

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

GABRIELA SOUZA ALVES

**Expressão homóloga de acetilxilano esterase de *Aspergillus nidulans*: purificação,
imobilização e propriedades funcionais**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

GABRIELA SOUZA ALVES

**Expressão homóloga de acetilxilano esterase de *Aspergillus nidulans*:
purificação, imobilização e propriedades funcionais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de
Concentração: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Coorientador: Dr. Robson Carlos Alnoch

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

Alves, Gabriela Souza

Expressão homóloga de acetilxilano esterase de *Aspergillus nidulans*: purificação, imobilização e propriedades funcionais. Ribeirão Preto, 2023.

119p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes

Coorientador: Alnoch, Robson Carlos

1. Expressão homóloga. 2. Acetilxilano esterase. 3. Sinergismo.
4. Xilooligossacarídeos. 5. Imobilização. 6. Nanopartícula de ferro magnética.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

- 1) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES- (Código Financeiro 001), Demanda Social.
- 2) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- 3) Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência -FAEPA- FMRP/USP.
- 4) Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.
- 5) Departamento de Bioquímica e Imunologia – FMRP/USP.

AGRADECIMENTOS

À Deus que a todo o momento me proporciona forças, sabedoria, proteção, inteligência e conhecimento para enfrentar todos os desafios que aparecem em meu caminho, bem como, todas as vitórias que ocorre em minha vida! Toda honra e toda glória a Ele.

Aos meus pais, Miguel e Vilma por ter me dado todo o suporte e ensinamentos necessários para a vida, por ter me mostrado desde pequena que o caminho da educação é o melhor caminho, e que me proporcionaram o início de uma paixão que era estudar e mesmo diante das dificuldades, sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, se não fosse por vocês talvez eu não teria chegado aonde cheguei. Agradeço também aos meus irmãos Estefani e Miguel por todo o companheirismo.

Ao meu namorado Pedro, por todos os momentos que me ouviu desabafar, diante das dificuldades e as conquistas! Pelo enorme apoio em todas as minhas decisões, mesmo longe foi presente, por todo o amor e carinho. Muito obrigada por me permitir fazer parte da sua família. Agradeço ao Fernando, Simone, Ana Júlia e Ana Luiza cujo apoio foi essencial e fez toda a diferença durante esta fase.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, por ter acreditado no meu trabalho e fornecido a orientação essencial ao longo deste mestrado. Agradeço sinceramente pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade concedida, pela paciência e por ter contribuído significativamente para o meu crescimento e desenvolvimento profissional.

Aos meu coorientador Dr. Robson Carlos Alnoch, por toda a dedicação e paciência na minha orientação, pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste projeto. Sua experiência e visão foram importantes para o sucesso deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial Guilherme, Luiz, Diandra, Gabriela, Camila, Larissa, Luis, Malu, Douglas e Murilo, que me apoiaram durante todo o processo e estiveram presentes de diversas formas, cada um à sua maneira. Agradeço por cada risada compartilhada, por cada abraço reconfortante e por cada gesto gentil que demonstraram.

Aos meus colegas de laboratório e aos técnicos Mariana e Maurício que auxiliaram na realização dos meus experimentos.

Aos professores Beatriz Eleutério Goi, Valdemiro P. C. Júnior e Ana Flora Dalberto Vasconcelos pelo acolhimento, apoio, paciência, amizade, conversas e conselhos proporcionados desde a graduação até hoje.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomenon, which impress him like a fairy tale.”

MARIE CURIE

RESUMO

ALVES, Gabriela Souza. **Expressão homóloga de acetilxilano esterase de *Aspergillus nidulans*: purificação, imobilização e propriedades funcionais**. 2023. 119 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

As acetilxilano esterases (EC 3.1.1.72) são enzimas acessórias que catalisam ligações ésteres dos grupos acetil presentes na estrutura do xilano acetilado e são classificadas na família dos carboidratos esterases (CEs). O presente trabalho teve como objetivo geral a expressão homóloga, produção, purificação, propriedades funcionais e imobilização da acetilxilano esterase de *Aspergillus nidulans* (AxeAN). Inicialmente, o vetor pEXPYR foi utilizado para codificar o gene da acetilxilano esterase de *A. nidulans* (AxeAN), seguido da transformação em *A. nidulans* A773. Esse sistema de expressão permite a secreção de alta produção de proteínas. Na primeira parte deste trabalho, foi produzido a AxeAN recombinante, o extrato foi concentrado e purificado em uma coluna de troca aniônica (Hiprep Q FF 16/10), seguida por uma coluna de exclusão por tamanho (Superdex 75 10/300 GL). A AxeAN purificada foi evidenciada por SDS-PAGE, no qual foi observada a massa molecular de 33,5 kDa. A análise de sequência, modelagem molecular da AxeAN e a análise filogenética revelaram a presença da tríade catalítica (Ser¹²⁸, His²⁷⁰ e Asp²¹³) e a presença de 10 folhas β e 10 α -hélices, perfil característico de proteínas pertencentes à família α/β hidrolase. O dicróismo circular confirmou as análises anteriores, demonstrando que a estrutura da AxeAN é composta por α -hélices e folhas β . A AxeAN purificada apresentou atividade específica de 170 U mg⁻¹ determinada para o substrato *p*-nitrofenil acetato (*p*NPA). O efeito do pH e da temperatura foi avaliado, e a enzima demonstrou atividade máxima em pH 7,0 e a 55 °C. A AxeAN apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH (5,5–9,0), mantendo em média 80% de sua atividade inicial após 24 horas de incubação. Além disso, a termoestabilidade foi observada a 45 e 50 °C por 18 horas de incubação, mantendo uma atividade residual acima de 70%. O efeito de íons, EDTA e possíveis inibidores (furfural e 5-hidroximetil furfural) também foi analisado. A AxeAN apresentou 100% de atividade relativa na presença de Mn²⁺, Na⁺ e K⁺ em concentrações de 1 mmol. L⁻¹ e 5 mmol. L⁻¹. Não foi observado efeito negativo com o uso de EDTA em sua atividade. Por outro lado, houve um aumento na atividade com furfural e 5-hidroximetil furfural. Os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando *p*NPA como substrato, os valores de K_M e V_{máx} foram de 0,098 mM e 320,1 U. mg⁻¹, respectivamente. O efeito sinérgico da AxeAN foi avaliado juntamente com uma endo-1,4- β -xilanasase (MpXyn10) de *Malbranchea pulchella*, utilizando quatro diferentes xilanos (Birchwood, Beechwood, Oat spelt e Arabinoxilano). Os maiores valores foram observados com xilano Birchwood, em especial na produção de xilobiose (13,44 mg. mL⁻¹) com MpXyn10-AxeAN em comparação com apenas MpXyn10, que apresentou uma produção de 10,93 mg. mL⁻¹ após 24 horas a 50 °C. Na segunda parte deste trabalho, para a imobilização enzimática foi preparado suportes à base de agarose (Amino-agarose, Glioxil-agarose e IDA-agarose), assim como a síntese de suportes à base de nanopartículas de ferro magnética (NPM) (GA-APTES-Nano e APTES-Nano). Também foram utilizados os suportes comerciais NPM (GA-APTES-NanoTM e APTES-NanoTM) juntamente com o PuroliteTM um suporte comercial, resultando em um total de oito suportes funcionalizados para a imobilização da AxeAN. Os processos de imobilização foram avaliados, e seis derivados (Amino-agarose, PuroliteTM, GA-APTES-Nano, APTES-Nano, GA-APTES-NanoTM e APTES-NanoTM) foram selecionados para as próximas etapas. Os derivados APTES-Nano e APTES-NanoTM apresentaram as melhores termoestabilidade a 60 °C por até 30 minutos, com 90% de atividade residual, em comparação com a enzima livre, que no mesmo período, apresentou apenas 30% de sua atividade residual. Por fim, o derivado GA-APTES-Nano demonstrou a melhor estabilidade operacional, mantendo 95% de atividade após seis ciclos de reação. Os resultados deste estudo mostram-se promissores para a aplicação da AxeAN em futuras hidrólises de biomassa lignocelulósica, visando a obtenção de xilooligossacarídeos e a aplicação em biorrefinarias.

Palavras – chave: expressão homóloga, acetilxilano esterase, sinergismo, xilooligossacarídeos, imobilização, nanopartícula de ferro magnética.

Abstract

ALVES, Gabriela Souza. **Homologous expression of acetylxylan esterase from *Aspergillus nidulans*: purification, immobilization and functional properties.** 2023. 119 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Acetylxylan esterases (EC 3.1.1.72) are accessory enzymes that catalyze ester bonds of acetyl groups present in the structure of acetylated xylan and are classified in the carbohydrate esterases family (CEs). The general objective of the present work was the homologous expression, production, purification, functional properties, and immobilization of acetylxylan esterase from *Aspergillus nidulans* (AxeAN). Initially, the pEXPYR vector was used to encode the *A. nidulans* acetylxylan esterase gene (AxeAN), followed by transformation into *A. nidulans* A773. This expression system allows the secretion of high protein production. In the first part of this work, recombinant AxeAN was produced, and the extract was concentrated and purified on an anion exchange column (Hiprep Q FF 16/10), followed by a size exclusion column (Superdex 75 10/300 GL). The purified AxeAN was demonstrated by SDS-PAGE, in which a molecular mass of 33.5 kDa was observed. Sequence analysis, molecular modeling of AxeAN, and phylogenetic analysis revealed the presence of the catalytic triad (Ser¹²⁸, His²⁷⁰ and Asp²¹³) and the presence of 10 β -sheets and 10 α -helices, a characteristic profile of proteins belonging to the α/β hydrolase class. Circular dichroism confirmed previous analyses, demonstrating that the structure of AxeAN is composed of α -helices and β -sheets. Purified AxeAN showed a specific activity of 170 U mg⁻¹ determined for the substrate *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA). The effect of pH and temperature was evaluated, and the enzyme demonstrated maximum activity at pH 7.0 and at 55 °C. AxeAN showed stability over a wide pH range (5.5–9.0), maintaining an average of 80% of its initial activity after 24 hours of incubation. Furthermore, thermostability was observed at 45 and 50 °C for 18 hours of incubation, maintaining a residual activity above 70%. The effect of ions, EDTA, and possible inhibitors (furfural and 5-hydroxymethyl furfural) were also analyzed. AxeAN showed 100% relative activity in the presence of Mn²⁺, Na⁺ and K⁺ at concentrations of 1 mmol. L⁻¹ and 5 mmol. L⁻¹. No negative effect was observed with the use of EDTA on its activity. On the other hand, there was an increase in activity with furfural and 5-hydroxymethyl furfural. The kinetic parameters using *p*NPA as substrate were determined for K_M and V_{máx} were 0.098 mM and 320.1 U. mg⁻¹, respectively. The synergistic effect of AxeAN was evaluated together with an endo-1,4- β -xylanase (MpXyn10) from *Malbranchea pulchella*, using four different xylans (Birchwood, Beechwood, Oat spelt, and Arabinoxylan). The highest values were observed with Birchwood xylan, especially in the production of xylobiose (13.44 mg. mL⁻¹) with MpXyn10-AxeAN compared to just MpXyn10, which presented a production of 10.93 mg. mL⁻¹ after 24 hours at 50 °C. In the second part of this work, agarose-based supports (Amino-agarose, Glyoxyl-agarose and IDA-agarose) were prepared for enzymatic immobilization, as well as the synthesis of supports based on magnetic iron nanoparticles (NPM) (GA- APTES-Nano and APTES-Nano). Commercial NPM supports (GA-APTES-NanoTM and APTES-NanoTM) were also used together with PuroliteTM, a commercial support, resulting in a total of eight functionalized supports for AxeAN immobilization. The immobilization processes were evaluated, and six derivatives (Amino-agarose, PuroliteTM, GA-APTES-Nano, APTES-Nano, GA-APTES-NanoTM and APTES-NanoTM) were selected for the next steps. The APTES-Nano and APTES-NanoTM derivatives showed the best thermostability at 60 °C for up to 30 minutes, with 90% residual activity, compared to the free enzyme, which showed only 30% of its residual activity in the same period. Finally, the GA-APTES-Nano derivative demonstrated the best operational stability, maintaining 95% activity after six reaction cycles. The results of this study are promising for the application of AxeAN in future hydrolysis of lignocellulosic biomass, aiming to obtain xylooligosaccharides, and their application in biorefineries.

Keywords: homologous expression, acetylxylan esterase, synergism, xylooligosaccharides, immobilization, magnetic iron nanoparticle.