLO et al., 2023; LIMA et al., 2025).

De modo geral, a gestão inadequada desses resíduos ocasiona diversos prejuízos ao meio ambiente, afetando o solo, a água e o ar, além de resultar na perda de potencial energético e de oportunidades para a geração de subprodutos (CORDEIRO et al., 2020). Esses materiais apresentam elevada recalcitrância, o que exige tratamentos específicos, como aqueles realizados em biorrefinarias, que promovem sua conversão em produtos de maior valor agregado e sua reinserção em cadeias produtivas. Dessa forma, contribuem para o escalonamento industrial dentro de uma perspectiva de economia circular, alinhada aos princípios de sustentabilidade e ao aproveitamento eficiente de recursos (SANTOS; RAMBO; SCAPIN, 2024).

No Brasil, a elevada produção agrícola, especialmente de culturas como cana-de-açúcar e café, evidencia o grande potencial de geração desses resíduos (CONAB, 2025; CONAB, 2026). Esses materiais são ricos em biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Esses três componentes desempenham funções estruturais específicas que, em conjunto, contribuem para a recalcitrância desses materiais, tornando necessário o uso de tratamentos adequados, como os enzimáticos, para sua degradação (WU et al., 2023).

As enzimas, como catalisadores biológicos, apresentam grande relevância industrial devido à sua alta especificidade por seus respectivos substratos (GAETE; TEODORO; MARTINAZZO, 2020). São utilizadas estrategicamente em diversos setores, como o farmacêutico, têxtil, de papel e de vinhos. Dentre elas, as celulasas destacam-se como algumas das mais empregadas, sendo classificadas em endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (HUSSAIN et al., 2025; RODARTE et al., 2024). A atuação sinérgica desses três tipos enzimático sobre o substrato aumenta significativamente a eficiência de degradação,

promovendo a liberação de açúcares fermentescíveis, que podem ser utilizados, por exemplo, na produção de biocombustíveis (CORDEIRO et al., 2020; MAFA; PLETSCHE; MALGAS, 2021).

As plataformas de obtenção dessas enzimas incluem, principalmente, o uso de microrganismos. Os fungos, especialmente os filamentosos, apresentam grande potencial devido à sua elevada capacidade de decomposição de material vegetal (HUANG; WANG; LIU, 2024). Dependendo da espécie, esses organismos podem produzir diferentes famílias de celulasas, que atuam de maneira variada (CHEN et al., 2025). Diversas espécies têm sido exploradas industrialmente, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (NAZIR et al., 2024).

Apesar do amplo uso desses microrganismos, ainda há intensa busca por novas fontes promissoras de enzimas lignocelulolíticas. Nesse contexto, estudos têm investigado o uso de fungos fitopatogênicos como fonte enzimática, visto que suas enzimas apresentam adaptações naturais para a degradação vegetal, exibindo alta especificidade e estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura (ALMEIDA et al., 2022; SANTANA et al., 2023; VITOR et al., 2024). Destaca-se o fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da doença conhecida como vassoura-de-bruxa, que afeta o cacaueteiro, sendo considerado uma fonte natural de celulasas (SOUSA FILHO et al., 2021). Entre as enzimas produzidas por esse fitopatógeno, destaca-se a endoglucanase EG45, pertencente à família 45 das glicosídeo hidrolases (GH45) e com massa molecular teórica de aproximadamente 38 kDa. Sua principal função consiste na clivagem de ligações β -1,4-glicosídicas internas da celulose amorfa, atuando de forma importante tanto no processo de infecção vegetal quanto na degradação da parede celular da planta hospedeira (SANTANA, 2025).

No entanto, devido a questões de biossegurança, seu uso direto na indústria é limitado, tornando necessárias alternativas como a expressão heteróloga em organismos mais seguros e adequados.

Entre os principais organismos utilizados como hospedeiros para expressão heteróloga, destaca-se *Escherichia coli*, amplamente empregada devido à sua facilidade de cultivo, manipulação genética e ao vasto conhecimento disponível sobre sua fisiologia e estratégias de expressão (GOMES et al., 2016). Alguns estudos já demonstraram a expressão em *E. coli* de celulasas funcionais de fungos fitopatogênicos, incluindo *M. perniciosa* e outras espécies (SANTANA, 2025; VITOR et al., 2024). Entretanto, os níveis de produção relatados ainda são limitados, evidenciando a necessidade de otimização das condições de expressão e do processo produtivo para viabilizar rendimentos compatíveis com aplicações em escala

industrial (SANTANA, 2025).

Diante dos baixos rendimentos descritos para a expressão de celulasas fúngicas, espera-se que a modulação da temperatura de cultivo e da indução por IPTG, aliada à escolha de cepas hospedeiras específicas, atue diretamente na melhoria do rendimento e da solubilidade da endoglucanase de *M. pernicioso*.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo aprimorar a expressão de uma endoglucanase recombinante de *M. pernicioso* expressa em sistema heterólogo de *E. coli*, por meio da variação de cepas comerciais, da temperatura de cultivo e das condições de indução com IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), bem como avaliar a solubilidade da proteína obtida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resíduos agroindustriais e biorrefinarias

O aumento da demanda global por alimentos e biomassa tem intensificado a expansão das atividades agroindustriais. Como consequência, observa-se um crescimento significativo na geração de resíduos oriundos do processamento de matérias-primas, o que tem despertado crescente preocupação quanto ao seu manejo e impacto ambiental (BORGES; MARTINS; BASSO, 2025).

Além da crescente geração de resíduos, outro desafio associado ao modelo industrial atual está relacionado à elevada dependência de recursos não renováveis, especialmente combustíveis fósseis, amplamente utilizados para suprir a demanda energética global. A exploração intensiva desses recursos contribui para o aumento das emissões de gases de efeito estufa e para o agravamento das mudanças climáticas. Além disso, impacta diretamente a qualidade do ar e contribui para o aquecimento global, implicando prejuízos indiretos e diretos à saúde humana (PADILHA et al., 2026). Nesse contexto, os resíduos agroindustriais passam a ser considerados fontes promissoras de biomassa renovável, com potencial para reduzir a dependência de combustíveis fósseis e contribuir para a diversificação da matriz energética.

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, apresentando elevada produção de culturas de grande importância econômica e ricas em biomassa lignocelulósica. No caso da cana-de-açúcar, por exemplo, a produção nacional é estimada em aproximadamente 709 milhões de toneladas no primeiro levantamento na safra

2026/2027, havendo um aumento de 5,3% em relação ao levantamento anterior (CONAB, 2026). De forma semelhante, o café também possui grande relevância no cenário agrícola brasileiro, com produção estimada em aproximadamente 66,2 milhões de sacas beneficiadas no primeiro levantamento de 2026, representando um aumento de 17,1% do que o foi registrado no final de 2025, distribuídas entre as variedades arábica e conilon (CONAB, 2026). Esses dados evidenciam que apenas uma parcela das culturas agrícolas do país já é capaz de gerar quantidades expressivas de resíduos agroindustriais, ressaltando o potencial desses materiais para aplicações biotecnológicas.

Os resíduos agroindustriais podem ser classificados, de maneira geral, em resíduos de campo e de processamento. Os resíduos de campo são gerados durante as etapas de cultivo e colheita, incluindo materiais como folhas, palhas e caules. Já os de processamento são produzidos após o beneficiamento da matéria-prima agrícola, originando subprodutos como bagaço, cascas e melaço. Muitos desses materiais apresentam elevada fração de biomassa lignocelulósica, o que os torna potenciais matérias-primas para processos biotecnológicos e para a geração de bioprodutos de valor agregado (LIMA et al., 2025; ASTUDILLO et al., 2023).

De maneira geral, a gestão inadequada desses materiais pode causar impactos ambientais e sociais significativos, como degradação do solo, poluição hídrica e atmosférica, além da perda de biomassa com potencial de aproveitamento energético, especialmente no caso dos resíduos lignocelulósicos, cuja elevada recalcitrância dificulta sua degradação natural no ambiente (CORDEIRO et al., 2020).

Diante da elevada recalcitrância desses resíduos e dos impactos associados ao seu acúmulo, surge a necessidade de estratégias sustentáveis de aproveitamento, como as biorrefinarias, que visam converter a biomassa lignocelulósica em energia e bioprodutos de valor agregado, contribuindo para a transição da indústria para um modelo de economia circular, em substituição ao modelo linear que é baseado na produção, processamento e descarte (SANTOS; RAMBO; SCAPIN, 2024). Nesse contexto, o aproveitamento eficiente da biomassa lignocelulósica torna-se um aspecto central para o desenvolvimento de processos sustentáveis de valorização desses resíduos.

2.2 Biomassa lignocelulósica e estrutura da celulose

De modo geral, os materiais lignocelulósicos são constituídos predominantemente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), que representam aproximadamente 30–45%,

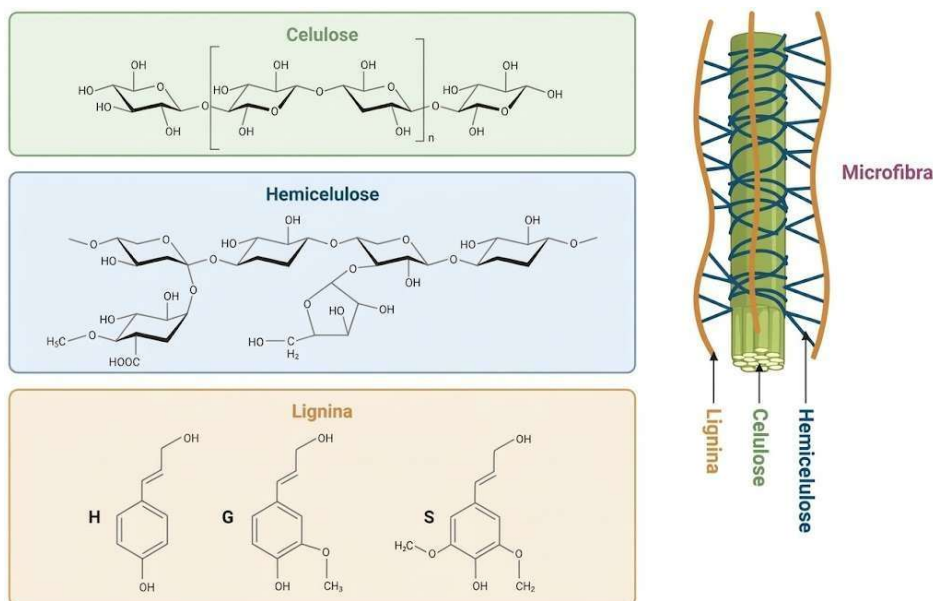
15–25% e 15–25% da biomassa seca, respectivamente. Esses componentes encontram-se estruturalmente associados por diferentes interações, incluindo ligações covalentes, formando um arranjo altamente resistente à degradação (WU et al., 2023).

Estruturalmente, a celulose é formada por um polímero linear constituído por unidades de β -D-glicopirranose conectadas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Essas cadeias lineares estabelecem interações intermoleculares por meio de ligações de hidrogênio, organizando-se em microfibrilas que se agrupam em fibrilas maiores e originam fibras de celulose com elevado grau de ordenação. Essa organização resulta na formação de regiões cristalinas, caracterizadas por alta compactação estrutural, o que reduz a acessibilidade às enzimas e dificulta processos de pré-tratamento para a biomassa. Além dessas regiões, a celulose também apresenta porções amorfas, menos organizadas, que são mais suscetíveis à ação enzimática e química (ILIĆ et al., 2023; SANTIAGO, 2017).

A hemicelulose, por sua vez, consiste em um heteropolissacarídeo ramificado composto por diferentes monossacarídeos, como xilose, manose, glicose e arabinose, apresentando menor grau de polimerização e organização estrutural predominantemente amorfa quando comparada à celulose. A lignina é um polímero aromático complexo derivado de unidades fenilpropanoides, como coniferil, sinapil e p-cumaril, que se associa aos polissacarídeos da parede celular vegetal. Essa associação contribui para a rigidez estrutural, a impermeabilidade à água e a proteção da parede celular vegetal contra estresses ambientais e degradação microbiana (ILIĆ et al., 2023).

A resistência da celulose à degradação está relacionada à presença da hemicelulose e da lignina na parede celular vegetal. Enquanto a hemicelulose pode dificultar o reconhecimento enzimático devido a grupamentos acetilados, a lignina atua como uma barreira física que restringe o acesso das enzimas à celulose. Essa organização estrutural complexa confere à biomassa lignocelulósica um elevado grau de recalcitrância, tornando-a naturalmente resistente à degradação química, física e enzimática (SANTIAGO, 2017). Por isso, etapas de pré-tratamento são geralmente necessárias para aumentar a acessibilidade da celulose e tornar a hidrólise da biomassa mais eficiente, permitindo que enzimas hidrolíticas, como as celulasas, atuem sobre os polissacarídeos da parede celular.

Figura 1- Representação dos principais componentes da biomassa lignocelulósica. A celulose é formada por cadeias lineares de glicose ligadas por β -(1 $\rightarrow$ 4), a hemicelulose consiste em um heteropolissacarídeo ramificado e a lignina é um polímero aromático formado por unidades fenilpropanoides, como p-cumaril (H), coniferil (G) e sinapil (S).



Fonte: Adaptado de Ren et al., 2024.

2.3 Celulases e atuação na hidrólise da celulose

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas ao reduzir a energia de ativação do processo. Devido à sua complexidade estrutural, a síntese química dessas moléculas é limitada, sendo sua produção majoritariamente realizada por organismos vivos. Nesse contexto, os microrganismos se destacam como principais produtores industriais de enzimas, em virtude de sua facilidade de cultivo, elevada taxa de crescimento e capacidade de secreção enzimática (GAETE; TEODORO; MARTINAZZO, 2020).

A degradação da biomassa lignocelulósica depende da ação de diferentes enzimas hidrolíticas, entre as quais se destacam as celulases, responsáveis pela conversão da celulose em açúcares fermentescíveis. Essas enzimas apresentam grande potencial biotecnológico e são amplamente exploradas em diferentes setores industriais, como as indústrias farmacêutica, de biocombustíveis, papel, têxtil e vinícola. Suas propriedades catalíticas e a capacidade de hidrolisar substratos específicos tornam essas biomoléculas estratégicas para processos produtivos mais eficientes, especialmente quando associadas aos avanços da engenharia genética e da biotecnologia, contribuindo para o desenvolvimento industrial de forma mais sustentável e ecológica (RODARTE et al., 2024).

Segundo Hussain et al. (2025), as celulases podem ser classificadas, de maneira geral, em três grupos principais: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, sendo que cada uma desempenha um papel específico no processo de hidrólise da cadeia de celulose. Nesse processo, o desempenho enzimático é otimizado pela ação sinérgica entre os diferentes

tipos de enzimas, favorecendo a conversão da celulose em glicose. As principais características e classificações das celulasas envolvidas na hidrólise da celulose estão apresentadas na Tabela 1.

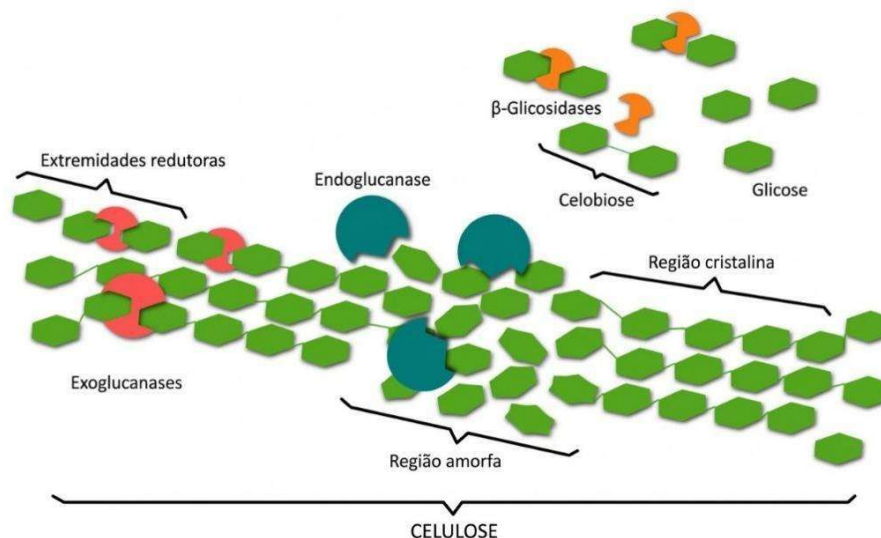
Tabela 1- Classificação das celulasas, respectivos números EC e características funcionais na degradação da celulose.

Nome	Enzyme		Referências
	Commission (EC)	Características	
Endoglucanase	EC 3.2.1.4	Hidrolisam ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) no interior das regiões amorfas da celulose, formando oligossacarídeos menores e novas extremidades de cadeia.	(ALI et al., 2026; HUSSAIN et al., 2025)
Exoglucanase ou celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	Atuam nas extremidades das cadeias de celulose, hidrolisando ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e liberando principalmente celobiose; podem agir tanto nas extremidades redutoras quanto nas não redutoras.	(KAMANDE; OMWENGA; NGUGI, 2024; SRIVASTAVA et al., 2023)
β-glicosidase	EC 3.2.1.21	Hidrolisam celobiose e outros oligossacarídeos derivados da celulose, liberando moléculas de glicose e completando a ação das celulasas.	(REN et al., 2024)

Fonte : Elaborado pelo autor

No contexto industrial, o principal interesse está na forma como os diferentes tipos de celulasas atuam de maneira integrada para aumentar a eficiência da degradação da celulose e a liberação de açúcares fermentescíveis. De modo geral, as endoglucanases iniciam o processo ao romper ligações glicosídicas de forma aleatória no interior da cadeia polimérica, principalmente nas regiões amorfas, gerando novas extremidades de cadeia. Essas extremidades passam a servir de substrato para as exoglucanases, que atuam nas extremidades das cadeias, liberando principalmente celobiose. Posteriormente, a celobiose é hidrolisada em glicose pela ação das β -glicosidases, completando a sacarificação da celulose. A cooperação funcional entre essas enzimas caracteriza o sinergismo enzimático (Figura 2), essencial para a conversão eficiente da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (CORDEIRO et al., 2020; MAFA; PLETSCHKE; MALGAS, 2021).

Figura 2 - Representação esquemática do sinergismo entre celulases.



Fonte: Adaptado de Pérez-Contreras et al., 2025.

2.4 Fungos como fonte de celulases

A degradação de materiais lignocelulósicos desempenha papel central na ciclagem de nutrientes, sendo conduzida majoritariamente por microrganismos decompositores. De maneira geral, bactérias e fungos destacam-se como os principais agentes envolvidos nesse processo, atuando por meio da produção de enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação da biomassa vegetal. Apesar da diversidade de microrganismos envolvidos, alguns grupos apresentam maior eficiência, principalmente devido à elevada capacidade de produção e secreção de enzimas (DATTA, 2024; LI et al., 2024).

Os fungos, especialmente os fungos filamentosos, destacam-se pela elevada eficiência na decomposição da biomassa vegetal. Esses organismos apresentam sistemas metabólicos altamente desenvolvidos, permitindo a produção de uma ampla diversidade de enzimas lignocelulolíticas, frequentemente superior à observada em bactérias (HUANG; WANG; LIU, 2024). Esses microrganismos podem ser classificados em fungos de decomposição parda, branca e branca, de acordo com sua capacidade de degradar os diferentes componentes da lignocelulose. No entanto, esses grupos apresentam diferenças na diversidade de enzimas produzidas, o que influencia sua eficiência degradativa (HSIN et al., 2025).

Os fungos associados à decomposição branca destacam-se pela capacidade de degradar simultaneamente celulose, hemicelulose e lignina, promovendo uma degradação mais completa do material, ainda que de forma mais lenta. Em contraste, os fungos de

decomposição parda atuam principalmente sobre celulose e hemicelulose, apresentando limitada ação sobre a lignina, porém com maior adaptação a condições ambientais adversas. Já os fungos relacionados à decomposição branca apresentam atuação mais restrita, degradando celulose e hemicelulose de maneira significativa, o que resulta em menor eficiência global (CHEN et al., 2025). Essas diferenças tornam os fungos de decomposição branca particularmente relevantes para aplicações biotecnológicas, especialmente na produção de enzimas destinadas à hidrólise de biomassa lignocelulósica em processos industriais.

Em nível molecular, essas diferenças também se refletem na composição e diversidade das enzimas envolvidas na degradação da celulose. Segundo Sista Kameshwar e Qin (2018), observa-se, a partir de uma análise genômica, diferenças na distribuição de algumas famílias de hidrolases de glicosídeos associadas à degradação da celulose entre fungos de decomposição branca, parda e branca. Entre as celulasas, destaca-se a ausência da família GH-48, relacionada às exoglucanases, em fungos de decomposição parda e branca, além da redução de outras enzimas como GH-9 e GH-45. Por outro lado, as famílias GH-5 (endoglucanases) e GH-3 (β -glucosidases) apresentam maior abundância entre os grupos, indicando seu papel central na hidrólise da celulose.

Essas características estruturais, funcionais e moleculares não apenas determinam a eficiência degradativa desses organismos, mas também estão diretamente relacionadas ao seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos. Nesse contexto, os fungos filamentosos apresentam uma série de vantagens que os tornam particularmente atrativos para a produção de enzimas de interesse industrial.

Dentre essas, destaca-se a elevada capacidade de secreção extracelular de enzimas, facilitando sua recuperação e aplicação em diferentes processos industriais. Além disso, a plasticidade metabólica desses organismos, aliada à sua capacidade de adaptação e colonização de ambientes diversos, contribui para sua eficiência na degradação de substratos complexos. Outro aspecto relevante é a presença de mecanismos de modificação pós-traducional, que possibilitam a produção de enzimas funcionalmente mais estáveis e ativas, representando uma vantagem em relação a outros sistemas biológicos, como bactérias (ROTH; WESTRICK; BALDWIN, 2023; SALAZAR-CEREZO; DE VRIES; GARRIGUES, 2023).

Nesse contexto, diversos fungos filamentosos têm sido amplamente explorados em processos industriais devido à sua elevada capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas. Dentre esses, destacam-se espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (NAZIR et al., 2024). Segundo Sohail et al. (2022), a produção de celulasas

é amplamente realizada na indústria utilizando *Trichoderma reesei*, em função do amplo conhecimento acerca desse organismo e de sua elevada capacidade de secreção de diferentes enzimas celulolíticas. Além disso, outros fungos também demonstram elevado potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas, como *Aspergillus terreus* (KADOGUCHI et al., 2024), *Aspergillus niger* (BELLAOUCHI et al., 2021) e *Penicillium oxalicum* (LI et al., 2020; YAO et al., 2016). Apesar dos amplos estudos com essas espécies, visando seu aprimoramento contínuo, novos microrganismos continuam sendo investigados quanto ao seu potencial biotecnológico.

Nesse contexto, fungos fitopatogênicos têm emergido como fontes promissoras de enzimas degradadoras da parede celular vegetal devido à sua adaptação evolutiva para romper tecidos vegetais sob condições de estresse de campo, gerando biocatalisadores naturalmente mais robustos e tolerantes a flutuações de calor e de pH que as linhagens industriais tradicionais.

Entre eles, destaca-se *M. pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa, uma das principais doenças que afetam a cultura do cacaueteiro, comprometendo a produção e a qualidade dos frutos e impactando significativamente a cadeia produtiva do cacau, especialmente em regiões como a Amazônia brasileira e o estado da Bahia (SOUSA FILHO et al., 2021).

A literatura recente comprova essa versatilidade no fungo *M. pernicioso*. Santana et al. (2023) caracterizaram uma carboximetilcelulase capaz de reter 88,66% de sua atividade a 90 °C por 30 minutos operando em pH ótimo mais neutro de 7,2. A produção de β -glicosidase por *M. pernicioso* foi investigada por Almeida et al. (2022) a partir do extrato bruto fúngico, apresentando valores ideais de atividade enzimática em pH 4,5 e temperatura de 60 °C, além de estabilidade térmica no intervalo de 50 °C a 90 °C. Por sua vez, Vitor et al. (2024) descreveram a produção de uma β -glicosidase recombinante proveniente deste fungo em células de *E. coli*, a qual demonstrou atividade hidrolítica em pH 5,0 à temperatura de 60 °C. O estudo de fitopatógenos como esse contribui para a identificação de enzimas celulolíticas mais eficientes e de novas fontes com potencial aplicação industrial, visto que esses biocatalisadores demonstram capacidade de adaptação às condições severas dos processos bioprocessuais.

No entanto, devido a questões de biossegurança, esses organismos não são adequados para uso direto em processos industriais, o que torna a expressão heteróloga uma estratégia fundamental para a produção segura e controlada dessas enzimas. Nesse contexto, enzimas de *M. pernicioso* têm sido exploradas por meio dessa abordagem, ampliando sua

aplicabilidade em diferentes processos biotecnológicos. Estudos recentes demonstraram a expressão funcional de endoglucanases desse organismo em *E. coli*, evidenciando o potencial dessa estratégia, embora ainda sejam necessários aprimoramentos nas condições de expressão e no desempenho enzimático (SANTANA, 2025; VITOR et al., 2024).

2.5 Endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* (EG45)

Considerando a importância das endoglucanases na degradação da celulose, torna-se relevante compreender as características estruturais e funcionais da enzima EG45, denominação adotada por Santana (2025) para a proteína objeto de estudo deste trabalho.

A enzima EG45 utilizada neste estudo é uma endoglucanase proveniente do fungo *M. perniciosa*, classificada na família GH45 das glicosil hidrolases. A classificação das glicosil hidrolases em famílias baseia-se na similaridade da sequência de aminoácidos, na estrutura tridimensional e no mecanismo catalítico das enzimas, as quais são responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato (HENRISSAT; BAIROCH, 1993 ;HENRISSAT; DAVIES, 1997).

Segundo Santana (2025), a análise da sequência da EG45 realizada no servidor ProtParam revelou que a proteína é composta por 205 resíduos de aminoácidos, apresenta massa molecular teórica de aproximadamente 20,9 kDa, sendo considerada uma enzima de baixo peso molecular, e ponto isoelétrico teórico (pI) de 4,34, caracterizando-a como uma proteína de natureza ácida. Essas propriedades fornecem informações importantes para compreender o comportamento da enzima durante sua expressão heteróloga e as etapas de purificação, além de servirem como parâmetros para sua caracterização bioquímica.

O estudo também demonstrou a obtenção da enzima em sua forma solúvel e ativa, alcançando uma concentração de proteína solúvel total de 27,94 mg/L. Além disso, a EG45 apresentou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura de 50 °C, condições compatíveis com processos industriais de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, reforçando seu potencial para aplicações biotecnológicas.

2.6 Expressão heteróloga de enzimas

A expressão heteróloga de proteínas, baseada em técnicas de DNA recombinante, consiste na produção de proteínas recombinantes em sistemas hospedeiros distintos do

organismo de origem (WATTS et al., 2021). Esse processo envolve a inserção de genes de interesse em vetores de expressão e sua posterior introdução em um organismo hospedeiro adequado, permitindo a síntese controlada da proteína desejada (YESILIRMAK; SAYERS, 2009). Dessa forma, a expressão heteróloga configura-se como uma ferramenta essencial da biotecnologia moderna, amplamente utilizada na produção de enzimas e outras biomoléculas de interesse para indústria.

No contexto da bioprospecção de enzimas, especialmente aquelas provenientes de microrganismos, a expressão heteróloga torna-se uma etapa essencial após a identificação de genes com potencial biotecnológico. Na indústria, a utilização de fungos como degradadores de biomassa lignocelulósica é amplamente difundida; no entanto, esses organismos podem apresentar limitações relacionadas às exigências específicas de cultivo e indução da produção enzimática (LAMBERTZ et al., 2014). Nesse sentido, a expressão heteróloga surge como uma estratégia capaz de superar tais limitações, permitindo a produção eficiente de enzimas em sistemas hospedeiros mais adequados, frequentemente com menor custo e maior controle do processo, tanto de organismos procarióticos quanto eucarióticos (MARTÍNEZ-OLIVARES; COCA-RUIZ, 2025).

Diversos sistemas hospedeiros têm sido utilizados na expressão heteróloga de proteínas, incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de inseto e células de mamíferos. Entre os sistemas bacterianos, destaca-se *E. coli*, amplamente utilizada devido à sua facilidade de cultivo e manipulação genética. Por outro lado, sistemas eucarióticos, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, bem como fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, permitem a realização de modificações pós-traducionais mais complexas. Já sistemas baseados em células de inseto e de mamíferos são frequentemente utilizados para a expressão de proteínas com maior complexidade estrutural e funcional (GOMES et al., 2016). A escolha do sistema hospedeiro mais adequado depende de fatores como custo, rendimento, complexidade da proteína e necessidade de modificações estruturais, sendo esses aspectos determinantes para o sucesso da produção recombinante (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre os principais sistemas hospedeiros utilizados na expressão heteróloga de proteínas, destacando suas vantagens e desvantagens.

Sistema Hospedeiro	Benefícios	Limitações
<i>Escherichia coli</i>	Fácil; Rápido; Econômico; Alta taxa de crescimento; Capacidade de fermentação contínua;	Não possui maquinário para remover íntrons; Genes estrangeiros podem causar terminação prematura da expressão gênica; Viés de códons; Ausência de modificações pós-traducionais; Glicosilação extremamente incomum em bactérias; Produção de proteínas insolúveis (corpos de inclusão); Degradação de proteínas; Acúmulo de endotoxinas;
<i>Bacillus subtilis</i>	Não produz LPS/endotoxinas; Pode ser transformado facilmente com muitos bacteriófagos e plasmídeos; Capacidade de secreção de proteínas funcionais diretamente no meio de cultura;	Produção de proteases extracelulares que podem reconhecer e degradar proteínas heterólogas; Instabilidade de plasmídeos; Expressão reduzida ou ausente da proteína de interesse;
Levedura	Crescimento rápido em meio de baixo custo; Modificações pós-traducionais apropriadas; Segurança do sistema garantida; Não produz endotoxinas;	Hiperglicosilação de proteínas ; Viés de códons; Ineficiência na secreção de proteínas para o meio, levando à retenção intracelular;
Fungos filamentosos	Alto nível de expressão;	Sistema complexo; Falta de conhecimento sobre a fisiologia;
Baculovirus / Inseto	Alto nível de expressão; Modificações pós-traducionais apropriadas; Seguro para vertebrados; Excelente ferramenta para produção de glicoproteínas recombinantes;	Expressão contínua não é possível; Condições de cultivo mais exigentes;
Células de mamíferos	Enovelamento proteico correto; Modificações pós-traducionais adequadas; Glicosilação apropriada;	Alto custo; Tecnologia complicada; Potencial contaminação com vírus animais;

Plantas transgênicas	Fácil escalonamento com baixo custo; As proteínas podem ser direcionadas para diferentes órgãos em diferentes estágios de crescimento; Alto rendimento;	Os níveis de expressão dependem do alvo; Ensaio funcionais ainda precisam ser desenvolvidos;
Animais transgênicos	Enovelamento proteico adequado; Modificações pós-traducionais apropriadas e correta montagem do produto; Glicosilação adequada;	Período de produção relativamente longo; Baixo rendimento; Custos mais elevados;

Fonte : Gomes et al., 2016. Adaptado.

Dentre os diversos sistemas hospedeiros disponíveis, a *E. coli* destaca-se como um dos mais utilizados para a expressão heteróloga de proteínas. Apesar de suas vantagens, como facilidade de cultivo, rápido crescimento e baixo custo, esse sistema ainda apresenta limitações importantes, incluindo a formação de corpos de inclusão decorrente da agregação de proteínas mal dobradas, além de problemas relacionados ao enovelamento inadequado e à baixa solubilidade das proteínas expressas. Tais limitações estão frequentemente associadas à ausência de modificações pós-traducionais e às diferenças no maquinário celular bacteriano, o que pode comprometer a estrutura e a funcionalidade das enzimas produzidas. Ainda assim, *E. coli* permanece como uma das plataformas mais empregadas na produção recombinante, devido à sua elevada produtividade, facilidade de escalonamento e ao amplo domínio técnico sobre sua genética e fisiologia (BHATWA et al., 2021; HEMAMALINI; EZHILMATHI; MERCY, 2019; SMOLSKAYA; LOGASHINA; ANDREEV, 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento de ferramentas moleculares e estratégias experimentais tem ampliado significativamente a capacidade de produção de proteínas heterólogas, incluindo a disponibilidade de múltiplos sistemas de expressão, linhagens geneticamente otimizadas e condições de cultivo ajustáveis, permitindo o desenvolvimento de estratégias eficientes para contornar essas limitações (SANDOMENICO; SIVACCUMAR; RUVO, 2020).

Dentre as estratégias empregadas para otimizar a expressão heteróloga em *E. coli*, destaca-se, inicialmente, a otimização das condições de cultivo, incluindo temperatura, pH, aeração e composição do meio, fatores que influenciam diretamente o enovelamento e a solubilidade das proteínas. Além disso, o controle da taxa de expressão, por meio da modulação da concentração de indutores e do uso de promotores reguláveis, tem sido amplamente utilizado

para evitar a sobrecarga do maquinário celular e a formação de agregados proteicos (Mohite et al., 2026; TOH et al., 2023). Outra abordagem relevante envolve o uso de linhagens geneticamente modificadas, desenvolvidas para favorecer a formação de ligações dissulfeto, reduzir a atividade proteolítica ou minimizar a produção de endotoxinas (CASTILLO-CORUJO et al., 2024; HULEANI et al., 2022; KAMOSHIDA et al., 2024).

Adicionalmente, a co-expressão com chaperonas moleculares e o uso de proteínas de fusão, como *maltose-binding protein* (MBP) e *glutathione S-transferase* (GST), contribuem para o correto enovelamento e aumento da solubilidade das proteínas recombinantes (MAKSUM et al., 2023; SHAFIEE; SHARIFI; AMINI, 2024). Estratégias de direcionamento subcelular, especialmente para o periplasma, também são empregadas com o objetivo de explorar ambientes celulares mais favoráveis à maturação proteica, uma vez que esse compartimento apresenta um ambiente oxidante que contribui para a formação de ligações dissulfeto e, conseqüentemente, para o enovelamento adequado das proteínas (GIBISCH et al., 2024).

O uso de aditivos químicos, como osmólitos e outros agentes estabilizantes, bem como a otimização da sequência gênica por meio da adaptação de códons para aumentar a eficiência traducional, representam abordagens complementares importantes (ATROSHENKO et al., 2024; PAREMSKAIA et al., 2024). Por fim, estratégias voltadas à formação controlada de corpos de inclusão ou à sua posterior recuperação têm sido amplamente exploradas visando à obtenção de proteínas biologicamente ativas, uma vez que processos de solubilização e *refolding* permitem recuperar proteínas funcionais a partir de agregados insolúveis (NABIEL et al., 2022). Adicionalmente, métodos que aumentam a secreção ou liberação de proteínas também vêm sendo investigados como forma de maximizar o rendimento e a funcionalidade das proteínas produzidas (KLEINER-GROTE; RISSE; FRIEHS, 2018).

Alguns trabalhos já demonstraram a expressão de enzimas celulolíticas de origem de fungos fitopatógenos em *E. coli*. Por exemplo, foi obtida a expressão bem-sucedida da endoglucanase de *Fusarium graminearum*, agente causal da fusariose, com produção de enzima ativa e elevados níveis de expressão tanto no periplasma quanto no meio extracelular (YILDIRIM; ÇELIK, 2017). Da mesma forma, foram obtidos bons resultados na expressão de uma β -1,4-endoglucanase de *Macrophomina phaseolina*, fungo causador da podridão de carvão (WANG; JONES, 1997). Outro exemplo é *Pyrenochaeta lycopersici*, agente da podridão da raiz do tomateiro, cuja endoglucanase foi expressa em *E. coli*, porém a maior parte da proteína foi produzida em corpos de inclusão, sendo necessário o emprego de

técnicas de *refolding* para recuperar sua atividade enzimática (VALENTE; INFANTINO; ARAGONA, 2011). Esses estudos demonstram que *E. coli* pode ser utilizada com sucesso para a expressão de enzimas celulolíticas de fungos fitopatógenos, embora algumas proteínas demandem estratégias adicionais para obtenção da forma funcional

Sob essa perspectiva, os desafios associados à expressão heteróloga em *E. coli* não limitam sua aplicação, mas reforçam seu papel como uma plataforma altamente versátil e consolidada na produção de proteínas recombinantes, capaz de atender a diferentes demandas biotecnológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Aprimorar a expressão da enzima endoglucanase recombinante de *M. perniciosus* em *E. coli*, determinando as melhores condições de cultivo e indução para a sua obtenção em diferentes cepas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de expressão da endoglucanase recombinante (EG45), a partir do vetor pET-32a, utilizando as cepas comerciais de *E. coli* BL21 Star (DE3), C41 (DE3) e C42 (DE3);
- Analisar o impacto de variações na concentração de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) e nas temperaturas de cultivo (16, 20, 25 e 30 °C) sobre o rendimento da expressão da proteína e solubilidade;
- Verificar o perfil de solubilidade da proteína recombinante obtida após o processo de lise celular por sonicação;
- Monitorar a eficiência da expressão e o fracionamento proteico por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este trabalho contou com o auxílio de ferramentas de inteligência artificial, como o ChatGPT e o Gemini, utilizadas para apoio na organização de ideias, revisão textual, esclarecimento de conceitos, tradução de termos e adaptação de figuras, sendo todo o conteúdo posteriormente revisado criticamente e de responsabilidade integralmente do autor pelas informações apresentadas.

Além disso, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), incluindo atividades com organismos geneticamente modificados realizadas em ambiente de nível de biossegurança 1 (NB-1), seguindo as normas e boas práticas laboratoriais vigentes, em conformidade com as diretrizes da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a legislação brasileira de biossegurança. As atividades desenvolvidas foram aprovadas pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), conforme Parecer CIBio nº 01/2026.

O estudo envolveu acesso ao patrimônio genético brasileiro, com o projeto devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o nº A0B9690, em conformidade com a Lei nº 13.123/2015 e o Decreto nº 8.772/2016.

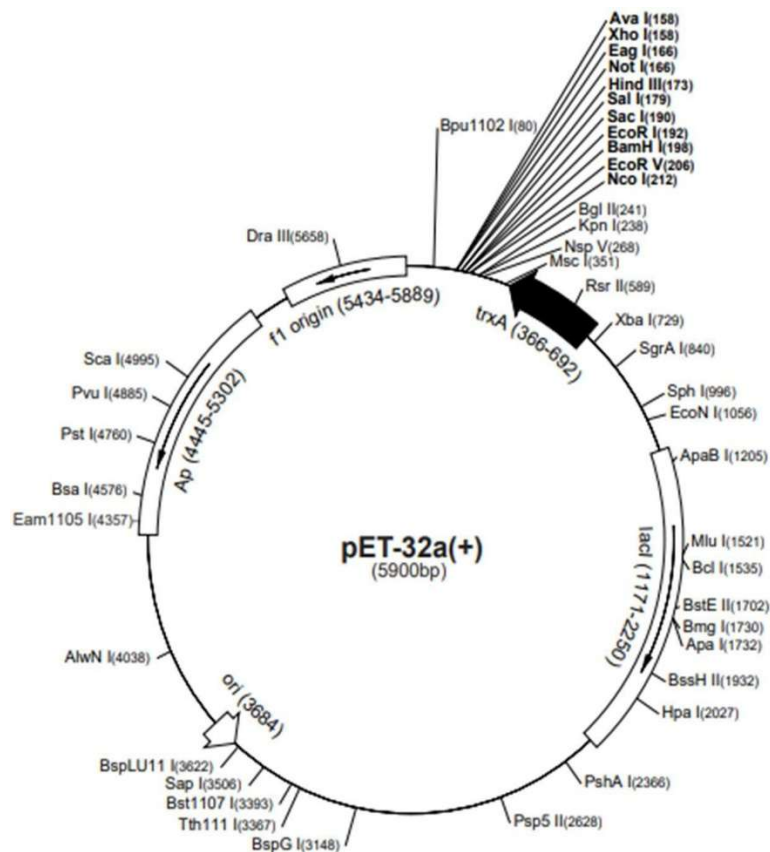
4.2 Construção do gene sintético e transformação bacteriana em *E. coli*

A construção do gene sintético (EG45 - Santana, 2025) e sua montagem no vetor de expressão pET-32a (Figura 3) foram realizadas por empresa terceirizada. Posteriormente, os plasmídeos foram enviados para transformação na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

O vetor de expressão pET-32a (Figura 3) foi utilizado para a clonagem e expressão da endoglucanase recombinante em *E. coli*. Esse vetor contém os elementos necessários para a expressão da proteína de interesse, incluindo o promotor T7, o operador *lac*, a sequência codificante para tiorredoxina (TrxA), a His-tag e o gene de resistência à ampicilina (*bla*).

As células de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Thermo Fisher Scientific®), C41(DE3) (Novagen®) e C43(DE3) (Novagen®) foram transformadas pelo método de choque térmico, sendo incubadas em gelo por 20 minutos e submetidas a choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Após essa etapa, colônias das cepas transformadas foram enviadas à Universidade Federal do Ceará (UFC), em meio LB sólido suplementado com ampicilina, para realização dos testes de expressão proteica.

Figura 3 - Mapa esquemático do vetor de expressão pET-32a. Fonte : Novagen. pET-32a-c(+) Vectors. TB122, 1998.



Fonte:Novagen

4.3 Cultivo celular e expressão de endoglucanase com indutor

A etapa de cultivo e expressão da proteína recombinante foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) , na Universidade Federal do Ceará (UFC).

Inicialmente, as cepas de *E. coli* transformadas foram submetidas ao processo de reativação. Em câmara de fluxo laminar (ESCO, Class II BSC), para cada cepa, uma colônia isolada foi coletada com auxílio de uma ponteira estéril e inoculada em 10 ml de meio LB suplementado com ampicilina na concentração final de 50 µg/mL. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm em shaker por aproximadamente 16 horas. A viabilidade celular foi confirmada pela observação de turbidez no meio de cultivo

Após esse período, alíquotas de 500 µL foram retiradas das culturas e preservadas em glicerol a uma concentração final de 25% , sendo armazenadas em microtubos tipo Eppendorf (1,5 mL) a -20 °C, para posterior utilização nos experimentos de cultivo e expressão

heteróloga.

Para início dos experimentos, pré-inóculos foram preparados de cada cepa de *E. coli* em 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL), utilizando tubos Falcon estéreis. Foram inoculados 10 µL de cada amostra conservada em glicerol, em cultivos separados. As culturas foram incubadas sob agitação de 180 rpm em shaker à 37 °C durante aproximadamente 16 horas (overnight).

Após o cultivo do pré-inóculo, 200 µL de cada cepa foi inoculado em quatro tubos Falcon contendo 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL), destinados às diferentes concentrações do indutor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo). O crescimento bacteriano foi monitorado por leituras de densidade óptica (DO600) em equipamento EPOCH utilizando microplaca de 96 poços até que as culturas atingissem valores entre 0,6 e 0,8, também levando em consideração a leitura de um ensaio branco contendo meio LB e ampicilina estéril.

Antes da indução, uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi coletada como controle da expressão (T0) para análise em SDS-PAGE. Em seguida, o IPTG foi adicionado aos cultivos para obtenção das concentrações finais de 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,0 mM.

Após a indução, as culturas foram incubadas sob agitação em shaker refrigerado mantendo uma temperatura constante para cada ensaio. O procedimento foi repetido independentemente para as temperaturas de 16, 20, 25 e 30 °C, a fim de avaliar a influência da temperatura na expressão da proteína recombinante. As culturas incubadas a 16 °C e 20 °C permaneceram sob agitação por aproximadamente 16 horas (*overnight*), enquanto aquelas mantidas a 25 °C e 30 °C permaneceram incubadas por 3 horas.

Ao final do período de indução, as culturas foram transferidas para microtubos tipo Eppendorf e levadas para centrifuga (CAPP, modelo CR-1544R) a $12.000 \times g$, a 4 °C, por 20 minutos. Em seguida, o pellet foi reservado para posterior análise em SDS-PAGE.

4.4 Preparo da amostra e aplicação em SDS-PAGE

Para preparo das amostras, os pellets celulares foram ressuspensos em meio LB, e uma alíquota de 80 µL de cada tratamento com IPTG/temperatura foi transferida para microtubo tipo Eppendorf separados. Após isso, aplicou-se um tampão de amostra 5x (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; Glicerol 50%; SDS 10%; 0,5% Azul de bromofenol) na quantidade de 20 µL. As amostras foram submetidas à desnaturação em banho térmico a 95°C por 5 min e, posteriormente centrifugadas a $12.000 \times g$ por 5 min, a 4 °C.

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970). O sistema de gel vertical foi constituído por um gel de concentração a 5% e um gel de separação a 12% de acrilamida. Para aplicação no gel, foram transferidos 5 μ L do marcador molecular (GE Healthcare UK limited – 17044601, lote 9733015) para o primeiro poço, enquanto 10 μ L de cada amostra foram aplicados nos demais poços.

A corrida eletroforética foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) sob condições de 250V, 50mA (25 mA por gel) e 10 W ajustada ao aparelho de eletroforese (Amersham Pharmacia Biotech, modelo EPS 3501 XL), até que o corante de frente atingisse a extremidade inferior do gel (aproximadamente 1h e 45 min).

Após a eletroforese, os géis foram lavados e transferidos para recipiente contendo a solução corante (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; 40% Metanol; 10% Ácido Acético) por 16h. Em seguida, ocorreu a lavagem com água destilada e submetidos à solução descorante (40% metanol e 20% Ácido acético), por aproximadamente 6 horas, até remoção do excesso de corante e visualização nítida das bandas proteicas. Os géis foram armazenados em água destilada para análise posterior.

4.5 Lise por sonicação

Após a análise das diferentes condições de expressão por SDS-PAGE, foi realizada uma avaliação qualitativa para seleção dos tratamentos de IPTG mais eficientes para indução da proteína em cada temperatura. A partir dessa avaliação, os pellets das amostras selecionadas, previamente congelados durante a etapa de cultivo e indução, foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl 160 mM pH 7,4; NaCl 4 M; imidazol 40 mM; lisozima 50 μ g/mL) e ajustados para um volume final de 20 mL em tubos Falcon.

Antes da sonicação, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram mantidas em banho de gelo e submetidas à lise mecânica em sonicador (Qsonica, modelo Q700) utilizando sonda ultrassônica (12,7 mm) com parâmetros de 10 pulsos de 8 segundos *on* e intervalos de 20 segundos *off*, sob amplitude de 70%.

Após a lise, 1 mL de cada lisado foi reservado em microtubos tipo Eppendorf, enquanto o volume remanescente no tubo Falcon foi armazenado a -20°C . Em seguida, as amostras reservadas foram centrifugadas e o sobrenadante e o pellet foram separados em microtubos distintos para posterior análise das frações solúvel e insolúvel por SDS-PAGE.

4.6 Análise eletroforética da fração solúvel e insolúvel

Para a análise das frações solúvel e insolúvel foram adicionados 20 μ L de tampão de amostra (5x) a 80 μ L da fração solúvel (sobrenadante) em um microtubo separado. Para a fração insolúvel, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água Milli-Q, e uma alíquota de 80 μ L foi transferida para microtubo, seguido da adição de 20 μ L de tampão de amostra 5x para aplicação em gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada conforme o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo 5% de gel de concentração e 12% de gel de separação, utilizando tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%). A corrida eletroforética foi conduzida sob condições de 250 V, 25 mA por gel e 10 W, até que o corante de frente (azul de bromofenol) atingisse a extremidade inferior do gel.

Ao término da corrida, o gel foi lavado com água destilada e corado com solução corante (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; 40% Metanol; 10% Ácido Acético) por aproximadamente 16 horas (*overnight*). Em seguida, foi novamente lavado e submetido à solução descorante por aproximadamente 6 horas, até a adequada visualização das bandas proteicas. As bandas obtidas foram analisadas quanto ao perfil de expressão da proteína recombinante, por comparação entre as frações solúvel e insolúvel após lise celular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do vetor de expressão e características da proteína de fusão

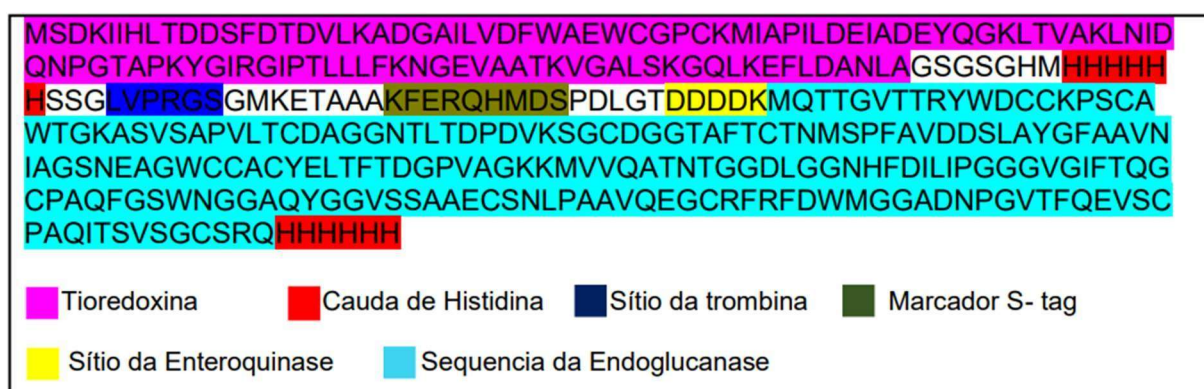
O vetor de expressão pET-32a foi escolhido devido às suas características estruturais adequadas à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O sistema é baseado no promotor T7, um promotor forte e altamente específico, reconhecido pela RNA polimerase T7, responsável por promover a transcrição eficiente do gene de interesse (DUBENDORF; STUDIER, 1991). A regulação da expressão ocorre por meio do sistema lac, no qual o operador lacO é controlado pela proteína repressora LacI, impedindo a expressão basal na ausência do indutor IPTG, que atua inativando esse repressor (DUBENDORF; STUDIER, 1991). Além disso, o vetor contém o gene de resistência à ampicilina (*bla*), utilizado como marcador de seleção bacteriana, permitindo o crescimento apenas das células transformadas.

O principal diferencial do pET-32a é a presença de uma estratégia de expressão por fusão proteica. O vetor contém a tioredoxina (Trx), utilizada como proteína de fusão para

aumentar a solubilidade da proteína recombinante e reduzir a formação de corpos de inclusão (LAVALLIE et al., 1993). Associada a essa fusão, encontra-se a cauda de histidina (His-tag), que permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA), facilitando as etapas de purificação *downstream* (HOCHULI, 1990).

Na construção utilizada, a endoglucanase EG45 está ligada às sequências peptídicas codificadas pelo próprio vetor (Figura 4). Essa organização estrutural confere à proteína recombinante características derivadas tanto da enzima de interesse quanto dos elementos do sistema de expressão. Como resultado, a proteína de fusão apresenta 369 aminoácidos, massa molecular teórica de 38,8 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,32 (SANTANA, 2025).

Figura 4 - Representação esquemática da construção da proteína recombinante EG45, destacando seus principais elementos estruturais.



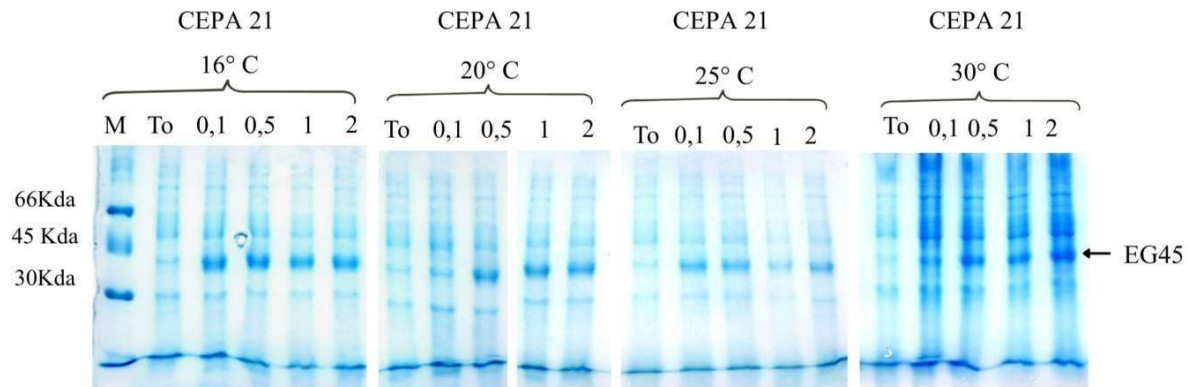
Fonte: Elaborado por Santana (2025).

5.2 Análise eletroforética de indução com IPTG

As análises eletroforéticas realizadas após a indução da expressão com IPTG (figuras 5, 6 e 7) permitiram avaliar a produção da proteína recombinante sob diferentes condições experimentais, incluindo temperatura de cultivo, concentração de IPTG, tempo de indução e cepa de expressão (*E. coli* BL21 Star(DE3), C41(DE3) e C43(DE3)).

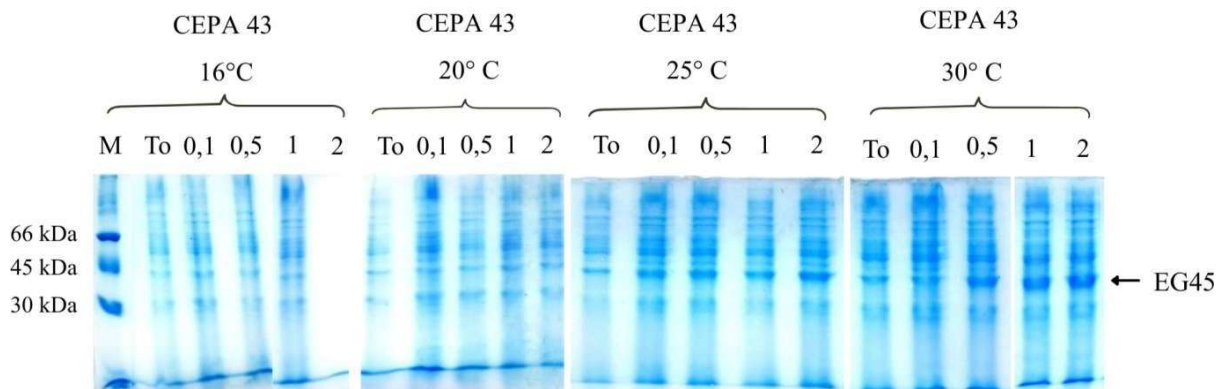
Figura 5 - Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em *E. coli* BL21 Star(DE3) (cepa 21). As amostras foram coletadas antes da indução (T0) e após o período de indução correspondente a cada temperatura. Foram avaliadas concentrações de IPTG de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM. M: marcador de massa molecular (kDa). A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante de fusão EG45, com massa

molecular aparente de aproximadamente 38 kDa.



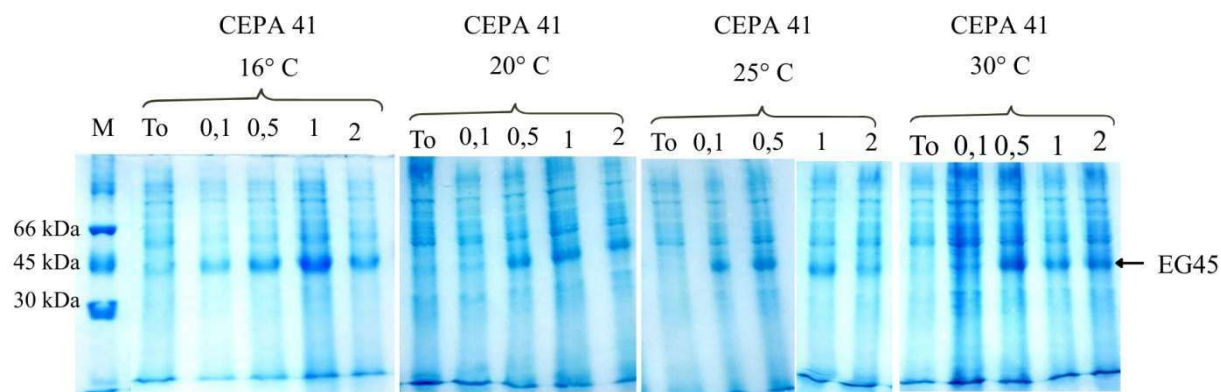
Fonte :Autor

Figura 6 - Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em *E. coli* C43(DE3) (cepa 43). As amostras foram coletadas antes da indução (T0) e após o período de indução correspondente a cada temperatura. Foram avaliadas concentrações de IPTG de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM. M: marcador de massa molecular (kDa). A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante de fusão EG45, com massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa.



Fonte: Autor

Figura 7 - Análise eletroforética (SDS-PAGE) da expressão da endoglucanase recombinante EG45 em *E. coli* C41(DE3) (cepa 41). As amostras foram coletadas antes da indução (T0) e após o período de indução correspondente a cada temperatura. Foram avaliadas concentrações de IPTG de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM. M: marcador de massa molecular (kDa). A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante de fusão EG45, com massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa.



Fonte: Autor

De modo geral, observou-se a presença de uma banda com massa molecular aparente compatível com a esperada para a proteína recombinante na maioria das condições avaliadas ao término da expressão. Além disso, essa banda pôde ser detectada em menor intensidade em diversas amostras coletadas no tempo zero (T0), antes da adição de IPTG, sugerindo a ocorrência de expressão basal (*leaky expression*) do sistema de expressão baseado no promotor T7. A exceção foi observada na cepa C41(DE3), cultivada a 25 e 30 °C, cujas amostras T0 não apresentaram a banda correspondente à proteína recombinante (Figura 7), comportamento compatível com o esperado para amostras não induzidas.

Considerando que a EG45 foi expressa em fusão com a tiorredoxina (TrxA), além das sequências His-tag e S-tag presentes no vetor pET-32a, a proteína recombinante possui massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa, compatível com a esperada para a proteína de fusão e superior à da enzima nativa, permitindo sua identificação no gel por comparação com o marcador de massa molecular.

Entre as diferentes cepas avaliadas, observaram-se variações na intensidade da banda correspondente à proteína recombinante, indicando diferenças na eficiência de expressão entre as condições testadas. A temperatura de cultivo foi um dos principais fatores associados a essas variações, uma vez que influencia diretamente a fisiologia celular, a velocidade de síntese proteica. Em função dessas diferenças, foram adotados tempos de indução distintos, sendo 16 horas para os cultivos realizados a 16 e 20 °C e 3 horas para aqueles conduzidos a 25 e 30 °C.

Comparando-se as diferentes cepas, observou-se que as concentrações de IPTG entre 0,5 e 2,0 mM proporcionaram os níveis mais expressivos de produção da proteína recombinante, com base na análise qualitativa da intensidade das bandas observadas nos géis. Entretanto, foram observadas variações pontuais entre as condições testadas. Como exemplo, na amostra cepa 21/25°C/1 mM (Figura 5), a banda correspondente à proteína recombinante

apresentou menor intensidade em comparação às demais concentrações avaliadas na mesma temperatura e nesse intervalo de concentração de IPTG na cepa.

Pode ser observado que a cepa C43(DE3) apresentou, de modo geral, menor intensidade da banda correspondente à proteína recombinante em comparação às demais cepas avaliadas. Entretanto, verificou-se um discreto aumento na intensidade da banda com a elevação da temperatura de cultivo, sendo esse efeito mais evidente a 25 e 30 °C, o que pode estar relacionado ao aumento da atividade metabólica e da taxa de síntese proteica nessas condições para essa cepa. Ressalta-se que a ausência da amostra cepa 43/16°C/2 mM está relacionada à perda da amostra durante a execução do experimento.

Em ambas as cepas 21 e 41, as concentrações de IPTG das amostras entre 0,5 e 2,0 mM tenderam a produzir bandas de maior intensidade, independentemente da temperatura de cultivo, embora tenham sido observadas pequenas variações entre as concentrações do indutor, por exemplo: a amostra 41/16°C/1 mM apresentou uma intensidade maior do que em outras concentrações de IPTG (Figura 7).

Além disso, observou-se que, a partir de 0,5 mM de IPTG, o aumento da concentração do indutor não promoveu uma diferença visual expressiva na intensidade da banda correspondente à EG45 em nenhuma das cepas 21 e 41. Em especial, as concentrações de 1,0 e 2,0 mM apresentaram perfis eletroforéticos bastante semelhantes, sugerindo que concentrações superiores a 0,5 mM não resultaram em aumento aparente da expressão da proteína recombinante.

A comparação entre as cepas pode ser realizada considerando suas características genéticas e fisiológicas, as quais influenciam diretamente a dinâmica da expressão heteróloga. Essas diferenças incluem alterações relacionadas à estabilidade do mRNA, ao controle da expressão mediada pela RNA polimerase T7 e à tolerância ao estresse decorrente da superexpressão de proteínas recombinantes.

Especificamente, a cepa BL21 Star(DE3) é recomendada para a expressão de proteínas não tóxicas, apresentando alta expressão devido à elevada produção da RNA polimerase T7. Isso faz com que o gene da proteína seja transcrito em grande velocidade, resultando em um acúmulo de massa proteica mesmo sob concentrações menores de IPTG (INVITROGEN, 2010). Além disso, essa cepa possui uma mutação no gene *rne*, responsável pela codificação da RNase E, o que aumenta a estabilidade do mRNA e pode favorecer a expressão de proteínas recombinantes.

Esse comportamento explica o resultado observado no gel da Cepa 21 (Figura 4) a 16 °C, onde, mesmo sob um metabolismo mais lento pela menor temperatura, a banda

correspondente à EG45 aparece de forma nítida e com intensidade marcante em todas as concentrações de IPTG avaliadas.

Em relação às cepas C41 (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/cmc0017>) e C43 (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/cmc0019>), derivadas da cepa BL21(DE3) assim como a BL21 Star, seu uso é direcionado principalmente à expressão de genes tóxicos ou proteínas de membrana. Diferentemente da cepa parental, essas linhagens apresentam mutações adaptativas que reduzem a atividade basal da RNA polimerase T7, cuja expressão é controlada pelo promotor lacUV5, permitindo uma expressão mais estável e menos tóxica de proteínas recombinantes. Isso favorece o correto enovelamento e o acúmulo da proteína de interesse, minimizando o estresse celular e a sobrecarga da maquinaria de expressão.

Dessa forma, a menor intensidade das bandas observadas para a cepa C43 pode estar relacionada ao perfil de expressão mais moderado característico dessa linhagem. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que bandas mais intensas foram observadas apenas em temperaturas de cultivo mais elevadas (25 e 30 °C) (Figura 6), condições que podem aumentar a taxa de síntese proteica e, conseqüentemente, a quantidade de proteína acumulada.

De acordo com Dumon-Seignovert, Cariot e Vuillard (2004), as cepas mutantes C41(DE3) e C43(DE3) apresentaram maior estabilidade que a cepa parental BL21(DE3) durante a expressão de proteínas heterólogas potencialmente tóxicas. Além disso, a cepa C41(DE3) tem sido associada a uma expressão mais eficiente e ao melhor enovelamento de proteínas recombinantes. Esse comportamento foi observado por Chen et al. (2012), que relataram menores níveis de *misfolding* para uma xilanase expressa em C41(DE3) quando comparada à BL21(DE3).

De acordo com Webb e Lithgow (2020), análises transcriptômicas demonstraram que, após a indução com IPTG, as cepas C41(DE3) e C43(DE3) ativam de forma mais intensa múltiplas vias metabólicas e operons relacionados à produção proteica quando comparadas à cepa parental BL21(DE3). Entre as alterações observadas, destaca-se o aumento da expressão de genes que codificam chaperonas moleculares e proteases, proteínas associadas ao enovelamento, controle de qualidade e degradação de proteínas mal dobradas.

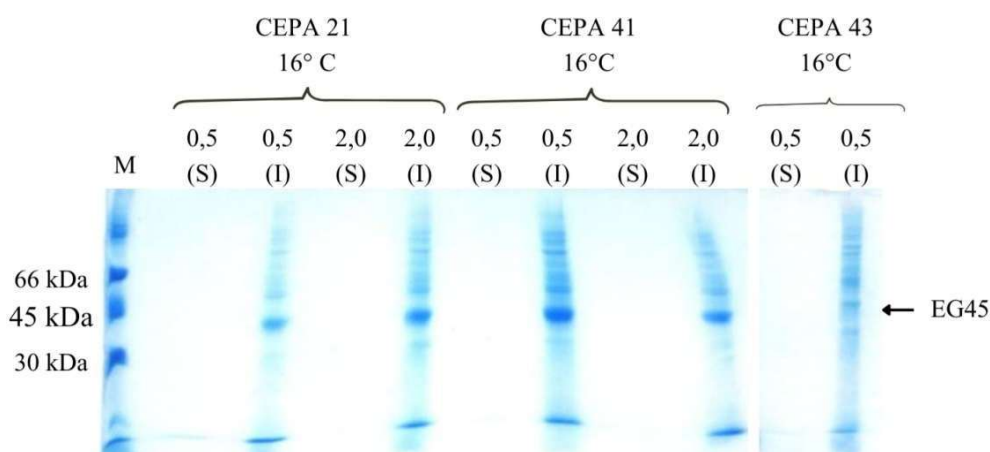
Tendo em vista esses resultados, foram selecionadas para análise de solubilidade as amostras induzidas com 0,5 mM e 2,0 mM de IPTG, cultivadas nas temperaturas de 16 °C e 30°C, a fim de comparar o comportamento da solubilidade proteica sob as menores e as maiores concentrações de indutor (excluindo a 0,1 mM) e de temperatura utilizadas. Essas

amostras foram submetidas à lise por sonicação e posterior avaliação da solubilidade da proteína recombinante em SDS-PAGE.

5.3 Avaliação da solubilidade da enzima por eletroforese.

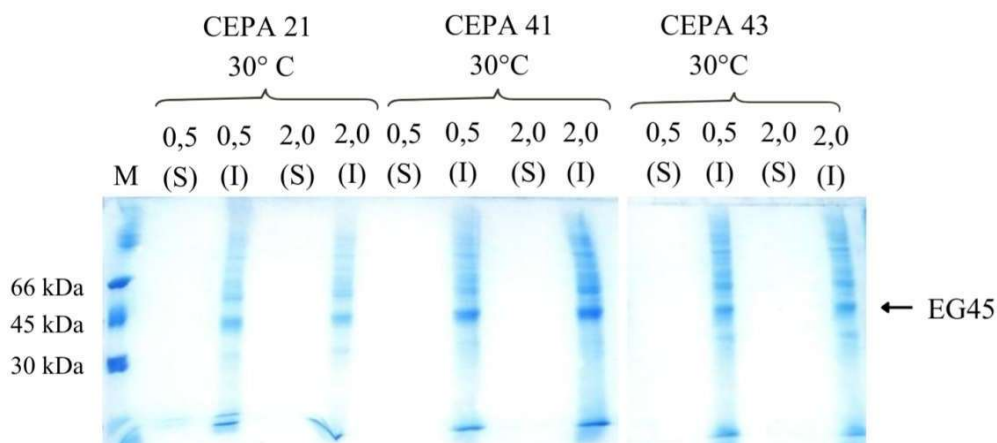
Por meio da eletroforese e da análise das frações solúvel e insolúvel das amostras testadas, observou-se que, em todas as condições avaliadas, a fração insolúvel apresentou maior intensidade de bandas em comparação à fração solúvel, independentemente da concentração de IPTG ou da temperatura de cultivo (Figuras 8 e 9). Esse resultado sugere que a expressão da enzima EG45 está predominantemente direcionada à formação de corpos de inclusão, com ausência de proteína na fração solúvel (possivelmente pela alta diluição que precisou ser ajustada para o método de sonicação disponível).

Figura 8 - Análise da solubilidade da proteína recombinante EG45 em diferentes cepas de *E. coli* (cepas 21, 41 e 43), cultivadas a 16 °C e induzidas com 0,5 mM e 2,0 mM de IPTG em eletroforese (SDS-PAGE). As frações solúvel (S) e insolúvel (I) foram avaliadas por SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular (kDa). A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante de fusão EG45, com massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa.



Fonte: Autor

Figura 9 - Análise da solubilidade da proteína recombinante EG45 em diferentes cepas de *E. coli* (cepas 21, 41 e 43), cultivadas a 30 °C e induzidas com 0,5 mM e 2,0 mM de IPTG. As frações solúvel (S) e insolúvel (I) foram avaliadas por SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular (kDa). A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante de fusão EG45, com massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa.



Fonte: Autor

A redução da temperatura de cultivo para 16 °C está associada à diminuição do crescimento celular e à desaceleração dos processos de transcrição e tradução, o que leva a uma menor taxa de síntese proteica. Esse efeito pode favorecer o enovelamento correto de proteínas recombinantes, por oferecer mais tempo para o *folding*, aumentando a chance de solubilidade. No entanto, nas condições avaliadas, essa redução de temperatura não foi suficiente para promover a solubilização da proteína (Figura 8).

Da mesma forma, o aumento da concentração de IPTG, geralmente relacionado ao maior nível de expressão proteica, pode ter intensificado o estresse celular e favorecido a formação de agregados insolúveis. Nesse contexto, mesmo as amostras induzidas com 0,5 mM de IPTG apresentaram perfil predominantemente insolúvel em ambas as temperaturas (Figura 8 e 9).

Apesar de o vetor pET-32a fundir a EG45 à tioredoxina (TrxA), a proteína permaneceu na fração insolúvel. O uso dessa estratégia se justifica porque a EG45 possui 10 cisteínas em sua sequência, capazes de formar até 5 pontes de dissulfeto. A tioredoxina deveria ajudar no enovelamento correto dessas ligações para evitar erros. Porém, a alta quantidade de proteína produzida pelo sistema pET pode ter superado a capacidade da tag de mantê-la solúvel, o que justificaria a provável formação de corpos de inclusão.

Observou-se também que, entre as cepas avaliadas, as cepas C21 e C43 apresentaram menor intensidade de banda na fração insolúvel. Embora esse resultado possa indicar menor acúmulo da proteína na forma insolúvel, também levanta a hipótese de que parte da enzima tenha permanecido na fração solúvel, sem ser detectada no SDS-PAGE em razão da diluição das amostras durante a lise celular.

6 CONCLUSÃO

Com a execução deste trabalho, foi possível expressar de forma robusta em *E. coli* a endoglucanase recombinante de *M. perniciosus* (EG45). A análise por eletroforese (SDS-PAGE) confirmou a expressão na maioria das condições testadas.

Em relação à concentração do indutor, o intervalo de 0,5 mM a 2,0 mM de IPTG resultou nas bandas de maior intensidade. Contudo, a concentração de 0,5 mM é definida como a ideal para os ensaios subsequentes, visto que uma menor dosagem atenua a velocidade de tradução e evita a sobrecarga do sistema T7, atuando como uma estratégia recomendada para tentar mitigar a formação de agregados insolúveis.

Quanto à seleção do hospedeiro, observou-se um comportamento distinto entre as linhagens avaliadas. As cepas BL21 Star (DE3) e C43 (DE3) apresentaram menor acúmulo de proteína na fração insolúvel, o que pode estar relacionado à presença de uma fração solúvel, embora não detectada nas condições de análise devido ao estado de diluição da amostra. Em contrapartida, as cepas C41 (DE3) e BL21 Star (DE3) apresentaram os maiores níveis de expressão da proteína recombinante.

Apesar de o produto ter sido obtido predominantemente na forma insolúvel nesta etapa, a cepa C41 (DE3) é recomendada para o direcionamento do bioprocessamento e para futuros experimentos por combinar elevado nível de expressão com características fisiológicas que favorecem uma produção mais estável, associadas ao controle da atividade da RNA polimerase T7.

Considerando também os efeitos da temperatura sobre a expressão, conclui-se que a faixa entre 25 °C e 30 °C é a mais adequada para o processo, com destaque para 25 °C, por representar um equilíbrio entre rendimento de expressão e viabilidade operacional, além de constituir uma condição mais favorável para futuras etapas de escalonamento.

Como perspectiva para trabalhos futuros, recomenda-se aumentar a escala do cultivo celular para melhor adaptação à etapa de lise por sonicação, bem como a utilização da coloração por nitrato de prata no SDS-PAGE, visando avaliar de forma mais precisa a distribuição da proteína entre as frações solúvel e insolúvel. Essas adequações podem minimizar os efeitos da diluição do lisado decorrentes das limitações da sonda disponível no equipamento utilizado e contribuir para a validação da premissa de solubilidade levantada neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALI, Imran *et al.* Sustainable Endoglucanase Production from Lignocellulosic Waste Through Fungal Co-Culture Technology: A Step Towards Circular Economy. **Biology**, v. 15, n. 5, p. 399, jan. 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology15050399>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/15/5/399> . Acesso em: 16 mar.2026.
- ALMEIDA, Larissa Emanuelle da Silva; RIBEIRO, Geise Camila Araújo; APARECIDA DE ASSIS, Sandra. β -Glucosidase produced by *Moniliophthora perniciosa*: Characterization and application in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 963–973, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.2167> . Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bab.2167> . Acesso: 29 jun.2026.
- ASTUDILLO, Álvaro *et al.* Advances in Agroindustrial Waste as a Substrate for Obtaining Eco-Friendly Microbial Products. **Sustainability**, v. 15, n. 4, p. 3467, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/su15043467>. Disponível em : <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/4/3467> . Acesso em :16 mar.2026.
- ATROSHENKO, Denis L. *et al.* Additivities for Soluble Recombinant Protein Expression in Cytoplasm of *Escherichia coli*. **Fermentation**, v. 10, n. 3, p. 120, mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10030120>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/10/3/120> . Acesso em: 2 mai.2026.
- BELLAOUCHI, Reda *et al.* Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 50, 1 dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X23007321> . Acesso em: 1 jun. 2026.
- BHATWA, Arshpreet *et al.* Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 10 fev. 2021. DOI: [10.3389/fbioe.2021.630551](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551) . Disponível em : <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2021.630551/full> . Acesso em 1 jun. 2026.
- BORGES, Arthur Massaro; MARTINS, Caio Cesar dos Santos; BASSO, Micheli Cristiani Aiello. Gestão sustentável e reutilização de resíduos agroindustriais: uma abordagem sob a perspectiva da economia circular e da administração do agronegócio. **Aracê**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. e9576, 2025. DOI: <https://doi.org/10.56238/arev7n11-016> . Disponível em: <https://periodicos.newsciencepubl.com/arace/article/view/9576>. Acesso em: 16 mar. 2026.
- CASTILLO-CORUJO, Angel *et al.* *Escherichia coli* Cytoplasmic Expression of Disulfide-Bonded Proteins: Side-by-Side Comparison between Two Competing Strategies. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 1126–1134, 28 maio 2024. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.2311.11025>. Disponível em: <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.2311.11025> . Acesso em :1

jun.2026.

CHEN, Mengke *et al.* Microbial Degradation of Lignocellulose for Sustainable Biomass Utilization and Future Research Perspectives. **Sustainability**, v. 17, n. 9, p. 4223, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/su17094223>. Disponível em : <https://www.mdpi.com/2071-1050/17/9/4223> .Acesso em: 1 jun.2026.

CHEN, Y. -P. *et al.* Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on Escherichia coli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 455–463, 1 mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05232.x> .Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/112/3/455/6715995?login=true> . Acesso: 24 jun.2026.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, Brasília, DF, v. 14, n.1, abr 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cana-de-acucar/arquivos-boletins/1o-levantamento-safra-2026-27/1o-levantamento-safra-2026-27> . Acesso em: 16 mar. 2026.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília**, DF, v.13, n. 1, primeiro levantamento, fevereiro 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cafe/1o-levantamento-de-cafe-safra-2026/1o-levantamento-de-cafe-safra-2026> . Acesso em: 16 mar. 2026.

CORDEIRO, Noéle Khristinne *et al.* Gestão de resíduos agrícolas como forma de redução dos impactos ambientais. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 14, n. 2, p. 23–34, 24 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.18316/rca.v14i2.5593> . Disponível em: <https://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/5593> . Acesso em: 16 mar. 2026.

DATTA, Rahul. Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. **Heliyon**, v. 10, n. 1, p. e24022, 3 jan. 2024. DOI: [10.1016/j.heliyon.2024.e24022](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022) . Disponível em : <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10792583/> . Acesso em : 20 mar.2026.

DUBENDORF, John W.; STUDIER, F. William. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, n. 1, p. 45–59, 5 maio 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2) . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1902522/> . Acesso em: 23 jun. 2026.

DUMON-SEIGNOVERT, Laurence; CARIOT, Guillaume; VUILLARD, Laurent. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 1, p. 203–206, 1 set. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592804001779> . Acesso em:24 jun.2026.

GAETE, Analyse Villanueva; TEODORO, Carlos Eduardo de Souza; MARTINAZZO, Ana Paula. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e567985785, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5785> . Disponível em:
<https://rsdjournal.org/rsd/article/view/5785>. Acesso em: 16 mar. 2026.

GIBISCH, Martin *et al.* A production platform for disulfide-bonded peptides in the periplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 166, 5 jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02446-6> . Disponível em :
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-024-02446-6> . Acesso em: 1 jun.2026.

GOMES, Amitha Reena; BYREGOWDA, Sonnahallipura Munivenkatappa; VEEREGOWDA, Belamarahalli Muniveerappa; BALAMURUGAN, Vinayagamurthy. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 346–356, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>. Disponível em :
https://researcherslinks.com/table_contents_detail/Advances-in-Animal-and-Veterinary-Sciences/33/695/html. Acesso em : 1 jun.2026.

HEMAMALINI, N.; EZHILMATHI, S.; MERCY ANGELA, A. Recombinant protein expression optimization in *Escherichia coli*: a review. **Indian Journal of Animal Research**, v. 54, n. 6, p. 653–660, 2019. DOI: <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-3808>. Disponível em:
<https://arccjournals.com/journal/indian-journal-of-animal-research/B-3808>. Acesso em: 2 jun. 2026.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. Pt 3, p. 781–788, 1 ago. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2930781>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1134435/> . Acesso em:19 jun.2026.

HENRISSAT, Bernard; DAVIES, Gideon. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637–644, 1 out. 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X97800723> . Acesso em: 16 jun. 2026.

HOCHULI, Erich. Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Adsorbent. In: SETLOW, Jane K. (org.). **Genetic Engineering: Principles and Methods**. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 87–98. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0641-2_6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1366709/>. Acesso em: 23 jun. 2026.

HSIN, Kuan-Ting *et al.* Lignocellulose degradation in bacteria and fungi: cellulosomes and industrial relevance. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 25 abr. 2025. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1583746. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40351319/> . Acesso em:2 jun. 2026.

HUANG, Jiaqi; WANG, Jianfei; LIU, Shijie. Advances in the production of fungi-derived lignocellulolytic enzymes using agricultural wastes. **Mycology**, v. 15, n. 4, p. 523–537, 1 out. 2024. DOI: 10.1080/21501203.2023.2253827. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11636153/> . Acesso em:2 jun.2026.

HULEANI, Sergiu *et al.* *Escherichia coli* as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n.

5, p. 756–773, 4 jul. 2022. DOI: [10.1080/07388551.2021.1967871](https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1967871). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34470557/> . Acesso em: 4 jun.2026.

HUSSAIN, Muhammad Hammad *et al.* From Waste to Wealth: Unlocking the Potential of Cellulase Characteristics for Food Processing Waste Management. **Foods**, v. 14, n. 21, p. 3639, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14213639>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/21/3639>. Acesso em: 16 mar.2026.

ILIĆ, Nevena *et al.* Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production. **Energies**, v. 16, n. 8, p. 3598, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/en16083598>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1073/16/8/3598> .Acesso em: 16 mar. 2026.

INVITROGEN. **One Shot® BL21(DE3), One Shot® BL21(DE3)pLysS, One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells**: manual técnico. Rev. Date: 2 June 2010. Manual part no. 28-0182. MAN0000662. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C602003> Acesso em: 24 jun. 2026.

KADOGUCHI, Elen Ayumi *et al.* Optimization of Cellulase Production from Agri-Industrial Residues by *Aspergillus terreus* NIH2624. **Processes**, v. 12, n. 10, p. 2169, out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102169>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/12/10/2169> . Acesso em: 5 jun. 2026.

KAMANDE, Stephen M.; OMWENGA, George I.; NGUGI, Mathew P. Production of cellulases by *Xylaria* sp. and *Nemania* sp. using lignocellulose substrates for bioethanol production from maize cobs. **Heliyon**, v. 10, n. 17, 15 set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36802>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024128332> . Acesso em : 16 mar. 2026.

KAMOSHIDA, Go *et al.* Development of a novel bacterial production system for recombinant bioactive proteins completely free from endotoxin contamination. **PNAS Nexus**, v. 3, n. 8, p. pgae328, 1 ago. 2024. DOI: [10.1093/pnasnexus/pgae328](https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae328). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11331542/> . Acesso em:2 jun. 2026.

KLEINER-GROTE, Gabriele R. M.; RISSE, Joe M.; FRIEHS, Karl. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 8, p. 532–550, 2018. DOI: [10.1002/elsc.201700200](https://doi.org/10.1002/elsc.201700200). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6999260/> . Acesso em: 5 jun. 2026.

KORSA, Gamachis *et al.* Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 13, 10 abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13213-023-01715-w> . Acesso em: 16 mar. 2026.

LAMBERTZ, Camilla *et al.* Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 135, 18 out.2014. DOI: [10.1186/s13068-014-0135-5](https://doi.org/10.1186/s13068-014-0135-5). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4212100/> . Acesso em:5 jun. 2026.

LAVALLIE, E. R. *et al.* A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents

inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Bio/Technology**, v. 11, n. 2, p. 187–193, fev. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0293-187> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7763371/> . Acesso em: 23 jun.2026.

LI, Cheng-Xi *et al.* Weighted Gene Co-expression Network Analysis Identifies Critical Genes for the Production of Cellulase and Xylanase in *Penicillium oxalicum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 27 mar. 2020. DOI: [10.3389/fmicb.2020.00520](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00520). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7118919/> . Acesso em: 4 jun. 2026.

LI, Zhongye *et al.* Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass. **Engineering Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 100139, 1 jun. 2024. DOI: [10.1016/j.engmic.2024.100139](https://doi.org/10.1016/j.engmic.2024.100139). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39629327/>. Acesso em: 5 jun. 2026.

LIMA, Edvânia de Holanda *et al.* Resíduos agroalimentares: uma revisão sobre impactos e estratégias de minimização. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 14, n. 4, p. 360–376, 2025. DOI: <https://doi.org/10.31668/tmmara27>. Disponível em: <https://revista.ueg.br/index.php/sapiencia/article/view/17458>. Acesso em: 16 mar. 2026.

MAFA, Mpho S.; PLETSCHE, Brett I.; MALGAS, Samkelo. Defining the Frontiers of Synergism between Cellulolytic Enzymes for Improved Hydrolysis of Lignocellulosic Feedstocks. **Catalysts**, v. 11, n. 11, p. 1343, nov. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/11/1343>. Acesso em: 16 mar. 2026.

MAKSUM, Iman *et al.* An Overview of Culture Conditions for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 10, n. 1, mar. 2023. DOI: [10.30491/jabr.2022.349844.1547](https://doi.org/10.30491/jabr.2022.349844.1547). Disponível em: https://www.biotechrep.ir/article_170140.html . Acesso em: 1 jun. 2026.

MARTÍNEZ-OLIVARES, José Agustín; COCA-RUIZ, Victor. Synergies in Green Bioprocessing: A Comprehensive Review of Heterologous Protein Expression and the Transformative Potential of Natural Deep Eutectic Solvents. **Applied Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 113, dez. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5040113>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8007/5/4/113> . Acesso em: 1 jun. 2026.

MOHITE, Dr Amar *et al.* Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*: Optimization Strategies. **Vascular and Endovascular Review**, v. 9, n. 1, p. 15–30, 11 nov. 2025. Disponível em: <https://verjournal.com/index.php/ver/article/view/647>. Acesso em: 1 jun. 2026.

NABIEL, Ahmad *et al.* Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 2022. DOI: [10.7324/JABB.2023.112204](https://doi.org/10.7324/JABB.2023.112204). Disponível em: https://www.jabonline.in/abstract.php?article_id=937&sts=2 . Acesso em: 1 jun. 2026.

NAZIR, Madiha *et al.* Approaches for Producing Fungal Cellulases Through Submerged Fermentation. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 16, n. 1, 31 jan. 2024. DOI: [10.31083/j.fbe1601005](https://doi.org/10.31083/j.fbe1601005). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38538521/> . Acesso em: 23 mai. 2026.

PADILHA, Eduardo Oliveira et al. Consequências da degradação da qualidade do ar no surgimento e agravamento de doenças respiratórias. **Research, Society and Development**, v. 15, n. 1, e2115148587, 11 jan. 2026. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v15i1.48587>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/48587>. Acesso em: 16 mar. 2026.

PAREMSKAIA, A. I. *et al.* Codon-optimization in gene therapy: promises, prospects and challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1371596, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1371596> . Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2024.1371596/full>. Acesso em: 20 mai. 2026.

PÉREZ-CONTRERAS, Serafin *et al.* Production of Ligninolytic and Cellulolytic Fungal Enzymes for Agro-Industrial Waste Valorization: Trends and Applicability. **Catalysts**, v. 15, n. 1, p. 30, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal15010030> . Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/15/1/30>. Acesso em: 1 jun. 2026.

REN, Fengyun *et al.* Fungal systems for lignocellulose deconstruction: From enzymatic mechanisms to hydrolysis optimization. **GCB Bioenergy**, v. 16, n. 5, p. e13130, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcbb.13130>. Disponível em : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcbb.13130> . Acesso em : 16 mar.2026.

RODARTE, Mirian et al. Avanços na biotecnologia de enzimas hidrolíticas industriais: biodigestão anaeróbia como fonte de microrganismos produtores – um estudo de revisão. **Revista Científica Da Faminas**, v. 19, n. 2, p. 929, 2025. Disponível em: <https://periodicos.faminas.edu.br/index.php/RCFaminas/article/view/929>. Acesso em: 16 mar. 2026.

ROTH, Mitchell G.; WESTRICK, Nathaniel M.; BALDWIN, Thomas T. Fungal biotechnology: From yesterday to tomorrow. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 4, 27 mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1135263>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10512358/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

SALAZAR-CEREZO, Sonia; DE VRIES, Ronald P.; GARRIGUES, Sandra. Strategies for the Development of Industrial Fungal Producing Strains. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 8, p. 834, ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof9080834>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/8/834> . Acesso em: 1 jun.2026.

SANDOMENICO, Annamaria; SIVACCUMAR, Jwala P.; RUVO, Menotti. Evolution of *Escherichia coli* Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6324, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6324> . Acesso em: 1 jun.2026.

SANTANA, Cleidinea Souza de *et al.* Molecular and structural characterization of cDNA from a cellulase of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora. **Seven Editora**, 7 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.56238/uniknowindevolp-144> . Disponível em: <https://sevenpubl.com.br/index.php/editora/article/view/2815> . Acesso em: 29 jun.2026.

SANTANA, Cleidinea Souza de. **Produção e caracterização bioquímica de uma**

endoglucanase recombinante de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) Aime & Phillips-Mora a partir de células de *Escherichia coli*. 2025. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2025. Disponível em: <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/1901> . Acesso em: 19 jun. 2026.

SANTIAGO, Bárbara Luiza Silva; RODRIGUES, Fábio de Ávila. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: uma revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa/MG, BR, v. 3, n. 7, p. 1011–1022, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18540/jcecvl3iss7pp1011-1022>. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/2336> . Acesso em: 16 mar. 2026.

SANTOS, J. R.; RAMBO, M. K.; SCAPIN, E. Recent advances in xylitol production in biorefineries from lignocellulosic biomass: a review study. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, Rio de Janeiro, v. 59, p. e1814, 2024. DOI: <https://doi.org/10.5327/Z2176-94781814>. Disponível em: https://www.rbciamb.com.br/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/1814 . Acesso em: 15 mar. 2026.

SHAFIEE, Fatemeh; SHARIFI, Shima; AMINI, Armin. Intein Based Fusion Proteins: Great Tags for the Soluble Production and Convenient Purification of Recombinant Proteins. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. e3728, 1 abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.30498/ijb.2024.400460.3728>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39220337/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

SISTA KAMESHWAR, Ayyappa Kumar; QIN, Wensheng. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 93–105, 3 abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6059041/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

SMOLSKAYA, Sviatlana; LOGASHINA, Yulia A.; ANDREEV, Yaroslav A. *Escherichia coli* Extract-Based Cell-Free Expression System as an Alternative for Difficult-to-Obtain Protein Biosynthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 928, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21030928>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32023820/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

SOHAIL, Muhammad *et al.* Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes from Yeasts: Properties and Industrial Applications. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3783, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27123783>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/12/3783> . Acesso em: 06 jun. 2026.

SOUSA FILHO, Hélio R. *et al.* History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. **Plant Pathology**, v. 70, n. 9, p. 1971–1978, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13457>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13457> . Acesso em: 1 jun. 2026.

SRIVASTAVA, Neha *et al.* Recent advances on lignocellulosic bioresources and their valorization in biofuels production: Challenges and viability assessment. **Environmental Technology & Innovation**, v. 29, p. 103037, 1 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103037>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186423000330> . Acesso em: 16 mar.

2026.

TOH, Wai Keat *et al.* Development of constitutive and IPTG-inducible integron promoter-based expression systems for *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. **3 Biotech**, v. 13, n. 3, p. 91, 20 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03507-0> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36825259/> . Acesso em: 1 jun.2026.

VALENTE, Maria Teresa; INFANTINO, Alessandro; ARAGONA, Maria. Molecular and functional characterization of an endoglucanase in the phytopathogenic fungus *Pyrenochaeta lycopersici*. **Current Genetics**, v. 57, n. 4, p. 241–251, 1 ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0343-5> . Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00294-011-0343-5#citeas> . Acesso em: 16 jun. 2026.

VITOR, Alison Borges *et al.* Cloning, heterologous expression and characterization of β -glucosidase deriving from *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime and Phillips Mora. **3 Biotech**, v. 14, n. 11, p. 287, nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04128-x> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39493291/> . Acesso em: 29 jun. 2026.

WANG, H.; JONES, R. W. Site-directed mutagenesis of a fungal β -1,4-endoglucanase increases the minimum size required for the substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 225–231, 1 ago. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530051042> . Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051042#citeas> . Acesso em: 16 jun.2026.

WATTS, Anshul *et al.* Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. **Meta Gene**, v. 29, p. 100899, 1 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2021.100899>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214540021000505?via%3Dihub>. Acesso em: 1 jun. 2026.

WEBB, Chaille Teresa; LITHGOW, Trevor. Deciphering the transcriptional changes in *Escherichia coli* strains C41(DE3) and C43(DE3) that makes them a superior choice for membrane protein production. **Research Square**, v. 3, 2020. Preprint. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-38023/v3>. Acesso em: 24 jun. 2026.

WU, Wenjuan *et al.* The Role of Lignin Structure on Cellulase Adsorption and Enzymatic Hydrolysis. **Biomass**, v. 3, n. 1, p. 96–107, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomass3010007> . Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8783/3/1/7> . Acesso em: 29 jun.2026.

YAO, Guangshan *et al.* Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 78, 31 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0491-4> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27034716/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

YESILIRMAK, Filiz; SAYERS, Zehra. Heterologous Expression of Plant Genes. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, n. 1, p. 296482, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1155/2009/296482>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19672459/> . Acesso em: 1 jun. 2026.

YILDIRIM, Zehra; ÇELİK, Eda. Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 319–324, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.5008>. Disponível em: <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.5008>. Acesso em: 16 jun. 2026.